



**J. Philipp Junker, Christian Popp, Nikolaus Rajewsky**

---

## **2. Einzelzellgenomik verändert die Entwicklungsbiologie**

In:

Walter, Jörn / Schickl, Hannah (Hrsg.): Einzelzellanalyse in Forschung und Medizin : eine Stellungnahme der interdisziplinären Arbeitsgruppe Gentechnologiebericht.

ISBN: 978-3-939818-84-7

Berlin-Brandenburgische Akademie der Wissenschaften, 2019. S. 23-37

Persistent Identifier: urn:nbn:de:kobv:b4-opus4-32809

---

Die vorliegende Datei wird Ihnen von der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz zur Verfügung gestellt.



## 2. EINZELZELGENOMIK VERÄNDERT DIE ENTWICKLUNGSBIOLOGIE

### 2.1 EINFÜHRUNG

Neue Entwicklungen in der Einzelzellgenomik verändern seit einigen Jahren die Entwicklungsbiologie grundlegend. Forscher haben schnell das Potenzial der Einzelzell-Transkriptomik<sup>1</sup> für eine systematische Identifizierung von Zelltypen erkannt, was eine große Verbesserung gegenüber den zuvor verwendeten Ansätzen darstellt, die beispielsweise auf der Morphologie (also auf der Struktur und Form) von Zellen basierten oder mit einer nur geringen Zahl von Markergenen durchgeführt wurden. Neue, umfassende Zelltypatlanten basierend auf Einzelzellgenomik sind eine überaus wertvolle Ressource für die Wissenschaft, da sie beispielsweise eine systematischere Analyse der Auswirkungen von Mutationen ermöglichen, indem sie zeigen, in welchem Zelltyp das mutierte Gen exprimiert wird (Projekte: Human Cell Atlas, Tabula Muris oder Fly Cell Atlas, die zum Ziel haben, alle Zelltypen des jeweils untersuchten Organismus basierend auf Einzelzell-Transkriptomik zu identifizieren).<sup>2</sup> Allerdings bewegen sich aktuelle Arbeiten im Bereich der Einzelzellgenomik, wie im Folgenden näher erläutert wird, über die Zelltypidentifizierung hinaus in Richtung funktionale Informationen über die Auswirkungen von Störungen, den Ursprung von Zelltypen, Differenzierungspfade sowie räumliche Architektur von Geweben und Mechanismen der Genregulierung (Griffiths et al., 2018). Aufgrund ihrer genetischen Zugänglichkeit, ihrer hochgradigen experimentellen Reproduzierbarkeit und des detaillierten Wissens über wichtige Entwicklungsmechanismen, das in jahrzehntelanger Forschung angesammelt wurde, dienen die entwicklungsbiologischen Modellorganismen aktuell häufig als Startpunkt für neue experimentelle und rechnerische Methoden, die dann später auf Krankheitsmodelle oder Proben menschlicher Patienten angewendet werden können. Die Einzelzell-Transkriptomik ist bei Weitem die fortgeschrittenste der

1 Transkriptomik ist die Untersuchung der Gesamtheit aller Transkripte (RNA-Abschriften der DNA) innerhalb einer Zelle und ermöglicht Rückschlüsse darüber, welche Gene in einer bestimmten Zelle exprimiert sind.

2 Bei allen diesen Projekten geht es um die Erstellung von Referenzkarten aller Zellen des untersuchten Organismus (z. B. Mensch, Maus, Fliege). So ist es das Ziel des Human Cell Atlas, „umfassende Referenzkarten aller menschlichen Zellen (der grundlegenden Einheiten des Lebens) zu erstellen, als Grundlage für ein Verständnis für die menschliche Gesundheit und für die Diagnostik, Überwachung und Behandlung von Krankheiten“. Siehe unter: <https://www.humancellatlas.org/> [24.06.2019].

sogenannten Einzelzell-Omics-Technologien und wird somit den größten Teil dieses Kapitels ausmachen, das einen Überblick über die aktuellen Entwicklungen zur Einzelzellgenomik in der Grundlagenforschung liefert. Allerdings entwickeln sich auch Einzelzellmessungen anderer Parameter, insbesondere die Proteomik und DNA-Methylierung sowie die Messung offenen Chromatins,<sup>3</sup> schnell und werden hier ebenfalls behandelt.

## 2.2 STÖRUNGSANALYSE IN ENTWICKLUNGSMODELLSYSTEMEN

Entwicklungsmodelle, die zur Einzelzellanalyse häufig herangezogen werden, sind klassische Tiermodellorganismen wie Fruchtfliegen, Zebrafische und Mäuse, die sich besonders gut für genetische Studien eignen.<sup>4</sup> Eine wichtige neuere Ergänzung hierzu sind aus humanem Material von Patienten gewonnene Organoide,<sup>5</sup> die erstmals menschliches Gewebe für Genveränderungen zugänglich machen (Camp/Treutlein, 2017). Dies ist etwa bei humanen Hirnorganoiden von besonderer Bedeutung, da die einzigartigen Eigenschaften des menschlichen Gehirns im Tiermodell nur schlecht wiedergeben werden können. Die Einzelzellanalyse ermöglicht Studien zur Auswirkung genetischer Störungen auf Entscheidungen über das Zellschicksal. Dies wird bereits regelmäßig in Vergleichen zwischen Wildtypen und mutierten Tieren durchgeführt, oder auch in einer aktuellen Publikation zur frühen mesodermen<sup>6</sup> Spezifizierung durch die Analyse von Mosaiktieren (Pijuan-Sala et al., 2019). In dieser Studie haben die Autoren einen chimären Mausembryo aus Wildtyp- und  $Tal1^{-/-}$ -Zellen geschaffen, der einen direkten Vergleich des

- 3 Proteomik bezieht sich auf die Untersuchung der Gesamtzahl der in einer einzelnen Zelle nachgewiesenen verschiedenen Proteine. Die DNA-Methylierung ist eine biochemische Modifizierung von DNA, die sich auf den Zustand des Chromatins (Komplex aus DNA und den zugehörigen Proteinen) auswirkt, der wiederum die Genexpression reguliert und beeinflusst. Offenes Chromatin meint die Teile des Genoms, die regulatorische Proteine binden können. Diese Regionen sind typischerweise an der Kontrolle der Genexpression beteiligt.
- 4 In sog. Störungsstudien („perturbation studies“) werden spezifische Gene unterbrochen, um die Auswirkung dieser Störung auf die Entwicklung der jeweiligen Zelle untersuchen zu können. Daraus lässt sich die Funktion des Gens ableiten.
- 5 Organoide sind dreidimensionale Stammzellkulturen, die auf der funktionalen Ebene Organen gleichen. Sie sind mehrzellige Einheiten, können dreidimensionale Strukturen bilden und zeigen Funktionen, die typisch sind für das nachgeahmte Organ (Bartfeld/Clevers, 2018).
- 6 Keimblätter bestehen aus verschiedenen Zellschichten im Embryoblasten, die sich fortlaufend ausdifferenzieren und während der Embryonalentwicklung unterschiedliche Gewebe und Organe hervorbringen. Die drei Keimblätter nennt man Endoderm (Innenschicht), Ektoderm (Außenschicht) und Mesoderm (Mittelschicht). Aus dem Mesoderm bilden sich unter anderem Blut, Muskeln und Knochen.

Differenzierungspotenzials des Wildtyps und der mutierten Zelle in demselben Tier ermöglichte.<sup>7</sup>

Über die klassischen genetischen Störungen hinaus kann die Einzelzellanalyse auch in idealer Weise die molekularen und zellulären Auswirkungen anderer Störungen analysieren. Ein besonders beeindruckendes Beispiel für diese Art der Anwendung ist die Regeneration von Gliedmaßen beim Axolotl nach deren Amputation. In einer diesbezüglichen Studie konzentrieren sich Gerber et al. (2018) auf die Identifikation der Zelltypen, die vorübergehend an der Verletzungsstelle erscheinen, um die Skelettregeneration in Gang zu bringen. Durch die Kombination der Einzelzellanalyse mit der Verfolgung der genetischen Abstammung nach Brainbow (einer Methode, bei der einzelne Zellen mit fluoreszierenden Proteinen gefärbt werden) fanden sie heraus, dass es keine bereits existierenden Stammzellen gab. Stattdessen beobachteten sie, dass eine heterogene Zellpopulation (sogenannte Fibroblasten) stammzellartige Eigenschaften annahm und sich in Vorläuferzellen für die neu zu bildenden Skelettelemente entwickelte.

Seit einigen Jahren ist ein vermehrtes Forschungsinteresse an neuen Modellorganismen zu beobachten, was vor allem daher rührt, dass die Einzelzell-Transkriptomik die Identifizierung von Zelltypen und Differenzierungspfaden deutlich erleichtert hat. Daneben steht mit dem Aufkommen von Gene-Editing durch CRISPR/Cas9<sup>8</sup> ein einfaches Hilfsmittel zur Verfügung, um transgene Tiere vieler Arten zu produzieren. Neben der oben genannten Arbeit am Axolotl sind weitere interessante Beispiele Evolutionsstudien an Ringelwürmern und an der Seeanemone *Nematostella* (Achim et al., 2018; Sebé-Pedrós et al., 2018). Diese Projekte beginnen, zusammen mit neuartigen Computermethoden zum Vergleich von Einzelzell Datensätzen unterschiedlicher Spezies, zunehmend interessante Einblicke in die Entwicklung von Zelltypen zu gewähren.

Die Kombination aus Einzelzellgenomik und CRISPR/Cas9-Genome-Editing hat nicht nur zu gesteigertem Interesse an neuen Modellsystemen geführt, sondern inspiriert auch die Methodenentwicklung in anderen Bereichen wie zum Beispiel

7 Mosaiktiere bestehen aus mindestens zwei unterschiedlichen Zellpopulationen mit unterschiedlichem Chromosomengehalt. Der beschriebene chimäre Mausembryo ist so ein Mosaik aus normalen Zellen („Wildtyp“) und sogenannten  $Tal1^{-/-}$ -Zellen, denen der Transkriptionsfaktor Tal1 auf beiden Chromosomen fehlt. Tal1 (die Abkürzung steht für „T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1“) spielt eine Rolle in der Regulierung von Genen, die mit Leukämie in Zusammenhang stehen.

8 CRISPR/Cas ist eine Methode zur Bearbeitung von Genen durch Einschnitte an bestimmten vordefinierten Stellen im Genom, die von Guide-RNA identifiziert werden.

Perturbation Screening und Lineage Tracing<sup>9</sup> (wobei auf Letztere im Folgenden näher eingegangen werden soll). Bei CRISPR-Screens wird Cas9 in kultivierte Zellen eingebracht, zusammen mit einer Vielzahl sogenannter „single guide RNAs“ (sgRNAs),<sup>10</sup> die auf unterschiedliche Gene abzielen. Eine Auslesung durch Einzelzell-Transkriptomik ermöglicht dann eine Verbindung der Aktivität einer spezifischen sgRNA mit Veränderungen in der Genexpression (Dixit et al., 2016; Jaitin et al., 2016; Datlinger et al., 2017). Diese Methoden sind zwar aktuell noch auf kultivierte Zellen beschränkt und noch nicht anwendbar auf Entwicklungsmodellsysteme, aber sie versprechen viel für die systematische Identifizierung genregulierender Netzwerke.

### 2.3 RÄUMLICHE INFORMATIONEN

In Geweben und Organen sind Zellen in speziellen räumlichen Strukturen angeordnet, die für deren ordnungsgemäße Funktion notwendig sind. Außerdem werden Zellen stark von ihrer Umgebung beeinflusst (z. B. die Umgebung von Stammzellen, sog. Stammzellnischen) sowie von den Signalen, die sie sich untereinander zusenden. Die Einzelzellgenomik erfordert typischerweise allerdings eine Trennung der Proben in eine Einzelzellsuspension, sodass bei den meisten Ansätzen alle Informationen über die räumliche Anordnung verloren gehen. Aktuell konzentriert man sich in der akademischen Welt wie auch in der industriellen Forschung stark darauf, die räumlichen Informationen bei der Einzelzellanalyse zu erhalten. Entsprechende Ansätze können grob in drei Kategorien unterteilt werden:

1. Methoden, die zusätzliche räumliche Informationen nutzen, die in der Mikroskopie erfasst wurden. Wenn die räumlichen Expressionsmuster zellspezifischer Markergene bekannt sind, dann können Zellen nach diesen Orientierungsgenen ausgerichtet werden (Satija et al., 2015; Karaiskos et al., 2017). Interessanterweise haben die Labore von Rajewsky und Friedman kürzlich gezeigt, dass die räumlichen Expressionsmuster größtenteils aus ersten Prinzipien abgeleitet werden können, auch ohne zusätzliche Informationen,

9 Perturbation Studies untersuchen systematisch den Einfluss von Störungen der Genexpression (z. B. durch gezieltes Editieren, Ausschalten bzw. Überexprimieren von Genen) auf den Phänotyp und die Entwicklung von Zellen. Als Lineage Tracing bezeichnet man die Untersuchung aller Nachkommen einer Zelle. Die beiden Methoden können auch miteinander kombiniert werden.

10 „Single guide RNA“ („ribonucleic acid“; Ribonukleinsäure) lenkt Cas9 an die Stelle, an der geschnitten werden soll.

da die meisten Gene in einfachen Mustern mit glatten Übergängen exprimiert werden (novoSpaRc<sup>11</sup>).

2. Andere Methoden nutzen die Mikroskopie-basierte Detektion von Gen-expression mit räumlicher Auflösung (FISH<sup>12</sup>). Da diese mikroskopischen Methoden nur eine geringe Zahl von Genen nachweisen können, werden mehrere Runden von Experimenten benötigt, um Hunderte von Genen zu detektieren. Kürzlich wurde dieser Ansatz zum ersten Mal auf die Ebene des gesamten Transkriptoms gehoben (Eng et al., 2017). Ein wichtiger Vorteil dieser bildbasierten Techniken ist deren viel höhere Transkript-Erkennungsrate als bei sequenzbasierten Ansätzen, da sie auf Hybridisierung und nicht auf der oft ineffizienten reversen Transkriptionsreaktion beruhen. Dennoch sind diese Methoden noch immer arbeitsaufwendig im Aufbau und zeitaufwendig in der Durchführung.
3. Zudem gibt es neuartige Methoden, bei denen molekulare Barcodes (in Form kurzer DNA-Sequenzen) räumliche Informationen direkt in Gewebeschnitten codieren. Diese Ansätze basieren entweder auf Abfolgen von Primern<sup>13</sup> mit Barcodes für die reverse Transkription, die auf eine Oberfläche aufgebracht werden (Stahl et al., 2016), oder auf Kügelchen mit Barcodes, die auf einer Oberfläche positioniert werden (Rodriques et al., 2019).

## 2.4 ZEITLICHE INFORMATIONEN – PSEUDOTEMPORALE ORDNUNG

Neben der räumlichen Information gibt es eine weitere große Herausforderung in der Einzelzellgenomik, die Aufnahme zeitlicher Informationen. Da Zellen während der Sequenzierung zerstört werden, ist es nicht möglich, Veränderungen in ihrer Expression sowie Entscheidungen über ihr Schicksal in Echtzeit nachzuverfolgen. Wenn aber die Anzahl Zellen in einer Probe groß genug ist, dann können auch

- 11 novoSpaRc ist eine Rechenmethode zur Vorhersage von Lokalisierungen einzelner Zellen im Raum allein durch die Nutzung von Daten aus Einzelzell-RNA-Sequenzierung. Abstände einzelner Zellen im Expressionsraum werden dabei in deren physische Abstände im Gewebe übertragen.
- 12 FISH ist eine Technik, bei der die spezifische Bindung bestimmter Zielgene bzw. ihrer Transkripte an Nukleinsäuresequenzen genutzt und durch fluoreszierende Marker sichtbar gemacht wird. Diese Fluoreszenz erlaubt Rückschlüsse auf das Vorhandensein und ggf. die räumliche Verteilung der Nukleinsäuren in der Probe.
- 13 Primer sind Oligonukleotide, also kurze Schnipsel aus DNA oder RNA (bis ca. 30 Basen lang), die als Ausgangspunkt für die Synthese von DNA oder RNA durch bestimmte Enzyme (Polymerasen) dienen.

vorübergehende (und somit seltene) Zustände im Datensatz erkannt werden. Somit ist es möglich, Zellen entlang einer abgeleiteten, sogenannten pseudotemporalen Trajektorie<sup>14</sup> anzuordnen (Moignard et al., 2015; Setty et al., 2016; Haghverdi et al., 2016; Kester/van Oudenaarden, 2018). Für kurzfristige Prozesse, die kontinuierlich ablaufen (wie z. B. Hämatopoese), kann so der gesamte Vorgang der transkriptionellen Veränderungen in einem einzigen Experiment erfasst und per Computer rekonstruiert werden (siehe Aliee, Sacher, Theis, Kapitel 4).

Während mit den Methoden der pseudotemporalen Ordnung von Einzelzell-Transkriptomen Zellen effizient entlang kontinuierlicher Trajektorien geordnet werden, geht die Richtung des Differenzierungsvorgangs aus den Daten allein nicht eindeutig hervor. La Manno et al. (2018) haben kürzlich die RNA-Geschwindigkeitsanalyse vorgestellt, eine Rechenmethode, bei der die Richtung im Genexpressionsraum, in die Zellen sich bewegen, basierend auf ungesplizten vs. gesplizten<sup>15</sup> (d. h. „neuen“ vs. „alten“) Transkriptmolekülen abgeleitet wird. Eine weitere neue Methode, um in die unmittelbare Zukunft von Zellen zu blicken, ist die metabolische Markierung von RNA (Hendriks et al., 2018; Erhard et al., 2019), durch die, basierend auf Markierungen, die experimentell in einem vorgegebenen Zeitfenster in RNA-Moleküle eingebracht werden, alte von neuen Molekülen getrennt werden können.

Trotz der relativen Neuartigkeit der pseudotemporalen Ordnung gibt es bereits zahlreiche biologische Anwendungsbereiche. Dazu gehören eine vollständige Differenzierungstrajektorie für Planarien (Plass et al., 2018) sowie eine Studie, die Übergänge zwischen Venen und Arterien in der koronaren Entwicklung bei der Maus aufgezeigt hat (Su et al., 2018). In erweiterten Ansätzen werden Einzelzell-Transkriptome in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gemessen und anschließend mit dem Computer die verschiedenen Zeitpunkte zu kontinuierlichen Trajektorien verbunden (Farrell et al., 2018; Wagner et al., 2018).

14 Für die pseudotemporale Analyse (Pseudozeitanalyse) werden die sequenzierten Zellen nach Ähnlichkeit ihres Transkriptoms geordnet. Die daraus resultierende Folge an Einzelzell-Transkriptomen wird als „Trajektorie“ (Entwicklungsverlauf) bezeichnet und als zeitliche Abfolge von Zellzuständen interpretiert, d. h. als gradueller Übergang vom Stammzellenstadium hin zur differenzierten Zelle.

15 Nach der Transkription durchläuft die RNA Modifizierungen, die zu deren Reifung führen. „Splicing“ ist der Vorgang, bei dem bestimmte Teile der Original-RNA (Introns) ausgeschnitten und entsorgt werden, während die verbleibenden Teile (Exons) zu einer reifen RNA verbunden werden.

## 2.5 ZEITLICHE INFORMATIONEN – ABSTAMMUNGSANALYSE MIT HOHEM DURCHSATZ

Während die pseudotemporale Ordnung und die metabolische RNA-Markierung kurzfristige zeitliche Informationen liefern, wären Informationen über Verhältnisse zwischen Zellen über längere Zeiträume wünschenswert – über Tage, Monate, ja sogar Jahre. Der Bereich der Abstammungsverfolgung macht sich schon lange visuelle Marker (z. B. Fluorophore) zunutze, um Zellen zu markieren und nachzuvollziehen. In neuerer Zeit ist es mit dem Aufkommen der Einzelzellgenomik möglich geworden, die enorme Informationsspeicherkapazität des Genoms zu nutzen, um die Abstammungsverbindungen von Zellen zu bestimmen. Sequenzbasierte Methoden zur Abstammungsanalyse fallen grob in zwei Kategorien: solche, bei denen natürlich vorkommende Mutationen genutzt werden, und solche, bei denen das Genom aktiv modifiziert werden soll.

In der Theorie sind natürlich vorkommende somatische Mutationen (wie z. B. Einzelnukleotidvariationen oder Variationen in der Anzahl Kopien) leistungsstarke Abstammungsmarker, die in der Sequenzierung ausgelesen werden können. Da die Abstammungsnachverfolgung anhand somatischer Mutationen nicht invasiv ist und keine kontinuierliche Beobachtung erfordert, ist sie ideal zur Untersuchung humaner Proben geeignet. In den letzten Jahren wurde diese Strategie in Pionierstudien für frühe Entscheidungen über embryonische Abstammung übernommen. An Organoiden aus einzelnen Mauszellen (Behjati et al., 2014) und in großen Mengen analysierten Humanblutproben (Lodato et al., 2015) haben Analysen somatischer Mutationen eine Rekonstruktion früher embryonischer Abstammungsbäume ermöglicht. In einem neueren richtungsweisenden Paper des Walsh-Labors haben die Autoren nach Genom-Sequenzierung einzelner Zellen Neuronen aus postmortalen menschlichen Gehirnen in einen entwicklungsbezogenen Abstammungsbaum geordnet (Ju et al., 2017). Die generelle Anwendung dieses Ansatzes wird aktuell aber noch durch die hohen Kosten der Sequenzierung des gesamten Genoms einer großen Anzahl Einzelzellen gebremst. Die Abstammungsnachverfolgung basierend auf Mutationen in Mitochondrien (die eine viel höhere Mutationsrate haben) ist eine vielversprechende Alternative zur Abstammungsnachverfolgung mit hohem Durchsatz bei Menschen (Ludwig et al., 2019).

Solche Ansätze sind zwar ideal für menschliche Proben geeignet, aber für Modellorganismen sind Techniken der Abstammungsnachverfolgung basierend auf experimenteller Modifikation normalerweise die bessere Wahl, weil dabei eine bessere

Kontrolle möglich ist. Experimentell kontrollierte Genommodifikationen zur Abstammungsnachverfolgung sind per Rekombination durch synthetische Cre/lox-Kassetten<sup>16</sup> (Pei et al., 2017) oder mit der CRISPR/Cas9-Technologie möglich. Abstammungsnachverfolgung mit hohem Durchsatz basierend auf CRISPR/Cas9 in Kombination mit Zelltypidentifizierung per Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurde kürzlich an Zebrafischen (Alemany et al., 2018; Raj et al., 2018; Spanjaard et al., 2018) und Mäusen (Kalhor et al., 2018; Chan et al., 2019) durchgeführt. Es bleiben zwar viele experimentelle und rechnerische Herausforderungen bestehen, aber die CRISPR/Cas-Methode zur Abstammungsnachverfolgung ist als genereller Ansatz zur Identifizierung des entwicklungsbezogenen Ursprungs von Zelltypen und für Einblicke in Mechanismen zelltypabhängiger Erkrankungen besonders vielversprechend.

## 2.6 MESSUNG ANDERER PARAMETER ALS RNA

Wie bereits erwähnt, ist die RNA-Sequenzierung die am weitesten entwickelte Technologie in der Einzelzellgenomik. Aber Messungen anderer Parameter sind auf dem Vormarsch, insbesondere die Messung offenen Chromatins, DNA-Methylierung und Einzelzellprotein-detektion. Einzelzell-ATAC-Sequenzierung (scATAC-seq), eine neue Methode zur Messung offenen Chromatins, kann inzwischen dank neuer Protokolle zum Einfügen von DNA-Barcodes in einzelne Zellen routinemäßig an Tausenden von Zellen durchgeführt werden. Zu den Anwendungsmöglichkeiten gehören Atlanten zur Zugänglichkeit von Chromatin bei Mäusen (Cusanovich/Hill et al., 2018) und in der Entwicklung von *Drosophila* (Cusanovich/Reddington et al., 2018). In einer bemerkenswerten neueren Publikation haben Yoshida et al. (2019) Epigenom- und Transkriptommessungen an 86 primären Immun-Zelltypen aus der Maus generiert und dadurch wichtige Erkenntnisse darüber gewonnen, welche Mechanismen der Genregulation für die Steuerung von Zelldifferenzierung im Immunsystem wichtig sind.

Während scATAC-seq von der Wissenschaft schnell angenommen wird, ist der Einsatz der Einzelzell-DNA-Methylierung bisher beschränkt auf relativ wenige Labore, was wahrscheinlich vor allem an den hohen Kosten der DNA-Methylierungsanalyse liegt. Dabei hat sie bereits wichtige Einblicke geliefert, insbesondere in die frühe Entwicklung. Rulands et al. (2018) haben beispielsweise

<sup>16</sup> Cre/lox-Kassetten sind ein System, das Genveränderungen in bestimmten Zelllinien in lebenden Tieren ermöglicht.

unerwartete Schwankungen im Genombereich in der DNA-Methylierung beim Austritt aus der Pluripotenz festgestellt. Wichtig ist hier, dass die DNA-Methylierung bereits erfolgreich mit RNA-Messungen aus denselben Einzelzellen kombiniert werden konnte (Clark et al., 2018).

Während die Proteindetektion in Einzelzellen im Bereich des vollen Proteoms bisher nicht erfolgreich etabliert werden konnte, gibt es bereits äußerst vielversprechende Ansätze zum Nachweis von Protein-Panels: Die Einzelzell-Massenzytometrie (Bendall et al., 2011) ermöglicht durch den Einsatz von mit Schwermetallen markierten spezifischen Antikörpern den parallelen Nachweis zahlreicher Proteine in Einzelzellen. Dafür binden Antikörper gepaart mit bestimmten Isotopen von Übergangselementen an ihre Epitope, also an ihre Bindungsstellen an den zu untersuchenden Proteinen. Einzelne Zellen werden dann vaporisiert und zu Plasma ionisiert, und elementare Ionen werden mithilfe von sogenannter Flugzeitmassenspektrometrie erkannt.<sup>17</sup> Ein weiterer Sequenzierungsansatz ist CITE-seq (Stoeckius et al., 2017), die einen gleichzeitigen Nachweis von mit Oligonukleotiden markierten Antikörpern und Transkriptom-Messungen in einer effizienten Einzelzellauslesung ermöglicht.

Mit mehr und mehr Datensätzen auf der Basis unterschiedlicher Messtechniken wird in diesem Bereich immer deutlicher, dass neuartige Computermethoden zur Datenintegration erforderlich sind. Dazu gehört u.a. die Abstimmung der Zelltypen, die durch scRNA-seq and scATAC-seq identifiziert wurden, aber auch die Entfernung von Unterschieden zwischen scRNA-seq-Datensätzen, die auf technische Artefakte zurückzuführen sind (z.B. Masseneffekte durch Dissoziationstechniken). In letzter Zeit wurden mehrere vielversprechende Computerverfahren vorgestellt (Barkas et al., 2018; Butler et al., 2018; Haghverdi et al., 2018).

Die Einzelzellanalyse verändert unser Verständnis von biologischer Entwicklung. Mithilfe neuer Methoden und Ansätze haben Entwicklungsbiologen Hilfsmittel an die Hand bekommen, mit denen sie lang verborgene Geheimnisse in der räumlichen und zeitlichen Gewebeorganisation lüften können. Dieses fundamentale Wissen bietet nicht nur eine bessere Sicht auf biologische Prozesse im gesunden Zustand, es bietet auch Gelegenheit, sich auf Abweichungen von der Norm zu konzentrieren, die zu Krankheiten führen. Im letzten Abschnitt wird die neue europäische Initiative LifeTime vorgestellt, die die Einzelzellanalyse in die

<sup>17</sup> In der Flugzeitmassenspektrometrie wird das Verhältnis der Masse eines Ions zu dessen Ladung mit Flugzeitmessung bestimmt. Ionen werden durch ein elektrisches Feld von bekannter Stärke beschleunigt.

Lage versetzen soll, unser Verständnis, die frühe Diagnostik, Überwachung und Behandlung verschiedenster Erkrankungen in Richtung Innovation und personalisierte Medizin voranzutreiben.

## 2.7 LIFETIME: EINE NEUE INITIATIVE BASIEREND AUF EINZELZELLANALYSE

Die Aussagekraft von Einzelzellanalysetechnologien wurde nicht nur kürzlich von der Fachzeitschrift *Science* anerkannt, die diese als „Durchbruch des Jahres 2018“ feierte (Pennisi, 2018), sondern hat auch die Gründung der europäischen Forschungsinitiative LifeTime inspiriert. Das Konsortium besteht aus Hunderten von Forschern in 18 europäischen Ländern und wird von allen wichtigen europäischen Wissenschaftsakademien, von vielen nationalen Regierungen sowie von über 70 Firmen unterstützt. Ihr Ziel besteht darin, menschliche Zellen zu begreifen und zu kartieren, um dann in der Behandlung von Krankheiten bei Patienten direkt ansetzen zu können. Durch das Ausschöpfen des vollen Potenzials von Einzelzelltechnologien, künstlicher Intelligenz und individuell gestalteten experimentellen Krankheitsmodellen (wie Organoiden) möchten die LifeTime-Forscher den Krankheitsbeginn besser vorhersagen und Krankheiten durch gezielte Analyse des patienteneigenen Gewebes behandeln. Um dies erreichen zu können, muss erst verstanden werden, wie Genome innerhalb von Zellen funktionieren, um zu entziffern, wie Zellen Gewebe bilden, und die Dynamiken zu identifizieren, die von einer gesunden Zelle oder vom gesunden Gewebe zu einem pathologischen Zustand führen.

Einzelzelltechnologien bieten eine gute Möglichkeit zur Überwindung einiger der grundlegenden Defizite in unseren aktuellen wissenschaftlichen Ansätzen, zum Beispiel durch die Lösung der räumlichen zellulären Heterogenität oder die Erfassung zellulärer Veränderungen im Laufe der Zeit. Wichtig ist, dass die Erfindung und Nutzung neuer Computer-Tools und künstlicher Intelligenz von entscheidender Bedeutung für das Erreichen der Ziele von LifeTime sein werden. Dadurch wird es erst möglich sein, die generierten Daten zu integrieren und nicht nur den gesunden Zustand, sondern auch die Ursache und Biologie von Krankheiten zu verstehen. Die Verbesserung experimenteller Krankheitsmodelle durch die Anwendung neuer Technologien in der Genommodifikation und Zellumprogrammierung wird es den LifeTime-Forschern möglich machen, Genome und Zellen aus Patientengeweben zu verändern.

Zur Erleichterung der Profilierung mehrerer Schichten der Genomregulierung – ein wichtiger Schritt hin zu den Zielen von LifeTime – müssen auch Einzelzell-Multi-Omics und Bildgebung weiterentwickelt und integriert werden (z. B. Transkriptom, Epigenom, Metabolom, Proteom etc.). Außerdem werden starke Bemühungen in der experimentellen Skalierung nötig sein, um den erforderlichen Probendurchlauf mit der richtigen analytischen Auflösung zu erreichen. Angesichts der Erfahrung mit der Entwicklung anderer Technologien in der Vergangenheit (z. B. DNA-Sequenzierung) können innerhalb von einigen Jahren adäquate Fortschritte und damit einhergehende signifikante Kostensenkungen erwartet werden. Tatsächlich ist dies bei einigen Einzelzelltechnologien bereits heute der Fall, die aktuell mit Millionen von Zellen pro Probe arbeiten.

Weitere Entwicklungen werden auch bei anderen Technologiesäulen erforderlich sein, auf denen LifeTime aufgebaut ist – nicht zuletzt an der Schnittstelle zwischen technologischen Bereichen. Manche sind naturgemäß eng miteinander verbunden wie zum Beispiel die Anpassung rechnerischer und statistischer Techniken an die Skalierung und Integration von Einzelzell-Multi-Omics. Auch werden mit dem Aufkommen detaillierter molekularer und räumlicher Zellreferenzkarten neue Machine-Learning-Tools nötig sein, um die Integration von Patiententrajektorien zu erleichtern und den Krankheitsweg des Patienten anhand elektronischer Krankenakten vorhersagen zu können. Außerdem wird es notwendig sein, neue Computermethoden zu entwickeln, um mechanistisch zu verstehen, was den Transkriptionszustand einer Zelle vorantreibt und letztlich, was dessen präzise Funktion im Zusammenhang mit einem spezifischen Gewebe ist (siehe Aliee, Sacher, Theis, Kapitel 4). Dieses verbesserte Wissen um Ursache und Wirkung in zellulären Regulierungsprofilen wird ein Sprung in Richtung personalisierte Medizin sein. Mit der Anwendung von patientenabgestimmten Organoiden und Organ-on-a-Chip-Modellen, die ebenfalls weiterentwickelt und verbessert werden, möchten die LifeTime-Forschenden die Translation in die Klinik erreichen. Dies wird den Übergang von personalisierten experimentellen Krankheitsmodellen zu aussagekräftigen Vorhersagesystemen vorantreiben.

Das LifeTime-Toolkit aus Methoden und Technologien (LifeTime Technology Platform) wird für eine große Bandbreite an Erkrankungen nutzbar sein. Dazu gehören neurologische Erkrankungen, Infektionskrankheiten, Krebserkrankungen und viele andere Krankheitsfelder. Die Auswahl der Erkrankungen, die mit der LifeTime Technology Platform untersucht werden sollen, erfolgt über einen interaktiven, transparenten und von Kollegen geprüften Prozess, genannt „LifeTime

Launchpad“. Darin wird eine Reihe von Parametern berücksichtigt, wie zum Beispiel die Auswirkungen auf die Gesellschaft, die Heterogenität auf der Zellebene, die Verfügbarkeit von Zellmodellen, die klinische Machbarkeit etc. Der Mechanismus bleibt auch während der Umsetzungsphase von LifeTime erhalten, damit neue Ideen und Gelegenheiten untersucht werden können, sobald sie aufkommen.

## 2.8 LITERATUR

Achim, K. et al. (2018): Whole-Body Single-cell sequencing reveals transcriptional domains in the annelid larval body. In: *Molecular biology and evolution* 35(5): 1047–1062.

Aleman, A. et al. (2018): Whole-organism clone tracing using single-cell sequencing. In: *Nature*, Online-Publikation 28.03.2018. DOI: 10.1038/nature25969.

Barkas, B. et al. (2018): Wiring together large single-cell RNA-seq sample collections. In: *BioRxiv*, Online-Publikation 02.11.2018. DOI: 10.1101/460246.

Bartfeld, S./Clevers, H. (2018): Aus Stammzellen abgeleitete Organoide und ihre Bedeutung für die biomedizinische Forschung und Therapie. In: Zenke, M. et al.: *Stammzellforschung*. Nomos, Baden-Baden.

Behjati, S. et al. (2014): Genome sequencing of normal cells reveals developmental lineages and mutational processes. In: *Nature* 513: 422–425.

Bendall, S. C. et al. (2011): Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. In: *Science* 332(6030): 687–696.

Butler, A. et al. (2018): Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. In: *Nature Biotechnology* 36: 411–420.

Camp, J. G./Treutlein, B. (2017): Human organomics: a fresh approach to understanding human development using single-cell transcriptomics. In: *Development* 144: 1584–1587.

Chan, M. M. et al. (2019): Molecular recording of mammalian embryogenesis. In: *Nature* 570: 77–82.

Clark, S. J. et al. (2018): scNMT-seq enables joint profiling of chromatin accessibility DNA methylation and transcription in single cells. In: *Nature Communication*, Online-Publikation 22.02.2018. DOI: 10.1038/s41467-018-03149-4.

Cusanovich, D. A. et al. (2018): A single-cell atlas of in vivo mammalian chromatin accessibility. In: *Cell* 174(5): 1309–1324.

Cusanovich, D. A. et al. (2018): The cis-regulatory dynamics of embryonic development at single-cell resolution. In: *Nature*, Online-Publikation 14.03.2018. DOI: 10.1038/nature25981.

Datlinger, P. et al. (2017): Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. In: *Nature Methods* 14: 297–301.

Dixit, A. et al. (2016): Perturb-Seq: Dissecting molecular circuits with scalable single-cell RNA profiling of pooled genetic screens. In: *Cell* 167(7): 1853–1866.e17.

Eng, C. H. L. J. et al. (2017): Profiling the transcriptome with RNA SPOTs. In: *Nature Methods* 14: 1153–1155.

Erhard, F. et al. (2019): scSLAM-seq reveals core features of transcription dynamics in single cells. In: *BioRxiv*, Online-Publikation 21.01.2019. DOI: 10.1101/486852.

Farrell, J. A. et al. (2018): Single-cell reconstruction of developmental trajectories during zebrafish embryogenesis. In: *Science* 360(6392): eaar3131.

Gerber, T. et al. (2018): Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration. In: *Science* 362(6413): eaaq0681.

Griffiths, J. A. (2018): Using single-cell genomics to understand developmental processes and cell fate decisions. In: *Molecular Systems Biology*, Online-Publikation 16.04.2018. DOI: 10.15252/msb.20178046.

Haghverdi, L. et al. (2016): Diffusion pseudotime robustly reconstructs lineage branching. In: *Nature Methods* 13: 845–848.

Haghverdi, L. et al. (2018): Batch effects in single-cell RNA-sequencing data are corrected by matching mutual nearest neighbors. In: *Nature Biotechnology* 36: 421–427.

Hendriks, G. et al. (2018): NASC-seq monitors RNA synthesis in single cells. In: *BioRxiv*, Online-Publikation 17.12.2018. DOI: 10.1101/498667.

Jaitin, D. A. et al. (2016): Dissecting immune circuits by linking CRISPR-pooled screens with single-cell RNA-seq. In: *Cell* 167(7): 1883–1896.e15.

Ju, Y. S. et al. (2017): Somatic mutations reveal asymmetric cellular dynamics in the early human embryo. In: *Nature* 543: 714–718.

Kalhor, R. et al. (2018): Developmental barcoding of whole mouse via homing CRISPR. In: *Science* 361(6405): eaat9804.

Karaiskos, N. et al. (2017): The drosophila embryo at single-cell transcriptome resolution. In: *Science* 358(6360): 194–199.

- Kester, L./van Oudenaarden, A. (2018): Single-cell transcriptomics meets lineage tracing. In: *Cell Stem Cell* 23(2): 166–179.
- La Manno, G. et al. (2018): RNA velocity of single cells. In: *Nature* 560: 494–498.
- Locato, M. A. et al. (2015): Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. In: *Science* 360(6256): 94–98.
- Ludwig, L. S. et al. (2019): Lineage tracing in humans enabled by mitochondrial mutations and single-cell genomics. In: *Cell* 176(6): 1325–1339.
- Moignard, V. et al. (2015): Decoding the regulatory network of early blood development from single-cell gene expression measurements. In: *Nature Biotechnology* 33: 269–276.
- Pei, W. et al. (2017): Polylox barcoding reveals haematopoietic stem cell fates realized in vivo. In: *Nature* 548: 456–460.
- Pennisi, E. (2018): Development cell by cell. In: *Science* 362(6421): 1344–1345.
- Pijuan-Sala, B. et al. (2019): A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis. In: *Nature* 566: 490–495.
- Plass, M. et al. (2018): Cell type atlas and lineage tree of a whole complex animal by single cell transcriptomics. In: *Science* 360(6391): eaaq1723.
- Raj, B. et al. (2018): Simultaneous single-cell profiling of lineages and cell types in the vertebrate brain. In: *Nature Biotechnology* 36: 442–450.
- Rodrigues, S. G. et al. (2019): Slide-seq: A scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. In: *Science* 363(6434): 1463–1467.
- Rulands, S. et al. (2018): Genome-scale oscillations in DNA methylation during exit from pluripotency. In: *Cell Systems* 7(1): 63–76.e12.
- Satija, R. et al. (2015): Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nature Biotechnology* 33: 495–502.
- Sebé-Pedrós, A. et al. (2018): Cnidarian cell type diversity and regulation revealed by whole-organism single-cell RNA-seq. In: *Cell* 173(6): 1520–1534.e20.
- Setty, M. et al. (2016): Wishbone identifies bifurcating developmental trajectories from single cell data. In: *Nature Biotechnology* 34: 637–645.
- Spanjaard, B. et al. (2018): Simultaneous lineage tracing and cell-type identification using CRISPR-Cas9-induced genetic scars. In: *Nature Biotechnology* 36: 469–473.
- Ståhl, P. L. et al. (2016): Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. In: *Science* 353(6294): 78–82.

Stoeckius, M. et al. (2017): Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. In: *Nature Methods* 14: 865–868.

Su, T. et al. (2018): Single-cell analysis of early progenitor cells that build coronary arteries. In: *Nature* 559: 356–362.

Wagner, D. E. et al. (2018): Single-cell mapping of gene expression landscapes and lineage in the zebrafish embryo. In: *Science* 360(6392): 981–987.