

Morphologische Analyse von mikroskopierten Zell- und Gewebebildern

Kurzfassung der Dissertation

Vorgelegt von Thomas Temme

In sogenannten *High Throughput/High Content Screenings* wird durch eine Kombination aus moderner Mikroskopie und Bildbearbeitungsverfahren ein hoher Probendurchsatz bei gleichzeitig maximaler Featureextraktion gewährleistet. Große Datenmengen und sich ständig verändernde biologische Fragestellungen stellen die Bildverarbeitung vor immer größere Herausforderungen. Daher wird neben der Hochdurchsatz-Technik auf Hardware-Ebene entsprechende Software benötigt, die in der Lage ist, die aufgezeichneten Daten automatisiert und parallelisiert auszuwerten. Auch heutzutage noch geschieht die Datenauswertung mangels adäquater Software oftmals per manueller Annotation, welche wiederum einen Bias zwischen verschiedenen Wissenschaftlern hat. Da für aussagekräftige Statistiken jedoch große Datensätze zwingend erforderlich sind, sind manuelle Auswertungen in vielen biologischen Anwendungskontexten zu Zeit- und Kostenaufwändig.

Die vorliegende Arbeit setzt sich zum Ziel, die Etablierung von sogenannten Hochdurchsatz-Techniken in drei beispielhaften Anwendungskontexten durch die Entwicklung von Software und Algorithmen zu unterstützen. Die Hauptaufgabe in allen drei Anwendungskontexten liegt in der Algorithmenentwicklung zur automatischen Datenauswertung von mikroskopierten Zell- und Gewebebildern. Dabei sollen die Algorithmen die Morphologie einzelner Zellen untersuchen und auswerten. Gleichzeitig soll sichergestellt werden, dass die Software so autonom wie möglich arbeitet und ein Wissenschaftler als Endanwender möglichst wenig komplexe Konfigurationseinstellungen für die Algorithmen vornehmen muss. Nur so kann ein Hochdurchsatzablauf etabliert werden.

Im ersten Anwendungskontext sollen entwicklungsneurotoxische Effekte von Substanzen im Neurosphärenmodell untersucht werden. Das Neurosphärenmodell erlaubt wichtige Merkmale der Entwicklung des Nervensystems in einem *in vitro*-System nachzubilden. In dieser Arbeit werden Algorithmen vorgestellt, welche Merkmale wie Zelltypidentifizierung, Morphologie, Migrationsdistanz und zelltypenspezifische Dichteverteilungen innerhalb der Migrationsfläche mit hoher Erkennungsrate und wenigen Fehlerkennungen errechnen. Der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz erkennt fluoreszenzgefärbte Neurone mit einer Erkennungsrate von 80 bis 85% gegenüber einer manuellen Zählung. Die Rate der Fehlerkennungen liegt dabei zwischen 10 und 15%. Die Robustheit der Algorithmen wurde mit drei Modellsubstanzen verifiziert: Methylqueckilber (MeHgCl), Acrylamid und epidermalem Wachstumsfaktor (EGF). Diese Modellsubstanzen verringern die neuronale Differenzierung, beeinflussen die Zellmigration in Abhängigkeit von ihrer Konzentration und ändern die Zellverteilung für EGF, welches von den selbst entwickelten Algorithmen mit hoher Genauigkeit im Vergleich zur manuellen Auswertung bestätigt wurde.

Der zweite Anwendungsfall spielt im Kontext der Immunologie. Neutrophile Granulozyten dienen als Bestandteil des Immunsystems dazu, verschiedene Krankheitserreger zu vernichten. Um die zellulären Prozesse bei der Erregerabwehr besser zu verstehen, soll die Bewegung und morphologische Veränderung eines zu Experimentbeginn selektierten neutrophilen Granulozyten über einen Zeitraum mehrerer Stunden untersucht werden. Unter Stimulation mit Chemikalien wird der Prozess der Erregerabwehr simuliert, während die Neutrophilen unter einem Mikroskop sichtbar sind. Dabei ist die Bewegung und morphologische Veränderung der Neutrophilen sehr gut unter der Mikroskoplinse wahrnehmbar. Bei einer statisch fixierten Mikroskoplinse würde der selektierte Neutrophile jedoch nach kurzer Zeit aus dem Bildbereich herauswandern. Um dieses Problem zu beheben wird im Rahmen dieser Arbeit eine Software in Form eines *ImageJ*-Plugins implementiert, welche die Mikroskopkamera automatisch mit dem gewählten Neutrophilen mitbewegt und somit die Zelle über mehrere Stunden verfolgen kann. Während eines Experiments treten Zellokklusionen auf, bei denen verschiedene Neutrophile gehäuft an einer Stelle sind und sich innerhalb des Zeitframes nicht voneinander unterscheiden lassen. Damit die Software trotzdem in der Lage ist, die selektierte Zelle weiter zu verfolgen, wird im Rahmen dieser Arbeit ein Algorithmus vorgestellt, welcher Informationen über mehrere Zeitframes aggregiert, um die selektierte Zelle auch bei Zellokklusionen im Fokus zu behalten. Erste Auswertungen deuten darauf hin, dass dieser Algorithmus in der Lage ist, Zellokklusionen mit einer Genauigkeit von etwa 70 Prozent korrekt aufzulösen.

Der dritte Anwendungsfall spielt im Kontext der Darmkrebsdiagnostik. Die Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Blut korreliert mit der Überlebensrate bei Darmkrebspatienten. Daher zählen Pathologen auf HE gefärbten Gewebebildern die Anzahl an eosinophilen Granulozyten um für einen Patienten daraus eine binäre Diagnose (krebskrank oder gesund) zu stellen. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Ansatz vorgestellt, um die Anzahl an eosinophilen Granulozyten innerhalb eines Gewebeschnitts mit Hilfe der nicht-invasiven CARS-Spektroskopie automatisiert zu zählen und dabei die Arbeit des Pathologen erheblich zu beschleunigen.