

Thora Pommerencke
Dr. sc. hum.

Ein computergestütztes System zur quantitativen Charakterisierung der epithelialen Differenzierung und deren Veränderung bei Störung am Beispiel der Hautirritation

Promotionsfach: Medizinische Biometrie u. Informatik
Doktorvater: Prof. Dr. Hartmut Dickhaus

Unsere Haut unterliegt einem fortlaufenden Erneuerungsprozess, welcher über ein vielschichtiges intra- und interzelluläres Zusammenspiel aus Protein-Expression, Morphologie und Differenzierung der Zellen aufrecht erhalten wird. Für das Verständnis der Haut und ihrer Antwort auf äußere Störungen sind daher Untersuchungen isolierter Komponenten nicht ausreichend. Die Systembiologie mit ihren Methoden zur Modellierung komplexer Systeme ermöglicht eine ganzheitliche Herangehensweise und gewinnt daher zunehmend an Bedeutung. Zur dynamischen Modellierung der Haut werden quantitative Daten zur Proteinexpression sowie Morphologie in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen benötigt. Diese bisher fehlenden räumlichen Daten könnten potentiell durch die Verknüpfung von Experimenten an Gewebekulturen, der Bildaufnahme ganzer Gewebeschnitte mittels „Whole Slide Scanning“ sowie einer nachfolgenden Bildanalyse standardisiert gewonnen werden. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Bildanalyse-Tools zur automatisierten Generierung quantitativer Daten der epidermalen Differenzierung und die Evaluation der gesamten Pipeline zur Datengewinnung am Beispiel der Hautirritation.

Während für die Probenpräparation überwiegend auf etablierte Verfahren zurückgegriffen werden konnte, erforderte die automatisierte Bildanalyse die Entwicklung neuer Methoden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde daher das Bildanalyzesystem EpiQuant2D implementiert, welches die automatisierte Analyse fluoreszent gefärbter, mit dem „Whole Slide Scanner“ digitalisierter Gewebeschnitte erlaubt. Für die Epithelsegmentierung wurde eine neuartige Methode allein auf Basis der Zellkern- und der Basallamina-Information entwickelt, da sich Epithelfärbungen bei toxikologischen Studien behandlungsabhängig zum Teil stark verändern. Im Bereich des Epithels wird die Expression eines beliebigen Markers in Abhängigkeit vom relativen Abstand zur Basallamina als Maß für die Zelldifferenzierung ermittelt. Für eine subzelluläre Expressionsanalyse sowie zur Quantifizierung morphologischer Parameter erfolgt eine vollautomatische Einzelzellerkennung. Die resultierenden expressorischen sowie morphologischen Differenzierungsprofile stellen die Grundlage mathematischer Modelle der Differenzierung dar. Die Rekonstruktion von Gewebeschnitten in der Simulationsumgebung EpiSim unter Verwendung der mittels EpiQuant2D extrahierten morphologischen Merkmale hat demonstriert, dass auf dieser Basis eine natürliche Gewebemorphologie simuliert werden kann.

Eine realistische Modellierung der menschlichen Haut erfordert ein Testsystem mit hoher Ähnlichkeit zu nativer Epidermis. Daher wurden die hier verwendeten Gewebekulturen bezüglich Morphologie und Expression mit humaner Haut verglichen. Die morphologische Analyse zeigt, dass die differenzierungsabhängigen Veränderungen im mittleren Epithelbereich bei der Nativhaut langsam, insbesondere zwischen 50 % und 60 % relativer Distanz, bei den Kulturen dagegen bereits früh (bei ca. 30 % relativer Distanz) stattfinden. Dieser Unterschied spiegelt sich auch in einer verfrühten Involucrin-Expression wider. Weiterhin wurde bei den Kulturen eine Verdreifachung der proliferativen Aktivität anhand Ki67-positiver Zellkerne festgestellt. Inwieweit dieses artifizielle Testsystem trotz der

Unterschiede relevante Aussagen über die Nativhaut erlaubt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Es sind komplexere Gewebekulturen in der Entwicklung, welche neben den Keratinozyten weitere Zelltypen enthalten und somit mehr Aussagekraft versprechen.

Um reproduzierbare Ergebnisse gewährleisten zu können, muss ein Testsystem in hohem Maße standardisiert sein. Eine Untersuchung unbehandelter Gewebekulturen bezüglich Dicke und Expression hat gezeigt, dass die inter-Kulturvarianz ungefähr doppelt so hoch ist wie die intra-Kulturvarianz. Dennoch konnten unterschiedlich nicht-korrosiv behandelte Kulturen anhand ihrer Gewebeantwort mit einer Spezifität von 94 % und einer Sensitivität von 92 % automatisch in irritierte und nicht-irritierte Proben klassifiziert werden. Dies deutet auf eine sehr reproduzierbare Gewebeantwort und somit standardisierte Bedingungen hin. Weiterhin zeigt die Robustheit der Klassifikation, dass sich die Gewebeantwort anhand quantitativer Merkmale der mittels EpiQuant2D berechneten Expressionsprofile beschreiben lässt.

Zur Einschätzung der Anwendbarkeit des hier vorgestellten Systems im Kontext toxikologischer Studien wurden Experimente mit unterschiedlichen Substanzen durchgeführt. Die Behandlung mit milden Irritanzen führte bereits zu sichtbaren Verschiebungen der Expressionsmuster bei Hsp27 und E-Cadherin, was die Eignung des Systems zur Erkennung früher Irritationsmechanismen bestätigt. Herkömmlichen Irritationstests, die wie der MTT-Test auf einem Gewebshomogenat basieren, bleiben diese frühen Veränderungen verborgen. Allerdings zeigen die Ergebnisse auch, dass eine Bewertung allein auf Basis der Proteinprofile unsicher ist und dass viele der in den Schnitten enthaltenen Informationen nicht genutzt werden. Eine Erweiterung der Methode um beispielsweise Texturmerkmale würde die Robustheit und Sensitivität sicherlich erhöhen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass über die Kombination aus Gewebekulturen, „Whole Slide Scanning“ und Bildanalyse systembiologische Experimente zur Charakterisierung der Epidermis unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt und die bisher fehlenden Daten der epidermalen Differenzierung quantitativ gewonnen werden können. Durch die Verknüpfung von molekularen Expressions-Daten und der Lokalisation im Gewebe bzw. der Zelle ist das System prädestiniert für multi-scale Modelle, welche auf der Integration unterschiedlicher Abstraktionsebenen beruhen. Mit diesen Modellen lässt sich die Komplexität der epidermalen Homöostase abbilden und ein tieferes Verständnis des Systems erlangen. Systembiologische Modelle der Haut würden daher die Risikobewertung von Chemikalien und die Arzneimittel-Entwicklung in hohem Maße unterstützen. Das vorgestellte System kann darüber hinaus auch direkt als Testmethode zur Einstufung des irritativen Potentials von Substanzen eingesetzt werden und bietet somit eine Alternative zu Tierversuchen.