

Richard M. Köhler

Dr. med.

Establishment of organotypic epithelial raft cultures as a model of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and quantification of treatment effects through machine learning-based cell counting

Fach/Einrichtung: Pathologie

Doktorvater: Prof. Dr. Magnus von Knebel Doeberitz

Onkogene humane Papillomviren (HPV) sind für invasive Karzinome und Präkanzerosen in verschiedenen anatomischen Regionen verantwortlich. Trotz des umfangreichen Wissens über die an der HPV-induzierten Karzinogenese beteiligten Moleküle gibt es bis heute keine kausale Therapie. Die Entwicklung von Behandlungsansätzen muss daher beschleunigt werden, und neue Tumormodelle, die die Behandlungssituation *in vivo* realistisch widerspiegeln, könnte eine entscheidende Rolle bei der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten spielen. Ziel dieser Arbeit war es, ein *In-vitro*-Modell HPV-induzierter präkanzeröser Läsionen für präklinische Arzneimitteluntersuchungen zu etablieren und eine automatisierte Methode für die Quantifizierung von Zellzahlen in diesem Modell zu entwickeln.

Um dreidimensionale organotypische epitheliale Kulturen als Modell für HPV-induzierte präkanzeröse Läsionen zu etablieren, kultivierte ich verschiedene HPV-transformierte Krebszelllinien zusammen mit normalen humanen Keratinozyten auf einer dermisähnlichen Struktur, welche primäre humane Fibroblasten enthielt und für die Langzeit-Zellkultur von mehreren Wochen geeignet war. Um die Eignung unseres Modells für präklinische Studien zur Anwendung von Arzneimitteln zu demonstrieren, wurden Kulturen mit drei verschiedenen Wirkstoffen behandelt: Cisplatin, 5-Fluorouracil und Sinecatechine. Diese Wirkstoffe wurden entweder auf die der Luft exponierten Oberfläche aufgetragen oder dem Wachstumsmedium zugesetzt, um die topische und systemische Verabreichung von Arzneimitteln nachzuahmen. Zuletzt entwickelte ich einen semi-automatischen, auf maschinellem Lernen basierenden Ansatz zur Quantifizierung der Zellzahlen in diesen Modellen, welcher die Auswirkungen der Behandlung sowohl auf die HPV-transformierten Zellen als auch auf normale Keratinozyten akkurat widerspiegeln sollte.

Ich etablierte erfolgreich ein organotypisches *In-vitro*-Modell von HPV-induzierten präkanzerösen Läsionen mit verschiedenen HPV-positiven Zervixkarzinom-Zelllinien. Das Modell ermöglichte uns die erfolgreiche Beobachtung der Behandlungseffekte mit Cisplatin, 5-

Fluorouracil und Sinecatechinen in einem dreidimensionalen Kontext mit differenzierter Betrachtung der HPV-transformierten Zellen und des umgebenden normalen Epithels. Insbesondere blieben die Zellen in den Kulturen über den gesamten Beobachtungszeitraum von sechs Wochen lebensfähig, wenn sie unbehandelt blieben. Ich konnte zeigen, dass maschinelles Lernen in Form eines „extreme gradient boosted tree“ (XGBoost) Klassifizierers erfolgreich zur Unterscheidung und Quantifizierung von Tumorzellen, normalen Keratinozyten und degradierten Zellen mit hoher Genauigkeit eingesetzt werden kann. Die Quantifizierungsergebnisse spiegelten die mikroskopischen Beobachtungen plausibel wider und vermittelten ein detailliertes Bild der zeit- und dosisabhängigen Behandlungseffekte.

Das etablierte Modell in Kombination mit der halbautomatischen Zellquantifizierung kann in *In-vitro*-Studien als wertvolles Instrument für die Analyse wichtiger präklinischer Endpunkte dienen, wie beispielsweise der Wirksamkeit der Zielzellenbehandlung, möglicher Nebenwirkungen und der Optimierung des Behandlungsplans. Diese Arbeit liefert wichtige Erkenntnisse für Forschungsarbeiten, die auf neue Therapieansätze für HPV-assoziierten präkanzeröse Läsionen abzielen.