

## Protein-Profilung stratifizierter Epithelien mittels Bildverarbeitung histologischer Serienschnitte

Pommerencke T<sup>1</sup>, Tomakidi P<sup>2</sup>, Grabe N<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für medizinische Biometrie und Informatik, Universität Heidelberg, Deutschland

<sup>2</sup>Poliklinik für Kieferorthopädie der Mund-Zahn-Kiefer-Klinik der Universität Heidelberg, Deutschland  
thora.pommerencke@med.uni-heidelberg.de

**Einleitung** Die Homöostase stratifizierter Epithelien, d.h. die selbst regulierte Erneuerung des Epithels, ist seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung, da Störungen dieser Homöostase zu Krankheiten wie zum Beispiel der Schuppenflechte führen können [9]. Das Gewebe unterliegt einem Gleichgewicht aus fortwährender Zellteilung und -reifung, wodurch eine über die Zeit konstante Morphologie erreicht wird. Die Differenzierung der Keratinozyten (Zellen des Epithels) beginnt dabei im „Stratum basale“, der untersten Zellschicht im Epithel nahe des Bindegewebes, und terminiert im „Stratum corneum“. Während dieses Prozesses wandern die Keratinozyten vom „Stratum basale“ nach außen und unterliegen dabei einer Abflachung, Vergrößerung und schließlich der Auflösung des Zellkerns [1,4,7].

Zum Verständnis solch komplexer biologischer Systeme hat die Systembiologie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Kürzlich wurde eine erste Simulation der humanen epithelialen Homöostase vorgestellt [6]. Da die Homöostase unter anderem durch eine gezielte Proteinexpression gesteuert wird, besteht zur dynamischen Modellierung des Epithels die Notwendigkeit einer quantitativen Beschreibung der Proteinexpression in Abhängigkeit von der Zelldifferenzierung. Eine realistische Wahl der Simulations-Parameter ist jedoch anhand der gegenwärtigen Datenlage in der Literatur schwierig. Gängige Verfahren zum Protein-Profilung [2,9] basieren meist auf der Homogenisierung von Gewebe, wodurch jedoch die Korrelation zwischen räumlicher Lage und Proteinexpression verloren geht. Daher entstammen die in der Literatur zu findenden Beschreibungen der Proteinexpression hauptsächlich noch immer der mikroskopischen Analyse einzelner Gewebeschnitte durch einen Spezialisten. Diese verbal formulierten, qualitativen Angaben lassen sich jedoch nur schwer für Gewebesimulationen verwenden.

Aus diesen Gründen wurde ein neuartiges Verfahren entwickelt, in dem Proteinexpressionsprofile stratifizierter Epithelien automatisiert und hoch auflösend über die Bildverarbeitung immunhistologisch gefärbter Schnitte generiert werden. Das gesamte Projekt gliedert sich in einen experimentellen und den informationstechnischen Teil der Bildanalyse, welcher im Rahmen einer Diplomarbeit realisiert wurde.

**Material und Methoden** Experimentell wurde natives Gewebe von gesunden Patienten durch indirekte Immunfluoreszenz gefärbt [10]. Hierzu wurde zunächst eine fluoreszente Dreifachfärbung an Gefrierschnitten entwickelt, bei der das interessierende Protein sowie das Kollagen-I als Bestandteil der extrazellulären Matrix über indirekte Immunfluoreszenz und die Zellkerne direkt mit DAPI (Diamidino-phenylindol) angefärbt werden. Die Anfärbung von Kollagen-I dient dabei der klaren Trennung zwischen Epithel und Bindegewebe. Da das Projekt auch die Identifikation korrelierter exprimierter Proteine während der Differenzierung zum Ziel hat und auf einem einzelnen Gewebsschnitt nur eine begrenzte Zahl von Färbungen möglich ist, wird die Analyse an Serienschnitten durchgeführt. Dies sichert dieselbe Gewebsherkunft für jedes der erzeugten Proteinexpressionsmuster und ermöglicht die Detektion lokaler Anomalitäten, die z. B. für die Diagnostik von Nutzen sein könnten. Die digitale Erfassung der einzelnen Schnitte erfolgte an einem Nikon Eclipse 90i mit einer Nikon DXM 1200F hoch auflösenden CCD Kamera.

Die Implementierung der Bildanalyse wurde mithilfe von Matlab 7.1 einschließlich der „Image Processing Toolbox“ realisiert. In einem ersten Schritt wird das Epithel automatisch segmentiert. Dies erfolgt über die in einem Phasenkontrastbild mittels Kantendetektion identifizierten Gewebekonturen und die Maskierung von Bereichen intensiver DAPI-Färbung unter Ausschluss des Bindegewebes. Das Epithel wird anschließend in Richtung Bindegewebe so erweitert, dass auch die Basal-Lamina enthalten ist. Da am „Stratum corneum“ häufig eine hohe unspezifische Immunfärbung auftritt, wird dieser Bereich bei der hier beschriebenen Methode nicht mit analysiert. Als Grundlage für die Beschreibung der funktionellen Abhängigkeit von Proteinexpression und Differenzierung wählten wir die sinkende Anzahl von Zellkernen pro Epithelfläche mit fortschreitender Zelldifferenzierung. Ausgehend von dieser Idee wurde ein Glättungsverfahren entwickelt, bei dem das Bild der Kernfärbung mit einer binären Filtermatrix gefaltet wird, dessen Breite und Höhe mit zunehmender Distanz zum „Stratum basale“ anwachsen. Auf Basis des geglätteten Kernbildes kann nun die Markerintensität in Abhängigkeit zur DAPI-Intensität gemessen werden, wobei eine niedrige DAPI-Intensität kennzeichnend für eine fortgeschrittene Differenzierung ist.

**Ergebnisse** Das vorgestellte Verfahren liefert erstmals eine grobe quantitative Beschreibung der Proteinexpression im Epithel. Beispielhaft wurde die kombinatorische Expression von fünf Schlüssel-Markern (Integrin  $\alpha 6$ , Keratin 1/10, Involucrin, Filaggrin und Desmoplakin) der epithelialen Homöostase in normaler humaner Epidermis untersucht. Bei den generierten Markerprofilen ist die normierte Markerintensität gegen die abnehmende normierte DAPI-Intensität als Maß für die Differenzierung aufgetragen.

**Diskussion und Ausblick** Die ermittelten Expressionsmuster stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein [1-5,10] und müssen nun noch in ihrer statistischen Sicherheit überprüft werden. Die Validation der Methode schließt sicherlich die Frage mit ein, ob der Differenzierungsgrad adäquat durch die mittlere Anzahl an Zellkernen pro Fläche beschrieben werden kann. Wir halten diesen Ansatz jedoch für geeigneter als die alternative und naheliegendere Korrelation von Differenzierung und Distanz zur Basal-Lamina, da er robuster gegenüber komplexen räumlichen Epithelstrukturen ist. Derart komplexe Epithelstrukturen können z.B. auftreten, wenn das zu analysierende Epithel stark ausgeprägte Verzahnungen mit dem Bindegewebe (Reteleiste) aufweist oder das Epithel im Labor nicht genau senkrecht angeschnitten wird. Das Berühren der Reteleiste beim Schnitt führt durch die Freilegung einer Basalschicht mitten im Epithel zur Störung der erwarteten Differenzierungsschichtung und kann über ein vermehrtes Auftreten von Zellkernen nicht jedoch über die Distanz zur Basal-Lamina erfasst werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit soll eine geeignete mathematische Beschreibung der generierten Profile gefunden werden. Diese würde es ermöglichen, die gemessenen funktionellen Abhängigkeiten in ein systembiologisches Modell der epithelialen Homöostase zu integrieren. Außerdem wird erst über die mathematische Beschreibung ein statistischer Vergleich von z. B. pathologischem und Normalgewebe möglich.

Eine geplante Erweiterung der bestehenden Methode liegt in der Detektion von lokalen Anomalitäten. Hierbei sollen nach Registrierung der Serienschnitte Veränderungen im kombinatorischen Expressionsmuster ausgewählter Marker auf zellulärer Ebene identifiziert und analysiert werden. Dabei ist die simultane Erfassung unterschiedlicher Marker von entscheidender Bedeutung für eine Patientenbehandlung. Auf ihrer Basis könnte zukünftig eine Diagnose pathologischer Veränderungen gezielter gestellt und verfügbare Therapieansätze optimiert werden.

## Literatur

- [1] Candi, E., Schmidt, R., et al., *The cornified envelope: a model of the cell death in the skin*. Nature, 2005, 6: 328-340.
- [2] Cole, J., Tsou, R., et al., *Early gene expression profile of human skin to injury using high-density cDNA microarrays*. Wound Repair Regen, 2001, 9: 360-70.
- [3] Eckert, R. L., Crish, J. F., et al., *Regulation of involucrin gene expression*. J Invest Dermatol, 2004, 123: 13-22.
- [4] Fuchs, E., Byme, C., *The epidermis: rising to the surface*. Curr Opin Genet Dev., 1994, 4: 725-36.
- [5] Fuchs, E. and Green, H., *Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte*. Cell, 1980, 19: 1033-42.
- [6] Grabe, N. and Neuber, K., *A multicellular systems biology model predicts epidermal morphology, kinetics and Ca<sup>2+</sup> flow*. Bioinformatics, 2005, 21: 3541-7.
- [7] Holbrook, K. A., *Ultrastructure of the epidermis*. The Keratinocyte Handbook. I. Leigh, B. Lane and F. Watt, Cambridge University Press, 1994: 3-39.
- [8] Huang, C. M., Foster, K. W., et al., *Comparative proteomic profiling of murine skin*. J Invest Dermatol, 2003, 121: 51-64.
- [9] Itoh, K., Kawasaki, S., et al., *Identification of differentially expressed genes in psoriasis using expression profiling approaches*. Exp Dermatol, 2005, 14: 667-74.
- [10] Tomakidi, P., et al., *Discriminating expression of differentiation markers evolves in transplants of benign and malignant human skin keratinocytes through stromal interactions*. J Pathol, 2003, 200: 298-307.