

# Vollautomatische Einzelzellerkennung auf fluoreszenten Gewebeschnitten humaner Epidermis

Thora Pommerencke<sup>1</sup>, Hartmut Dickhaus<sup>1</sup>, Niels Grabe<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Medizinische Biometrie und Informatik, Universitätsklinikum Heidelberg  
thora.pommerencke@med.uni-heidelberg.de

**Kurzfassung.** Wir stellen hier ein vollautomatisches Verfahren zur Einzelzellerkennung auf fluoreszenten Gewebeschnitten humaner Epidermis vor. Das Ziel dieser Arbeit war es, Expressionsverschiebungen von beispielsweise Zellmembran zu Nucleus detektieren zu können. Diese können bei pathologischen Veränderungen des Gewebes auftreten. Im Vergleich zu anderen existierenden Segmentierungen werden hier die Zellgrenzen in einem kombinierten Ansatz sowohl auf Basis einer Membranfärbung als auch anhand detektierter Zellkerne mittels Watershed ermittelt. Wir konnten zeigen, dass wir mit unserem Verfahren eine Membranfärbung deutlich von einer Zellkernfärbung unterscheiden können. Somit ermöglicht die von uns entwickelte Einzelzellerkennung eine Detektion von Translokationen in der Expression.

## 1 Einleitung

Die Unterscheidung von pathologisch verändertem und gesundem Gewebe geschieht meist anhand geeigneter Biomarker, mit denen ein Gewebe angefärbt wird. In [1] wurde bereits gezeigt, wie die Proteinexpression in einem fluoreszent gefärbten Gewebeschnitt räumlich, vollautomatisch und quantitativ vermessen werden kann. Hierbei wurde jedoch bisher die subzelluläre Lokalisation der Expression vernachlässigt. Pathologische Veränderungen im Gewebe können sich jedoch auch in einer Verschiebung des Expressionsmusters innerhalb der Zelle widerspiegeln [2]. Ohne diese subzelluläre Auflösung könnten daher wichtige Informationen verloren gehen.

Die uns bekannten Einzelzellerkennungen auf epithelialen Geweben sind entweder nur semiautomatisch [3] oder approximieren die Zellgrenzen anhand der Lokalisation der Zellkerne über Voronoi oder Watershed [4]. Letztere Verfahren bieten nicht die von uns gewünschte Genauigkeit für eine subzelluläre Expressionsanalyse. Vor diesem Hintergrund haben wir eine vollautomatische Zellerkennung mit Detektion der Zellkerne auf fluoreszent gefärbten Gewebeschnitten entwickelt, welche die Zellgrenzen auf Basis einer Membranfärbung detektiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Färbung

Experimentell wurden Schnitte cryokonservierter *in vitro* Hautkulturen (EFT, Mattek) über eine fluoreszente Dreifachfärbung angefärbt. Dabei wurden die Zellmembranen mittels eines Antikörpers gegen E-Cadherin über indirekte Immunfluoreszenz mit Alexa 488 (grün) und die Zellkerne direkt chemisch mit DAPI (Diamidinophenylindol) blau gefärbt. Der später zu untersuchende Biomarker wurde über indirekte Immunfluoreszenz mittels Alexa 594 (rot) gekennzeichnet.

### 2.2 Bildakquise

Die Bildakquise erfolgte mithilfe des Hamamatsu NanoZoomer Digital Pathology (NDP) System in einer Auflösung von  $0,23 \mu\text{m}/\text{Pixel}$  (40x Vergrößerung) und in drei Ebenen, d.h. Z-Höhen, in einem Abstand von jeweils  $2 \mu\text{m}$ . Abbildung 1 zeigt exemplarisch einen Bildausschnitt aufgenommen mit 40x Vergrößerung.

### 2.3 Bildanalyse

Die zu untersuchenden Gewebebereiche wurden entweder automatisch oder manuell aus einem Übersichtsbild selektiert. Für die nachfolgenden Analysen wurde für jeden Farbkanal jeweils diejenige Bildebene aus dem Z-Stapel ausgewählt, bei der die gefärbten Strukturen die größte Schärfe aufwiesen. Diese kann je nach Bildregion unterschiedlich sein. Auf jedem der extrahierten Teilbilder erfolgte dann die Einzelzellerkennung, welche sich in drei größere Analyseblöcke unterteilen lässt: die Erkennung des Epithels, die Detektion der Zellkerne und schließlich die Segmentierung der einzelnen Zellen. Alle drei Blöcke werden im Folgenden nun kurz beschrieben.

Für die Segmentierung des Epithels wurde zunächst der Kontrast im Bild der Membranfärbung mit einer Intensitätsanpassung und adaptiver Histogrammangleichung erhöht. Anschließend erfolgte die automatische Segmentierung anhand der Membranfärbung über ein Schwellwertverfahren und morphologische Operationen wie „Schließen“ und „Öffnen“. Zur Performanzsteigerung erfolgte dieser Schritt bei einer Vergrößerung von 10x.

Die Detektion der Zellkerne erfolgte nach Kontrasterhöhung über ein iteratives und adaptives Schwellwertverfahren und anschließender Watershedtransformation bei einer Vergrößerung von 20x. Über einen Größenfilter wurden Cluster von Zellen identifiziert, auf denen zur Trennung der Zellen eine Watershedtransformation auf Basis lokaler Maxima durchgeführt wurde. Potentielle Artefakte wurden mittels Diskriminanzanalyse anhand zuvor ermittelter Erwartungswerte für Merkmale wie Fläche, Rundheit, Rauheit, Kontrast und Kompaktheit ausgeschlossen.

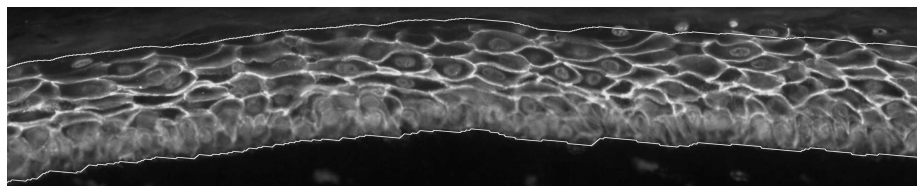
Die Zellgrenzen wurden bei einer Vergrößerung von 40x auf dem Bild der Membranfärbung ermittelt. Hierbei kam eine weitere Watershedtransformation zum Einsatz. Die Schwierigkeit bei der Ermittlung der Zellgrenzen besteht

insbesondere darin, dass bei den uns vorliegenden Schnittbildern starke Überlagerungen der Zellstrukturen auftraten und einige Zellen im Präparat nicht in ihrer Mitte durchgeschnitten, sondern entlang ihrer Oberfläche geschnitten wurden. In diesem Fall ist anstelle einer gefärbten Zellkontur eine gefärbte Fläche zu sehen, welche für die Anwendung der Watershedtransformation ungeeignet ist. Daher wurden Minima nicht nur in der Ebene gesucht, die im Mittel das schärfste Bild zeigt, sondern auch in der darüber und darunter liegenden, da eine flächig gefärbte Zelle in einer anderen Ebene evtl. als Kontur zu sehen ist. Anschließend wurden die Minima aus allen Ebenen sowie die detektierten Zellkerne zu einer Maske vereint und mit dieser das Bild der Membranfärbung so durch morphologische Rekonstruktion modifiziert, dass regionale Minima nur in den Maskenbereichen vorlagen bzw. dort erzwungen wurden. Auf diesem veränderten Bild der Membranfärbung wurden schließlich die Zellgrenzen mittels einer letzten Watershedtransformation ermittelt. Zellflächen außerhalb des zu erwartenden Größenbereichs wurden verworfen.

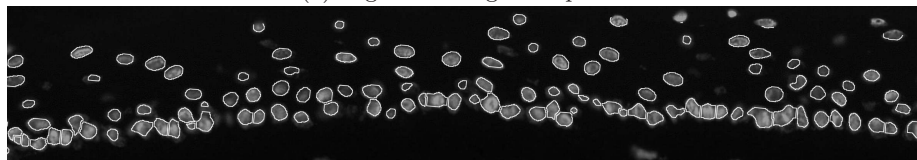
Alle Algorithmen zur Bildanalyse der digitalisierten Schnitte wurden mithilfe von Matlab R2008a unter Verwendung der Image Processing Toolbox entwickelt.

### 3 Ergebnisse

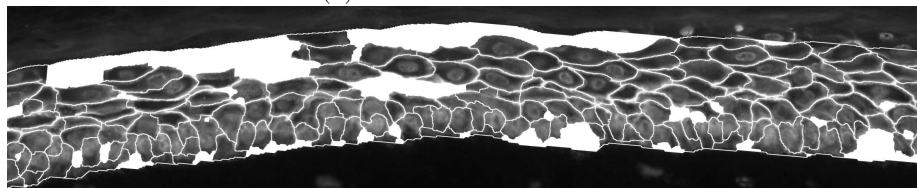
Für die Validierung der Zellsegmentierung wurde die Anzahl manuell segmentierter Zellen mit der detektierten Anzahl von Zellen verglichen. Bei der auto-



(a) Segmentierung des Epithels



(b) Detektion der Zellkerne



(c) Segmentierung der Zellen

**Abb. 1.** Ablauf der Segmentierung

matischen Zellsegmentierung wurden statt 277 Zellen 297 Zellen (d.h. eine Übersegmentierung von ca. 7%) ermittelt. Weiterhin wurde getestet, ob es mit dieser Segmentierung möglich ist, eine membranständige Färbung von einer Zellkernfärbung zu unterscheiden. Für diesen Test wurde für 1150 Zellen das Verhältnis der mittleren Färbungsintensität im betrachteten Kompartiment (Nucleus bzw. Membran) zur Färbungsintensität der Gesamtzelle berechnet. Für die Zellkernfärbung wurde ein Verhältnis von 3,3 für Nucleus zu Zelle und 0,7 für Membran zu Zelle berechnet. Und für die Membranfärbung ein Verhältnis von 0,9 für Nucleus zu Zelle und 1,4 für Membran zu Zelle ermittelt. Ein exemplarisches Segmentierungsergebnis ist in Abbildung 2 zu sehen.

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Einzelzellerkennung auf fluoreszent gefärbten Gewebeschnitten, um subzelluläre Kompartimente voneinander unterscheiden zu können. Als eine wichtige Anwendung sei hier die Translokation der Expression von  $\beta$ -Catenin von der Membran in den Zellkern im Frühstadium des Colon-Karzinoms genannt, welche nur über eine subzelluläre Expressionsanalyse sichtbar wird.

Der Vergleich des von uns entwickelten Verfahrens mit der manuellen Segmentierung zeigt nur eine Übersegmentierung von knapp 7%, welche hauptsächlich darauf zurückzuführen ist, dass bei der manuellen Segmentierung in unklaren Fällen keine Kontur gezeichnet wurde, während die automatische Segmentierung immer nach einer Lösung sucht.

Die von uns durchgeführte Expressionsanalyse zeigt, dass mit der automatischen Zellsegmentierung eine membranständige Expression deutlich von einer Expression im Zellkern unterschieden werden kann. Es scheint daher hinreichend für eine vollautomatische Analyse subzellulärer Expressionsverschiebungen zwischen den Kompartimenten Zellkern, Membran und Cytoplasma geeignet. Im Vergleich zu den uns bekannten Segmentierungsverfahren, welche die Zellgrenzen anhand der Lokalisation der Zellkerne z.B. durch Voronoi-Graphen setzen, ist bei uns eine weitaus höhere Genauigkeit zu erwarten, da wir uns direkt an den Membranen orientieren. Weiterhin können wir auch bei einer lückenhaften Zellkernverteilung robuste Ergebnisse liefern. Die ersten hier beschriebenen Ergebnisse der Segmentierung wurden auf Gefrierschnitten durchgeführt. Insbesondere durch Verwendung dünner präparierbarer histologischer Schnitte aus Paraffin-eingebettetem Gewebe erwarten wir noch erheblich klarere Membranstrukturen. Das vorgestellte Verfahren sollte dann eine noch erheblich verbesserte Detektion der Zellgrenzen zeigen.

## Literaturverzeichnis

1. Grabe N, Pommerencke T, Steinberg T, et al. Reconstructing protein networks of epithelial differentiation from histological sections. *Bioinformatics*. 2007;23:3200–3208.
2. Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, et al. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2000;82:1689–1693.
3. Baggett D, Nakaya M, McAuliffe M, et al. Whole cell segmentation in solid tissue sections. *Cytometry*. 2005;67:137–43.
4. Landini G, Othman I. Estimation of tissue layer level by sequential morphological reconstruction. *J Microscopy*. 2002;209:118–125.