Verfahren zur qualitativen Bewertung der Syntheseleistung von Vitalzellkulturen

Klaus Gärtner, Christoph Giese[1], Frank Sonntag und Uwe Marx[1]

Institut für Medizintechnik Dresden e. V., Bernhard-Voß-Str. 25-27, 01445 Radebeul
[1]ProBioGen AG, Goethestraße 50-54, 13086 Berlin
E-Mail: gaertner@imt-dresden.de

Zusammenfassung. Bei einer adäquaten Aussaat der zu klonierenden bzw. zu charakterisierenden Zellen ist es möglich, die Syntheseleistungen der Zelle durch Einsatz spezifischer Fluoreszenzmarker zu visualisieren. Ziel dieser Arbeit ist die qualitative Erfassung dieser Visualisierung, so dass eine Aussage über die spezifische Syntheseleistung der jeweiligen Einzelzelle möglich ist. Dabei findet das Konzept der unscharfen Klassifikation Anwendung. Nach der Identifikation der „Hochproduzenten" unter den Zellen ist mit dem Visualisierungs- und Analyseverfahren ein Entscheidungssystem zu entwickeln, dass die Möglichkeiten der Ansteuerung und Gewinnung dieser Zellen mittels Mikromanipulation auch im Kultursystem schafft.

1 Einführung

Monoklonale Antikörper sind in Biologie und Medizin zu einem äußerst nützlichen Hilfsmittel geworden, weil man mit solchen Molekülen viele Bestandteile von Zellen und Geweben markieren und identifizieren kann. Um identische Antikörper mit einer bestimmten Struktur zu gewinnen, werden Myelomzellen (Krebszellen) mit B-Lymphozyten verschmolzen. Diese Hybridzellen (Hybridom-Zellen) entwickeln auf dem Wege der klonalen Proliferation Zellfamilien (Klone), die genetisch identisch sind und damit absolut strukturgleiche Antikörper mit einer einheitlichen Antigenspezifität produzieren. Bei der Produktion monoklonaler Antikörper (mAk) ist die frühzeitige Bestimmung der Syntheseleistung von einzelnen Zellen bzw. Zellklonen mit nicht invasiven Techniken entscheidend, um in minimaler Zeit eine maximale Produktausbeute zu erreichen und den Zellabfall zu verringern. Ziel der Erkennungsaufgabe ist die Entwicklung eines Entscheidungssystems zur qualitativen Erfassung der Syntheseleistung von Modellzellen durch Klassifikation in verschiedene Subpopulationen und zur Selektion der leistungsfähigsten Zellen.

2 Lösungsansatz

Um eine exakte digitale 3D-Rekonstruktion der Zellen zu ermöglichen, wird der Ansatz der konfokalen Bildaufnahme am Mikroskop untersucht. Dabei wird die 3D-Szene (Füllvolumen) in eine Folge von 2D-Bildern mit festem Z-Abstand a transformiert und schrittweise ein 2D-Analyseprozess (Abb. 1) durchgeführt.

2.1 2D-Analyseverfahren

Zur Gewinnung selektiver Merkmale können unter Beimischung von „Green Fluorescence Protein“ oder ähnlichen Molekülen Proteinsyntheseleistungen in lebenden Zellen und Geweben sichtbar gemacht werden, da sich unter bestimmten Bedingungen eine „Diffusionswolke“ um die produzierenden Zellen bildet. Die Fluoreszenzerscheinung, welche eine Zelle oder einen Zellklon umgibt, ist die Grundlage für die Gewinnung mehrerer Messgrößen wie z. B. Fläche oder Intensität des Präzipitats (hochmolekularer Antikörper-Antigen-Komplex um die Hybridom-Zellen). Zur Auswertung wird die Bildanalysesoftware analySIS® der Firma Soft Imaging System aus Münster eingesetzt. Die aufgenommenen Farbbilder werden nach signalnaher Bildvorverarbeitung zunächst in Grauwertbilder transformiert. Nach der Korrektur der Präzipitate entsprechend den biologischen Gegebenheiten lassen sich über geeignete unscharfe Schwellwertsetzungen alle Produzenten unter den Zellen vom Hintergrund trennen.

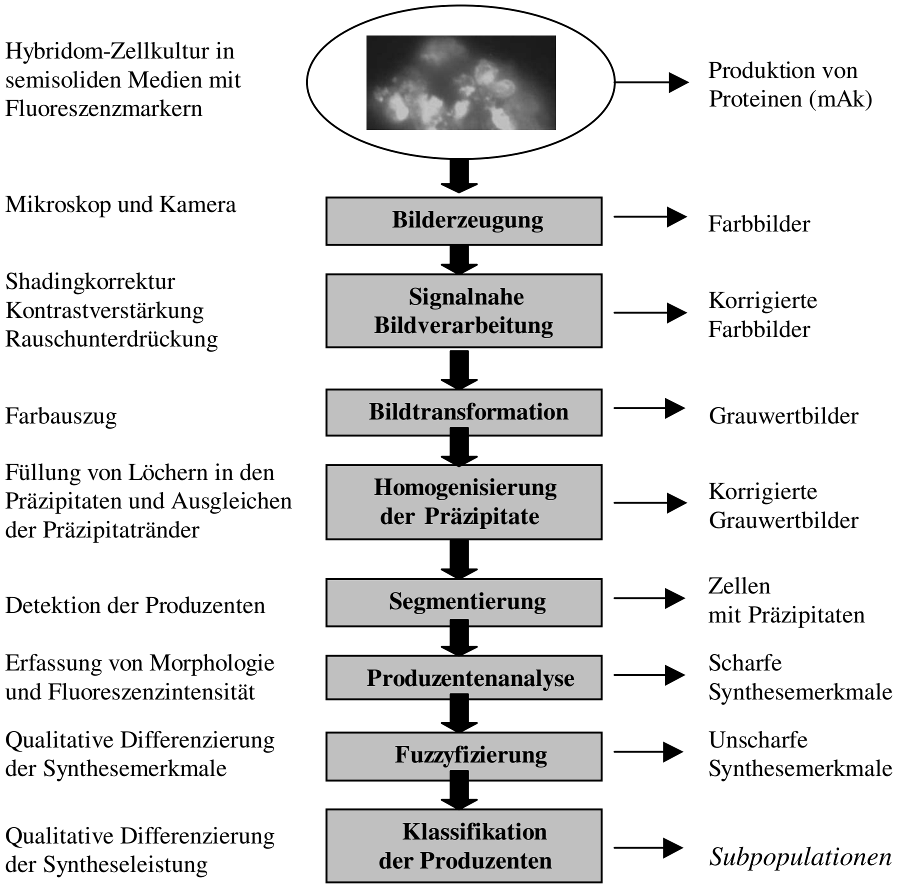
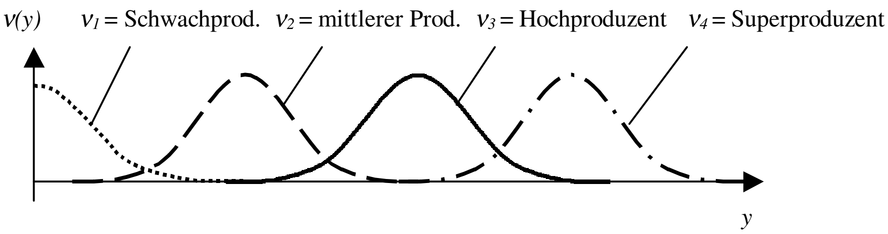


Abb. 1. 2D-Bildanalyseprozess zur Bewertung der Syntheseleistung vitaler Zellen

Abb. 2. Fuzzyfizierung der linguistischen Ausgangsvariablen "Syntheseleistung"



Formal ist der Analyseprozess durch eine Eingangsbeschreibung $\underline{x}$, eine Ausgangsbeschreibung $\underline{y}$ und ein Regelsystem $\underline{y} = f(\underline{x})$ definiert. Die Koeffizienten des Regelsystems orientieren sich an der auf Messwerten basierenden Beschreibung des Zellkultursystems. Um die fließenden Übergänge von Präzipitatregionen mit hoher zu schwacher Syntheseleistung sowie Präzipitatüberlappungen besser berücksichtigen zu können und damit die Separierbarkeit zu verbessern, wird für die Differenzierung der Syntheseleistung das Konzept der unscharfen Klassifikation nach dem linguistischem Modellansatz eingesetzt. Anders als bei analytischen Modellansätzen handelt es sich hier bei den zugeordneten Parametern um linguistische Größen, die durch unscharfe Mengen dargestellt werden. Zu jedem erfassten Parameter werden linguistische Variable gegeben, deren Terme einen konkreten Wert jeweils verbal beschreiben.

Während der Analyse werden 6 Parameter als linguistische Eingangsvariable x_1 ... x_6 bestimmt und die Messwerte durch Fuzzifizierung in geeignete Fuzzy-Mengen umgewandelt. Als linguistische Ausgangsvariable y wird die Zellsyntheseleistung anhand unscharfer Klassen gebildet. Um später Entscheidungsmuster in Form von unscharfen Regeln aus den Bilddaten zu extrahieren, ist die Vorgabe der linguistischen Terme ausgewählter Variablen durch den Fachmann notwendig. Die linguistische Ausgangsvariable y wird in vier Subpopulationen (v_1 - v_4) zerlegt (Abb. 2). Für das System wird weiterhin folgende Eingangskonfiguration festgelegt:

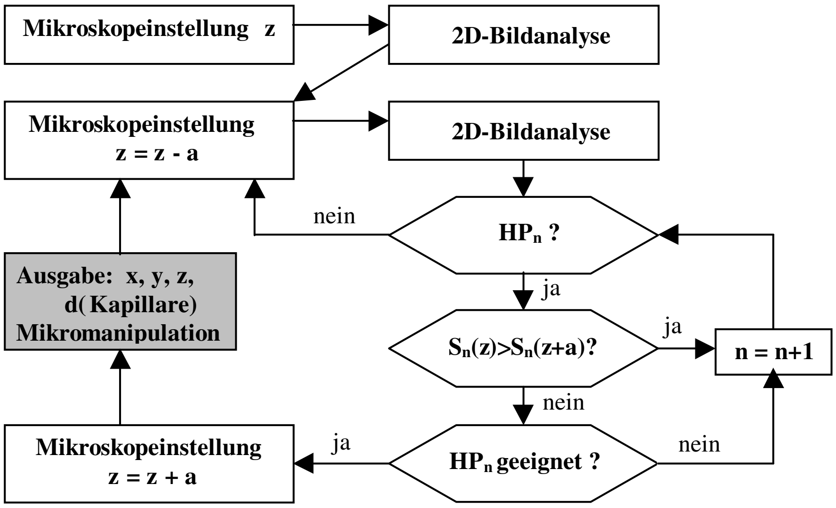
x_1 - Präzipitatfläche:	$\mu_{1,1}$ = klein, $\mu_{1,2}$ = mittel, $\mu_{1,3}$ = groß
x_2 - Fluoreszenzintensität:	$\mu_{2,1}$ = keine, $\mu_{2,2}$ = schwach, $\mu_{2,3}$= mittel, $\mu_{2,4}$=stark
x_3 - Präzipitatdurchmesser:	$\mu_{3,1}$ = klein, $\mu_{3,2}$ = mittel, $\mu_{3,3}$ = groß
x_4 - Abstand zum Nachbarproduzent:	$\mu_{4,1}$ = kurz, $\mu_{4,2}$ = mittel, $\mu_{4,3}$ = lang
x_5 - Präzipitatumfang:	$\mu_{5,1}$ = klein, $\mu_{5,2}$ = mittel, $\mu_{5,3}$ = groß
x_6 - Präzipitatform:	$\mu_{6,1}$ = kreisförmig, $\mu_{6,2}$ = mittel, $\mu_{6,3}$ = elliptisch.

2.2 3D-Selektionsverfahren

Im anschließenden 3D-Selektionsprozess erfolgt die Prüfung, Auswahl und Koordinatenbestimmung der Subpopulationen „Hochproduzenten" und „Superproduzenten" für eine automatische Mikromanipulation (Abb. 3).

Bei Kenntnis des nachfolgenden Fluoreszenzbildes (z-a) werden die Syntheseleistungen S_n der Hochproduzenten HP_n verglichen sowie die Abstände zu Nachbarproduzenten bewertet. Die Selektion erfolgt bei der Z-Koordinate, bei der die Zelle die maximale Syntheseleistung aufweist.

Abb. 3. 3D-Selektionsprozess zur automatischen Mikromanipulation der Hochproduzenten



Bei mehreren Hochproduzenten auf einer Z-Ebene beginnt die Selektion beim Hochproduzenten mit dem größten Zellaußendurchmesser unter Beachtung eines hinreichend großen Abstandes zum nächstliegenden kleineren Produzenten. Der Zellaußendurchmesser ist dabei entscheidend für die Auswahl der geeigneten Kapillare zur Selektion. Der Abstand zum nächstliegenden Produzenten ist zur Abschätzung der Gefahren für die Zelle beim möglichen Absaugen wichtig.

3 Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Für den Anwendungsfall wurde der 2D-Bildanalyseprozess an 1000 durch einen Biologen erkannten, produktiven Zellen durchgeführt und bewertet (Tab. 1).

Produzent	Schwach-	Mittlerer-	Hoch-	Super-	Gesamt
Biologe	285	385	307	23	1000
Entscheidungssystem:					
- als Schwachproduzenten	248	24 ↑			272
- als Mittlere Produzenten	33 ↓	347	4 ↑		384
- als Hochproduzenten		22 ↓	279	5 ↑	306
- als Superproduzenten			6 ↓	17	23
Erkennungsrate/Population [%]	99	102	94	96	98,5

Tabelle 1. Testergebnisse des 2D-Bildanalyseprozesses an 1000 produktiven Zellen.

Die Ergebnisse belegen, dass durch das System eine bessere Differenzierung der Syntheseleistung der Zellen innerhalb der erkannten Subpopulation erfolgt. Durch die Bildfehler, Überlagerungen und Überlappungen der Präzipitate usw. sind derartige visuelle Klassifikationen durch einen Biologen unmöglich.