

Schlussbericht
zum BMBF-Verbundvorhaben

IMAGING – Multimodale proteomische Bildgebung: Zugang zur biomedizinischen Systembiologie von Geweben

Teilprojekt B:
Entwicklung einer integrierten Bildanalyse und Data-Mining-Plattform
basierend auf der Definiens Cognition Network Technology

Dr. Ralf Schönmeier (Projektleitung)
Dr. Günter Schmidt
Prof. Dr. Gerd Binnig

Förderkennzeichen: 0315508 B

Laufzeit: 01.09.2009 – 31.08.2012

Zuwendungsempfänger:

Definiens AG, Bernhard-Wicki-Straße 5, 80636 München

DEF:NIENS[®]
Understanding Images

Verbundpartner:

- Helmholtz Zentrum München – Abteilung Proteinanalytik, Prof. Dr. Marius Ueffing
- Helmholtz Zentrum München – Institut für Pathologie, Prof. Dr. Axel Walch / Prof. Dr. Heinz Höfler
- Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Dr. Detlev Suckau
- Helmholtz Zentrum München – Institut für Biologische und Medizinische Bildgebung, Prof. Dr. Vasilis Ntziachristos
- Helmholtz Zentrum München – Institut für Biomathematik und Biometrie, Prof. Dr. Rupert Lasser

München, Oktober 2012

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315508 B gefördert.
Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel IMAGING – Multimodale proteomische Bildgebung: Zugang zur biomedizinischen Systembiologie von Geweben Teilprojekt B: Entwicklung einer integrierten Bildanalyse und Data-Mining-Plattform basierend auf der Definiens Cognition Network Technology	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Schönmeyer, Ralf Schmidt, Günter Binnig, Gerd	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.08.2012
	6. Veröffentlichungsdatum geplant
	7. Form der Publikation --
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Definiens AG Research Bernhard-Wicki-Straße 5 80636 München	9. Ber. Nr. Durchführende Institution --
	10. Förderkennzeichen 0315508 B
	11. Seitenzahl 16
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 12
	14. Tabellen --
	15. Abbildungen 11
16. Zusätzliche Angaben --	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) --	
18. Kurzfassung Die Systembiologie stützt sich auf eine Vielzahl von Methoden zur Gewinnung von Modellierungsparametern aus Proben. Dabei spielen bildgebende Verfahren eine zentrale Rolle, die in letzter Zeit um spektroskopische Techniken – wie dem MALDI-Imaging – bereichert werden. In diesem Projekt wird ein multimodaler Ansatz verfolgt, um spezifische Vorteile der Modalitäten gemeinsam zu nutzen. Im Rahmen des AP4 entstand eine Bildanalyse- und Data-Mining-Plattform, die sämtliche Daten aller zur Verfügung stehenden Modalitäten integriert und einheitlich verarbeitet, um relevante Parameter für systembiologische Modellbildung zu gewinnen. Als Methode kommt die Definiens Cognition Network Technology zum Einsatz. Sie wurde im Zuge des Projekts angepasst und erweitert. Ein erzielttes Ergebnis stellt die Verbesserung der Ortsauflösung von MALDI-Messdaten dar, die erst durch Kombination mit bildanalytischen Ergebnissen aus optischen Mikroskopaufnahmen ermöglicht wurde. Damit bietet sich erstmals Zugang zu der Reichhaltigkeit dieser spektroskopischen Daten in der für die systembiologischen Untersuchung von Gewebeschnitten der Netzhaut erforderlichen Ortsauflösung. Dies wird dazu genutzt, dynamische Zustände verschieden konditionierter Präparate zu modellieren und die entwickelten Prinzipien lassen sich auch auf andere Modalitäten übertragen.	
19. Schlagwörter Bildanalyse, Objekterkennung, Retina, MALDI-Imaging, Mikroskopie, Spektroskopie, multimodal	
20. Verlag --	21. Preis --

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN planned	2. type of document (e.g. report, publication) final report
3. title Multimodal Proteome Imaging: An Entry to Biomedical Tissue Systems Biology Working Package 4: Development of an Integrated Image Analysis and Data Mining Platform Based on Definiens Cognition Network Technology	
4. author(s) (family name, first name(s)) Schönmeyer, Ralf Schmidt, Günter Binnig, Gerd	5. end of project 31.08.2012 6. publication date planned 7. form of publication --
8. performing organization(s) (name, address) Definiens AG Research Bernhard-Wicki-Straße 5 80636 München	9. originator's report no. -- 10. reference no. 0315508 B 11. no. of pages 16
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 12 14. no. of tables -- 15. no. of figures 11
16. supplementary notes --	
17. presented at (title, place, date) --	
18. abstract Systems biology relies on many different methods to obtain the parameters from tissue samples required for modeling. Manifold imaging techniques play a crucial role and have recently been complemented by spectroscopic methods such as MALDI imaging. In this contribution, we established a multimodal approach to combine the advantages of several such methods. In the context of WP4, an image analysis and data mining platform was developed to integrate all available data from the project. Unified processing allowed us to generate the relevant parameters for systems biology modeling. These methods are based on Definiens Cognition Network Technology, which was adopted and extended throughout the project. An important result was the improvement in the spatial resolution of MALDI measurements, made possible by incorporating image analysis results from optical microscopy. This allowed us, for the first time, to access rich spectroscopic data, with the necessary resolution for investigating retinal tissue samples. We have used these methods to model the dynamic states of light- and dark-conditioned retinal samples; however, these principles are of general interest and transferable to other modalities.	
19. keywords image analysis, object recognition, retina, MALDI imaging, microscopy, spectroscopy, multimodal	
20. publisher --	21. price --

I. Kurzdarstellung

1. Aufgabenstellung

Die Mehrzahl der Systembiologieansätze konzentrieren sich auf die Modellierung des dynamischen Verhaltens von intrazellulären Netzwerken. In der gegenwärtigen klinischen Realität werden jedoch meistens Gewebeproben nach ihrer mikroskopischen Morphologie und molekularen Zusammensetzung beurteilt. Deshalb wird ein Ansatz benötigt, der die histologische Ebene mit der molekularen verbindet. Ein solcher Ansatz eröffnet enormes Potential sowohl für die Forschung als auch die klinische Routine. Neue Technologien für die Abbildung von Molekülen in ihrer natürlichen Umgebung im intakten Gewebe werden zur Zeit entwickelt (z.B. MALDI-Imaging). In diesem Projekt soll die quantitative molekulare Abbildung von Zellen und Geweben in Richtung quantitativer Datenanalyse weiterentwickelt werden. Ziel ist es multimodale, dynamische Bilddaten von Zellen und Geweben zu integrieren, um eine standardisierte und qualitätskontrollierte Datenbasis für die Systembiologie zu erhalten. Als biologisches Trainingsmodell wurde die Säugetierretina ausgewählt, da dieses Gewebe eine hochgeordnete histologische und zelluläre Stratifizierung besitzt. Die Definiens Bildanalyse-Plattform ermöglicht eine vollständig automatisierte Auswertung von multispektralen und multidimensionalen Bilddaten. Eine Proteomik und Histopathologie verknüpfende Analyse von multimodalen Gewebe und Zelldaten ist jedoch ein offenes Problem, dessen Lösung eine neue Methodik eröffnet, um pharmakologisch und diagnostisch relevante Biomarker zu finden. Insbesondere erlaubt die direkte Verknüpfung von Ergebnissen aus der kontextbezogenen Analyse von Daten aus MALDI Imaging und zeitaufgelöster Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, mit einem theoretischen Modell die Gewinnung eines tieferen Systemverständnisses des betrachteten Gewebes.

Im Teilprojekt 4 (AP4) besteht die Aufgabe darin, die Entwicklung einer integrierten Bildanalyse- und Data-Mining-Plattform basierend auf der Definiens Cognition Network Technology umzusetzen.

Die Definiens Bildanalyse-Plattform ermöglicht die automatische Quantifizierung von Strukturen aus digitalen Bildern. Sie unterstützt dabei die Analyse von multispektralen, multidimensionalen und multimodalen Bilddaten. Sobald die zur Verfügung gestellten Daten der diverse Bildmodalitäten örtlich zueinander in Bezug gesetzt sind, kann auf sämtliche Kanäle aller Modalitäten parallel zugegriffen werden. Dies ermöglicht eine modalitätsübergreifende Analyse. Obwohl die Plattform bereits erfolgreich in einer Vielzahl akademischer und industrieller Labore arbeitet, fehlt bislang ein fundiertes und ausgearbeitetes Verständnis für eine derartige Anwendung zur Auswertung von multimodalen Bilddaten. Das vorgeschlagene Projekt stellt sich den Problemen (und Chancen) für eine multimodale Bildverarbeitung, indem es alle Bildverarbeitungsaufgaben vereinheitlicht und in einer standardisierten Softwareumgebung integriert. Der aktuelle Stand der Plattform wird erweitert, um einen homogenisierten Zugang zu den heterogen vorliegenden Bilddaten und assoziierten Metadaten zu bieten.

Gemäß dem Antrag wurden zehn Unterziele definiert, die zusammen mit einer Beschreibung der erzielten Ergebnisse unter II. 1. aufgeführt sind.

2. Voraussetzungen

Durch die Kombination der Partner des Projekts ergibt sich ein Verbund von sich ergänzenden Kompetenzen, auf das alle Partner zurückgreifen können. Einerseits sind dies die beteiligten Institute des Helmholtz Zentrums München, die ihre wissenschaftliche Expertise einbringen. Dies umfasst neben domänenspezifischem Wissen auch die Erfahrung und Weiterentwicklung bei der Aufnahme der erforderlichen Bildaufnahme-modalitäten. Andererseits ist mit dem Industriepartner Bruker ein Gerätehersteller beteiligt, der insbesondere bei der zentralen Modalität des MALDI-Imaging Know-how aus erster Hand beisteuert.

Die Definiens AG bereichert den Verbund, indem es seine vorhandene Expertise und Softwareplattform einsetzt und im Rahmen des Projekts weiterentwickelt. Zentrale Voraussetzung für die automatisierte Bildanalyse ist dabei die Definiens Cognition Network Technology. Diese wurde vom Nobelpreisträger Prof. Gerd Binnig und seinem Team seit 1996 entwickelt und stellt eine robuste Technologie zur Lösung von Bildanalyseaufgaben im Bereich der Geo- und Biowissenschaften dar. Die Technologie wird dazu eingesetzt, kognitive Prozesse der menschlichen Wahrnehmung zu modellieren, um Objekte, wie z.B. Gewebe, Zellen oder Zellbestandteile, aus Bilddaten automatisiert zu erkennen und zu quantifizieren. Sie bildet somit eine fundierte Plattform, auf die die weiteren Entwicklungen dieses Projekts aufbauen.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Diagramm in Abb. 1 illustriert die Zusammenarbeit und den Arbeitsablauf des Gesamtprojekts. Die von der Definiens AG zu leistenden Arbeiten des AP4 drehen sich rund um das Image Content Repository (rechts im Diagramm) in enger Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Instituts für Biomathematik und Biometrie des Helmholtz Zentrums München. Während des Projektlaufs hat sich außerdem bewährt, dass die Definiens AG direkten Einfluss auf die Erstellung von Bilddaten einzelner Modalitäten hatte, um zu gewährleisten, dass sich die resultierenden Daten einfacher in den Datenbestand integrieren lassen. Abb. 2 zeigt den geplanten zeitlichen Ablauf der Bearbeitung von AP4, der sich als ambitioniert aber realistisch erwies und eingehalten werden konnte.

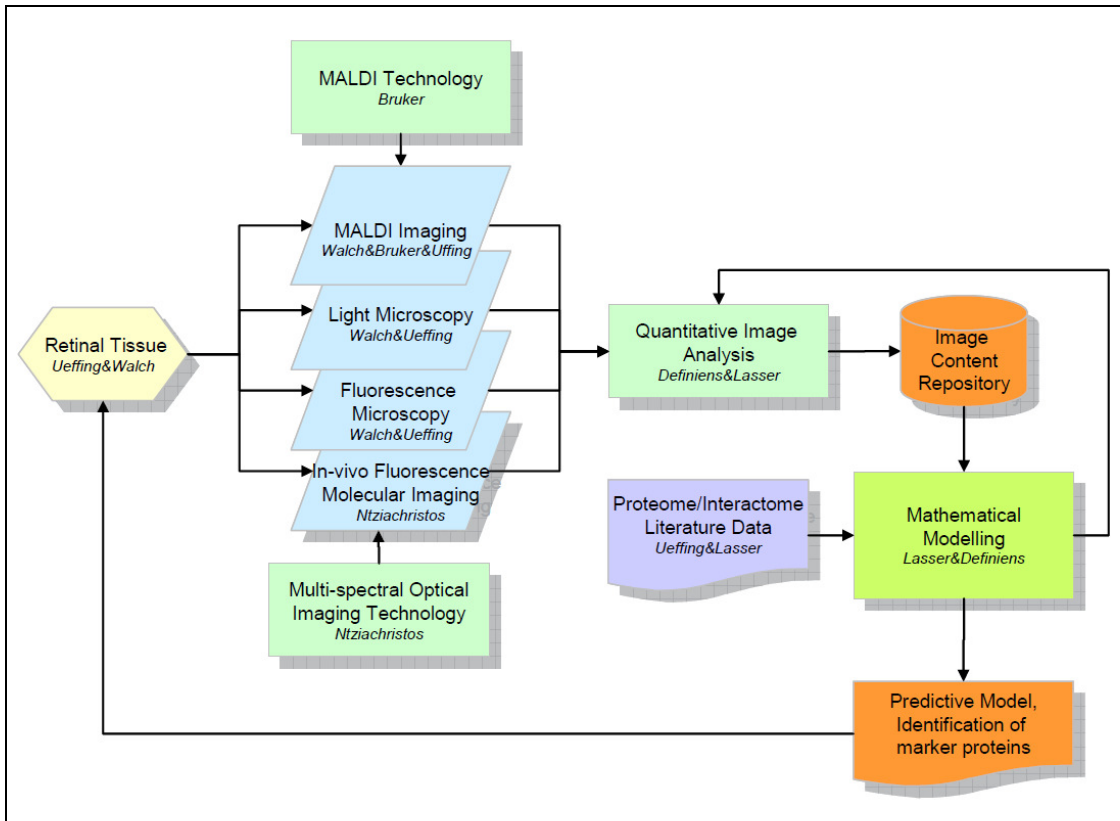


Abb. 1: Projekt Workflow und Zusammenarbeit der Partner.

WP4: Development of an integrated image analysis and data mining platform based on Definiens Cognition Network Technology®	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
Extend Definiens image analysis software platform to read image formats and corresponding experiment metadata												
Define common export data format which allows the standardization of all image modalities												
Define a set of features extracted from the images which will be used for modeling												
Develop Cognition Network Language (CNL) Script to analyze single-modality images from Light and Confocal Fluorescence Microscopy and MALDI Imaging												
Develop CNL Script to analyze time-series of in-vivo fluorescence images												
Develop Cognition Network Language (CNL) Script to co-analyse registered images												
Iteratively refine the set of features used to populate the mathematical model												
Improve image analysis by utilizing knowledge generated by the mathematical modeling and or which is provided by other proteome/interactome data												
Extend image analysis platform towards a general data mining platform which is applied in feature selection												
Documentation and results dissemination												

Abb. 2: Plan mit zeitlichem Ablauf der Unterziele für AP4.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Für das AP4 stellt folgende Auswahl an Literatur den wissenschaftlichen Stand dar:

1. Athelougou M, Feehan O, Schönmeier R, Binnig G: Automatische Analyse mehrdimensionaler Bilddaten, Laborpraxis, May 2008
2. Athelougou M, Schönmeier R., Schmidt G, Schäpe A, Baatz M, Binnig G: Bildanalyse in Medizin und Biologie – Beispiele und Anwendungen, Wintermantel E. und Suk-Woo Ha, Medizintechnik – Life Science Engineering, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008, 983-1008
3. Athelougou M, Schmidt G, Schäpe A, Baatz M, Binnig G: Definiens Cognition Network Technology – A Novel Multimodal Image Analysis Technique for Automatic Identification and Quantification of Biological Image Contents, Spencer L. Shorte and Friedrich Frischknecht, Imaging Cellular and Molecular Biological Functions, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2007, 407-421
4. Baatz M., Schäpe A., Schmidt G., Athelougou M. and Binnig G., Cognition Network Technology: Object Orientation and Fractal Topology in Biomedical Image Analysis. Method and Applications, Losa Gabriele A., Fractals in Biology and Medicine, Volume IV, Springer Verlag 2005, 67-73
5. Athelougou M., Schmidt G., Schönmeier R., Binnig G., Kontextbasierte Bildanalyse mit Cognition Networks, BIOSpektrum, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 13. Jahrgang, Ausgabe 0607, 2004, 657–659
6. Okamoto Y, Higashiyama H, Inoue H, Kanematsu M, Kinoshita M, Asano S: Quantitative image analysis in adipose tissue using an automated image analysis system: Differential effects of peroxisome proliferator-activated receptors and - γ agonist on white and brown adipose tissue morphology in AKR obese and db/db diabetic mice. *Pathology International* 2007; 57: 369–377 doi:10.1111/j.1440-1827.2007.02109.x
7. Schmidt G, Horsch A, Schulz-Wendtland R, Kaur S, Elter M, Sittek H, Wittenberg T, Athelougou M, Binnig G: Definiens Cognition Network Technology for Automated Holistic Analysis in Mammography. In Horsch A, Deserno TM, Handels H, Meinzer H-P, Tolxdorff T, ed. *Bildverarbeitung für die Medizin (BVM)*; 2007 25.-27.03.2007; München, Germany: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007: 282-287
8. Strömberg S, Björklund MG, Asplund C, Sköllerö A, Persson A, Wester K, Kampf C, Nilsson P, Andersson A, Uhlen M, Kononen J, Ponten F, Asplund A: A high-throughput strategy for protein profiling in cell microarrays using automated image analysis. *Proteomics* 2007, 7, 2142–2150; DOI 10.1002/pmic.200700199 Abraham, P Fritz, M. McClellan, P Hauptvogel, M Athelougou, and H Brauch. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with CD44+ clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clinical Cancer Research* (2005) Vol. 11, 1154–1159

Die Definiens Cognition Network Technology stützt sich auf folgende Patente:

1. Method For Processing Data Structures, WO0145033
2. Method For The Processing Of Several Different Data Structures, WO0205198
3. Extracting Information From Input Data Using A Semantic Cognition Network, WO2004036337
4. Cognition Integrator And Language, WO2006106152
5. Automatic Image Analysis And Quantification For Fluorescence In Situ Hybridization US2008137937

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Innerhalb des Projektzeitraums fanden unter Beteiligung von Mitarbeitern der Definiens AG folgende projektbezogenen Treffen statt:

- 20.10.2009: Konsortium Kick Off Meeting, Helmholtz Zentrum München
- 24.10.2010: Arbeitstreffen, Helmholtz Zentrum München
- 02. und 03.06.2010: SysTec Kickoff Meeting, Freiburg
- 09.09.2010: Arbeitstreffen, Helmholtz Zentrum München
- 18.10.2010: Arbeitstreffen, Helmholtz Zentrum München
- 25.10.2010: Arbeitstreffen, Definiens AG
- 13.12.2010: Arbeitstreffen, Helmholtz Zentrum München
- 16.02.2011: Konsortium Meeting, Helmholtz Zentrum München
- 17. und 18.02.2011: Treffen sämtlicher Projektpartner beim Kongress "2nd International Workshop on Protein Analysis of Tissues", München
- 06.06.2011: Arbeitstreffen, Helmholtz Zentrum München
- 20.12.2011: Konsortium Meeting, Helmholtz Zentrum München
- 12. bis 15.10.2011: Treffen vieler Projektpartner auf dem Kongress „53rd Symposium of the Society of Histochemistry“, München
- 20.01.2012: Arbeitstreffen, Helmholtz Zentrum München
- 03.02.2012: Arbeitstreffen, Helmholtz Zentrum München
- 14.05.2012: Arbeitstreffen, Helmholtz Zentrum München
- 06.07.2012: Konsortium Meeting, Definiens AG
- 20.07.2012: Arbeitstreffen, Helmholtz Zentrum München
- 23.07.2012: Arbeitstreffen, Helmholtz Zentrum München

Insbesondere die Zusammenarbeit mit den Projektpartnern vom Institut für Pathologie sowie dem Institut für Biomathematik und Biometrie des Helmholtz Zentrums München gestaltete sich intensiv. Dies zeigt sich auch bei der vom Institut für Pathologie geleiteten und von der Definiens AG substantiell unterstützten Erstellung des Artikels „Die Funktionsweise der Netzhaut“ in Ausgabe 03/2011 der vom BMBF herausgegebenen Zeitschrift „Systembiologie.de“.

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses

Das AP4 gliedert sich in 10 Unterziele (Z1) bis (Z10), deren Bearbeitung im Folgenden näher erläutert wird:

(Z1) Erweiterung der Definiens Bildanalyse-Software-Plattform, um erforderliche Datenformate und zugehörige Metadaten einlesen zu können

Die Definiens Software bietet bereits die Möglichkeit, sämtliche Standard-Datenformate einzulesen und zu verarbeiten. Dies umfasst auch eine große Anzahl von herstellerspezifischen Datenformaten für Mikroskopaufnahmen (Zeiss/Mirax, Leica, Olympus, etc.). Um die im Rahmen des Projekts erstmals zu verarbeitenden Daten von MALDI-Messungen einlesen zu können, wurde ein Datenkonverter implementiert. Dieser ermöglicht den Einsatz eines generischen Treibers (Meta-Header-Format) zum Einlesen dieser spektralen Daten. Metadaten können verarbeitet werden, wenn sie im allgemein üblichen CSV-Format zur Verfügung stehen.

(Z2) Definition eines gemeinsamen Datenformats für Exporte, die eine Standardisierung aller Bildmodalitäten erlauben

Mit den Projektpartnern wurde ein Datenformat vereinbart und Konventionen getroffen, die den reibungslosen Datenaustausch ermöglichen. Die Aufgabe der Definiens AG ist es, sämtliche Bilddaten automatisiert auszuwerten sowie deren Ergebnisse mit Metadaten zusammengeführt aufzubereiten und vereinheitlicht an die Projektpartner zur mathematischen Modellbildung weiterzuleiten. Das vereinbarte Datenformat besteht aus einer Tabelle im CSV-Format für jedes Präparat, deren Spalten die Ergebnisse der Bildanalyse tragen. Jede Zeile definiert einen Messpunkt und trägt auch die Informationen von Metadaten (z.B. Identifikationsnummern und Konditionierung der Präparate). Da die Daten von MALDI-Spektren bis zu 10.000 Kanäle umfassen, ist es EDV-technisch nicht praktikabel diese in einzelnen Spalten der Tabelle abzulegen. Stattdessen sind diese jedem Messpunkt assoziiert in einem Binärformat hinterlegt, das sich auch den Konventionen des Meta-Header-Formats zu Nutze macht.

Im Verlauf des Projekts wurde ein Datenbestand mit diesen Konventionen aufgebaut und mehrfach ergänzt. Dabei hat sich die einfache Erweiterbarkeit des vereinbarten Formats bewährt.

(Z3) Definition eines Satzes von Eigenschaften (Features), die aus den Bildern gewonnen wurden und für die Modellierung herangezogen werden

Ausgangspunkt für die Definiens Bildanalyse sind Mikroskopaufnahmen von Querschnitten der Retina vom Schwein. Die Gewebeproben wurden von Projektpartnern angefertigt und für die diversen Aufnahme-Modalitäten präpariert.

Mit der Definiens Bildanalyse wurde zunächst eine automatische Segmentierung und Klassifikation der einzelnen funktionalen Schichten der Retina aus H&E-gefärbten Mikroskopaufnahmen umgesetzt (Abb. 3a/b). Des Weiteren können in den Schichten zelluläre Strukturen erkannt und quantifiziert werden (Abb. 3c). Daraus lassen sich orts aufgelöste und beschreibende Features für den Gewebetyp der jeweiligen Schicht sowie den darin enthaltenen Zelldichten ableiten.

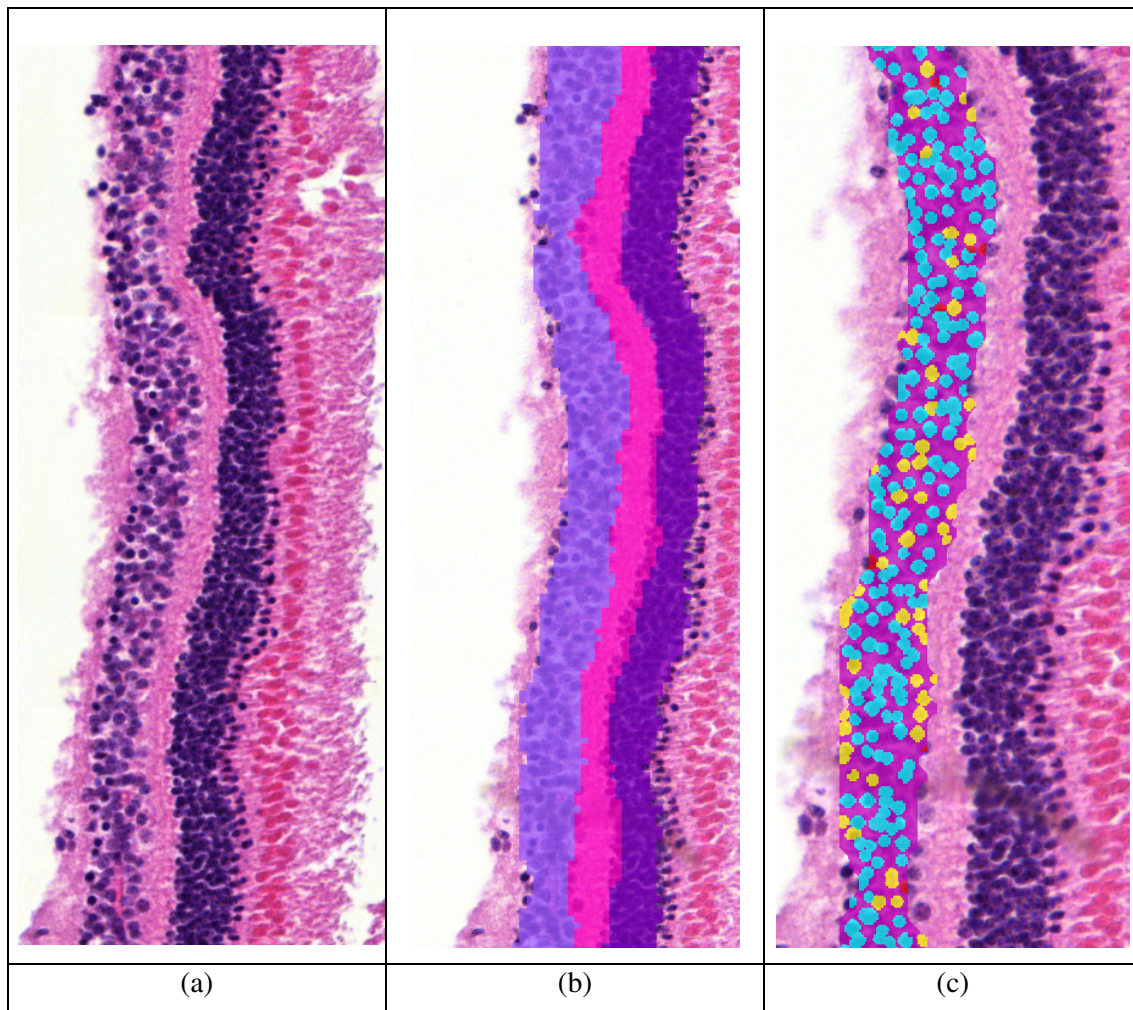


Abb. 3: Ausschnitt einer H&E-gefärbten Mikroskopaufnahme der Retina vom Schwein: (a) Original, (b) mit bildanalytischer Detektion der inneren und äußeren Körnerschicht (hell und dunkel lila) sowie der äußeren plexiformen Schicht (rosa), (c) bildanalytische Detektion von Zellkernen (hellblau und gelb) in der inneren Körnerschicht.

(Z4) Entwicklung eines Cognition Network Language (CNL) Programms, um Bilder einzelner Modalitäten von Licht- und Konfokal-Fluoreszenz-Mikroskopie sowie MALDI Imaging zu analysieren

Neben der unter Z3 entwickelten Bildanalyse zur Auswertung von H&E-gefärbten Mikroskopaufnahmen, wurden CNL-Programme entwickelt, die spektrale Daten von MALDI-Messungen und multispektralen licht- und autofluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen analysieren und aufbereiten. Abb. 4 zeigt eine automatische Peak-Erkennung in MALDI-Spektren als Vorgriff für die mathematische Modellbildung der Projektpartner. Da die Einzelmessungen der multispektralen Mikroskopaufnahmen jeweils nur kleine Ausschnitte des Präparats abdecken, müssen eine Vielzahl von Messungen zunächst passend zusammengesetzt werden. An diese vorverarbeitenden Schritte schließt sich bei der Analyse der spektralen Daten ein Differenzbildung und Normierung jeweils benachbarter spektraler Kanäle an (Abb. 5). Das gleiche Vorgehen wird auch für die autofluoreszenzmikroskopischen Daten angewandt.

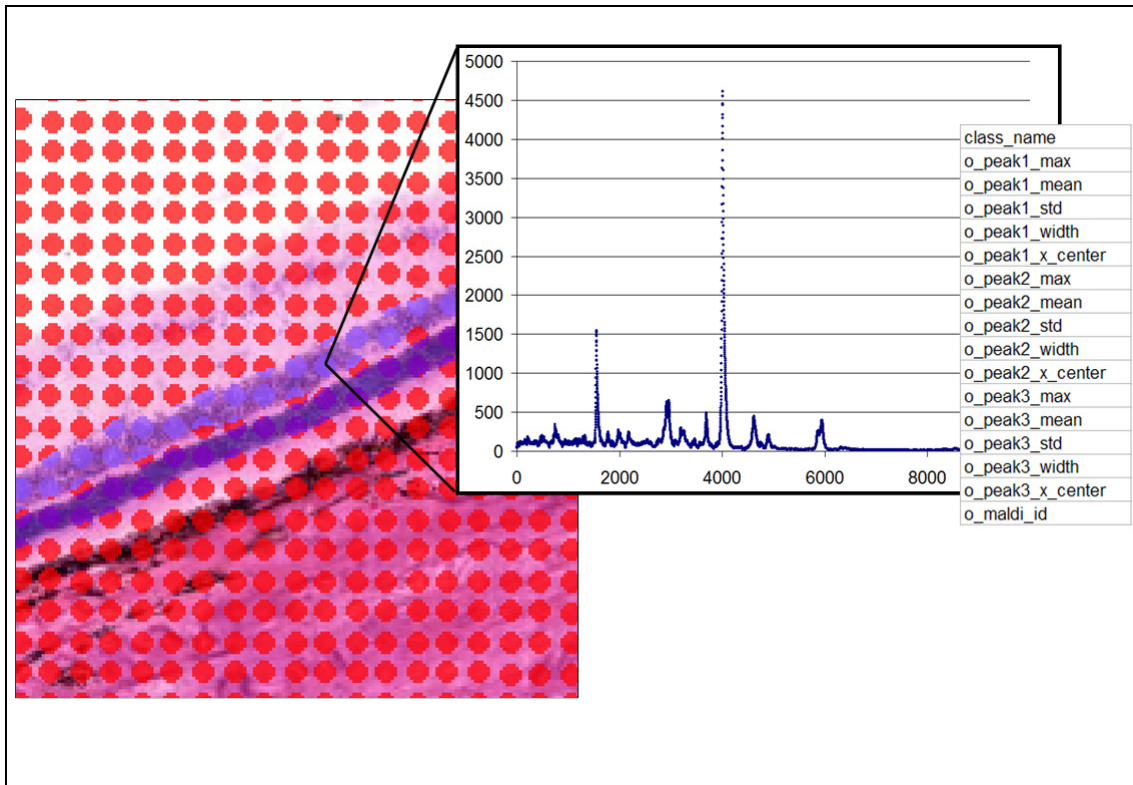


Abb. 4: Darstellung des Spektrums einer MALDI-Messung mit ausgewählten Features resultierend aus einer auf der Definiens Plattform entwickelten Peak-Detektion.

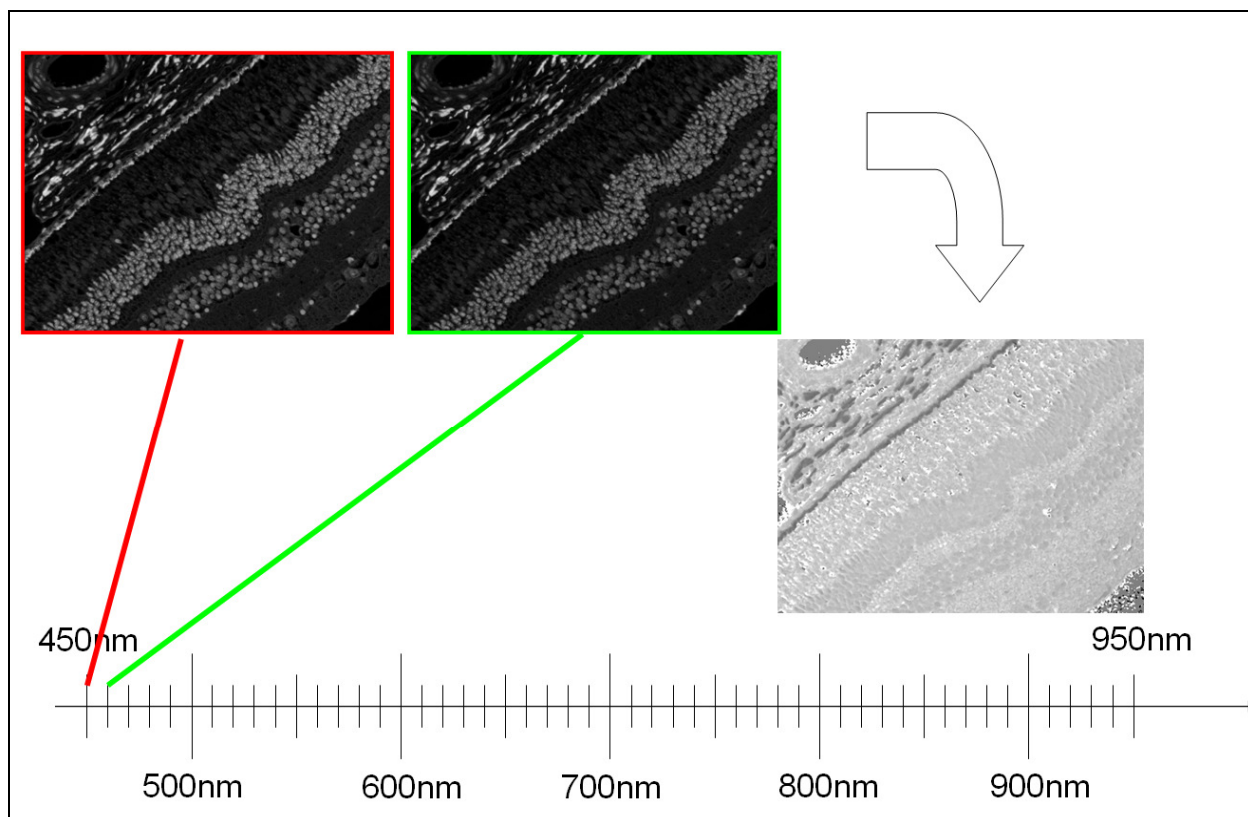


Abb. 5: Bildanalytische Kontrastverstärkung mit Differenzbildung von Bildern jeweils benachbarter Spektralbereiche geben Hinweise für unterschiedliches Erscheinen von hell- und dunkelkonditionierten Retina-Präparaten in bestimmten Wellenlängenbereichen.

(Z5) Entwicklung eines CNL-Programms, um Zeitserien aus in-vivo Fluoreszenz-Bildern zu analysieren

Wie im Zwischenbericht H2-2011 erwähnt, konnten auf Grund regulatorischer Rahmenbedingung und Abläufe von den Projektpartnern keine Zeitserien von in-vivo Fluoreszenz-Bildern im Projektzeitraum der Definiens AG zur Verfügung gestellt werden, die dazu geeignet sind den multimodalen Datenpool zu ergänzen. Stattdessen wurde im Sinne von Z9 der Schwerpunkt auf die Weiterentwicklung einer allgemeinen Data-Mining-Plattform gelegt. Diese erlaubt die Verarbeitung von den vorhanden Daten (inklusive spektraler Modalitäten) und ist flexibel erweiterbar, um auch Daten anderer Modalitäten aufzunehmen.

(Z6) Entwicklung eines CNL-Programms zur Koanalyse von registrierten Bildern

Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur Koanalyse von registrierten Bildern umgesetzt, die jeweils spezifische Vorteile bieten: zunächst können mit der Definiens XD Plattform sämtliche Bilddaten eines Falls geladen werden und stehen gleichzeitig zur Verfügung. Dabei werden durch Registrierung korrespondierende Orte zueinander in Bezug gesetzt. Abb. 6 zeigt ein Beispiel, wie die Orte der MALDI-Messpunkte in die mikroskopische Aufnahme des H&E-gefärbten Präparats desselben Gewebes übertragen werden. Die Vermittlung der Registrierung erfolgt dabei über drei korrespondierende Landmarken, die für jede Modalität manuell gesetzt werden. Auch die Messungen der multispektralen Daten sind auf diese Weise integriert. Jeder MALDI-Messpunkt ist demnach mit bildanalytischen Ergebnissen aus den anderen Modalitäten assoziiert, so dass modalitätsübergreifende Eigenschaftsvektoren erzeugt werden. Abb. 7 illustriert dies und zeigt den Eigenschaftsvektor eines MALDI-Messpunkts. Der zweite Ansatz für die Koanalyse der Daten des multimodalen Datenbestands nutzt die Definiens Image Miner Software. Hier werden die Ergebnisdaten der Bildanalyse von sämtlichen Fällen in Tabellenform zusammengeführt. Die Registrierung von örtlich zugehörigen Daten erfolgt ebenfalls über eine Koordinatentransformation. Metadaten sind über Schlüssel-Wert-Paare assoziiert. Für die Analysen stehen hier die Daten sämtlicher Präparate auf einmal in vereinheitlichter Form zur Verfügung. Abb. 8 enthält ein Beispiel, bei dem aus derart aufbereiteten Daten eine statistische Analyse für unterschiedliche Fälle einzeln und zusammengefasst dargestellt ist.

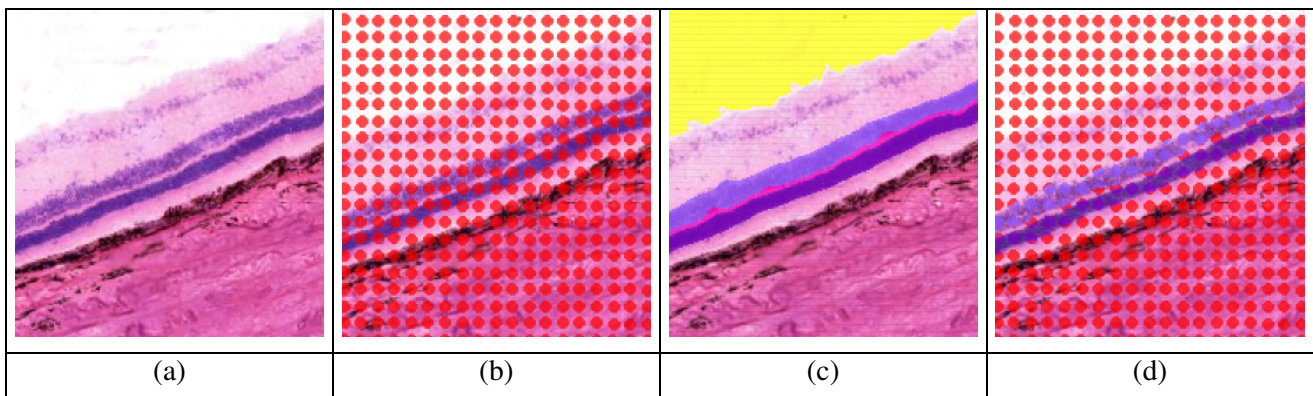


Abb. 6: Ausschnitt einer H&E-gefärbten Mikroskopaufnahme der Retina vom Schwein: (a) Original, (b) mit koregistrierten MALDI-Messpunkten (rot), (c) mit bildanalytischer Detektion der inneren und äußeren Körnerschicht (hell und dunkel lila) sowie der äußeren plexiformen Schicht (rosa), (d) Überlagerung der MALDI-Messpunkte mit Ergebnis der Bildanalyse zur vollautomatischen Regionenauswahl relevanter Spektren.

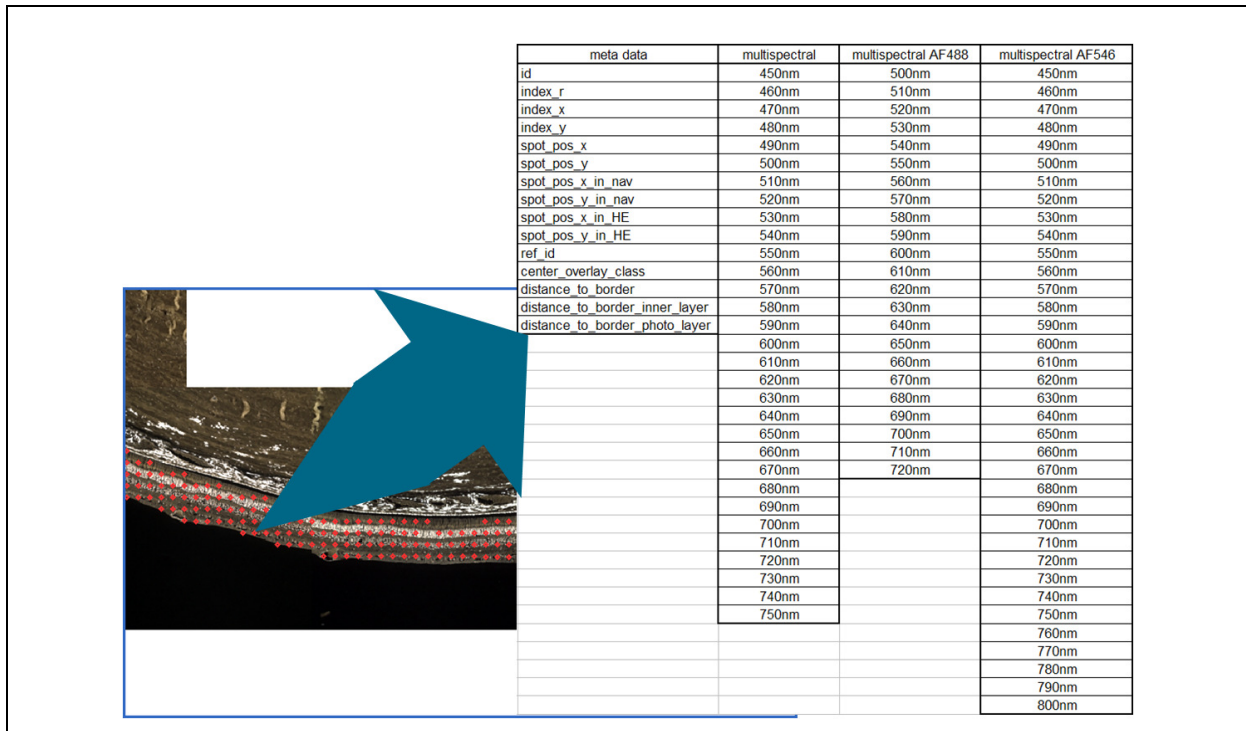


Abb. 7: Jedem MALDI-Messpunkt (hier rot dargestellt in der Ansicht einer multispektralen Messung) ist ein Eigenschaftsvektor zugeordnet, der Daten verschiedener Modalitäten enthält. Neben dem Spektrum der MALDI-Messung (nicht dargestellt) sind dies hier in der ersten Spalte der Tabelle Positionsangaben in koregistrierten Bildern und Werte aus bildanalytischen Analysen (Spalte 1) sowie Daten von multispektralen Messungen (Spalten 2 bis 4).

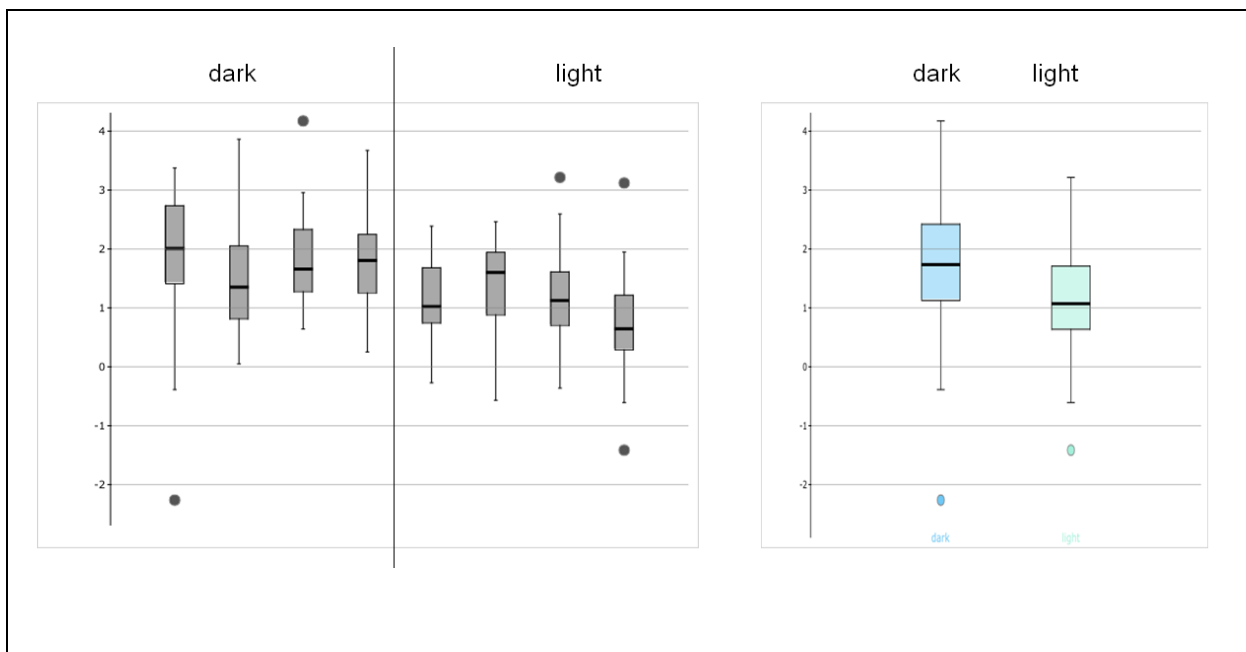


Abb. 8: Exemplarische Darstellung eines Analyseergebnisses mit Definiens Image Miner: links Box-plots einer Eigenschaft (Kontrast benachbarter Kanäle aus multispektralen Daten) für 8 Fälle. Rechts sind jeweils 4 Fälle zusammengefasst, die einer gemeinsamen Eigenschaft (hell- und dunkel-konditionierte Präparate) unterliegen.

(Z7) Schrittweise Verfeinerung eines Satzes von Features, um das mathematische Modell zu bilden

Eine der Hauptherausforderungen des Projekts bestand darin, die Ortsauflösung der MALDI-Messungen zu verbessern. Üblicherweise beträgt der Abstand zwischen zwei Messpunkten rund $50\mu\text{m}$ und liegt damit in der Größenordnung einer einzelnen Schicht der Retina. Um nun bei der mathematischen Modellierung Aussagen mit größerer Ortsauflösung machen zu können, macht man sich zu Nutze, dass der Querschnitt der Retina als ein eindimensionales System mit einer definierten Abfolge von Schichten betrachtet werden kann. Dieses System benötigt einen Bezugsrahmen, um Abstände messen zu können. Mittels automatisierter Bildanalyse können nun für jeden der MALDI-Messpunkte der Abstand zu einer festgelegten Grenze zwischen zwei Schichten der Retina vermessen werden. Das Ergebnis wird mit diesem Abstand in ein eindimensionales System eingetragen und bildet die Grundlage für die Bildung des mathematischen Modells bei der Auswertung von MALDI-Spektraldaten.

Da die MALDI-Messpunkte über das ganze Präparat verteilt sind (Abb. 9), kommen statistisch verteilt viele unterschiedliche Abstände vor und erlauben im eindimensionalen System Aussagen mit deutlich höherer Ortsauflösung als dies mittels MALDI allein mit den $50\mu\text{m}$ -Abständen zwischen den Messpunkten auf dem Präparat möglich wäre.

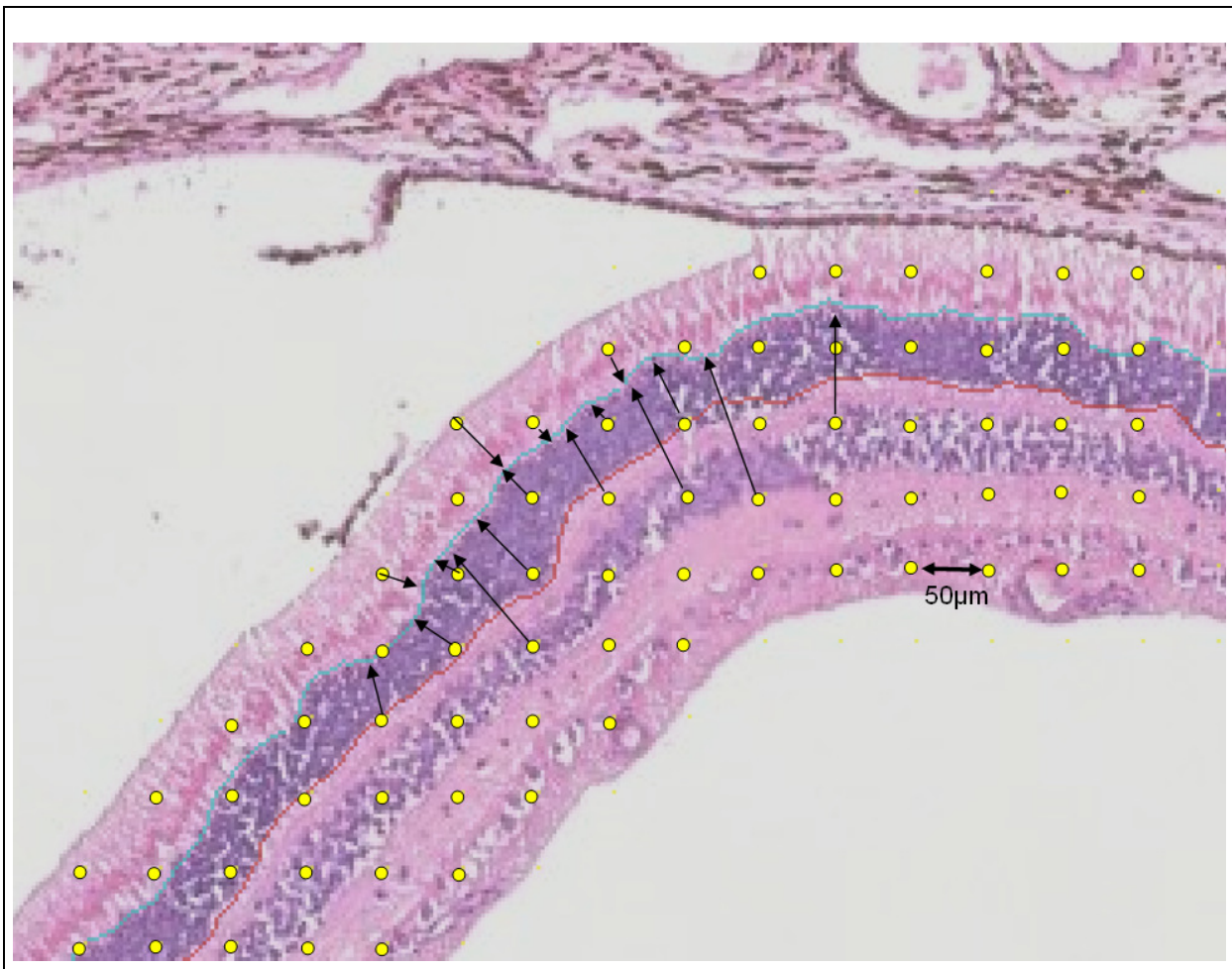


Abb. 9: Für jeden Ort eines MALDI-Messpunkts (gelbe Punkte) können Abstände (schwarze Pfeile) zur Grenze (blaue Linie) der äußeren Körnerschicht mittels einer automatisierten Bildanalyse durch die Definiens Plattform vermessen werden.

(Z8) Verbesserung der Bildanalyse unter Verwendung von Erkenntnissen der mathematischen Modellierung oder anderer Proteom/Interaktom-Daten

Nach Diskussion der ersten Ergebnisse der mathematischen Modellierung mit den Projektpartnern, wurde die unter Z7 eingeführte Betrachtungsweise für das mathematische Modell verbessert, indem bei der Bildanalyse auch die Detektion und Klassifikation der Photorezeptorschicht mit einbezogen wurde (Abb. 10). Darüber hinaus wird bei künftiger Modellbildung die Dicke der einzelnen Schichten dazu genutzt, Abstände in einer Schicht zu normieren. Die verbesserte Bildanalyse liefert die dazu nötigen Parameter und berechnet für jeden MALDI-Messpunkt Abstände zu den zwei Grenzen der drei benachbarten Retina-Schichten (Abb. 11).

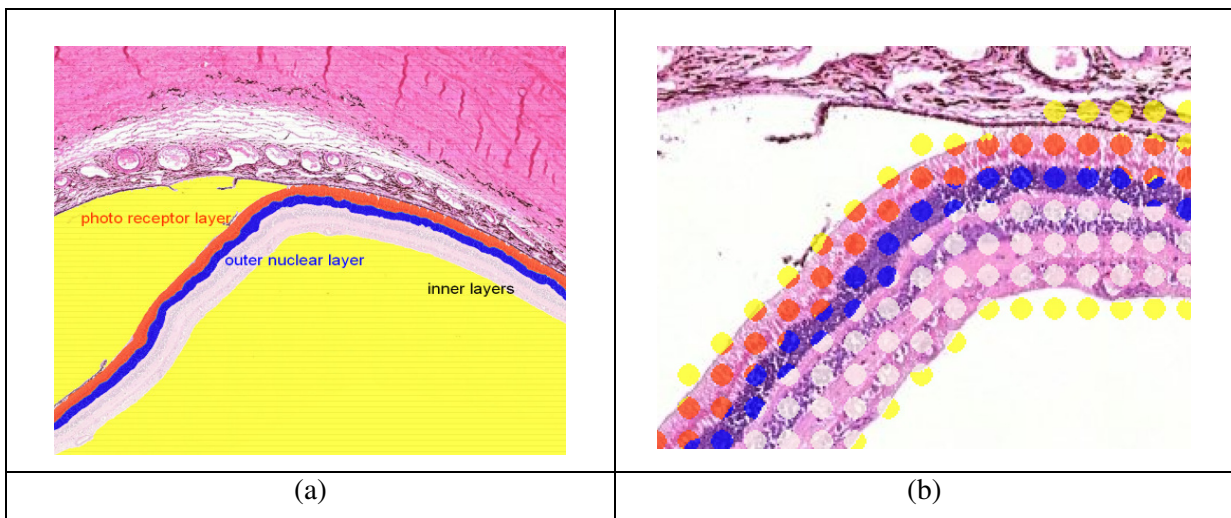


Abb. 10: Ausschnitt einer H&E-gefärbten Mikroskopaufnahme der Retina vom Schwein: (a) Segmentierung und Klassifikation von drei Schichten der Retina, (b) Übertragung der Ergebnisse auf den Ort von MALDI-Messpunkten, um diese für die mathematische Modellbildung weiter zu charakterisieren.

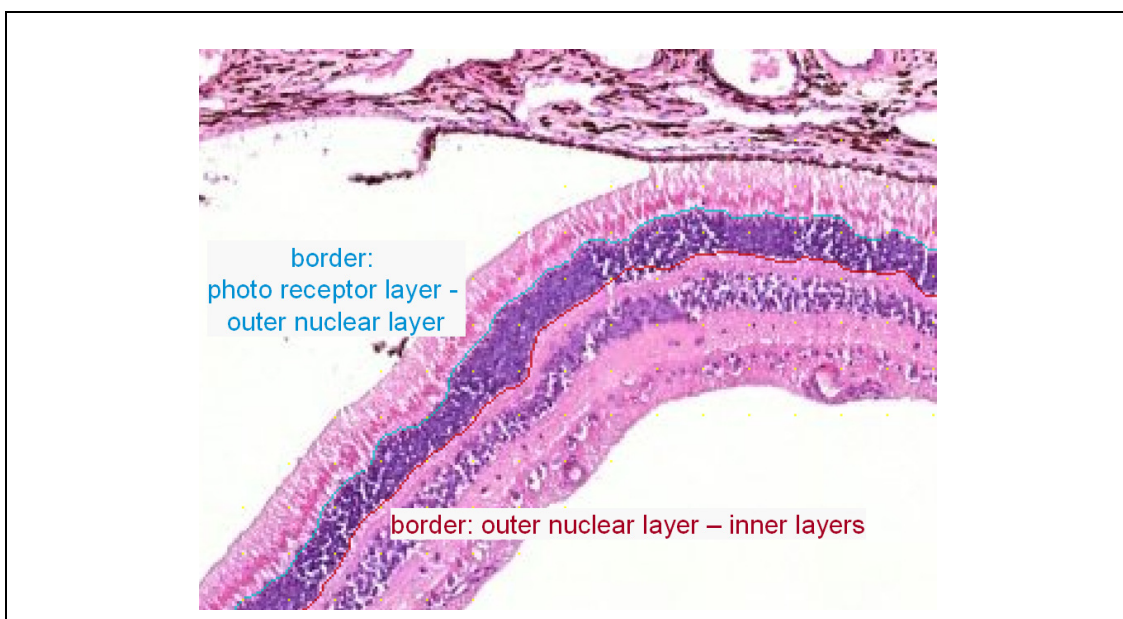


Abb. 11: Grenzen zwischen Photorezeptor- und äußerer Körnerschicht (blau) sowie äußerer und innerer Körnerschicht (rot) als Bezugsrahmen für die Normierung von Abständen der MALDI-Messpunkte.

(Z9) Erweiterung der Analyse-Plattform hinsichtlich einer allgemeinen Data-Mining-Plattform, die für Merkmalsauswahl verwendet wird

Während des Projektverlaufs wurden Entwicklungen der Definiens AG zur Schaffung einer allgemeinen Data-Mining-Plattform unterstützt. Diese steht in Form des Produkts *Image Miner* zur Verfügung, die beständig weiterentwickelt wird. Sie dient der Zusammenfassung, Aufbereitung und Analyse sämtlicher Ergebnisdaten des Projekts und bietet u.a. Module zur Klassifikation und Merkmalsauswahl. Spezifische Erweiterungen erlauben den Zugang zu den spektralen Daten der MALDI-Messungen.

(Z10) Dokumentation und Ergebnis-Verbreitung

Neben den halbjährlichen Zwischenberichten und diesem Endbericht wurden Ergebnisse in den Veröffentlichungen unter 6. dokumentiert sowie auf zahlreichen Powerpoint-Folien, die bei den regelmäßigen Konsortialtreffen (siehe 5.) gezeigt wurden, festgehalten.

Auf folgenden Kongressen wurden Ergebnisse vorgestellt und diskutiert:

- Vortrag auf dem "2nd International Workshop on Protein Analysis of Tissues" am 17.02.2011 in München
- Haupt- und Sessionvortrag auf dem "53rd Symposium of the Society for Histochemistry" (SHC2011) am 14./15.10.2011 in München
- Poster und Posterpräsentation auf der "4th Conference on Systems Biology of Mammalian Cells" (SBMC2012) am 10.07.2012 in Dresden

2. Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Gemäß dem Finanzierungsplan des Projektantrags wurden bei der Definiens AG zwei Wissenschaftler für 36 Monate zu 50% finanziert. Dafür wurde inklusive Reisekosten eine Zuwendung von 94.800,-€/Jahr beantragt. Für detaillierte Positionen des zahlenmäßigen Nachweises: siehe Schlussrechnung.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Im Rahmen des Arbeitspakets wurden sowohl wissenschaftliche als auch methodische Erkenntnisse gewonnen. Die Entwicklung neuer Methoden – allen voran die Verbesserung der Ortsauflösung von MALDI-Messungen mit Unterstützung von automatisierter Bildanalyse – war notwendig und eröffnet erst die Möglichkeit, weitere wissenschaftliche Fragenstellungen zu bearbeiten. Unabhängig von der konkreten Anwendung innerhalb des Projekts sind diese Erkenntnisse wertvoll und nützlich. Ohne die spezifischen Kompetenzen der Projektpartner, die bei diesem Vorhaben auf einzigartige Weise gebündelt sind, wäre eine Erzielung der Ergebnisse nicht möglich gewesen. Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten zeigt sich auch in den Ergebnissen zu Z9. Hier wurde durch Weiterentwicklung einer allgemeinen Data-Mining-Plattform ein mächtiges Werkzeug erstellt, das die Basis für weitere Erkenntnisse und Innovationen bereitet.

4. Voraussichtlicher Nutzen

Lichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und MALDI-Imaging sind für sich genommen bereits Methoden, um potentielle Biomarker zu identifizieren und zu validieren. Eine multimodale Analyse eröffnet die Möglichkeit für neue Erkenntnisse, weil sich die Modalitäten mitunter gegenseitig ergänzen: beispielsweise unterstützt eine Auswertung lichtmikroskopischer Aufnahmen eine Verbesserung der Ortsauflösung von MALDI-Messungen. Insbesondere wenn quantitative Bildanalyse zur Anwendung kommt, werden zeit- und damit kostenintensive manuelle Analyseschritte vermieden.

Im Rahmen des Projekts wurde ein Prototyp entwickelt, der Bildanalyseergebnisse für multimodale Bilddaten automatisiert zur Verfügung stellt. Die Definiens Software Image Miner wurde dahingehend erweitert, dass diese und andere assoziierte Daten aufgenommen und weiterverarbeitet werden können. Es stellt somit ein allgemeine Data-Mining-Plattform dar, die bereits jetzt als Produkt verfügbar ist und für die kombinierter Verarbeitung von multimodalen Daten weiteren Nutzen bietet.

Die bestehende Kundenbasis der Definiens AG mit mehr als 1000 verkauften Lizenzen und der ausgeprägten Vernetzung mit dem Wissenschaftsbetrieb sowie der Pharmabranche stellt eine wertvolle Basis für eine erfolgreiche Vermarktung dar. Durch dieses neue Produkt werden Kunden in die Lage versetzt, großen Mengen nicht nur von Bilddaten zu verarbeiten und zu analysieren. Dies hilft signifikant die Entdeckung von neuen Biomarkern zu beschleunigen sowie andere Aufgaben der molekularen Bildgebung in der klinischen Forschung zu unterstützen.

5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Auf dem Kongress „53rd Symposium of the Society of Histochemistry“ vom 12. bis 15.10.2011 in München war ein Themenschwerpunkt die Vorstellung von aktuellen Entwicklungen des MALDI-Imaging. Fortschritte auf dem Gebiet bei anderen Stellen war die Verbesserung der nativen Ortsauflösung von MALDI-Messungen. Dies ist allerdings nur bei Verwendung von bestimmten Matrixpräparationen sinnvoll, die einen eingeschränkten massenspektroskopischen Messbereich hinnehmen.

Eine andere neue Entwicklung stellt das 3D-MALDI-Imaging dar: hier werden die Daten von einzelnen 2D-MALDI-Messungen aufeinanderfolgender Gewebeschnitte softwaretechnisch wieder zusammengefügt. Damit lassen sich 3D-Rekonstruktionen von Bereichen in einer Gewebeprobe anfertigen, bei der für jeden 3D-Ortspunkt massenspektroskopische Messdaten vorliegen. Dieses sehr aufwändige Verfahren muss sich erst bei der Untersuchung einzelner Proben bewähren, bevor es für multimodale Analysen interessant wird.

6. Veröffentlichungen

Folgende Publikationen von Mitarbeitern der Definiens AG als Hauptautor wurden angefertigt:

- “Multimodal Image Analysis of Retinal Tissue using MALDI and Histochemistry”, Günter Schmidt, Ralf Schönmeier, Stephan Meding, Axel Walch; Proccs. "2nd International Workshop on Protein Analysis of Tissues", München, 2011.
- “Present and Future Impact of Image Analysis and Image Mining on Histochemistry”, Gerd Binnig; Proccs. "53rd Symposium of the Society for Histochemistry", München, 2011.
- “Automated Co-analysis of MALDI- and H&E-images of Retinal Tissue for an improved spatial MALDI Resolution”, Ralf Schönmeier, Günter Schmidt, Stephan Meding, Axel Walch, Gerd Binnig; Proccs. "53rd Symposium of the Society for Histochemistry", München, 2011.
- “A multi-spectral approach towards quantitative characterization of light- and dark-adapted porcine retinal tissue”, R. Schönmeier, A. Feuchtinger, S. Meding, G. Schmidt, A. Walch, G. Binnig; Proccs. “4th Conference on Systems Biology of Mammalian Cells”, Dresden, 2012.