

# Untersuchungen von Struktur und Funktion lebender Zellen mit Hilfe digitaler Bildverarbeitungsmethoden.

## Teilprojektleiter

Prof. Dr. Dr. med. habil.  
Hans-Gerd Lipinski

## Projektdauer

2005 – 2008

## Projektpartner

Prof. Dr. Wiemann  
Institut für Biologische  
Emissionsbewertung,  
Marl  
Prof. Dr. Gulbins  
Universität  
Duisburg-Essen  
Institut für Molekular-  
biologie,  
Prof. Dr. Fandrey  
Universität  
Duisburg-Essen  
Institut für Physiologie

## Mitarbeiter

Dr. Sebastian Magosch  
M.Sc.  
Dr. Alexander Roth, M.Sc.  
M.Sc. André Bernardini  
(Doktorand, Institut für  
Physiologie)  
M.Sc. Christian Imhäuser  
(Doktorand, Institut für  
Molekularbiologie)  
M.Sc. Michael Granseier  
(Doktorand, Institut für  
Molekularbiologie)  
M.Sc. Darius Schippritt  
(Doktorand, Institut für  
Biologische Emissions-  
bewertung)  
B.Sc. Jan-Hendrik Terjung  
(wiss. Mitarbeiter)

## Förderung

Fachhochschule  
Dortmund  
Forschungsbudget

## Kontakt

Prof. Dr. Dr. med. habil.  
Hans-Gerd Lipinski  
Fachbereich Informatik  
Fachhochschule  
Dortmund  
Emil-Figge-Straße 42  
44227 Dortmund  
Tel.: (0231) 755-6721  
E-Mail: lipinski  
@fh-dortmund.de

## Zusammenfassung:

Mit Methoden der digitalen Bildverarbeitung werden Bilder lebender Zellen, von Zellsystemen und Zellverbänden analysiert. Es werden Verfahren entwickelt, mit denen rechnergestützt optimierte räumliche Rekonstruktionen von Zellen generiert sowie Mobilitätsparameter anhand von zellulären Bewegungsmustern bestimmt werden können. Diese Analysen dienen dem grundlegenden Verständnis von in vitro Untersuchungen an zellulären Mikrosystemen, die für die Erforschung von Krankheiten beim Menschen unentbehrlich sind. Die Vorhaben werden von Promotionsprojekten für Absolventen des Masterstudiengangs Medizinische Informatik begleitet.

## Ergebnisse:

Die moderne digitale Bildverarbeitung erlaubt nicht nur die Aufbereitung der Bilddaten für eine optimale Visualisierung beliebiger zwei- oder dreidimensionalen Szenarien, sondern ermöglicht auch eine quantitative Analyse der Bilddaten. Für die Bewertung von biomolekularen und zellulären Prozessen stellt die digitale Bildverarbeitung mittlerweile ein unverzichtbares Instrument in der Biomedizin dar. Mit Hilfe moderner Mikroskope und Computern lassen sich molekulare und zelluläre Reaktionen registrieren und zielgerichtet auswerten.

Die Arbeitsgruppe *Biomedizinisch-technische Informatik* arbeitet seit 2001 mit biowissenschaftlichen Forschungseinrichtungen zusammen, um im Rahmen von Kooperationsprojekten praxisnah Bildaufbereitungs- und Analysesoftware zu erstellen. Zu diesen Kooperationspartnern gehören das Institut für Physiologie/Bereich molekulare Physiologie der Universität Duisburg-Essen (Prof. Dr. J. Fandrey), das Institut für Molekularbiologie der Universität Duisburg-Essen (Prof. Dr. E. Gulbins) sowie das Institut für Biologische Emissionsbewertung gGmbH in Marl (Prof. Dr. M. Wiemann). In diesen Institutionen hat die Arbeitsgruppe mit finanzieller Unterstützung durch das Rektorat der FH Dortmund, durch den Fachbereich Informatik der FH Dortmund und das Wissenschaftsministerium des Landes NRW digitale Mikroskopie-Arbeitsplätze eingerichtet, an denen Mitarbeiter der jeweiligen Forschungseinrichtungen sowie Studierende und Absolventen des Masterstudiengangs Medizinische Informatik der Fachhochschule Dortmund gemeinsam Bilddaten für Forschungs- und Studienabschlussarbeiten sowie Doktorarbeiten generieren. Die Abbildung 1 zeigt beispielhaft einen solchen Gemeinschaftsarbeitsplatz im Institut

für Physiologie der Universität Duisburg-Essen. Es handelt sich um ein hochauflösendes Laserscanning-Mikroskop, mit dem zwei- und dreidimensionale Bilder von molekularen Wechselwirkungen mit lebenden Zellen generiert werden können.



Abb. 1: Gemeinsam genutztes Laserscanning-Mikroskop (Institut für Physiologie, Uni Duisburg-Essen)

Bevor eine Bildanalyse durchgeführt werden kann, müssen die mit der mikroskopischen Aufnahmeeinheit erstellten Originalbilder so aufbereitet werden, dass eine sinnvolle Auswertung möglich wird. Eine typische Vorverarbeitung besteht darin, die Bildszenen in Hintergrund und Objektbereich (z.B. Zelle) formal zu zerlegen. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Binärszenen. Konventionelle Binärisierungsverfahren führen häufig zu Ergebnissen, die keine sinnvollen Bildanalyse zulassen. Die Abbildung 2 zeigt ein typisches Beispiel. Die aus den Originalbilddaten (lebende Knochenzellen; Abb. 2A) mit konventionellen Verfahren erzeugte Binärszene (Abb. 2B) ist unbefriedigend, da die Zellen nicht eindeutig dargestellt sind. Mit einer gezielten Manipulation des Fourierspektrums der Originalbilddaten und anschließender Rücktransformation in den Ortsbereich (Abb. 2C) hingegen lassen sich brauchbare Binärisierungen erzielen (Abb. 2D). Die Manipulationen des Fourierspektrums erfolgt mit Hilfe eines in der Arbeitsgruppe entwickelten

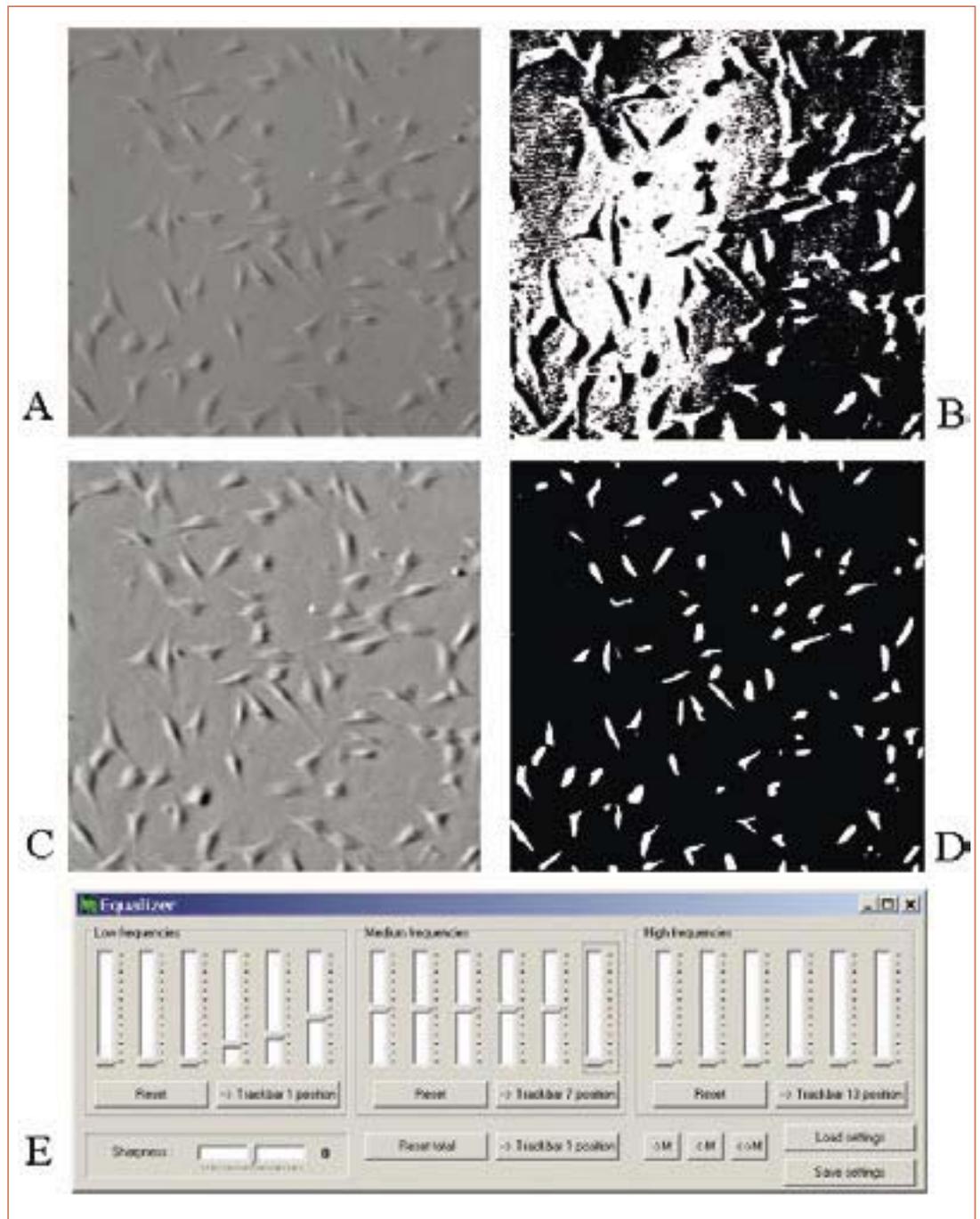


Abb. 2: Erzeugung von Binärszenen vitaler Knochenzellen (*in vitro*) mit Hilfe von Binärisierungsverfahren ohne und mit Anwendung eines Image-Equalizers. Originalbilddaten (2A), konventionelle Binärisierung (2B), Korrektur der Bilddaten nach Neugewichtung des Fourierspektrums der Originalbilder (2C), Binärisierung dieser Bilddaten (2D). Einstellung der Gewichtung der spektralen Anteile des Bildes mit Hilfe des Image-Equalizers (2E).

so genannten „Image Equalizers“. Hier werden die Originalbilddaten durch gezielte Gewichtung ihres Ortsfrequenzspektrums (Abbildung 2 E), das mit Hilfe einer diskreten zweidimensionalen schnellen Fouriertransformation ermittelt wurde, modifiziert. Eine anschließende Fourier-Rücktransformation liefert die verbesserten binären Bilddaten.

Dieses ursprünglich für zweidimensionale Bilddaten entwickelte Image-Equalizer Verfahren wurde zusätzlich für dreidimensionale Bilddaten erweitert (so genannter Voxel-Equalizer). Hier werden die Originalbilddaten, die dreidimensionale Informationen beinhalten, zunächst räumlich Fourier transformiert. Danach erfolgt die Neugewichtung der spektralen Anteile analog zum zweidimensionalen Image-Equalizer. Abschließend werden die modifizierten Spektren aus dem 3D-Spektralbereich in den Bildbereich zurück transformiert. Mit diesem Verfahren bleiben feine räumliche Strukturen von Zellen nach erfolgter Filterung erhalten. Wendet man hingegen auf den 3D-Bildstapel den zweidimensionalen Image-Equalizer für jede Bildschicht einzeln an und rekonstruiert daraus die 3D-Szene, gehen zahlreiche Detailstrukturen im Bild verloren. Die Abbildung 3 zeigt diesen Effekt. In den Bildausschnitten A, B und C bleiben offensichtlich räumliche Strukturen der Zelle nach Anwendung des Voxel-Equalizers (Abb. rechts) besser erhalten als bei einer Verwendung des zweidimensionalen Image-Equalizers (Abb. links).

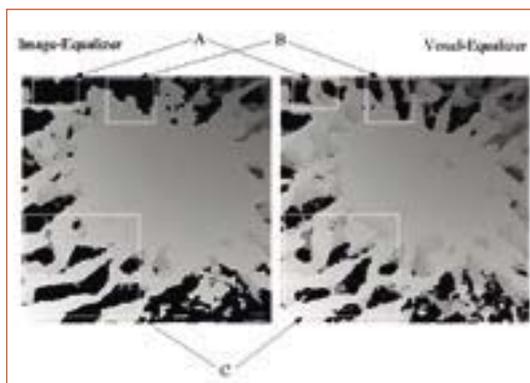


Abb. 3: Bildkorrektur einer lebenden Knochenzelle mit Hilfe des zweidimensionalen Image-Equalizers (links) und des dreidimensionalen Voxel-Equalizers (rechts). Deutliche Unterschiede zeigen sich in den markierten Ausschnitten A, B und C.

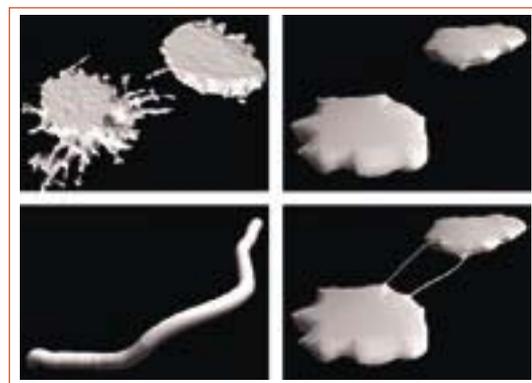


Abb. 4: Modellierung dreidimensionaler Zellverbände. Natürliche Zellstrukturen (oben links) werden durch Entfernung von Verbindungsstrukturen vereinfacht (oben rechts) und mit Hilfe von modellierten Verbindungen (unten links) zu einem Zellverbandsmodell verknüpft.

Die räumliche Rekonstruktion der Zellbilddaten ermöglicht auch eine gezielte Vereinfachung der Zellmorphologie. Die Abbildung 4 (links oben) zeigt zwei lebende Knochenzellen mit ihren teilweise unterbrochenen Verbindungsstrukturen. Diese Strukturen, die Interaktionen zwischen Zellen ermöglichen, lassen sich in der virtuellen 3D-Szene vollständig entfernen (Abb. 4, rechts oben) und durch graphisch modellierte Verbindungen (Abb. 4, links unten) ersetzen. Auf diese Weise entstehen Zellmodelle (Abb. 4, unten rechts), mit deren Hilfe Stoffaustauschprozesse in Zellverbänden simuliert und mit experimentell zugänglichen Daten verglichen werden können (an solchen Modellanalysen wird derzeit gearbeitet).

Neben der morphologischen Struktur von lebenden Zellen hat deren Bewegungsverhalten eine große Bedeutung für die Beurteilung des Zellzustandes. In vitro, also in einer Zellkultur beobachtete Knochenzellen lassen sich im Experiment durch biochemische Eingriffe gezielt in bestimmte Richtungen lenken. Mit diesen Zellbewegungen gehen häufig charakteristische Formveränderungen der Zelle einher, die Aussagen über die Vitalität von Zellen und/oder das biochemische Umfeld, in dem sich die Zellen aufhalten, erlauben. Durch den Einsatz eines rechnergestützten Verfahrens konnten die Bewegungen der lebenden Zellen näher analysiert werden. Diese Bewegungsanalyse basiert auf binären Bildern, die mit Hilfe des Image-Equalizer Verfahrens erzeugt werden (siehe Abbildung 2). Aus Bildsequenzen lassen sich für jede Zellen über die Zeit hinweg sowohl der Bewegungsverlauf („Pfad“)

als auch die dabei auftretenden Zellverformungen bestimmen.

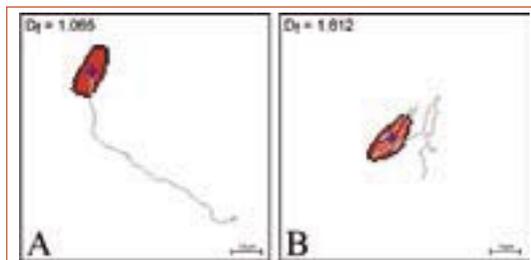


Abb. 5: Zurückgelegte Pfade von mobilen digitalisierten Zellen aufgrund einer experimentell provozierten Bewegung. A: überwiegend geradliniger Bewegungsablauf (fraktale Bewegungsdimension  $D_f=1.07$ ); B: zirkulärer Bewegungsablauf (fraktale Dimension  $D_f=1.6$ ).

Die Abbildung 5 zeigt exemplarisch zwei typische Bewegungsmuster. Im ersten Fall erfolgt eine geradlinige Bewegung (Abbildung 2A), im zweiten Fall liegt ein zirkuläres Bewegungsmuster vor. Charakterisierbar sind die von der Zelle generierten Pfade mit Hilfe der so genannten „fraktalen Dimension“, einer mathematischen Größe, welche die Komplexität des Pfades in Form einer Zahl  $D_f$  angibt. Hiermit lassen sich die unterschiedlichen zellulären Bewegungsabläufe erfolgreich klassifizieren.

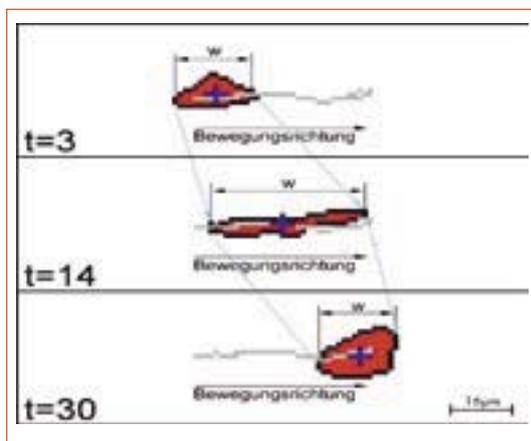


Abb. 6: Formveränderung einer Zelle während eines Bewegungsablaufs (zu unterschiedlichen Zeiten  $t$  [s] registriert).

Mobile Zellen weisen während des Bewegungsablaufs zudem häufig typische Zellformveränderungen auf. Diese lassen sich mit Hilfe der digitalen Bildverarbeitung erfassen und quantifizieren. Die Abbildung 6 zeigt die Änderung der Zellform zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Zunächst ist die Zelle eher rund ( $t=3$ ), anschließend erfolgt eine Streckung der Zelle ( $t=14$ ), die anschließend wieder in eine rundliche Form übergeht ( $t=30$ ). Mit der zeitweiligen Streckung der Zelle ist ein „Kriechprozess“ verbunden, welcher der Zelle eine rasche Fortbewegung ermöglicht.

Die Teilprojekte der spektralen Bildvoranalyse mit Hilfe der Image-Equalizer bzw. Voxel-Equalizer Technik, der räumlichen Rekonstruktion der Zellen sowie der Analyse von Zellbewegungen am Beispiel lebender in vitro Knochenzellen wurden weitgehend abgeschlossen. Zwei Promotionsprojekte (Promotion zum „Doktor der naturwissenschaftlichen Medizin“) konnten im Rahmen dieser Teilprojekte an der Universität Duisburg-Essen in 2007 erfolgreich beendet werden (Alexander Roth: Einfluss der Ortsfrequenzen auf digitale Mikroskopiebilddaten vitaler Zellpräparate; Sebastian Magosch: Analyse von Zellbewegungsmustern).

Auf der Basis der gewonnenen methodischen Erkenntnisse, wurden in 2007 neue Projekte begonnen, die mit entsprechenden kooperierende Promotionsvorhaben für Absolventen des Masterstudiengangs Med. Informatik der Fachhochschule Dortmund einher gehen. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen werden aktuell zelluläre Proteininteraktionen unter Verwendung der molekularen „Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Technologie“ untersucht (Promotionsprojekt M.Sc. A. Bernardini). Zusammen mit dem Institut für Molekularbiologie werden computergestützte Verfahren zur räumlichen Erfassung und Visualisierung von Wechselwirkungen zwischen Zellen und Molekülen entwickelt (Promotionsprojekte M.Sc. Chr. Imhäuser und M.Sc. M. Granseier). In Kooperation mit dem Institut für Biologische Emissionsbewertung gGmbH (Marl) wird eine Analysesoftware entwickelt, welche neue Bewertungsmöglichkeiten von Wechselwirkungen zwischen Feinststäuben und dem Immunsystem des Menschen eröffnet (Promotionsprojekt M.Sc. D. Schippritt).