Bildverarbeitung für ein vollautomatisches Fluoreszenz-Mikroskop zur Messung von DNA-Schäden und DNA-Reparatur

Wilfried Böcker und Wolfgang Rolf*

Institut für Medizinische Strahlenphysik, Universitätsklinikum Essen,
45122 Essen, Hufelandstr. 55, Institut für Toxikologie, Novartis Basel, Schweiz
Email: wilfried.boecker@uni-essen.de

Zusammenfassung. Zur Erfassung von DNA-Schäden und DNA-Reparatur hat sich der *Comet-Assay* als sensitive Methode etabliert. Die in der Literatur vorgestellten Resultate entstammen verschiedenen manuellen Auswertesystemen bzw. unterschiedlichen Methoden zur Quantifizierung des DNA-Schadens und sind folglich schlecht bzw. gar nicht vergleichbar. Basierend auf diesen Erfahrungen haben wir ein vollautomatisches Bildanalyse-System für den *Comet-Assay* entwickelt, um eine objektivere Auswertung zu gewährleisten. Die Analysesoftware wurde in zwei Bereiche unterteilt. Im ersten Schritt erfolgt eine automatische Zellerkennung bzw. Zellklassifizierung. Im zweiten Schritt werden dann die klassifizierten Kometen analysiert und entsprechende DNA-Schaden-Parameter berechnet. Durch die sehr schnelle Auswertezeit sowie die Möglichkeit der simultanen Messung des DNA-Gehaltes kann mit diesem System zellzyklus-abhängige DNA-Reparatur untersucht werden.

1 Einleitung

Durch die zunehmende Leistungsfähigkeit moderner Personal-Computer und den damit verbundenen effektiven Einsatz digitaler Bildverarbeitung werden computergestützte mikroskopische Auswerteverfahren für die biomedizinische Forschung zunehmend attraktiver (z.B. zur Bestimmung von DNA-Schäden). Das bekannteste Beispiel automatisierter Assays [1] ist zweifelsohne die Chromosomen-Analyse in Metaphasen, für die Versuche zur automatischen Auswertung bereits mehr als 20 Jahre zurück reichen.

Daneben hat sich die moderne Fluoreszenz-Mikroskopie seit vielen Jahren als eines der wichtigsten Systeme zur Untersuchung von einzelnen Zellen oder gar Zellbestandteilen etabliert. Daher ist ein vollautomatisches Bildverarbeitungssystem für die Fluoreszenz-Mikroskopie notwendig und wünschenswertswert. Allerdings ist es durch die physikalischen (fluoreszenz-markierte Zellen sind nur sehr schwach fluoreszierende, inkohärente Objekte) und biologischen (die große Variabilität der zellulären Eigenschaften) Randbedingungen sehr schwierig gewesen vollautomatische *fluorescence-image-cytometry*-Systeme zu entwickeln.

Zur vollautomatischen Auswertung ist ein schneller Auto-Fokus für Fluoreszenz-Mikroskopie notwendig. Wir haben zu diesem Zweck einen Analog-Autofokus entwickelt, dessen Fokussierzeit zwischen 1-2 Sekunden beträgt. Hierdurch wird eine sehr schnelle Analyse möglich [2].

Als Applikation haben wir an diesem System den sogenannten *Comet-Assay* implementiert, der sich zur Erfassung von DNA-Schäden und DNA-Reparatur als sensitive Methode seit einigen Jahren etabliert hat [3,4,5]. Bei diesem Assay wird aus dem Verhältnis der Gesamtfluoreszenz-Intensität aus Kometenschweif und Kometenkopf ein zum DNA-Schaden korrelierender Messwert berechnet [6].

Zur Ausbildung von Kometenstrukturen müssen zunächst die auf dem Objektträger befindlichen Zellkerne der zu analysierenden Zellen einem schwachen elektrischen Feld ausgesetzt werden und anschließend mit einem DNA-Fluoreszenzfarbstoff gefärbt werden. In Abhängigkeit des zuvor applizierten DNA-Schadens bilden sich dann mehr oder weniger ausgeprägte Kometenschweife aus.

2 Methoden

2.1 Bildverarbeitungs-Hardware

Ein Fluoreszenz-Mikroskop (MPV II, Leitz Wetzlar) wurde mit Schrittmotoren (Märzhäuser) ausgestattet, die es erlauben den Mikroskoptisch in alle drei Raumrichtungen zu bewegen (x,y Schrittweite: 2µm, z: 0,2µm). Weiterhin wurde das Mikroskop mit einem optischen Strahlteiler ausgestattet, so dass es möglich ist simultan 3 unterschiedliche Fluoreszenz-Emissionswellenlängen über entsprechende Bildverstärker-Kameras zu erfassen (Proxitronic). Für den *Comet-Assay* ist jedoch nur eine Bildverstärkerkamera nötig (ausschließlich DNA-Markierung). Als Bildverarbeitungsrechner dient zur Zeit dabei ein Pentium-Rechner unter Windows NT. Zusätzlich kommt das von uns entwickelte, spezielle Fluoreszenz-Autofokus-System zum Einsatz. Die Steuerung des Autofokus erfolgt über eine Messwerterfassungskarte (Sorcus, Heidelberg) mit eigener CPU und echtzeitfähigem Multitasking-Betriebssystem (OsX). Die gesamte Steuerung des Mikroskops wird von dieser Einheit übernommen.

Die Kommunikation mit dem Bildverarbeitungsrechner erfolgt über ein *handshake*- Protokoll. Die Suche der zu analysierenden Zellen beginnt mit einem mäanderförmigen „Abfahren“ des Objektträges durch Bewegung der x,y- Schrittmotoren. Befinden sich leuchtende Objekte im Bildfeld der Kamera so wird autofokussiert. Anschließend wird das Kamerabild in einem sogenannten *image-stack*-Speicher abgelegt. Diese Such- & Autofokussiereinheit fährt dann mit dem Absuchen fort. Zeitgleich lädt der Bildverarbeitungsrechner bereits gespeicherte Kamerabilder zur Objekt-Identifizierung und Analyse vom *image-stack*.

2.2 Bildobjekt-Segmentierung

Die Analysesoftware wurde in zwei Bereiche unterteilt. Im ersten Schritt erfolgt eine automatische Zellerkennung bzw. Zellklassifizierung. Im zweiten Schritt werden

dann die klassifizierten Objekte analysiert und entsprechende Parameter berechnet. Durch diesen Parallelbetrieb zwischen der Such- & Autofokussier-Einheit und der Identifikations- & Analyse-Einheit ist eine zeitoptimierte Auswertung gegeben.

Ein wichtiger Bestandteil der Objekt-Identifikation ist zuvor die Bildobjekt-Segmentierung. Dies geschieht mittels eines kombinierten *threshold*-Verfahren, wobei zunächst aus der Anzahl der Rauschpixel im Bildhintergrund des binärisierten Kamerabildes eine Abschätzung bezüglich des Schwellenwertes gemacht wird. Im zweiten Schritt wird durch einen abgewandelten morphologischen Algorithmus (*threshold with reconstruction*) [7] der geeignete Schwellenwert bestimmt. Zuvor wurde jedoch das Kamerabild einer *shading*-Korrektur unterzogen, um räumliche Intensitätsinhomogenitäten, die aufgrund der optischen Abbildung entstanden sind zu kompensieren [8].

2.3 Komet-Klassifizierung

Für verlässliche Resultate sollte sich die automatische Auswertung des DNA-Schadens nur auf intakte Kometenstrukturen beschränken. Alle anderen Objektstrukturen (im nachfolgenden als Artefakte bezeichnet) wie z.B. abnorme Kometen (von apoptotischen Zellen), sich berührende Kometen (Zellcluster), Färbeartefakte (im Gel befindliche Fremdkörper) etc. müssen ausgeschlossen werden. Die Einordnung erfolgt anhand 20 verschiedener Merkmale in zwei Gruppen: a) intakte Kometen b) Artefakte. Die Auswahl dieser Merkmale wurde teilweise empirisch als auch aufgrund von à priori Wissen formuliert (z.B. die richtungsabhängige Ausrichtung der Kometen aufgrund E-Feldes).

Um Rechenzeit zu reduzieren, wird die Klassifizierung 2-stufig in eine Vor- und Hauptklassifizierung aufgeteilt. In der Vorklassifizierung werden objektgrößenabhängige Merkmale [9] der einzelnen Bildobjekte berechnet. Als Merkmale finden in diesem Schritt folgende Objekteigenschaften Verwendung: Fläche, Perimeter, konvexer Perimeter, Momente in vertikaler Richtung (senkrecht zur Kometenhauptachse), Feret's in vertikaler und horizontaler Richtung sowie Intercepts für vier verschiedene Richtungen.

Diese Merkmale bilden einen 10-dim. Merkmalsvektor. Anhand eines vorab erstellten Trainingsatz (gewonnen aus 1000 repräsentativen Kometen) wird festgestellt, ob jede Komponente des Merkmalsvektors sich im zulässigen Bereich des Trainingssatz befindet, andernfalls wird das gerade untersuchte Objekt als Artefakt deklariert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die eigentliche Hauptklassifizierung erfolgt dann an den verbleibenden Bildobjekten durch die Berechnung von 10 zusätzlichen Form- und Grauwert-abhängigen Parametern. Als Merkmale finden hierbei Kompaktheit, Perimeter-Rauhigkeit, Eulerzahl, Orientierung, Feret-Maximumwinkel, Feret-Minimumwinkel, Grauwertminimum, Grauwertmaximum, Grauwertmittelwert, Grauwert-Standardabweichung Verwendung [9]. Die anschließende Hauptklassifizierung wird mittels Berechnung der Mahalanobis-Distanzen in diesem zweiten Merkmalsraum durchgeführt.

2.4 DNA-Schadenparameter-Quantifizierung

Positiv klassifizierte Kometen können anschließend weiter analysiert werden. Als DNA-Schadensparameter werden üblicherweise neben der integralen Fluoreszenzintensitäts-Ratio (Schweif zu Kopf Verhältnis) auch das *Tailmoment* als relevante Kometen-Kenngröße genutzt [10].

3 Ergebnisse

Die typischen Auswertezeiten der hier vorgestellten, automatischen Kometenanalyse liegen bei 30-90 min für 1000 Einzelzellen. Die dabei auftretenden Fehlklassifizierungen betragen 4,3 % Falsch-Positiv-Rate bzw. 7,8 % Falsch-Negativ-Rate. Diese Werte wurden aus Untersuchungen von Objektträgern der Routine-Analyse gewonnen. Dabei wurden die einzelnen Objektträger mittels zwei verschiedenen Bildanalyse-Systemen simultan manuell und automatisch ausgewertet. Die manuelle Auswertung wurde von einem erfahrenen Auswerter (mehrere Jahre Erfahrung mit manueller Comet-Assay Auswertung) durchgeführt. Ebenso zeigen die erhaltenen Messdaten (DNA-Schaden, DNA-Reparatur) eine gute Übereinstimmung mit manuell ausgewerteten Proben [6].

Der Vergleich von Dosis-Wirkungskurven (0-2 Gy, Röntgenstrahlung) von manuell ausgewerteten Präparaten mit automatisch ausgewerteten ergibt innerhalb des 95% Vertrauensbereichs keine signifikanten Unterschiede. Für jeden Dosismesspunkt wurden jeweils Mittelwerte aus 100 Einzelkometen gebildet. Durch die sehr schnelle Auswertezeit (1000 Comets / h) sowie die Möglichkeit der simultanen Messung des DNA-Gehaltes werden auch Zellzyklus-Analysen möglich. Somit kann mit diesem System z.B. zellzyklus-abhängige DNA-Reparatur untersucht werden. Dabei wird für jede Zelle neben dem DNA-Gehalt auch die jeweilige DNA-Reparatur in Form von Dot-Plots (Abb. 1) dargestellt. Dies wurde im ersten Schritt an stimulierten Lymphozyten durchgeführt und für die verschiedenen Zellzyklusphasen (G1, S, G2) zugehörige Dosiswirkungskurven und auch DNA-Reparaturkinetiken ermittelt Abb. 2).

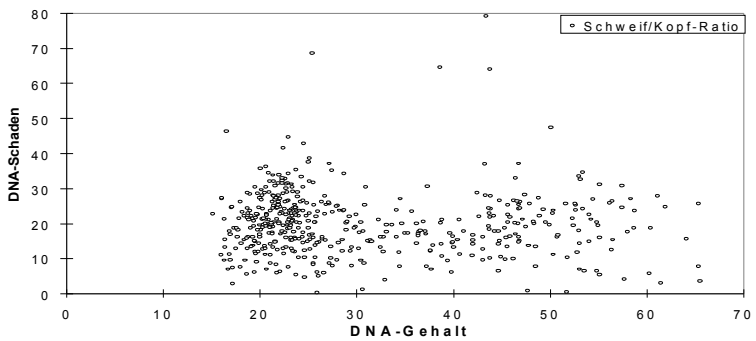

Abb. 1 Dot-Plot Darstellung von DNA-Schaden (gemessen als Schweif/Kopf-Ratio) und DNA-Gehalt von stimulierten Lymphozyten (72h) nach Bestrahlung mit 2 Gy Röntgen.

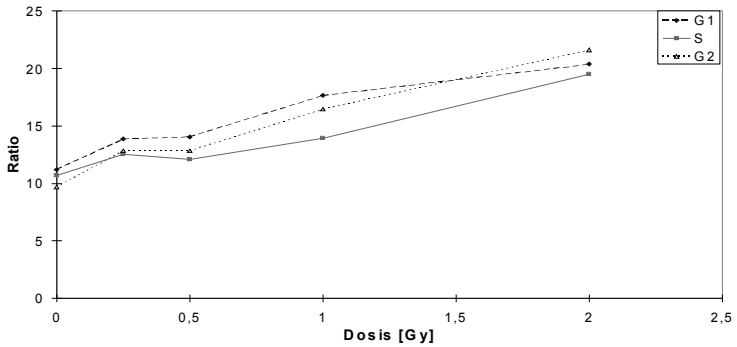

Abb . 2 zellzyklusabhängige Dosiswirkungskurven von stimulierten Lymphozyten (72h). Der DNA-Schaden (Ratio) ist als Mittelwert aus 100 einzelnen Kometen-Ratios dagestellt.

4 Diskussion

Das vollautomatische *image-cytometry*-System erlaubt die automatische Erkennung und Bestimmung von Zellen und wichtigen Zellfaktoren. Als Applikation wurde der vollautomatische *Comet-Assay* implementiert. Neben einer hohen Auswertegeschwindigkeit durch das spezielle Hardwarekonzept ist auch eine reproduzierbare Auswertequalität gewährleistet, die es gegenüber manuellen Systemen hat. Durch einen speziellen Trainings-Algorithmus können die Merkmale verschiedenster Objekte automatisch erlernt werden.

5 Literatur

1. Böcker W.: Automated cell inspection systems for the determination of DNA damage and repair in biological research. 302-313, SPIE 3164: Applications of Digital Image Processing XX, 30.7-1.8 San Diego 1997
2. Böcker W.; Rolf W.; Müller W.-U. and Streffer C.: A fast autofocus unit for fluorescence microscopy, Phys. Med. Biol. 42**,** 1981-1992, 1997.
3. Östling O.; Johanson K.J.: Microelectrophoretic studies of radiation induced DNA-damage in individual mammalian cells. Biochem Biophys. Res. Commun.,123,291-298, 1984.
4. Olive P.L.; Wlodek D.; Banath J.P.: DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. Cancer Res., 51,4671-4676, 1991.
5. McKelvey-Martin VJ.; Green M.H.L.; Schmezer P.; Pool-Zobel B.L.; De Meo M.P.; Collins A.: The single gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. Mutat Res; 288:47-63, 1993.
6. Böcker W.; Rolf W.; Bauch T. Müller W.-U.; Streffer C. „Automated Comet Assay Analysis“, Cytometry, 35,134-144, 1999.
7. Zamperoni P.: Methoden der digitalen Bildverarbeitung. Vieweg Verlag, Braunschweig, 1991.
8. Castleman K.R.: Digital Image Processing, Prentice Hall, New York, 1979.
9. Nadler M. Smith E.P.: Pattern Recognition Engineering. Wiley-Interscience, New York, 1993
10. Böcker W.; Bauch T.; Müller W.-U. and Streffer C.: Image analysis of Comet assay measurements, Int. J. Radiat. Biol, 72**,** No. 4, 449-460, 1997.