

3D Formnormalisierung von Zellkernen mit Hilfe einer elastischen Kugelabbildung

Evgeny Gladilin, Roland Eils und Karl Rohr

Universität Heidelberg, IPMB, und Deutsches Krebsforschungszentrum, TBI,
Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg
Email: e.gladilin@dkfz.de

Zusammenfassung. Die Auswertung zellulärer Mikroskopieaufnahmen ist erheblich erschwert durch eine große Variabilität in der optischen Erscheinung unterschiedlicher Zellen oder in Zeitreihen derselben Zelle. Bedingt durch die kontinuierliches Zellwachstum und Deformationen unter der Einwirkung äußerer Kräfte unterliegen sowohl die Textur als auch die Form zellulärer Strukturen erheblichen Schwankungen. Da es i.a. schwierig ist, eindeutige Strukturkorrespondenzen zwischen zwei unterschiedlichen Zellaufnahmen zu finden, bietet sich eine topologieerhaltende Abbildung der Zellaufnahmen auf eine geeignete Referenzgeometrie zur Formnormalisierung an. In dieser Arbeit präsentieren wir eine neue Methode zur elastischen Kugelabbildung drei-dimensionaler Objekte für die Formnormalisierung von konfokalen Lasermikroskopieaufnahmen humaner Fibroblastzellkerne. Der entwickelte Ansatz ermöglicht die topologische Analyse markierter Genbereiche im Zellkern mittels normalisierter radialer Abstände.

1 Einleitung

Zur quantitativen Analyse der 3D Topologie von Zellkernen ist eine Formnormalisierung erforderlich. Beispielsweise ist die Bewegung von markierten Molekülen in verschiedenen Zellkernen stets überlagert mit unterschiedlichen globalen Bewegungen und Deformationen des gesamten Zellkerns. Zur Bestimmung biologisch relevanter Informationen aus Bilddaten verschiedener Zellen oder Zeitreihen derselben Zelle ist es daher notwendig, die globalen Zelltransformationen aus den beobachteten Bewegungen markierter Strukturen herauszurechnen, d.h. die Bilddaten zu normalisieren. Da Zellkerne in Abwesenheit von äußeren Kräften kugelförmig sind, erscheint die Normalisierung der Zellkerengeometrie mittels einer Kugelabbildung eine natürliche Wahl. In dieser Arbeit präsentieren wir einen physikalisch-basierten Ansatz zur Kugelabbildung der 3D Zellkerengeometrie, der zur topologischen Analyse von konfokalen Lasermikroskopieaufnahmen (engl. CLSM) humaner Fibroblastzellkerne angewendet wurde.

2 Stand der Kunst

Die meisten Arbeiten zur Registrierung von mikroskopischen Zellkernaufnahmen gehen von der Annahme globaler rigider Transformationen (d.h. Translationen

und Rotationen) aus, die mittels Massenzentrum- bzw. Eigenachsenanpassung normalisiert werden, siehe [4,5]. Die Annahme rein rigider Transformationen ist jedoch unrealistisch, da Zellen aus einem gelartigen Weichgewebe bestehen, welches sich unter der Einwirkung äußerer Kräfte kontinuierlich verformt. Folglich sind nicht-rigide (elastische) Transformationen im allgemeinen erforderlich, um eine Normalisierung der Zellkernegeometrie bzgl. beliebiger Deformationen durchzuführen. Im Unterschied zu bekannten Verfahren zur Kugelabbildung, wie z.B. harmonische oder konforme Abbildungen [6], basiert der in dieser Arbeit präsentierte Ansatz auf einem physikalisch-basierten Modell der Weichgewebemechanik. Die Kugelabbildung der 3D Zellkernegeometrie wird durch die Invertierung von Transformationen ermittelt, die bei der Registrierung eines Finite Elemente (FE) Templategitters auf das Zielgebiet im 3D Bild berechnet werden. Infolge der natürlichen Eigenschaften elastischer Medien sind diese Transformationen topologie-erhaltend.

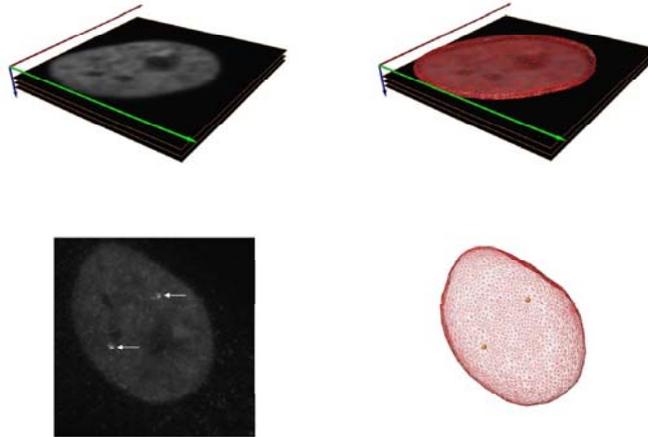
3 Methoden

Die Normalisierung der 3D Zellkernegeometrie bzgl. rigider und nicht-rigider Transformationen (d.h. Translationen, Rotationen und Deformationen) wird durchgeführt mittels einer inversen Kugelabbildung. Die Datenverarbeitungskette beinhaltet folgende Hauptschritte:

- Bildentrauschung.
- Abschätzung eines optimalen Schwellenwertes für Bildbinarisierung.
- Affine Anpassung des sphärischen FE-Templategitters an das Eigenellipsoid des binarisierten Bildes.
- Elastische Abbildung des ellipsoidalen Templates auf den Zellkernrand.
- Abbildung des gesamten 3D Zellkernbereichs auf eine Kugel durch Invertierung der für das FE-Template berechneten Transformationen.

Für die Bildentrauschung wurde ein anisotropes Diffusionsfilter benutzt, welches die Unterdrückung hochfrequenter Rauschanteile bei gleichzeitiger Kantenhaltung ermöglicht [7]. Zur automatischen Bildbinarisierung wurde ein Verfahren verwendet, das einen optimalen Schwellenwert auf der Basis von Extrema des Bildhistogramms berechnet. Binarisierung der Zellkernbilder ist eine notwendige Maßnahme zur vorläufigen Abschätzung der Zellkernform, da die optische Erscheinung der Zellkerne in den CLSM-Aufnahmen infolge einer inhomogenen Chromatinfärbung kerninnerer Bereiche i.a. sehr variabel ist. Im nächsten Schritt wird das sphärische Finite Elemente (FE) Templategitter mit Hilfe affiner Transformationen (Translationen, Rotationen, Skalierung) an das Eigenellipsoid des binarisierten Bildes angepasst. Da Zellkerne bereits eine natürliche ellipsoidale Form besitzen, liefert die affine Transformation eine gute erste Näherung für die gesamte Zellkernegeometrie. Eine präzisere Approximation setzt eine weitere nicht-rigide (elastische) Abbildung des FE-Templates auf die Randoberfläche des Zellkerns voraus. Für diesen Zweck hat sich ein einfaches 'propagation-by-normals' Ansatz als ausreichend erwiesen. Die Verschiebungen der Knotenpunkte des FE-Templategitters bei der affinen und nicht-rigiden Abbildung auf die

Abb. 1. Links: 3D konfokale Lasermikroskopieaufnahme eines menschlichen Fibroblastzellkerns (512x512x60), einzelne Schicht des 3D Datensatzes mit zwei Genbereichen (gekennzeichnet mit Pfeilen). Rechts: 3D bzw. 2D Ansicht des auf den Zellkernbereich registrierten FE-Templategitters.

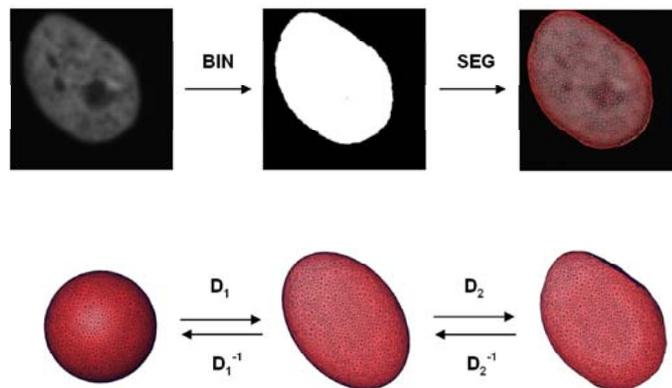


Zellkerngeometrie werden als Randbedingungen für die Berechnung volumetrischer Deformationen des gesamten Zellkernbereichs mit Hilfe der Finite Elemente Methode verwendet. In einer Reihe von früheren Publikationen wurden die mechanischen Eigenschaften von Zellen und insbesondere Zellkerne untersucht [1,2]. Ausgehend von diesen Studien können Zellkerne in erster Näherung als linear-elastische Körper mit Hilfe von Partiellen Differentialgleichungen (PDG) der Elastizitätstheorie beschrieben werden [3]. Das Randwertproblem (RWP) zur Berechnung volumetrischer Deformationen besteht in der Bestimmung der Verformung eines linear-elastischen Körpers für die gegebenen Randverschiebungen. Für die numerische Berechnung volumetrischer Deformationen des Templategitters wurde die Finite Elemente Methode (FEM) angewendet [8].

4 Experimentelle Ergebnisse

Das oben beschriebene Verfahren wurde zur automatischen Anpassung des sphärischen FE-Templategitters an 3D CLSM Bilder humaner Fibroblastzellkerne angewendet. Die darauf basierte Formnormalisierung der Zellkerne ermöglichte die anschließende topologische Analyse fluoreszent-markierter Chromosombereiche im Kerninneren (siehe Abb. 1). Nach anisotroper Bildglättung und anschließender Bildbinarisierung wurde das Eigenellipsoid für den Zellkernbereich ermittelt. Im nächsten Schritt wurde das sphärische Oberflächengitter des FE-Templates mittels Massenzentrumstranslation und Hauptachsenskalierung an das Eigenellipsoid des binarisierten Bildes angepasst (siehe Abb. 2). Anschließend wurden die Knotenpunkte des FE-Gitters iterativ entlang der inneren Normalen bis auf den Rand des Zellkerns verschoben. Die Verschie-

Abb. 2. Übersichtschema der elastischen Kugelabbildung. Oben: Ausgangsbild des Zellkerns, binarisiertes Bild und Ergebnis der Segmentierung des Zellkernrandes mit Hilfe des FE-Oberflächengitters. Unten: ursprüngliches sphärisches FE-Templategitter, ellipsoidales FE-Template entsprechend dem Eigenellipsoid des binarisierten Bildes (oben, Mitte) und das auf den Zellkernbereich registrierte FE-Templategitter. Die Verschiebungen der Knotenpunkte des Oberflächengitters bei der Anpassung des FE-Templates an den Zellkern liefern die Randbedingungen zur Berechnung volumetrischer Deformationen (D_1 , D_2) für das gesamte Tetraedergitter des FE-Templates mit Hilfe der FEM. Mit den inversen Transformationen (D_1^{-1} , D_2^{-1}) ist eine inverse Abbildung des gesamten Zellkernbereichs auf eine Kugel gegeben.

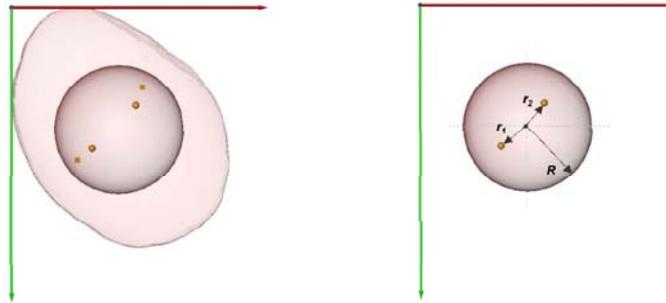


lungen der Knotenpunkte des Oberflächengitters wurden als Randbedingungen für die Berechnung entsprechender volumetrischer Deformationen des FE-Templategitters verwendet. Nach Invertierung volumetrischer Verschiebungsfelder, die das sphärische Template auf den Zellkernbereich abbilden, erhält man eine inverse Abbildung des gesamten Zellkernbereichs auf eine Kugel (siehe Abb. 2). Um die Positionen markierter Genbereiche nach der Kugelabbildung zu bestimmen, wurde eine lineare Finite Elemente Interpolation auf den Tetraederelementen angewendet. Als charakteristische Größe zur Beschreibung der Position in sphärischen Koordinaten bietet sich der normierte radiale Abstand an, welcher als Verhältnis von absoluten radialen Abständen markierter Bereiche zum Radius der Templatekugel berechnet wird (siehe Abb. 3).

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit haben wir einen neuartigen Ansatz zur Normalisierung von 3D Bildaufnahmen von Zellkernen mittels einer inversen elastischen Kugelabbildung präsentiert. Ein Finite Elemente Templategitter wurde verwendet, um affine und nicht-rigide Transformationen bei der Abbildung einer Kugel auf die Zellkernbereiche zu bestimmen. Mit den inversen Transformationen ist eine inverse Abbildung für jeden Punkt des gesamten Zellkernbereichs auf eine Kugel gegeben. Zur topologischen Analyse einzelner Genbereiche wurde der normierte dimensi-

Abb. 3. Ergebnis der Kugelabbildung des Zellkerns samt zweier Genbereiche. Links: die rechteckige Punktmarkierungen zeigen die Positionen zweier Genbereiche im Originalbild, die runden Punktmarkierungen zeigen die Positionen dieser Genbereiche nach der Kugelabbildung. Rechts: zur invarianten Beschreibung der Positionen der Zielbereiche in sphärischen Koordinaten bietet sich der normierte radiale Abstand an, welcher als Verhältnis der absoluten radialen Abstände von markierten Bereichen zum Radius der Templatekugel berechnet wird.



onslose Radialabstand eingeführt. Das entwickelte Registrierungsschema eignet sich darüber hinaus für die Formnormalisierung anderer Objekte, die physikalisch sinnvoll auf eine Kugel oder ein anderes geometrisches Template verformt werden können.

Danksagung. Diese Arbeit wurde gefördert im EU Projekt 3DGENOME.

Literaturverzeichnis

1. Thoumine O, Ott A. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *Cell Science* 1997;110:2109–2116.
2. Guilak F, Tedrow JR, Burgkart R. Viscoelastic properties of the cell nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:781–786.
3. Ciarlet PG. *Mathematical Elasticity. Volume I: Three-Dimensional Elasticity*, vol. 20 of *Studies in Mathematics and its Applications*. North-Holland, Amsterdam; 1988.
4. Rieger B, Molenaar C, Dirks RW, Vliet LJVan. Alignment of the Cell Nucleus From Labeled Proteins Only for 4D In Vivo Imaging. *Microscopy Research And Technique* 2004;64:142–150.
5. CPBacher, Reichenzeller M, Athale C, Herrmann H, REils. 4-D single particle tracking of synthetic and proteinaceous microspheres reveals preferential movement of nuclear particles along chromatin-poor tracks. *BMC Cell Biology* 2004;5(45):1471–2121.
6. A shape adapted motion model for non-rigid registration. vol. 4684. *SPIE Meidcal Imaging*; 2002.
7. Perona P, Malik J. Scale space and edge detection using anisotropic diffusion. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 1990;12:629–639.
8. 3D finite element analysis of uniaxial cell stretching. vol. 12. *ICBME/IFBME*, Singapore; 2005.