

Stereoskopische Visualisierung einer Infektion mammalischer Zellen durch pathogene Bakterien

Michael Granseier^{1,2}, Heike Grassmé¹, Erich Gulbins¹, Hans-Gerd Lipinski²

¹Institut für Molekularbiologie, Universität Duisburg/Essen

²Fachbereich Informatik, Fachhochschule Dortmund

michael.granseier@arcor.de

Kurzfassung. Die Infektion mammalischer Zellen durch pathogene Bakterien ist biologisch immer noch nicht sicher geklärt. Mit Hilfe der Laserscanmikroskopie ist es mittlerweile aber möglich, räumliche Bilddaten von Zellproben zu erstellen, auf denen der Eindringvorgang der Bakterien in das Zellinnere durch verschieden leuchtende Fluoreszenzfarbstoffe visualisiert werden kann. Unter Verwendung bekannter und adaptierter 3D-Rekonstruktionsalgorithmen werden dreidimensionale Visualisierungen von Mikroskopiebildern vorgestellt, mit deren Hilfe die Analyse des Infektionsprozesses erleichtert wird. Dabei hat sich gezeigt, dass mit Oberflächenrekonstruktionsverfahren die Topografie der Zelloberfläche korrekt dargestellt werden kann, während die Darstellung der Farbstoffverteilungen besser durch ein Texture-Mapping-Verfahren gelingt. Die Rekonstruktionen konnten insbesondere durch den Einsatz von stereoskopischen Visualisierungstechniken detailgenau analysiert werden.

1 Einleitung

Infektionen gesunder mammalischer Zellen durch pathogene Bakterien werden derzeit auch mit molekularbiologischen Methoden untersucht. Im Verlauf einer solchen Infektion gelingt es den Bakterien, die Zellmembran zu durchdringen und somit die Zelle von innen zu schädigen. Das Verstehen der exakten Wechselwirkungen zwischen der Zellmembran und den Bakterien während des Eintritts des Bakteriums in das Zellinnere ist dabei für das Verständnis des Krankheitsprozesses von großem Interesse [1, 2]. Erst wenn die molekularbiologische Ursache geklärt ist, die es einem Bakterium ermöglicht, die Zellmembran zu durchdringen, kann ein effektives Medikament entwickelt werden, um die Infektion humaner Zellen mit pathogenen Bakterien zu hemmen.

Durch den Einsatz von modernen 3D-Laserscanmikroskopen lassen sich mittlerweile digitale Bilddaten von infizierten Zellproben erstellen, welche zuvor mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen optisch angeregt werden. Primär sind die erzeugten Bilddaten zweidimensional. Da jedoch ein Bilddatenstapel generiert wird, können die Bilddaten zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt werden. Ziel dieses Artikels ist es, aus den akquirierten Mikroskopbildern unter Verwendung bekannter und modifizierter Volume-Rendering-Verfahren dreidimensionale Ansichten zu generieren, auf denen der Eintritt der Bakterien in

das Zellinnere räumlich interaktiv betrachtet werden kann. Dabei ist neben der korrekten Wiedergabe der zeitlich-räumlichen Veränderungen der Membran- und Bakterienstrukturen auch auf die korrekte Wiedergabe der Intensitätsverteilung der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe sowie deren Kolo-kalisation zu achten. Zur genaueren Analyse erscheint in diesem Zusammenhang eine stereoskopische Visualisierung sinnvoll.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Zellbilder

Für die Generierung der dreidimensionalen Visualisierungen standen mikroskopische Schnittbildfolgen mammalischer Zellproben (Makrophagen) zur Verfügung, die mit einem grün fluoreszierenden Mycobakterium infiziert wurden. Unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wurden die Makrophagen so präpariert, dass in den späteren Mikroskopbildern sowohl das in der Zelle produzierte Lipid Ceramid als auch die als Signalgeber fungierenden Rab5-Proteine sichtbar gemacht werden konnten [1, 2]. Zur Unterscheidung der beiden Zellbestandteile wurde für das Ceramid ein roter und für das Rab5 ein blauer Farbstoff verwendet. Diese präparierten Makrophagen wurden dann mit einem Laserscanmikroskop der Marke Leica DMIRE 2, ausgestattet mit einem durch Öl benetzten Objektiv mit 100-facher Vergrößerung, mikroskopiert. Alle vier Proben hatten eine Größe von $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ in der Ebene. Die Probendicke lag zwischen $4,094 \mu\text{m}$ und $9,538 \mu\text{m}$.

Im Laufe der Bildakquisition wurde jede Zellprobe in sechs Schichten von oben nach unten registriert, wobei durch die Laserbestrahlung die Fluoreszenzstoffe optisch angeregt wurden, so dass die oben genannten Probenbestandteile sichtbar wurden (Bakterien = grün, Ceramid = rot, Rab5 = blau). Von jeder Schicht wurde die zugehörige Bildmatrix für die drei Farbkanäle Rot, Grün und Blau gespeichert. Somit standen für die 3D-Rekonstruktion jeweils drei einzelne Bildfolgen der fluoreszierenden Bestandteile einer jeden Makrophage zur Verfügung. Die Bilder hatten eine Größe von 512×512 Bildpunkten, was einer Pixelgröße von $0,293 \times 0,293 \mu\text{m}^2$ entspricht.

2.2 Bildvorverarbeitung und -visualisierung

Störende und nicht-relevante Bildpunkte wurden mit Hilfe eines Schwellwert-Filters entfernt. Ein solcher Filter entfernt alle Bildpunkte, die unterhalb eines manuell festgelegten Pixelwertes liegen und lässt dabei die übrigen Bildpunkte unverändert. Meist als dunkle Bildpunkte auftretendes Hintergrundrauschen konnte somit fast vollständig entfernt werden. Für die 3D-Rekonstruktion mit Hilfe des Marching-Cube-Verfahrens wurden die Zellbilder zunächst durch einen Bildkanten erhaltenden Diffusionsfilter geglättet, damit die Topografie der Zelloberfläche im Verlauf der Infektion verdeutlicht wird. Weiterhin wurden die ursprünglich sechs Schnittbilder einer jeden Probe durch lineare Interpolation

von Zwischenbildern auf 21 Bilder erweitert. Erst dadurch war die Generierung brauchbarer 3D Ansichten möglich. Zur besseren räumlichen Orientierung bei der Betrachtung der dreidimensionalen Zellen wurde jeder Zelle interaktiv eine Membrankontur hinzugefügt, welche unter Verwendung einer Catmull-Rom Spline-Interpolation aus manuell festgelegten Stützstellen berechnet wurde. Die endgültigen dreidimensionalen Zellbilder wurden mit Hilfe der zwei bekannten räumlichen Rekonstruktionsverfahren „Marching-Cube“ und „Texture-Mapping“ generiert. Mit Ausnahme der Membraninterpolation wurden für die übrigen Bearbeitungsschritte Algorithmen und Methoden des Insight Toolkit (ITK) und des Visualization Toolkit (VTK) verwendet [3]. Als Entwicklungsumgebungen dienten der Borland C++ Builder 5 sowie das Microsoft Visual Studio .NET 2003.

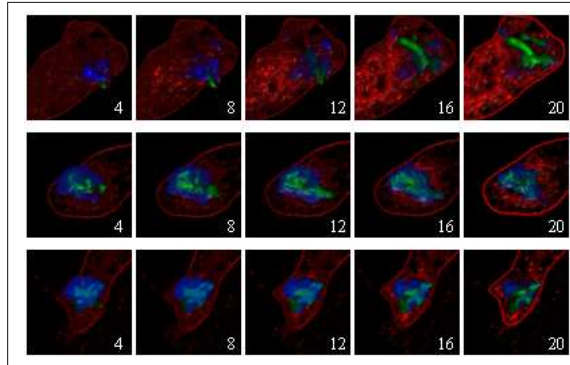
2.3 Stereoskopische Darstellung

Die Möglichkeit des stereoskopischen Sehens basiert auf den etwas unterschiedlichen Perspektiven, mit denen die Augen ein Objekt erkennen. Linkes und rechtes Auge nehmen dabei leicht voneinander abweichende Bilder wahr, aus denen das Gehirn die räumliche Ansicht bildet. Dieses Prinzip kann mit Hilfe spezieller Stereoskopie-Monitore künstlich umgesetzt werden, wobei auf dem Display ein verschachteltes Gesamtbild mit jeweils verschiedenen Informationen für beide Augen dargestellt wird. Es existieren eine Reihe von Darstellungsverfahren, für die u.U. auch eine spezielle Sehhilfe benötigt wird, um jedem Auge das ihm zugeordnete Bild sichtbar zu machen. Es kamen die bekannten Stereoskopieverfahren „Dresden“ und „Crystal-Eyes“ zum Einsatz. Die verwendete Hardware bestand aus einem 20 Zoll SeeReal Cn 3D Display und einem 20 Zoll Planar SD2020 Display.

3 Ergebnisse

Die Abbildung 1 auf Seite 369 zeigt die dreidimensionalen Visualisierungen der unterschiedlichen Makrophagen unter Verwendung des Texture-Mapping Verfahrens. Dargestellt ist jeweils der relevante Ausschnitt der Zelle, innerhalb dessen die Bakterien in das Zellinnere eindringen. Jede Bildserie beinhaltet im Original 20 3D-Schnittbilder, die ein Eindringen von oben nach unten in die Zelle zeigen. Von jeder Zellprobe wurden beispielhaft fünf Abbildungen ausgewählt. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zeigen die Verteilung des Ceramid, des Rab5 sowie der Bakterien während des Infektionsvorgangs. Gut erkennbar sind in allen Abbildungen auch die Intensitätsunterschiede der einzelnen Farbstoffe, bedingt durch unterschiedlich starke Ansammlungen der an die Farben gekoppelten Zellprobenbestandteile. Die Kollokalisierungen zwischen Bakterien und Rab5 sowie zwischen Rab5 und Ceramid werden durch die additive Überlagerung der entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffe als cyan- bzw. violettfarbene Bereiche wiedergegeben. In der Abbildung 2 auf Seite 370 sind die gleichen Schnittbilder unter Verwendung des Marching-Cube-Verfahrens dargestellt. Die Topografie der Zelloberfläche ist hier deutlich erkennbar. Zur besseren Visualisierung der zeitlichen

Abb. 1. Dreidimensionale Texture-Mapping-Rekonstruktion der Makrophagen. Ceramid ist rot eingefärbt, Rab5-Proteine blau und pathogene Bakterien grün. Von links nach rechts sieht man jeweils den zeitlichen Verlauf des Infektionsprozesses durch Abtragung der jeweils obersten Schnittebene. Die Nummerierung steht für die Position des Bildes in der vollständigen 3D-Schnittbildfolge.



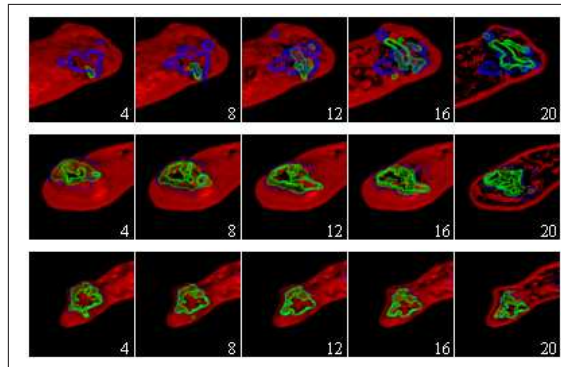
Veränderungen der Bakterien- und Rab5-Strukturen wurden diese durch zweidimensionale Isolierungen dargestellt. Die nachträglich hinzugefügte Zellmembran ist in den Bildern ebenfalls rot dargestellt. Sie dient allerdings nur der besseren Abgrenzung der Zelle gegenüber dem Hintergrund und ist nicht als Ceramid-Aggregation zu betrachten. Bei allen Abbildungen handelt es sich aus drucktechnischen Gründen nicht um stereoskopische Darstellungen, da dieser Effekt nur mit entsprechenden Hilfsmitteln (Monitor, Brille etc.) erzielt werden kann.

4 Diskussion

Mit Hilfe des räumlichen Rekonstruktionsverfahrens „Marching-Cube“ konnte die Topografie der Zelloberfläche im Verlauf der Bakterieninfektion deutlich dargestellt werden. Da es sich hierbei um ein Oberflächen-Rendering-Verfahren handelt, lassen sich durch die Bakterienaktivität bedingte Deformationen der Zellmembran besonders gut räumlich visualisieren, wobei vor allem Einbuchtungen, die das Eindringen der Bakterien ermöglichen, von besonderem Interesse sind. Um die Oberflächentopografie eindeutig analysieren zu können, mußten die Zellbilder zunächst mit einem Diffusionsfilter geglättet werden. Diese Glättung führt jedoch zu dem Problem, dass die biologisch wichtige Granularität der Ceramid-Aggregationen verloren geht. Des Weiteren können die unterschiedlichen Farbtintensitäten der Fluoreszenzstoffe über das Marching-Cube-Verfahren nicht wiedergegeben werden. Somit stellen die 3D-Rekonstruktionen des Marching-Cube keine biologisch korrekten Abbildungen dar.

Durch den Einsatz des Texture-Mapping-Verfahrens lassen sich solche Defizite beheben. Diese Visualisierungstechnik bildet die Konzentrationsunterschiede des Ceramid und des Rab5 in den einzelnen Zellebenen korrekt ab, wodurch z.B. Rückschlüsse auf Aktivitätsschwerpunkte innerhalb der Bakterienansammlung

Abb. 2. Dreidimensionale Marching-Cube-Rekonstruktion der geglätteten Makrophagenbilder. Ceramid ist rot eingefärbt, Rab5-Proteine blau und pathogene Bakterien grün. Von links nach rechts sieht man jeweils den zeitlichen Verlauf des Infektionsprozesses durch Abtragung der jeweils obersten Schnittebene. Die Nummerierung steht für die Position des Bildes in der vollständigen 3D-Schnittbildfolge.



gezogen werden können. In den Bildern 8 bis 16 der Abbildungen 1 und 2 zeigen sich in allen drei Proben schlauchartige Ausformungen der grünen Bakterienansammlungen. Diese Ausformungen deuten darauf hin, dass in diesem Moment das tatsächliche Eindringen der Bakterien in das Zellinnere stattfindet. Im Bereich dieser Aktivität werden signalgebende Rab5-Proteine in den Zellen aktiviert, die sich deutlich durch den blauen Fluoreszenzfarbstoff von den restlichen Bestandteilen der Zellprobe abheben.

Insgesamt können mit beiden räumlichen Rekonstruktionen die genauen Wechselwirkungen zwischen der Zellmembran und den Bakterien untersucht werden. Insbesondere durch die Möglichkeit der stereoskopischen Visualisierung lassen sich die genannten Details des Infektionsvorgangs in fast greifbarer räumlicher Virtualität noch exakter analysieren. Hierbei steht auch die Rolle des Ceramid im Vordergrund [4, 5]. Es eröffnet sich somit ein neuer Ansatz zur adäquaten Analyse von Infektionsvorgängen mammalischer Zellen.

Literaturverzeichnis

1. Grassmé H, Jendrossek V, Riehle A, et al. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramid-rich membrane rafts. *Nat Med.* 2003;9(3):322–330.
2. Grassmé H, Riethmüller J, Gulbins E. Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. *Prog Lipid Res.* 2007;46:161–170.
3. Schroeder W, Martin K, Lorenzen B. *The Visualization Toolkit (3rd Edition)*. United States of America: Kitware Inc.; 2004.
4. Cremesti A, François P, Grassmé H, et al. Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem.* 2001;267(26):23954–23961.
5. Gulbins E, Kolesnick R. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene.* 2003;22:7070–7077.