

3D-Visualisierung und Kolokalisation von Proteinen und ceramidreichen Domänen

Christian Imhäuser^{1,2}, Heike Gulbins (Grassmé)², Erich Gulbins²,
Hans-Gerd Lipinski¹

¹Fachbereich Medizinische Informatik, Fachhochschule Dortmund

²Institut für Molekularbiologie, Universität Duisburg/Essen

ci@cne.de

Kurzfassung. Die Topologie von Proteinen innerhalb ceramidreicher Membranbereiche stimulierter T-Lymphozyten ist für die Molekularbiologie von großem Interesse, weil experimentell ein Zusammenhang zwischen der Clusterbildung von Rezeptorproteinen und der Membranaufteilung in ceramidreiche Mikrodomänen für den transmembranen Signalaustausch nachgewiesen werden konnte. Die Mechanismen der Clusterbildung und die räumliche Verteilung der Proteine sind bis heute nahezu unbekannt. Mit der modernen Laserscanmikroskopie lassen sich jedoch räumliche Bilddaten von Zellproben gewinnen, deren Bestandteile durch verschieden fluoreszierende Farbstoffe visualisiert werden. Mit Hilfe von adaptierten 3D-Visualisierungsmethoden konnten Volumerending- und Oberflächenmodelle erzeugt werden, anhand derer die räumliche Verteilung der Proteine und der ceramidreichen Bereiche sowie die Kolokalisation beider Moleküle dargestellt werden konnten.

1 Einleitung

Die Funktionen von Proteinen in lebenden Zellen werden unter Anderem durch ihre räumliche Verteilung festgelegt. Die räumliche Anordnung wird wiederum durch die Aufteilung in Membrandomänen beeinflusst. Bislang konnte gezeigt werden, dass durch die Aktivierung der sauren Sphingomyelinase es zu einer Formation ceramidreicher Membranbereiche kommt, die zu einer Clusterbildung aktivierter Rezeptormolekülen wie CD95 oder CD40 führt [1]. Funktioniert diese Clusterbildung aus verschiedenen Gründen nicht mehr, kann die Zelle weder zur Apoptose veranlasst, noch durch ein pathogenes Bakterium infiziert werden [2, 3]. Die entartete Zelle würde im ersten Fall ungehemmt wachsen und könnte im Gesamtorganismus zu einer krebsartigen Erkrankung führen.

Bis heute sind die exakten Mechanismen der Clusterbildung und die räumliche Verteilung der Proteine innerhalb der ceramidreichen Domänen nahezu unbekannt. Es werden daher geeignete 3D-Visualisierungsmethoden vorgestellt, die helfen, den exakten Prozess der Clusterbildung von Rezeptormolekülen sowie die räumliche Assoziation (Kolokalisation) mit den ceramidreichen Bereichen besser zu verstehen und interaktiv zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Bildakquise

Das verwendete Bildmaterial stammte aus einer schichtweisen Digitalisierung mehrerer Jurkat-Cluster (Zelllinien aus einer T-Lymphozyten Leukämie), welche mit substanzspezifischen Antikörpern präpariert wurden. Für das zellgebundene Ceramid wurde ein roter und für das CD95-Protein ein grüner Farbstoff verwendet. Die in den Antikörpern enthaltenden fluoreszierenden Farbstoffe wurden durch die Laserbestrahlung eines Konfokallasermikroskops optisch angeregt und ihre Intensität von einem Sensor erfasst. Die gewonnenen Bildinformationen wurden in Abhängigkeit von der roten bzw. grünen Farbe der Fluoreszenzstoffe in zwei separate Kanäle gespeichert.

Für die mikroskopischen Aufnahmen kam ein Laserscanmikroskop der Firma Leica DMIRE 2 (Öl benetztes Objektiv mit 100-facher Vergrößerung) zum Einsatz. Jede Zellprobe wurde mit einem Abstand zwischen $0,66$ und $0,91 \mu\text{m}$ abgetastet und wies durchschnittlich eine Größe von ungefähr $40 \times 40 \times 4 \mu\text{m}^3$ auf. Die akquirierten Bilder hatten eine Auflösung 512×512 Bildpunkten mit einer Pixelgröße von ca. $0,08 \mu\text{m}$.

2.2 Bildvorverarbeitung

Die einzelnen Bilder wiesen neben dem aufnahmebedingten typischen Rauschen Kontrastarmut und unausgewogene Helligkeitsverteilungen auf. Die geringe Tonwerttraumausnutzung im Original wurde zur Kontrastanhebung durch ein RescaleIntensityFilter korrigiert. Durch die Anzahl der Anhaftungen fluoreszierender Antikörper wurde die Intensität bei der Bildakquisition bestimmt. Ferner

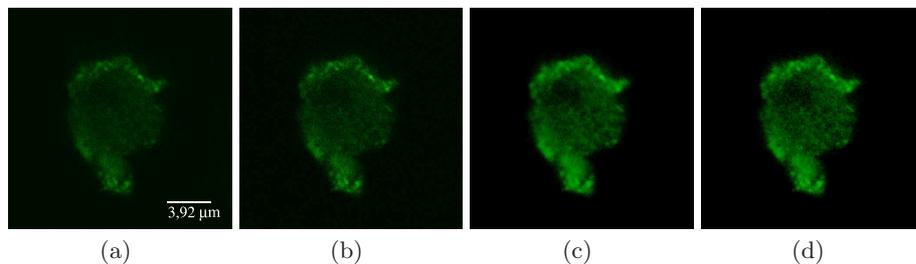


Abb. 1. Bildvorverarbeitung. (a) Exemplarisch gewähltes Schnittbild aus dem Jurkat-Cluster „CerCD952min1“. Ungefiltertes Einzelkanalbild mit verschiedenen Intensitäten von CD95 (grün). (b) Nach der Kontrastverbesserung. (c) Nach logarithmischer Skalierung und bilateraler Filterung (Bereich-Sigma = 30, Weite-Sigma = 40). Gute Rauschunterdrückung bei hervorragender Kanten-/Strukturerhaltung. (d) Nach logarithmischer Skalierung und Anwendung des Diffusionsfilters (Zeitschritt = 0.125, Leitwert = 6, Wiederholungen = 2). Gute Rauschunterdrückung bei hervorragender Kantenerhaltung. Innere Strukturen werden leicht geglättet.

ergab sich das Problem, dass sich Antikörper mit bereits angedockten verbinden konnten, d.h. je höher die Zahl der Anhaftungen, desto größer war auch die Wahrscheinlichkeit dieser vermeintlichen Intensitätsvergrößerungen. Daraus ließ sich kein linearer Zusammenhang zwischen akquirierter und realer Intensität mehr ableiten. Diskutiert wurde ein exponentieller Zusammenhang. Daher wurden die gewonnenen Bildinformationen logarithmisch skaliert, so dass der vermutete exponentielle Tonwertverlauf aufgehoben/umgekehrt wurde. Zusätzlich wurden Kontrast und Helligkeit unter Verwendung eines eigens entwickelten Filters erneut so angepasst, dass Werte außerhalb des definierten Tonwertraumes auf das jeweils Minimum/Maximum abgebildet wurden.

Um das Hintergrundrauschen weitgehend zu beseitigen, kam sowohl ein BilateralFilter als auch CurvatureAnisotropicDiffusionFilter zum Einsatz. Beiden Filtern ist es gemein, dass sie schwache Gradienten (wie Rauschen etc.) gut unterdrücken, aber große Steigungen der Intensitäten, welche oft an Kanten von Objekten innerhalb des Bildes vorzufinden sind, fast nicht beeinflussen.

2.3 Visualisierung

Die 3D-Visualisierungen der einzelnen Zellproben wurden mit Hilfe des Volumerenderings (RayCasting und TextureMapping) und der Oberflächenrekonstruktion nach dem MarchingCube-Verfahren erzeugt. Durch manuelle maßstabsgetreue Korrektur des Schnittbildabstandes wurden weitere Schnittbilder zwischen den gegebenen linear interpoliert. Farbtransfer- und Opazitätsfunktionen wurden so gewählt, dass die Intensitätsunterschiede mit denen im Bildmaterial übereinstimmten.

2.4 Kolokalisation

Für den visuellen Nachweis der Kolokalisationen von CD95 und Ceramid wurden mehrere verschiedene Methoden entwickelt oder angepasst. Die 3D-Daten wurden hierfür als gerastert in 3D-Zellen angesehen. Innerhalb dieser Zellen wurden alle Intensitätswerte oberhalb eines festgelegten Schwellwertes gezählt. Die minimalen und maximalen Z-Positionen wurden separat gespeichert. Bei der Produktintensität wurde die 3D-Zelle mit der Intensität aus dem normalisierten Produkt beider Summen vollständig, aber höchstens zwischen den vorher ermittelten Z-Positionen, gefüllt. Die Methode Binärisierung hingegen setzte die 3D-Zelle erst mit der maximalen Intensität, wenn beide Summen separat festgelegte Schwellwerte in relativem Maß überstiegen. Zudem wurde eine Kreuzkorrelationsfunktion (KKF) zur Quantifizierung des Kolokalisationsgrades von CD95 und Ceramid bestimmt. Da Korrelationen in Richtung der Z-Achse nicht von Interesse waren, wurde die zweidimensionale KKF schichtweise über den gesamten Bildstapel berechnet und als 3D-Objekt mit identischem Schnittbildabstand in die 3D-Szene eingebettet. Zusätzlich wurden die Werte der KKF mit Hilfe des RescaleIntensityFilters normalisiert.

Bis auf die eigens entwickelten Kolokalisationsroutinen wurden Algorithmen und Methoden des Insight Toolkits (ITK)[4] und Visualization Toolkits (VTK)[5]

unter der Entwicklungsumgebung Microsoft Visual Studio 2008 Express Edition verwendet.

3 Ergebnisse

Die verwendeten Schnittbildfolgen konnten im Hinblick auf Kontrastverbesserung, korrigierter logarithmischer Skalierung und Rauschunterdrückung für eine optimale 3D-Visualisierung aufbereitet werden. Die Abb. 1 zeigt die visuellen Ergebnisse nach der schrittweisen Filteranwendung auf ein exemplarisch gewähltes Schnittbild. Die räumliche Verteilung von CD95-Proteinen und Ceramid konnte unter Verwendung drei verschiedener Visualisierungstechniken zum ersten Mal gezeigt werden. Die Abb. 2(a-c) gibt neben der Oberflächenrekonstruktion auch die Visualisierungen mit Hilfe der beiden Volumerending-Verfahren wieder, anhand derer wir die verschiedenen Intensitätsverteilungen der Zellbestandteile

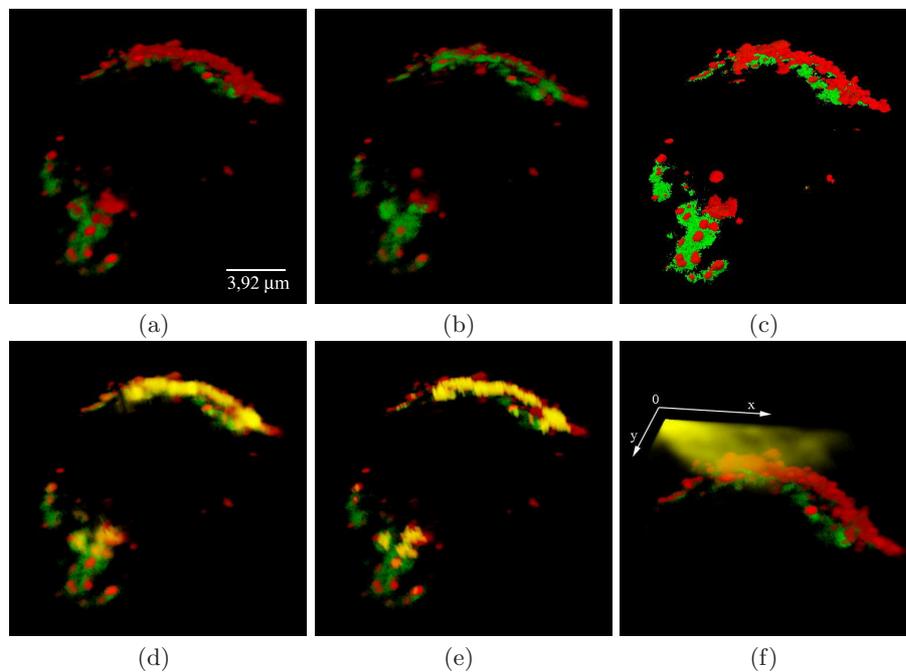


Abb. 2. 3D-Visualisierungen des Jurkat-Clusters „CerCD952min1“ als Overlay (CD95 = grün, Ceramid = rot, Kolokalisation = gelb). Räumliche Intensitätsverteilung mit Hilfe des (a) RayCasting- und (b) TextureMapping3D-Verfahrens (Schwellwerte für CD95/Ceramid = 128/103), und (c) Oberflächenrekonstruktion (Schwellwerte für CD95/Ceramid = 147/157). 3D-Darstellung der Kolokalisationen im Volumerending-Modell aus (a) unter Verwendung der Produktintensität (d) und Binärisierung (e). Dreidimensionale Kreuzkorrelationsfunktion beider Kanäle als eine Art „Ähnlichkeitswolke“ (f) angewandt auf den oberen Ausschnitt des Modells.

interpretieren konnten. Darüber hinaus wurden für den Nachweis der Kolokalisation die Verfahren Produktintensität und Binärisierung entwickelt und an acht Zellprobendaten getestet. Die Abb. 2(d-f) zeigt die visuellen Resultate der einzelnen Methoden, angewandt auf eine exemplarisch gewählte Zellprobe.

4 Diskussion

Die Bildanalyse ergab, dass mit den ausgewählten Filtern das Bildmaterial zugunsten einer optimalen 3D-Visualisierung aufbereitet werden konnte. Hierfür steuerte der `RescaleIntensityFilter` zu einer erheblichen Kontrastverbesserung bei. Kaum wahrzunehmende Intensitäten wurden sichtbar gemacht und vorhandene Konzentrationen hervorgehoben. Leider wurde auch das aufnahmebedingte Rauschen verstärkt, welches mit der nachfolgenden logarithmischen Skalierung noch unterstützt wurde. Trotzdem konnte der `BilateralFilter` diese Störungen gut beseitigen, und erhielt dabei hervorragend Kanten und innere Strukturen. Im Vergleich dazu glättete die optimierte Variante des Diffusionsfilters bei guter Rauschunterdrückung leicht die inneren Zellstrukturen und beeinflusste damit die granularitäre und wichtige Verteilung des Ceramids. Die Kanten wurden nahezu vollständig erhalten.

Im Hinblick auf die räumliche Verteilung von CD95 und Ceramid stellte sich das `RayCasting` als die beste Visualisierungstechnik heraus, da sich mit ihr die räumliche Intensitätsverteilung sehr präzise darstellen ließ. Die Oberflächenrekonstruktion bot hingegen die performantere Interaktionsmöglichkeit bei Verlust der Intensitätsdarstellung.

Es wurden erfolgreich Bildanalysemethoden entwickelt, mit denen der räumliche Nachweis der Kolokalisation gelang. Durch die Einführung der Produktintensität konnte der Grad der Kolokalisation bestimmt werden. Der Ungenauigkeit hinsichtlich der multiplikativen Eigenschaft des Verfahrens wurde mit einer gewichteten Skalierung entgegengewirkt. Mit Hilfe der Binärisierung konnten für jeden Kanal die Positionen der Kolokalisation präziser bestimmt werden. Ebenso konnte die räumliche Darstellung der Kreuzkorrelationsfunktion als ein Ähnlichkeitsmaß interpretiert werden. Allerdings ließ sich mit ihr keine Aussage über Intensität und Position der Kolokalisation treffen.

Literaturverzeichnis

1. Grassmé H, Jekle A, Riehle A, et al. CD95 Signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem.* 2001;276(23):20589–96.
2. Krawczyk C, Penninger JM. Molecular controls of antigen receptor clustering and autoimmunity. *Trends Cell Biol.* 2001;11(5):212–20.
3. Grassmé H, Jendrossek V, Riehle A, et al. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramid-rich membrane rafts. *Nat Med.* 2003;9(3):322–30.
4. Ibáñez L, Schroeder W, Ng L, et al. *The ITK Software Guide*. 2nd ed. United States of America: Kitware Inc; 2005.
5. Schroeder W, Martin K, Lorensen B. *The Visualization Toolkit*. 4th ed. United States of America: Kitware Inc; 2006.