3D-Darstellung der inneren Struktur des Zellkerns -

Rekonstruktion und Modelle zur Zellfunktion

A. Bischoff, R. Bracht, D. Komitowski

Abteilung Histodiagnostik, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg
e-mail: A.Bischoff@DKFZ-Heidelberg.de

Zusammenfassung. Molekularbiologische Methoden erlauben heute, durch Anfärbung von spezifischen DNS-Bereichen der Chromosomen, die inneren Struktur von Zellkernen durch eine dreidimensionale Rasterung mit dem Konfokalen-Fluoreszenz-Scanning-Mikroskop darzustellen. Zur quantitativen Untersuchungen der Morphologie der Zellkerne wird die Kernoberfläche mit Hilfe von Kugelflächenfunktionen modelliert, was zum einen zur Beschreibung der Form, zum anderen zur Definition eines kerneigenen Koordinatensystems führt. Zur Ermittlung der räumlichen Verteilung markierter DNS-Sequenzen, wie z.B. Kinetochoren, Centromere, Nukleoli u.a., wird die Pyramid-Linking-Segmentierung benutzt. Mit zwei Parametern, dem Abstand der segmentierten Region zum Zellkernrand bzw. zum Zellkernmittelpunkt, wird die Verteilung von Kinetochoren innerhalb des Zellkernes untersucht.

Schlüsselwörter: 3D-Visualisierung, Zellkernstruktur, Konfokale-Fluoreszenz-Scanning-Mikroskopie, Kugelflächenfunktionen, Pyramid-Linking-Segmentierung

1 Einleitung

Die moderne Forschung liefert Beweise dafür, daß die räumliche Organisation des Genoms Aufschlüsse über die Grundmechanismen der Tumorentstehung zuläßt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die 3D-Visualisierung und die Beschreibung der Verteilung definierter Zellkernstrukturen in Lymphozyten von Tumorpatienten, bei denen eine chromosomale Instabilität nachgewiesen wurde. Es werden hierbei nicht nur Chromosomen oder Teilbereiche von Chromosomen untersucht, sondern auch Kinetochoren, Centromere, Nukleoli und Genprodukte wie DNA-Polymerase oder Ki67-Proteine. Um tumorbedingte Abweichungen in der Genomorganisation zu erfassen, wurden Modellvorstellungen über die innere Struktur der Lymphozytenkerne bei gesunden Personen und Tumorpatienten zugrunde gelegt.

2 Material und Methode

Für die Untersuchungen werden unbehandelte Patienten mit urologischen Tumoren, vorwiegend Harnblasenkarzinome, herangezogen. Ein Patient, bei dem noch keine Krebskrankheit nachgewiesen ist, kann bereits Träger von chromosomalen- oder Genveränderungen sein, die eine neoplastische Transformation auslösen können. Auf diese Art und Weise wäre es möglich, Risikogruppen frühzeitig zu erkennen.

In Zusammenarbeit mit der Urologischen Universitätsklinik Heidelberg erhalten wir von den entsprechenden Patienten eine Blutprobe. Aus der Blutprobe werden die Lymphozyten isoliert und innerhalb des Zellkernes werden die Kinetochoren mit einem Antikörper, der speziell an die Centromere Proteine A, B und C (CENP-A, CENP-B, CENP-C) bindet, markiert. Im nächsten Schritt wird der Antikörper mit einem Sekundärantikörper, der mit dem Fluoreszensfarbstoff Flourescein-Iso-ThioCyanat (FITC) beladen ist, markiert. Der Zellkern wird mit Propidiumjodid (PI) gegengefärbt. Man erhält somit Zellkerne, die mit PI angefärbt sind und idealerweise innerhalb des Zellkerns 46 markierte Regionen, die die Kinetochoren repräsentieren.

Mit Hilfe eines Konfokalen-Fluoreszenz-Scanning-Mikroskops werden ca. 80 optische Schnitte durch den Zellkern gelegt. Die insgesamt ca. 10 MByte Daten pro Zellkern werden mit einer Workstation (SGI Indy) ausgewertet. Als Basis für die quantitative Untersuchungen und Beschreibung der Morphologie der Zellkerne dient die Modellierung der Kernoberfläche, die zum einen zur Beschreibung der Form führt, zum anderen zur Definition eines kerneigenen Koordinatensystems. Dieses Koordinatensystem erleichtert die Parametrisierung der räumlichen Verteilung markierter DNS-Sequenzen. In einem weiteren Schritt ist mit geeigneten Segmentierungsmethoden die räumliche Organisation von Kernkompartimenten, wie z.B. Kinetochoren zu bestimmen.

Eine Möglichkeit der Beschreibung der Zellkernform stellt das Ellipsoidmodell dar. In der Praxis erweist sich dieses Modell als wenig geeignet, da die Kerne der Tumorzellen sehr irregulär sind. Sie weisen Eindellungen oder Ausstülpungen auf und lassen sich mit Kugel- bzw. Ellipsoidmodellen nicht ausreichend beschreiben. Zur Beschreibung der Zellkernform wurden daher Kugelflächenfunktionen, die in der Physik als Lösungen der quantenmechanischen Gleichungen für rotationssymmetrische Systeme bekannt sind gewählt. Sie beschreiben beispielsweise die Form der Atomorbitale. Da ihr Funktionensystem vollständig ist, kann jede beliebige Form mit Hilfe einer Summe von Kugelflächenfunktionen Y_l^m dargestellt werden. Es ergibt sich eine Gleichung für die Oberflächenpunkte in Kugelkoordinaten r, t, p:

$$r = \sum_{l=0}^{L} \sum_{m=-l}^{l} a_{lm} Y_l^m(t,p)$$

die Vorfaktoren a der Funktion Y kennzeichnen die Form der Objekte. In ihnen manifestieren sich vorhandene Symmetrien des Objekts.

Diese Gleichung gilt im objekteigenen Koordinatensystem, dem sogenannten Eigensystem. Da die Objekte beliebig im Raum verschoben und gedreht erscheinen können, ist es erforderlich, das Eigensystem zu bestimmen. Die Transformation vom Koordinatensystem des Beobachters zum Eigensystem des Objekts wird allgemein beschrieben durch die Vektorgleichung:

$$\mathbf{X}' = A\mathbf{x} + \mathbf{v}$$

A = Matrix der Drehung, $\mathbf{v}$ = Verschiebungsvektor

Dieses Verfahren wird verwendet, um Zellkerne von beliebiger Form zu modellieren. Man erhält die Modellfunktion für die Oberfläche eines Zellkerns als eine Funktion $M(a_{lm}, r', \phi', \theta')$ mit den Entwicklungskoeffizienten a_{lm} der Funktionen $Y_l^m(\phi', \theta')$ in Kugelkoordinaten r', ϕ', θ' der Oberflächenpunkte, gültig im Eigensystem des Zellkerns. Zur Beschreibung eines Objekts, dessen Oberflächenpunkte bekannt sind, müssen die freien Parameter der Modellfunktion bestimmt werden. Es werden diejenigen Werte der Parameter berechnet, für die sich die minimale Abweichung der Modellfunktion von den gemessenen Daten ergibt, auch als Least-Squares-Ansatz bezeichnet.

$$\sum_O \left| D_O - M_O(a_i, A, \mathbf{v}) \right|^2 \longrightarrow Min$$

D bezeichnet die gemessenen Daten,
M die Modellfunktion in Abhängigkeit ihrer freien Parameter a, A, $\mathbf{v}$

Da die Modellfunktion nichtlinear von den Parametern A und $\mathbf{v}$ abhängt, kann die Lösung nur iterativ ausgehend von einer ersten Schätzung gewonnen werden.

Verwendet wird die Standardmethode nach Levenberg-Marquardt. Erste Schätzungen für die Verschiebung des Eigensystems ist der Objektschwerpunkt, während die Drehung des Eigensystems bezüglich des Koordinatensystems des Beobachters aus der Lage der Hauptträgheitsachsen des Objekts bestimmt wird.

Im nächsten Schritt wird das Datenmaterial des 2. Kanals durch entsprechende Segmentierungsverfahren ausgewertet. Zur Ermittlung der räumlichen Verteilung markierter DNS-Sequenzen, wie z.B. Kinetochoren, Centromere, Nukleoli oder Genprodukte, wie DNA-Polymerase oder Ki 67-Proteine, wurden verschiedene Segmentierungsverfahren wie Schwellwert-, Cluster- oder Pyramid-Linking-Segmentierung verwendet. Vergleiche zwischen punkt- und regionenorientierter Segmentierung ergab, daß die Pyramid-Linking-Segmentierung hierbei die besten Ergebnisse lieferte. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein regionenorientiertes Verfahren, bei der ein Pixel einem Objekt zugeordnet wird, unabhängig davon, was mit den Nachbarpixeln geschieht. Damit können, losgelöst vom eigentlichen Objekt, einzelne isolierte Punkte oder Regionen entstehen. Ein entscheidender Gesichtspunkt der Segmentierung ist jedoch, daß ein Objekt zusammenhängend sein muß.

Als Startpunkt für die Pyramid-Linking-Segmentierung dient die unterste Gaußpyramide eines Bildes. Hierbei werden die Grauwerte der benachbarten Pixeln gemittelt und zu einem Bildpunkt auf der nächsthöheren Pyramidenebene zusammengefaßt. Dies entspricht einer Glättungsoperation mit einem Rechteckfilter. Da jeder Bildpunkt einen Beitrag zu mehreren Bildpunkten auf der nächsthöheren Ebene leistet, ist zu entscheiden, zu welchem er wahrscheinlich gehört. Die Entscheidung fällt durch Vergleich der Grauwerte und Wahl des am nächsten liegenden Bildpunktes. Dieses Verfahren wird für alle Ebenen der Pyramide durchgeführt. Die erhaltene Datenstruktur wird in der Informatik als Baum bezeichnt. Diese ermittelte Baumstruktur ist der zentrale Punkt, um eine Verbindungsstruktur in der Pyramide zu schaffen mit dem Ziel, eindeutige Verbindungen zwischen den Bildpunkten der verschiedenen Ebenen herzustellen, sogenannte Vater-Sohn-Verbindungen. Dabei wird der Sohnknoten mit dem Vaterknoten verbunden, dessen Grauwert minimal abweicht. Dieses Vorgehen wird in folgenden Schritten iterativ wiederholt, bis ein stabiles Ergebnis erreicht wurde:

1. Berechnung der Bildpyramide unter Berücksichtigung der in der vorigen Iteration geschaffenen Verbindungen.
2. Erstellung der Vater-Sohn-Verbindungen durch das Prinzip minimaler Grauwertabweichung.
3. Abbruch der Iteration wenn das Ergebnis stabil bleibt, d.h. die Verbindungen der vorigen Iteration erhalten bleiben.

Nach Abschluß der Iteration entsteht eine sogenannte Baumstruktur, in der die Bildpunkte der verschiedenen Pyramidenebenen miteinander verknüpft sind. Ausgehend von der höchsten Ebene können nun die verschiedenen Bildregionen durch Propagation durch die Baumstruktur getrennt werden.
Für die Untersuchungen werden 2 Parameter berücksichtigt:

1. Abstand der segmentierten Region zum Zellkernrand, hier als Randstand bezeichnet.
2. Abstand der segmentierten Region zum Zellkernmittelpunkt, hier als radiale Distanz bezeichnet.

Zur Verifizierung der gefundenen Ergebnisse wurde der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest verwendet, mit dessen Hilfe überprüft werden kann, ob gewisse Unterschiede zwischen zwei Verteilungsfunktionen signifigant sind oder nicht.

3 Ergebnisse

Erste Ergebnisse zeigen die Eignung des Verfahrens zur Klassifizierung von Zellkernen und zur Charakterisierung der räumlichen Genomorganisation, besonders bei unregelmäßig geformten Zellkernen des Tumorgewebes. Es konnte mit Hilfe dieses Testes gezeigt werden daß es bei gesunden Personen innerhalb eines Signifikanzniveaus von +5% und -5% eine Gleichverteilung der Kinetochoren innnerhalb des Zellkernes gibt. Untersuchungen mit Patientenblut haben gezeigt, daß die Zellkerne sehr unterschiedlich geformt sind und die Gleichverteilung der Kinetochoren sehr stark schwankt. Um hier genauere Aussagen machen zu können, sind noch weitere Messungen notwendig.