

4D-Atlas der embryonalen Mausentwicklung

M. Plischke, K.-H. Wolf, S. Kroczyk, S. Rinkwitz¹, C. Grothe¹, D.P. Pretschner und K. Seidl²

Institut für Medizinische Informatik, TU Braunschweig, 38106 Braunschweig,

¹ Abteilung Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover, 30625 Hannover

² AG Bioinformatik, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, 38124 Braunschweig

Email: M.Plischke@tu-bs.de

Zusammenfassung. Präsentiert wird ein Projekt zur Erstellung eines vierdimensionalen anatomischen und morphologischen Atlanten der embryonalen Entwicklung der Maus. Basierend auf der Klassifizierung nach Theiler werden 3D-Modelle einzelner Entwicklungsstadien realisiert. Hierzu werden aus histologischen 2D-Bilddaten digitale 3D-Modelle der embryonalen Maus erstellt. Im nächsten Schritt wird die embryonale Entwicklung zwischen je zwei Entwicklungsstadien simuliert. Es entsteht ein vierdimensionaler Atlas der embryonalen Mausentwicklung. Durch diesen Atlanten sollen die Effekte von Geninaktivierungen visualisiert sowie die molekularen Grundlagen der nativen und pathologischen Morphogenese dargestellt werden.

1 Einleitung

Die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines funktionellen Organismus basiert auf einem komplexen Netzwerk von regulatorischen Systemen, deren enges Zusammenspiel die Balance des Lebens garantieren. Das gezielte An- und Abschalten von Genen bildet hierbei die molekulare Grundlage für ein fein abgestimmtes zeitliches und räumliches Ablaufmuster während der Embryonalentwicklung. Die Assoziation der Genexpression mit der sich formierenden morphologischen Struktur ist somit eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Regulation morphogenetischer Prozesse. Viele erworbene oder angeborene Krankheiten können auf Fehlfunktionen von Genen zurückgeführt werden, die schon während der Embryonalentwicklung potentiell gestörte Regelkreise manifestieren und schließlich pathologische Auswirkungen auf die Gesamtfunktion eines Organismus zeigen. Natürliche oder ektopisch induzierte Störungen der räumlichen und zeitlichen Balance der Genexpression können dramatische Folgen für die Gesamtentwicklung eines Individuums haben. Deren Analyse stellt jedoch wertvolle Informationen über die Funktion eines Gens im Netzwerk regulatorischer Faktoren zur Verfügung.

Die Erforschung biologischer Systeme folgte bisher meist dem klassischen Paradigma einer Anhäufung von Informationen aus den verschiedensten wissenschaftlichen Disziplinen und überließ es der Abstraktionsfähigkeit des Einzelnen, die konzertierten Geschehnisse während der Embryonalentwicklung im Hinblick auf ihre räumliche und zeitliche Erfassbarkeit zu verstehen. Gerade in den letzten Jahren konnten an Mäusen durch gezielte Inaktivierung einzelner Gene (Knockout (KO)-

Mäuse) wertvolle Informationen über Genotyp/Phänotyp-Beziehungen gewonnen werden. Neue dynamische Systeme zur Speicherung, Analyse und Visualisierung großer Datenmengen, erleichtern durch Simulation und intuitive Visualisierung das Verständnis komplexer biologischer Prozesse.

Die aktuelle Generation interaktiver Atlanten verknüpft die Nomenklatur und anatomische Strukturen miteinander und ermöglicht die Visualisierung von komplexen dreidimensionalen Strukturen [1-3]. Unsere Intention ist die Erstellung eines Atlanten, der die Embryonalentwicklung der Maus simuliert und visualisiert. Darüber hinaus wird die Etablierung geeigneter morphometrischer Analyseverfahren sowie die Implementierung morphogenetischer Anomalien die Grundlage für die Verifizierung von phänotypischen Veränderungen bei Gen-Funktionsstörungen in Maus-Mutanten (KO-Mäusen) liefern.

2 Methode

Grundlage des vierdimensionalen Atlanten ist eine Datenbasis, die als Verknüpfung verschiedener Modalitäten mit den folgenden Schritten realisiert wird:

- 3D-Rekonstruktion von embryonalen Mäusen benachbarter Entwicklungsstadien
- Verknüpfung mit einer anatomischen Datenbank bezüglich der Embryonalentwicklung der Maus (nach [4])
- Einbringen ausgewählter Gen- und Genprodukt-Expressionsmustern
- Entwicklung einer Simulationsmethode zur Darstellung von Gen-Expressionsänderungen

Zur dreidimensionalen Rekonstruktion der embryonalen Maus, wurden für jedes Entwicklungsstadium C56BL/6-Maus-Embryonen präpariert, mit Bouin fixiert, in Paraffin eingebettet und histologische Serienschritte angefertigt. Die transversalen Schnitte wurden einer Hämatoxylin/Eosin- (HE-) Färbung (H: 3 min / E: 1 sec) unterzogen und anschließend mikroskopiert. Mit Hilfe der zweidimensionalen Querschnitte erfolgte die dreidimensionale Rekonstruktion. Als erstes Modell wurde ein Maus-Embryo im Theiler-Stadium 19 (E11.5) gewählt. Die zweite Datenbasis ist ein Embryo im Theiler-Stadium 21 (E12.5). Pro Maus werden zwischen 600 und 1000 Schnitte von je 7µm erstellt, mikroskopiert und digitalisiert. Je Schnitt wurden mehrere Digitalaufnahmen mit einem Auflösungsvermögen auf zellulärer Ebene erzeugt, diese wieder zu einem zweidimensionalen Bild zusammengefügt und präparationsbedingte Artefakte manuell korrigiert. Die zu einem dreidimensionalen Volumen zusammengeführten Schnittbilder ermöglichen die 3D-Rekonstruktion des Maus-Embryos.

Der nächste Schritt ist die semiautomatische Segmentierung und Identifizierung der jeweiligen Strukturen und Organsysteme in den virtuellen Embryonen. Hierzu wird das dreidimensionale Modell mit einer terminologischen Datenbasis verbunden, die speziell für dieses Projekt nach [4] geschaffen wurde.

Neben den rein anatomisch-morphologischen Informationen sollen ausgewählte Gen- und Genprodukt-Expressionsmuster in den virtuellen Embryo integriert werden. Die Visualisierung der Expressionsmuster zu verschiedenen Zeitpunkten kann das Verständnis der räumlichen und zeitlichen Mechanismen erleichtern und dient als ein Beispiel für die Integration zusätzlicher Informationen in das Modell.

Es wird eine Methode zur zeitlichen Simulation der Embryonalentwicklung implementiert, die auf Methoden des Morphings beruht. So wird zwischen den durch mikroskopische Schnitte gewonnenen Stadien der Mausentwicklung interpoliert. Damit ist eine kontinuierliche Visualisierung der Embryonalentwicklung möglich. In diese Visualisierung können weitere Informationen eingebunden werden. Besonders interessant wäre die Integration von Genotyp/Phänotyp-Beziehungen.

Der Atlas wird modular konzipiert und bildet somit eine Plattform und Datenbasis für zukünftige Entwicklungen.

3 Ergebnis

Als Ergebnis des Projektes entsteht ein neuartiger, vierdimensionaler Atlas der embryonalen Mausentwicklung. Bei der Erstellung der dreidimensionalen Modelle erwies es sich als schwierig, räumliche Verzerrungen im dreidimensionalen Modell zu vermeiden. Der Atlas visualisiert nicht nur die embryonale Entwicklung, sondern bildet auch die Basis für die Implementierungen weiterer Module, welche die visuelle Darstellung von Genotyp/Phänotyp-Beziehungen und den zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen ermöglichen. Darüber hinaus können Ergebnisse von KO-Experimenten in den Atlas integriert werden und so die Auswirkungen von Gen-Funktionsstörungen auf morphogenetische Prozesse in dreidimensionalen Ansichten über die Zeit beobachtet werden. Damit kann eine Datenbasis für die weitere Erforschung der Wirkungsweise von Genen geschaffen werden.

4 Diskussion und Ausblick

Die Verwendung dreidimensionaler Computermodelle zur Simulation dynamischer Systeme kann neue, innovative Impulse bei der Aufbereitung, Darstellung und Simulation komplexer biologischer Vorgänge geben. Die Morphogenese der Organentwicklung ist ein Beispiel für mehrdimensionale Ereignisse, bei denen Funktion und Struktur durch eine Kaskade von regulatorischen Sequenzen in einem zeitlichen Fenster aufgebaut werden. Die Visualisierung dieser biologischer Abläufe ist eine Herausforderung für die Informatik. Dhenain et.al. beschreiben in [3] einen dreidimensionalen digitalen Maus-Atlas, der auf der Basis des hochauflösenden Magnetresonanz-Imageverfahrens (MRI) die einzelnen Stadien der Mausentwicklung zwischen E6 und E15.5 darstellt. Der Vorteil der MRI-Technik gegenüber der wesentlich aufwendigeren optischen Methode, bei der die Proben geschnitten, gefärbt, fotografiert, digitalisiert und abschließend dreidimensional rekonstruiert werden müssen, ist die enorme Geschwindigkeit der Datengewinnung. Allerdings bietet das optische Verfahren alle Vorteile der Bildauflösung, die weit in den subzellulären Raum hineinreichen kann. Ein wesentlicher Aspekt unseres 3D-Projektes umfasst die morphometrische Vermessung von embryonalen Strukturen, um pathologische und atypische Veränderungen (z.B. in Maus-Mutanten) zu analysieren. Hierzu muss die Zahl der Zellen innerhalb der jeweiligen embryonalen Struktur kalkulierbar sein, so dass die Auswirkungen beeinträchtigter Genfunktionen (z.B. Apoptose; Wachstumsinduktion) auf Subpopulationen von Zellen verschiedenen Ursprungs erkennbar werden. Es ist

klar ersichtlich, dass unser Vorhaben ein Auflösungsvermögen auf zellulärem Niveau voraussetzt, das nur mit dem aufwendigeren optischen Verfahren erreichbar ist. Zur Identifikation der Zellen wurden die histologischen Serienschritte einer HE-Färbung unterzogen, wobei die Anfärbung der Zellkerne mittels Hämatoxylin erfolgte.

Bisherige 3D-Rekonstruktionen von Embryonen aus histologischen Serienschritten umfassten Entwicklungsstadien bis E9 (Theiler-Stadium 14) [3]. In unserem neuen, hochauflösenden Atlanten kann die Entwicklung der embryonalen Maus erstmalig zwischen E11.5 und 12.5 (Theiler-Stadium 19-21) vierdimensional dargestellt werden. Darüber hinaus bietet der Atlas die Möglichkeit der zusätzlichen Implementierung von Regelkreisen, die an morphogenetischen und Signal-Transduktionsprozessen beteiligt sind. Hierbei werden Systeme benötigt, die Signalkaskaden beschreiben und sie in das Raum-Zeitgefüge solcher Atlanten integrieren. Kürzlich wurde ein Prototyp vorgestellt, der das Problem der digitalen Erfassung von zellübergreifenden Signalwegen und zellulärer Differenzierung während morphogenetischer Prozesse aufgreift [5]. Mit der Implementierung dieser Systeme in das 3D-Embryo-Modell rückt die Vision der virtuellen Maus in greifbare Nähe. Differenzierungsphänomene morphogenetischer Prozesse laufen vor den Augen des Betrachters ab und können auf molekulare Grundlage gestellt werden. Pathologische Veränderungen werden nicht nur nachvollziehbar, sondern sogar artifiziell generierbar, und Gen-Funktionsstörungen können auf der Basis ihrer morphologischen Korrelate aufgespürt werden. Ohne Frage wird der konsequente Ausbau des virtuellen Maus-Embryos über alle Entwicklungsstadien nicht nur eine neue Ära für die Entwicklungsbiologen einleiten, sondern auch einen bedeutenden Fortschritt für die medizinische Grundlagenforschung und Diagnostik sein.

Danksagung. Für die Herstellung der aufwendigen histologischen Serienschritte danken wir H. Streich.

5 Literatur

1. Höhne KH, Pflesser B, Pommert A, et al.: A new representation of knowledge concerning human anatomy and function. *Nat Med* 1(6): 506-511, 1995.
2. Brune RM, Bard JB, Dubreuil C, et al.: A three-dimensional model of the mouse at embryonic day 9. *Dev Biol* 216(2): 457-468, 1999.
3. Dhenain M, Ruffins SW, Jacobs RE: Three-dimensional digital mouse atlas using high-resolution MRI. *Dev Biol* 232(2): 458-470, 2001.
4. Kaufman MH: *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press, London, 2001.
5. Seidl, K, Wingender, E: PheGe, a novel concept for in-silico analyses of genotype/phenotype relations. *Proceedings of the German Conference on Bioinformatics – GCB* 2001: 226-227, 2001.