# Spezielle Morphologische ‚Watersheds' zur Segmentierung 3-dimensionaler Chromosomen-Domänen von fluoreszenz-markierten Zellkernen in verrauschten Bildern.

Wilfried Böcker und Thomas Radtke*

Institut für Medizinische Strahlenphysik
Universitätsklinikum Essen, Hufelandstr. 55
45122 Essen,
*Inst. f. Med. Physik u. Biophysik
Robert-Koch-Str. 3148149 Münster
Email: wilfried.boecker@uni-essen.de

**Zusammenfassung** Zellkerne, die mittels spezieller DNA-Sonden (Chromosomen-Painting) und Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung präpariert wurden, zeigen unter dem Laser-Scanning-Mikroskop distinkte Territorien der angefärbten Chromosomen. Über die Morphologie dieser Domänen ist bisher nicht viel bekannt. Insbesondere die Frage nach morphologischen Veränderungen z.B. nach Einwirkung von ionisierender Strahlung ist nicht bekannt. Mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops und einer Bildverarbeitung , die auf morphologischen *watersheds* basiert werden Chromosomendomänen automatisch segmentiert und anschließend rekonstruiert. Die so gewonnenen Daten können genutzt werden um beispielsweise Veränderungen der Interphasechromosomen nach Bestrahlung zu untersuchen.

## 1 Einleitung

Einen wichtigen Teil in der Bildverarbeitung stellt die automatische Segmentierung dar. Dabei wird das Bild in verschiedene, sinnvolle, separate Regionen aufgeteilt. Die Resultate können dann markiert und für anschließende Merkmals-Analysen benutzt werden. Üblicherweise werden Segmentierungs-Verfahren in zwei Kategorien eingeteilt: 1. regionen-basierte Algorithmen: Hier wird nach Bildbereichen gesucht, die homogen sind im Sinne von messbaren Eigenschaften wie Grauwerte, Farbe, Kontrast oder Textur. 2. kontur-abhängige Verfahren: Hier wird dagegen nach lokalen Grauwertsprüngen (Gradienten) gesucht. In dieser Präsentation wird zur Segmentierung von Interphase-Chromosomendomänen ein Verfahren vorgestellt, das eine Kombination aus den beiden vorhergenannten Kategorien darstellt: ein konturbasierter, *region-growing* Algorithmus aus dem Bereich der Mathematischen Morphologie.

Chromosomen-Domänen stellen die Aufenthaltsbereiche der verschiedenen Chromsomen während der Interphase des Zellzyklus innerhalb des Zellkerns dar.

Erst durch die Möglichkeit mit Hilfe der sogenannten *Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung* (FISH) Untersuchung weiß man, dass die einzelnen Chromosomen während der Interphase des Zellzyklus distinkte räumliche Bereiche innerhalb des Zellkerns aufweisen [1]. Bei dieser Methode werden die jeweiligen Chromosomen mit einer spezifischen DNA-Sonde markiert, die ihrerseits mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Mit einem Fluoreszenz-Mikroskop lassen sich dann die jeweiligen Chromosomen-Domänen beobachten. Über die Morphologie dieser Domänen ist bisher nicht viel bekannt. Zwar wurde die alte Annahme, dass Chromosomen sich jeweils im gesamten Zellkern ausbreiten und sich gegenseitig durchdringen Ende der 70er Jahre experimentell widerlegt, aber genaue Informationen über räumliche Ausdehnung bzw. gegenseitiger Abgrenzung können zur Zeit nur anhand von biophysikalischen Modellen vorgenommen werden. Insbesondere die Frage nach morphologischen Veränderungen z.B. nach Einwirkung von ionisierender Strahlung ist nicht bekannt.

Weiterhin ist es bislang nicht gelungen reproduzierbar Domänenbereiche zu segmentieren und anschließend quantitative Aussagen bzgl. ihrer Formfaktoren (z.B. Volumen und Domänenoberfläche) zu machen. Erst in letzter Zeit konnte erfolgreich Domänen-Volumen und Oberfläche mittels Laser-Scanning-Mikroskopie und digitaler Bildverarbeitung erfasst und rekonstruiert werden [2]. Jedoch stellt gerade die Domänenoberfläche prinzipiell eine schwer quantifizierbare Größe dar [3].

## 2 Methoden

Um die 3-dimensionale Struktur der Domänen zu erfassen, ist ein Laser-Scanning-Mikroskop notwendig. Hiermit lassen sich die Zellkerne –ähnlich des tomographischen Prinzips- in einzelne optische Schnittbilder entlang der optischen Achse zerlegen. Der so gewonnene Bildstapel enthält die Information über die 3-dimensionale Morphologie der Domäne. Für unsere Untersuchungen haben wir humane Lymphozyten des peripheren Blutes mit einer DNA-Sonde markiert, die spezifisch an das Chromosom 11 bindet und ihrerseits an einen grün fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist. Zusätzlich wurde der gesamte Zellkern mit einem rot fluoreszierenden DNA-Farbstoff markiert, um den gesamten DNA-Gehalt des Kerns zu messen. Aufgrund physikalischer und biologischer Randbedingungen wurden in dieser Präsentation die einzelnen Zellkerne in 20 separate optische Schnittbilder zerlegt, die entlang der optischen Achse aufgenommen wurden (Zellkerndurchmesser ca. 10 µm). Die Bildverarbeitungsaufgabe besteht im ersten Schritt darin, automatisch für jedes Bild des Bildstapels die Konturen des angefärbten Chromosomenpaars (diploide Zellen) zu extrahieren.

### 2.1 Bildrestrauration

Systembedingt weisen diese Bilder aufgrund des schwachen Fluoreszenzlichtes sowie unspezifischer Färbungen einen hohen Rauschanteil auf. Zusätzlich ist die räumliche Intensitätsverteilung durch eine asymmetrische, ortsabhängige Punktverwaschungsfunktion (PSF) verschmiert. Die Bild-Vorverarbeitung besteht aus einem rauschunterdrückenden Restaurationsfilter. Neben dem Wienerfilter kommt auch ein iterati-

ver Tikhonov-Miller Algorithmus (ICTM) zum Einsatz. Durch letzteren lassen sich bei der inversen Filterung -besser als mit dem Wiener-Filter- Artefakte unterdrücken. Eine ausführliche Beschreibung der Bildrestauration ist in [4] zu finden.

## 2.2 Segmentierung

Die Konturen werden von einem marker-gesteuerten *watershed*-Algorithmus extrahiert (Ausgangsbasis ist dabei ein Gradientenbild) und das Regionenwachstum von einem *dual-greylevel reconstruction* Algorithmus durchgeführt. Ein einfacher *wa*

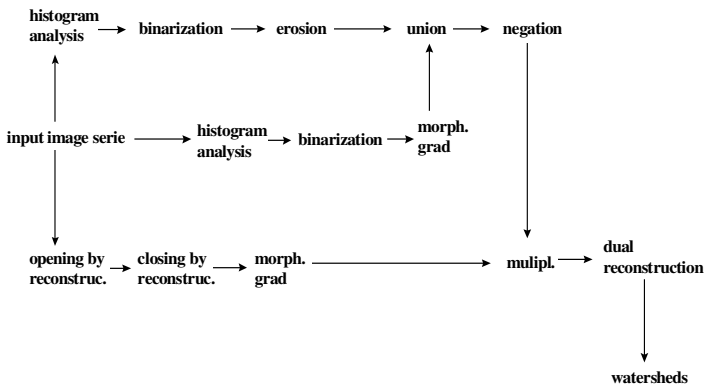


**Abb. 1** Chromosomendomänen Segmentierung durch einen speziellen marker-gesteuerten *watershed* Algorithmus. Die *Open-by-Reconstruction* und *Closing-by-Reconstruction* stellen eine besondere Form eines *asf*-Filters dar. Die Verarbeitung kann in 2-D und in 3-D erfolgen.

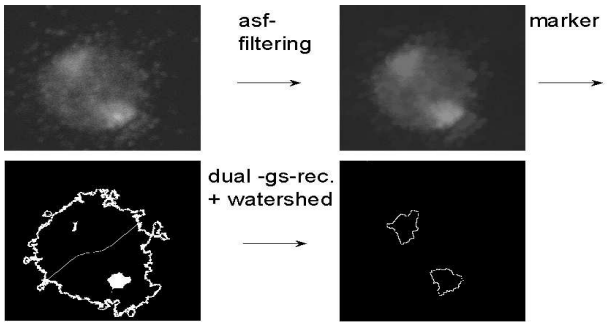


**Abb 2.** 2-D Segmentierung zweier Chromosomendomänen (Chromosom 1) mit Hilfe des markergesteuerten *watershed*-Algorithmus. Das Eingangsbild stammt aus einem Bildstapel (etwa aus der Mitte) von 30 Einzelbildern.

*tershed*-Algorithmus führt üblicherweise zu einer Übersegmentierung, da jedes regionale Minimum im Bild als eigene Region segmentiert wird. Insbesondere bei verrauschten Bildern führt dieser Weg zu einer dramatischen Übersegmentierung.

Durch die Einführung von binären Markern in Verbindung mit morphologischen Grauwert-Rekonstruktionen lässt sich diese Übersegmentierung unterdrücken, und der *watershed*-Algorithmus extrahiert nur das größte regionale Extrema zwischen den Markern. Üblicherweise benötigt man einen Marker innerhalb und einen Marker außerhalb des zu segmentierenden Objektes.

Es werden dann keine zusätzlichen Forderungen an die Größe oder die Position der Objekt- und der Hintergrund-Marker gestellt. Die automatische Bestimmung der Marker kann im Einzelfall eine nicht-triviale Aufgabe darstellen. Jedoch lassen sich durch den gezielten Einsatz von a priori Wissen auf relativ einfache Weise zuverlässige Marker finden.

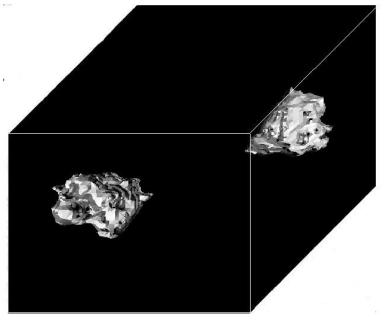

**Abb. 3** Visualisierung der Domänenrekonstruktion durch einen Marching-Cube Algorithmus. Die Rekonstruktion wurde aus einem Bildstapel mit 20 Einzelbildern erstellt.

### 2.3 Visualisierung

Nach Abschluss der Segmentierung wird aus den verschiedenen Segmenten in den jeweiligen Einzelbildern des Bildstapels durch ein m*arching-cube*-Rendering 3-dimensionale Domänestrukturen erzeugt.

Die Qualität der marker-gesteuerten Segmentierung über *watersheds* wird abschließend durch ein zweites, statistisches Verfahren (*k-means* clustering, ISODATA-Programm) sowie ein manuelles Festlegen der Domänengrenzen überprüft [4].

## 3 Ergebnisse

Zunächst wurde, wie bereits oben erwähnt, eine inverse Filterung für jedes Bild des Bildstapels durchgeführt. Hierdurch wird die optische Verschmierung durch die PSF teilweise restauriert. Anschließend erfolgte für jedes Bild des Bildstapels die eigentliche Segmentierung nach oben beschriebenem Schema. Als Domänen-Marker wurden die hellsten Bildbereiche genutzt. Ein globaler Schwellenwert = 90% des hellsten Pixels im Grauwerthistogramm liefert dabei einen stabilen Marker für die Chromosomen-Domäne. Als Hintergrund-Marker wurde die geschlossene Kontur des gesamten Zellkerns benutzt. Der Ausgangspunkt hierfür ist ein zusätzliches Bild im zweiten Fluoreszenzkanal (Gegenfärbung der gesamten Kern-DNA, rote Fluores-

zenz). Bevor das Gradientenbild für die marken-gesteuerte Segmentierung erzeugt wurde, mussten durch zwei morphologische Algorithmen (*opening by reconstruction* mit anschließendem *closing by reconstruction*) Grauwertschwankungen innerhalb der Domäne homogenisiert werden, ohne jedoch dabei die Morphologie zu verändern. Im Anschluss daran erfolgte die eigentliche Segmentierung mittels morphologischen Gradienten, *dual greylevel reconstruction* und anschließender *watershed* Detektierung. Das Ergebnis ist eine geschlossene Kontur, die den Domänenrand im jeweiligen Bild markiert. Nachdem die Segmentierung für alle Bilder des Bildstapels abgeschlossen war, ließ sich aus den Einzelsegmenten 3-dimensionale Aufenthaltsbereiche für die beiden angefärbten Chromosomen erstellen und volumenspezifische Aussagen berechnen (Gesamtfluoreszenz, Oberfläche etc.).

Als ein Qualitätsmaß wurde die Gesamtfluoreszenz des Chromosomenpaars herangezogen, da es für Chromosomenpaare der diploiden Zellen keinerlei Abweichung im DNA-Gehalt geben sollte. Untersucht wurden 30 verschiedene Zellkerne. Dabei zeigte sich, dass für den oben beschriebenen morphologischen Algorithmus im Vergleich zur manuellen Bestimmung und zu dem statistischen Verfahren die Segmentierungsresultate die kleinsten Abweichungen zwischen den beiden Chromosomen auftraten. Für die manuelle Auswertung ergab sich eine mittlere Abweichung der Fluoreszenzintensität von 6.2 %, für die statistische Methode: 7.2 % und für die *watershed* Segmentierung: 2.1 % [4].

## 4 Diskussion

Abschließend lässt sich feststellen, dass durch die Kombination aus regionen- und kontur-basierten Verfahren mittels erweiterten *watershed*-Algorithmus eine sehr robuste Möglichkeit gegeben ist, Chromosomen-Domänen in verrauschten Fluoreszenzbildern zuverlässig zu detektieren, die im Vergleich zur manuellen Segmentierung deutlich bessere Resultate liefert.

## 5 Literatur


1. T.Cremer, A. Kurz, R. Zirbel, S. Dietzel, B. Rinke, E. Schröck, M.R. Speicher, U. Mathieu, A. Jauch, P. Emmerich, H. Scherthan, T. Ried, C. Cremer and P. Lichter, „Role of chromosome teritories in the functional compartmentalization of the cell nucleus“, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol,* **58**, pp. 777-792, 1993.
2. Eils R, Ditzel S, Bertin E, Schröck E, Speicher MR, Ried T, Robert-Nicoud C, Cremer C, Cremer T: Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: Actice and inactive X chromosome Territories have similar volumes but differ in shape and surface structure, J. Cell Biol., 6:1427:1440, 1996.
3. Radtke T: Rekonstruktion und Quantifizierung von Chromosomendomänen in Interphasezellen, Dissertation, Essen, 1999.
4. Böcker W.; Radtke T.; Streffer C.: „Three-dimensional imaging of interphase cell nuclei with laser scanning microscopy“, p.46-57, SPIE 3460: Applications of Digital Image Processing XXI, 19-24.7 San Diego 1998.