

# **Application-driven development of modules for an image analysis pipeline in three-dimensional fluorescence microscopy**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

**Alexander Schmitz**

aus Daun (Eifel)

Frankfurt am Main, 2017

(D30)

# Zusammenfassung

In der Zell- und Entwicklungsbiologie werden Modellsysteme eingesetzt, in denen natürliche Gegebenheiten repräsentativ abgebildet werden. In der Entwicklungsbiologie werden Fragestellungen daher an Modellsystemen wie Insekten oder Pflanzen studiert. Um die Physiologie und Pathologie von Zellen, Geweben und Organen zu analysieren, werden in der Zellbiologie dreidimensionale Zellkulturen (z.B. Sphäroide oder Organoide) verwendet. In allen Systemen werden Nachbarschaft und Interaktionen von Zellen sowie physikochemische Einflüsse repräsentativ für ein echtes Gewebe abgebildet. Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie und die Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie (engl. *light sheet-based fluorescence microscopy*, LSFM) bieten die Möglichkeit, Bildstapel von dreidimensionalen Proben unter Wahrung ihrer Integrität zu generieren. Die hohe Aufnahmegeschwindigkeit und der geringe Energieeintrag eines LSFM ermöglichen Aufnahmen lebender Proben über lange Zeiträume mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Die Qualität der erstellten Aufnahmen wird für die Erhebung quantitativer Daten zu Morphologie, Funktionalität und Dynamik im Kontext des Gesamtsystems genutzt. Dieser Ansatz wird als *bildbasierte Systembiologie* bezeichnet. Um das Potential der Daten zu nutzen, wird ein Bildanalysestrang (engl. *image analysis pipeline*) benötigt, mit dessen Hilfe die Datenhandhabung, Visualisierung und die Extraktion biologisch relevanter Daten erfolgen kann.

Ziel dieser Arbeit war es, Module eines Bildanalysestrangs zu identifizieren, zu entwickeln und zu optimieren. Die Module umfassen die Organisation, Reduktion und Visualisierung von Bilddaten, die Rekonstruktion von Bilddaten mehrerer Blickrichtungen, die automatische Erkennung (Segmentierung) und zeitliche Verfolgung (engl. *tracking*) von Zellkernen und die Extraktion von Objektmerkmalen. Die Module wurden anwendungsorientiert entwickelt um die Anwendbarkeit auf Daten aus der dreidimensionalen Fluoreszenzmikroskopie zu gewährleisten. Die zu Grunde liegenden Bilddaten stammten aus aktuellen Forschungsprojekten in der Entwicklungsbiologie von Insekten und Pflanzen, sowie aus der Zellbiologie.

Die in der Fluoreszenzmikroskopie erstellen Datensätze sind üblicherweise komplex und erfordern automatisierte Bildverarbeitung für die Handhabung, Visualisierung und Analyse der Daten. Das erste Modul führt eine Strukturierung der Datensätze durch, reduziert die Datenmenge durch Zuschneiden und Bildkompression und berechnet Projektionen entlang verschiedener Raumrichtungen. Das zweite Modul erlaubt die Aufbereitung der im ersten Modul generierten Projektionen und korrigiert in diesen Bildern Intensitätsschwankungen, die als Funktion der Zeit auftreten. Das Programm wurde als Teil einer Publikation in *Nature Protocols* veröffentlicht. Für den Austausch und die Visualisierung der Datensätze wurde die Webapplikation *BugCube* als drittes Modul des Bildanalysestrangs entwickelt.

Proben können in einem LSFM rotiert und dadurch Aufnahmen aus verschiedenen Blickrichtungen erzeugt werden. Im Vorfeld meiner Arbeit konnten Frederic Strobl und Alexander Ross die gesamte Embryogenese des roten Reismehlkäfers, *Tribolium castaneum*, und der Feldgrille, *Gryllus bimaculatus*, mit dem LSFM aufnehmen. Für die Rekonstruktion der Aufnahmen habe ich die Erweiterung *Multiview Reconstruction* der Software *FIJI* als Modul für den Bildanalysestrang evaluiert. Die Erweiterung wurde hinsichtlich Automatisierung und Effizienz optimiert. Dadurch konnten wir die ersten, qualitativ hochwertigen Rekonstruktionen während der Embryogenese beider Insekten erstellen.

Optische Aufhellverfahren erhöhen die Eindringtiefe in Proben, und ermöglichen Endpunktaufnahmen vollständiger Objekte. Diese Arbeit beschreibt ein Modul für die quantitative Charakterisierung von Endpunktaufnahmen optisch aufgehellter Sphäroide. Die Grundlage bildet eine Zellkernsegmentierung. Für die Leistungsbewertung der Segmentierung wurde ein Programm entwickelt, mit dem aus Bilddaten Validierungsdatensätze (engl. *ground truth*) erstellt werden konnten. Das Programm wurde in der Zeitschrift *BMC Bioinformatics* veröffentlicht. Die Zellkernsegmentierung lieferte die Grundlage für Simulationsmodelle, in denen strukturell unterschiedliche Bereiche in Sphäroiden mit Korrelationsfunktionen identifiziert wurden. Die Ergebnisse dieser Zusammenarbeit wurden in der Zeitschrift *Royal Society Interface* veröffentlicht. Neben Position, Volumen und Form erfasst die quantitative Charakterisierung lokale Strukturparameter, die anhand eines Formmodells (engl. *alpha shape*) und von zwei Zellgraphen ermittelt werden. Das Modul liefert somit eine umfassende Charakterisierung auf der Ebene einzelner Zellen, der Zellnachbarschaft und des gesamten Zellverbandes. In dieser Arbeit wurde das Modul in vier Anwendungen verwendet, um den Einfluss verschiedener Stressbedingungen auf die Morphologie und Anordnung von Zellen in Endpunktaufnahmen optisch aufgehellter Sphäroide zu analysieren.

Ein weiteres Modul des Bildanalysestrangs wurde für die Extraktion von Zellkernpositionen und der Abstammungshistorie entwickelt. In Zusammenarbeit mit Dr. Daniel von Wangenheim, Dr. Alexis Maizel und Dr. Jens Fangerau wurde das Programm auf Langzeitaufnahmen der Seitenwurzel von *Arabidopsis thaliana* angewendet. Unsere Arbeit ermöglichte die Erstellung eines vierdimensionalen Atlas der Seitenwurzelentwicklung in *Arabidopsis thaliana*. Das entwickelte Modul und die Ergebnisse der Anwendung wurden in der Zeitschrift *Current Biology* veröffentlicht.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich die entwickelten Module in interdisziplinären Forschungsprojekten der Zell- und Entwicklungsbiologie auf Datensätze aus der dreidimensionalen Fluoreszenzmikroskopie anwenden. Die Module ermöglichten die Organisation, Verarbeitung, Visualisierung und Analyse der Datensätze. Die entwickelten Module haben ein hohes Potential für die Anwendung in weiteren Forschungsprojekten. Die Perspektive des Bildanalysestrangs sehe ich deshalb nicht nur in der bildbasierten Systembiologie, sondern auch in der medizinischen Diagnostik und in industriellen Hochdurchsatzverfahren.