

Objekterkennung und Modellierung zellulärer Strukturen aus mikroskopischen Bildern

TANJA STECKLING¹, HARTMUT KLÖTZER¹, TIM SUTHAU¹, STEPHANIE WÄLTER²,
ERICH WANKER² & OLAF HELLWICH¹

Zusammenfassung: Die vorliegende Arbeit hat die automatische Erkennung von Proteinen in Konfokalmikroskopaufnahmen zum Thema. Hierbei wird die ein Protein charakterisierende Verteilung innerhalb einer Zelle mit Hilfe einer geeigneten Parametrisierung untersucht. Da Proteine aufgrund ihrer Funktion und Struktur in speziellen Zellkomponenten auftreten, können sie anhand ihrer räumlich strukturierten Verteilung eindeutig identifiziert werden. Bisherige Auswertungen sind nur manuell durchführbar und basieren somit auf individuellen Erfahrungswerten. Ziel dieses Forschungsvorhabens ist die Entwicklung eines automatisierten Verfahrens, mit dem es möglich ist, Proteine mit Klassifizierungsverfahren aus der Fernerkundung zu klassifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass Bildanalysealgorithmen sowohl bekannte Proteine erkennen, als auch unbekannte Proteine charakterisieren, sofern sie eine individuelle Proteinverteilung in der Zelle aufweisen.

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der automatischen Erkennung von Proteinen in Konfokalmikroskopaufnahmen. Hierbei wird die ein Protein charakterisierende Proteinverteilung innerhalb einer Zelle mit Hilfe einer geeigneten Parametrisierung untersucht. Da Proteine aufgrund ihrer Funktion und Struktur in speziellen Zellkomponenten auftreten, können sie anhand ihrer räumlich strukturierten Verteilung eindeutig identifiziert werden. Da bisherige Auswertungen nur manuell durchführbar sind und somit auf individuellen Erfahrungswerten basieren, ist ein Ziel dieses Forschungsvorhabens die Entwicklung eines automatisierten Verfahrens, mit dem es möglich ist, Proteine zu klassifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass Bildanalysealgorithmen sowohl bekannte Proteine erkennen, als auch unbekannte Proteine charakterisieren, sofern sie eine individuelle Proteinverteilung in der Zelle aufweisen. Grundlegend hierfür ist ein fester Bezugspunkt innerhalb der Zelle, der eine Vergleichbarkeit der einzelnen Proteinaufnahmen ermöglicht. Der Ansatz beginnt mit der Lokalisierung des Zellkerns, mit dem es möglich ist, die Lage der Proteinstrukturen zu differenzieren. Die Definition weiterer markanter Zellkomponenten führt zu einem Zellmodell. Dieses erzeugte Modell ermöglicht es, die vom Protein markierten Zellkomponenten eindeutig zu analysieren. Mit Hilfe von Klassifizierungsverfahren aus der Fernerkundung wurden bereits stabile Ergebnisse erzielt.

Mittels Konfokalmikroskopie konnten geeignete Basisdaten gewonnen werden, wobei die zunächst ausgewählten Proteine eindeutige Lokalisationen aufweisen. Mit Hilfe dieser Aufnahmen gelang eine geeignete systematische Parametrisierung, die Grundlage für die Klassifizierung ist.

Diese funktionelle Charakterisierung von Proteinen könnte in Zukunft helfen, zunehmend von der Behandlung von Krankheitssymptomen zu der Beseitigung von Krankheitsursachen zu gelangen.

¹ Technische Universität Berlin, Photogrammetrie und Kartographie, EB 9, Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin

² Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), Berlin-Buch, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin

2 Modellierung und Aufnahme

2.1 Zellaufbau und Objektdefinitionen

Betrachtet man eine tierische Zelle unter einem Mikroskop, stellt man fest, dass das Cytoplasma groß genug ist, um verschiedene Zellorganellen voneinander unterscheiden zu können. Der Aufbau einer tierischen Zelle mit den unterschiedlichen Zellkomponenten (Organellen) ist in Abb. 1 dargestellt.

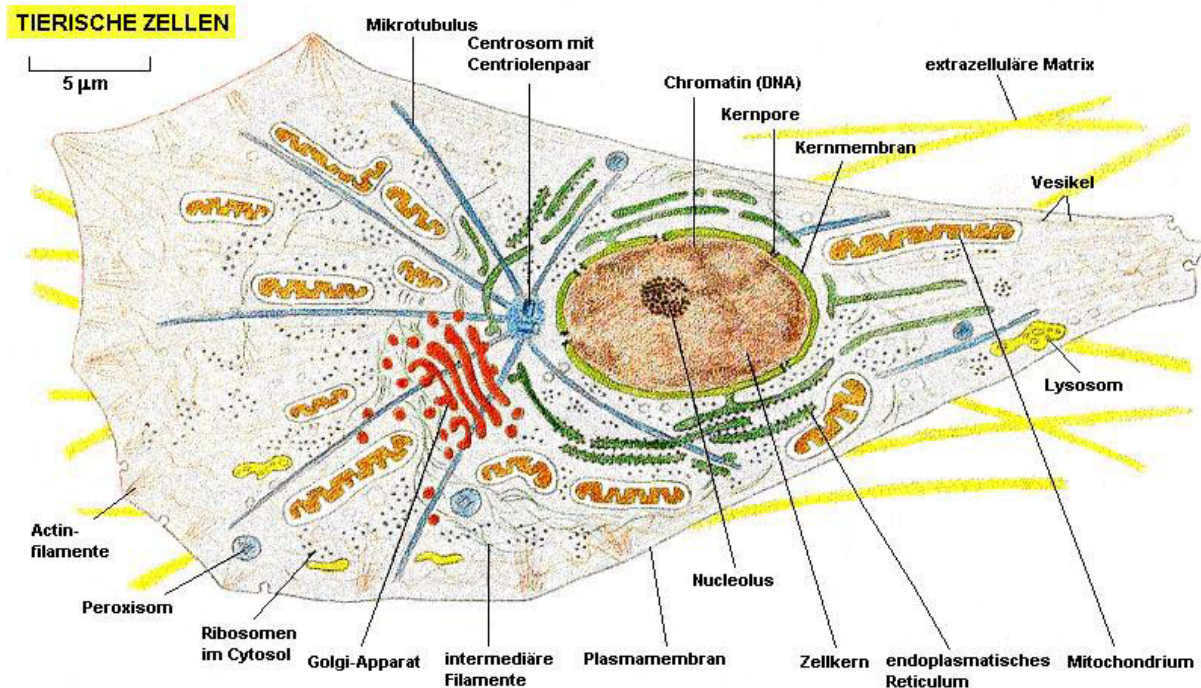


Abb. 1: Schematischer Aufbau einer tierischen Zelle [ALBERTS et al; 2001]

Spezielle Charakteristika ermöglichen es, die Organellen zu unterscheiden. Hierzu gehören nicht nur die Größe und die Form, sondern auch die Lage innerhalb der Zelle. Die Vielzahl der Funktionen, die Proteinen zuzuordnen sind, ist unter anderem eine Folge der ungeheuren Vielfalt verschiedener dreidimensionaler Formen, die sie haben können. Je nach Funktion treten die einzelnen Proteine an unterschiedlichen Orten in der Zelle auf. So ist bereits bekannt, dass z.B. einige Proteine insbesondere im Golgi-Apparat angesiedelt sind, wohingegen andere überwiegend im Zellkern vorkommen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode ist es möglich, Bilder zu erzeugen, die eine Proteinverteilung wiedergeben und somit auch optische Analysen ermöglichen. Bei der bisherigen manuellen Auswertung von Proteinaufnahmen sind die Zellkomponenten identifiziert worden, die von der Färbung betroffen waren.

Die spezifischen Eigenschaften der einzelnen Organellen werden in der Tab. 1 zusammengefasst. Ausgehend von dieser Aufstellung konzentrierte man sich bei der Definition von Merkmalen nicht in erster Linie auf die im Bild erkannten Organellen, sondern versuchte möglichst einfache Strukturunterschiede zu definieren. Zum Beispiel wurde das Protein Vimentin in eine fadenartige Kategorie eingeordnet, im Gegensatz dazu fiel das Protein Huntingtin (4C8) in die Kategorie punktförmige Strukturen im Außenraum. Andere Proteine besitzen kaum eine Außenraumfärbung, wie z.B. HSP70 oder Huntingtin (HD1), deren Unterscheidung jedoch durch den Zellkern möglich ist. Huntingtin (HD1) färbt den Zellkern recht intensiv, was von HSP70 nicht behauptet werden kann. Diese Vorgehensweise bei der Merkmalsdefinition schien zu Beginn relativ günstig und im ersten Schritt auch praktisch

umsetzbar zu sein, genügt aber nach den späteren Erkenntnissen nicht mehr, um die Organellen eindeutig zu beschreiben [ALBERTS et al; 2001].

Zellorganelle	Merkmale
Zellkern/Nucleus	rund, oval, nierenförmig begrenzt von der Kernmembran
Nucleolus	ein oder mehrere Organellen in dem Nucleus meist rund oder oval; gleichmäßig geformt
Cytoplasma	flächige Struktur in der gesamten Zelle
Golgi-Apparat	unregelmäßige Struktur in der Nähe der Kernmembran fleckiger Charakter liegt in der Nähe des Centrosoms stellt im Zellbereich eine deutliche Intensität dar bei nierenförmigen Zellkernen meist in der Einbuchtung
Mitochondrien	wurmartige Form stellen z.T. dicke Fäden dar im gesamten Cytoplasma verteilt
Microtubuli	dünne, fadenartige Struktur liegen im gesamten Cytoplasma vor Konzentration nimmt zum Centrosom zu
Endoplasmatisches Reticulum	kammerförmige Struktur liegt um den Zellkern herum
Peroxisomen	punktförmige Struktur gleichmäßig im gesamten Cytoplasma verteilt
Fokal Adhesion	fleckenförmige Strukturen an der Plasmamembran meistens verbunden mit Microtubuli
Plasmamembran	Umrißlinie bei konfokalen Aufnahmen exakte Begrenzung der Zelle
Centrosom	punktförmige Struktur liegt direkt am Zellkern bildet das Zentrum der Microtubuli-Fäden bei nierenförmigen Zellkernen meist in der Einbuchtung

Tab. 1: Merkmale für die einzelnen Organellen

2.2 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie

Um Zellen überhaupt betrachten zu können, benötigt man ein Mikroskop. Die Erfindung des Mikroskops im 17. Jahrhundert ermöglichte zum ersten Mal die Beobachtung von Zellen und noch ein paar hundert Jahre später verdankte man alles, was über Zellen bekannt war, diesem einfachen Gerät. Lichtmikroskope gehören nach wie vor zur Grundausrüstung der Zellbiologen [ALBERTS et al; 2001].

Mit dem konfokalen Mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM), schematisch angedeutet in Abb. 2, ist die Vermessung räumlicher Strukturen in der z-Achse mit hoher Auflösung möglich. Der Laser ist die Lichtquelle und beleuchtet ausschließlich Punkte in der Brennebene. Dies wird dadurch erreicht, dass ein Laserstrahl über die Bildebene tastet, die über die Mikroskopoptik auf die Brennebene fokussiert ist. Dabei ist lediglich ein dünner Streifen nahe der Brennebene hell beleuchtet. Außerhalb dieses Streifens fällt die Lichtintensität mit dem Quadrat der Entfernung von der Brennebene ab. So werden unscharfe Objekte außerhalb der Brennebene unterdrückt [JÄHNE; 2002].

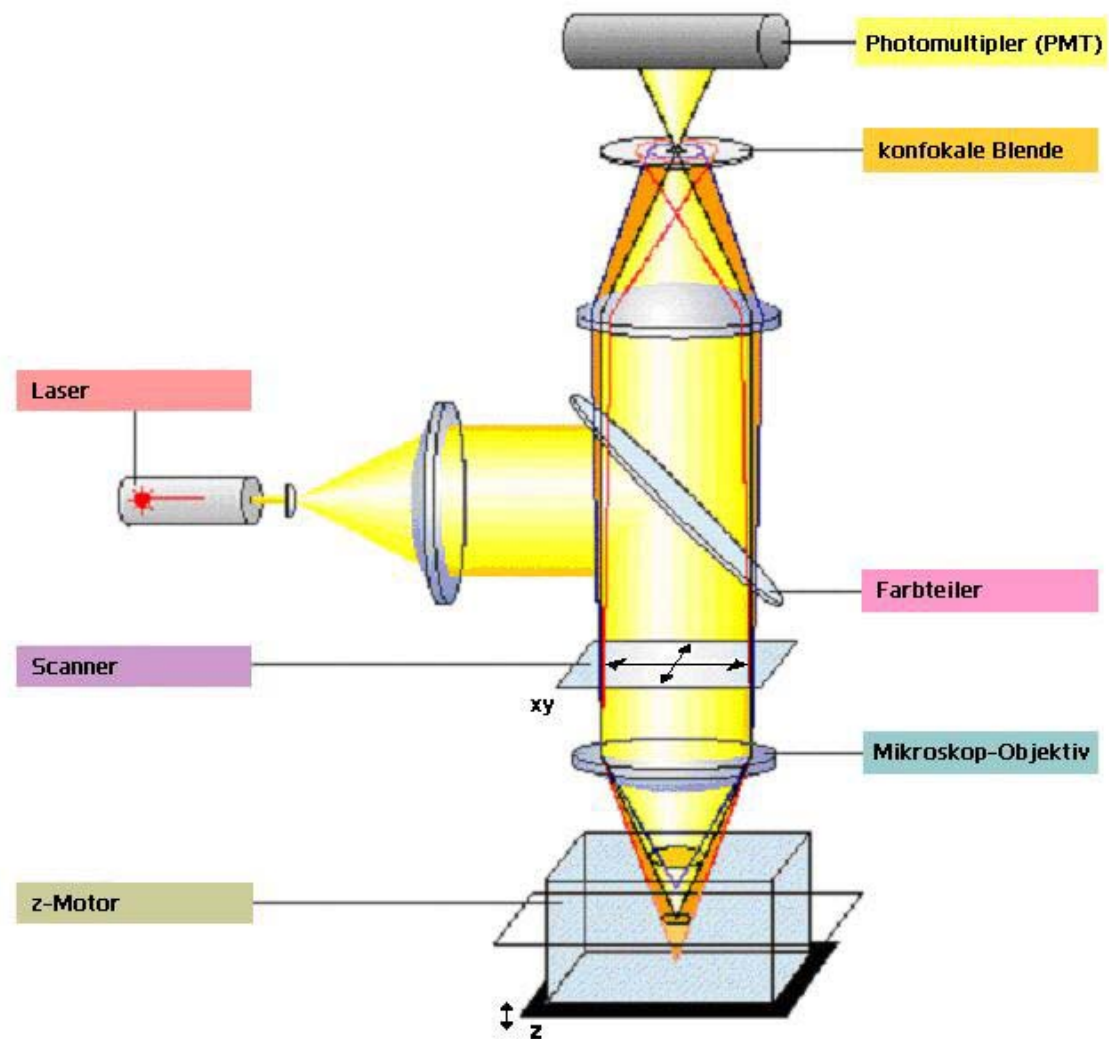


Abb. 2: Das konfokale Laser Scanning Mikroskop (schematische Darstellung) [ZEISS; 2002]

Eine Möglichkeit für den Nachweis und die Untersuchung bestimmter Objektdetails, wie hier die Lage und Struktur von Proteinen in Zellen, bietet die Fluoreszenzmikroskopie. Die endogenen Proteine werden mit Immunfluoreszenzmikroskopie in der Zelle sichtbar gemacht. Fluoreszenzfarbstoffe können im Fluoreszenzmikroskop mit Licht bestimmter Wellenlängen angeregt werden und strahlen dann Licht größerer Wellenlängen ab, das von einer digitalen Kamera aufgenommen wird.

3 Kantenextraktion

Um die Proteinaufnahmen genauer untersuchen und untereinander vergleichen zu können, wird ein Bezugspunkt in der Zelle benötigt. Die neben den Proteinaufnahmen erstellten Hellfeldbilder zeigen je nach Qualität deutlich den Zellkern.

Grundlage für die Ermittlung der Zellkernkante waren die Hellfeldaufnahmen, die einen bzw. mehrere Zellkerne zeigen. Hierbei entstanden Aufnahmen, die sich in Hinblick auf die Qualität stark unterscheiden (Abb. 3 bis 5).



Abb. 3: Gute Zellkernaufnahme am Beispiel von Vimentin



Abb. 4: Mittelmäßige Zellkernaufnahme am Beispiel von HSP70

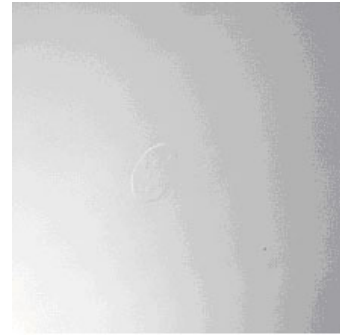


Abb. 5: Schlechte Zellkernaufnahme am Beispiel von HSP40

Die in Abb. 3 gezeigte Aufnahme repräsentiert eine optimale Bildqualität. Diese Tatsache wird auch dadurch verstärkt, dass nicht nur der Zellkern mit seinen Strukturen eindeutig erkennbar ist, sondern auch Strukturen außerhalb des Zellkerns im Cytoplasma wiedergegeben werden. Im Vergleich dazu wird der Zellkern in Abb. 4 nur noch schwach deutlich, wobei einzelne Strukturen kaum erkennbar sind. Der qualitativ schlechteste Fall liegt bei Abb. 5 vor, wo die Zellkernkante visuell nicht mehr eindeutig lokalisierbar und die Kantenerkennung kaum mehr möglich ist.

Wie die nachfolgenden Untersuchungen zeigen, treten in Hinblick auf die Kantenextraktion Probleme bereits bei den qualitativ besten Bildern auf. Von allen getesteten Programmen ergaben die Programmsysteme EDISON und HALCON die besten Resultate. Für die Bestimmung der Zellkernkante wurde im Folgenden das Programm EDISON verwendet, da bei HALCON kein allgemeingültiger Programmablauf realisiert werden konnte.

3.1 Kantenextraktion mit EDISON

Dieses Programm wurde freundlicherweise von der Rutgers State University of New Jersey im Internet zur Verfügung gestellt. EDISON steht für **E**dge **D**etection and **I**mage **S**egmenta**ti**ON System. Es handelt sich um ein Programm, das einerseits eine Kantenextraktion und andererseits eine Segmentierung durchführen kann [EDISON; 2002].

Trotz der qualitativen Unterschiede, deren Ursprung nicht rekonstruiert werden kann, wurde mit dem Programmsystem EDISON eine Kantenanalyse durchgeführt, deren Ergebnisbilder wie folgt aussehen:

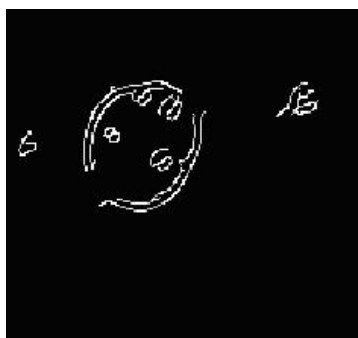


Abb. 6: Ergebnisbild von EDISON für die Vimentin-Aufnahme



Abb. 7: Ergebnisbild von EDISON für die HSP70-Aufnahme

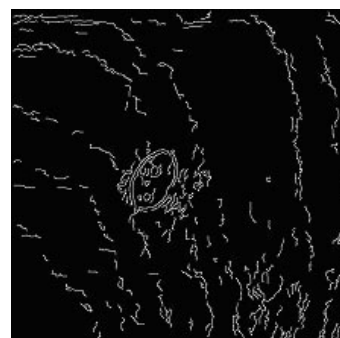


Abb. 8: Ergebnisbild von EDISON für die HSP40-Aufnahme

Die ursprüngliche Zielsetzung war, die vorliegenden Hellfeldaufnahmen möglichst automatisch zu bearbeiten und die Zellkernkante in allen auftretenden Fällen qualitativ bestmöglich zu lokalisieren. Selbst die besten Hellfeldaufnahmen ließen bald erkennen, dass eine ge-

geschlossene Zellkernkante mit EDISON nicht extrahiert werden kann. Es konnte aber ein Verfahren mit EDISON entwickelt werden, das durch wenige weitere Bearbeitungsschritte einen automatischen Programmablauf ermöglicht. Die daraus resultierenden Kantendateien sind somit die Basis für alle Modellansätze des selbstentwickelten Programms PROMEMORIA.

4 Merkmalsraum

Bezugnehmend auf die Extraktion der Zellkernkanten kann im Folgenden mit der Analyse der Proteinaufnahmen begonnen werden. Die Hauptaufgabe liegt hier in der Modellierung einzelner Merkmale, mit deren Hilfe eine Klassifizierung der Proteine möglich wird.

4.1 Merkmalsmodellierung und Parametrisierung

Im ersten Schritt werden nun die Organellen hinsichtlich ihrer Charakteristika analysiert. Wie bereits gezeigt (Tab. 1), weisen die meisten Organellen spezifische Eigenschaften auf, die z.T. in mathematische Modelle umgesetzt werden können.

Generell wurde zwischen dem Zellkerninnenraum und dem Cytoplasmabereich (Außenraum) unterschieden. Um die Zellkernfärbung zu charakterisieren, sind mehrere Methoden verfolgt worden. Die einfachste Parametrisierung besteht in der Bestimmung einer mittleren Zellkernfärbung. Hierfür werden alle Grauwerte der Pixel des Zellkerns gemittelt.

In Anlehnung an ein Histogramm erfolgte die zweite Parametrisierung durch eine Intervallbetrachtung der Grauwerte. Fünf konstante Grauwertintervalle wurden analysiert, wobei die Häufigkeit stets im Zusammenhang mit dem Grauwertmittel stand und somit keinen neuen unabhängigen Parameter darstellt. Um eine möglichst eindeutige Charakterisierung zu erhalten, wurde eine weitere Parametrisierung eingeführt. Für diese Analyse wurden alle Pixel, deren Grauwert größer als Null ist, als gefärbt betrachtet. Angefangen bei einem maximalen Grauwert von 255 (weiß) wurde die Menge aller gefärbten Zellkernpixel und der prozentuale Anteil auf alle möglichen Zellkernpixel bestimmt. Im Rahmen der Statistik sollte die Grenze, bei der eine 50%ige Zellkernfärbung ermittelt wird, als proteinspezifischer Parameter angesehen werden können.

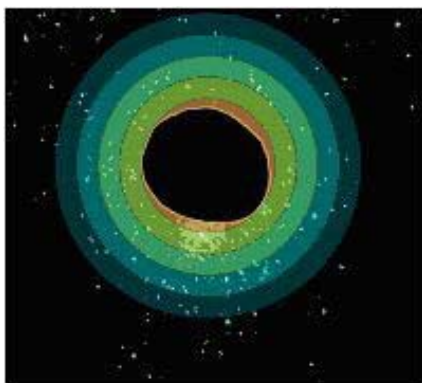


Abb. 9: Schalenmodell

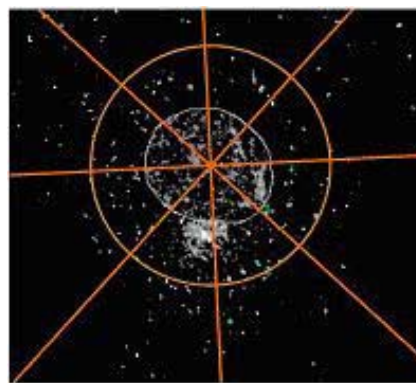


Abb. 10: Sektorendefinition

Neben dem Zellkerninnenraum wurden für den Außenraum der Zelle mehrere Modelle entwickelt. Geometrisch betrachtet wurde die Färbung in einem Schalenmodell untersucht, um ausgeprägte Strukturen rund um den Zellkern, wie z.B. das endoplasmatische Retikulum, zu lokalisieren. Dabei werden Schalen außerhalb des Zellkerns aufgebaut, die den Zellkernschwerpunkt als Mittelpunkt haben. Die Abb. 9 zeigt, dass die erste Schale je nach Zellkernform, z.T. eine unregelmäßige Innenkante hat, alle weiteren Schalengrenzen jedoch äquidistant sind. Wiederum werden Grauwertmittel bestimmt und fließen zusammen mit der prozentualen Färbung in die Berechnungen ein.

Ein weiteres, sektorielles Modell hingegen wurde mit den Zellkernachsen (kleinste und größte Entfernung vom Zellkernschwerpunkt zur Kante) kombiniert, so dass in Abhängigkeit von der Zellkernform spezielle lokale Objekte analysiert werden konnten. Die Sektoren, wie in Abb. 10 angedeutet, basieren auf der Nullrichtung, die entlang der kleinen Hauptachse verläuft. Die angesprochenen Unterschiede zwischen Fadenstrukturen und punktförmigen Objekten im Außenraum wurden mit einer Fadenberechnung modelliert, so dass diese Parameter ebenfalls für die Klassifizierung zur Verfügung stehen. Deutlicher Vorteil dieser Methode ist die unabhängige Kontrolle der Lage des Golgi-Apparates, die es erlaubt, in einer ggf. zweiten Iteration die Golgi-Betrachtungen zu wiederholen. Untersucht werden in diesem Modell die Färbungen in Prozent, die sich wiederum aus der Anzahl der tatsächlich gefärbten und maximal möglichen Proteinpunkte ergeben. Aus diesen Modellen resultieren die in der Tab. 2 zusammengefassten, verwendeten Parameter.

Modell	Parameter	Anz
Zellkern	Grauwertmittel, Färbung in %, 50%ige Färbung	3
Golgi	Grauwertmittel	1
Sektoren	Intervallbetrachtung der Färbung (0-20%, 20-80% & 80-100%)	3
Außenraum	Grauwertmittel, Färbung in %	2
Fäden/Punkte	ursprüngliche Anzahl, Anzahl (Länge über 5 Pixel), Anzahl Fäden	3
		12

Tab. 2: Alle 12 verwendeten Parameter

4.2 Klassifizierungsverfahren

Aus der Fernerkundung sind bereits mehrere Klassifizierungsverfahren bekannt, die auch in diesem Projekt angewendet werden können. Betrachtet man die einzelnen Merkmale bzw. die mathematischen Modellierungen und Parameterbestimmungen, stellt man fest, dass sich insbesondere das Quaderverfahren für die Klassifizierung anbietet. Auch die schnelle Umsetzung in dem selbstentwickelten Programm PROMEMORIA begünstigte die Entscheidung für dieses Verfahren.

Das allgemeingültige Quaderverfahren basiert auf n Merkmalsachsen und somit auf einem n -dimensionalen Merkmalsraum. Hierbei werden auf den Merkmalsachsen klassenspezifische Intervalle definiert, die im Merkmalsraum die eindeutige Lage jeder Objektklasse realisieren.

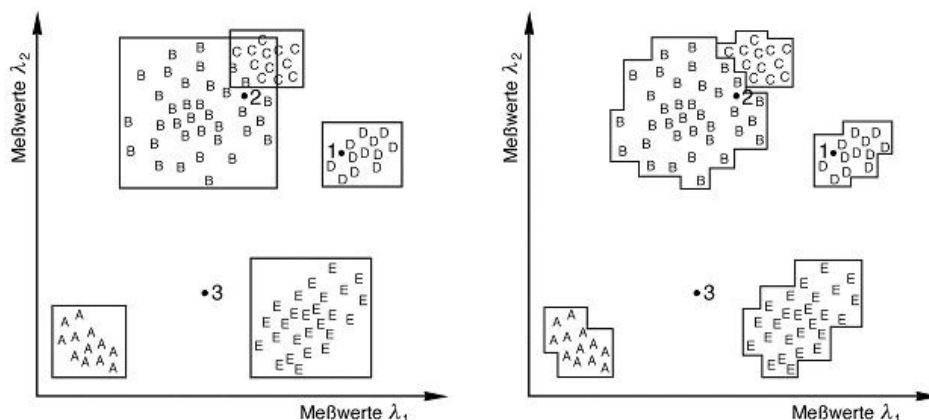


Abb. 11: Quaderverfahren [ALBERTZ; 2001]

Die folgenden Betrachtungen zur Zellkernanalyse sollen das angewendete, modifizierte Quaderverfahren erläutern. Sie können auf die übrigen Modelle übertragen werden. Die für diese Arbeit zur Verfügung stehende Datenbasis führte bei einer Analyse des Zellkerns zu der in Abb. 12 dargestellten graphischen Verteilung.

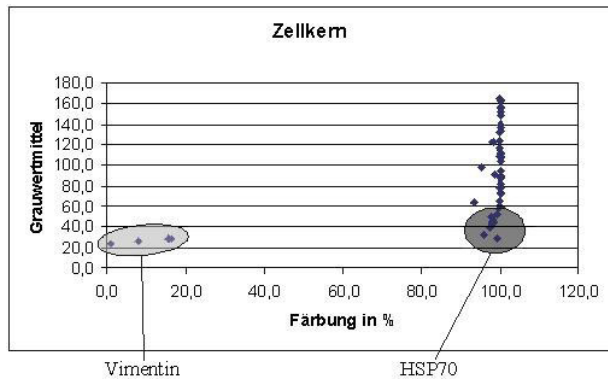


Abb. 12: Diagramm der Zellkernfärbung

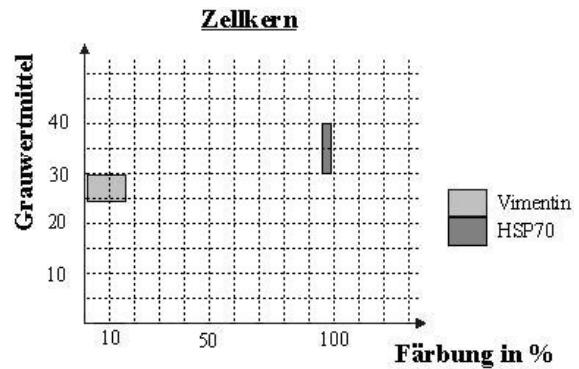


Abb. 13: Merkmalsraum zur Zellkernfärbung

Mit Hilfe der Parameter *Färbung in %* und *Grauwertmittel* können die Proteine Vimentin und HSP70 eindeutig klassifiziert werden. Für beide Proteine konnten Quader definiert werden, die eine Unterscheidung ermöglichen.

Neben der Analyse des Zellkerns, die den ersten Unterraum (Abb. 13) aus den Parametern in Tab. 2 bildet, resultieren aus der Merkmalsmodellierung weitere fünf Unterräume, die sog. Unterscheidungskriterien. Es können daher maximal sechs Kriterien erfüllt sein. Wie man in Abb. 13 erkennen kann, sind keine Quader für die restlichen Proteine definiert worden. Daraus ergibt sich, dass in diesem Fall nur für die beiden Proteine Vimentin und HSP70 eine positive Entscheidung eintreten kann.

Die maximale Anzahl an Unterscheidungskriterien für jedes Protein ergibt sich wie folgt:

Vimentin:	max. 6 Ja-Entscheidungen
HD1:	max. 3 Ja-Entscheidungen
HSP40:	max. 4 Ja-Entscheidungen
HSP70:	max. 2 Ja-Entscheidungen
BARD:	max. 2 Ja-Entscheidungen
4C8:	max. 2 Ja-Entscheidungen
CAG:	max. 2 Ja-Entscheidungen
GIT:	max. 4 Ja-Entscheidungen

Im Falle von Vimentin können alle sechs Unterscheidungskriterien positiv entschieden werden, wohingegen für das Protein BARD z.B. nur zwei Kriterien positiv erfüllt sein können. Die eigentliche Entscheidung, um welches aktuell vorliegende Protein es sich handelt, wird getroffen, indem prozentual berechnet wird, für welches Protein die meisten Ja-Entscheidungen vorliegen. Liegen für ein Protein 2 HD1-Kriterien vor (66%) und nur 1 BARD-Entscheidung (50%), fällt die Entscheidung auf HD1.

4.3 Klassifizierungsergebnisse

Auf Grundlage der Merkmalsmodelle und ihrer Parametrisierung bzw. des ausgewählten Klassifizierungsverfahrens erfolgte mit Hilfe von 47 Aufnahmen ein Klassifizierungstraining. Ziel dieses Trainings war die Optimierung des Klassifizierungsverfahrens und die Bestimmung von möglichst eindeutigen Unterscheidungskriterien.

In der Tab. 3 werden die Klassifizierungsergebnisse zusammengestellt und im Folgenden kurz erläutert:

Die Spalten zwei bis neun der Tabelle sind je einem Protein zugeordnet. In diesen Spalten sind die Ergebnisse der Merkmalsuntersuchung für das jeweilige Protein angegeben.

Protein / Antikörper	Vimentin 6	HSP70 2	HSP40 4	BARD 2	HD1 3	4C8 2	CAG 2	GIT 4
Vimentin								1
Vimentin	4							
Vimentin	4							
Vimentin	4							
Vimentin	4							
HSP70		2			1			
HSP70		2			1	1		
HSP70	1	1						
HSP40			3					1
HSP40			4					
HSP40			3					
BARD	1		1	2				
BARD			1	2				
BARD			1	2				
BARD			2	2				
HD1			1	1	1			
HD1	1			1	2			
HD1	1			1	2			
HD1				1	2			
HD1				1	3			
HD1				1	3			
HD1				1	1		1	
HD1				1	3			

Protein / Antikörper	Vimentin 6	HSP70 2	HSP40 4	BARD 2	HD1 3	4C8 2	CAG 2	GIT 4
4C8				1	1	1		
4C8			1		1	2		1
4C8			1			2		1
4C8	1					2		
4C8			1			2		1
4C8			3					
4C8			1	1		1		
4C8			2			1		
4C8				1		1		
4C8	1			1		2		
4C8					1			
4C8	1		1			2		
4C8				1		1		1
4C8				1		1		1
4C8				1		1		1
4C8				1		2		2
CAG	1						2	
CAG	1						2	
CAG								
GIT					1			4
GIT						1		3
GIT			1			1		3
GIT			1			1		1

Tab. 3: Klassifizierungsergebnisse

Es muss darauf hingewiesen werden, dass z.T. mehrere Zellen aus einer Aufnahme entnommen worden sind, was durch eine grau/weiß Markierung in der Tabelle veranschaulicht wird. Deutlich wird, dass die Grunddaten keine statistische Sicherheit garantieren.

Untersucht man die Proteinbilder, die in der ersten Spalte stehen, ergeben sich im Einzelnen folgende Resultate: Für das Protein Vimentin konnten fünf Bilder, die aus ursprünglich zwei Aufnahmen stammen, getestet werden. Das erste Bild wurde über ein Merkmal fälschlicher Weise dem Protein GIT zugeordnet. In diesem Fall wird das Protein dunkelgrau markiert. Bei den restlichen Aufnahmen wurden stets vier Vimentin-typische Merkmale erkannt und eine dementsprechende Zugehörigkeit festgestellt (mittelgraue Markierung).

Trotz einiger Fremdmerkmale wurden die Aufnahmen der Proteine HSP70, HSP40 und BARD korrekt klassifiziert.

Beim Protein Huntingtin muss zwischen den Antikörpern differenziert werden. Das vom Antikörper HD1 erkannte Huntingtin ist in zwei Fällen falsch, in den anderen sechs Fällen jedoch richtig zugeordnet worden. Von Huntingtin, das durch 4C8 markiert wurde, konnten die meisten Zellen getestet werden. Diese Vielzahl an Aufnahmen wurde aus Kolorisationen mit den unterschiedlichsten Proteinen gewonnen. Bei diesem Protein streute die Zuordnung, d.h. von insgesamt 17 Aufnahmen sind acht richtig, drei falsch klassifiziert worden, wobei die restlichen sechs Bilder, hellgrau markiert, als nicht klassifiziert einzustufen sind. Dieser Fall tritt genau dann ein, wenn gleich viele Unterscheidungskriterien mit Ja beantwortet wurden und die möglichen Proteinklassen die gleiche Kriterienanzahl besitzen. Die Ähnlichkeit mit dem Protein BARD, das ebenfalls über zwei Merkmale klassifiziert werden kann, ist Ursache für das Scheitern der Klassifizierung.

Wie beim nächsten Protein (Huntingtin (CAG)) deutlich wird, können im Extremfall Aufnahmen ohne jegliche Merkmalidentifikation überhaupt nicht zugeordnet werden.

Das letzte Protein GIT ist in drei Bildern richtig und in einem Bild falsch zugeordnet worden.

5 Ausblick

Die Parametrisierung von Proteinmerkmalen lieferte die Voraussetzung für eine Klassifizierung mittels modifiziertem Quaderverfahren. Das selbst erzeugte Programm PROMEMORIA ist in der Lage, eine neue Aufnahme mit acht bereits modellierten Proteinen zu vergleichen und ggf. eine Zuordnung zu treffen. Hier muss darauf hingewiesen werden, dass einerseits die Ausgangsdatenmenge durch die Auswahl von acht Proteinen gering gehalten wurde. Andererseits

rerseits ist das verwendete modifizierte Quaderverfahren ein relativ simples Klassifizierungsverfahren; es wird in Zukunft durch besser geeignete Klassifizierungsansätze ersetzt. Wenn man berücksichtigt, dass dieses Programm eine Vorstufe darstellt, sind diese beiden Aspekte ausreichend, um zu zeigen, dass die prinzipielle Klassifizierungsmethode funktioniert. Im nächsten Schritt kann dann die Basisdatenmenge, d.h. die Auswahl der Proteine vergrößert werden.

Zwar konnten die meisten Proteine korrekt zugeordnet werden, dennoch gibt es Methoden, die mehr Erfolg versprechen. Eine Lösung liegt in der Anwendung von Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen. Mit Hilfe dieser Funktionen können durch aussagekräftigere prozentuale Wahrscheinlichkeiten nicht nur für einige, sondern für alle Proteinklassen die Ja/Nein-Entscheidungen des modifizierten Quaderverfahrens ersetzt werden. Die damit einhergehende Mehrdimensionalität des Merkmalsraums wird berücksichtigt und genauere Ergebnisse erzeugt.

Darüber hinaus ist die Anzahl der Ausgangsbilder zu gering. Die im Augenblick zur Verfügung stehende Menge an Proteinaufnahmen sollte erhöht werden, um statistisch sichere Auswertungen zu garantieren.

Zudem ist es möglich, einen Antikörper zur Färbung der Zellkernmembran zu verwenden. Diese sogenannte Laminfärbung wird die Extraktion der Zellkernkante vereinfachen und bietet bei gleichbleibender Qualität eine bessere Automatisierbarkeit.

6 Literaturverzeichnis

- ALBERTS, BRUCE; BRAY, DENNIS; JOHNSON, ALEXANDER; LEWIS, JULIAN; RAFF, MARTIN; ROBERTS, KEITH; WALTER, PETER; 2001: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 2. korrigierte Auflage, Übersetzung von Martina Börsch-Supan (Koordination), WILEY-VCH Verlag, Weinheim
- ALBERTZ, JÖRG; 2001: Einführung in die Fernerkundung, 2. Auflage, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt
- EDISON; 2002: Edge Detection and Image SegmentatiON, Bogdan Georgescu, Chris Christoudias (freeware), Center for Advanced Information Processing (CAIP), Rutgers State University of New Jersey,
Internet: <http://www.caip.rutgers.edu/riul/research/code/EDISON>
Hilfdateien: <http://www.caip.rutgers.edu/riul/research/code/EDISON/doc/help.html>
- HALCON; 2002: HALCON Version 6.1, HALCON/C++ Referenzhandbuch, MVTec Software GmbH; München, Internet: <http://www.mvtec.com>
- HALCON; 2002: HALCON Version 6.1, Getting Started with HALCON, User's Manual, MVTec Software GmbH; München, Internet: <http://www.mvtec.com>
- JÄHNE, BERND; 2002: Digitale Bildverarbeitung, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin
- ZEISS; 2002: Das konfokale Laser Scanning Mikroskop im Überblick, Broschüre: Konfokales Prinzip, Firma Zeiss, Internet:
[http://www.zeiss.de/C12567BE00472A5C/EmbedTitelIntern/KonfokalesPrinzipd/\\$File/Konfokales_Prinzip.pdf](http://www.zeiss.de/C12567BE00472A5C/EmbedTitelIntern/KonfokalesPrinzipd/$File/Konfokales_Prinzip.pdf)
- ZEISS; 2002: LSM 510 QuickStart Manual, Broschüre, Firma Zeiss, Internet:
http://www.cbit.uchc.edu/home_pages_nv/LSM_510_Training.pdf
- ZEISS; 2002: Image Browser, Firma Zeiss, Internet:
<http://www.zeiss.de/de/micro/home.nsf/InhaltFrameDHTML/7F3C15790A8CEBB0C12567c1004B7861>