

**9. Workshop  
Automatisierungstechnische  
Verfahren für die Medizin vom  
29. bis 30. Oktober 2010 in  
Zürich**



**„Automatisierung des Hochdurchsatz-Screenings von  
Zebrafischlarven“**

Christian Pylatiuk, Bertram Ziegner, Alexander Pfriem, Rüdiger Alshut, Markus Reischl,  
Stefan Schulz, Georg Bretthauer  
Institut für Angewandte Informatik, KIT, Karlsruhe, Deutschland  
E-Mail: pylatiuk@kit.edu

Sebastian Hötzel, Urban Liebel  
Institut für Toxikologie und Genetik, KIT, Karlsruhe, Deutschland

Copyright: VDI Verlag GmbH  
Band: Fortschritt-Bericht VDI Reihe 17 Nr. 279 „Automatisierungstechnische  
Verfahren für die Medizin, 9. Workshop, Tagungsband“  
Editors: Robert Riener, Heike Vallery, Serge Pfeifer  
ISBN: 978-3-18-327917-3  
Pages: 13-14

# Automatisierung des Hochdurchsatz-Screenings von Zebrafischlarven

Christian Pylatiuk<sup>1</sup>, Bertram Ziegner<sup>1</sup>, Alexander Pfriem<sup>1</sup>, Rüdiger Alshut<sup>1</sup>, Sebastian Hötzel<sup>2</sup>, Markus Reischl<sup>1</sup>, Urban Liebel<sup>2</sup>, Stefan Schulz<sup>1</sup>, Georg Bretthauer<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Institut für Angewandte Informatik, KIT, Karlsruhe, Deutschland

<sup>2</sup>Institut für Toxikologie und Genetik, KIT, Karlsruhe, Deutschland

Kontakt: pylatiuk@kit.edu

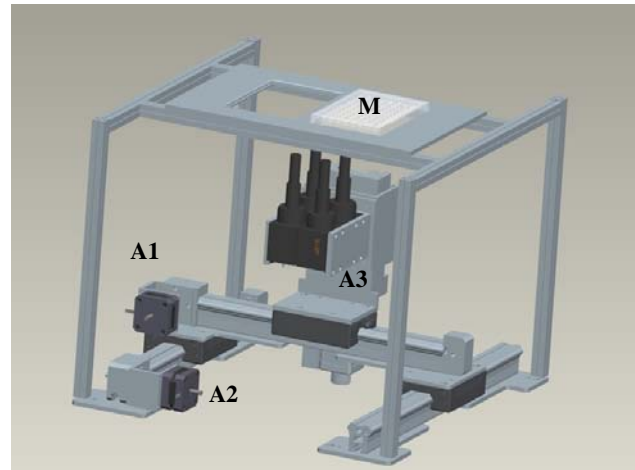
## Einleitung

In den letzten Jahren etablierten sich Larven des Zebrafischbärblings *danio rerio* als Modellorganismus für das Verständnis der Embryonalentwicklung und von Zellbiologischen Prozessen. Außerdem werden Zebrafischlarven zunehmend als Alternative zu Tierversuchen an Säugetieren für Toxizitäts-Bestimmungen eingesetzt [1,2]. Hierfür ist ein hoher Durchsatz erforderlich, um bei >60.000 Molekülen in unterschiedlicher Konzentration die Toxizität auf biologische Organismen zu ermitteln, wie es die Europäische REACH Verordnung vorschreibt [3]. Die Handhabung und Analyse der Fischlarven erfordert, mangels verfügbarer und geeigneter Automatisierungstechnik, bislang einen erheblichen manuellen sowie zeitlichen Aufwand. Die einzelnen Arbeitsschritte (Sortieren, Pipettieren in Mikrotiterplatten, Mikroskopieren, Bildanalyse) sind monoton und damit fehleranfällig. Automatisierte und überwachte Prozesse sind erforderlich und können eine reproduzierbare Qualität gewährleisten.

## Methoden und Materialien

### Parallel-Mikroskopie-System

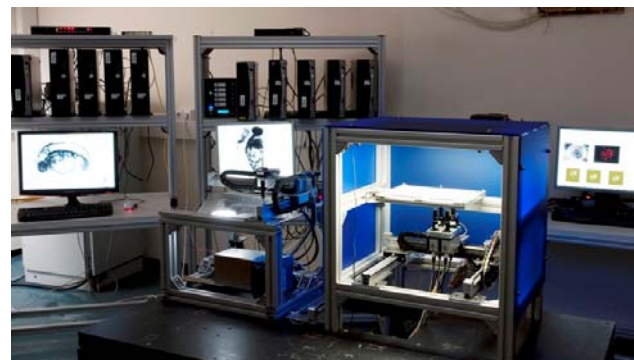
Damit mehrere Tausend Zebrafischlarven im gleichen Entwicklungsstadium; also innerhalb von 180 min. mikroskopiert werden können wurde ein Mikroskopie-System entwickelt, bei dem vier Industriekameras (uEYE UI-5480SE-C-HQ von IDS, Obersulm) in einer 2x2 Matrixform angeordnet (Abb. 1) wurden. Jede Kamera nimmt ein Viertel der Mikrotiterplatte auf, die insgesamt 96 oder 384 Zebrafischlarven in Einzelkammern beinhaltet. Die Kameras werden von einem 3-Achs-Linearroboter geführt, wobei eine Positioniergenauigkeit von < 0,03mm erzielt wird. Jede Kamera ist über Gigabit Ethernet mit einem eigenen Quadcore-CPU PC verbunden. Sowohl die Kamerasteuerung als auch die Robotersteuerung erfolgt über LabView™ Software (National Instruments). Die PCs verfügen über 2 lokale Festplatten, sodass abwechselnd Bilddaten lokal gespeichert und gleichzeitig Daten an einen Server übertragen werden können. Das Datenmanagement erfolgt ebenfalls mittels LabView™ Software. Im Gegensatz zu kommerziellen, halbautomatisierten Systemen (wie z.B. dem Olympus Scan^R) werden hier die Kameras bewegt und nicht das Objekt. Diese Lösung bietet den Vorteil, dass sich die Position der Fischlarven z.B. bei Sequenzaufnahmen nicht verändert.



**Abb. 1:** CAD-Modell des Parallel-Mikroskopie-Systems mit drei Linearaktoren (A1-3), vier Kameras (C) und einer Mikrotiterplatte (M).

### Fischei-Sortier-System

In einer Petrischale wahllos verteilte Fischeier sollen in Standard 96er oder 384er Mikrotiterplatten derart einsortiert werden, dass jede Kammer genau ein Fischei enthält. Mittels Bildanalyse werden die Koordinaten der Fischeier detektiert. Ein 3-Achs-Linearroboter führt danach eine Saugspitze an die jeweilige Position eines erkannten Eis und saugt bis zu 16 Eier seriell in einen Schlauch. Anschließend werden die Eier vereinzelt in die Wells abgegeben. Das System ist in Abb. 2 dargestellt. Ziel ist es befruchtete Fischeier zu erkennen und von Kot, Futterresten und koagulierten Eiern unterscheiden zu können (Abb.3). Die Bildanalyse und die Robotersteuerung erfolgen unter LabView™.



**Abb. 2:** PCs zur Datenspeicherung und Bildanalyse (links), Fischei-Sortier-System (mitte) und Parallel-Mikroskopie-System (rechts).

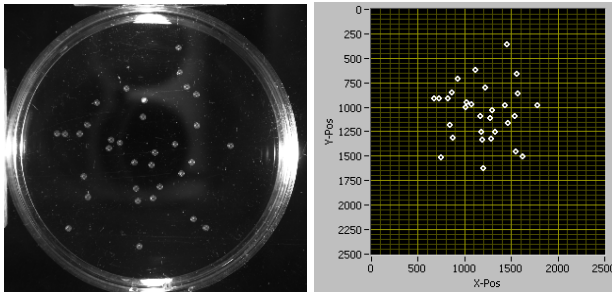


Abb. 3: Links: Fischeier in einer Petrischale.  
Rechts: Positionen erkannter Fischeier.

### Bildanalyse System

Beide Systeme (Parallel-Mikroskopie und Fischei-Sortierer) sind gekoppelt mit einer automatisierten Bilderkennung. Die gefundenen, extrahierten Merkmale für die Klassifikation unterscheiden sich je nach Entwicklungsstadium des Fischeis erheblich [4]. In Abb. 4 ist exemplarisch das Verfahren für die Vorverarbeitung der Bildanalyse eines Fischeis im Segmentations-Entwicklungsstadium (ca. 24 h nach der Befruchtung) dargestellt. Die mikroskopische Analyse von Organen erfordert Aufnahmen mit einer größeren als der durch die numerischen Apertur des Objektivs vorgegebenen Schärfentiefe. Durch das zusammenfügen einzelner Schichtaufnahmen mit einem MatLab Algorithmus können Aufnahmen mit extendiertem Fokus erzielt werden [4].

Zur Anwendung eines Klassifikators werden bei der Merkmalsextraktion charakteristische Zahlenwerte aus den Bildern errechnet, die eine möglichst signifikante Klassenunterscheidung ermöglichen. Die Anwendung statistischer Methoden, in diesem Fall die Multivariate Analyse und der Bayes-Klassifikator, ermöglicht die automatisierte Klassenzuweisung anhand der extrahierten Merkmalswerte und damit die automatisierte Auswertung der Mikroskopaufnahmen (vgl. Abb. 5)

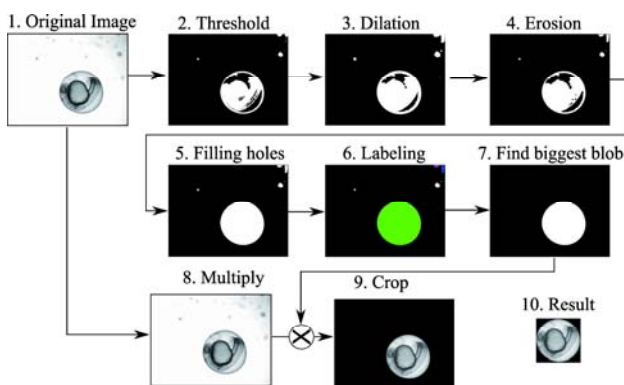


Abb. 4: Schritte der Bild-Vorverarbeitung gemäß [4].

### Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Für das Einsortieren einer Mikrotiterplatte mit 96 Eiern, benötigt der Fischei-Sortierer 12 Minuten; d.h. 7,5 s. pro Fischei. Das entspricht der Zeit, die eine technische Assis-

tentin dafür benötigt. Ebenso werden durch das automatisierte Sortieren nicht mehr Fischeier oder Larven geschädigt, als durch manuelles. Die Fehlerrate (definiert als jede Kammer enthält genau 1 Ei) ist mit 5-10 % in etwa vergleichbar. Durch Parallelisierung mittels mehrerer Roboter kann zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt eine große Anzahl an Fischembryonen bereit gestellt werden. Mit den entwickelten Methoden zur Bildanalyse konnten Klassifikationsraten von 99.5% für die korrekte Erkennung von koagulierten Fischeiern im Segmentations-Entwicklungsstadium demonstriert werden [4]. Dies ermöglicht die technischen Voraussetzungen eines Hochdurchsatz-Screenings von Zebrafischlarven, wie es beispielsweise für Toxizitäts-Bestimmungen erforderlich ist [1,5,6]. Das Laborpersonal kann von monotonen (und damit fehleranfälligen) Aufgaben entlastet werden.

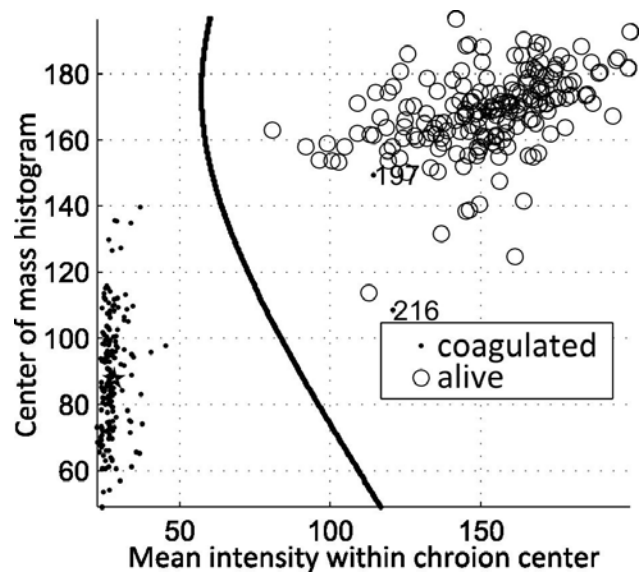


Abb. 5: Automatisierte Klassenzuweisung.

### Literatur

- [1] Yang, L.; Ho, N.Y.; Alshut, R.; Legradia, J.; Weiss, C.; Reischl, M.; Mikut, R.; Liebel, U.; Müller, F.; Strähle, U.: Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. In: *Reproductive Toxicology* 28(2):245-253, 2009.
- [2] Zon, L.; Peterson, I.: In vivo drug discovery in the zebrafish. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 4(1):35-44, 2005.
- [3] Hartung, T.; Rovida, C.: Chemical regulators have overreached. In: *Nature* 460:1080-1081, 2009.
- [4] Alshut, R.; Legradi, J.; Yang, L.; Strähle, U.; Mikut, R.; Reischl, M.: Robust Identification of Coagulated Zebrafish Eggs using Image Processing and Classification Techniques. In: *Proc. of the 19th GMA-FA 5.14 "Computational Intelligence" Workshop*, Dortmund, Germany, Dec. 2-4 2009.
- [5] Liebel, U. et al: A microscope-based screening platform for large-scale functional protein analysis in intact cells. In: *FEBS Letters* 554(3):394-398, 2003.
- [6] Gehrig, J.; Reischl, M.; Kalmár, É.; Ferg, M.; Hadzhiev, Y.; Zaucker, A.; Song, C.; Schindler, S.; Liebel, U. & Müller, F.: Automated high-throughput mapping of promoter-enhancer interactions in zebrafish embryos. In: *Nature Methods* 6, 911-916, 2009.