

# INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen

Gesamtfakultät

der Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Phys. Matthias Gebhard

aus Ravensburg

Tag der mündl. Prüfung: 28.01.2004



Multidimensionale Segmentierung  
in Bildfolgen und  
Quantifizierung dynamischer  
Prozesse

Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Jähne

Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer



# Zusammenfassung

Im Rahmen dieser interdisziplinären Arbeit habe ich Methoden der Bildverarbeitung entwickelt, um reproduzierbare, quantitative Aussagen über dynamische Phänomene zu ermöglichen. Der Anwendungsschwerpunkt liegt im Bereich von Biologie und Medizin. Die verarbeiteten Daten stammen aus konfokalen Mikroskopaufnahmen, die biologischen Strukturen wurden mit fluoreszierenden Markern gefärbt. Aufgrund eines schlechten Signal-zu-Rausch Verhältnisses mußte ich robuste Verfahren entwickelt. Geeignete Vorverarbeitungsschritte waren nötig um die Qualität der Bilder zu erhöhen. Ich entwickelte ein Verfahren, um sowohl 2D- als auch 3D-Objekte mit aktiven Konturen in Bildern zu segmentieren. Dabei konnte ich in 2D zeigen, daß der Bereich der Attraktion der aktiven *B-spline* Kontur durch ein spezielles externes Kräftefeld erhöht werden konnte. Dies stellt einen Vorteil gegenüber den bisherigen parametrischen aktiven Konturen dar, besonders dann, wenn die Initialkurve weit von dem zu segmentierenden Objekt gelegt wird. In 3D wurde von mir eine Methode vorgestellt, um mehrere Objekte separat zu segmentieren. Hier setzte ich für diesen Spezialfall der Zellteilung einen Clusteralgorithmus ein, um zuvor extrahierte Kanteneckenpunkte den Objekten zuzuordnen. Damit konnte ich die Volumen- und Oberflächenveränderung quantifizieren. Um segmentierte Objekte in beliebigen Dimensionen über die Zeit zu verfolgen, wurde von mir ein *Particle-Tracking* Algorithmus auf der Grundlage einer Fuzzy-Entscheidungslogik entwickelt. Eine Reihe von Anwendungen aus der biologischen Grundlagenforschung veranschaulichen die Wirkungsweise der entwickelten Methoden.

## Abstract

In this interdisciplinary work I developed digital image processing methods for quantitative analysis of dynamics. The applications focused on biology and medicine. Confocal microscopes can resolve biological structures by the use of fluorescent markers. Due to a low signal to noise ratio the processing of noise reduction techniques was an important task. I developed a segmentation method in 2D and 3D based on deformable models. In 2D, I was able to show that the attraction range of the active B-spline contour could be increased in combination with a special external field. This improvement to the classical parametric active contour is especially important when the initialization of the curve is far beyond the object. In 3D, I introduced a method for simultaneously segmenting multiple objects in one image and adapted this approach to the special case of cell division. A cluster algorithm was applied to assign the extracted edge points to the different objects. With these methods, I was able to quantify the volume and area expansion of the membrane over time. To track multiple segmented objects over time, I have developed a particle-tracking algorithm, based on a Fuzzy decision kernel. Several applications show the benefit of the developed methods.



Diese Arbeit wurde in der Abteilung Theoretische Bioinformatik am  
Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg unter der  
Betreuung von Dr. Roland Eils durchgeführt.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>I</b>	<b>Grundlagen der Physik und Biologie</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Physikalische Grundlagen</b>	<b>9</b>
2.1	Das optische Auflösungsvermögen . . . . .	9
2.2	Laser . . . . .	11
2.3	Fluoreszenz . . . . .	11
2.4	Das konfokale Prinzip . . . . .	12
2.5	Die Punkt-Abbildungs-Funktion . . . . .	13
2.6	Lichtmikroskopie . . . . .	15
2.6.1	Hell- und Dunkelfeld Mikroskopie . . . . .	15
2.6.2	Phasenkontrast Mikroskopie . . . . .	15
2.6.3	Interferenzkontrast Mikroskopie . . . . .	16
2.6.4	Fluoreszenz Mikroskopie . . . . .	16
2.6.5	Konfokale <i>laser scanning</i> Mikroskopie . . . . .	19
2.6.6	Micro-CT Mikroskopie . . . . .	20
2.7	Diffusion . . . . .	23
2.7.1	Die Diffusionskonstante . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Biologische Grundlagen</b>	<b>25</b>
3.1	Proteine und Markerproteine . . . . .	25
3.1.1	GFP und deren spektrale Varianten . . . . .	26
3.1.2	ATP . . . . .	27
3.2	Die Zellteilung . . . . .	27
3.2.1	Die Stadien der Zellteilung . . . . .	27
<b>II</b>	<b>Spezielle Methoden der Bildverarbeitung</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>Bildvorverarbeitung</b>	<b>33</b>
4.1	Abtasttheorem . . . . .	33
4.2	Morphologische Filter . . . . .	34

4.3	Glättungsfilter und deren Anwendung . . . . .	37
4.3.1	Rechteckfilter . . . . .	37
4.3.2	Binomialfilter . . . . .	38
4.3.3	Die anisotrope Diffusion . . . . .	40
4.4	Regionenwachstum als <i>Labelling</i> der Objekte . . . . .	41
<b>5</b>	<b>Registrierung</b>	<b>43</b>
5.1	Rigide Transformation . . . . .	43
5.2	Nicht-rigide Transformation . . . . .	45
5.2.1	Streckungen . . . . .	45
5.2.2	Affine Transformation . . . . .	46
<b>6</b>	<b>Segmentierung</b>	<b>47</b>
6.1	Kantenbasierte Segmentierung . . . . .	47
6.2	Pyramidenstrukturen . . . . .	48
6.2.1	Die Gauß- und Laplacepyramide . . . . .	49
6.2.2	Pyramid Linking . . . . .	50
<b>7</b>	<b>Aktive Modelle</b>	<b>53</b>
7.1	Definitionen von <i>B-spline</i> Kurven . . . . .	56
7.2	Definitionen von NURBS Flächen . . . . .	58
7.3	Klassifikation von mehreren Objekten im Bild . . . . .	58
7.3.1	<i>Fuzzy c-mean Clustering</i> . . . . .	59
7.4	Externe Kräftefelder . . . . .	60
7.4.1	Multiskalare Gauß-Potentialkräfte . . . . .	60
7.4.2	Druckkräfte . . . . .	60
7.4.3	Distanz Potentialkräfte . . . . .	61
7.4.4	Gradienten Vektor-Fluß . . . . .	61
7.5	Evolution der Kontur bzw. Oberfläche . . . . .	62
7.5.1	Evolution der <i>B-spline</i> Kontur . . . . .	62
7.6	Fourierdeskriptoren . . . . .	63
<b>8</b>	<b>Multidimensionales <i>Tracking</i></b>	<b>65</b>
8.1	Die Kontinuität des optischen Flusses . . . . .	65
8.2	Korrespondenzproblem . . . . .	69
8.3	<i>Two-Frame Particle-Tracking</i> . . . . .	71
8.3.1	Unterschiedliche <i>Tracking</i> -Ansätze . . . . .	72
8.3.2	Implementierung . . . . .	74
<b>9</b>	<b>3D-Segmentierung mit NURBS</b>	<b>77</b>
9.1	Bildvorverarbeitung . . . . .	78
9.2	Klassifikation der Kantenpunkte . . . . .	79
9.3	NURBS Oberflächen . . . . .	79
9.4	Fitten der Oberflächen . . . . .	80

<b>10 Aktive Konturen in 2D</b>	<b>83</b>
10.1 Gradienten Vektor-Fluß in der Anwendung . . . . .	86
10.2 Evolution der <i>snake</i> und Kontrollpunkt-Modifikation . .	87
10.3 Evolution der <i>snake spline</i> und der <i>polygon snake</i> . . . .	90
10.4 Anwendungen in der Zellbiologie . . . . .	90
<b>III Anwendungen</b>	<b>93</b>
<b>11 Micro-strukturelle Untersuchungen</b>	<b>95</b>
11.1 Vorangegangene Arbeiten . . . . .	96
11.2 Quantitative Ergebnisse und Diskussion . . . . .	98
<b>12 Quantitative Analyse von PML-Kompartimenten</b>	<b>103</b>
12.1 Experiment und biologische Fragestellung . . . . .	103
12.2 Methoden für die Quantifizierung . . . . .	104
12.3 Ergebnisse . . . . .	105
<b>13 Quantitative 4D-Bildfolgenanalyse in lebenden Zellen</b>	<b>109</b>
13.1 Experiment und biologische Fragestellung . . . . .	109
13.2 Methoden für die Quantifizierung . . . . .	110
13.3 Ergebnisse . . . . .	111
<b>14 Diskussion</b>	<b>115</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>119</b>
<b>Index</b>	<b>120</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>121</b>
<b>Danksagung</b>	<b>135</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

Mit der Entwicklung des Mikroskops und geeigneten optischen Elementen wurde in den ersten Jahrzehnten des 17. Jahrhunderts das Studium von Objekten möglich, die mit bloßem Auge nicht mehr zu erkennen sind. Großes Interesse galt – und gilt bis heute noch – der Erforschung von Krankheitserregern, z.B. Viren oder Bakterien. Man wollte ihre Struktur und Aktivität analysieren. Im Laufe der Zeit hat sich die Auflösungsgrenze des Mikroskops um mehrere Größenordnungen verbessert, so daß man mittlerweile in der Lage ist, einzelne Proteine zu untersuchen. Dadurch konnte die Funktion der Zelle systematisch untersucht werden; z.B. konnten Wechselwirkungen einzelner Kompartimente nachgewiesen werden. Die Beobachtung einzelner Substrukturen innerhalb der Zelle über einen bestimmten Zeitraum hinweg zeigt naturgetreu die Funktion dieses kleinsten Organismus des Lebens. Um die Bewertung der beobachteten Phänomene reproduzierbar zu machen, sind manuelle Auswertungen, die auf visuellen Eindrücken basieren, nicht geeignet, da sie durch die subjektive Betrachtungsweise unterschiedlicher Benutzer schwanken können. Man stelle sich z.B. das Auszählen mehrerer hundert Zellen in einem Bild durch mehrere Personen vor. Erschwerend kommt hinzu, daß durch die Aufnahme von hochaufgelösten multidimensionalen Datensätzen oft eine so große Datenmenge produziert wird, daß eine manuelle Auswertung nicht mehr möglich ist.

Der Einsatz automatischer Methoden zur Quantifizierung in Mikroskopaufnahmen ist stark mit der Entwicklung von Computern verbunden. Grundlage für die computerbasierte Analyse von Mikroskopdaten ist die digitale Generierung von Bildern, die mittlerweile mit allen gängigen Mikroskopsystemen möglich ist. Auf diese digitalen Datensätze können Bildverarbeitungsalgorithmen angewandt werden, um die Ergebnisse quantitativ oder qualitativ aufzubereiten.

Das Studium der lebenden Zelle gibt Aufschluß über viele ihrer Funktionen, die zum Überleben notwendig sind. Dabei werden zu unterschied-

lichen Zeitpunkten Aufnahmen gewonnen, die den zeitlichen Ablauf verschiedener Stadien darstellen. Durch die Bearbeitung dieser Bildfolgen mit entsprechenden Algorithmen lassen sich quantitative Aussagen über die Entwicklung der Zelle machen.

Seit der Entdeckung des *Green Fluorescent Protein* (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* und seinen spektralen Varianten ist die Anzahl der nicht-invasiven *in vivo*-Untersuchungen in lebenden Zellen sprunghaft angestiegen [2]. Das GFP kann an verschiedene Proteine angeheftet werden. Bei Anregung des GFP durch ein Elektromagnetisches (EM) Feld mit der GFP-spezifischen Wellenlänge, kann indirekt das angeheftete Protein sichtbar gemacht werden ([54],[13]). Mit einem Lichtmikroskop wird die emittierte Strahlung sichtbar. Damit können Strukturen im Innern einer Zelle beobachtet werden. Die Anregung wird linienweise durchgeführt und die emittierten Photonen werden nach dem optischen Aufbau mit Hilfe einer *photo-multiplier tube* (PMT) gesammelt. Der Vorteil dieser Methode ist, daß die erhaltenen Bilder digital über einen *Charge Coupled Device* (CCD) Chip ausgelesen werden können und sofort für anschließende Bildverarbeitungsprozesse zur Verfügung stehen.

Die Färbung mittels GFP wird insbesondere interessant, wenn Bildsequenzen, d.h. Bilder zu verschiedenen Zeitpunkten, aufgenommen werden, um dynamische Phänomene zu untersuchen. Ein Problem bei zeitlich aufgelöster Mikroskopie liegt darin, daß ein Kompromiss zwischen der Aufnahmezeit und der Intensität der Strahlung eingegangen werden muss. Biologische Strukturen sind sehr anfällig bezüglich EM-Strahlung. Bei zu hoher EM Intensität kann die Zelle sterben bzw. ungewünschte Strukturen bilden (z.B. DNA<sup>1</sup>-Protein Komplexe) [63], was zu einer Verkürzung der Aufnahmezeit führt. Die Konsequenz der Verringerung der Strahlungsintensität um längere Aufnahmezeiten zu erhalten, ist ein kleines Signal-zu-Rauschen Verhältnisses (*signal to noise ratio*, SNR) [67]. Mit dem konfokalen Mikroskop ist es möglich, unverschwommene, hochauflösende Aufnahmen von dicken Proben aus verschiedenen Tiefenschichten zu erstellen. Die Information außerhalb der fokalen Ebene wird durch das Anbringen einer Blende vor dem Detektor verworfen. Somit wird nur die fokale Region der Probe detektiert. Mit dieser Methode kann Punktweise angeregt und detektiert werden, was den Einsatz von *laser scanning* Mikroskopen (LSM) prädestiniert.

Vergleiche zwischen zweidimensionalen (2D) und dreidimensionalen (3D) Analysen haben gezeigt, daß mit der zusätzlichen Dimension nicht nur mehr Information zur Verfügung steht, sondern Phänomene ausschließlich in drei anstelle von zwei Dimensionen beobachtbar sind [50]. In vielerlei Hinsicht ist es unumgänglich, die Analyse von multidimensionalen

---

<sup>1</sup>DNA: *Deoxyribonucleic Acid*. Englischer Ausdruck für die Erbsubstanz DNS (Desoxyribonucleinsäure).

Daten mit Hilfe des Computers vorzunehmen. Erstens sind die aufgenommenen Daten aufgrund ihrer Größe mit manuellen Auswertungsmethoden nicht mehr sinnvoll zu bearbeiten; z.B. hat ein typisches 3D Bild mit den räumlichen Dimensionen  $512 \times 512 \times 15$  in x,y,z-Richtung eine Größe von etwa 4 Megabyte. Bei der gleichzeitigen Messung von drei Farbkanälen ergibt sich für hundert 3D Bilder eine ungefähre Größe von 1 Gigabyte; dies stellt für manuelle Analysen ein gewaltiges Datenvolumen dar. Des Weiteren haben automatisierte Methoden den Vorteil, daß sie reproduzierbar sind, d.h. das Experiment und die Ergebnisse werden transparent und können bei Bedarf wieder verifiziert werden. Die zeitliche Einsparung sei hier nur am Rande erwähnt. Da automatisierte Methoden im Bereich der Zellbiologie recht selten anzutreffen sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von Algorithmen entwickelt und implementiert, die eine automatische Analyse ermöglichen.

Um Objekte in den Bildern zu detektieren und segmentieren, ist oft eine Vorverarbeitung nötig, um die Bildqualität zu erhöhen. Eine Reihe von Glättungsfiltern können hierbei eingesetzt werden; soll jedoch die Kanteninformation erhalten bleiben, fällt die Wahl auf so genannte regularisierte Filter. Der in der Praxis bewährte anisotrope Diffusionsfilter [68] nach Black et. al. [7] wurde in 3D implementiert. Dieser erhält den Betrag der Gradienten senkrecht zu den Kanten; gleichzeitig glättet er in Richtung der Kante ebenso wie in homogenen Regionen mit relativ geringen Grauwertänderungen [67]. Einzelne Artefakte oder Bildstörungen, wie z.B. Pixelrauschen, können einfach mit morphologischen Filtern entfernt werden. Aus der Klasse der morphologischen Filtern wurden die in der Praxis wichtigsten implementiert.

Die Segmentierung von Objekten ist wesentlicher Bestandteil einer quantitativen Analyse. Hierbei werden Objektgrenzen detektiert, um das Objekt vom Hintergrund abzugrenzen. Unterschiedlichste Verfahren, die die vollautomatische und benutzerunabhängige Segmentierung zum Ziel haben, werden in [59] vorgestellt. Bei Bildern mit schwankenden Beleuchtungsverhältnissen, die z.B. durch chemische Aktivität des GFP-Proteins hervorgerufen werden, wird meist eine automatische Segmentierung unmöglich. Bei ungünstigen Segmentierungen können selbst nach Glättung des Bildes die Kanten der Objekte unterbrochen und durch Artefakte verfälscht sein. Die Segmentierung auf der Basis von aktiven Konturen ist eine Methode, mit der man umschließende Kanten auffinden kann; implizit erhält man eine geschlossene Kontur und das Artefakte einen geringen Einfluss auf die endgültige Kontur haben. Letztere wird iterativ bestimmt; meistens wird hierbei ein Energiefunktional minimiert, das mathematisch die globale Approximation der Kontur zu den Objektkanten bewertet. Aus der geschlossenen Kontur lässt sich die Zuordnung aller Pixel, die zum Objekt gehören, berechnen. Eine solche Zuordnung kann auch über ein

Regionenwachstums Verfahren (siehe Abschnitt 4.4) mit einer definierten Nachbarschaftsbeziehung geschehen. Erst durch diese Zuordnung lassen sich Objektparameter, wie z.B. das Massenzentrum (*center of mass*), berechnen. Sind die Objekte in der Bildfolge detektiert, lassen sich durch Verfolgen der einzelnen Objekte über mehrere Zeitschritte (*Tracking*) quantitative Parameter extrahieren. Die Zuordnung der Objekte über die gesamte Bildsequenz ist nicht eindeutig; unterschiedliche Heuristiken zum Auffinden der Korrespondenzen sind je nach Art der Anwendung mehr oder weniger erfolgreich. Durch die Abstrakte Formulierung der Verfolgung von Objekten ist es möglich, Objekte in beliebigen Dimensionen zu analysieren. Die anschließende Quantifikation gibt Auskunft über Eigenschaften der Objektdynamik.

Diese Arbeit ist in drei große Bereiche unterteilt: in einen Teil, indem Grundlagen der Physik und Biologie wiederholt werden (ab Seite 9), einen Teil (ab Seite 33) indem grundlegende und speziell entwickelte Bildverarbeitungsmethoden behandelt werden und einen Teil (ab Seite 95) der drei Anwendungen vorstellt. Die abschließende Diskussion in Kapitel 14 (ab Seite 115) zeigt in einem kritischen Überblick die erreichten Ziele und deren Grenzen.

In Teil I werden die physikalischen Grundlagen der Lichtmikroskopie erklärt. Dabei werden die optischen Prinzipien und Techniken beschrieben, die zum Verständnis der modernen Mikroskopie notwendig sind. Abhängig von der Transparenz der Probe, kommt die Durchlicht- oder Auflichtmikroskopie zum Einsatz. Die konfokale Technik ist geeignet, um Objekte dreidimensional aufzunehmen. Im Anwendungsteil sind konfokale Beispielbilder in 2D bzw. in 3D dargestellt. Das Verhalten fluoreszierender Stoffe bei spezifischer Anregung kann zur indirekten Auflösung von biologischen Strukturen unter dem Mikroskop ausgenutzt werden (siehe Kapitel 2.6.4). Zur Untersuchung der Struktur anorganischer Stoffe oder Mineralien sind Lichtmikroskope mit ihrer geringen Eindringtiefe ungeeignet. Mit der Röntgentomographie steht (wie in Kapitel 2.6.6 erläutert) eine Möglichkeit zur Untersuchung von dichten Materialien zur Verfügung; allerdings ist sie aufgrund der hohen Energiedosis nur begrenzt für lebende Objekte geeignet. Mit einer zeitlich aufgelösten Serie an Bildern wird die Dynamik in mehreren Stadien der Zellteilung studiert. Dabei spielen Diffusionsprozesse eine wichtige Rolle; die theoretischen Grundlagen hierzu werden in Abschnitt 2.7 besprochen. Die verschiedenen Zellteilungsstadien sind in Kapitel 3 abgebildet und beschrieben.

In Teil II werden spezielle Methoden der Bildverarbeitung vorgestellt. Dieser Teil kann in die Bereiche Vorverarbeitung und der eigentlichen Verarbeitung unterteilt werden. Die Methoden der Bildvorverarbeitung beginnen mit den morphologischen Filtern in Abschnitt 4.2. Mit dieser Klasse von Filtern können Artefakte entfernt werden, Löcher in Objek-



ten gefüllt und dünne Verbindungen zwischen Objekten gelöscht werden, ohne das Volumen zu verändern. Diese Operatoren sind sowohl für zwei- als auch dreidimensionale Bilddaten von mir implementiert worden. Der wohl bekannteste Glättungsfilter, basierend auf dem Gauß Kern, ist in Abschnitt 4.3 aufgeführt und Unterschiede zu konventionellen Glättungsfiltern werden diskutiert.

Kapitel 6 beschäftigt sich mit der Segmentierung, im speziellen mit kantenbasierten Ansätzen. Ein weiteres Segmentierungsverfahren arbeitet mit so genannten aktiven Konturen (siehe Kapitel 7). Bei 2D-Bilder spricht man auch von *snakes*. Vereinfacht ausgedrückt sind dies Gummibänder, die so durch das Graustufengebirge des Bildes gelegt werden, daß ein Energieminimum erreicht wird. Bei 3D-Bilder geht man entsprechend von verformbaren Gummiballons (*balloon*) aus, die sich an die Kanten des zu segmentierenden Datensatzes schmiegen. So können Gebiete auch dann gut segmentiert werden, wenn kurze Abschnitte der Kanten nicht gut zu erkennen sind. Energiefunktionen können verschiedene Parameter nutzen. Meist wird versucht, die Länge der Strecke zu minimieren und dennoch in der Nähe einer Kante (definiert durch den maximalen Grauwertgradienten) zu liegen. Aus der Segmentierung resultieren Binärbilder, repräsentiert durch zwei unterschiedliche Grauwerte, die Objekt- oder Hintergrundpixel zugewiesen werden. Nach der Segmentierung sind Objekte nur durch die Kantenpixel definiert, die das Objekt vom Hintergrund abgrenzen. Beim Bestimmen des Volumens oder des Grauwert-Massenzentrums müssen alle Pixel, die in einem Objekt enthalten sind, dem Objekt zugeordnet werden. Auf diesen Prozess des Regionenwachstums wird in Abschnitt 4.4 eingegangen.

Ein weiterer Aspekt in der Vorverarbeitung wird in Abschnitt 5 besprochen, wo ich zeigen konnte, wie mittels der so genannten Registrierung Störbewegungen in Bilder korrigiert werden können. Wird die Störbewegung entfernt, wird gleichzeitig das Ergebnis des *Trackings* verbessert. Das Kapitel 8 geht auf die von mir implementierte *Particle-Tracking* Methode ein (*Particle* steht hier für eine abstrakte Bezeichnung eines segmentierten Objekts in beliebiger Dimension) und gibt einen Überblick der unterschiedlichen Ansätze.

In Kapitel 9 wird eine Methode speziell für die Analyse von Volumen- und Oberflächendynamik vorgestellt. Dabei benutzte ich die Daten aus dem Experiment in Kapitel 13, um die manuelle Volumenmessung mit der von mir entwickelten automatischen Methode zu verifizieren. Diese Methode basiert auf einem deformierbaren Modell; eine initiale Kugel wird dabei um die extrahierten Kantenpunkte gelegt. Für die Beschreibung der Kugel kam eine NURBS (verallgemeinerte *B-spline*) Fläche zum Einsatz. Die Lage der Oberflächenpunkte dieser Fläche ist durch Kontrollpunkte festgelegt. Die Kugel wird iterativ von den Kantenpunkten

angezogen; der optimale Fit des Modells an die Kantenpunkte wird durch Minimierung eines quadratischen Fehlerfunktionalen erzielt. Bei der Minimierung wurde nur eine Verschiebung der Kontrollpunkte zugelassen.

Im nächsten Kapitel beschäftigte ich mich mit einem klassischen Problem der *snake*. Durch die Beschreibung der Kontur mit *B-splines* und dem Einsatz eines modifizierten externen Kräftefelds konnte ich Verbesserungen gegenüber herkömmlichen Methoden erzielen. Beispiele aus der Zellbiologie als auch Beispiele mit künstlichen Testbilder zeigen die erzielten Verbesserungen.

In Teil III, dem Anwendungsteil, werden drei von mir bearbeitete Experimente vorgestellt. Im ersten Experiment in Kapitel 11 arbeitete ich an der dreidimensionalen Analyse von Koks. Dabei nahm ich die Proben mit einem Micro-CT Scanner auf und bearbeitete sie mit speziellen Bildverarbeitungsmethoden. Die quantitative Analyse dieser Strukturen dient der Abschätzung der Effektivität beim Verbrennungsprozess; die aktive Oberfläche hat direkten Einfluss auf den Wirkungsgrad.

In Kapitel 12 wird die Dynamik von speziellen Zellkernkompartimenten, den so genannten PML-Kompartimenten mit Bildverarbeitungsmethoden untersucht. Die im Methodenteil beschriebenen Bildverarbeitungsalgorithmen wurden im Experiment eingesetzt, beginnend mit der Vorverarbeitung, anschließender Segmentierung, dem *Particle-Tracking* und der Visualisierung. Bei der nächsten Anwendung in Kapitel 13 wird eine biologische Fragestellung in 4D (3D-Bildsequenz) vorgestellt, bei der die Kernhülle, das Chromatin und die Centrosome während der Zellteilung gleichzeitig visualisiert und quantifiziert wurden. Als Vorverarbeitungsschritt kam der anisotrope Diffusionsfilter zum Einsatz, mit dem allerdings die Bilder nicht ganz vom Rauschen befreit werden konnten. Deshalb wurde eine Segmentierung angewandt, die auf einer Schwellwertmethode basierte. Durch *Particle-Tracking* konnten die Tochterkerne über die Zeit verfolgt werden und das synchrone Ansteigen der Chromatinmenge bei zwei Tochterzellkernen quantifiziert werden.

Jede Anwendung schließt mit einer Diskussion der erreichten Ziele ab. Eine umfassendere Diskussion findet sich in Kapitel 14.

**Teil I**

**Grundlagen der Physik und  
Biologie**



# Kapitel 2

## Physikalische Grundlagen

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei Arten von Mikroskopietechniken, dem Auf- und Durchlichtverfahren. Transparente Objekte wie z.B. Zellen oder Gewebe, können im Durchlichtverfahren beobachtet werden, während nichttransparente Objekte, wie z.B. Mineralien, nur im Auflichtverfahren abgebildet werden können. In diesem Kapitel werden die physikalischen Grundlagen der verschiedenen Mikroskopietechniken diskutiert. Ein Einblick in die Methodik der Röntgen-Computertomographie schließt dieses Kapitel ab.

### 2.1 Das optische Auflösungsvermögen

In der Lichtmikroskopie wird eine Abbildung durch die Wechselwirkung zwischen Licht und einem Objekt (Probe) dargestellt. Die Abbildung kann sehr feine Details in oder auf dem Objekt mit einer 2- bis 1000-fachen Vergrößerung sichtbar machen. Die maximale Auflösung optischer Mikroskope ist durch Beugungseffekte und durch die Wellennatur des verwendeten Lichtes begrenzt. Nach dem Rayleigh Kriterium [27] ist der minimale, mit optischer Mikroskopie auflösbare Abstand zweier Objekte proportional zur Wellenlänge und umgekehrt proportional zur numerischen Apertur ( $N_A$ ):

$$\Delta x = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{N_A}. \quad (2.1)$$

$\Delta x$  gibt hier den Abstand zweier Punkte und  $\lambda$  die benutzte Wellenlänge an. Das Produkt  $n \cdot \sin \alpha$  mit dem Brechungsindex  $n$  und dem halben Öffnungswinkel des Objektivs  $\alpha$  (siehe Abbildung 2.4) wird als  $N_A$  definiert. Der kleinste auflösbare Abstand zweier Objekte kann durch die minimale Wellenlänge und die maximale numerische Apertur erzielt werden. Objektive, die für wässrige Proben konzipiert sind, haben eine maximale numerische Apertur von  $N_A=1,2$ . Lichtoptische Mikroskope erreichen bei ca.  $0,2\mu\text{m}$  ihre Auflösungsgrenze.

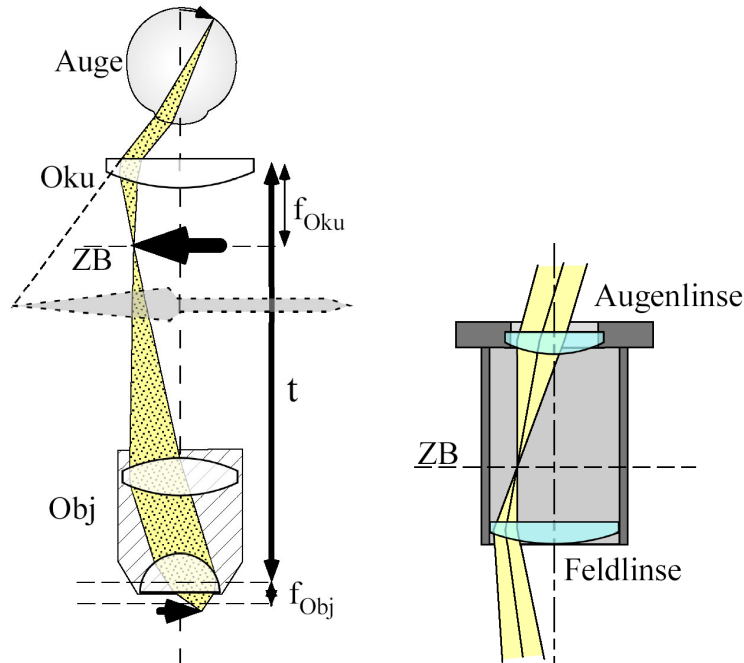


Abbildung 2.1: **Links** Strahlengang eines Lichtmikroskops. **Rechts** Huyghens-Okular.

Optische Mikroskope besitzen ein Linsensystem, das den Lichtstrahl auf dem Objekt fokussiert und ein vergrößertes Bild erzeugt. Die Mikroskope können sowohl für Auflicht als auch für Durchlicht verwendet werden. Bei der Durchlichtmikroskopie passiert ein Lichtstrahl das Kondensiorlinsensystem und gelangt anschließend durch die Probe in das Abbildungssystem aus Objektiv und Okular. Für nichttransparente und dickere Proben steht die Auflichtmikroskopie zur Verfügung. Hier fällt der Lichtstrahl durch die Objektivlinse, wird von der Probenoberfläche reflektiert und zurück in das Objektiv geleitet (siehe Abbildung 2.1<sup>1</sup>). Bei geringer Vergrößerung oder Dunkelfeldabbildung wird manchmal eine zweite Beleuchtungsquelle verwendet. Verschiedenste Techniken werden eingesetzt, um den Abbildungscontrast zu erhöhen und so zusätzliche Einzelheiten der jeweiligen Mikrostruktur sichtbar zu machen. Zu nennen sind u.a. Hell- und Dunkelfeld-, Phasenkontrast-, Interferenzkontrast-, Fluoreszenzkontrast- und Polarisationskontrast-Mikroskopietechniken.

<sup>1</sup>Optik, Licht und Laser, D. Meschede, Kap. 4, © 1999 B.G. Teubner Stuttgart Leipzig.

## 2.2 Laser

Die zugrundeliegende Physik des Lasers (*light amplification by stimulated emission of radiation*) ist die stimulierte Emission. Die erzwungene, induzierte oder stimulierte Emission ist das genaue Gegenstück zur Absorption. Ein elektromagnetisches Strahlungsfeld kann ein Teilchen entweder zum Übergang in einen energetisch höheren oder tieferen Zustand veranlassen, vorausgesetzt seine Frequenz stimmt mit der Energiedifferenz zwischen beiden Zuständen überein, d.h.  $\nu = \frac{\Delta W}{h}$  [27]. Ein Strahlungsfeld kann ein Teilchen aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand heben (Absorption) oder aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand zurücksenden (stimulierte Emission). Im zweiten Fall wird die Energie, die dem Teilchen entzogen wird, vom Strahlungsfeld aufgenommen, während im ersten Fall das umgekehrte passiert. Die beiden entgegengesetzten Vorgänge haben, bezogen auf ein Teilchen im Grundzustand bzw. ein angeregtes Teilchen, genau die gleiche Wahrscheinlichkeit. Ob die Absorption oder die stimulierte Emission überwiegt, hängt also lediglich von den Anzahldichten  $n_2$  und  $n_1$  auf den unterschiedlichen Niveaus ab (das zweite Niveau ist das Energiereichere). Bei  $n_1 > n_2$  überwiegt die Absorption, die einfallende Welle ist gedämpft. Bei  $n_2 > n_1$  verstärkt sich die einfallende Welle ständig durch stimulierte Emission (Entdämpfung). Im Gleichgewicht ist immer  $n_2 < n_1$ , denn nach *Boltzmann* ist  $n_2 = n_1 e^{\frac{h\nu}{kT}}$ . Die Dämpfung der Welle durch Absorption ist der übliche Vorgang und nur durch Modifikationen, und zwar durch stärkere Besetzung des angeregten Zustands im Vergleich zum Grundzustand, kann Entdämpfung erzielt werden. Wenn es sich um ein thermisches Gleichgewicht handelt, entspricht ein solcher Zustand einer negativen Temperatur. Die Eigenschaften des Laserlichts und des Lichts der thermischen Emission mit überwiegender Spontanemission, sind grundsätzlich verschieden. Spontane Emissionsakte erfolgen ihrem Wesen nach unabhängig voneinander und nehmen in ihrer Intensität exponentiell ab; die einzelnen mikroskopischen Strahlungsblitze haben keine Phasenbeziehung zueinander, sie sind inkohärent. Die Lawine stimulierter Emissionen besteht dagegen aus lauter Einzelakten mit strenger Phasenbindung, der gesamte Laserpuls ist räumlich und zeitlich kohärent. In der Anwendung sind folgende Eigenschaften wichtig: Die hervorragende Frequenzkonstanz und die Kohärenz und Parallelität der Strahlung.

## 2.3 Fluoreszenz

Lumineszenz ist die Emission von Photonen von einem elektronisch angeregten Zustand. Sie kann in zwei verschiedene Arten eingeteilt werden, in

die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz, abhängig vom Zusammenhang zwischen angeregtem Zustand und dem Grundzustand. Bei der Fluoreszenz findet ein quantenmechanisch erlaubter Übergang statt, bei der Phosphoreszenz ein quantenmechanisch verbotener Übergang, meistens von einem Triplet- zu einem Singulettzustand [38]. Dies äußert sich in der durchschnittlichen Lebensdauer des angeregten Zustands, die bei der Fluoreszenz im Bereich von  $10^{-8}$  Sekunden liegt. Typische Lebensdauer von Phosphoreszenzen liegen bei Millisekunden (Fernsehbildschirme) bis Stunden (Leuchtzifferblätter). Nach der Absorption von Licht finden mehrere Prozesse statt [38]. Normalerweise wird ein Fluorophor in einen höheren Vibrationszustand versetzt, ausgehend von einem der elektronischen Zustände  $S_1$ ,  $S_2$  oder  $S_3$ . Relaxation zum niedrigsten Vibrationszustand  $S_1$  passiert in einer Zeit von etwa  $10^{-11}$  Sekunden. Diesen Prozess bei dem im wesentlichen die Energie in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben wird nennt man interne Konversion. Von diesem Zustand aus geht das Molekül in einen Vibrationszustand von  $S_0$  über, wobei entweder ein Fluoreszenzphoton erzeugt wird, oder ein strahlungsfreier Übergang stattfindet (siehe Abbildung 2.2). Normalerweise ist das emittierte Licht höchstens so kurzwellig wie das absorbierte (Stokes'sche Regel). Dieser *Stokes Shift* ist das Endprodukt verschiedener Prozesse, wie z.B. die interne Konversion von einem angeregten Zustand zum niedrigsten Vibrationszustand  $S_1$ . Bei vollständiger Umwandlung in thermische Energie beobachtet man also Fluoreszenzlöschung. Die Häufigkeit aller dieser Prozesse nimmt im Allgemeinen mit wachsender Temperatur zu. Nur ausnahmsweise beobachtet man in der Emission kurzwelligere (anitstoke'sche) Linien als in der Absorption. Die Zusatzenergie kann entweder aus dem thermischen Energievorrat stammen, oder die Absorption des Photons kann einen Übergang höherer Energie ausgelöst haben der sonst verboten wäre. Lumineszenz kann unterteilt werden in:

- chemische Lumineszenz (z.B. Glühwürmchen).
- Radiolumineszenz (durch radioaktive Strahlung angeregt).
- Elektronenlumineszenz (z.B. in Fernsehröhren).

## 2.4 Das konfokale Prinzip

Der große Vorteil der konfokalen Lichtmikroskopie ist die Möglichkeit, das von einer Probe aus einer einzigen Ebene reflektierte oder emittierte Licht zu sammeln. Eine Lochblende, die zur Fokusebene konjugiert (konfokal) angeordnet ist, sorgt dafür, daß das gesamte Licht, das nicht



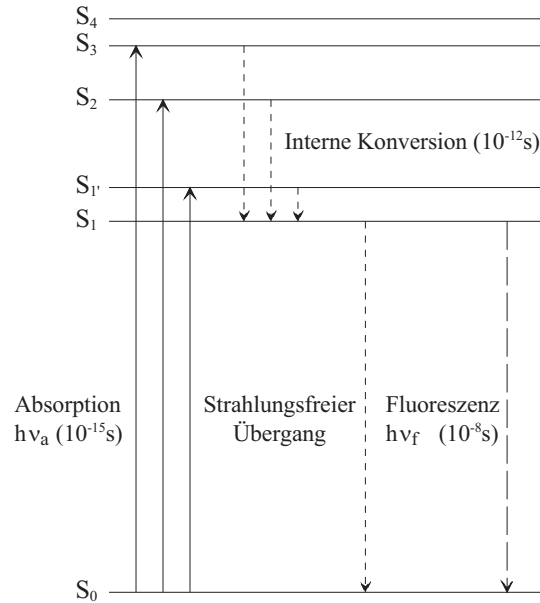


Abbildung 2.2: Typische Energieniveaus und Lebensdauern von Übergängen eines Fluorophors. Die elektronischen Zustände sind weiter unterteilt in mehrere Vibrationszustände, die hier zur besseren Übersichtlichkeit weggelassen wurden.

aus dieser Ebene stammt ausgeblendet wird. Beim *laser scanning* Mikroskop wird ein Bild aus einer Menge von Daten zusammengesetzt, wobei die Probe Punkt für Punkt und Zeile für Zeile sequentiell abgetastet wird (daraus resultiert der Name *laser scanning*) [10]. Durch Verschieben der Fokusebene lassen sich einzelne Bilder (optische Schnitte) zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammensetzen und anschließend digital verarbeiten.

## 2.5 Die Punkt-Abbildungs-Funktion

Die räumliche Lichtintensitätsverteilung wird durch die so genannte Punkt-Abbildungs-Funktion  $h$  (*point-spread-function*, PSF) beschrieben:

$$h(u, v, \phi) := |\vec{E}(u, v, \phi)|^2 \quad (2.2)$$

Die Variablen  $u = \frac{2\pi z NA^2}{n\lambda}$  und  $v = \frac{2\pi r NA}{\lambda}$  sind optische Koordinaten, die ihren Ursprung im geometrischen Fokus haben. Dabei ist  $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ . Die PSF und das elektrische Feld  $E$  sind hier in Zylinderkoordinaten dargestellt ( $F = F(u, v, \phi)$ ).  $E$  kann im Fokus nach [56] dargestellt werden

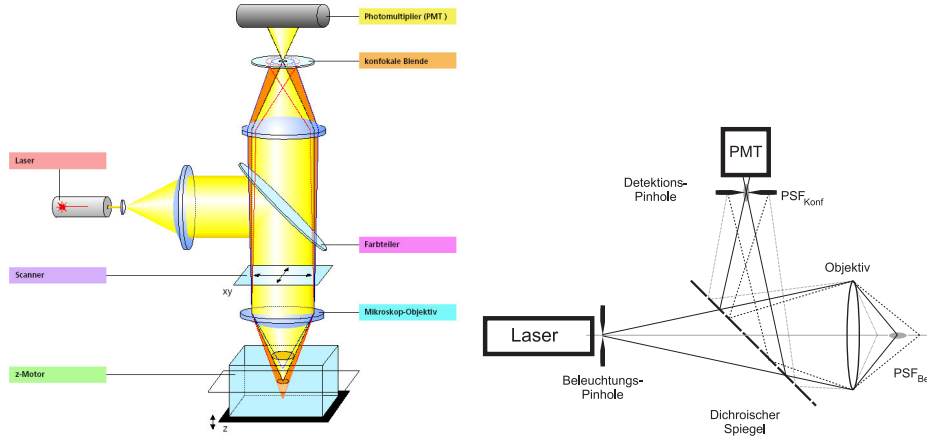


Abbildung 2.3: **Links** Konfokales Prinzip des *laser scanning* Mikroskops. **Rechts** Schematische Darstellung des Strahlengangs und der Bauteile.

als:

$$\begin{pmatrix} E_x(u, v, \phi) \\ E_y(u, v, \phi) \\ E_z(u, v, \phi) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -i(I_0(u, v) + I_2(u, v) \cos 2\phi) \\ -iI_2(u, v) \sin 2\phi \\ -2I_1(u, v) \cos \phi \end{pmatrix} \quad (2.3)$$

Die Beugungsintegrale  $I_n$  sind gegeben durch:

$$\begin{aligned} I_0(u, v) &= \int_0^\alpha \cos^{\frac{1}{2}} \theta \sin \theta (1 + \cos \theta) J_0\left(\frac{v \sin \theta}{\sin \alpha}\right) \exp\left(\frac{iu \cos \theta}{\sin^2 \alpha}\right) d\theta \\ I_1(u, v) &= \int_0^\alpha \cos^{\frac{1}{2}} \theta \sin^2 \theta J_1\left(\frac{v \sin \theta}{\sin \alpha}\right) \exp\left(\frac{iu \cos \theta}{\sin^2 \alpha}\right) d\theta \\ I_2(u, v) &= \int_0^\alpha \cos^{\frac{1}{2}} \theta \sin \theta (1 - \cos \theta) J_2\left(\frac{v \sin \theta}{\sin \alpha}\right) \exp\left(\frac{iu \cos \theta}{\sin^2 \alpha}\right) d\theta \end{aligned}$$

Die  $J_i$ 's sind dabei Besselfunktionen erster Art und  $i$ -ter Ordnung,  $\alpha$  der Aperturwinkel und  $\theta$  der Azimutwinkel der Apertur.

Daraus ergibt sich die PSF für linear polarisiertes Licht:

$$\begin{aligned} h(u, v, \phi) &= |I_0(u, v)|^2 + |I_2(u, v)|^2 + 4 |I_1(u, v)|^2 \cos^2 \phi \\ &\quad + 2 \cos 2\phi \operatorname{Re}\{I_0(u, v)I_2^*(u, v)\} \end{aligned} \quad (2.4)$$

Für un- oder zirkular-polarisiertes Licht ergibt sich:

$$h(u, v) = |I_0(u, v)|^2 + 2 |I_1(u, v)|^2 + |I_2(u, v)|^2 \quad (2.5)$$

In Abbildung 2.4 ist das Hauptmaximum der PSF hinter einer Linse schematisch dargestellt, wobei die Koordinaten so gewählt sind, daß  $z$  entlang der optischen Achse verläuft.

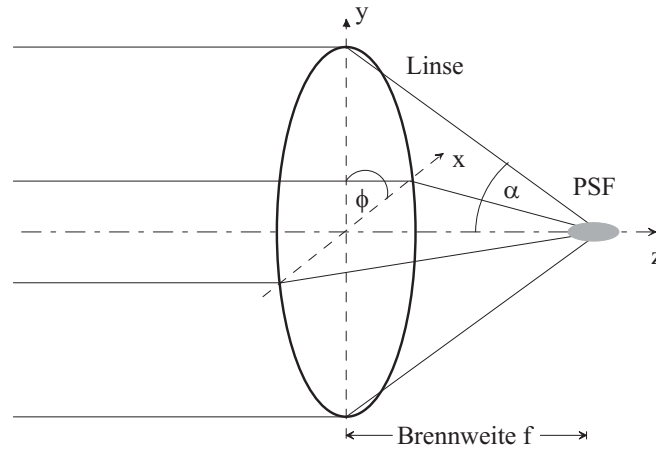


Abbildung 2.4: Lichtintensitätsverteilung hinter einer Linse.

## 2.6 Lichtmikroskopie

### 2.6.1 Hell- und Dunkelfeld Mikroskopie

Der Kontrast der Durchlichtmikroskopie basiert auf Änderungen der optischen Dichte und der Farbe innerhalb des Materials. Partikel und andere Füllmaterialien können klar identifiziert werden. Dunkelfeld-Mikroskopie eignet sich besonders für linienartige Strukturen wie Kanten und Risse, die im Hellfeld nicht genügend sichtbar werden. Im Gegensatz zur Hellfeldbeleuchtung wird die Objektstruktur hell auf dunklem Untergrund abgebildet. Im ungünstigsten Fall haben ungefärbte Objekte in der Durchlichtmikroskopie keinen Kontrast. Objekte, die ungefärbt sind und keine Farb- oder Dichteunterschiede in der Struktur besitzen, werden in der klassischen Mikroskopie nicht, oder nur unzureichend dargestellt, falls das Objekt das Licht weder ausreichend bricht noch streut. Geeignet sind Objektive, die durch eine hervorragende Linsenqualität und Reinheit möglichst wenig Licht streuen und eine geringe sphärische und chromatische Aberration aufweisen.

### 2.6.2 Phasenkontrast Mikroskopie

Eine Möglichkeit, das Problem der Hell- und Dunkelfeld-Mikroskopie zu lösen, ist eine Modifikation der Durchlichtmikroskopie. Objekte wie zum Beispiel Zellen, die keine tief greifenden optischen Eigenschaften besitzen, müssen anders ausgeleuchtet werden. Zellmembranen besitzen gering graduierte Dichteunterschiede zu Luft, beziehungsweise zu Glas. Wenn man die Zelle nicht dem Lichtweg entlang, sondern durch Streulicht seit-

lich beleuchtet, so werden geringe Unterschiede in der Dichte wesentlich verstärkt. Die gestreuten Lichtstrahlen treffen in unterschiedlichen Winkeln auf das Objekt, werden gestreut, bzw. gebrochen und das abgelenkte Licht zeigt deutlicher die Umrisse. Mit Hilfe von Filtern wird das Beleuchtungslicht abgelenkt und durch spezielle Objektive wird lediglich das in verschiedenen Winkeln vom Objekt weggebrochene Licht wieder aufgenommen.

### 2.6.3 Interferenzkontrast Mikroskopie

Im Interferenzkontrastmikroskop wird die Beleuchtung in zwei Strahlenbündel geteilt. Ein Strahl wird von der Probe reflektiert, der andere von einem flachen Spiegel. Danach werden die beiden Strahlen zusammengeführt, so dass sie interferieren. Die Interferenzmuster können eingesetzt werden, um die Probendicke bei Transmission oder die Probenrauigkeit bei Reflektion zu messen. Ein quantitatives Interferenzverfahren für genaue, berührunglose Messungen der Niveauunterschiede von Oberflächen ( $10\mu\text{m}$  bis  $30\mu\text{m}$ ) ist die Auflicht-Interferenz-Einrichtung nach Mirau (Weißlichtinterferometrie) [8].

Eine Sonderstellung unter den interferometrischen Verfahren nimmt der differentielle Interferenzkontrast (DIC) ein. Im Auflicht des differentiellen Interferenzkontrastes werden Höhenunterschiede der Probe und materialabhängige Phasenveränderungen des reflektierenden Lichtes zur Abbildung herangezogen. Kleine Höhenunterschiede (optische Weglängendifferenzen zwischen etwa einem zehntel der Wellenlänge bis zu einer ganzen Wellenlänge) lassen sich auf diese Weise sichtbar machen und ergeben Abbildungen mit räumlichem Charakter.

### 2.6.4 Fluoreszenz Mikroskopie

Eine Lichtquelle mit großer spektraler Leuchtdichteverteilung (Xenon- oder Quecksilberdampfampe) sorgt dafür, daß möglichst viele verschiedene fluoreszierende Stoffe verwendet werden können. Ein Anregungsfilter wird benötigt, um das Präparat nur mit dem Teil des Spektrums zu beleuchten, für das der Fluoreszenzfarbstoff empfindlich ist. Das sorgt zum einen für einen dunkleren Hintergrund und ist zum anderen vor allem dann wichtig, wenn es sich um organische Präparate handelt, die z.B. durch UV-Licht zerstört oder stark verändert werden können. Es werden Strukturen innerhalb der Zelle wie z.B. DNA-Proteinkomplexe gebildet, die zu Abberationen bis hin zum Zelltod führen können [63]. Aufgrund der toxischen Wirkung elektromagnetischer Strahlung auf lebende Objekte muss ein Kompromiss zwischen der Aufnahmezeit und

Lichtintensität eingegangen werden. Daraus resultiert meist ein schlechtes Signal zu Rauschverhältnis (SNR) [67].

Der selektive Sperrfilter hat die Aufgabe, nur einen Teil des vom Präparat bzw. vom Fluoreszenzfarbstoff ausgesandten Lichts durchzulassen, um so den Kontrast zu erhöhen. Je nach Anwendung und zu untersuchendem Stoff wird zwischen primärer und sekundärer Fluoreszenz unterschieden: Primär bedeutet, daß der Stoff selbst fluoreszierende Eigenschaften hat oder fluoreszierende Stoffe enthält. Sekundäre Fluoreszenz heißt, daß dem zu untersuchenden Material fluoreszierende Stoffe beigemischt werden, bzw. der Stoff mit Fluoreszenzfarbstoffen eingefärbt wird. Ein Beispiel für sekundäre Fluoreszenz ist die Immun-Fluoreszenz in der Medizin. Dabei werden Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen eingefärbt, um Erreger nachzuweisen. Die markierten Antikörper werden nach der Reaktion ausgewaschen, wodurch nur die gefärbten Komplexe im Präparat bleiben. Zeigt sich danach keine Fluoreszenz, befanden sich auch keine spezifischen Erreger im Präparat. Bei der Auswahl eines geeigneten Farbstoffs muß darauf geachtet werden, daß die Farbstoffe chemisch nicht mit dem zu untersuchenden Stoff reagieren und daß die mikroskopischen Geräte auf Anregungs- und Fluoreszenzwellenlänge abgestimmt sind. Zur Beleuchtung sind die in der Mikroskopie üblichen Halogenlampen nicht geeignet, da sie nicht im UV-Bereich strahlen, in dem viele Stoffe fluoreszieren. Gasentladungslampen, z.B. vom Typ Xenon-Hochdruck- oder Quecksilber-Hochdrucklampen, sind für diesen Zweck besser geeignet. Bei den letztgenannten werden durch Hochdruck die typischen Linien im Spektrum verbreitert. Bei der Xenon-Lampe ist die lange Lebensdauer von Vorteil, sie strahlt jedoch einen höheren Infrarot-Anteil ab als die Quecksilber-Lampe. Nachteilig bei diesen Lampen ist die hohe Wärmeenergie, die vom Präparat ferngehalten werden muß. Spontane Emissionsakte erfolgen ihrem Wesen nach unabhängig voneinander, die einzelnen mikroskopischen Strahlungsblitze haben keine Phasenbeziehung untereinander, sie sind inkohärent. Außerdem nimmt die Intensität dieser spontanen Strahlung exponentiell ab und ist nur lokal messbar.

Das Verhältnis zwischen ausgesandter und anregender Strahlungsenergie ist bei der Fluoreszenz kleiner als eins. Für die effektive Quantenausbeute gilt das Verhältnis:  $I_{eff} = \frac{I_e}{I_a}$  wobei  $I_e$  die emittierte und  $I_a$  die absorbierte Energie ausdrückt. In der Praxis ist die Quantenausbeute sehr klein, der Wert eins wird praktisch nie erreicht.

In der Fluoreszenzmikroskopie kommt den Filtern eine besondere Bedeutung zu. Die Anregungsfilter sind in der Regel Interferenzfilter und werden auch Bandpaßfilter genannt. Ihre Bezeichnung hängt von ihren Eigenschaften ab; z.B. steht die Bezeichnung BP 546/9 für folgende Eigenschaften: BP = Bandpaßfilter, 546 = Schwerpunktswellenlänge in nm,

9 = Halbwertsbreite in nm. Den Gegensatz zu den Kurzpaßfilter stellen die Langpaßfilter dar: sie lassen ab einer bestimmten Wellenlänge alle längeren, energieärmeren Wellenlängen durch und eignen sich immer dann gut als Sperrfilter, wenn Erreger- und Emissionsstrahlung eines Fluoreszenzstoffes energetisch eng nebeneinander liegen. Der Filter wird dann so gewählt, daß seine Kante genau zwischen diesen Strahlungswellenlängen liegt. Dadurch wird eine wesentliche Kontrasterhöhung zwischen Bild und Hintergrund erreicht. Ein wichtiges Qualitätsmaß von Filtern ist auch der sog. Fuß, d.h. der spektrale Teil des Filters, an dem sich die Transmission der Nullmarke nähert. Er sollte möglichst schmal sein.

Das nächste wichtige Element des Auflicht-Fluoreszenzmikroskops ist der dichroitische Teilerspiegel. Seine Aufgabe ist es, die anregende Strahlung möglichst vollständig auf das Objekt zu lenken und das Fluoreszenzlicht möglichst vollständig zum Okular durchzulassen. Sein Dichroismus muß also so beschaffen sein, daß er für die Fluoreszenzwellenlänge transparent ist und für die Anregungswellenlänge als ein Spiegel fungiert. Die zueinander gehörenden Anregungsfilter, Farbteilerspiegel und Sperrfilter bilden jeweils eine Baueinheit, die einfach durch Schwenken ausgewechselt werden können.

Für die Objektive gelten ähnliche Anforderungen wie bei der normalen Auflichtmikroskopie. Da in der Auflichtmikroskopie wegen des Strahlengangs der Lichtstrom  $F$  proportional zur vierten Potenz der numerischen Apertur  $N_A$  ist ( $F \sim N_A^4$ ), sollten die Objektive hohe Aperturen besitzen. Der Farbfehler ist dabei zu vernachlässigen, da ohnehin nur das schmale Wellenlängenband des Fluoreszenzfarbstoffes benutzt wird. Früher hatte man bei vielen Glassorten im UV-Bereich Probleme mit der Eigenfluoreszenz. In der Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie sind die Anforderungen an die Filter höher und es gelingt kaum, einen dunklen Hintergrund zu erreichen. Außerdem wird der größte Anteil der Strahlung bei der Durchlichtbeleuchtung vom Objektiv weggestreut. Die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie begann in der Mitte des 20. Jahrhunderts in Anlehnung an die klassische Durchlichtmikroskopie mit einer Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie. Davon kam man aber nach kurzer Zeit ab, da bald bessere Techniken zur Herstellung von Filtermaterialien zur Verfügung standen. Man benötigt zunächst wesentlich energiereicheres Licht als bei der klassischen Mikroskopie, bei der Halogenlampen ausreichen.

In der Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Filter in den Lichtweg eingebaut, der nur ein bestimmtes Band des Lichtes hindurchläßt, welches sich mit dem Absorptionsmaximum des in Frage kommenden Farbstoffes deckt. Alle Methoden haben gemeinsam: Die Bilder lassen sich klassisch durch analoge Fotografie oder durch digitale Bilderfassung

mit einer Videokamera oder mit Foto-*multipliern* einfangen.

### 2.6.5 Konfokale *laser scanning* Mikroskopie

Das konfokale *laser scanning* Mikroskop (CLSM) ist eine Form des Auflicht-Fluoreszenzmikroskopes, die zurückgeht auf das von Minsky 1957 entwickelte und von Egger und Petran 1967 angewandte mikroskopische Prinzip. Als Anregungslicht dienen verschiedene monochromatische Laser definierter Wellenlänge und Leistung. Das Scannen mikroskopischer Objekte wird ermöglicht durch galvanisch betriebene Umlenkspiegel in einer optischen Ablenkungseinheit, die ein Bild mit einer vorgegebenen Anzahl an Bildpunkten, so genannten Pixeln (*picture element*), abrastern können. Die nur kurzzeitige Bestrahlung des Objektes sorgt für eine nur geringe thermische Schädigung, bzw. einen nur kleinen Ausbleicheffekt (photobleaching).

Der bedeutendste Fortschritt in der konfokalen *laser scanning* Mikroskopiertechnik ist jedoch die Abbildungsqualität, die durch die besondere Anordnung der Lochblende im Strahlengang des Anregungslichtes und der Blende im Abbildungsstrahlengang zustande kommt: die Abbildung der Lochblende im Exzitationsstrahlengang liegt auf dem exakt gleichen Fokus im Objekt wie die Rückwärtsprojektion der Blende im Emissionsstrahlengang (siehe Abbildung 2.3). Dadurch wird die Beleuchtung und Abbildung der Fokusebene optimiert und Signale von anderen Ebenen im dreidimensionalen Objekt werden stark unterdrückt. Dieser räumliche Filterprozess ist jedoch nur bei kleinen Blendenöffnungen erzielbar. Bei größeren Blendenöffnungen nimmt die Tiefenschärfe wieder ab, die Konfokalität geht verloren. Dichroitische Farbteiler lassen Licht einer bestimmten Wellenlänge geradlinig passieren, während Licht kürzerer Wellenlänge rechtwinklig reflektiert wird. Das emittierte Licht kann nun über eine Reihe von Strahlteilern und Emissionsfiltern „gereinigt“ und je nach Wellenlängenbereich auf verschiedene Detektoren umgeleitet werden. Dies sind z.B. Photo-*multiplier*, die das gerasterte Bild als einzelne Bildpunkte wiedergeben. Jedes einzelne Pixel besitzt einen Grauwert zwischen 0 und 255 bei einer 8 bit Auflösung der Kamera. Die Bilder sind digitalisiert, extern abspeicherbar und werden am Bildschirm kontinuierlich aufgebaut. Zur Darstellung mehrfarbiger Bilder sind mehrere Detektoren erforderlich, deren Graubilder auf dem Farbkanal gespeichert werden, der der natürlichen Farbe entspricht. Durch Überlagerung dieser verschiedenen Bilder entsteht ein Mehrkanalbild in Farbe.

Die Technik der Konfokalität ermöglicht also die Darstellung optischer Schnitte durch lebende, dreidimensionale Objekte. Durch die Ausstattung der Mikroskope mit motor- oder piezo-gesteuerten Tischen wird die Aufnahme von Schnittserien definierter Intervalle möglich. Die Soft-

wareverarbeitung der Schnittserien erlaubt die dreidimensionale Darstellung dieser Schnittserien. Die konfokale *laser scanning* Mikroskopie findet bisher ihre Anwendung in der Zell- und Gewebeforschung, u.a. auch an lebenden Organen. Aufgrund der Entwicklung von verbesserten Fluoreszenzfarbstoffen gelingt auch die Darstellung von  $\text{Ca}^{2+}$  Bewegungen und von pH-Wert-Verschiebungen in lebenden Zellen *in vivo* [37]. Aktuelle Untersuchungen über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik mit mathematischen Modellen haben gezeigt, daß die Intensität der experimentell gemessenen Strahlung, verglichen mit der modellierten, um Größenordnungen geringer ausfällt [69]. Die Ursachen dieser Strahlungsreduktion ist auf eine geringere Kinetik der Marker und daraus resultierende geringere Bindungsgeschwindigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  mit dem Marker zurückzuführen. Mit der Eigenschaft des Laserlichts, bis zu einer Tiefe von über  $100\mu\text{m}$  in Objekte eindringen zu können, können räumliche Aufnahmen von biologischen Präparaten gewonnen werden.

### 2.6.6 Micro-CT Mikroskopie

Wie im vorigen Abschnitt 2.6.5 diskutiert, ist die Eindringtiefe bei herkömmlichen Lasern in Zellgewebe bzw. wässrigen Lösungen auf ca.  $100\mu\text{m}$  beschränkt. Um dichtere und größere Strukturen zu untersuchen, sind Methoden, die auf Lichtmikroskopie basieren, ungeeignet. In der Medizin wird seit Röntgen's Entdeckung der nach ihm benannten Strahlung (1895) die Tomographie eingesetzt, um Knochen bzw. pathologische Gewebeveränderungen im menschlichen Körper sichtbar zu machen. Für die dreidimensionale Abtastung eines Objekts wurde die Computertomographie (CT) eingeführt, mit der zum ersten Mal eine zerstörungsfreie Volumenmessung zur Verfügung stand. Eine Weiterentwicklung der CT, die es erlaubt kleine Objekte mit hoher Auflösung im  $\mu\text{m}$ -Bereich aufzunehmen, wurde mit der Micro-CT Technik erreicht. Da die Objekte einer hohen Energiedosis ausgesetzt sind ist dieses Verfahren nur beschränkt für lebende biologische Präparate geeignet.

Für die Erzeugung von Röntgenstrahlung werden Elektronen durch Heizung der Kathode und Anlegen einer Anodenspannung zwischen 50kV und 300kV auf ein Metall mittlerer oder hoher Massenzahl, wie z.B. Molybdän, Kupfer oder Wolfram, beschleunigt. In diesem Metall wird die Geschwindigkeit der Elektronen verzögert, die dabei freigesetzte Energie wird in Bremsstrahlung und zu einem großen Teil in Wärme umgewandelt, so daß die Antikathode meist gekühlt werden muss. Diese Strahlung dringt tief in Materieschichten ein. Der plötzlichen Abbremsung, also einer völlig unperiodischen Beschleunigung, entspricht nach *Fourier* ein kontinuierliches Spektrum, ähnlich dem akustischen Knall. Daher sollte das klassische Spektrum der Röntgen-Bremsstrahlung sich über alle Fre-



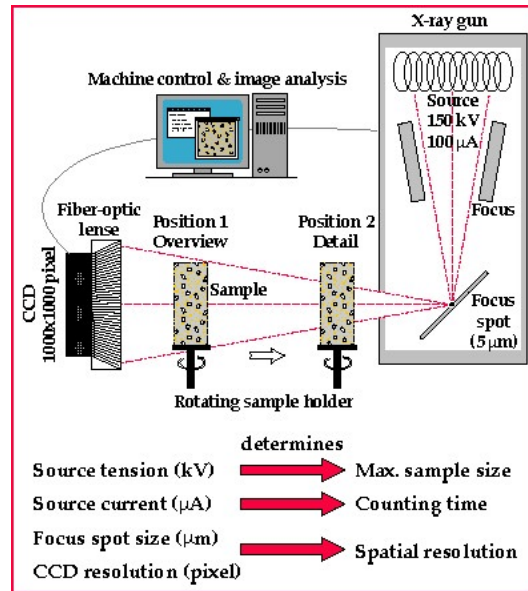


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau eines Micro-CT Scanners.

quenzen erstrecken. Da die Strahlung aber in Photonen abgepackt ist, kann ein Photon höchstens die gesamte Energie  $eU$  des Elektrons aufnehmen. Das Spektrum bricht bei einer Grenzfrequenz  $\nu_{gr}$  ab, für die gilt:

$$h\nu_{gr} = eU$$

$$\lambda_{gr} = \frac{hc}{eU} = \frac{1234nm}{U}.$$

Das Bremsspektrum wird bei hinreichend hoher Elektronenenergie durch ein Linienspektrum von relativ einfachem Bau überlagert, das im Gegensatz zum Bremsspektrum charakteristisch für das Antikathodenmaterial ist. Das Bremsspektrum entsteht, indem die schnellen Elektronen tief in die Hülle der getroffenen Atome eindringen, und hängt nur vom Aufbau der inneren Hülle ab. Dabei hat der chemische Zustand oder Aggregatzustand kaum Einfluss auf das Bremsspektrum. Der Hauptteil der Sekundärstrahlung ist viel weicher als die Primärstrahlung, und ihr Absorptionskoeffizient ist unabhängig von der Röhrenspannung. Analog verhält sich im sichtbaren Spektralbereich erregte Fluoreszenz, ihre Frequenz ist nach der Stokes Regel verringert (siehe Abschnitt 2.3). Die Röntgenstrahlung von Fe, Co, Ni, Cu, Zn wird entsprechend der Reihenfolge im Periodensystem härter. Maßgebend ist hier die Ordnungszahl und nicht die Atommasse. Die Sekundärstrahlung ist die charakteristische Strahlung des beschossenen Elementes.

Mit dem Röntgentomographie-Verfahren können zweidimensionale Projektionsbilder mit vollständiger dreidimensionaler Information generiert



Abbildung 2.6: SkyScan-1072 Micro-CT Scanner, installiert an der University of Adelaide, SA 5005, Australia.

werden. In jedem zweidimensionalen Projektionsbild wird ein Teil der Tiefeninformation integriert. Dadurch wird es möglich, komplette dreidimensionale Strukturen einer Probe ohne Präparation oder Chemikalienbehandlung sichtbar zu machen und zu quantifizieren.

Vorhandene medizinische Röntgentomographie-Systeme haben Auflösungen von bis zu 1mm. Um die Mikrostruktur von Materialien zu beobachten wird allerdings eine bessere Auflösung benötigt als sie mit den vorhandenen medizinischen Geräten erzielt wird. In den letzten Jahrzehnten wurde von vielen Herstellern die Auflösung erhöht, so dass es mittlerweile möglich ist, bis zu einer Tiefe von  $4\mu\text{m}$  aufzulösen. Dabei können verschiedenste Gegenstände, wie z.B. Zähne, zahnmedizinische Materialien, Metalllegierungen, Fische, Knochen, Nahrungsmittel und weiche Gewebeproben, untersucht werden.

Eine mikro-fokussierte Röntgenstrahlquelle belichtet die Probe auf einem Präzisionsteller und die Projektion wird mit einer empfindlichen Röntgen-Kamera aufgenommen. Dabei wird nach jeder Belichtung der Präzisionsteller um einen fest vorgegebenen Winkel rotiert bis das Objekt um 180 Grad gedreht ist. Je kleiner der Rotationswinkel desto mehr Aufnahmen werden von dem Objekt generiert und entsprechend höher ist die Auflösung der daraus berechneten Schnittbilder. Im einfachsten Fall kann die Projektion als parallele Röntgenstrahlableitung beschrieben werden. Durch diese Näherung können mit komplexen Algorithmen Schichtbilder aus den Projektionsbilder rekonstruiert werden, die auf Röntgenstrahl-dichte basieren [33].

Auf der Basis der einzelnen 2D Schichtbilder können mit so genannten Oberflächen- oder Volumenrendering Methoden Computermodelle erstellt werden, die entweder nur die Oberfläche oder das komplette Volumen darstellen. Mit dem Volumen-Modell ist es möglich, virtuelle

Schnitte beliebiger Ausrichtung durch das Objekt zu erzeugen. Beliebige Schnitte bedeutet, daß die Azimut- und Polwinkel, mit sphärischen Polarkoordinaten ausgedrückt, beliebig innerhalb der Intervalle verändert werden können. Dadurch entstehen neue Einblicke in die Struktur, denn solche Perspektiven werden erst mit einem Modell möglich. Die Morphologie der Probe kann am Bildschirm studiert werden; ähnlich dem diagnostisch- medizinischen-Röntgen werden Strukturen zugänglich, die zuvor nicht sichtbar waren. Im Bereich der Materialforschung stellt diese Methode oft das einzige Verfahren dar, um Objekte zerstörungsfrei zu analysieren.

In Abbildung 2.6 wird exemplarisch der Aufbau eines Micro-CT Scanners gezeigt (Typ 1072 vom Hersteller SkyScan). Der Scanner ist mit einem Steuer- und Daten-Computer verbunden und kann Proben der Größe 1,5cm x 3cm mit einer maximalen Auflösung von  $4\mu\text{m}$  und einer maximalen 120-fachen Vergrößerung aufnehmen.

## 2.7 Diffusion

Diffusionsprozesse spielen in der Natur eine wesentliche Rolle beim Austausch von Materie, Energie und Informationen. Dieser Prozess findet in allen Aggregatzuständen statt, solange das thermodynamische Verteilungsgleichgewicht nicht erreicht ist. Ein Verteilungsgleichgewicht kann z.B. durch einen Konzentrationsgradienten verhindert werden. Der Begriff Diffusion und die daraus abgeleitete Diffusionskonstante ist im makroskopischen Maßstab zu verstehen. Informationen innerhalb der Zelle werden durch Proteine als Botenstoffe ausgetauscht, die sich über so genannte Pfade ausbreiten. Die Diffusion ist nur über kurze Wegstrecken von Bedeutung, da eine Verdoppelung der Strecke eine Vervierfachung der Diffusionszeit zur Folge hätte. Typische Diffusionswege und zugehörige Diffusionszeiten sind bei molekularem Sauerstoff bei  $18^\circ\text{C}$  in Wasser z.B.:

- für 8nm (entspricht etwa der Dicke der Zellmembran) eine Diffusionszeit von 16ns.
- für  $80\mu\text{m}$  (entspricht etwa dem Durchmesser einer Zelle) eine Diffusionszeit von 1,6s.
- für 8cm eine Diffusionszeit von 18,7 Tage.

Durch diesen Vergleich wird deutlich, daß bei Austauschprozessen durch die Membran die Diffusion einen wesentlichen Einfluss ausübt, bei interzellulären Transporten aber nur eine untergeordnete Rolle spielt. Wie groß der Einfluss der Diffusion innerhalb des Zellkerns ist, bleibt eine nach wie vor ungelöste Frage. Neue Experimente zeigen den Trend, daß

die Diffusion im mikroskopischen Maßstab nicht als alleiniger Antrieb bei Austauschprozessen eine Rolle spielt, sondern auch andere, aktive Motoren innerhalb der Zelle bzw. dem Zellkern den Austausch steuern [49]. Da die Diffusion im Zellkern durch die Inhomogenität der unterschiedlichen Strukturen gestört wird und die hohe Streuung der in der Literatur angegebenen Viskositäten keine genaue Bestimmung zulässt, sind meist nur grobe Aussagen unter Vorbehalt möglich. Grundlage für die Bestimmung der Diffusion sind das erste und zweite Fick'sche Gesetz [27].

### 2.7.1 Die Diffusionskonstante

Die Diffusionskonstante legt für einen bestimmten Prozess, wie z.B. Wärmetransport, die Austauschrate fest. Diese kann in mehreren Dimensionen inhomogen sein und wird im Allgemeinen durch einen Diffusionstensor  $D$  beschrieben. Für ein gegebenes Zeitintervall  $\Delta t = t_j - t_0 = t_{j+1} - t_1 = \dots = t_n - t_{n-j}$  ist die mittlere quadratische Verschiebung (MSD: *mean square displacement*) folgendermaßen definiert:

$$MSD(\Delta t_j) = \frac{1}{n-j} \sum_{i=j}^n (r(t_i) - r(t_{i-j}))^2.$$

Es können im wesentlichen drei unterschiedliche Arten von Diffusion beobachtet werden, die einfache bzw. Brown'sche zufällige Diffusion (**a**), die direkte Diffusion (**b**) und die beschränkte Diffusion (**c**). In drei Dimensionen lässt sich die MSD für die drei unterschiedlichen Klassen folgendermaßen berechnen:

$$\mathbf{a.} \quad MSD(\Delta t) = 6D\Delta t \quad \mathbf{b.} \quad MSD(\Delta t) = 6D\Delta t + \nu^2 \Delta t^2 \quad \mathbf{c.} \quad MSD(\Delta t) = R^2.$$

Die Diffusionskonstante wird durch  $D$  festgelegt,  $\nu$  beschreibt die Geschwindigkeit der direkten Bewegung und  $R$  legt den Radius der Begrenzung fest.

Durch geeignete Wahl der Experimente läßt sich durch Ermitteln der Diffusionskonstante  $D$  die Viskosität der liquiden Flüssigkeit  $\eta$ , z.B. im Zellkern, errechnen. Für eine sphärische Näherung bei konstanter Temperatur kann die Viskosität mit der Stokes-Einstein Gleichung berechnet werden:

$$\eta = \frac{k \cdot T}{6\pi D \cdot r}. \quad (2.6)$$

wobei  $k_B$  die Boltzmannkonstante,  $T$  die absolute Temperatur in Kelvin und  $r$  den genäherten Radius des Objektes beschreibt. Eine ausführliche Diskussion der Diffusion und deren Bestimmung aus experimentellen Beobachtungen wird in [9] geführt.

# Kapitel 3

## Biologische Grundlagen

Der biologische Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Zellteilung und dem Proteintransport. Aus diesem Grund soll in diesem Kapitel nur auf diese speziellen biologischen Phänomene eingegangen werden. Wie im Abschnitt 2.6.4 beschrieben, kann durch konfokale Mikroskopie ein Protein durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Diese Eigenschaft bildet die Grundlage der *in vivo* Analyse von einzelnen Proteinen, bis hin zu komplexen biologischen Systemen, wie z.B. Kompartimenten. Von großem Interesse ist die Phase der Zellteilung, denn hierbei finden Prozesse statt, die die Entwicklung der entstehenden Tochterzellen entscheidend prägen. Unregelmäßigkeiten während der Zellteilung können pathologische Veränderungen der Zelle bzw. des Gewebes zur Folge haben.

### 3.1 Proteine und Markerproteine

Zellen sind aus einer Vielzahl von Proteinen aufgebaut, die mehr als die Hälfte ihres Trockengewichts ausmachen. Proteine bestimmen die Hülle und Struktur der Zelle und haben direkten Einfluss auf zelluläre Prozesse. Sie bestehen aus einer Kombination von bis zu zwanzig chemisch sehr unterschiedlichen Aminosäuren. Der Transport von Proteinen findet über drei verschiedene Wege statt:

- Transport über den Kernporenkomplex (*gated transport*).
- Transmembran Transport.
- Vesikulärer Transport.

#### Vesikel

Vesikel transportieren Proteine von einem Kompartiment zu einem anderen. Z.B. findet der Transfer von löslichen Proteinen vom Endoplasmatischen Reticulum (ER) zum Golgi-Apparat mit Hilfe von Vesikeln

statt. Ein Vesikel spaltet sich von einem Kompartiment ab, indem es wie ein Ball aufgeblasen wird, und wandert anschließend bis zu seinem Zielkompartiment. Dort dockt es an, verschmilzt mit diesem und gibt seinen Inhalt ab. Da diese Transportkontainer keine Membranen durchwandern können, bewegen sie sich nur zwischen topologisch ähnlichen Kompartimenten. Viele Arbeiten haben gezeigt, daß sich die Vesikel auf Mikrotubulis, den Hauptbestandteilen des Cytoskeletts einer Zelle, mit höheren Geschwindigkeiten fortbewegen [67].

### PML-Kompartimente

Der Zellkern enthält zahlreiche membranlose Sub-Strukturen [61], von denen viele als mobil klassifiziert worden sind [47]. Die Promyelocytic Leukemie-(PML) Kompartimente sind in den meisten Säugetier-Zellen vorhanden und sind bei akuten Promyelocytic Leukemie Patienten sehr stark über den Zellkern verstreut. Eine Vielzahl an Funktionen wurden diesen Kompartimenten zugeschrieben, wie das Speichern von Proteinen [46] oder die transkriptionelle Aktivierung [46]. Frühere Arbeiten von D. Spector et.al. zeigen den Trend, daß PML-Kompartimente lokale Protein-Ansammlungen oder Protein-Säure Komplexe aufspüren und markieren, falls deren Zusammensetzung suspekt oder artfremd ist [66]. In Säugetier-Zellen konnte ein typischer Radius von  $0,2\mu\text{m}$  bis  $1,0\mu\text{m}$  und eine typische Anzahl von 10-30 Stück dieser Kompartimente im Zellkern bestimmt werden.

#### 3.1.1 GFP und deren spektrale Varianten

Die Fluoreszenz des *Green Fluorescent Proteins* (GFP) wird seit 1990 eingesetzt, um Proteine unter herkömmlichen Mikroskopen durch Anregung mit einer spezifischen Wellenlänge sichtbar zu machen. Dieses Protein wird ebenso wie seine spektralen Varianten ([13],[72]) aus der Qualle *Aequorea victoria* extrahiert. Das Klonen der vollen cDNA von GFP [54], die fluoreszierende Eigenschaft in anderen Organismen ohne Co-Faktoren und die anhaltende Fluoreszenz von GFP nach der Fusion mit anderen Proteinen hat dieses Protein innerhalb der letzten Jahre zu den beliebtesten Markerproteinen gemacht. Mit dieser Technik der fluoreszierenden Marker XFP (X für die Vielzahl spektraler Varianten von GFP) steht eine Methode zur Verfügung, die es erlaubt, komplexe biochemische *in vivo* Experimente nicht-invasiv durchzuführen. Allerdings muss bei Experimenten mit GFP immer die Phototoxizität biologischer Substanzen gegenüber elektromagnetischer Strahlung berücksichtigt werden [63].

### 3.1.2 ATP

ATP (Adenosintriphosphat) ist in Lebewesen die wichtigste energetische Verbindung. ATP ist ein Molekül, das durch die Art seiner Bindungen einen besonders hohen Energieinhalt besitzt. Die drei Phosphatgruppen stoßen sich durch vier negative Ladungen, die auf engstem Raum angeordnet sind, stark voneinander ab. Die Bindungen – vor allem zwischen der letzten und vorletzten Phosphatgruppe – sind besonders energiereich und instabil und werden unter Freisetzung von Energie leicht gespalten (exogene Reaktion). Der Rest des Moleküls besteht aus dem Zucker Ribose und der organischen Base Adenin:



Die Energie  $E_{ex}$  (ca. 30kJ/mol), die bei der Spaltung des ATP in ADP (Adenosindiphosphat) und Phosphat (P) frei wird, darf aber nicht als Wärmeenergie verpuffen, sondern muß als chemische Energie für endogene Reaktionen zur Verfügung stehen. Dies gelingt durch Kopplung der exogenen (Energie liefernden) mit der endogenen (Energie verbrauchenden) Reaktion.

## 3.2 Die Zellteilung

### 3.2.1 Die Stadien der Zellteilung

Die Basisabläufe der Zellteilung sind in allen eukaryotischen<sup>1</sup> Zellen relativ ähnlich und schematisch in Abbildung 3.1<sup>2</sup> dargestellt. Aufgrund der Dynamik der Zellteilung ist es schwierig, typische Ausschnitte der Stadien statisch darzustellen. Sie durchläuft sechs Stadien. Die ersten fünf Stadien der Zellteilung bilden die Mitose; der sechste Schritt, der sich mit dem Ende der Mitose überschneidet, ist die Cytokinese. Die fünf Stadien der Mitose – Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase – sind als streng aufeinander folgende Schritte definiert. Die Cytokinese hingegen beginnt während der Anaphase und setzt sich bis zum Ende der M-Phase fort.

#### Interphase

In der Interphase befindet sich die Zelle im synthetisch aktiven Zustand. Die Chromosomen sind dekondensiert und im gesamten Zellkern verteilt.

---

<sup>1</sup>eukaryotischen Zellen besitzen im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen einen Zellkern und enthalten kompliziert gebaute Organellen wie z.B. Mitochondrien.

<sup>2</sup>Alberts et. al., Molecular Biology of the cell, Third Edition © 1995 Garland Publishing, Inc. 1994.

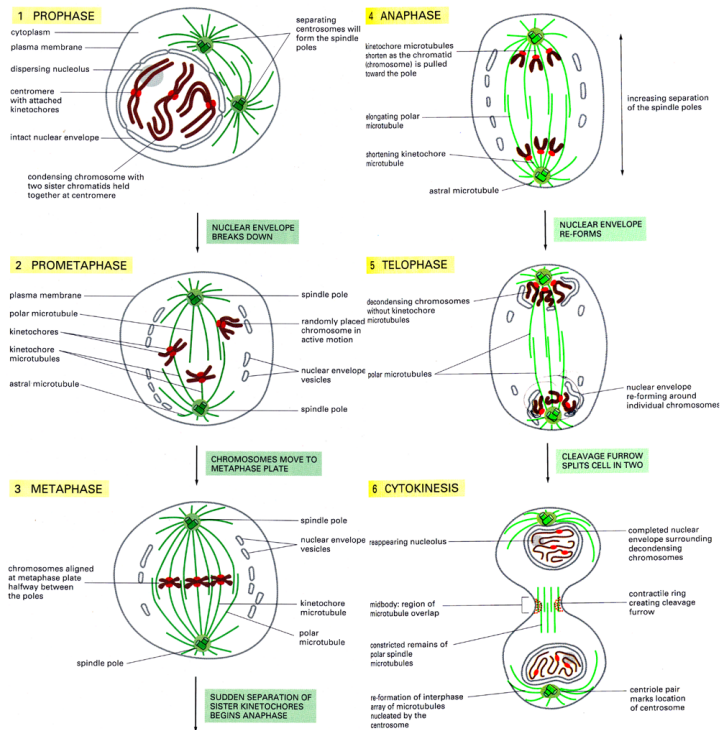


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Zellteilungsschritte.

Man bezeichnet sie mit dem Begriff Chromatin. Die Interphase gliedert sich in drei Abschnitte, der erste (G1) schließt sich an eine Zellteilung an und dient der Massenzunahme. Zellen, die sich nicht mehr teilen, befinden sich ebenfalls in dieser Phase, die dann als G0 bezeichnet wird. Die G1 / G0-Phase ist unterschiedlich lang und variiert sehr stark von Zelltyp zu Zelltyp. In der anschließenden S-Phase wird die chromosomale DNA und ihr assoziierte Proteine verdoppelt. In der darauf folgenden G2-Phase werden Strukturen für die folgende Mitose gebildet.

## Prophase

Unter dem Mikroskop gesehen beginnt der Übergang von der G<sub>2</sub>- zur M-Phase des Zellzyklus nicht zu einem festen Zeitpunkt, sondern ist eher als fließender Übergang anzusehen (Abbildung 3.1/1). Das Chromatin, das in der Interphase in diffuser Form vorliegt, beginnt sich langsam in genau definierte Chromosomen zu kondensieren. Dadurch sind die Chromosomen nun sehr komprimiert und besitzen einen Durchmesser von ca. 200nm. Jedes Chromosom hat sich in der vorangehenden S-Phase dupliziert und besteht aus jeweils zwei Schwesterchromatiden. Jedes Chromatid enthält eine spezifische DNA-Sequenz, das so genannte Centromer, das für die Trennung der Tochterzellen erforderlich ist. Gegen Ende der Propha-



se beginnen sich die cytoplasmatischen Mikrotubuli aufzulösen und der wichtigste Bestandteil der Mitose, die Mitosespindel, entsteht. Gleichzeitig löst sich der Zellkern auf und die Kernmembran öffnet sich. Die Mitosespindel ist eine bipolare Struktur, aufgebaut aus Mikrotubuli und zugehörigen Proteinen. Die Mitosespindel entsteht anfangs außerhalb des Zellkerns zwischen den sich trennenden Centrosomen.

### **Prometaphase**

Die Prometaphase startet mit dem plötzlichen Auflösen der Kernmembran. Die Kernhülle zerfällt in Membranvesikel, die von Teilen des ER nicht zu unterscheiden sind (Abbildung 3.1/2). Während der Zellteilung sind diese Vesikel um die Spindel angeordnet. Die Spindelmikrotubuli außerhalb des Zellkerns können nun in den Kernbereich eindringen. Spezielle Proteinkomplexe, die so genannten Kinetochoren, bilden sich an jedem Centromer und binden einen Teil der Spindelmikrotubuli, die man nun als Kinetochor-Mikrotubuli bezeichnet. Die verbleibenden Mikrotubuli in der Spindel werden polare Mikrotubuli genannt, die außerhalb der Spindel liegenden bezeichnet man als Astral-Mikrotubuli. Die Kinetochor-Mikrotubuli üben auf die Chromosomen einen Zug aus, der sie in periodische Bewegungen versetzt. Schon in diesem frühen Stadium der Mitose wird also die Voraussetzung dafür geschaffen, daß die Chromatiden während der Anaphase zu entgegengesetzten Spindelpolen wandern.

### **Metaphase**

Die Kinetochor-Mikrotubuli richten die Chromosomen in einer Ebene in der Mitte zwischen den Spindelpolen aus (Abbildung 3.1/3). Jedes Chromosom wird in dieser Metaphasenplatte durch den Zug der paarweise angeordneten Kinetochoren und der zugehörigen Mikrotubuli festgehalten. Diese Mikrotubuli sind an den beiden entgegengesetzten Spindelpolen angeheftet.

### **Anaphase**

Die Anaphase beginnt abrupt auf ein bestimmtes Signals hin (Abbildung 3.1/4). Dabei trennen sich die paarweise angeordneten Kinetochoren, so das jedes Chromatid langsam zu dem gegenüberliegenden Spindelpol gezogen werden kann. Alle neu getrennten Chromosomen bewegen sich mit derselben Geschwindigkeit von über  $1\mu\text{m}$  pro Minute. Zwei Bewegungsarten können dabei unterschieden werden. Während der Anaphase A verkürzen sich die Kinetochor-Mikrotubuli, wenn sich die Chromosomen

den Polen nähern. Während der Anaphase B dehnen sich die polaren Mikrotubuli und die zwei Pole der Spindel weichen auseinander. Am Ende der Anaphase sind zwei identische Chromosomensätze vollständig voneinander getrennt. Typischerweise dauert die Anaphase nur wenige Minuten (siehe Kapitel 13).

### **Telophase**

In der Telophase (griech. *telos*, Ende) lösen sich die Kinetochor-Mikrotubuli auf und die getrennten Tochterchromosomen erreichen die Pole und stoppen ihre Bewegung (Abbildung 3.1/5). Die polaren Mikrotubuli verlängern sich weiter und eine neue Kernhülle formiert sich um die beiden Gruppen von Tochterchromosomen. Die Chromosomen entspiralisieren sich zur Form des Chromatins und die Nucleoli – die in der Prophase verschwunden waren – tauchen wieder auf. Damit ist die Mitose beendet.

### **Cytokinese**

Das Cytoplasma teilt sich während der Anaphase auf die entstehenden Tochterzellen auf. Dieser Prozess ist in Abbildung 3.1/6 am Beispiel einer Tierzelle illustriert. Die Membran in der Mitte der Zelle, wird zwischen den Tochterkernen senkrecht zur Spindel nach innen gezogen und eine Teilungsfurche entsteht. Diese schmale Brücke besteht solange bis sie endgültig an jedem Ende abgeschnürt wird. Diese wird allmählich tiefer und erreicht schließlich die (dichtgepackten) Überreste der Mitosespindel zwischen den beiden Zellkernen. Zwei getrennte Tochterzellen mit demselben Chromosomensatz entstehen.

## Teil II

# Spezielle Methoden der Bildverarbeitung



# Kapitel 4

## Bildvorverarbeitung

Die Bildvorverarbeitung ist ein wesentlicher Schritt in der quantitativen Auswertung von Bilddaten. Meistens steht hier im Vordergrund, das SNR Verhältnis zu erhöhen und/oder Artefakte zu entfernen ohne wesentliche Informationen zu verlieren. Kanten oder die Anzahl der Objekte können z.B. Information darstellen. Operatoren lassen sich in punkt-, regionen- oder kantenbasierte Methoden einteilen. Punkt-Operatoren modifizieren jeden Pixel eines Bildes nach einer bestimmten Vorschrift, in die nur die Information eines Pixels eingeht. Typischer Vertreter dieser Operatorenklasse ist die Segmentierungsmethode, die auf einem Schwellwert basiert. Regionenbasierte Operatoren verwenden Informationen in einer fest vorgegebenen Nachbarschaft, dem sog. Strukturelement (*structuring element*), um daraus den neuen Pixelwert zu berechnen. Glättungsfilter sowie morphologische Filter basieren auf einem lokalen Verfahren wie später in Abschnitt 4.2 veranschaulicht wird. Eine weitere Klasse an lokalen Operatoren sind die gradientenbasierten Operatoren, hierbei werden Differenzen aus Zeilen bzw. Spalten gebildet um Kanten zu detektieren. In Abschnitt 6.1 werden am Beispiel des Canny-Filter die Prinzipien kantenbasierter Methoden dargestellt.

### 4.1 Abtasttheorem

Ein Signalstrom sei durch eine kontinuierliche Bildfunktion  $f(\mathbf{x})$  gegeben. Die diskrete Abtastung der kontinuierlichen Bildfunktion wird mathematisch als Multiplikation von  $f(\mathbf{x})$  mit einem periodisch angeordneten Gitter von Dirac'schen  $\delta$ -Funktionen  $\delta(\mathbf{x} - \mathbf{u}_{m,n})$  beschrieben:

$$f_s(\mathbf{x}) = f(\mathbf{x}) \sum_{m,n} \delta(\mathbf{x} - \mathbf{u}_{m,n}) \quad \circ \bullet \quad \hat{f}_s(\mathbf{k}) = \sum_{p,q} \hat{f}(\mathbf{k} - \hat{\mathbf{u}}_{p,q})$$

mit

$$\hat{\mathbf{u}}_{p,q} = \begin{bmatrix} p \square k_1 \\ q \square k_2 \end{bmatrix}, \quad p, q \in \mathbb{Z}, \quad \square k_w = \frac{1}{\Delta x_w}.$$

Gilt für das Spektrum einer kontinuierlichen Funktion  $\hat{f}(\mathbf{x})$ :

$$\hat{f}(\mathbf{x}) = 0 \quad \forall \quad |k_w| \geq \frac{\square k_w}{2},$$

d.h. ab einer Grenzwellenzahl, der so genannten *Nyquist*-Wellenzahl, wird das Frequenzspektrum abgeschnitten; dann kann es mit den abgetasteten Punkten mit der Schrittweite

$$\Delta x_w = \frac{1}{\square k_w}$$

exakt rekonstruiert werden. Das Abtasttheorem lässt sich anschaulich erklären, indem für die Rekonstruktion des ursprünglichen Signals ohne Qualitätsverlust jede Wellenzahl mit mindestens zwei Punkten abgetastet werden muss [34].

## 4.2 Morphologische Filter

Mathematische Morphologie ist eine Methode um geometrische Information aus Binär- und Grauwertbilder zu gewinnen. Morphologische Filter sind nichtlinear, da keine Transferfunktion für diese Klasse von Operatoren angegeben werden kann. Hier soll der Einfachheit halber nur auf die Methodik im Falle von Binärbildern eingegangen werden. Anwendungen auf Grauwertbilder sind ebenfalls möglich. Das Strukturelement definiert die lokale, einzubeziehende Nachbarschaft. Als Eingabegröße dienen die Grauwerte der Nachbarschaft, das Ergebnis wird durch eine Verknüpfung dieser Werte berechnet. Dabei ist das Ergebnis von der Größe und Beschaffenheit des Strukturelementes abhängig. In allen von mir implementierten morphologischen Operatoren wurde ein Block in drei Dimensionen mit 26 Elementen als Strukturelement eingesetzt (sogenanntes Schachbrett-Strukturelement). Die Operationsvorschrift basiert auf dem Strukturelement und wird auf das Originalbild angewandt. Das Ergebnis wird in einem neuen Bild an der Stelle des zentralen Pixels des Strukturelementes abgespeichert. Ebenfalls bekannt als Rangfolgeoperatoren sind es im wesentlichen folgende morphologische Operatoren, die in der Praxis die häufigste Anwendung finden:

### **Erosion:**

Ein Operator, der die Bedingung

$$\Psi_\epsilon(F_1 \cap F_2) = \Psi_\epsilon(F_1) \cap \Psi_\epsilon(F_2) \quad (4.1)$$

erfüllt, wird als binäre Erosion bezeichnet, wobei  $F_1$  und  $F_2$  für ein Paar von binären Bildern steht. Jede translationsinvariante Erosion ist von der Form

$$\Psi_\epsilon(F) = \bigcap_{b \in B} F - b = F \ominus B \quad (4.2)$$

für eine elementare Untermenge  $B \in \mathbb{R}^n$  ( $n \in \mathbb{N}^+$ ), ebenfalls bekannt als das Strukturelement. In der Mengentheorie wird die translationsinvariante Erosion als *Minkowski subtraction* bezeichnet. Anschaulich bedeutet dies, daß die Erosion einen durch das Strukturelement definierten Bereich vom Objekt abträgt, dieses also an den Objektgrenzen schrumpfen lässt.

### Dilatation:

In Analogie zur Erosion gilt für die binäre Dilatation die Bedingung

$$\Psi_\delta(F_1 \cup F_2) = \Psi_\delta(F_1) \cup \Psi_\delta(F_2), \quad (4.3)$$

wobei  $F_1$  und  $F_2$  für ein Paar von binären Bildern steht.

Die Erosion kann als logische *AND* Operation aufgefasst werden, bei dem das zentrale Pixel oder Voxel nur dann auf eins gesetzt wird, wenn alle Elemente innerhalb des Strukturelements den Wert eins haben. Analog gilt für die Dilatation, daß diese als logische *OR* Operation auf den Elementen des Strukturelements repräsentiert werden kann.

### Median:

Das Median Filter kann schematisch folgendermaßen auf Grauwertbilder beschrieben werden:

- Alle Grauwerte im Strukturelement werden der Reihe nach in einem eindimensionalen Array sortiert.
- Das zentrale Element bekommt den Medianwert dieser Grauwertverteilung zugewiesen.

Dieses Filter bietet bei einigen wenigen Grauwert-Ausreißern eine effektive Art der Glättung und Eliminierung von Pixel-Artefakten. Der Nachteil bei dieser Art von Filterung ist, wie bei der Glättung mit einem Gauß Kern, daß über alle Bereiche des Bildes gleich stark geglättet wird, also Kanten und Rauschen in die Filterung gleichwertig eingehen.

Durch Kombination von Erosion und Dilatation werden zwei neue Filter erzeugt, das *Opening*- und *Closing*-Filter. Diese Filter haben gemeinsam, daß es sich hierbei um idempotente Operatoren handelt, eine oft gewünschte Eigenschaft an Filtern. Mehrmalige Anwendung eines idempotenten Filters hat keine Änderung des Ergebnisses zur Folge. Der ideale Bandpass-Filter ist ein Beispiel für diese Klasse von idempotenten Operationen.

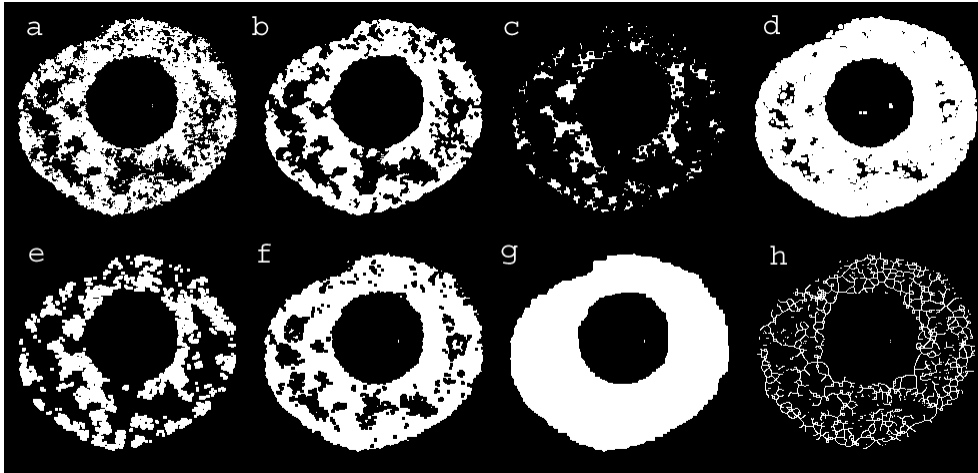


Abbildung 4.1: Veranschaulichung der Wirkungsweise morphologischer Operatoren. **a** Binärbild. **b** Median Filter. **c** Erosions Filter. **d** Dilatations Filter. **e** *Opening* Filter mit einer Iteration. **f** *Closing* Filter mit einer Iteration. **g** *Closing* Filter mit fünf Iterationen. **h** *Thinning* Filter mit fünf Iterationen.

#### Opening:

Die Verknüpfung von Dilatation nach Erosion

$$F \circ B = (F \ominus B) \oplus B \quad (4.4)$$

ist bekannt als strukturelles *Opening*, da es ein Strukturelement  $B$  mit einbezieht.

#### Closing:

Die Kombination von Erosion, angewandt auf die Dilatation

$$F \bullet B = (F \oplus B) \ominus B \quad (4.5)$$

wird als strukturelles *Closing* bezeichnet.

#### Skeleton:

Das (euklidische) *Skeleton* eines Objekts stellt eine Struktur mit der Breite eines Pixels dar und bildet innerhalb des Objekts die zentrale Achse der Objektform. Diese Struktur wurde als erstes 1967 durch Blum [5] beschrieben, der ihr den Namen *medial axis* gab. Aus diesem Binärbild können nützliche Informationen der Objekte, wie z.B. Topologie, Orientierung und Konnektivität, abgeleitet werden.

#### Thinning:



Der *Thinning*-Operator kann als ein Spezialfall der Erosion angesehen werden und erfüllt zusätzliche Bedingungen [34]:

- Ein Objekt darf nicht in mehrere Objekte geteilt werden.
- Endpunkte eines Objektes dürfen nicht erodiert werden.
- Ein einzelner Objektpixel darf nicht entfernt werden.

Mit diesen Modifikationen wird deutlich, daß die Objekte bei iterativer Anwendung des Operators bis hin zur Konvergenz skelettiert werden. Um die Funktionsweise der dreidimensionalen morphologischen Filter besser zu veranschaulichen, sind in Abbildung 4.1 einige Binärbilder dargestellt, die jeweils mit einem dreidimensionalen Strukturelement der Größe  $5 \times 5 \times 5$  modifiziert wurden. Das Ausgangsbild ist in Abbildung 5.1.a auf Seite 45 abgebildet.

#### **Euclidean Distance Map:**

Von jedem Objektpunkt des Bildes wird die euklidische Distanz von einem zum nächstliegenden Pixel bestimmt, der nicht zu einem Objekt gehört (z.B. dem Hintergrund angehört). Dieser positive Wert wird anstelle des Binärwertes an der Stelle der aktuellen Pixelposition abgelegt; die Bildgröße der *euclidean distance map* besitzt die gleiche Dimension wie das Originalbild. Probleme, z.B. beim Ausrechnen des Umfangs, entstehen meist, da Distanzen nicht in allen Raumrichtungen isotrop sind. So ist der Abstand vom Zentralpixel zu den Diagonalelementen um  $\sqrt{2}$  verschoben.

## **4.3 Glättungsfiler und deren Anwendung**

Im Kapitel 4.2 wurde ein nichtlineares Glättungsfiler, der Medianfiter, vorgestellt. Mit der Methode der Faltung (*convolution*) ist es möglich, Bilder oder Bildbereiche zu glätten bzw. zu mitteln. Diese Klasse von Filtern haben wichtige Eigenschaften wie z.B. Verschiebungsfreiheit und Erhaltung des Mittelwerts, im Idealfall noch eine monoton fallende Transferfunktion und Isotropie [34].

### **4.3.1 Rechteckfiter**

Ein einfaches Verfahren, Bildbereiche zu glätten, ist die Anwendung eines Rechteckfilters. Hierbei werden die einzelnen Bildpunkte innerhalb der Filtermaske addiert und durch die Anzahl der Pixel geteilt. Ein solches Fiter wird folgendermaßen mittels ein  $1 \times 3$  Fiter dargestellt:

$${}^3\mathcal{R} = \frac{1}{3}[1 \ 1 \ 1].$$

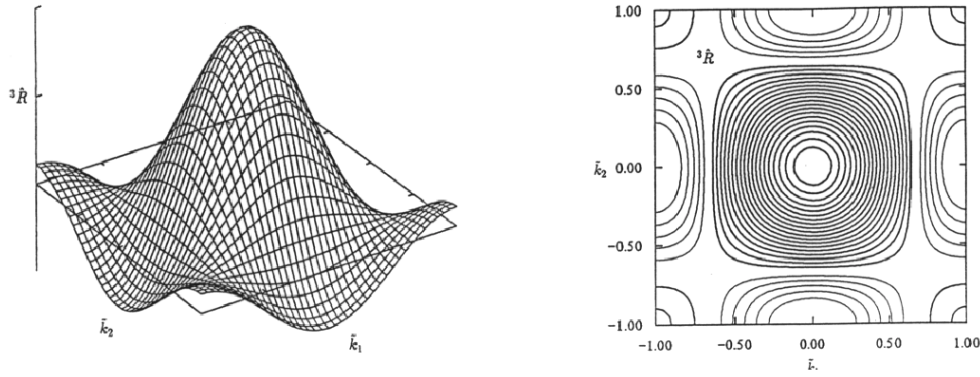


Abbildung 4.2: **Links** Transferfunktion eines  $3 \times 3$  Rechteckfilters. **Rechts** Projektion der Transferfunktion auf eine Ebene.

Beim Betrachten der Transferfunktion von Rechteckfiltern fällt auf, daß diese Klasse von Glättungsfiltern nicht optimal ist. Die Amplitudendämpfung nimmt nicht monoton mit der Wellenzahl zu, sondern oszilliert. Strukturen mit den höchsten Wellenzahlen werden nicht stark genug gedämpft, wie aus Abbildung 4.2 zu entnehmen ist. Beim Entwickeln von mehrdimensionalen Filtermasken kann die Eigenschaft der Separierbarkeit ausgenutzt werden. Das Filter lässt sich in eine horizontale  ${}^3\mathcal{R}_x$  und vertikale Komponente  ${}^3\mathcal{R}_y$  zerlegen bzw. durch diese zusammensetzen:

$${}^3\mathcal{R} = {}^3\mathcal{R}_x * {}^3\mathcal{R}_y = \frac{1}{9} \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} = \frac{1}{3} [1 \ 1 \ 1] * \frac{1}{3} \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \\ 1 \end{bmatrix}.$$

Da der Faltung im Ortsraum eine Multiplikation im Fourierraum gegenübersteht, kann die Transferfunktion einfach berechnet werden. Ein wesentlicher Vorteil von Rechteckfiltern ist die schnelle und effiziente Berechnung, unabhängig von der gewählten Filtermaske.

### 4.3.2 Binomialfilter

Eine effiziente Klasse von Glättungsfiltern, die die Probleme der Rechteckfilter im vorhergehenden Abschnitt umgeht, sind die Binomialfilter. Diese Filter besitzen eine stetig fallende Transferfunktion, die für hohe Wellenzahlen ohne Oszillationen gegen Null abfällt und stets positiv ist (siehe Abbildung 4.3). Außerdem lassen sich Binomialfilter durch Ausnutzen der Separabilität einfach implementieren. Die Basis dieses Filters ist durch

$$\mathcal{B} = \frac{1}{2} [1 \ 1]$$

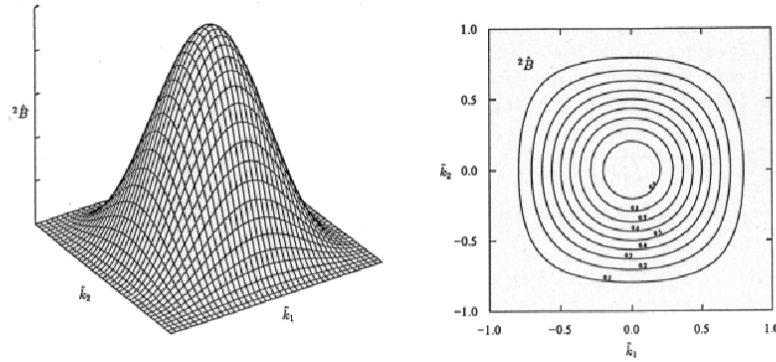


Abbildung 4.3: **Links** Transferfunktion des Gauß Kerns, approximiert mit einer  $3 \times 3$  Binomial-Filtermaske. **Rechts** Die Projektion der Gauß-Transferfunktion auf eine Ebene.

gegeben und mittelt die Grauwerte zweier benachbarter Bildpunkte. Wenn diese Maske  $p$ -mal hintereinander angewendet wird, ergibt sich folgende Filtermaske

$$\frac{1}{2^p} \underbrace{[1 \ 1] * [1 \ 1] * \dots * [1 \ 1]}_{p\text{-mal}}$$

bzw. mit den Operatoren  $\mathcal{B}$  ausgedrückt ergibt sich

$$\mathcal{B}^p = \underbrace{\mathcal{B}\mathcal{B}\dots\mathcal{B}}_{p\text{-mal}}$$

Durch  $p$ -maliges Anwenden der Basis-Filtermaske  $\mathcal{B}$  werden nach der Vorschrift des Pascal'schen Dreiecks die Koeffizienten der diskreten Binomialverteilung gewonnen.  $p$  muß als die Ordnung des Binoms,  $f$  als der Skalierungsfaktor  $2^{-p}$  und  $\sigma^2$  als die Varianz oder effektive Breite der Maske zugeordnet werden. Durch Faltung eines horizontalen  $\mathcal{B}_x^p$  mit einem vertikalen  $\mathcal{B}_y^p$ , jeweils eindimensionalen Binomialfilter lässt sich der zweidimensionale Binomialfilter generieren:

$$\mathcal{B}^p = \mathcal{B}_x^p \mathcal{B}_y^p$$

und für  $p = 2$  ergibt sich folgende Filtermaske:

$$\mathcal{B}^2 = \frac{1}{4} [1 \ 2 \ 1] * \frac{1}{4} \begin{bmatrix} 1 \\ 2 \\ 1 \end{bmatrix} = \frac{1}{16} \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 2 & 4 & 2 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix}$$

Die Maske des Binomialfilters hat näherungsweise die Gestalt der Gauß-Glockenkurve und wird für größere Filterkerne immer besser approximiert. Die Werte sind die Binomialkoeffizienten in der Anordnung aus

dem Pascalschen Dreieck. Ihre Summe wird auf eins normiert. Höhere Dimensionen lassen sich ebenfalls durch Ausnutzen der Separabilität analog implementieren, wie hier am Beispiel der Zweidimensionalität gezeigt.

### 4.3.3 Die anisotrope Diffusion

Diffusionsalgorithmen entfernen Rauschen aus einem Bild durch die Modifizierung des Bildes mit einer partiellen Differentialgleichung (PDE) [7]. In Analogie zur isotropen Diffusionsgleichung der Wärmeleitung, gegeben durch

$$\frac{\partial I(x, y, z, t)}{\partial t} = \operatorname{div}(\nabla I), \quad (4.6)$$

werden an die Stelle des zu diffundierenden Mediums die Grauwerte des Bildes  $I(x, y, z, 0)$  als Anfangsbedingung gesetzt, wobei  $I(x, y, z, 0) : \mathbb{R}^2 \mapsto \mathbb{R}^+$  ein Bild im Kontinuum darstellt.  $x, y, z$  repräsentieren die räumliche Position,  $t$  ist ein artifizierlicher Zeitschritt und  $\nabla I$  ist der Gradient des Bildes. Diese Art der isotropen diffusiven Filterung ist äquivalent zur Filterung mit einem Gauß-Filter. Gleichung 4.6 wurde von Perona und Malik abgeändert um die Glättung an Kanten (hohen Gradienten) zu stoppen:

$$\frac{\partial I(x, y, z, t)}{\partial t} = \operatorname{div}[g(\|\nabla I\|) \cdot \nabla I]. \quad (4.7)$$

Die so genannte *edge-stopping* Funktion  $g(\|\nabla I\|)$  muss für große Gradienten gegen Null konvergieren:  $g(r) \rightarrow 0$  falls  $r \rightarrow \infty$ . In dieser Arbeit implementierte ich ein anisotropes Filter, das auf der Tukey's Psi doppelt-gewichteten robusten Schätzung basiert. Diese Funktion bietet gegenüber anderen *edge-stopping* Funktionen, wie z.B. der Funktion nach Perona-Malik, den Vorteil des schärferen Glättens an Kanten [67]. Es gelten folgende Relationen:

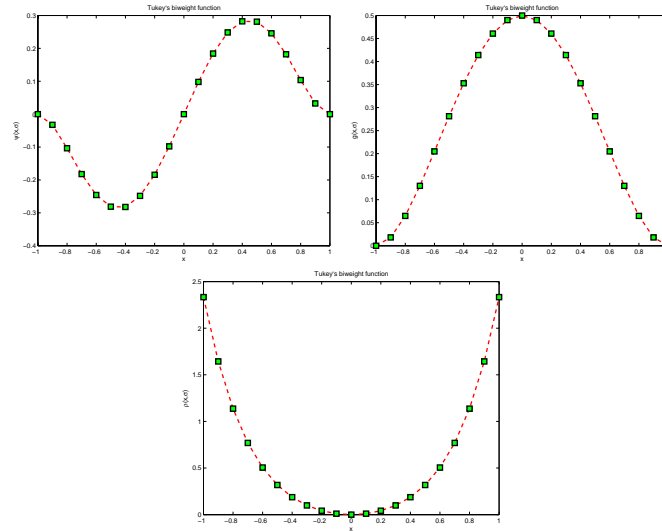
$$g(x) = a \frac{\rho'(x)}{x} = a\psi(x)$$

mit  $a = \frac{\sigma^2}{4}$ ,  $\sigma$  als Skalierungsparameter und  $\rho$  als robuste Fehlernorm.

$$\rho(x, \sigma) = \begin{cases} \frac{x^2}{\sigma^2} - \frac{x^4}{\sigma^4} + \frac{x^6}{3\sigma^6} & |x| \leq \sigma \\ \frac{1}{3} & \text{sonst} \end{cases}$$

$$g(x, \sigma) = \begin{cases} \frac{1}{2} \left(1 - \left(\frac{x}{\sigma}\right)^2\right)^2 & |x| \leq \sigma \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

$$\Psi(x, \sigma) = \begin{cases} x \cdot \left(1 - \left(\frac{x}{\sigma}\right)^2\right)^2 & |x| \leq \sigma \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

Abbildung 4.4: Tukey's Psi Funktion  $\Psi(x, \sigma)$ ,  $g(x, \sigma)$  und  $\rho(x, \sigma)$ 

In der Anwendung zeigte sich, daß eine Erhöhung des SNR in Fluoreszenzbilder am effektivsten mit anisotroper Diffusion zu erreichen ist ([70],[68]). Gerade in Kombination mit kantenbasierten Techniken zur Segmentierung ist dieser Filter ein wichtiges Werkzeug um das Bild von Störungen zu befreien ohne wesentliche Kanteninformationen zu vernichten.

## 4.4 Regionenwachstum als *Labelling* der Objekte

Benachbarte Pixel in 2D bzw. Voxel in 3D werden mit einem Regionenwachstumsverfahren einzelnen Objekten zugeordnet. Dabei wird ein initialer Startpunkt (*seed point*) gesetzt, die Nachbarschaft um diesen Punkt wächst iterativ bis man auf eine Kante stößt bzw. alle zusammenhängenden Pixel erkannt sind. Dieser Algorithmus arbeitet auf der Basis von Binärbilder, das Strukturelement definiert die Nachbarschaftsbeziehung der Pixel untereinander. Hier gibt es in 2D die Möglichkeit einer 4er bzw. 8er Nachbarschaft, in drei Dimensionen 6er, 18er oder 26er Nachbarschaften [34]. Oft müssen die Bilder zur Rauschunterdrückung mit geeigneten Vorverarbeitungsmethoden bearbeitet werden (siehe Kapitel 4.3). Das Regionenwachstumsverfahren wurde als Stackaufruf implementiert um die Geschwindigkeit zu erhöhen. Die Vorgehensweise wird anhand des folgenden Pseudocodes veranschaulicht:

- 1: struct pixel
- 2: stack sPixel

```

    {Gehe zum ersten, nicht gelabelten Pixel und weise der Struktur pixel
    dessen Koordinaten zu}
    sPixel.push(pixel);
3: while (!sPixel.empty()) do
4:   {Es wird solange dasselbe Label vergeben bis keine Objekte mehr
    im Stack sind}
    pixel = sPixel.top();
    {Entferne das letzte Element vom Stack}
    sPixel.pop();
    {Vergleiche die Koordinaten in alle 26 Richtungen, hier nur in die
    Richtung Osten (x+1)}
5:   if rawImage[pixel.z][pixel.y][pixel.x+1] == iThreshold then
6:     {Das aktuelle Objekt muss wieder in den Stack zurück da Nach-
    barn vorhanden sind}
    sPixel.push(pixel);
    {Weise der Struktur die gefundenen Koordinaten zu, hier nur in
    die Richtung Osten (x+1)}
    pixel.x = pixel.x+1;
    {Lege die Struktur auf dem Stack ab}
    sPixel.push(pixel);
    {Weise dem Pixel das aktuelle Label zu}
    rawImage[pixel.z][pixel.y][pixel.x] = iCurrentLabel;
7:   else if Überprüfe die Nachbarschaft des Objektes then
8:     {Verfahre analog zu Zeile 5 ...}
9:   end if
10: end while

```

# Kapitel 5

## Registrierung

Die Registrierung ist eine Methode zur Bestimmung der räumlichen Transformation, die zwei räumliche Datenmengen zur Überlagerung bringt. Diese Methode ist wichtig für die Korrektur/Eliminierung von Störungen in Bildsequenzen. Bilder, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommen wurden, können durch mehrere Faktoren überlagert und gestört sein, wie z.B.:

- Eigenbewegung von lebenden Zellen auf dem Objektträger.
- Äußere Einflüsse auf die Messapparatur bzw. Änderung der Kameraperspektive.

Diese Störungen der eigentlichen, zu quantifizierenden Dynamik kann mit Hilfe von Registrierungsmethoden korrigiert werden [45]. Welche Art von Registrierung – rigide oder nicht-rigide – eingesetzt wird, hängt oft von den Aufnahmebedingungen und deren induzierten Problemen ab. In den nächsten Kapiteln wird ein kurzer Überblick der verschiedenen Verfahren gegeben und anhand von Beispielen illustriert.

### 5.1 Rigide Transformation

Die rigiden (starren) Transformationen (oder eigentliche Bewegungen) sind definiert als geometrische Transformationen, die durch die Hintereinanderausführung einer Rotation und einer Translation gegeben sind. Diese Transformationen sind längen- und winkeltreu; sie erhalten die Krümmung von Linien (wie auch die Krümmung von Oberflächen), sowie die Winkel zwischen Linien. Rigide Transformationen sind einfach festzulegen. Die Methode besteht darin, zwei Komponentenvektoren zu bestimmen, die Translation und die Rotation. Die Translation wird beschrieben durch einen dreidimensionalen Vektor  $\mathbf{t}$ , gegeben durch die drei Koordinaten  $\mathbf{t} = (t_x, t_y, t_z)^t$  relativ zu den kartesischen Achsen  $x, y, z$  bzw. zu

anderen Koordinatensystemen (z.B. sphärische Polarkoordinaten). Für die Beschreibung der Rotationskomponenten gibt es viele Möglichkeiten, wie z.B. die Euler Winkel oder orthogonale Matrizen. Mit orthogonalen Matrizen kann die rigide Transformation durch

$$\mathbf{x}' = R\mathbf{x} + \mathbf{t} \quad (5.1)$$

beschrieben werden, wobei  $R$  eine orthogonale  $3 \times 3$  Matrix mit den Eigenschaften  $R^t R = R R^t = I$  und  $R^{-1} = R^t$  ist. Diese Klasse an Matrizen enthalten sowohl Rotationen als auch Spiegelungen, wie z.B. die Transformation einer rechten Hand auf die linke. Ungeeignete Spiegelungen können unter Ausnutzen der Nebenbedingung  $\det(R) = +1$  eliminiert werden.

Um nun die geeignete Rotation und Translation zu finden, die physikalisch bzw. anatomisch korrespondierende Punkte in den beiden Datenmengen  $X$  und  $Y$  möglichst nahe zusammenbringt, wird ein Ähnlichkeitsmaß definiert, das dann minimiert wird. Sind bereits Korrespondenzen zwischen Punkten in den Punktmenngen  $X$  und  $Y$  bekannt, so wird als ein Maß des globalen Registrierungsfehlers meist der mittlere quadratische Fehler berechnet, der folgendermaßen definiert ist:

$$FRE_i^2 = \frac{1}{N} \sum_i^N w_i^2 FRE_i^2, \quad (5.2)$$

wobei

$$\mathbf{FRE}_i = T(\mathbf{x}_i) - \mathbf{y}_i \quad (5.3)$$

als *fiducial registration error* ( $FRE$ ) bezeichnet wird und  $\mathbf{x}_i$  und  $\mathbf{y}_i$  die korrespondierenden Bezugspunkte aus den zwei Welten  $X$  und  $Y$  darstellen. In Gleichung 5.2 gehen zum Auffinden der optimalen Transformation die Anzahl der Bezugspunkte  $N$  und der nicht-negative Gewichtungsfaktor  $w_i^2$  ein. Im Falle der rigiden Transformation muss nach einem  $R$  und  $\mathbf{t}$  gesucht werden, das die Gleichungen 5.2 und 5.1 folgendermaßen kombiniert:

$$\min\left(\sum_i^N w_i^2 |\mathbf{x}_i' - \mathbf{y}_i|^2\right) = \min\left(\sum_i^N w_i^2 |R\mathbf{x}_i + \mathbf{t} - \mathbf{y}_i|^2\right) \quad (5.4)$$

Die Wahl der Minimierungsstrategie ist wesentlicher Bestandteil zum Auffinden einer globalen Lösung, gängige Ansätze werden in [59] diskutiert.



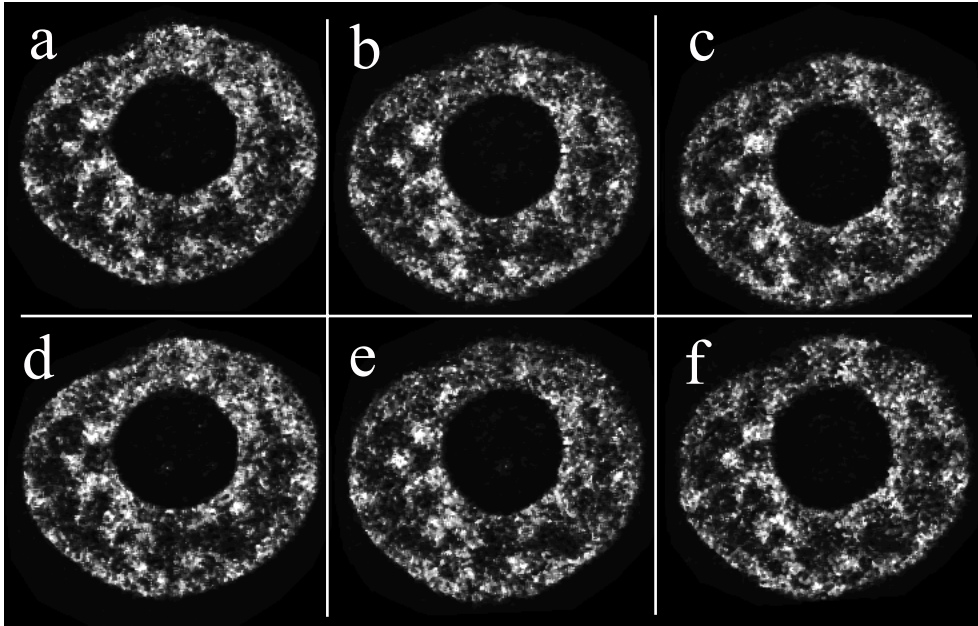


Abbildung 5.1: Die obere Reihe enthält drei Bilder, aufgenommen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. In der Reihe darunter sind die registrierten Bilder abgebildet. Dabei repräsentiert das linke Bild den ersten, das mittlere Bild den mittleren und das rechte Bild den letzten Zeitpunkt.

## 5.2 Nicht-rigide Transformation

### 5.2.1 Streckungen

Die einfachste nicht-rigide Transformation ist die Einführung einer Skalierung bei der rigiden Transformation nach Abschnitt 5.1:

$$\mathbf{x}' = RS\mathbf{x} + \mathbf{t} \quad (5.5)$$

und

$$\mathbf{x}' = SR\mathbf{x} + \mathbf{t}, \quad (5.6)$$

wobei  $S = \text{diag}(s_x, s_y, s_z)$  die Diagonalmatrix darstellt, dessen Elemente die Skalierungsfaktoren entlang der drei Koordinatenachsen repräsentieren. Da im Allgemeinen  $RS \neq SR$ , resultieren aus Gleichung 5.5 und 5.6 zwei verschiedene Klassen an Transformationen. Diese Transformationen sind längen- und winkeltreu. Gleichung 5.5 und 5.6 lassen sich zu

$$\mathbf{x}' = sR\mathbf{x} + \mathbf{t}, \quad (5.7)$$

zusammenfassen, wenn gilt  $s_x = s_y = s_z = s$ , wenn also die Skalierung isotrop ist. Diese Transformation wird z.B. eingesetzt, wenn Kalibrierungsfehler von Aufnahmen zu eliminieren sind. Die Streckung und auch

die Schubstreckung (eine Streckung verknüpft mit einer Translation) sind Sonderfälle der affinen Transformation. Analog zur rigiden Transformation kann die Registrierung auf folgendes Minimierungsproblem

$$\min\left(\sum_i^N w_i^2 |sR\mathbf{x}_i + \mathbf{t} - \mathbf{y}_i|^2\right) \quad (5.8)$$

reduziert werden (vergleiche Gleichung 5.4). In Abbildung 5.1 ist das Ergebnis einer Streckung von dreidimensionalem Chromatin innerhalb des Zellkerns<sup>1</sup> dargestellt. Zu sehen ist eine fokale Ebene aus einem dreidimensionalen Bild für drei unterschiedliche Zeitpunkte. Man kann gut erkennen, daß die Drift des Zellkerns im mittleren und rechten Zeitpunkt nach unten durch die Registrierung sehr gut korrigiert werden konnte. In diesem Beispiel wurde die Registrierungssoftware AIR<sup>2</sup> benutzt.

### 5.2.2 Affine Transformation

Die Komponenten  $a_{ij}$  der Transformationsmatrix  $A$  können beliebige Werte annehmen. Der Unterschied zur rigiden Transformation besteht darin, daß eine Änderung der Winkel zwischen Geraden möglich ist. Die affine Abbildung ist geraden-, parallelen- und teilverhältnistreu. Das transformierte Objekt läßt sich mit der Transformationsbedingung

$$\mathbf{x}' = A\mathbf{x} + \mathbf{t} \quad (5.9)$$

beschreiben. Wie in der rigiden Transformation werden Minimierungsverfahren zum Auffinden einer optimalen Transformation eingesetzt. Für die Registrierung lokaler Deformationen sind Methoden, die auf *Thin-Plate splines* basieren, besonders gut geeignet [18].

---

<sup>1</sup>Dargestellt mit dem fluoreszierenden Marker 33342 der Firma Hoechst.

<sup>2</sup>Automated Image Registration, <http://bishopw.loni.ucla.edu/AIR5/>.

# Kapitel 6

## Segmentierung

Die Segmentierung wird eingesetzt, um Objekte vom Hintergrund zu trennen. Das einfachste Segmentierungsverfahren basiert auf einem Grauwert-Schwellwert, d.h. Pixel, deren Grauwert über einem bestimmten Wert liegen, werden als Objektpixel erkannt. Alle anderen Pixel werden dem Hintergrund zugewiesen. Kantenbasierte Methoden arbeiten auf der ersten Ableitung mit anschließendem Auffinden des Extremwertes, dem Grauwertgradienten im Bild, bzw. auf der zweiten Ableitung. In allen Fällen erhält man nach der Segmentierung ein Binärbild. Meist ist in aufgenommenen Bildern die Objektkante nicht scharf vom Hintergrund abgetrennt bzw. durch Rauschen überlagert, was den Einsatz von geeigneten Vorverarbeitungsschritten erfordert (siehe Kapitel 4). Um verschiedene, nichtverbundene Objekte zu klassifizieren, kann ein Regionenwachstum eingesetzt werden (siehe Kapitel 4.4).

### 6.1 Kantenbasierte Segmentierung

Der Kantenoperator nach Canny [12] ist seit über 15 Jahren in vielen Bereichen der Bildverarbeitung etabliert. Er basiert auf den ersten Ableitungen des Gauß-gefilterten Bildes. Nach dem Einsatz komplexer *Thinning-* und *Linking-*Methoden (*non-maxima suppression* und *hysteresis thresholding*) werden Kanten als solche erkannt, wenn der Betrag des Gradienten ein Maximum annimmt. Bildstörungen werden mit diesem Kantendetektor im Vergleich zu anderen kantenbasierten Verfahren (z.B. Sobel-Filter) geringer gewichtet und schwach ausgebildete Kanten werden erkannt. Das Resultat dieses Filters hängt wesentlich von der Qualität des Bildmaterials ab, speziell vom SNR, und kann durch Bildvorverarbeitungsschritte entscheidend beeinflusst werden. Regularisierte Filter, wie z.B. der Canny Operator, sind Filter, die zwar in eine Richtung ableiten, aber in alle anderen Richtungen glätten. Dies funktioniert, weil die Glättung senkrecht zur Gradientenrichtung keine Kante verwischt.

Kantenbasierte Verfahren zum Segmentieren sind im Allgemeinen sehr sensitiv gegenüber Rauschen. Oft werden mit einfacheren, punktbasierten Verfahren über einen Schwellwert bessere Ergebnisse erzielt. Gerade bei Mikroskopaufnahmen mit Markerproteinen ist das Signal nicht homogen über das Objekt verteilt, sondern an diskreten Positionen (siehe Abbildung 13.1 auf Seite 111). Die folgende algorithmische Struktur soll die Funktion des Canny-Operators verdeutlichen:

- Faltung des Bildes mit einem Gauß-Filter (siehe Kapitel 4.3) mit der Standardabweichung  $\sigma$ .
- Schätzung der lokalen Kantennormalenrichtung  $n$  für jeden Pixel im Bild.
- Finden der Lage der Kanten (*non-maxima suppression*).
- Berechnung des Betrags der Kante.
- Hysteresis-Schwellwert zur Unterdrückung von Falschanzeigen.
- Wiederholung der ersten fünf Punkte für ansteigende  $\sigma$  und Aufsummierung der Ergebnisse mit der so genannten *Feature synthesis*-Methode. Diese Methode ist als Heuristik definiert und dient dazu, mehrfach gefundene Kanten auf unterschiedlichen Skalen zu vermeiden.

Ein weiterer wichtiger Kantenoperator ist der *Marr-Hildreth* Operator. Dieser benutzt den *Laplacian-of-Gauss* (LoG) Faltungskern. Es sei  $f(x)$  eine  $C^2$  reelle eindimensionale Funktion auf  $\mathbb{R}$ . Bei den Extrempunkten von  $|f'(x)|$  wechselt die zweite Ableitung  $f''(x)$  ihr Vorzeichen. Ein Extremwert des Gradienten entspricht einem Wechsel von konkav zu konvex bzw. umgekehrt. Somit können Kantenpunkte des geglätteten Bildes als Nullstellen der zweiten Ableitung definiert werden. Eine Verallgemeinerung auf zwei Dimensionen führt auf die Kantendetektionstheorie von Marr-Hildreth [44]. Hildreth und Marr ersetzten in zwei Dimensionen  $f''(x)$  durch  $\Delta f(\mathbf{x}) = \frac{\partial^2 f(\mathbf{x})}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f(\mathbf{x})}{\partial y^2}$ .

## 6.2 Pyramidenstrukturen

Die Darstellung eines Bildes auf unterschiedlichen Auflösungsstufen ist in der Bildverarbeitung weit verbreitet. Die Gauß- und Laplacepyramide sind die wichtigsten Vertreter der multiskalen Repräsentation von Bildern. Auf diesen Bilddarstellungen lassen sich z.B. Segmentierungsmethoden auf unterschiedlichen Skalen implementieren [34].

### 6.2.1 Die Gauß- und Laplacepyramide

Will man bei der Bildanalyse nicht nur kleine Umgebungen in der Größenordnung von einigen Pixeln untersuchen, benötigt man größere Filtermasken. Wenn man auch mit großen Filtermasken in der Lage ist, großskalige Informationen zu extrahieren, so haben große Filtermasken doch den Nachteil großen Rechenaufwands. Dieser steigt quadratisch oder in dritter Potenz zur Maskengröße. Eine Verdopplung der Maskengröße führt bei zweidimensionalen Bildern zu einer Vervierfachung, bei dreidimensionalen Bildern zu einer Verachtfachung des Rechenaufwandes. Bei einer um den Faktor 10 größeren Maskengröße steigt der Rechenaufwand um den Faktor 100 bzw. 1000. Ein weiteres Problem liegt in der Abhängigkeit der Qualität einer Bildanalyse von der Auflösung. Die Gauß- und auch die Laplacepyramide lösen beide Probleme. Beide Pyramidenstrukturen speichern Bilder in verschiedenen Auflösungen.

Da bei der Darstellung eines Bildes mit einer niedrigeren Auflösung das Abtasttheorem (siehe Abschnitt 4.1) zu beachten ist, um Störeffekte zu vermeiden, muß ein Glättungsfilter hierfür gewissen Anforderungen genügen. Glättet man ein Bild mit einem Glättungsfilter soweit, daß alle Wellenzahlen unter der halben Grenzwellenzahl bleiben, so kann man es nach dem Abtasttheorem auf doppelt so großem Raster ohne Informationsverlust darstellen.

Allgemein hat der Glättungsfilter folgenden Bedingungen

$$\hat{\mathcal{B}}(\tilde{\mathbf{k}}) = 0 \quad \forall \quad \tilde{k}_p \geq \frac{1}{u_p}$$

mit der Abtaste  $u_p$  in die Richtung der  $p$ -ten Koordinate zu genügen. Die mit der Tilde gekennzeichneten Variablen repräsentieren verallgemeinerte, dimensionslose Größen. Dabei werden Frequenzen meist auf die Grenzfrequenz normiert (siehe Kapitel 4.1). Ist eine Variable mit einem Dach gekennzeichnet, wie z.B.  $\hat{f}$ , dann ist damit die Fouriertransformierte der Funktion  $f$  gemeint. Halbiert man mit einem solchen Glättungsfilter die Wellenzahl eines Bildes, ergibt sich ein um den Faktor vier kleineres Bild. Die Folge solcher kleiner werdenden Bilder heißt Gaußpyramide. Ist  $\mathcal{G} = \mathcal{G}^{(0)}$  das Originalbild und somit das unterste Bild der Gaußpyramide, dann ergibt sich für die Berechnung eines Bildes der Pyramide

$$\mathcal{G}^{(q+1)} = (\mathcal{R}\mathcal{B})^{(q)}\mathcal{G}^{(q)}.$$

$\mathcal{B}$  ist ein Glättungsfilter und  $\mathcal{R}$  ein Reduktionsfilter mit der halben Abtaste. Für ein Bild mit der Seitenlänge  $M$  und der Dimension  $W$  ergibt

sich eine Größe von

$$M^W \left(1 + \frac{1}{2^W} + \frac{1}{2^{2W}} + \dots\right) < M^W \frac{2^W}{2^W - 1}.$$

Die Gaußpyramide eines zweidimensionalen Bildes belegt somit nur 1/3 mehr Speicherplatz als das Originalbild. Bei einem dreidimensionalen Bild benötigt die Pyramide lediglich 1/7 mehr Platz. Da für die ganze Pyramide dasselbe Glättungsfilter verwendet wird, ist die Berechnung der Pyramide sehr effektiv. Bei einem zweidimensionalen Bild ist der Berechnungsaufwand für die Glättung des Originalbildes 4/3 bzw. bei einem dreidimensionalen Bild 8/7. Mit Hilfe solcher so genannter Mehrgitterstrukturen (*multigrid structures*) wie der Gaußpyramide und der noch später erläuterten Laplacepyramide, konnte seit ihrer Einführung in den früheren 80er Jahren eine beträchtliche Beschleunigung der Bildverarbeitungsalgorithmen erreicht werden. Es entstand sogar ein neuer Forschungsbereich, die Mehrgitterbildverarbeitung (*Multiresolutional Image Processing*).

Speichert man lediglich die Differenzbilder der Gaußpyramide, erhält man die so genannte Laplacepyramide  $\mathcal{L}$ . Durch Addition aller Bilder der Laplacepyramide erhält man schließlich wieder das Originalbild. In Operatorenschreibweise ergibt sich:

$$\mathcal{G}^{(0)} = \mathcal{G}^{(0)} - \mathcal{B}^{(0)}\mathcal{G}^{(0)} = (I - \mathcal{B}^{(0)})\mathcal{G}^{(0)}.$$

Durch einen geeigneten Expansionsoperator  $\mathcal{E}$  ist es möglich, aus der Laplacepyramide wieder das Ausgangsbild zu rekonstruieren. Der Expansionsoperator stellt mittels Interpolation ein Bild in der doppelten Größe dar und ermöglicht somit die einfache Addition von Bildern, die in der Pyramide direkt übereinander angeordnet sind:

$$\mathcal{G}^{(q-1)} = \mathcal{L}^{(q-1)} + \mathcal{E}\mathcal{G}^{(q)}.$$

### 6.2.2 Pyramid Linking

Das *Pyramid Linking* basiert auf einem so genannten *Split-and-Merge* Verfahren [29] und wird zur Segmentierung eingesetzt. Es soll an einem eindimensionalen Beispiel einer verrauschten Kante erläutert werden:

- Eine Auflösungspyramide wird berechnet, indem jeweils die Intensitäten von zwei benachbarten Pixeln gemittelt werden.
- Da jeder Bildpunkt einen Beitrag zu zwei Punkten auf der höheren Auflösungsstufe leistet, ist nun zu prüfen, zu welchem er wahrscheinlich gehört. Die Entscheidung fällt durch Vergleich der Intensitäten und wird durch Verknüpfung mit einer Kante in der Baumstruktur angezeigt.

- Alle Knotenintensitäten werden neu berechnet, indem nur die verbundenen Bildpunkte berücksichtigt werden. Das Verfahren beginnt auf der untersten Ebene und wird bis zur Wurzel fortgesetzt.
- Die letzten beiden Schritte werden wiederholt, bis ein stabiles Ergebnis erzielt wird.





# Kapitel 7

## Aktive Modelle

Aktive Konturmodelle in 2D (in der Literatur oft als *snake* oder *active contours* bezeichnet) und aktive Oberflächenmodelle (*active surfaces/shapes*) in 3D werden eingesetzt, um Objekte in Bildern meist interaktiv zu segmentieren [48]. Dabei werden beispielsweise Oberflächen manuell in die Nähe des zu segmentierenden Objekts initialisiert und die Randkurve/Oberfläche des Objekts wird durch Minimierung eines Energiefunktional mittels der aktiven Kontur beschrieben. Mit dieser Beschreibung können quantitative Aussagen über das Objekt, wie z.B. Volumen, Oberfläche etc. abgeleitet werden. Folgende aktive Konturmodelle lassen sich unterscheiden:

### **Explizite aktive Konturen** (*explicit snakes*)

Die grundlegende Idee der aktiven Kontur wurde als erstes von Kass et. al. 1988 [36] veröffentlicht. Die Kontur wird in ihrer Beschreibung durch einen Polygonzug festgelegt, welcher manuell um das zu segmentierte Objekt initialisiert wird. In mehreren Iterationsschritten wird diese diskrete Kontur  $\mathbf{M}(u) = (x(u), y(u))^T$  von dem Objekt angezogen bis ein optimaler Zustand erreicht ist, beschrieben durch ein Fehlerfunktional  $E$ . Diese Attraktion der Kontur zu dem Objekt kann durch folgendes Fehlerfunktional beschrieben werden:

$$E(\mathbf{M}(u)) = \int_0^k \frac{1}{2}(\alpha|\mathbf{M}'(u)|^2 + \beta|\mathbf{M}''(u)|^2) + \gamma E_{ext}(\mathbf{M}(u))du. \quad (7.1)$$

Der erste Summand ist verantwortlich für das Zusammenziehen bzw. Ausdehnen der Kontur, der zweite Term hat Einfluss auf die Krümmung der Kontur und der dritte Term verschiebt die Kontur in die Richtung des Gradientenanstieges im Bild. Die ersten zwei Terme beschreiben die interne, der dritte die externe Energie welche aus dem Bild extrahiert werden muss. Drei nichtnegative Parameter  $\alpha, \beta, \gamma$  gewichten jeden dieser drei Energieterme. Zur Minimierung der Gleichung 7.1 mit der

Gradientenabstiegs-Methode (*steepest descent*) [55] wird folgende Gleichung abgeleitet:

$$\frac{\partial \mathbf{M}}{\partial t} = \alpha \mathbf{M}'' + \beta \mathbf{M}'''' - \gamma \nabla (|\nabla E_{ext}(\mathbf{M}(u))|^2),$$

welche durch finite Differenzen approximiert werden kann [73]. Das Ergebnis ist entscheidend von der Initialisierung der Kontur abhängig. Die Iteration bricht oft in einem lokalen Minima der Gleichung 7.1 ab. Daraus resultieren unterschiedliche Lösungen aus unterschiedlichen Initialisierungen. Der größte Nachteil der expliziten aktiven Konturen ist die topologische Starrheit dieser Methode; mehrere Objekte können a priori nicht durch ein Abknospen der Kontur detektiert werden. In 3D sind topologische Änderungen, wie z.B. die Objektänderung von einem Löffel in einen Kochlöffel, sehr schwer zu erfassen. Ein weiterer Nachteil ist die Wahl der drei Parameter  $\alpha, \beta, \gamma$ : sie sind untereinander nicht intuitiv zugänglich und können nur experimentell „optimiert“ werden.

### Implizite aktive Konturen (*implicit snakes*)

Um die Probleme mit expliziten aktiven Konturen zu umgehen, wurde 1993 von Caselles et. al. die *implicit snake* eingeführt. Diese Beschreibung geht von einer Initialisierung einer Kontur  $\mathbf{M}$  aus, welche durch die Kontur des nullten *Level-Set* einer Funktion  $s_0 : \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}$  beschrieben wird, z.B. durch eine Distanztransformation. Anschließend wird  $s_0$  iterativ modifiziert, festgelegt durch eine partielle Differentialgleichung, die Informationen über das zugrunde liegende gaußgefilterte Bild  $f_\sigma$  enthält:

$$\partial_t s = g(|\nabla f_\sigma|^2) |\nabla s| \left( \nabla \cdot \left( \frac{\nabla s}{|\nabla s|} \right) + \nu \right).$$

$g(\cdot)$  ist eine Funktion mit der die Abbruchbedingung definiert wird, wie z.B. der Tukey-Psi Funktion  $\rho$ , aus Kapitel 4.3.3 und  $\nu \in \mathbb{R}$  ein Parameter. Diese Evolution stoppt nach der Zeit  $T$ , wenn sich  $\partial_t s$  zwischen zwei aufeinander folgenden Iterationsschritten kaum ändert. Das Ergebnis, die modifizierte Kontur  $\mathbf{M}$  wird als die nullte *Level-Set* Linie von  $s(\mathbf{x}, T)$  dargestellt. Diese Methode hat den Nachteil, daß die iterative Lösung nicht automatisch beim gewünschten Ergebnis abbricht und die Interpretation des Ergebnisses auf der Grundlage der Minimierung eines Energiefunktionals schwerfällt.

Die Vorteile der impliziten aktiven Kontur liegen in ihrer topologischen Flexibilität. Dabei können beliebig viele Objekte in einem Bild extrahiert werden, auch Objekte, die sich aufspalten. Ein weiterer Vorteil liegt in der Wahl eines einzigen Parameters  $\nu$  (Ballonkraft, siehe Kapitel 7.4.2) anstelle von drei Parametern bei den expliziten aktiven Konturen.

### Geodesische aktive Konturen (*geodesic snakes*)

Diese Konturen gehen einen Kompromiss zwischen impliziten und expliziten aktiven Konturen ein. Dabei wird das Energiefunktional der Kontur (Gleichung 7.1) durch folgenden Term ersetzt:

$$E(M(u)) = \int_{M(u)} (\alpha |M'(u)|^2 - \gamma g(|\nabla f_\sigma(M(u))|^2)) du,$$

wobei  $g(\cdot)$  z.B. der Tukey-Psi Funktion aus Kapitel 4.3.3 entsprechen kann. Die Lösung dieser Gleichung entspricht einer Kurve mit minimalen (*geodesic*) Distanzen. Meistens wird ein so genannter Geschwindigkeitsterm (*speed term*) eingeführt um die Attraktion der Kontur zu den Kanten zu erhöhen bzw. eine schnellere Konvergenz zu erzielen.

In den letzten Jahrzehnten ist die Bedeutung von automatischen Segmentierungsmethoden sprunghaft angestiegen. Für eine Vielzahl von Applikationen wurde es unumgänglich, digitalisierte Bilder quantitativ mit Hilfe geeigneter Bildverarbeitungsmethoden zu untersuchen. Im biomedizinischen Bereich, z.B. beim Bestimmen von Gewebevolumen [40], in der Diagnose [64], bei der Lokalisierung von pathologischen Veränderungen [76] und bei computergesteuerten Operationsplanungen [4] werden aktive Oberflächenmodelle mit Erfolg eingesetzt und sind meistens an spezielle Probleme angepasst. In der biologischen Grundlagenforschung werden zunehmend Algorithmen zur quantitativen Analyse von Mikroskopiebildern entwickelt [26], da die gewonnenen Aufnahmen nur noch mit enormen Zeitaufwand manuell zu bewältigen sind. Gerade bei konfokalen *laser scanning* Mikroskopen (siehe Kapitel 2) ist die Belichtungszeit absichtlich kurz gewählt, um phototoxische Beschädigungen am lebenden Material zu verhindern [63]. Unterbrochene Kanten und Artefakte in den Bildern sind die Folge dieses Problems und lassen sich oft auch nicht durch geeignete Vorverarbeitungsschritte (siehe Kapitel 4) eliminieren. Aus der obigen Diskussion über die unterschiedlichen Methoden mit ihren Vor- und Nachteilen geht hervor, daß keine Segmentierung allgemein in der Lage ist, als *Black-Box* eingesetzt zu werden. Vielmehr entscheidet die Art der Anwendung und Daten über die Wahl der Methode, um brauchbare Ergebnisse zu liefern.

Deformierbare Modelle sind speziell für solche schlecht vorverarbeiteten Bilder prädestiniert. Diese umschließen das zu segmentierende Objekt mit einer geschlossenen Hülle, versuchen Risse im Objekt zu interpolieren und den Einfluss von Pixelausreißer auf die gesamte Kontur gering zu gewichten. Dieses Prinzip der aktiven Kontur ist die iterative Suche eines Gleichgewichtszustandes einer Kurve unter Berücksichtigung interner und externer Kräfte (siehe Gleichung 7.1). Aktive Konturen können im Bildraum auf unterschiedliche Art definiert sein. Im ursprünglichen

Ansatz wurde die Kurve durch ein Polygonzug beschrieben. Andere, viel versprechende Ansätze, die diesen Polygonzug durch andere Kurven ersetzen oder das klassische externe Kräftefeld modifizieren, werden in der Literatur ausgiebig diskutiert. Ein Ansatz auf der Basis von *B-splines* anstatt eines Polygonzuges wurde von Leitner et. al. [41] und später in einer modifizierten Version von Brigger et. al. [11] vorgestellt. Durch diese Beschreibung ergeben sich Vorteile, auf die in Kapitel 10 näher eingegangen wird. *B-spline* und NURBS Kurven und Flächen werden in den folgenden Kapiteln 7.1 und 7.2 definiert. Aus diesen Definitionen wird ersichtlich, wie aus einer Anzahl an Kontrollpunkten eine Kurve oder Oberfläche erzeugt werden kann. Diese statische Oberfläche kann unter dem Einfluss einer externen Kraftquelle (Abschnitt 7.4) iterativ modifiziert werden. Die Evolution der Kontur unter Einfluss einer externen Kraftquelle wird in Abschnitt 7.5 beschrieben und kann als Minimierungsproblem formuliert werden.

## 7.1 Definitionen von *B-spline* Kurven

Eine *spline* ist eine Kurve, die anschaulich durch die Biegelinie eines dünnen Stabes beschrieben wird, die durch eine vorgegebene Reihe von festen Stützstellen verläuft. Der Name *spline* bezeichnet einen dünnen Stab, der von Schiffsbauern dazu benutzt wurde, um die richtige Form der Planken in Schiffs-Längsrichtung quer zu den Spanten zu konstruieren. Übersetzt ins deutsche ist die *spline* unter Straklatte bekannt, weshalb in der Literatur lange Zeit die *spline* auch als Strakfunktion bekannt war [42]. Die Basisfunktionen von *B-splines* sind im Allgemeinen nicht über ganz  $\mathbb{R}$  definiert. Jeder Kontrollpunkt  $B_i$  wird einer Basisfunktion zugeordnet. Somit hat jeder Kontrollpunkt nur einen beschränkten Einfluss auf die Konturpunkte  $P$ . Die Menge aller Konturpunkte im Parameterintervall  $t_{min} \leq t \leq t_{max}$  mit  $n + 1$  Kontrollpunkten, ist gegeben durch

$$P(t) = \sum_{i=1}^{n+1} B_i N_{i,k}(t) \quad (7.2)$$

mit den normalisierten Basisfunktionen  $N_{i,k}(t) \in (0, 1]$  und  $2 \leq k \leq n + 1$ . Der Algorithmus zum Berechnen der Basisfunktionen (Cox-de Boor) basiert auf der Rekursionsformel:

$$N_{i,k}(t) = \begin{cases} 1 & : x_i \leq t < x_{i+1} \\ 0 & : \text{sonst} \end{cases}$$

und

$$N_{i,k}(t) = \frac{(t - x_i)N_{i,k-1}(t)}{x_{i+k-1} - x_i} + \frac{(x_{i+k} - t)N_{i+1,k-1}(t)}{x_{i+k} - x_{i+1}}. \quad (7.3)$$

Im so genannten Knotenvektor werden die Elemente von  $x_i$  in der Reihenfolge  $x_i \leq x_{i+1}$  abgelegt. B-spline Kurven sind polynomiale spline-Funktionen der Ordnung  $k$  mit dem Grad  $k - 1$  und erfüllen folgende Bedingungen:

- Die Funktion  $P(t)$  ist ein Polynom vom Grad  $k-1$  in jedem Intervall  $x_i \leq t \leq x_{i+1}$ .
- $P(t)$  Die Ableitungen von  $P(t)$  der Ordnung  $1, 2, \dots, k - 2$  erfüllen die Stetigkeitsbedingung.

Eine B-spline Kurve kann ihr Aussehen durch folgende Modifikationen verändern:

- Verschieben oder Hinzufügen eines Kontrollpunkts.
- Ändern des Knotenvektors impliziert einen Wechsel der Basisfunktionen in periodisch gleichmässige, offen gleichmässige oder ungleichmässige Basisfunktionen.
- Wechsel der Ordnung  $k$  der Basisfunktionen.
- Wechsel der Anzahl und Position der Kontrollpunkte.
- Einführen mehrerer gleicher Kontrollpunkte (Multiplizität).
- Hinzufügen multipler Knotenpunkte im Knotenvektor.

In einem gleichmässigen Knotenvektor sind die Werte gleichmässig verteilt; meistens beginnen sie im normierten Fall mit 0, werden durch kleine Intervalle erhöht und enden beim Maximalwert von Eins. Für eine gegebene Ordnung  $k$  resultieren aus einem gleichmässigen Knotenvektor periodisch gleichmässige Basisfunktionen, für die

$$N_{i,k}(t) = N_{i-1,k}(t - 1) = N_{i+1,k}(t + 1) \quad (7.4)$$

gilt. Ein offener, gleichmässiger Knotenvektor hat dieselbe Multiplizität am Rande der Knotenwerte wie die Ordnung der verwendeten B-spline Funktion. Ungleichmässige Knotenvektoren besitzen entweder ungleichmässige Verteilungen und/oder multiple Knotenwerte und sind entweder periodisch oder offen. Falls die Anzahl an Kontrollpunkten gleich groß ist wie der Grad der Kurve, erhält man die Basis der *Bezier*-Kurve, die *Bernstein*-Basis.

## 7.2 Definitionen von NURBS Flächen

Die kartesische rationale Produkt *B-spline* Oberfläche wird im 4D Raum mit einer zusätzlichen homogenen Koordinate  $h$  folgendermaßen definiert [57]:

$$Q(u, w) = \sum_{i=1}^{n+1} \sum_{j=1}^{m+1} h_{i,j} B_{i,j}^h N_{i,k}(u) M_{j,l}(w). \quad (7.5)$$

Die  $B_{i,j}^h$  repräsentieren die homogenen 4D-Koordinaten, die durch die Polygonpunkte (Punktgitter) bei der Initialisierung der Fläche vorgegeben werden.  $N_{i,k}(u)$  und  $M_{j,l}(w)$  sind die *B-spline* Basisfunktionen, die durch Gleichung 7.3 definiert sind. Es sind  $s$  die Anzahl der Abtastpunkte in  $u$ -Richtung und  $t$  die Anzahl an Abtastpunkten in  $w$ -Richtung. Die rationale *B-spline* Oberfläche kann dann durch Projektion in den dreidimensionalen Raum durch Teilung mit der homogenen Koordinate bestimmt werden:

$$\begin{aligned} Q(u, w) &= \frac{\sum_{i=1}^{n+1} \sum_{j=1}^{m+1} h_{i,j} B_{i,j} N_{i,j}(u) M_{i,j}(w)}{\sum_{i=1}^{n+1} \sum_{j=1}^{m+1} h_{i,j} N_{i,j}(u) M_{i,j}(w)} = \\ &= \sum_{i=1}^{n+1} \sum_{j=1}^{m+1} B_{i,j} S_{i,j}(u, w), Q \in \mathbb{R}^{s \times t \times 3}. \end{aligned} \quad (7.6)$$

$B_{i,j} \in \mathbb{R}^{(n+1) \times (m+1) \times 3}$  sind die dreidimensionalen Koordinaten des Punktgitters und  $S_{i,j}(u, w) \in \mathbb{R}^{s \times t \times [(n+1) \cdot (m+1)]}$  die bivarianten rationalen *B-spline* Basisfunktionen:

$$S_{i,j}(u, w) = \frac{h_{i,j} N_{i,k}(u) M_{j,l}(w)}{\sum_{i_1=1}^{n+1} \sum_{j_1=1}^{m+1} h_{i_1,j_1} N_{i_1,k}(u) M_{j_1,l}(w)}. \quad (7.7)$$

Dabei definieren  $l, k$  die Ordnung der *B-splines* und  $n+1, m+1$  die Größe des Punktgitters.

## 7.3 Klassifikation von mehreren Objekten im Bild

Um die in Abschnitt 7 beschriebene Problematik von expliziten aktiven Konturen zu verbessern und das Auffinden mehrerer Objekte in einem Bild zu ermöglichen, wurde von mir ein *Cluster*-Algorithmus als Vorverarbeitungsschritt eingesetzt. Dabei wurden die extrahierten Kantenpunkte den einzelnen Objekten zugewiesen und Objektschwerpunkte als *Cluster*zentren bestimmt. Da alle *Cluster*verfahren Informationen über den

zu bearbeitenden Datensatz benötigen, wird das Auffinden einer Lösung von Parametern beeinflusst. Meistens wird dabei die Anzahl der *Cluster* als Parameter angegeben, z.B. im weiter unten vorgestellten *Clustering*, das auf dem *Fuzzy c-mean* Verfahren basiert.

### 7.3.1 *Fuzzy c-mean Clustering*

Die harte Entscheidung des *c-mean* Algorithmus kann durch eine unscharfe (*Fuzzy*) Klassifikation ersetzt werden. *Fuzzy c-mean* (FCM) ist eine *Clustering* Technik, bei der jeder Datenpunkt einem *Cluster* zu einem bestimmten Grad angehört, festgelegt durch einen Zugehörigkeitsgrad. Diese Methode wurde 1981 durch Jim Bezdek als verbesserte *Clustermethode* eingeführt [6]. Ausgehend von einer fest vorgegebenen Anzahl an *Clustern* werden willkürlich die *Clusterzentren* festgelegt und iterativ neu berechnet; dieser erste Schätzwert ist meist der schlechteste. Zusätzlich wird jedem Datenpunkt bei jedem Iterationsschritt ein Zugehörigkeitsgrad zugewiesen, dabei verschieben sich iterativ die *Clusterzentren*. Diese Iterationsschritte basieren auf einer Minimierung des Kostenfunktional  $J_{FCM}$ , das die Distanzen jedes Datenpunktes zu den *Clusterzentren* (gewichtet durch dessen Zugehörigkeitsgrad) angibt:

$$J_{FCM} = \sum_{i,j} \sum_{k=1}^K u_k(i,j)^q (f(i,j) - c_k)^2.$$

$u_k(i,j)$  gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Pixel zur Klasse  $k$  zu gehört, des weiteren ist  $\sum_{k=1}^K u_k(i,j) = 1$ . Der Parameter  $q$  bestimmt die Unschärfe der Entscheidung und wird oft auf 2 gesetzt. Der Prozess ist dem *c-mean* Algorithmus sehr ähnlich und wird durch folgende Schritte beschrieben:

- Setze willkürliche Anfangswerte für die Klassenmittel  $c_k$ .
- Berechne die Klassifikation nach:

$$u_k(i,j) = \frac{(f(i,j) - c_k)^2}{\sum_{l=1}^K (f(i,j) - c_l)^2}.$$

- Berechne neue Klassenmittel nach:

$$c_k = \frac{\sum_{i,j} u_k(i,j)^q f(i,j)}{\sum_{i,j} u_k(i,j)^q}.$$

- Wenn der Unterschied der Klassenmittel zwischen den Iterationen eine bestimmte Schranke unterschreitet, beende den Algorithmus, sonst gehe zum zweiten Punkt.

## 7.4 Externe Kräftefelder

Externe Kräftefelder spielen bei parametrischen aktiven Konturen eine entscheidende Rolle (siehe Gleichung 7.1). Diese Felder sind dafür verantwortlich, die Kontur in Richtung der Objektkante anzuziehen. Dabei ist es wichtig, daß dieser so genannte Anziehungsbereich (*attraction range*) hoch ist, so daß im Falle einer weit entfernten Initialisierung die Kontur durch das externe Kräftefeld an die Objektkanten angezogen werden kann. Im Laufe der Zeit wurde deshalb nicht nur der Weiterentwicklung der *snakes*, sondern auch der externen Felder ein hoher Stellenwert beigemessen.

### 7.4.1 Multiskalare Gauß-Potentialkräfte

Die Gauß Potentialkraft wird aus dem Bild  $I(x, y)$  extrahiert, hier am Beispiel von zwei Dimensionen. Das typische Potential, mit dem eine deformierbare Kontur an Kanten angezogen wird, lautet

$$P(x, y) = -w_e |\nabla [G_\sigma(x, y) * I(x, y)]|^2,$$

wobei  $w_e$  ein positiver Gewichtsparameter und

$$G_\sigma(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\left(\frac{x^2+y^2}{2\sigma^2}\right)}$$

eine zweidimensionale Gaußfunktion mit der Standardabweichung  $\sigma$  ist. Durch die Wahl eines großen  $\sigma$ -Wertes kann zwar der Anziehungsbereich der aktiven Kontur erhöht werden, dies hat jedoch gleichzeitig eine Verrückung der Objektgrenzen und ein verfälschtes Ergebnis zur Folge. Dieses Problem wurde durch einen multiskalaren Ansatz gelöst. Hier wird die Kontur mit hohem  $\sigma$  aus großer Entfernung angezogen, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist. Danach wird ein kleinerer  $\sigma$ -Wert angenommen und die Kontur kann durch feinere Strukturen angezogen werden. Änderungen von  $\sigma$  müssen dabei ad hoc vorgenommen werden, ein allgemeines Verfahren für eine optimale Änderung dieses Parameters gibt es nicht. Diese so genannte *Coarse-to-Fine*-Methoden finden in der Bildverarbeitung häufig Verwendung (z.B. in der Registrierung oder bei der Gauß-Pyramide in Kapitel 6.2).

### 7.4.2 Druckkräfte

Die Kombination von Druckkräften mit der Gauß Potentialkraft wurde von Cohen [14] vorgeschlagen. Die Druckkräfte können auf die Kontur eine ausdehnende oder zusammenziehende Wirkung haben. Deformierbare



Modelle, die auf Druckkräften basieren, sind auch unter dem Ausdruck *balloons* bekannt [14]. Die Druckkraft ist definiert als:

$$\mathbf{F}_p(\mathbf{X}) = w_p \mathbf{N}(\mathbf{X}).$$

Hier ist  $\mathbf{N}(\mathbf{X})$  die nach innen gerichtete Einheitsnormale des Modells am Punkt  $\mathbf{X}$ ;  $w_p$  ist ein konstanter Gewichtsparameter. Durch die Wahl des Vorzeichens von  $w_p$  wird sich das Modell ausdehnen (positiv) oder zusammenziehen (negativ). Im Idealfall wird die Kontur sich deformieren, bis die Gauß-Potentialkraft den Vorgang anhält. Ein entscheidender Nachteil dieses Modells sind die Überschneidungen der Kontur mit sich selbst und die Entstehung von *Loops*.

### 7.4.3 Distanz Potentialkräfte

Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung des Anziehungsbereichs besteht darin, die Potential-Energie mit einer Distanzkarte zu definieren. Hierbei wird der Wert der Distanzkarte durch die Distanz zwischen dem Pixel und dem nächsten Objektpunkt festgelegt. Daraus ergibt sich ein größerer Anziehungsbereich. Mit der berechneten Distanzkarte  $d(x, y)$  kann die potentielle Energie wie folgt definiert werden:

$$P_d(x, y) = -w_d e^{-d(x,y)^2}.$$

Die korrespondierende Potentialkraft kann durch  $-\nabla P_d(x, y)$  bestimmt werden. Das Prinzip der Distanz Potentialkräfte ist durch die Anziehung der Kontur durch den am nächsten liegenden Kantenpunkt gegeben. Dieses Modell stößt auf Schwierigkeiten, falls Konkavitäten wie in Abbildung 10.2 auf Seite 88 abgebildet, durch *snakes* zu approximieren sind.

### 7.4.4 Gradienten Vektor-Fluß

Xu und Prince entwickelten eine vektorielle Diffusionsgleichung um den Gradienten des Kantenbildes zu diffundieren [75]. Dieser Prozess findet in Bereichen statt, die von den Kanten weit entfernt liegen und somit den Anziehungsbereich der Kontur erhöhen. Das resultierende Vektorfeld wird als Gradienten Vektor-Fluß (*gradient vector flow*, GVF) Feld bezeichnet. Dieses Feld ist definiert als der Gleichgewichtszustand der folgenden vektoriellen, partiellen Differentialgleichung:

$$\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} = g(|\nabla f|) \nabla^2 \mathbf{v} - h(|\nabla f|) (\mathbf{v} - \nabla f). \quad (7.8)$$

Hierbei ist  $\mathbf{v}(x, y, 0) = \nabla f$ ,  $\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t}$  die partielle Ableitung des Bildes  $\mathbf{v}(x, y, t)$  nach  $t$ ,  $\nabla^2$  der Laplaceoperator und  $f$  ein Kantenbild mit hohen Werten an der Objektkante, extrahiert mit einem beliebigen Kantenoperator

(siehe Kapitel 6.1). Die Definition des GVF-Feldes ist auf beliebig hohe Dimensionen erweiterbar, zwei Beispiele für  $g(r)$  und  $h(r)$  sind:

$$g(r) = e^{-\left(\frac{r}{\kappa}\right)^2}$$

$$h(r) = 1 - g(r)$$

mit  $\kappa$  als skalaren Parameter. Die Vorteile dieses externen Kräftefeldes liegen im erhöhten Anziehungsbereich und der verbesserten Konvergenz für deformierbare Konturen in Konkavitäten. Ein wesentlicher Nachteil liegt im Rechenaufwand zum Auffinden des Gleichgewichtszustandes der Gleichung 7.8. Bei größeren Bildern im Bereich  $512 \times 512$  Pixel benötigt man für die Lösung der Differentialgleichung (ein Iterationsschritt) auf einem PC mit einer 1GHz Intel P3 CPU und 512MB RAM unter Matlab ca. 2 Minuten.

## 7.5 Evolution der Kontur bzw. Oberfläche

Ist die Initialisierung der Kontur und das externe Kräftefeld gegeben, kann die Kontur iterativ nach Gleichung 7.1 verschoben werden. Diese Evolution der Kontur findet in Richtung der extrahierten Kanten statt und stoppt, falls ein bestimmtes Kriterium, z.B. das Erreichen des Minimums, erfüllt wird. Analog zur zweidimensionalen aktiven Kontur kann die Evolution der Oberfläche als zeitliche Variation angesehen werden [41]. Die Evolution der Kontrollpunkte über die Zeit findet ebenfalls unter dem Einfluss eines Kräftefeldes statt, z.B. des Distanz-Kraft Vektorfeldes aus Abschnitt 7.4.3 (der sich aus dem minimalen euklidischen Abstand eines Kontrollpunktes zum nächstliegenden Kantenpunkt berechnet). Da der Zusammenhang zwischen den Kontrollpunkten  $B_{i,j}$  und den Konturpunkten  $Q(u, w)$  durch Gleichung 7.5 gegeben ist, kann die zeitliche Variation der Oberfläche durch

$$\frac{dB_{i,j}(t)}{dt} = S_{i,j}^+(u, w) \cdot \frac{dQ(u, w)}{dt} = S_{i,j}^+(u, w) \cdot V(S_{i,j}(u, w) \cdot B_{i,j}(t)) \quad (7.9)$$

beschrieben werden, wobei  $V(\cdot)$  das Distanz-Kraft Vektorfeld und  $S^+$  die Pseudoinverse zur Matrix  $S$  darstellt:

$$S^+ = (S^T S)^{-1} S^T. \quad (7.10)$$

### 7.5.1 Evolution der B-spline Kontur

B-spline Konturen in 2D sind „glatte“ Kurven und wurden in Abschnitt 7.1 definiert. Es wurde gezeigt, daß für eine parametrisierte B-spline Kontur  $B(u) = (x(u), y(u))^T$  mit  $k$  Kontrollpunkten folgende Funktion

$$\int_0^k [(x''(u))^2 + (y''(u))^2] du \quad (7.11)$$

für alle  $B(u) \in H^2([0, k]) \times H^2([0, k])$  minimiert wird [3]. Ein Vergleich der Gleichung 7.11 mit 7.1 zeigt, daß in der Definition von *B-spline* Konturen der Term mit der zweiten Ableitung bereits minimiert ist. Somit ist in der expliziten Beschreibung der *snake*, repräsentiert durch *B-splines*, nur noch das Minimum zweier Terme zu bestimmen. Da der Einfluss der ersten Ableitung in Gleichung 7.1 auf die Kontur relativ gering ausfällt, kann dieser in der Bestimmung des Minimums vernachlässigt werden und die zu minimierende Gleichung wird auf

$$E(\mathbf{M}(u)) = \int_0^k E_{ext}(\mathbf{M}(u)) du \quad (7.12)$$

reduziert. Durch das Wegfallen der ersten Ableitungen kann sich die Kontur lokal beliebig weit ausdehnen bzw. zusammenziehen. Dies kann durch eine Neubestimmung der Abstände zwischen benachbarten Konturpunkten, einem so genannten *Resampling*-Prozess, nach jedem Iterationsschritt verhindert werden. Ein weiterer Vorteil dieser Beschreibung ist der Wegfall der drei Parameter  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Die Lösung für diese gewöhnliche Differentialgleichung erster Ordnung kann durch das Runge-Kutta Verfahren bestimmt werden [55]; die zeitintensive Berechnung der ersten und zweiten Ableitung entfällt.

## 7.6 Fourierdeskriptoren

Die Fourierdeskriptoren ermöglichen eine kompakte, translations-, skalierungs- und rotationsinvariante Beschreibung der Randkurve eines Objektes unter Verwendung von Fourierreihen [34]. Fourierdeskriptoren können für kontinuierliche oder abgetastete Randkurven formuliert werden. Allerdings ist es nicht einfach, eine äquidistante Abtastung in einem Pixelbild durchzuführen, da Diagonalwege länger sind als horizontale oder vertikale Wege. Deshalb ist es oft günstiger, die Konturpixelfolge, die z.B. durch einen Kettencode gegeben sein kann, durch eine parametrisierte kontinuierliche Kurve zu interpolieren. Dazu kann die in Abschnitt 7.1 vorgestellte Interpolation, die auf *B-splines* basiert, verwendet werden. Diese Randkurve  $f(x(p), y(p))$  sei für ein zweidimensionales Objekt mit geschlossener Kontur gegeben.  $f$  hat die Komponenten  $x(p)$  und  $y(p)$ . Es lässt sich die Kurve zu der komplexwertigen Funktion  $z(p) = x(p) + iy(p)$  kombinieren. Ist  $P$  der Umfang des Objektes, so gilt

$$z(p + nP) = z(p) \quad n \in \mathbb{Z}.$$

Diese periodische Kurve lässt sich folgendermaßen in eine Fourierreihe entwickeln:

$$\hat{z}_u = \frac{1}{P} \int_0^P z(p) \cdot e^{-\frac{2\pi i u p}{P}} dp \quad u \in \mathbb{Z}$$

$$z(p) = \sum_{u=-\infty}^{+\infty} \hat{z}_u \cdot e^{\frac{2\pi i u p}{P}}.$$

Diese Koeffizienten werden als Fourierdeskriptoren der Randkurve bezeichnet. Der Deskriptor  $\hat{z}_0$  liefert den Mittelpunkt der Randkurve. Das ist der erste Summand in der Fourierreihe; dieser bestimmt die Position des Objekts. Der Summand für  $u = 1$  in der Fourierreihe  $s(p) = \hat{z}_1 \cdot e^{\frac{2\pi i p}{P}}$  beschreibt einen Kreis, ebenso der Summand für  $u = -1$ . Die Überlagerung dieser beiden Kreise bei der Summation wiederum ergibt eine Ellipse. Auch die Summanden für  $|u| > 1$  überlagern sich zu einer Ellipse. Die Randkurve wird also durch Aufsummieren von Ellipsenkurven angenähert.

Eine besondere und wichtige Eigenschaft der Fourierdeskriptoren ist die translations-, skalierungs- und rotationsinvariante Beschreibung der Deskriptoren. Dies soll am Beispiel der ersten beiden Invarianzen verdeutlicht werden. Die Position wird nur durch einen Koeffizienten festgelegt, nämlich  $\hat{z}_0$ . Alle anderen Koeffizienten sind translationsinvariant. Lässt man diesen Koeffizienten weg, so erhält man eine translationsinvariante Beschreibung. Wird die Kontur mit einem Koeffizienten  $a$  skaliert, so werden auch alle Deskriptoren mit  $a$  skaliert. Bei einer Konturverfolgung entgegen dem Uhrzeigersinn gilt stets  $\hat{z}_1 \neq 0$ . Somit lassen sich skalierungsinvariante Deskriptoren definieren durch

$$\hat{z}_i := \frac{\hat{z}_i}{|\hat{z}_1|}.$$

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Fourierdeskriptoren ist die Kompaktheit der Darstellung. Durch nur wenige Fourierdeskriptorpaare lässt sich eine Form schon relativ gut approximieren. Aus den Fourierdeskriptoren lässt sich aufgrund der Approximationseigenschaft der Fourierreihe die Fläche für einen bestimmten Glattheitsgrad berechnen. Die Berechnung des Umfangs aus den Deskriptoren ist dagegen sehr aufwendig: sie führt zu elliptischen Integralen. Verwendet man statt der Fourierreihe eine Reihenentwicklung mit Hilfe von Kugelfunktionen, so lassen sich auf ähnliche Weise nicht nur Kurven, sondern auch Flächen im  $\mathbb{R}^3$  beschreiben. Eine solche Darstellung ist im Besonderen für kugelförmige Objekte vorteilhaft.

# Kapitel 8

## Multidimensionales *Tracking*

Die exakte Rekonstruktion von Vorgängen, die sich aus der Projektion einer dreidimensionalen Szene auf die zweidimensionale Bildebene ergeben ist fehlerbehaftet. Außerdem wirkt sich das Abtasttheorem (siehe Kapitel 4.1) limitierend auf die Bewegungsanalyse aus, da kontinuierliche Grauwertstrukturen auf diskrete Gitter abgebildet werden (räumlich) bzw. die Bildwiederholrate durch das Kamerasystem festgelegt ist (zeitlich). Da jede Art von Digitalisierung eine Diskretisierung der Bildinformationen erzwingt, werden mathematische Operatoren wie z.B. der Differentialoperator fehlerbehaftet, da sie nicht im Kontinuum sondern auf diskreten Masken angewendet werden. Speziell im Bereich der Differentialgeometrie, die aus dem Grenzübergang von infinitesimal beieinander liegenden Punkten abgeleitet wird, ist bei dynamisch veränderlichen Strukturen die zeitliche Ableitung mit einem Fehler behaftet.

### 8.1 Die Kontinuität des optischen Flusses

In der Bildsequenzanalyse, insbesondere im Bereich der Hydrodynamik, haben sich Verfahren durchgesetzt, die die Kontinuität des optischen Flusses ausnutzen, um die Dynamik der Bewegung zu ermitteln. Aus der Annahme, daß sich Grauwerte  $g$  nur durch Bewegung verändern können, muß in 2D das totale Differential verschwinden [32]:

$$dg(\vec{x}, t) = \frac{\partial g}{\partial x_1} dx_1 + \frac{\partial g}{\partial x_2} dx_2 + \frac{\partial g}{\partial t} dt = 0.$$

Die Differentialgleichung des optischen Flusses (*optical flow*) nimmt dann nach weiterem Umformen folgende Gestalt an:

$$\frac{\partial g}{\partial t} + \vec{v} \nabla g = 0. \quad (8.1)$$

Beim Vergleich dieser Kontinuitätsgleichung mit der konventionellen, z.B. aus der Hydromechanik, bekannten Gleichung

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\vec{v} \cdot \rho) = 0$$

fällt auf, daß die Gleichung des optischen Flusses nicht in die der Hydromechanik übergeht, und somit der Grauwert keine allgemeine Erhaltungsgröße ist. Mit der Nabla-Beziehung

$$\nabla \cdot (\vec{v} \cdot g) = g \cdot \nabla \cdot \vec{v} + \vec{v} \cdot \nabla g$$

läßt sich zeigen, daß die Gleichungen ineinander übergehen, wenn

$$g \cdot \nabla \cdot \vec{v} = 0, \quad (8.2)$$

also keine Quellen bzw. Senken im Geschwindigkeitsfeld vorhanden sind. Dieser Term würde sich sogar bei konstantem Beleuchtungsfeld ändern, was bei Bewegungen aus der Bildebene heraus auftritt. Da sich jedoch die Gesamtintensität im Bild nicht verändert, weil Größe und Intensität der Objekte gleichmäßig im Quadrat abnehmen, ist die Kontinuitätsgleichung des optischen Flusses sogar aus der der Hydrodynamik ableitbar. Mit der Annahme, daß der Grauwert über die Relation

$$\lim_{x \rightarrow \infty} \|g\vec{v}\| < \frac{1}{\|\vec{x} - \vec{x}_s\|^3} \quad (8.3)$$

am Rande der Partikel abfällt, kann mit Hilfe des Gauß'schen Satzes gezeigt werden, daß die rechte Seite der Gleichung gegen Null konvergiert:

$$\frac{d}{dt} \int_G g \cdot d\vec{V} = - \underbrace{\oint_{\partial G} \vec{v} g d\vec{A}}_{\rightarrow 0}. \quad (8.4)$$

Im Idealfall ist somit die Grauwertsumme eines Partikels über die Bildfolge konstant:  $\sum_{x,y \in O} g(x,y) = const.$  [31]. Dies impliziert, daß ein Partikel mit niedriger Geschwindigkeit als ein kleiner heller Spot erscheint, bei größerer Geschwindigkeit aber zu einem schwächer beleuchteten, ausgedehnteren Objekt wird. Mit den oben genannten Näherungen ist es möglich, den Grauwert jedes einzelnen Partikels als Erhaltungsgröße einzuführen.

Der optische Fluß hat die Dimension einer Geschwindigkeit und erscheint zwischen zwei Bildern als Verschiebungsvektor, z.B. vom Schwerpunkt eines Pixels in Bild 1 zum Schwerpunkt desselben verschobenen Pixels in Bild 2. Dividiert man diesen Verschiebungsvektor durch die Zeit zwischen den Aufnahmen, dann erhält man das Verschiebungsvektorfeld.

Aus diesem Idealfall lässt sich auch ableiten, daß sich in einer Dimension die Geschwindigkeit durch

$$v_x = -\frac{\frac{\partial g}{\partial t}}{\frac{\partial g}{\partial x}} \quad (8.5)$$

bestimmen ließe.

Die oben genannten Annahmen werden an mehreren Stellen verletzt. Die Kontinuitätsgleichung gilt nur im Ort-Zeit Kontinuum; je größer also die Zeitschritte zwischen den einzelnen Aufnahmen werden, desto ungenauer bzw. willkürlicher ist das Ergebnis der Geschwindigkeitsmessung. Durch die Beleuchtung mehrerer Partikel in einem Bild wird die Intensität eines Partikels durch alle anderen beeinflusst, Streueffekte treten auf. Eine weitere gravierende Einschränkung bei diesem Ansatz sind Strukturen, die mit GFP markiert sind. Sie verlieren über die gesamte Aufnahmezeit hinweg stark an Intensität. Der Abfall des Grauwerts ist meist am Rande aufgrund von Rauschen so überlagert, daß der Verlauf nicht mehr die oben genannte  $R^{-3}$  Annahme erfüllt.

Über die Kontinuitätsgleichung des optischen Flusses läßt sich der Grauwert jedes Partikels mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit seinem Pendant im Folgebild zuordnen. Allein auf der Basis des Grauwertes läßt sich nur sehr ungenau eine Zuordnung zwischen zwei Partikel formulieren, da die oben diskutierten Fehler eine sichere Klassifizierung meist nicht zulassen.

Da die Klassifizierung durch weitere Informationen der Partikel an Qualität gewinnt, wird die Oberfläche eines Partikels als eine annähernd konstante Größe über die gesamte Aufnahmezeit mit einbezogen. Änderungen der Fläche sind ebenfalls nicht als Erhaltungsgröße geeignet, denn durch Rauschen bzw. ungenaue Segmentierung kann diese lokale Information großen Schwankungen unterworfen sein.

Der Schwerpunkt, der sich aus der Grauwertverteilung in einem Partikel ergibt und für das Grauwert-Massenzentrum steht, kann eine sehr wichtige Größe bei der Bestimmung der Nachbarschaften sein. Durch die Massenträgheit bewegt sich ein Partikel gleichförmig fort, falls keine äußeren Kräfte einwirken. Die Positionsabweichung kann damit auch als Klassifizierungsgröße zwischen einer Verbindung dienen, kommt jedoch nicht als Erhaltungsgröße in Betracht, da sich das Grauwert-Massenzentrum bei Veränderungen der Textur verschiebt. Bei aktiven Prozessen, z.B. Strukturen in lebenden Zellen, ändert sich ständig die Grauwertverteilung innerhalb eines Partikels, indem Proteine versuchen, Konzentrationsgradienten auszugleichen.

Abschließend kann man feststellen, daß Erhaltungsgrößen im klassischen Sinne, z.B. die Energieerhaltung in der Mechanik bei der *Particle-Tracking Velocimetry* (PTV) [1], nicht existieren. Eine mögliche Vorge-

hensweise, wie dennoch *quasi-konstante* Parameter für die Klassifizierung herangezogen werden können, ist die Abschätzung von Fehlern, die sich z.B. aus der Annahme eines konstanten Grauwerts ergeben. Dabei bieten sich mehrere Varianten von Methoden an, die unterschiedliche Optimierungen fordern (siehe hierzu [34]).

Um alle Parameter gleichberechtigt in die Klassifizierung eingehen zu lassen, bietet sich ein Ansatz an, der auf *Fuzzy-Logik* basiert [51]. Bei diesem Ansatz werden die mit nicht-deterministischen Ungenauigkeiten behafteten Parameter in die Berechnung der Korrespondenzen zwischen Partikeln einbezogen. Aussagen, wie *gute Korrespondenz* stellen dabei sehr vage Formulierungen dar und sind keinem binären Wert zuzuordnen, sondern einem Wertebereich. Bei diesem Ansatz gehen lokale Diskontinuitäten eines Parameters weniger stark in die Klassifizierung ein, als bei der strengen Annahme einer Erhaltungsgröße.

Prinzipiell verschieden sind die Verfahren des PTV und die Bestimmung des optischen Flusses. Ist für das erste Verfahren die Bestimmung der Partikel mit ihren zugehörigen Parametern in jedem Bild obligatorisch, wird im zweiten Verfahren nicht auf Partikel- sondern auf Pixel-Ebene das Verschiebungsvektorfeld zwischen zwei Bildern bestimmt. Wird dieses diskrete Verschiebungsvektorfeld durch das Zeitintervall zwischen den beiden Bildern dividiert, erhält man für den Grenzübergang zu kleinen Zeitänderungen eine kontinuierliche Formulierung des optischen Flusses. Raum und Zeit werden hierbei benutzt, um möglichst geschlossene Vektorfelder zu bestimmen. Bei der Methode des PTV werden aus den Zuordnungen zwischen Partikeln aus unterschiedlichen Bildern bzw. Zeitschnitten der Bildsequenz geschlossene Trajektorien über die Zeit generiert. Dadurch wird Raum und Zeit erst bei der Rekonstruktion in Korrelation gebracht und das Geschwindigkeitsvektorfeld nachträglich auf Partikel-Ebene visualisiert ([68],[23]). Ein Vorteil der sich aus der Methode des optischen Flusses ergibt, ist die Robustheit gegenüber Störungen durch Rauschen und Artefakte. Bei sehr stark verrauschten Bildern konnte gezeigt werden [71], daß die Partikel-Geschwindigkeitsverteilung mit der PTV-Methode eine höhere Standardabweichung aufwies als die Methode des optischen Flusses. Außerdem war der Mittelwert der Partikel-Geschwindigkeitsverteilung mit der Methode des optischen Flusses unabhängig vom SNR, wobei hingegen das *Tracking* nach der PTV-Methode eine Verrückung des Mittelwertes bei sich ändernden SNR zur Folge hatte.

Bei geschlossenen Vektorfeldern im Raum-Zeit-Kontinuum können Merkmale aus dem Bild extrahiert bzw. Partikel segmentiert werden. Es werden Regionen als solche erkannt, die sich nur langsam in ihren Parametern über die Zeit und den Ort verändern. Dadurch bleibt das Geschwindigkeitsfeld eines bewegten Objekts in den meisten Punkten



kontinuierlich. Die Randpixelzuordnung eines Partikels über zwei Bilder ist bei dieser Methode schon enthalten und eindeutig. Bei der PTV-Methode muß eine Zuordnung der Randpixel über zwei oder mehrere Bilder erfolgen; dies geschieht mit Interpolationsmodellen, die eine Zuordnung von Konturpunkten über mehrere Zeitschritte treffen [68]. Dabei können virtuelle Zwischenbilder generiert werden, die einen kontinuierlichen Oberflächenverlauf der Trajektorie in Raum-Zeit generieren. Hierbei können Oberflächenapproximationsmethoden eingesetzt werden, die auf *B-splines* basieren (siehe Kapitel 7.1).

## 8.2 Korrespondenzproblem

Die nicht eindeutige Zuordnung eines bestimmten Kantenpixels zu einem Kantenpixel im Folgebild ist unter dem Begriff des Blendenproblems bekannt, ein Spezialfall des allgemeinen Korrespondenzproblems. Das Korrespondenzproblem besagt, daß es im Allgemeinen keine eindeutige Möglichkeit gibt, verschiedene korrelierende Pixel oder Objekte in einer Bildsequenz einander zuzuordnen. Eine Möglichkeit, das Korrespondenzproblem zu lösen, ist eine schnelle zeitliche Auflösung der Bilder, so daß der mittlere Verschiebungsvektor signifikant kleiner ist als der mittlere Partikelabstand. Ebenfalls könnte man durch eine höhere zeitliche Auflösung bei ausgedehnten Partikeln eine Überlappung der Fläche beobachten und somit die Korrespondenzvorhersage entscheidend verbessern [31].

Nachbarschaftsbeziehungen werden auf zwei unterschiedlichen Skalen eingeführt [20]. Zum einen wird die *two frame*-Information benutzt, die auf der Grundlage von Partikeln aus zwei aufeinander folgenden Bildern operiert. Ein Beispiel für einen *two frame*-Operator wäre die Anwendung der lokalen *Fuzzy*-Logik für die Berechnung von Zugehörigkeiten. Zum anderen wird der *three frame*-Operator eingeführt, um Beschleunigungen zwischen drei diskreten, aufeinander folgenden Zeitpunkten zu berechnen. Dieser Operator beschreibt die Krümmung von drei Trajektorien-Segmenten und wirkt durch die Angabe eines maximalen Beschleunigungswertes wie ein Filter.

Ein einfacher Ansatz zum Verfolgen von Partikeln über eine Sequenz stellt der *Nearest-Neighbour*-Ansatz dar. Hierbei wird ein Partikel mit dem nächstliegenden Partikel verknüpft, ohne dabei die Form und Struktur dieser zwei Partikel miteinander zu vergleichen. Auf der anderen Seite kann man versuchen, die *three-frame*-Information auszunutzen, um über die Beschleunigung zu einer Aussage zu kommen. Die Beschleunigungs-

komponente in x-Richtung bestimmt sich durch

$$a_x = \frac{\Delta v_x}{\Delta t} = \frac{x_3 - x_2}{t_3 - t_2} - \frac{x_2 - x_1}{t_2 - t_1}, \quad t_1 < t_2 < t_3, \quad (8.6)$$

die Komponenten in y- und z-Richtung analog. Durch äquidistante Zeitabstände kann der Betrag der Beschleunigung mit der Formel

$$a = 2 \cdot (|\vec{x}(t_1)| + |\vec{x}(t_3)| - 2 \cdot |\vec{x}(t_2)|) \quad (8.7)$$

errechnet werden. Es wird schnell offensichtlich, daß die alleinige Betrachtung der minimalen Beschleunigung zu einem falschen Ergebnis führen kann. Es bietet sich an, beide Verfahren geschickt miteinander zu kombinieren, was zu einem hierarchischen Ansatz des *Trackings* führt.

Die Zuordnung eines Teilchens im  $n$ -ten Bild zu einem Teilchen im  $n + 1$ -ten Bild ist als *two-frame* Korrespondenzproblem anzusehen, bei dem eine Zuordnungsauswahl getroffen werden muß. Im Allgemeinen Fall verhalten sich die Teilchen über die Sequenz völlig unabhängig voneinander und sind nicht unterscheidbar; im Experiment wird jedoch meist eine geringe Variation in den Objektgrößen Fläche und Grauwertsumme beobachtet da sich ein Objekt zeitlich oft nur beschränkt verändern kann. Der PTV-Algorithmus stellt zwischen einzelnen Verbindungen einen Zugehörigkeitsgrad  $Z_p$  her, der über die Güte einer Verbindung Aufschluß gibt:

$$Z_p(t, A, GrvSum, x, y, z). \quad (8.8)$$

$t$  steht für die Aufnahmezeit,  $A$  für die Fläche,  $GrvSum$ , und  $x, y, z$  für die Position des Partikels.

Dieser Zugehörigkeitsgrad muß für jedes Partikel der Bildsequenz zu seinen potentiellen Nachbarn neu bestimmt werden.

In erster Näherung wird das Abstandsmaß als Kriterium für die Auswahl potentieller Nachfolger im Folgebild eingesetzt. Es werden nur solche Partikel betrachtet, für die der geometrische Abstand  $d_{geom.} = \sqrt{(\vec{x} \cdot \vec{x})}$  unter einem fest vorgegebenen Schwellwert liegt. Diese Schwelle lässt sich über die Tatsache begründen, daß sich Partikel von einem Bild zum folgenden nur mit einer maximalen Geschwindigkeit weiterbewegen können; diese Geschwindigkeit ist empirisch festzulegen oder geht aus dem Experiment hervor. Durch diese Vorauswahl ist das Korrespondenzproblem zwar vereinfacht, aber noch nicht gelöst.

Als Korrespondenzmaß bietet sich eine auf *Fuzzy-Logik* basierende Lösungsstrategie an. Sie weist mehrere Vorteile gegenüber streng deterministischen Lösungsstrategien auf. In der Theorie der *Fuzzy-Logik*, deren Lösungen nicht mehr wie in der Bool'schen Logik nur einen exakten Wert annehmen müssen, wird keine Modellvorstellung wie bei Funktionsbeziehungen miteinbezogen. Andererseits bestimmen *Fuzzy-Systeme* Funkti-

onswerte, ohne dabei eine mathematische Beziehung zwischen Ausgabe- und Eingabewert zu fordern. Als erstes wurde dieser Ansatz des *Trackings* im Bereich der Hydrodynamik von Wernet [74] angewandt.

Eine weitere Forderung an ein möglichst objektives *Tracking* ist die Invarianz gegenüber der Abarbeitungs-Richtung. Vor dem Auflösen des erzeugten Verbindungsnetzwerkes von Partikeln in der Bildsequenz muß geklärt werden, ob neben eindeutigen Verknüpfungen auch Mehrfachverknüpfungen zugelassen werden, denn dadurch wird das Ergebnis entscheidend verändert.

### 8.3 Two-Frame Particle-Tracking

Bei gegebenem Schwerpunkt jedes Partikels aus zwei aufeinander folgenden Bildern, die unterschiedlichen Zeitpunkten zugeordnet sind, folgt als nächster Schritt die Zuordnung (*Matching*) jeder Partikelposition im ersten Bild zu der korrespondierenden Position im zweiten Bild.

Dieses Matchingproblem ist als Korrespondenzproblem bekannt, das mittels unterschiedlicher Methoden gelöst werden kann. Als erstes kann man einige Heuristiken zum Matching von Partikel-Schwerpunkten über zwei aufeinander folgenden Bildern mit geringer zeitlicher Änderung  $\Delta t$  einführen:

- **Maximale Geschwindigkeit**

Falls ein Partikel durch eine maximale Geschwindigkeit  $v_m$  im Strömungsfeld beschrieben werden kann, dann ist die Bewegung zwischen zwei Bildern mit dem Zeitintervall  $\Delta t$  auf die Strecke  $s = v_m \Delta t$  festgelegt. Dies bedeutet, daß der Korrespondenzpunkt nicht außerhalb einer vorgegebenen Schranke liegen kann.

- **Geringe Geschwindigkeitsdifferenzen**

Da Partikel als massenbehaftete Körper den Gesetzen der Massenträgheit folgen, sind geringe Änderungen der Geschwindigkeiten bei kleinem  $\Delta t$  die Konsequenz aus physikalischen Gesetzen.

- **Gemeinsamkeiten der Bewegung**

Räumlich zusammenhängende Objekte erscheinen in aufeinander folgenden Bildern als Punktregionen mit ähnlichen dynamischen Eigenschaften.

- **Eindeutigkeit der Zuordnung**

Es kommt selten zu einer Mehrfachzuordnung, d.h. es sollen nicht zwei Partikel aus demselben Bild einem Partikel im Folgebild zu-

geordnet werden, bzw. ein Partikel im aktuellen Bild zwei Partikeln im Folgebild. Manchmal sind solche Phänomene aber durchaus erwünscht, z.B. bei der Fusionierung bzw. Knospung von Vesikeln.

Durch die Betrachtung von Nachbarschaften kann das Korrespondenzproblem in einer lokalen Nachbarschaft gelöst werden.

Als nächstes stellt sich die Frage, bis zu welcher Zuordnungstiefe sich das Korrespondenzproblem am besten lösen läßt. Diese Abbruchbedingung des *Trackings* gibt an, bis zu welcher Verknüpfung das Korrespondenzproblem betrachtet werden soll. Bei Verknüpfungen nullter Ordnung werden die Korrespondenzen eines Partikels mit seinem nächsten Nachbarn betrachtet; bei Verknüpfungen erster Ordnung werden von diesen Nachbarn die Vorgänger- bzw. Nachfolger-Partikel miteinbezogen und bei höheren Ordnungen entsprechend mehr Verknüpfungen.

### 8.3.1 Unterschiedliche *Tracking*-Ansätze

#### Hierarchisches *Tracking* mit dreifacher *Fuzzy-Logik*

In diesem Ansatz wird hierarchisch vorgegangen, indem nach der Anwendung der Abstandsschwelle ein Netzwerk der gesamten Verbindungsstruktur in beide Richtungen aufgebaut wird. Der Begriff hierarchisch steht dabei für eine fest vorgegebene Abarbeitungsrichtung. In diesem Fall wird im bestehenden Verbindungsnetzwerk versucht, erst über die *Fuzzy-Logik* lokale Verknüpfungen aufzubrechen, um dann im Anschluß über die Dynamik zu stark gekrümmte Verbindungen aufzulösen.

Die Dynamik wird über den *three-frame* Beschleunigungsoperator miteinbezogen. Am Anfang werden also über das Korrespondenzmaß nur die statischen Parameter eines Partikel betrachtet. Hierbei wird das Ähnlichkeitsmaß über den *Fuzzy-Centroiden* bestimmt, der dann letztendlich für das Auflösen einer bestehenden Verbindung zuständig ist. Dieses Auflösen geschieht lokal ohne Miteinbeziehung der Nachbarschaftsinformation. Die restlichen Verbindungen bleiben jedoch noch bestehen und lassen eine Mehrfachzuordnung auf ein und dasselbe Partikel zu. Das Verfahren ist also unabhängig von der Abarbeitungsrichtung.

Symmetrisch ist auch die Reihenfolge der Hierarchieanordnung. Das Ergebnis bleibt identisch unabhängig davon, ob man zuerst über den statischen Operator oder den dynamischen vorgeht.

#### Logik-basierter Ansatz mit fünffacher *Fuzzy-Logik*

Ein alternativer Zugang, mit dem man die Dynamik gleichzeitig mit den statischen Parametern in das Korrespondenzproblem miteinbeziehen kann, ist die Gleichbehandlung aller Größen. Das ist möglich, in-

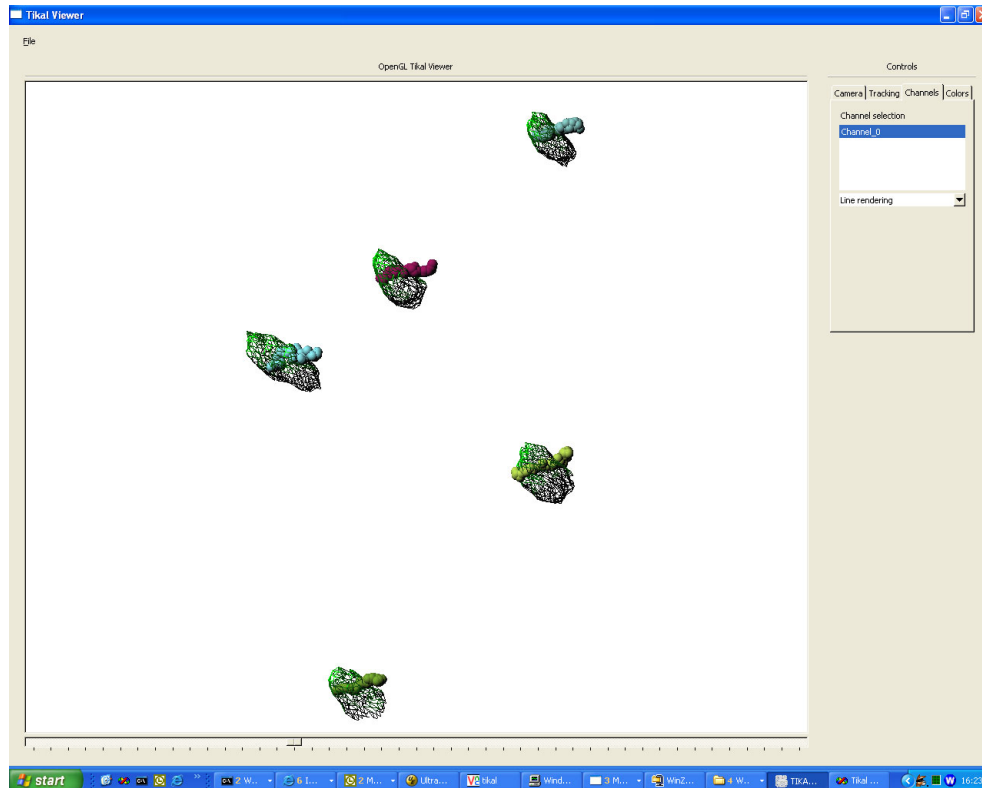


Abbildung 8.1: Cajal-Kompartimente sind aus einer Sequenz von konfokalen 3D Bildstapeln für einen Zeitpunkt rekonstruiert. Die Oberfläche der Kompartimente wird durch die Gitterstruktur, die zeitliche Bewegung der Schwerpunkte durch die Punktwolke beschrieben. Die fünf Kompartimente zeigen leichte Drift in eine gemeinsame Richtung.

dem die *Fuzzy*-Logik mit allen fünf Eingangsgrößen, also Grauwertsomme, Fläche (Volumen), Position, Geschwindigkeit und Winkel zum Vorgänger-Partikel, zu einer Aussage in Form eines Gütemaßes kommt.

Das Endergebnis nach der Defuzzifizierung würde wieder einen Korrespondenzgrad für die Verbindung angeben, der zum Aufbrechen bzw. Beibehalten von Verbindungen führt.

Dieser Ansatz wurde in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt. Es wird aber darauf hingewiesen, daß mit der vorhandenen Daten- und Programmstruktur eine Basis geschaffen worden ist, die es erlaubt, weitere *Fuzzy*-Parameter hinzuzufügen oder zu entfernen. Dadurch ergibt sich eine Methode, mit der es möglich sein wird, weitere Modifizierungen bzw. Algorithmen einfach zu implementieren.

### Multiframe Particle-Tracking

Bei diesem Verfahren wird über mehrere Bilder eine statistische Zugehörigkeitsfunktion verschiedener Trajektorien bestimmt. Ausgangspunkt ist ein Partikel aus dem aktuellen Bild, das im Folgebild mit denjenigen Partikeln korrespondiert, die innerhalb eines Suchkreises liegen. Für diese Partikel wird im Folgebild nach potentiellen Nachbarn innerhalb eines Kreises gesucht; genauso verfährt man mit den folgenden Bilder. Daraus läßt sich ein Ensemble an möglichen Verbindungen (Trajektorien bzw. Trajektorienfragmenten) zusammenstellen.

Bei dieser Technik wird der Winkel und Abstand in die Korrespondenz miteinbezogen, wobei die Verbindung mit der kleinsten absoluten Varianz die ideale Verbindung darstellt. Folgende Definitionen beschreiben die nötigen Variablen:

$$d_m = \frac{1}{3}(d_{ij} + d_{jk} + d_{kl}), d_{ij} = x_j - x_i \text{ usw.} \quad (8.9)$$

$$\theta_m = \frac{1}{2}(\theta_{ik} + \theta_{jl}), \theta_{ik} = \text{Winkel zwischen } d_{ij} \text{ und } d_{jk}, \quad (8.10)$$

$$\theta_{jl} = \text{Winkel zwischen } d_{jk} \text{ und } d_{kl}$$

$$x_i \in F^1, x_j \in F^2, x_k \in F^3, x_l \in F^4. \quad (8.11)$$

$F^i$  ist hier die Menge aller Punkte der  $i$ -ten Fläche. Eine detaillierte Beschreibung dieser Technik findet sich in [30].

### 8.3.2 Implementierung

Um die entwickelten Methoden für die Arbeitsgruppe und Kollaborationspartner verfügbar zu machen, wurde zusammen mit Christian Bacher eine Plattform zur Einbindung von Algorithmen aus der Bildverarbeitung geschaffen. Diese Umgebung ist speziell für große multidimensionale Datensätze ausgelegt und erlaubt eine einfache Einbindung von C/C++ Routinen. Die *Particle-Tracking* Methode wurde in dieser Umgebung in C++ implementiert. Hier wurde ein Ansatz mit dreifacher *Fuzzy*-Logik verwendet. Dabei werden die beliebig segmentierten Objekte in den Bildern mit einem Regionenwachstumsverfahren (siehe Kapitel 4.4) bearbeitet. Daraus resultiert ein mehrfach *gelabeltes* Bild, d.h. anstelle von Grauwerten wird den einzelnen Pixeln eine Referenzzahl *Label* zugeordnet, die die Zugehörigkeit der Pixel zum jeweiligen Objekt festlegt. Auf der Grundlage des Regionenwachstumsverfahrens werden die Bilddaten in strukturell neue Objekte konvertiert, die die Variablen Grauwertsumme, Schwerpunkt und Fläche bzw. Volumen und eine Liste der zugehörigen Pixel enthalten. Diese Objekte können mit der Angabe einiger Parameter über die Sequenz mit der *Particle-Tracking* Methode aus Kapitel

8.3.1 verfolgt werden. Das Ergebnis des *Particle-Tracking* wird als ASCII-Datei mit den jeweiligen Verknüpfungen der Objekte auf die Festplatte geschrieben. In Abbildung 8.3.1 ist die Cajal-Kompartiment Bewegung im Zellkern abgebildet. Diese dreidimensionalen Objekte wurden über 45 Zeitpunkte verfolgt. In dem Bild ist die zeitliche Drift der Objekte nach rechts oben gut zu erkennen. Diese Bewegung ist wahrscheinlich mit der Eigenbewegung der Zelle überlagert und wird mit der dreidimensionalen Rekonstruktion deutlich.





# Kapitel 9

## 3D-Segmentierung auf der Grundlage von NURBS

Ich entwickelte ein mehrschichtiges Verfahren, um Objekte in 3D-Zeitserien zu segmentieren und zu quantifizieren. Mit dieser Methode, die speziell an die Zellteilung angepasst wurde, konnten automatisch Objekteigenschaften, wie z.B. Volumen und Oberfläche, bestimmt werden. Zu Beginn setzte ich Vorverarbeitungsschritte zum Verbessern des Kontrastes ein (siehe Kapitel 4), um anschließend die Kanten mit Hilfe des Canny Kantendetektors (siehe Kapitel 6.1) zu extrahieren. Um mehrere Objekte in einem Bild zu verarbeiten, ordnete ich die extrahierten Kantenpixel mit Hilfe eines *Clusterverfahrens* den Objekten zu. Voraussetzung hierfür war, daß sich die Kantenpunkte in nur zwei Klassen – den beiden Tochterkernen – zuordnen lassen. Um eine geschlossene Oberfläche zu erhalten, wurden diese klassifizierten Kantenpunkte durch eine Non-Uniform Rational B-spline (NURBS) Oberfläche gefittet [35]. Die NURBS-Initialisierung wurde als Kugel mit fest vorgegebenem Radius um das jeweilige *Clusterzentrum* gewählt. Durch iteratives Fitten dieser aktiven NURBS-Fläche mittels Variation der zugehörigen Kontrollpunkte, konnte eine Hülle extrahiert werden, die die Oberfläche der Kantenpunkte optimal beschreibt. Die Variation der Kontrollpunkte ist als Optimierungsproblem mit einer approximierten quadratischen Form als Kostenfunktional definiert und beschreibt die euklidischen Distanzen aller Kantenpunkte zu den Oberflächenpunkten (Punkte der aktiven Kontur). Somit konnte ich die mit diesem Algorithmus gewonnenen quantitativen Ergebnisse mit einer manuellen Auswertung vergleichen, die auf einer 2D *Threshold-Methode* basierte (siehe Kapitel 13).

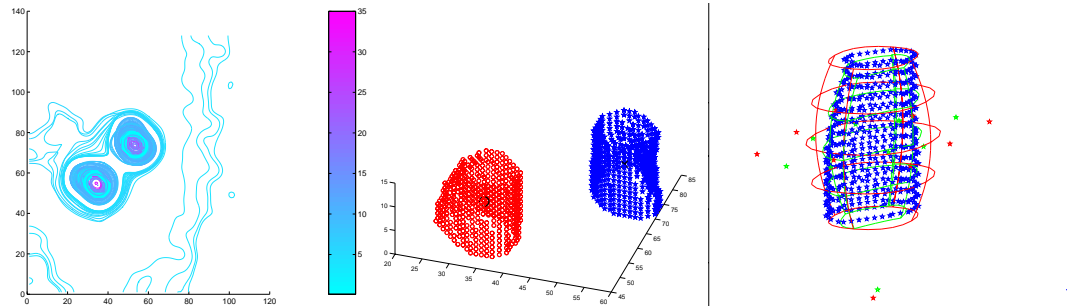


Abbildung 9.1: Aus einer Sequenz von konfokalen 3D Bildstapeln ist ein diskreter Zeitpunkt exemplarisch dargestellt. **Links** Der Gradient der Kanten im Bild ist farbkodiert von grün (niedriger Gradient) nach rot (hoher Gradient) dargestellt. **Mitte** Zwei Tochterkerne nach dem *Clustern*; die Zentren der einzelnen *Cluster* sind als 'O' and 'X' dargestellt. **Rechts** Der Fitting-Prozess einer anfänglichen Kugel (rot) zu den Objekt-Pixeln (blau) und der resultierenden NURBS Oberfläche (grün). Die Kontrollpunkte sind in der gleichen Farbe abgebildet.

## 9.1 Bildvorverarbeitung

Die Bildqualität wurde mit Hilfe geeigneter Vorverarbeitungsmethoden verbessert. Hierbei kam der anisotrope Diffusionsfilter aus Kapitel 4.3.3 zum Einsatz um das SNR im Bild zu erhöhen ohne die Kanteninformation zu verlieren. Diese Glättung des Bildes war notwendig denn anschließend wurden die Kanten mit Hilfe des Canny-Kantendetektors (siehe Kapitel 6.1) extrahiert. Somit konnten die Konturpunkte der zwei Objekte als diskrete Punktwolken dargestellt werden. Um die Konturpunkte den Objekten zuzuordnen, wurde eine anschließende Klassifizierung durch-

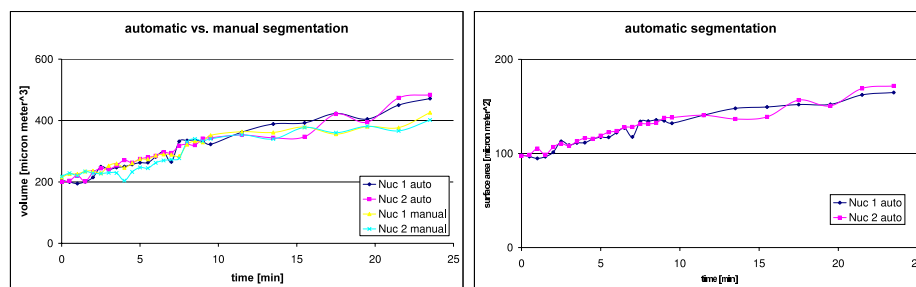


Abbildung 9.2: Volumen- und Oberflächenexpansion über die Zeit mit manueller und automatischer Segmentierung. **Links** Volumenexpansion der zwei Tochterkerne. **Rechts** Oberflächenexpansion.

geführt. Alle Schritte der Vorverarbeitung und Klassifizierung wurden mit der Programmumgebung Matlab, Version 6.5<sup>1</sup> und den entsprechenden Toolboxen für Bildverarbeitung und *Fuzzy-Logic* automatisiert.

## 9.2 Klassifikation der Kantenpunkte

Um mehrere, zusammenhängende 3D-Objekte in einem Bild zu segmentieren, wurde ein *Cluster*algorithmus eingesetzt, der einzelne Kantenpixel den *Cluster*zentren zuordnet, also den einzelnen zu detektierenden Objekten. Dieser *Cluster*-Algorithmus erlaubt die Initialisierung einer geeigneten Oberfläche für jedes Objekt. Im Gegensatz zu einer globalen Initialisierung konnte ein Schema zum Splitten einer Oberfläche vermieden werden [21]. Es wurde ein *Fuzzy-c-mean* Algorithmus eingesetzt, um die Kantenpunkte zu klassifizieren. Ein Punkt wird dabei mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit, einem bzw. mehreren *Clustern* zugeordnet [15]. Die Zugehörigkeitswahrscheinlichkeit eines Punktes zu einem *Cluster* wird durch den Abstand des Punktes zu den *Cluster*zentren bestimmt.

## 9.3 NURBS Oberflächen

Die Kontrollpunkte definieren die Eckpunkte eines Polygons und erlauben das Generieren einer glatten Oberfläche. Ausgehend von diesem Polygon kann die parametrisierte Oberfläche  $Q(u, w) \in \mathbb{R}^3$  [57] durch

$$Q(u, w) = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m P_{i,j}^h S_{i,k}(u) S_{j,l}(w) \quad u, w \in [0, 1] \quad (9.1)$$

erzeugt werden, wobei  $P_{i,j}^h \in \mathbb{R}^4$  die homogenen 4D Koordinaten (Polygon-Eckpunkte bzw. Kontrollpunkte):

$$P = \begin{pmatrix} P_{1,1}^{h \ T} \\ \cdot \\ P_{n,1}^{h \ T} \\ \cdot \\ P_{1,m}^{h \ T} \\ \cdot \\ P_{n,m}^{h \ T} \end{pmatrix}, \quad (9.2)$$

---

<sup>1</sup>©The MathWorks, Inc., www.mathworks.com

$S_{i,k}(u)$  und  $S_{j,l}(w)$  die nichtrationalen B-spline Basisfunktionen darstellen:

$$S = \begin{pmatrix} S_{1k}(u_1)S_{1l}(w_1) & \cdot & S_{nk}(u_1)S_{1l}(w_1) & \cdot & S_{nk}(u_1)S_{ml}(w_1) \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ S_{1k}(u_s)S_{1l}(w_1) & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ S_{1k}(u_s)S_{1l}(w_t) & \cdot & \cdot & \cdot & S_{nk}(u_s)S_{ml}(w_t) \end{pmatrix}, \quad (9.3)$$

definiert durch die Cox-de Boor Rekursionsformel [57]. Die Ordnung  $k, l$  der B-splines wurde kubisch,  $k = l = 3$  gewählt.

Das Parameterintervall wurde in  $u, w$  in  $s$  und  $t$  Unterintervalle unterteilt. Diese Unterteilung legt  $s \cdot t$  Gitterpunkte  $(u_1, w_1), \dots, (u_s, w_t)$  in der Parameterebene und folglich  $Q(u_1, w_1), \dots, Q(u_s, w_t)$  Oberflächenpunkte fest, die durch den Vektor  $Q^s$  in  $\mathbb{R}^{[s \cdot t] \times 4}$  ausgedrückt werden. Die Anzahl an Kontrollpunkte, die für eine genaue Nachbildung einer gegebenen Oberfläche notwendig sind, ist gewöhnlich viel kleiner als die Anzahl an benötigten Oberflächenpunkten. In dieser Anwendung wurde eine Datenkompression im Verhältnis von 1:100 erzielt.

## 9.4 Fitten der Oberflächen

Die Oberfläche des zu rekonstruierenden Objektes wird durch eine Menge an Cluster-Punkten  $M = \{m_1, \dots, m_N\}$  repräsentiert (siehe Abschnitt 9.3), die durch eine iterativ deformierbare NURBS-Oberfläche (Kugel) approximiert wird. Die NURBS-Oberfläche ist auf der einen Seite durch den abgetasteten Oberflächenpunkt-Vektor  $Q^s$ , andererseits durch den Kontrollpunkt-Vektor  $P$  beschrieben. Die Beziehung dieser Vektoren zueinander wird durch die Gleichung  $Q^s = S \cdot P$  ausgedrückt (siehe Abschnitt 9.3). Die Oberfläche wird durch eine Verschiebung der Kontrollpunkte um  $\delta P$  deformiert. Dies führt zu der Transformation:  $T(q_i, \delta P) := q'_i := q_i + (S_i \cdot \delta P)^T \in \mathbb{R}^4$ , wobei  $q_i^T$  die  $i$ -te Linie in  $Q^s$  repräsentiert.  $\delta P$  wird in jedem Iterationsschritt mit dem Levenberg-Marquardt Algorithmus [55] neu bestimmt, indem das Kostenfunktional  $\chi^2(P)$  minimiert wird:

$$d(q_i, M) = \min_{1 \leq j \leq N} \|m_j - q_i\|_2 = \|m_{j_{min}} - S_i P^T\|_2 \quad (9.4)$$

$$\chi^2(P) = \sum_{i=1}^{s \cdot t} d(q_i, M)^2 = \sum_{i=1}^{s \cdot t} (m_{j_{min}} - (S_i \cdot P^T))^2. \quad (9.5)$$

$\|\cdot\|_2$  ist die Euklidische Norm. Der Levenberg-Marquardt Algorithmus benötigt erste Ableitungen von  $\chi^2$  und berechnet in jedem Iterationsschritt die Verschiebung  $\delta P$ , bis der optimale Parameter  $P^*$  bestimmt

ist. Dabei ist anzumerken, daß  $S_i$  während des gesamten Optimierungsprozesses konstant bleibt und  $m_{j_{min}}$  nach jedem Levenberg-Marquardt Schritt ( $i$ ) neu bestimmt wird. Die Lage der endgültigen Kontrollpunkte wurde in eine ASCII-Datei exportiert, die Weiterverarbeitung fand mit der NURBS Modellierungssoftware Rhino3D<sup>2</sup> statt. In diesem Programm wurde anhand der Kontrollpunktliste die NURBS Oberfläche generiert, zusätzlich standen Funktionen für die quantitative Analyse des eingeschlossenen Volumens und der Oberfläche zur Verfügung.

---

<sup>2</sup>Robert McNeel and Associates, Seattle WA 98103, USA, [www.rhino3d.com](http://www.rhino3d.com)



# Kapitel 10

## Ein aktives Konturmodell zur Segmentierung in 2D

Die Segmentierung multidimensionaler Bildstapel in medizinischen oder biologischen Bereichen ist im Allgemeinen ein sensitives und schwieriges Unterfangen. Die Bildaufnahme von lebendigen (*in vivo*) zellbiologischen Objekten resultiert oft in einem niedrigen SNR, da, bedingt durch die Bewegung der Objekte, eine kleine Aufnahmezeit gewählt werden muss [63]. Ein häufig angewandter Segmentierungsansatz besteht aus einer zweistufigen Prozedur – am Anfang steht die Bildvorverarbeitung (siehe Kapitel 4), in der die Bilder geglättet werden – anschließend werden mit einer Kantendetektion die Kanten extrahiert. Hierbei können nicht geschlossene Kanten bzw. Fragmente entstehen; in einer weiteren Stufe wird versucht diese Kantenbrüche zu überbrücken und zu einer geschlossenen Kontur zu gelangen. *Snakes* oder aktive Konturen resultieren in einer geschlossenen Darstellung und eignen sich, dieses Problem der nicht geschlossenen Kanten zu lösen. Dieses Konzept eignet sich dazu, Benutzerinformation bzw. Vorwissen in den Segmentierungsansatz einfließen zu lassen.

Die Funktionsweise von *snakes* kann als iteratives Fitting einer Konturlinie zu einer Bilddomäne beschrieben werden, wobei ein Energiefunktional das der Kontur zugeordnet ist, minimiert wird [36]. Die *sna-ke* wird als Gleichgewichtszustand von internen- (Spannungs- und Dehnungskräfte) und externen Kräften (z.B. Gradientenkräfte) beschrieben. Es kann jedoch bei den klassischen Ansätzen zu folgenden Problemen führen:

- Die Sensitivität der Parametergewichte und die Optimierung untereinander kann nur empirisch bestimmt werden.
- Die äußeren Kräfte können beliebige Beträge annehmen und die Kontur in chaotische Zustände versetzen.

- Lokale Minima können die *snake* in einen lokalen Gleichgewichtszustand versetzen, durch Ausreißer-Pixel wird die Kontur nicht an das Objekt gefittet.

Im ursprünglichen Ansatz von Kass et. al. [36] wird die aktive Kontur durch ein Polygon repräsentiert und die Elastizitätseigenschaften hängen durch eine intuitiv schwer zugängliche Gewichtung der Parameter für die äußere und innere Energie ab. Um diese Parameterwahl zu umgehen wurden Verfahren vorgestellt, die auf kubischen *B-spline* Konturen basieren anstelle von Polygonen [41]. Hier wurde gezeigt, daß modifizierte *B-spline* Basisfunktionen das Kostenfunktional ebenfalls minimieren, da in der Definition von *B-splines* die Minimierung der Krümmung bereits enthalten ist [41]. Auf der anderen Seite wurde ein Verfahren zum Bestimmen des äußeren Kräftefeldes entwickelt, um das Fitten in so genannten Konkavitäten zu verbessern [75]. Dieses Verfahren ist unter dem Namen *Gradient Vector Flow* (GVF) bekannt und versucht nicht nur lokale Nachbarschaftsgradienten in das Kräftefeld einzubeziehen, sondern durch Glättung auf unterschiedlichen Skalen Gradienten in einer größeren Region. In meiner Arbeit wurden diese Methoden, das GVF-Kräftefeld mit einer Kontur, beschrieben durch kubische *B-splines* benutzt, um eine Verbesserung im Auffinden von Kanten zu erzielen. Durch diese Kombination konnte ich anhand von realen konfokalen Mikroskopaufnahmen zeigen, daß eine Verbesserung im Bereich der Segmentierung zu bisherigen Verfahren erzielt wurde. Der von mir entwickelte Ansatz ist ebenso in der Lage, die Parameter für die Gewichtung der internen und externen Kräfte einzusparen und einen globalen Fit zu bekommen, in den Ausreißer-Pixel mit geringem Einfluss eingehen.

Die Kontur der *snake splines* wurde mit gleichmäßigen (uniformen) *B-splines* beschrieben, wobei die Basisfunktionen im normierten Parameterintervall äquidistant angeordnet wurden. Eine parametrisierte Kurve  $\mathbf{M}(u) = [x(u), y(u)]$ ,  $u \in [0, k]$  ( $k \in \mathbb{N}$ ) wird folgendermaßen konstruiert:  $\mathbf{M}(u)$  beginnt mit der Festlegung einer Menge  $k$  Kontrollpunkte  $\mathbf{P}_i$ ,  $i = 1, \dots, k$ ,  $\mathbf{P}_i \in \mathbb{R}^2$ . Diese Konstruktion legt ebenfalls den Wertebereich des Parameterintervalls fest. Wir definieren  $P = (\mathbf{P}_i)^T$ , gegeben durch die einzelnen Kontrollpunkte  $\mathbf{P}_i$ ,  $P \in \mathbb{R}^{(k \times 2)}$ . Für kubische *B-splines* nehmen die Basisfunktionen den Grad drei an, bezeichnet durch  $\beta^3(u)$  und variieren nur translativ.

$$\mathbf{M}(u) = \sum_{i=1}^k B(u, i) \mathbf{P}_i$$

wobei  $B(u, i) = \beta^3(u - i)$  für  $i = 1, \dots, k - 3$  und für  $l = 0, 1, 2$



$$B(u, k-l) = \begin{cases} \beta^3(u+l-1) & : u \leq 3-l \\ \beta^3(u-k+l-1) & : u > 3-l \end{cases}$$

und

$$\beta^3(u) = \begin{cases} \frac{2}{3} + \frac{|u|^3}{2} - u^2 & : 0 \leq |u| < 1 \\ \frac{(2-|u|)^3}{6} & : 1 \leq |u| < 2 \\ 0 & : 2 \leq |u| \end{cases}$$

Um eine gleichmäßige Abtastrate von  $m$  Konturpunkten zu bekommen setzen wir  $u_j = \frac{j+i-1}{m}$  mit  $j = 1, \dots, m$ ,  $i = 1, \dots, k$  und erhalten die Konturpunkte mit folgender Relation:

$$\mathbf{M}(u_j) = \sum B(u_j, i) \cdot \mathbf{P}_i. \quad (10.1)$$

Wir setzen  $B_{ij} = B(u_j, i)$  und definieren  $B = ((B_{ji} \in \mathbb{R}^{m \times k}))$ . Um die Gleichung 10.1 in Matrixform zu setzen definieren wir noch  $M = (\mathbf{M}(u_j))^T \in \mathbb{R}^{m \times 2}$ , bestehend aus den  $m$  Konturpunkten  $M(u_j)$  und erhalten:

$$M = B \cdot P.$$

Hierfür kann  $P$  als die Lösung eines Gleichgewichtszustandes der Gleichung  $\min \|M - BP\|$  angesehen werden, umgeschrieben mit der pseudoinversen Matrix  $B^+$  von  $B$

$$P = (B^T B)^{-1} B^T M = B^+ M. \quad (10.2)$$

Ein klassisches Resultat für kubische *spline*-Funktionen zeigt, daß  $\mathbf{M}(u) = (x(u), y(u))^T$  die Gleichung

$$\int_0^k [(x''(u))^2 + y''(u)^2] du \quad (10.3)$$

für alle  $\mathbf{M}(u)$  minimiert, die zu  $H^2([0, k]) \times H^2([0, k])$  gehören. Diese Eigenschaft der kubischen *spline*-Funktionen wird in der Literatur oft als Minimal-Krümmungseigenschaft bezeichnet.

Eine der grundlegenden Ideen der primären *snake* war die Evolution einer Kontur über das Bild unter Auffinden eines globalen Minimumzustandes einer spezifischen Energiefunktion, traditionell definiert als

$$E = \int_0^k \frac{1}{2} (\alpha |\mathbf{M}'(u)|^2 + \beta |\mathbf{M}''(u)|^2) + \gamma E_{ext}(x(u)) du$$

wobei  $\alpha$  und  $\beta$  Gewichtsparameter für die internen Energieterme, die Spannung  $\mathbf{M}'(u)$  und Dehnung  $\mathbf{M}''(u)$  bereitstellen. Die partiellen Ableitungen  $\mathbf{M}'(u)$ ,  $\mathbf{M}''(u)$  bedeuten  $(\frac{\partial x(u)}{\partial u}, \frac{\partial y(u)}{\partial u})^T, (\frac{\partial^2 x(u)}{\partial u^2}, \frac{\partial^2 y(u)}{\partial u^2})^T$ . Als Gewichtsparameter für die externe Energie  $E_{ext}$  wird  $\gamma$  eingesetzt. Der zweite Term der internen Energie legt eine wichtige Eigenschaft der *snake* fest, die Glattheit der Kontur. Da eine glatte Kontur in der Definition der *B-spline* Funktionen enthalten ist [11], kann die Energiegleichung mit *B-spline* Konturen umformuliert werden in:

$$E = \int_0^k E_{ext}(\mathbf{M}(u)) du \quad (10.4)$$

Dieser Ansatz zeigt einige Vorteile gegenüber dem klassischen *snake*-Ansatz mit polygonalen Konturen, beschrieben in [11],[41],[75]. Erstens wird die Anzahl der Freiheitsgrade drastisch reduziert, im Prinzip von der Anzahl der Polygonpunkte auf die Anzahl der Kontrollpunkte. Auf der anderen Seite können wir auf die drei Parameter,  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  verzichten, die untereinander schwierig zu optimieren sind. Des weiteren kann die Lösung einfach als Gleichgewichtszustand durch eine gewöhnliche Differentialgleichung der Ordnung eins beschrieben werden. Die zeitintensive Berechnung der ersten und zweiten Ableitung entfällt ebenso. Mit Zuhilfenahme eines Standard-Lösungsverfahrens, dem Algorithmus von Runge-Kutta [55], wurde das Auffinden der Lösung implementiert indem iterativ eine optimale Verschiebung der Kontrollpunkte gesucht wurde.

## 10.1 Gradienten Vektor-Fluß in der Anwendung

Um die Konvergenz der *snake* in Konkavitäten zu erhöhen, wurde von Xu und Prince [75] ein modifiziertes, externes Kräftefeld eingeführt. Sie benannten dieses *Gradient Vector Flow* (siehe Kapitel 7.4.4). Wie das Distanzpotential-Kräftefeld, benutzt dieses Feld die Kanteninformation des originalen Bildes als Eingabegröße, meistens bestimmt durch den Canny Kantendetektor, wobei aber auch andere Kantendetektoren, wie z.B. Sobel, geeignet sind. Die Formel zum Bestimmen dieses GVF-Feldes,  $V(x, y) = (u(x, y), v(x, y))$  ist gegeben durch

$$\epsilon = \int \int \mu(u_x^2 + u_y^2 + v_x^2 + v_y^2) + |\nabla f|^2 |\mathbf{V} - \nabla f|^2 dx dy \quad (10.5)$$

wobei  $\mu$  einen Regularisierungskoeffizient angibt, der beide Terme balanciert. Der erste Term in Gleichung 10.5 bestimmt die Glättungseigenschaften, denn für kleine Gradienten resultiert das Ergebnis in einem

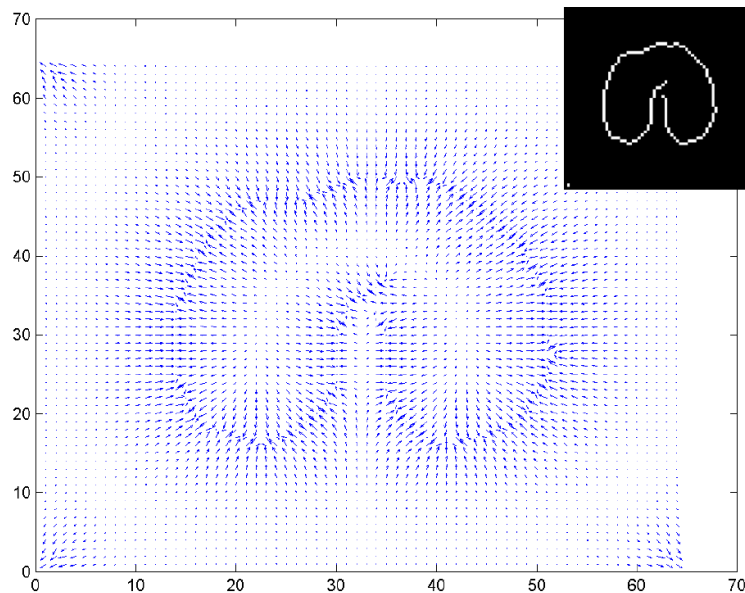


Abbildung 10.1: Externes GVF-Feld mit dem verwendeten Kantenbild (rechts oben) als Eingabegröße. Das GVF-Feld wurde aus den verrauschten Bilder aus Abbildung 10.2 generiert.

glatten Feld. Horn und Schunck nutzten dieses Verhalten zum ersten Mal in ihrer Beschreibung des optischen Flusses [32]. Um numerisch die Gleichung 10.5 zu lösen wird erst separiert und als skalares partielles Differentialgleichungssystem ein Lösungsverfahren angewandt, das auch zum Lösen der generalisierten Diffusionsgleichungen eingesetzt wird [75]. Ein Beispiel soll das externe GVF Feld anhand eines künstlich generierten Datensatzes in Abbildung 10.1 anschaulich verdeutlichen. Dieses Binärbild, rechts oben mit den extrahierten Kanten wurde als Eingangsbild für die Berechnung des GVF-Feldes nach Gleichung 10.5 eingesetzt. Man kann gut erkennen, daß im Bereich der Konkavität (Einbuchtung) das Kräftefeld, dargestellt durch diskret angeordnete Vektoren, nicht nur eine horizontale sondern auch eine vertikale Komponente besitzen und die außen initialisierte Kontur in diese Konkavität angezogen wird.

## 10.2 Evolution der *snake* und Kontrollpunkt-Modifikation

Die *snake spline* ist durch eine manuelle Initialisierung der Kontrollpunkte festgelegt. Unter dem Einfluss des externen GVF-Kräftefeldes wird diese iterativ modifiziert. Um die Lösung der Gleichung 10.4 zu finden muss die parametrisierte Variable  $M(u)$  als Funktion der Zeit (Iterationsschritt)

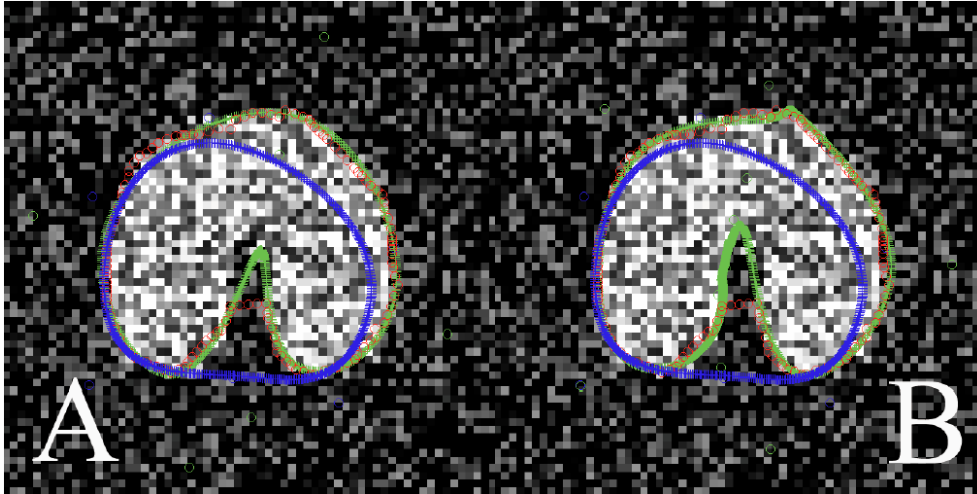


Abbildung 10.2: Vergleich zweier verschiedener Evolutionsmethoden. **A** Resultat erzielt mit einer fixen Anzahl an Kontrollpunkten. **B** Resultat mit der gleichen initialen *spline* wie in **A**, aber mit doppelter Anzahl an Kontrollpunkten. Die blaue Linie stellt in beiden Fällen die Initialisierung durch die blauen Kontrollpunkte dar. Die *polygon snake* (rot) und die *snake spline* (grün) sind mit den dazugehörigen Kontrollpunkten dargestellt.

aufgefasst werden:  $M(u, t)$  sowie  $u = u(t)$ . Wir definieren  $P$  als die Kontrollpunktmatrix, initialisiert durch den Benutzer. Wie in Gleichung 10.2 angegeben, kann die Evolution der Kontrollpunkte in Abhängigkeit der Zeit folgendermaßen beschrieben werden [41]:

$$\begin{aligned} \frac{dP(t)}{dt} &= B^+ \frac{dM(t)}{dt} = B^+ F_{ext} = -B^+ \nabla I(M) = \\ &= -B^+ \nabla I(BP(t)) = B^+ V(BP(t)). \end{aligned} \quad (10.6)$$

$V(BP(t))$  repräsentieren die Konturpunkte der *snake* unter dem Einfluss des GVF Vektorfeldes  $V(B_{ji}P_i(t))$ . Die  $i$ -te Spalte ist gegeben durch:

$$V_i = \begin{pmatrix} v_x([B_{ji}P_i]^x, [B_{ji}P_i]^y) & v_y([B_{ji}P_i]^x, [B_{ji}P_i]^y) \\ & \vdots \\ v_x([B_{mi}P_i]^x, [B_{mi}P_i]^y) & v_y([B_{mi}P_i]^x, [B_{mi}P_i]^y) \end{pmatrix}.$$

Diese gewöhnliche Differentialgleichung kann mit Hilfe der Methoden von Runge und Kutta [55] gelöst werden. Die Definition der *spline* zeigt, daß für drei Kontrollpunkte nur einfache Objekte wie Kreise

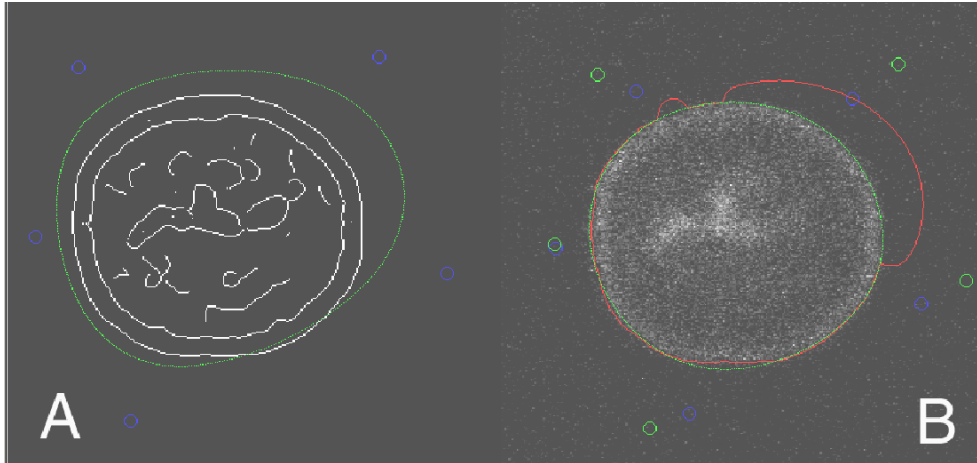


Abbildung 10.3: Segmentierung der Kernmembran. **A** Das extrahierte Canny-Kantenbild mit der initialen *spline* (grün), definiert durch die fünf Kontrollpunkte. **B** Original Grauwertbild mit dem Ergebnis nach der Evolution: *snake spline* (grün) und *polygon snake* (rot). Ebenso sind die anfänglichen (grün) mit den evolvierten (blau) Kontrollpunkten für die *snake spline* aufgetragen.

oder Ellipsen gefittet werden können. Für Objekte mit höherer Komplexität sind mehr Kontrollpunkte erforderlich. Im Allgemeinen definiert  $\frac{k}{m}$  die Glättungsrate der *spline*. Für größere  $k$ 's wird die Kontur näher an die Kontrollpunkte verrückt bis für  $k = m$  die Kontrollpunkte mit den Konturpunkten übereinstimmen. Ein zusätzliches Einfügen an Kontrollpunkten kann die *spline* in ihrem Konvergenzverhalten verbessern. Beim Einfügen von zusätzlichen Kontrollpunkten nach der Evolution der *spline* mit der ursprünglichen Anzahl an Kontrollpunkten wurde ein neuer Kontrollpunkt zwischen zwei Vorhandenen,  $\mathbf{P}_n$  und  $\mathbf{P}_{n+1}$  mit den neuen Koordinaten:

$$\mathbf{P}_{n+1/2} = \left( \begin{array}{c} \sqrt{(|P_n^x - P_{n+1}^x|)^2} \\ \sqrt{(|P_n^y - P_{n+1}^y|)^2} \end{array} \right)$$

eingefügt. Wie in Abbildung 10.2 dargestellt wurden zwei Testbilder mit denselben Parametern generiert, nur daß in 10.2.B die Anzahl der Kontrollpunkte verdoppelt wurde. In Abbildung 10.2.A konnte nur ein unbefriedigender Fit der *snake spline* innerhalb der Konkavität erreicht werden bzw. nur an der rechten Seite wurde gut gefittet, da die Anzahl der Kontrollpunkte oder Freiheitsgrade nicht groß genug war. Nach dem Einfügen der doppelten Anzahl an Kontrollpunkten zwischen die bereits vorhandenen konnte die Konkavität in allen Bereichen gut gefittet werden. Das externe Kräftefeld (dargestellt in Abbildung 10.1) enthält innerhalb der Konkavität an einigen Stellen nur eine horizontale Information, gegeben durch die oben unterbrochene Kante. Durch diese fehlende

Information ist es für die *polygon snake* nicht möglich, in die Konkavität zu expandieren, wobei die *snake spline* über diese energetisch lokalen Minimalzonen leichter hinweggeht. Bei iterativer Erhöhung der Anzahl an Kontrollpunkten wird jedoch schnell eine Sättigung erreicht. Zu viele Kontrollpunkte erhöhen die Gefahr der Selbstüberschneidung der Kontur mit sich selbst.

Experiment Nr.	$\sigma$	Control Points	$\eta_P^{snake}$	$\eta_S^{snake}$	$\eta_P^{ref}$	$\eta_S^{ref}$
1	1.5	7	1.4376	1.3342	4.2209	3.7633
2	1.2	6	1.3323	1.1162	4.5150	3.9944
3	1.5	12	1.4182	1.3133	3.9443	3.7084

Tabelle 1:  $\sigma$  ist die Standardabweichung bei der Gauß-Faltung,  $\eta_P^{snake}$  die gemittelte Entfernung aller Konturpixel der *polygon snake* zu der Referenzkurve,  $\eta_S^{snake}$  die gemittelte Entfernung aller Konturpixel der *snake spline* zu der Referenzkurve,  $\eta_P^{ref}$  die gemittelte Entfernung aller Referenzpixel zu den Konturpixeln der *polygon snake*,  $\eta_S^{ref}$  die gemittelte Entfernung aller Referenzpixel zu den Konturpixeln der *snake spline*.

### 10.3 Evolution der *snake spline* und der *polygon snake*

In dieser Simulation wurde das U-förmige Referenzbild aus Abbildung 10.1 mit Gauß'schem Rauschen versehen, um den Einfluss eines geringeren SNR auf die Evolution der *snake spline* und der *polygon snake* zu messen. Die Kanten wurden nach einer Faltung mit einer Binomial-Filtermaske mit dem Canny Kantendetektor extrahiert. Aus diesem Kantenbild wurde das GVF-Feld mit  $\mu=0,2$  errechnet, die Initialisierung war für die *snake spline* und der *polygon snake* dieselbe. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bei allen Variationen der Parameter ( $\sigma$ , Anzahl an Kontrollpunkten) war die mittlere Verschiebung der Konturpixel zu den Pixel der Referenzkontur für die *snake spline* um ca. 9% niedriger als für die *polygon snake*.  $\eta_P^{snake}$  bzw.  $\eta_S^{snake}$  gibt die gemittelte Entfernung eines jeden Pixels der *polygon snake* (*snake spline*) zu seinem nächsten Pixel der Referenzkontur an. Umgekehrt geben die mit *ref* bezeichneten Größen die gemittelte Entfernung eines jeden Kantenpixels der Referenzkontur zum nächstliegenden Konturpixel an. Die Distanzen wurden euklidisch bestimmt.

### 10.4 Anwendungen in der Zellbiologie

Aus einer Bildsequenz von dreidimensionalen, konfokalen Bildstapeln wurde eine Schicht zu einem bestimmten Zeitpunkt ausgewählt. Das

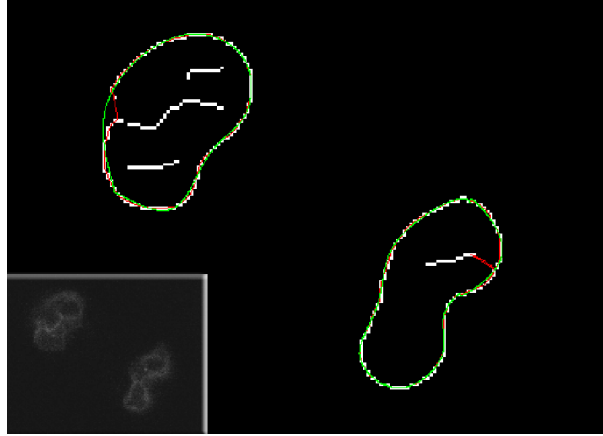


Abbildung 10.4: Segmentierung der Membran von zwei Tochterkernen. Der Canny Kantenoperator wurde auf die Originaldaten (links unten) angewandt. Die Segmentierung ist für die *polygon snake* (rot) und *snake spline* (grün) unter dem Einfluss des GVF-Felds dargestellt.

Testbild in Abbildung 10.3 zeigt einen Zellkern vor dem Auflösen der Lamina (Fluoreszenzmarker ist Lamin b). Biologen sind an zeitabhängigen Volumenmessungen des Kerns interessiert, um die Wachstumsrate nach der Zellteilung zu quantifizieren. Dafür wird eine genaue Segmentierung der Membran für jede z-Schicht benötigt. Die Initialisierung wurde manuell außerhalb der Membran mit fünf Kontrollpunkten gewählt, die nahe am Objekt gesetzt wurden. Während Segmentierungsmethoden wie Schwellwertverfahren oder Kantendetektion wegen Artefakten innerhalb des Objekts mit höheren Grauwerten ungeeignet erscheinen, erhalten wir mit der *snake spline* interessante Segmentierungsergebnisse. Wir applizierten einen Gauß Filter mit  $\sigma=4,5$  auf das  $256^2$  Pixel große Bild in Abbildung 10.3. Im nächsten Prozessschritt wurde das GVF Feld bestimmt mit dem Regularisierungskoeffizient  $\mu=0,2$  und 100 Iterationen. Mit dem Evolvieren nach Gleichung 10.6 konnte visuell ein besseres Ergebnis für die *snake spline* als für die *polygon snake* erzielt werden. Für *snake splines* ist die Anziehung der aktiven Kontur in Regionen, in die das GVF-Feld keine Richtungsinformation bereitstellt, wegen den besprochenen Eigenschaften der *spline* in Kapitel 7.1 begünstigt.

Das nächste Beispiel in Abbildung 10.4 zeigt zwei Tochterkerne in einem verrauschten Bild, wobei die Membran zu segmentieren war. Die Membranumrisse zeigen eine stärkere Verformung als im vorhergehenden Beispiel (siehe Abbildung 10.3). Beim linken Kern ist die Membrankante unterbrochen und die aktive Kontur muss die fehlende Information innerhalb dieses Bruches interpolieren. Ebenfalls sind einige störende Kanten

innerhalb der beiden Kerne vorhanden, die aus den verrauschten Rohdaten herrühren. Die manuelle Initialisierung wurde außen vorgenommen und in nächster Nähe zum einzelnen Objekt, so daß eine Anziehung durch den falschen Kern ausgeschlossen werden konnte. Die Parameter für die aktive Kontur hierbei wurden wie in dem vorigen Beispiel gewählt. In diesem Beispiel zeigt die Interpolation mit der *snake spline* ein besseres Ergebnis als eine polygonale Interpolation, die versucht, der falschen Kante zu folgen.



# Teil III

## Anwendungen



# Kapitel 11

## Micro-strukturelle Untersuchungen an Koks mit Bildverarbeitungsmethoden

Dieses Projekt hatte zum Ziel, mikro-strukturelle Eigenschaften von Koks für die Herstellung von Eisen und Stahl zu verstehen. Bei der Eisen- oder Stahlverhüttung ist die Güte, traditionell die Chemie, Größe und kalte Härte des Koks, für die Ausbeute und Qualität von wesentlicher Bedeutung. Die Reaktion mit  $CO_2$  (CRI: *Coke Reactivity Index*) und die Kokshärte (CSR: *Coke Strength After Reaction*) nach der Reaktion sind weitere Indizes für eine erfolgreiche Ausbeutung des Materials. CRI und CSR werden durch ein destruktives Standardverfahren bestimmt welche in der ASTM (*American Society for Testing and Materials*) Testmethode definiert sind. Hierbei durchströmt ein konstanter Fluß  $CO_2$  zwei Stunden lang die auf 1100 Grad Celsius erhitzte Probe. Der prozentuale Verlust an Gewicht nach der Reaktion wird als CRI festgelegt. Die abgekühlte Probe wird zentrifugiert und der kumulative Zuwachs über 10% bestimmt den CSR-Wert. Die Eigenschaften von Koks, die die Reaktionsfähigkeit und gleichzeitig den CSR beeinflussen, sind die Textur (Carbonform), Struktur (Porösität, Porengröße und Wandstärke der Poren) und die Zusammensetzung der Asche (Alkali, Sulfur, Eisen, etc.). Da dieses Standardverfahren aufwendig ist, sind nichtdestruktive Verfahren von großem Interesse, um die Eigenschaften des Koks ohne Reaktion mit  $CO_2$  zu untersuchen.



Abbildung 11.1: Koksprobe mit Messbalken.

## 11.1 Vorangegangene Arbeiten

Die makroskopischen Eigenschaften des Koks sind weitgehend erforscht und durch Standardverfahren zugänglich, z.B. das Elastizitäts- oder Young's-Modul [27]. Das Material wird mit Hilfe gängiger Bildverarbeitungsmethoden auf mikroskopische Eigenschaften hin untersucht. Während der letzten vier Jahrzehnte wurden einige Bildverarbeitungstechniken auf diesem Gebiet der angewandten Petrologie entwickelt. Die ersten Arbeiten wurden von England et. al. 1979 in den zentralen Entwicklungslabors bei BHP<sup>1</sup> durchgeführt, erweiterte Studien durch Depers et. al. 1984 und aktuelle Studien durch Patrick et. al. 1989, Bratek und Wilk 1990 und Eilertsen et. al. 1996 vorgenommen. Bei allen vorangegangenen Studien ging man nur auf die zweidimensionale Struktur ein, eine dreidimensionale Behandlung des Materials wurde hier zum ersten mal durchgeführt. Hierfür wurden Daten mit einem hochauflösenden 3D Röntgenmikroskop (Micro-CT, siehe Kapitel 2.6.6) aufgenommen, um genauere und zuverlässigere Hinweise der Koks Mikrostruktur zu erforschen. Die durch die quantitative Auswertung gewonnenen Materialeigenschaften konnten mechanische Eigenschaften dieses Materials erklären und somit die

---

<sup>1</sup>BHP Billiton, Newcastle, NSW, Australia

strukturellen Anforderungen an ein im Hochofen effektiv verwertbares Koks erklären. In diesem Projekt wurden fünf verschiedene Proben mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von fremden Mineralien untersucht. Die untersuchten 3D Bildstapel hatten jeweils eine Größe von einem Gigabyte. Der benutzte Micro-CT Scanner der Firma Skyscan, Typ 1072, eignet sich bestens für die Aufnahme von Mineralien (siehe Kapitel 2.6.6) und wird z.B. auch in der dentalen Forschung [62] eingesetzt. Aufgenommen wurden die Proben mit der gleichen Auflösung von  $9,8\mu\text{m}$  per Pixel in allen drei Raumrichtungen, wobei die Energie der Röntgenquelle 10 Watt (100kV und  $98\mu\text{A}$ ) betrug. Ein mit diesen Einstellungen gewonnenes Röntgenbild ist in Abbildung 11.2.Links, dargestellt. Die aus der Aufnahme gewonnenen Projektionen der Objektrotation wurden mit Hilfe eines Rekonstruktionsalgorithmus (modifizierter Feldkamp Algorithmus [19]) in Schnittbilder zerlegt (Abbildung 11.2.Rechts). Diese Bilder bildeten die Basis für alle quantitativen Auswertungen und 3D-Rekonstruktionen.

### Bisherige Untersuchungen an Koks-Mikrostrukturen:

- **Coarseness Index [16]:** Dieser Parameter beschreibt die Grobheit der untersuchten Struktur, z.B. der Wände oder Poren. In die Berechnung gehen ein Differenzbild, gebildet durch die Differenz zweier mit unterschiedlichen Schwellwerten erzeugter Binärbilder, ein mit einer anschließenden Skelettierung dieser Struktur. Die Inverse der absoluten Länge an *Skeleton*-Pixeln wird repräsentiert durch den Coarseness Index und ist umgekehrt proportional zur Liniendichte.
- **Fibre Index: [16]** Der Fibre Index gibt an, ob sich im Bild eine Vorzugsrichtung der Struktur feststellen läßt. Hierbei werden, wieder ausgehend von einem Differenzbild nach anschließender Skelettierung, Aufteilungen in horizontale (H), vertikale (V) und zwei diagonal (D1,D2) verbundene Bilder vorgenommen. Die Formel für die Berechnung dieses Parameters lautet:

$$F = 2^n \frac{MAX(H, V) + MAX(D1, D2)}{SUM(H, V, D1, D2)^n} - 1. \quad (11.1)$$

Hierbei bestimmt  $n$  die absolute Länge an Linienpunkten.

- **Particle Index: [43]**
  - Porosität: Die Pixel der absoluten Fläche, die von Poren eingenommen wird, dividiert durch die Grundfläche.

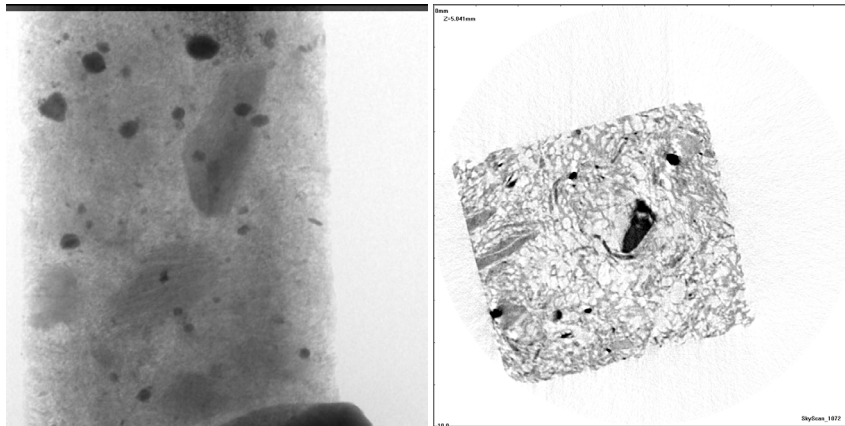


Abbildung 11.2: **Links** Röntgenaufnahme der Koksprobe aus 11.1. **Rechts** Ein rekonstruiertes Schnittbild der Projektion.

- Größenverteilung: Das Verhältnis von Fläche zu Volumen jeder Pore im Bild.
- Form (Feret Verhältnis): Die Ausdehnung von Poren (hierbei wird die kürzeste und längste axiale Länge herangezogen).
- Formstärke, Formkonkavität, Formkonvexität: Diese Parameter geben Unregelmäßigkeiten, Grobheit bzw. Abweichung der Fläche bzw. Volumen zu einer optimalen geometrischen Struktur wieder.
- Formfaktor: Fläche bzw. Volumen und Umfang der Poren werden zueinander ins Verhältnis gesetzt.

## 11.2 Quantitative Ergebnisse und Diskussion

Für die Analyse der Koks-Proben wurden fünf unterschiedliche Volumensegmente der Größe  $256^3$  Pixel bzw.  $2,5^3$  mm pro Probe untersucht. Die Ausgangsgröße der aufgenommenen Rohdaten betrug  $1024^3$  Pixel und war für eine Bearbeitung zu komplex. Insgesamt wurden fünf unterschiedlich vergütete Materialien mit der internen Bezeichnung RO370, RO374, RO371, RO373, RO375 verwendet. Die Daten wurden anhand eines geeigneten Schwellwertes in drei Klassen, Luftporenschluß bzw. Pore, Wand bzw. Koks und zusätzliche Mineraleinschlüsse segmentiert. Abbildung 11.3 zeigt ein segmentiertes 3D Bild, das in die drei Bereiche Wandstruktur (Links), Koksstruktur (Mitte) und Mineraleinschlüsse (Rechts) unterteilt ist. Aufgrund der guten Qualität der Rohdaten konnte ohne

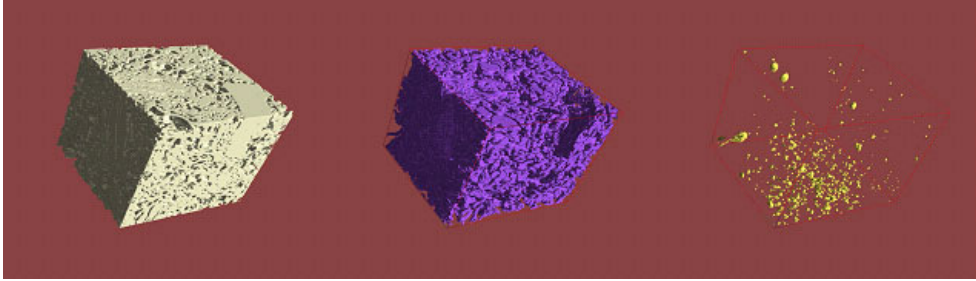


Abbildung 11.3: Rekonstruktionen der jeweiligen Struktur: Wand (Koks), Luft und Mineraleinschlüsse (von links nach rechts).

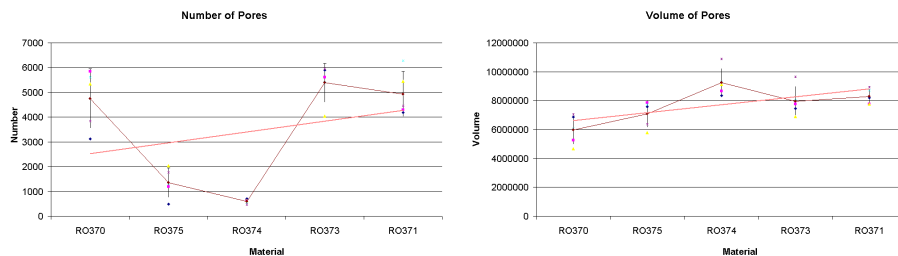


Abbildung 11.4: **Links** Anzahl der Poren für die fünf unterschiedlichen Koks-Proben. **Rechts** Gesamtvolumen der Poren für die fünf unterschiedlichen Koks-Proben. Jeweils dargestellt für fünf unterschiedliche Volumensegmente.

zusätzliche Artefakte, wie z.B. Rauschen, diese triviale Art von Segmentierung eingesetzt werden. Anschließend wurde für jeden Datensatz ein Volumenrendering durchgeführt, um eine geschlossene, dreidimensionale Struktur zu erzeugen. Weitere quantitative Methoden standen mit der verwendeten Software VGStudio MAX Ver. 1.1<sup>2</sup> zur Verfügung. Abbildung 11.4 und 11.5 zeigen einige Kenngrößen, wie die Anzahl der Poren pro Probe (11.4.Links), das absolute Porenvolumen (11.4.Rechts) und das Verhältnis kleiner Poren zu großen Poren (11.5.Links). In den Abbildungen sind die Werte der fünf Volumensegmente sowie der Mittelwert mit Standardabweichung für die fünf unterschiedlichen Proben aufgetragen. Die rosa Gerade stellt die lineare Näherung der Mittelwerte dar.

Beim Vergleich der Abbildungen 11.4.Links und 11.4.Rechts fällt auf, daß zum einen das Maximum des Porenvolumens beim Material RO374 zu finden ist, andererseits dieses Material aber die kleinste Porenanzahl besitzt. Diese Tendenz zum Bilden von wenigen ausgedehnten Lufteinschlüssen liegt in der Eigenschaft der Vergütung des Materials, wurde von dem Hersteller vermutet und konnte durch diese Arbeiten nachgewiesen

<sup>2</sup>©VolumeGraphics GmbH, Wieblinger Weg 92a, 69123 Heidelberg, Germany, [www.volumegraphics.com](http://www.volumegraphics.com).

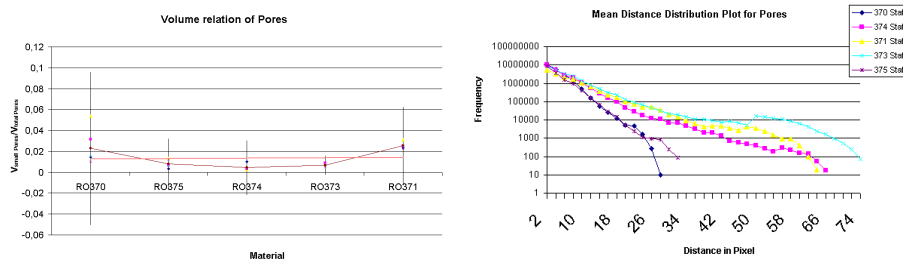


Abbildung 11.5: **Links** Verhältnis des Volumens, das durch kleine Poren eingenommen wird zum Volumen der großen, zusammenhängenden Pore. Fünf unterschiedliche Koks-Proben mit jeweils fünf unterschiedlichen Volumensegmenten sind abgebildet. **Rechts** Verteilung des mittleren Durchmessers der Poren für fünf unterschiedliche Koks-Proben.

werden. Beide Abbildungen zeigen denselben globalen Trend: das Volumen und die Anzahl der Luft einschlüsse nehmen bis zur Probe RO371 zu, das Resultat sind gröbere Strukturen. Das Volumenverhältnis der Poren, also das Verhältnis von kleinen, verteilten Poren zu großen, zusammenhängenden Poren zeigt in Abbildung 11.5. Links ein konstantes Verhältnis bei allen fünf Proben. Der Einfluss der kleinen eingeschlossenen Luftblasen liegt in allen fünf Proben bei ca. 1%. Der auffallend große Fehler für das erste und letzte Material resultiert wahrscheinlich aus den unterschiedlichen Aufnahmebedingungen; diese beiden Datensätze wurden an einem anderen Micro-CT Scanner mit unterschiedlichen Einstellungen aufgenommen. Bei der Analyse wurden diese verschiedenen Einstellungen aufeinander abgestimmt, z.B. die Auflösung, um die Daten vergleichbar zu machen. Mit dieser Analyse konnte zum ersten Mal quantitativ die Hypothese verifiziert werden, daß innerhalb der Koks-Struktur eine zusammenhängende Pore existiert, die überall verbunden ist und ca. 99% des gesamten Volumens einnimmt (siehe Abbildung 11.5. Links).

Eine weitere Analyse beschäftigte sich mit der Bestimmung des so genannten Engstellen (*Throat*)- Durchmessers (siehe Abbildung 11.6). Dieser Wert ist ein entscheidender Parameter für die Effektivität der Verbrennung, denn er bestimmt, wie schnell sich Wärme innerhalb des Materials ausbreitet. In Abbildung 11.7 sind schematisch die Schritte zum Bestimmen dieses Parameters dargestellt. Zu Beginn werden die Bilder mittels Schwellwertverfahren in die unterschiedlichen Strukturen (Poren, Luft und Mineraleinschlüsse) eingeteilt. Auf der Grundlage dieser Binärbilder wird auf jede Struktur ein *Thinning*-Operator (siehe Kapitel 4.2) angewandt, um das *Skeleton* der Objekte zu extrahieren.

Es resultiert eine Linie mit einer Breite von einem Pixel, die sich im Zentrum der Objekte befindet (siehe auch Abbildung 4.1.h auf Seite 36). Als nächstes sucht man für jeden Pixel im Binärbild der Struktur



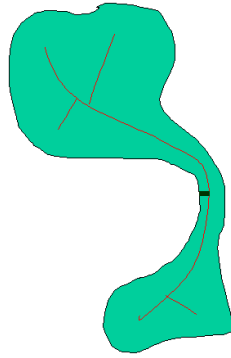


Abbildung 11.6: Schematische Veranschaulichung des morphologischen Operators *Thinning*. Aus einem Objekt (grün) wird das *Skeleton* extrahiert (rot). Die Engstelle ist schwarz abgebildet.

den nächstliegenden Hintergrundpixel und legt die Distanz nach Euklid in einem neuen, so genannten Distanzkarten-Bild ab. Durch die Multiplikation der Distanzkarte mit dem *Thinning*-Bild wird den diskreten *Skeleton*-Pixel ein Wert zugewiesen, der den Abstand ihrer Position zum nächsten Hintergrundpixel angibt. Das Histogramm dieses Bildes gibt die Durchmesserverteilung der Skelettierung aller Objekte im Bild an und ist in Abbildung 11.5.Rechts dargestellt. Diese Verteilung stimmt mit den Aussagen über die Strukturen weitgehend überein, eine Vergrößerung der Porendurchmesser bei den Proben RO370 bis hin zu RO371 kann quantitativ belegt werden. Die Häufigkeit ist logarithmisch aufgetragen, um einen besseren Eindruck dieser Tendenz zu geben, denn entscheidend ist das Verhalten für große Durchmesser. Auffällig dabei ist, daß diese Analyse die Strukturen in zwei Klassen einteilt; die eine enthält das Material RO370 und RO375, die andere die restlichen Proben. Ob diese Einteilung gerechtfertigt ist, muss materialwissenschaftlich interpretiert werden. Die Ähnlichkeit der Porendurchmesser ist ein Indiz für strukturelle Verwandtschaft und ist konträr zu den Ergebnissen in Abbildung 11.4.Links und 11.4.Rechts. Diese Unterschiede können durch die verschiedenen Ansätze erklärt werden. Für die Analyse der Durchmesser kann durch Bilden unterschiedlicher geometrischer Strukturen, wie z.B. Ellipsoiden anstelle von Kugeln, die Verteilung der Durchmesser flacher verlaufen, obwohl gleichzeitig das Volumen und die Anzahl der Poren zunimmt.

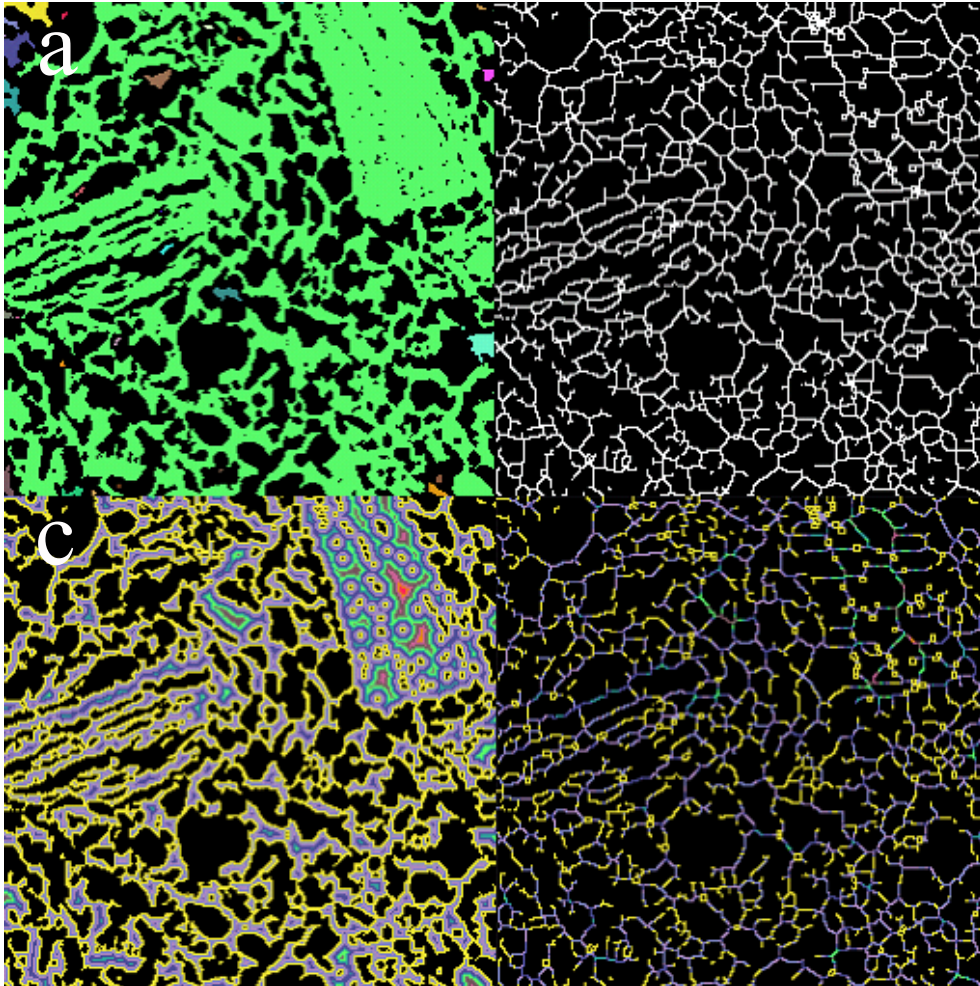


Abbildung 11.7: **a** Die verbundenen Regionen nach dem Regionenwachstum. **b** Extrahierte Struktur nach dem *Thinning*. **c** Farbkodierte euklidische Distanzkarte. **d** Multiplikation der euklidischen Distanzkarte (**c**) mit dem der binären Maske (**b**).

# Kapitel 12

## Quantitative Analyse von PML-Kompartimenten in Säugetier-Zellkernen

Die Zellkerne in Säugetierzellen enthalten eine Vielzahl an Kernkompartimenten, die in vielen Kernaustauschprozessen eine wichtige Rolle spielen [60]. Untersuchungen an PML-Kompartimenten im Zellkern (siehe Kapitel 3.1) haben in letzter Zeit stark zugenommen, da bei akuter *promyelocytic leukaemia* die PML-Kompartimente eine signifikant höhere Verteilung über den Zellkern aufweisen. Es wird vermutet, daß PML-Kompartimente mit dieser Krankheit in direkter Verbindung stehen. Die Klasse der PML-Kompartimente lässt sich in mehrere, in ihrem dynamischen Verhalten sehr unterschiedliche Kompartimente aufteilen. Dabei wird angenommen, daß sich eine bestimmte Funktion (siehe Kapitel 3.1) auch in einer typischen Dynamik widerspiegelt.

### 12.1 Experiment und biologische Fragestellung

Das *enhanced yellow fluorescent Protein* (EYFP) wurde an das Ende des Sp100 Protein, aus welchen PML-Kompartimente aufgebaut sind, fusioniert. Das EYFP-Sp100 wurde in Nierenzellen von Babyhamstern (BHK, *baby hamster kidney*) exprimiert<sup>1</sup>. Über diesen Marker konnte die Dynamik der PML-Kompartimente indirekt aufgenommen werden. Mit geeigneten Bildverarbeitungsmethoden sollten verschiedene Klassen von Bewegungen quantifiziert werden um eventuell auf die dazugehörige

---

<sup>1</sup>Die Aktivierung von Genen zur Produktion spezifischer Proteine wird als Expression bezeichnet. Die exprimierten Gene haben Einfluss auf die Funktion der Zelle innerhalb des Organismus.

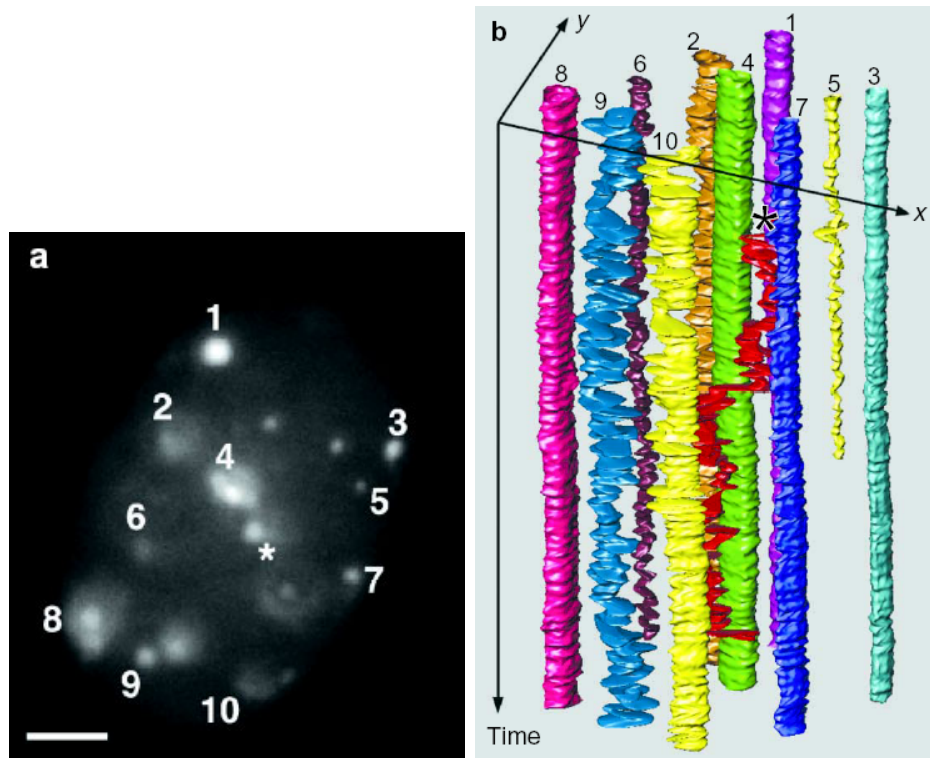


Abbildung 12.1: Orts- und zeitaufgelöste Visualisierung nach dem *Tracking* von 11 PML-Kompartimenten. **a** Mikroskopbild mit nummerierten PML-Kompartimenten zu einem bestimmten Zeitpunkt. Der horizontale Messbalken hat eine Länge von  $2,5\mu\text{m}$ . **b** Ort-Zeit Rekonstruktion der Bewegung von PML-Kompartimenten. Jedes PML-Kompartiment ist mit einer spezifischen Farbe und Nummer markiert. Die PML-Kompartimente können anhand der Nummerierung in der Rekonstruktion dem Originalbild zugeordnet werden.

Funktion der Kompartimente zu schließen. Innerhalb der Zelle wurden bisher nur diffusive Transportvorgänge beobachtet, Stoffwechselenergieabhängige Prozesse in Säugetier-Zellkernen konnten noch nicht quantitativ nachgewiesen werden.

## 12.2 Methoden für die Quantifizierung

Insgesamt wurden 145 Bilder einer Zelle über 12 Minuten aufgenommen (alle 5 Sekunden mit einer Aufnahmezeit von 80ms). Die aufgenommene Bildfolge wurde mit der Software *visTRAC* von TILL Photonics verarbeitet [65]. Wie für ein einzelnes 2D Bild in Abbildung 12.1.a dargestellt, wurde nach geeigneten Vorverarbeitungsschritten mit anschließender ani-

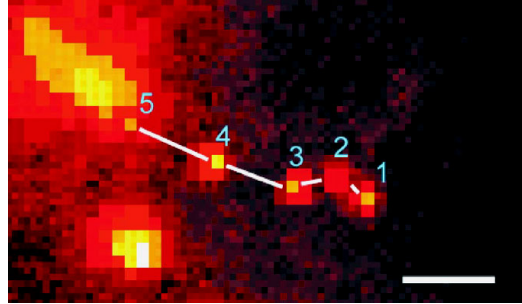


Abbildung 12.2: Ein PML-Kompartiment startet bei (1) und folgt dem quasilinearen Weg, auf dem es mit einem anderen PML-Kompartiment fusioniert (5). Dieses Bild zeigt eine Projektion von fünf zusammengehörigen Bildern. Der Messbalken hat eine Länge von  $1\mu\text{m}$ .

sotroper Diffusion eine kantenbasierte Segmentierung angewandt. Diese basierte auf dem Verfahren von Canny (siehe Kapitel 6.1) und eignet sich besonders gut für die Segmentierung von kleinskaligen Objekten, wie z.B. PML-Kompartimente [67]. Die segmentierten, binären Bilder wurden anschließend mit den in Kapitel 8 vorgestellten Methoden verfolgt, um Korrespondenzen zwischen einzelnen PML-Kompartimenten zu finden und diese zuzuordnen. Mit diesen Verbindungen konnte die Zeitsequenz in Abbildung 12.1.b rekonstruiert und quantifiziert werden. Nach dem *Tracken* der gesamten Bildsequenz und anschließender Quantifizierung konnte einfach zwischen den drei unterschiedlichen Klassen von PML-Kompartimenten unterschieden werden. Ebenfalls kann in Abbildung 12.1.b und 12.3 rein visuell ein qualitativer Eindruck der drei Klassen gewonnen werden.

## 12.3 Ergebnisse

Die Analyse der Geschwindigkeiten in 56 Zellen mit der in Kapitel 8 beschriebenen *Tracking*-Methode zeigt in Abbildung 12.1.b, daß die PML-Kompartimente eine Klassifikation ihrer Dynamik in drei verschiedenen Klassen erlaubt. Die Kerndynamik konnte dabei in stationäre, lokal bewegliche und schnelle, weitreichende Bewegung unterteilt werden [49]. Für die 12-minütige Untersuchung waren ca. 25% der gesamten PML-Kompartimente stationär bzw. führten sehr geringe Bewegungen aus. Wahrscheinlich waren diese Bewegungen durch eine Verbindung mit anderen Kompartimenten oder durch den begrenzten Freiraum im Zellkern beschränkt. Des weiteren konnte keine Größenabhängigkeit der Dynamik festgestellt werden, die Immobilität galt für Kompartimente aller Größen.

Die Radien der PML-Kompartimente innerhalb dieser langsamen Klasse variierten zwischen  $0,2\mu\text{m}$  und  $1,4\mu\text{m}$ . Die lokal bewegliche Klasse, die ungefähr 63% der gesamten PML-Kompartimente ausmachte, führte nur geringe Bewegung aus und zeigte Ähnlichkeiten zu der Bewegungsdynamik von Kern-Speckles [17] und Cajal-Kompartimenten (ebenfalls Kompartimente aus dem Zellkern). In allen 56 untersuchten Zellen war diese Klasse von Kompartimenten präsent.

Diese Bewegung repräsentiert wahrscheinlich einen auf Diffusion basierenden Mechanismus, da das Verringern an ATP (siehe Experiment weiter unten) nicht für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden kann [53].

Erweiterte Bewegung im Kernplasma wurde bei ungefähr 12% aller PML-Kompartimente beobachtet, wobei die Bewegung während der gesamten Zeitperiode von 12 Minuten oft stoppte und wieder einsetzte. Im Schnitt konnten für alle untersuchten Zellen bei 50% der Zellkerne ein oder mehrere PML-Kompartimente beobachtet werden. Diese Klasse an PML-Kompartimenten zeigte folgende dynamische Eigenschaften:

- Bidirektionale Bewegung könnte durch eine elastische Verbindung zu einer Faser hervorgerufen werden.
- Einzelne PML-Kompartimente zeigen die Tendenz, in Gruppen mit zwei bis drei PML-Kompartimenten zu fusionieren (siehe Abbildung 12.1.b, PML-Kompartiment Nr. 9).
- Es gibt Fusionierungsereignisse kleiner PML-Kompartimente zur Bildung neuer, größerer Kompartimente (siehe Abbildung 12.2).

Das PML-Kompartiment in Abbildung 12.2 bewegte sich innerhalb 40 Sekunden um  $2,6\mu\text{m}$  fort. Bis jetzt ist unklar, was für die Dynamik der Bewegung innerhalb der Klasse von PML-Kompartimenten verantwortlich ist. Nach der Analyse mit Bildverarbeitungsmethoden variierte die durchschnittliche Geschwindigkeit der sich schnell bewegenden PML-Kompartimente je nach Zelle zwischen  $4,0\frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$  und  $7,2\frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$ . Auffällig dabei waren die Maximalwerte im Bereich von ca.  $18\frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$ . Diese Dynamik ist um Größenordnungen höher als alle Untersuchungen an Strukturen im Zellkern (wie z.B. Cajal-Kompartimente) bisher gezeigt haben. Um die hohe Beweglichkeit in Abhängigkeit von der Stoffwechselenergie nachzuweisen, wurde der Zelle ATP (siehe Abschnitt 3.1.2) entzogen.

Es fällt auf (siehe Abbildung 12.2.b), daß sich die schnell bewegende Klasse an PML-Kompartimenten auch nach transkriptionaler<sup>2</sup> Hemmung

---

<sup>2</sup>Transkription (vgl. *scribere* lat. schreiben) bezeichnet die Kopie der genetischen Information, die in der DNA enthalten ist, in eine mRNA (messenger-RNA). Diese dient als Vorlage für die Übersetzung (Translation) der Erbinformation in Proteine.

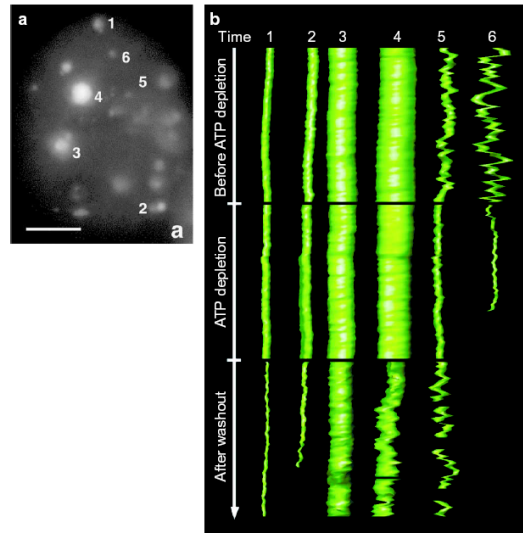


Abbildung 12.3: **a** Nummerierte PML-Kompartimente zu einem Zeitpunkt in einem Originalbild, aufgenommen durch ein konfokales Mikroskop. Der Messbalken hat eine Länge von  $5\mu\text{m}$ . **b** Die korrespondierenden PML-Kompartimente werden von einem Stoffwechselenergie abhängigen Mechanismus angetrieben. Die Rekonstruktion der Bewegung ist in Raum und Zeit dargestellt. Diese Kompartimente wurden in drei Phasen aufgenommen, vor ATP-Entzug, während ATP-Entzug und nach dem Auswaschen von *sodium azide*, einem ATP-Hemmstoff.

nicht beeinflussen lässt, jedoch durch Entzug von ATP um das vierfache gebremst wird. Ein ähnliches Resultat wurde mit Actin-abhängiger Hemmung beobachtet. Über einen Zeitraum von 30 Minuten unter Einwirkung eines Energieentzuges von Actin-abhängigem Myosin (siehe Abbildung 12.4) wurden die maximalen Geschwindigkeiten der schnell beweglichen PML-Kompartimente signifikant von  $4,3\frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$  auf  $1,1\frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$  reduziert. Die mehr lokalisierten Bewegungen anderer PML-Kompartimente waren davon nicht beeinflusst, wie ebenfalls aus der Abbildung 12.4 zu entnehmen ist. Es konnte somit eine Beteiligung von Myosin an der hohen Dynamik der PML-Kompartimente nachgewiesen werden (untersucht wurde allerdings nur ein Mitglied der Myosin-Familie).

Die PML-Kompartimente der schnellen, weitreichenden Bewegung wurden untersucht, ob ein diffusiver Transport für ihre Bewegung verantwortlich ist. Dazu wurde die Wahrscheinlichkeit der diffusiven Versetzung eines Partikels berechnet. Der Radius der PML-Kompartimente wurde mit  $0,402\mu\text{m}$ , die Temperatur während des Experiments mit  $T=310\text{K}$  und die Viskosität des Kernplasmas mit  $\eta=0,28\text{Pa s}$  abgeschätzt. Die Diffusionskonstante  $D$  bestimmt sich nach geeignetem Umstellen der Glei-

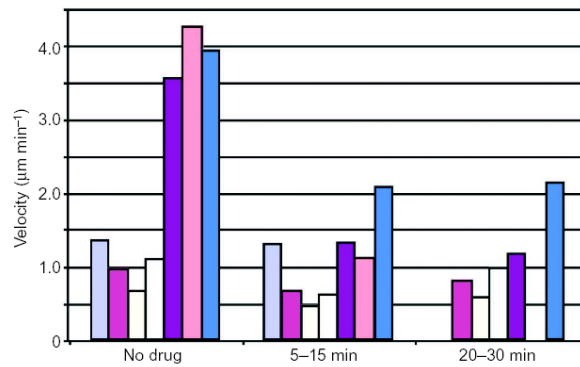


Abbildung 12.4: Geschwindigkeitsverteilung der PML-Kompartimente über drei Phasen. **Links** Ohne Behandlung. **Mitte** Nach Einbringen eines Myosin-Hemmstoffes (BDM) im Zeitintervall von 5-15 Minuten. **Rechts** Zeitintervall von 20-30 Minuten. Die Bewegung der sich schnell bewegendenden Klasse von PML-Kompartimenten bricht nach der Behandlung mit BDM dramatisch ein, während die der anderen Klassen auf einem konstanten Niveau bleibt. Die verschiedenen Farben korrespondieren mit einzelnen PML-Kompartimenten aus einem Zellkern.

chung 2.6 (siehe Kapitel 2.7, S. 24) zu:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\eta r} = 2,02 \cdot 10^{-15} \frac{m^2}{s}.$$

Die Wahrscheinlichkeit  $P$ , daß ein diffusives Kompartiment die beobachtete Entfernung von  $1,6\mu m$  während des Beobachtungsintervalls von  $t=10$  Sekunden zurücklegt, beträgt  $P=1,74 \cdot 10^{-14}$ . Da verlässliche Messungen über die Viskosität nur in mitotischen Zellen existieren, wurden diese Werte für die Berechnung der Diffusionskonstante im Interphase-Zellkern herangezogen. Ein signifikanter Einfluss der Diffusion wäre allerdings erst bei einer fehlerhaften Abschätzung der Viskosität um fünf Größenordnungen mit 0,1% zu verzeichnen. Aus diesen Abschätzungen kann der Einfluss der Diffusion für die Klasse der schnellen, weitreichenden PML-Kompartimente als gering eingestuft werden. Andere, aktive Prozesse müssen an diesen Transportmechanismen beteiligt sein. Dieses Experiment zeigte zum ersten Mal eine energieabhängige, quasilineare Bewegung von Kernkompartimenten in Säugetierzellen, ermöglicht durch Quantifizierung mit geeigneten Bildverarbeitungsmethoden.



# Kapitel 13

## Quantitative 4D-Bildfolgenanalyse in lebenden Zellen

Dynamische Prozesse innerhalb der Zelle finden in allen drei räumlichen Dimensionen statt. Um die Komplexität zu verringern wird bei vielen Analysen das ursprüngliche, dreidimensionale Problem auf ein zweidimensionales reduziert. Durch diese Projektion gehen Informationen verloren, außerdem lassen sich viele Prozesse ausschließlich in drei Dimensionen studieren [50]. Konfokale, dreidimensionale Bilder einer fluoreszierenden Struktur lassen sich zu verschiedenen Zeitpunkten aufnehmen (siehe Kapitel 2). Zeitliche Phänomene innerhalb des lebenden Zellkerns können somit aufgelöst und dynamische Prozesse quantifiziert werden.

### 13.1 Experiment und biologische Fragestellung

Die Dynamik der Kernhülle, des Chromatins und des Centrosoms wurden gleichzeitig über mehrere Stufen der Zellteilung (siehe Kapitel 3.2) untersucht [24]. Wenn die Zelle in die Prometaphase eintritt, beginnt sich die Membran der Kernhülle aufzulösen und die Membranproteine bewegen sich in das ER. Die Kernhülle ist dabei nicht mehr mit den kondensierten Chromosomen verbunden. Der Wiederaufbau der Kernhülle findet dabei analog zum Abbau statt, Membranproteine werden aus dem ER rekrutiert und umschließen in der späten Anaphase die Chromosome. Die drei Kompartimente wurden durch drei unterschiedliche spektrale Varianten des GFP (YFP, CFP, RFP) sichtbar gemacht. Da solche vierdimensionale Experimente mit einem enormen Datenvolumen verbunden sind, werden automatisierte Auswertungstechniken zum Bearbeiten benötigt.

Ein typisches Experiment ergibt ca. 5000 Bilder und entspricht mehreren Gigabyte was den verfügbaren Hauptspeicherplatz sprengt. Durch die hohe räumliche und zeitliche Auflösung des Experiments und dem damit verbundenen Datenvolumen ist die manuelle Analyse durch den Anwender nicht mehr möglich. Viele Volumenrekonstruktions-Programme können Datensätze zwar qualitativ, jedoch nicht quantitativ darstellen. Mit den entwickelten Bildverarbeitungsmethoden im II. Teil wurde es möglich, diese dynamischen Prozesse im Zellkern in Zahlen auszudrücken und qualitativ zugänglich zu machen. Erst mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung kann die Dynamik der Struktur quantitativ und qualitativ in eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden. Die Auflösung in den Experimenten betrug in der x- und y-Richtung jeweils 512 Pixel, in z-Richtung, der Richtung der optischen Achse, wurden zwischen 10 und 15 Schichten aufgelöst.

## 13.2 Methoden für die Quantifizierung

Durch den Kompromiss zwischen Aufnahmezeit und Orts-/Zeitauflösung war das SNR Verhältnis relativ hoch. Aus diesem Grund wurde zur Erhöhung der Kanteninformation der anisotrope Diffusionsfilter aus Kapitel 4.3.3 angewandt. Dieses sensitive Filter erhält die Kanten, indem nur senkrecht zu ihnen und in homogenen Bereichen geglättet wird. Der Gradient der Kante bleibt dadurch erhalten. Selbst nach dieser Rauschunterdrückung war es nicht möglich, kantenbasierte Segmentierungsmethoden (wie z.B. den Canny-Kantendetektor) einzusetzen, so daß die Wahl auf ein Schwellwertverfahren fiel. Anschließend wurden auf der Grundlage der segmentierten Binär- und Originalbilder die Objekte über die Zeit mit den in Kapitel 8 diskutierten Methoden verfolgt. Zur Verbesserung der schlechten z-Auflösung wurde eine kontinuierliche Glättung der Randkurven eingesetzt, basierend auf *B-spline* Kurven (siehe Kapitel 7.1). Diese Kurven haben die Eigenschaft, die Krümmung der Oberfläche zu minimieren und dadurch zwischen den einzelnen, diskreten, konfokalen Schnitten interpolierte kontinuierliche Oberflächeninformation bereitzustellen. Mit Hilfe des Programms TGS OpenInventor<sup>1</sup> konnte die gesamte dreidimensionale Struktur bzw. vierdimensionale Animation visuell erfasst, Ausschnitte vergrößert und gleichzeitig die Perspektive verändert werden. Für die dreidimensionale Zeitserie wurde mit einem rigiden Registrierungsalgorithmus (siehe Kapitel 5) iterativ die Summe der quadratischen Distanzen minimiert. Somit wurde das Einfügen beliebiger virtueller Zwischenschritte zwischen zwei diskreten Zeitpunkten ermöglicht, ohne daß die topologische Struktur des Objekts verändert

---

<sup>1</sup>© TGS Inc., San Diego, USA, [www.TGS.com](http://www.TGS.com)

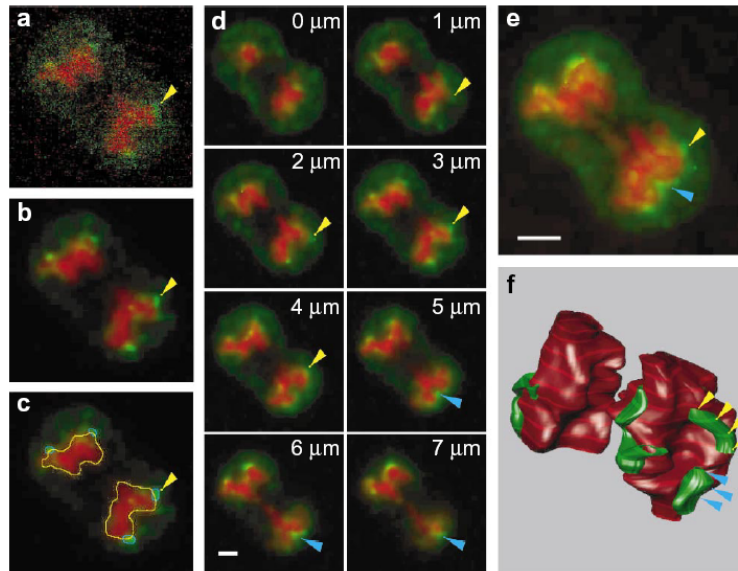


Abbildung 13.1: Für einen Zeitpunkt eines dreidimensionalen Zweifarberperiments sind LBR-YFP als Kernhüllenmarker (grün) und H2B-CFP als Chromatinmarker (rot) abgebildet. **a** Eine mittlere Schicht des dreidimensionalen Bildstapels zeigt zwei Tochterzellkerne in der späten Anaphase (siehe Abschnitt 3.2.1). Der gelbe Pfeil zeigt auf einen LBR Fleck. **b** Das Schnittbild aus **a** wurde mit dem Diffusionsfilter modifiziert. **c** Segmentierung des Chromatins (gelbe Linie) und der LBR Flecken (blaue Linie). **d** Dreidimensionaler Bildstapel der gefilterten optischen Schnitte. Dargestellt sind 8 von insgesamt 15 Schichten in unterschiedlichen Tiefen. **e** Projektion der Intensitäten für einen Bildstapel. **f** Dreidimensionale Rekonstruktion des segmentierten Bildstapels. Diese basiert auf fünf Interpolationsebenen (hellere Umrandung) zwischen den diskreten Schnittbildern. Die Pfeile deuten auf denselben LBR Fleck wie in **a** bis **e** abgebildet.

wurde. Die Membran der Kernhülle wurde durch einen YFP-Marker, der an den Lamin B-Rezeptor (LBR) bindet, sichtbar gemacht. Ebenso wurde ein CFP-Marker benutzt, der an Histon-2b (H2B) bindet und indirekt das Chromatin sichtbar macht.

### 13.3 Ergebnisse

Im ersten Experiment konnte gleichzeitig das Chromatin und der Wiederaufbau der Kernhülle in der späten Anaphase visualisiert werden. Der Lamin B-Rezeptor ist nur an bestimmten Stellen der Chromatinober-

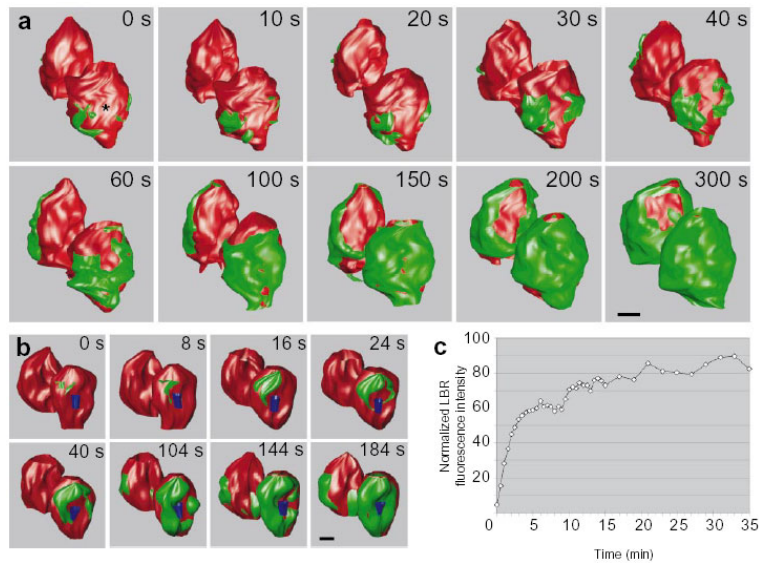


Abbildung 13.2: Aufbau der Kernhülle um das Chromatin in der späten Anaphase. **a** Eine Zeitserie von 53 Bildern wurde gleichzeitig für LBR-YFP (grün) und H2B-CFP (rot) alle 10 s aufgenommen. 10 repräsentative Zeitpunkte sind von links oben bis rechts unten dargestellt. **b** Eine dreifach gefärbte Sequenz über 190 Zeitpunkte wurde gleichzeitig für LBR-YFP, H2B-CFP und  $\gamma$ -tubulin-RFP aufgenommen. Die dreidimensionale Rekonstruktion zeigt Chromatin (rot), LBR Flecken (grün) und Centrosome (blau). **c** LBR-YFP Protein-Verteilung im ER und der Kernhülle für ein Zeitintervall von 35 min.

fläche konzentriert. Ein Vergleich der Oberflächenrekonstruktion mit der zweidimensionalen Projektion in Abbildung 13.1.e bzw. 13.1.f zeigt, daß dieses Phänomen nur in drei Dimensionen zu erkennen ist. Die weite Streuung von LBR-Flecken um den Schwerpunkt des Chromatins ist für den unteren Zellkern in Abbildung 13.1.d gezeigt. Ausgehend von dieser fleckenartigen, röhrenähnlichen Verteilung expandiert die Membran um das Chromatin, bis nach ca. fünf Minuten das gesamte Chromatin durch die Kernmembran umschlossen ist. Das Auftreten von LBR wird erst nach ca. 30 Sekunden messbar und zeigt für beide Tochterkerne ein synchrones Verhalten. Die Anordnung der LBR-Flecken war zudem in beiden Tochterkernen für mehrere Tochterpaare reproduzierbar. Im zweiten Experiment wurde zusätzlich  $\gamma$ -Tubulin-RFP (bindet an das Centrosom) als drittes Kompartiment visualisiert. Die Stelle innerhalb des Chromatins, um die sich die Kernhülle schließt, ist identisch mit der Position des Centrosoms (wie in Abbildung 13.2.b dargestellt). Da die Konzentration des GFP proportional zur Grauwertintensität im Bild ist, kann

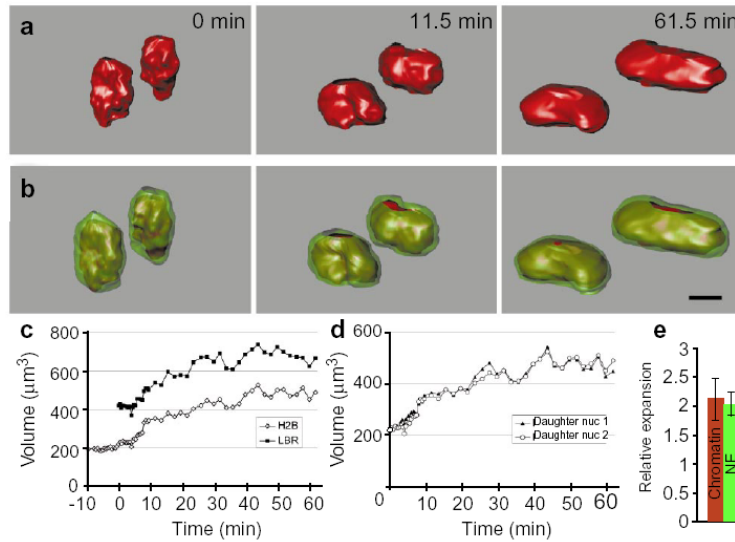


Abbildung 13.3: **a** Expansion von Chromatin (H2B-CFP), dargestellt für beide Tochterkerne zu drei verschiedenen Zeitpunkten. **b** Transparente Überlagerung des Chromatins und Kernhülle (LBR-YFP) für eine Zeitserie von insgesamt 61,5 min. **c** Expansion der Kernhülle und des Chromatins. **d** Expansion des Chromatins der zwei Tochterkerne **e** Relative Kernhüllen- und Chromatinexpansion in sechs Tochterkernen.

über ein Aufsummieren der Pixel im jeweiligen Kanal des dreidimensionalen Bildes die Konzentration bestimmt werden. In Abbildung 13.2.c ist der Kurvenverlauf über einen Zeitraum von 35 Minuten dargestellt. Ein starker Anstieg von ca. 70% der gesamten Kernhüllen-Konzentration findet innerhalb der ersten 2 bis 3 Minuten statt (siehe Abbildung 13.2.a). Innerhalb dieser Phase werden die einzelnen Flecken miteinander zu großen zusammenhängenden Flächen verbunden. Danach folgt eine etwa 7-minütige Phase ohne Wachstum, innerhalb der sich die Membranflächen vollständig mit dem Chromatin verbinden und das Signal für die Expansion der beiden Tochterkerne liefern. Diese Expansion ist mit geringen Wachstumsraten verbunden und dauert ca. 30 Minuten, bis das Maximum des Plateaus erreicht wird. Das logarithmische Verhalten der Kurve bestätigt ein Modell der Zellbiologie, in dem Kernmembranproteine durch Diffusion freien Zugang vom ER in die direkt damit verbundene Kernmembran haben bevor die Kernhülle sich komplett schließt. Dadurch ließe sich der anfänglich steile Anstieg der Kernmembranproteinkonzentration erklären. Nach dem Schließen der Membran befindet sich etwa 30% der gesamten Membranproteine im ER. Sie diffundieren durch den Kernporenkomplex zur Membran hindurch. Dies würde sich in einem

geringen Konzentrationszuwachs äußern, wie im Experiment beobachtet. Nach dem vollständigen Abdecken des Chromatins durch die Kernmembran wachsen beide Kompartimente auf die zweifache Konzentration an (siehe Abbildung 13.3.e) und stoppen ihr Wachstum. Das Wachstum beider Kompartimente korreliert stark (dargestellt in Abbildung 13.3.c,d). Dies stimmt mit der Annahme überein, daß die Dekondensierung des Chromatins die treibende Kraft für die Kernexpansion darstellt und die umschließende Kernhülle sich deren Wachstum anpasst. Die beobachteten quantitativen Wachstumsraten stimmten mit einer Analyse überein, die das Volumen automatisch bestimmt [22] (siehe Kapitel 9).

# Kapitel 14

## Diskussion

In Zusammenarbeit mit Daniel Gerlich [25], Wolfgang Tvaruskó [67], Christian Bacher und Julian Mattes habe ich Bildverarbeitungsmethoden entwickelt, um Dynamik in Mikroskopaufnahmen zu quantifizieren. Mit Hilfe dieser dynamischen Eigenschaften konnten funktionelle Zusammenhänge im Zellkern aufgezeigt werden.

Grundlage der von mir entwickelten Methoden waren vorangegangene Arbeiten von:

- C. Hering et. al. [31]: Diese Arbeit stellt die Grundlage der entwickelten *Particle-Tracking* Methode dar. Die oft schlechte Bildqualität (niedriges SNR) beeinflusst die Segmentierung von einem Zeitpunkt zum nächsten; deshalb lassen sich korrespondierende Objekte häufig nicht mit absoluter Sicherheit bestimmen. Aus diesem Grund habe ich einen *Tracking*-Ansatz implementiert, basierend auf einem *Fuzzy-Logic* Verfahren. Aufgrund der allgemeinen Definition der Methode kann dieser Algorithmus auf Objekte in beliebiger Dimension angewandt werden.
- M. J. Black et. al. [7]: In diesem Artikel wurde die anisotrope Diffusion mit möglichen *edge-stopping*-Funktionen diskutiert. Daraus leitete ich den anisotropen Diffusionsfilter in 3D ab und implementierte diesen mit der Tukey-Psi Fehlerfunktion.
- F. Leitner et. al. [41]: Aus dieser Arbeit wurde die Idee der iterativen Verrückung der Kontrollpunkte aufgegriffen. Die Verrückung der Kontrollpunkte wird dabei durch eine Gütefunktion kontrolliert und stoppt, wenn die Gütefunktion ein Minimum einnimmt. Dieser Ansatz wurde von mir auf drei Dimensionen erweitert, zusätzlich konnte ich durch iteratives Einfügen von Kontrollpunkten die Approximation der aktiven Kontur an die Kantenpunkte verbessern.

- X. Xu et. al. [75]: In dieser Arbeit wurde ein neues externes Kräftefeld eingeführt um die Konvergenz von aktiven Konturen in Konkavitäten zu verbessern. Dieses so genannte GVF-Feld wurde mit aktiven polygonalen Konturen getestet. In meiner Arbeit wurde dieses externe Kräftefeld mit der *B-spline snake* kombiniert. Dabei konnte ich zeigen, daß sich der *attraction range* vergrößerte. Dieser Ansatz ist robuster gegenüber Störungen, wie z.B. Unterbrechungen der Kante oder Pixelartefakte.

In Kapitel 9 benutzte ich die Daten aus der Anwendung in Kapitel 13, um ein aktives Oberflächenmodell zu testen. Die Oberfläche wurde durch eine NURBS-Fläche mit einer fest vorgegebenen Anzahl an Kontrollpunkten beschrieben. Auf die anisotrop diffundierten Bilder wandte ich einen Kantenoperator an, um die Umrisse der Kernmembran zu detektieren. Die Kantenpunkte in einem Bild ordnete ich mit einem Clusteralgorithmus den beiden Tochterkernen zu; das Clusterzentrum stellte gleichzeitig den Mittelpunkt der initialisierten NURBS-Kugel dar. Durch iterative Verrückung der Kontrollpunkte wurde die NURBS-Fläche deformiert und durch Minimierung einer Kostenfunktion an die Kantenpunkte gefittet. In dieser Anwendung konnte ich mit dieser Methode über mehrere Zeitschritte zeigen, daß die Volumen-Expansion der Kernhülle den gleichen Trend zeigte, wie die manuelle Analyse dieser Daten.

Um die Umrisse von zweidimensionalen Objekten zu beschreiben, wird in Kapitel 10 ein *snake* Konturmodell vorgestellt. Die Kontur habe ich mit kubischen *B-splines* definiert und unter dem Einfluss eines externen Kräftefeldes (GVF-Feld) iterativ an die extrahierten Kanten gefittet. In diesem Ansatz kombiniere ich das GVF-Feld mit der *B-spline* Kontur. Dabei konnte ich eine bessere Konvergenz der Kontur zu den Kantenpunkten zeigen. Außerdem wurde die Anzahl der zu optimierenden Parameter reduziert. Probleme in diesem Ansatz lagen in der topologischen Starrheit, so daß im Vorfeld die zu segmentierende Struktur bekannt sein musste.

Mehrere Anwendungen konnten mit diesen weiterentwickelten Methoden bearbeitet werden, um Dynamik quantitativ zu analysieren. Dabei stellt die Anwendung in Kapitel 11 eine Ausnahme dar, denn hier geht es nicht um die Dynamik, sondern um die quantitative Analyse der dreidimensionalen Struktur. In Röntgentomographiebilder untersuchte ich die Struktur von Koksproben. Mit der Rekonstruktion konnte ich zeigen, daß die Lufteinschlüsse innerhalb des Materials zu einer großen Pore zusammengeschlossen sind. Dies gilt natürlich nur, wenn die Poren untereinander durch Kanäle mit einem Durchmesser verbunden sind, der noch mit dem Mikroskop aufgelöst werden kann.

Im nächsten Experiment in Kapitel 12 habe ich die Dynamik von PML-Kompartimenten im Zellkern untersucht. Ich konnte quantitativ



zeigen, daß die Bewegung dieser Kompartimente in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden kann. Den Kompartimenten mit der größten Dynamik konnte ich eine Stoffwechselenergie-Abhängigkeit nachweisen, während die Dynamik der anderen Kompartimente unbeeinflusst gegenüber dem Entzug von Stoffwechselenergie waren. Mein implementierter *Particle-Tracking* Ansatz wurde zur dynamischen Analyse der Bildfolgen benutzt. Die Raum-Zeit Darstellung interpoliert die Kompartimente mit kubischen *B-splines* zwischen den Aufnahmezeiten und gibt einen qualitativen Eindruck ihrer Oberflächen- und Schwerpunktdynamik. In dieser Anwendung konnte ich zum ersten Mal quantitativ eine solch hohe Dynamik von Kompartimenten in Säugetierzellkernen nachweisen. Da aufgrund der hohen Dynamik die Kompartimente oft aus der fokalen Ebene des Objektivs verschwanden, waren die Trajektorien der Bewegung häufig fragmentiert. Es war mit automatischer Segmentierung nicht möglich, die sich ständig ändernden Beleuchtungsverhältnisse zu berücksichtigen, so daß ich ein Schwellwertverfahren zur Segmentierung einsetzte.

Mit der dreidimensionalen konfokalen Mikroskopietechnik konnte in der dritten Anwendung in Kapitel 13 die Dynamik von Oberflächen quantifiziert werden. Durch die gleichzeitige Aufnahme von mehreren fluoreszierenden Stoffen konnten drei unterschiedliche Strukturen simultan über mehrere Zellteilungsschritte hinweg analysiert werden. Dadurch konnte die Anreicherung der Kernhüllenproteine um das Chromatin zeitlich aufgelöst und qualitativ dargestellt werden. Eine weitere Analyse beschäftigte sich mit der zeitlichen Chromatin- und Kernhüllenexpansion zweier Tochterkerne. Ich konnte zeigen, daß die zeitliche Expansion des Zellkernvolumens simultan in den beiden getrennten Zellen stattfindet und einen logarithmischen Verlauf zeigt. Die Größe des Volumens wurde durch die Anzahl der Voxel bestimmt.

Eine Fortsetzung der hier vorgestellten Arbeiten könnte im Bereich der Entwicklung von geometrischen aktiven Konturen liegen. Damit ließe sich eine beliebige Anzahl an Objekten im Bild segmentieren. Bei einem Test mit der von Sethian et. al. [58] entwickelten Methode der *Level-Sets* konnte mit biologischen Beispieldaten allerdings kein befriedigendes Resultat erzielt werden. Des Weiteren war der Rechenaufwand beim Bestimmen des GVF-Feldes sehr hoch, für die Testbilder mit 128x128 Pixel lag die Zeit bei einigen Minuten für 100 Iterationen. Eine Implementierung in einer Hochsprache wie C könnte allerdings die Geschwindigkeiten im Vergleich zu Matlab drastisch erhöhen. Bei den NURBS Oberflächen würde die Optimierung der homogenen Koordinate eine genauere Approximation der aktiven Oberfläche erlauben, speziell für lokale Deformationen. Eine Möglichkeit, die Qualität des *Particle Trackings* zu verbessern besteht darin, in einem Vorverarbeitungsschritt die Bilddaten zu registrieren. Arbeiten auf diesem Gebiet wurden von Dr. J. Mattes und J.

Fieres in der Arbeitsgruppe von Dr. R. Eils durchgeführt und befinden sich im Einsatz. In Zukunft könnten die entwickelten Methoden nicht nur im biomedizinischen Bereich eingesetzt werden, sondern darüber hinaus in Bereichen, in denen die quantitative Analyse von Bilddaten eine Rolle spielt.

# Publikationsliste

**M. Gebhard, J. Mattes and R. Eils:** An Active Contour Model for Segmentation Based on Cubic B-Splines and Gradient Vector Flow, *Lecture Notes in Computer Science* 2208, 1373-1375, 2001

**D. Gerlich, J. Beaudouin, M. Gebhard, J. Ellenberg and R. Eils:** Four-dimensional imaging and quantitative reconstruction to analyse complex spatiotemporal processes in live cells, *Nature Cell Biology*, volume 3, pp. 852-858, 2001

**M. Muratani, D. Gerlich, S. M. Janicki, M. Gebhard, R. Eils and D. L. Spector:** Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus, *Nature Cell Biology*, volume 4, pp. 106-110, 2002

**M. Gebhard, R. Eils and J. Mattes:** Segmentation of 3D Objects using NURBS Surfaces for Quantification of Surface and Volume Dynamics, *International Conference on Diagnostic Imaging and Analysis*, ICDIA 2002 pp. 125-130, 2002

**C. Athale, M. Gebhard and R. Eils:** Examining Spatio-Temporal Dynamics in Cell Nuclei by Image Processing Methods, *FORMATX Microscopy Book Series*, volume 1, pp. 345-351, 2003

**M. Gebhard, J. Mattes and R. Eils:** Tracking of Nuclear Cell Architecture and Dynamics, *Image Sequence Analysis to Investigate Dynamic Processes*, LNCS Research Monograph, *Springer Verlag*, submitted

**J. Mattes, M. Gebhard and R. Eils:** Parametric deformable surface and volume models for image sequence processing, *Image Sequence Analysis to Investigate Dynamic Processes*, LNCS Research Monograph, *Springer Verlag*, submitted

# Index

- ADP, 27
- Anaphase, 29
- anisotrope Diffusion, 40
- ATP, 27
  
- B-spline, 56
- BHK, 103
- Binomial, 38
  
- Canny, 47
- Closing, 36
- CLSM, 19
- convolution, 37
- Cytokinese, 30
  
- Dilatation, 35
- DNA, 2
  
- ER, 25
- Erosion, 34
- Euclidean Distance Map, 37
- eukaryotisch, 27
- explicit snakes, 53
  
- Fluoreszenz, 11
- Fuzzy c-mean Clustering, 59
  
- geodesic snakes, 55
- GFP, 26
  
- idempotent, 35
- implicit snakes, 54
- in vivo, 20
- inkohärent, 11
- Interphase, 27
  
- konfokal, 12
  
- Laser, 11
  
- Median, 35
- Metaphase, 29
- Micro-CT, 20
- Minkowski subtraction, 35
  
- NURBS, 77
- Nyquist, 34
  
- Opening, 36
  
- photobleaching, 19
- Pixel, 19
- PML, 26
- Prometaphase, 29
- Prophase, 28
- PTV, 67
- Pyramid Linking, 50
  
- Registrierung, 43
  
- sekundäre Fluoreszenz, 17
- Skeleton, 36
- Skelettierung, 36
- snake, 83
  
- Telophase, 30
- Thinning, 36
- Tracking, 65

# Abbildungsverzeichnis

2.1	<b>Links</b> Strahlengang eines Lichtmikroskops. <b>Rechts</b> Huyghens-Okular. . . . .	10
2.2	Typische Energieniveaus und Lebensdauern von Übergängen eines Fluorophors. Die elektronischen Zustände sind weiter unterteilt in mehrere Vibrationszustände, die hier zur besseren Übersichtlichkeit weggelassen wurden. . . . .	13
2.3	<b>Links</b> Konfokales Prinzip des <i>laser scanning</i> Mikroskops. <b>Rechts</b> Schematische Darstellung des Strahlengangs und der Bauteile. . . . .	14
2.4	Lichtintensitätsverteilung hinter einer Linse. . . . .	15
2.5	Schematischer Aufbau eines Micro-CT Scanners. . . . .	21
2.6	SkyScan-1072 Micro-CT Scanner, installiert an der University of Adelaide, SA 5005, Australia. . . . .	22
3.1	Schematische Darstellung der Zellteilungsschritte. . . . .	28
4.1	Veranschaulichung der Wirkungsweise morphologischer Operatoren. <b>a</b> Binärbild. <b>b</b> Median Filter. <b>c</b> Erosions Filter. <b>d</b> Dilatations Filter. <b>e</b> <i>Opening</i> Filter mit einer Iteration. <b>f</b> <i>Closing</i> Filter mit einer Iteration. <b>g</b> <i>Closing</i> Filter mit fünf Iterationen. <b>h</b> <i>Thinning</i> Filter mit fünf Iterationen. . . . .	36
4.2	<b>Links</b> Transferfunktion eines $3 \times 3$ Rechteckfilters. <b>Rechts</b> Projektion der Transferfunktion auf eine Ebene. . . . .	38
4.3	<b>Links</b> Transferfunktion des Gauß Kerns, approximiert mit einer $3 \times 3$ Binomial-Filtermaske. <b>Rechts</b> Die Projektion der Gauß-Transferfunktion auf eine Ebene. . . . .	39
4.4	Tukey's Psi Funktion $\Psi(x, \sigma)$ , $g(x, \sigma)$ und $\rho(x, \sigma)$ . . . . .	41
5.1	Die obere Reihe enthält drei Bilder, aufgenommen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. In der Reihe darunter sind die registrierten Bilder abgebildet. Dabei repräsentiert das linke Bild den ersten, das mittlere Bild den mittleren und das rechte Bild den letzten Zeitpunkt. . . . .	45

- 8.1 Cajal-Kompartimente sind aus einer Sequenz von konfokalen 3D Bildstapeln für einen Zeitpunkt rekonstruiert. Die Oberfläche der Kompartimente wird durch die Gitterstruktur, die zeitliche Bewegung der Schwerpunkte durch die Punktwolke beschrieben. Die fünf Kompartimente zeigen leichte Drift in eine gemeinsame Richtung. . . . . 73
- 9.1 Aus einer Sequenz von konfokalen 3D Bildstapeln ist ein diskreter Zeitpunkt exemplarisch dargestellt. **Links** Der Gradient der Kanten im Bild ist farbkodiert von grün (niedriger Gradient) nach rot (hoher Gradient) dargestellt. **Mitte** Zwei Tochterkerne nach dem *Clustern*; die Zentren der einzelnen *Cluster* sind als 'O' and 'X' dargestellt. **Rechts** Der Fitting-Prozess einer anfänglichen Kugel (rot) zu den Objekt-Pixeln (blau) und der resultierenden NURBS Oberfläche (grün). Die Kontrollpunkte sind in der gleichen Farbe abgebildet. . . . . 78
- 9.2 Volumen- und Oberflächendynamik über die Zeit mit manueller und automatischer Segmentierung. **Links** Volumenexpansion der zwei Tochterkerne. **Rechts** Oberflächenexpansion. . . . . 78
- 10.1 Externes GVF-Feld mit dem verwendeten Kantenbild (rechts oben) als Eingabegröße. Das GVF-Feld wurde aus den verauschten Bilder aus Abbildung 10.2 generiert. . . . . 87
- 10.2 Vergleich zweier verschiedener Evolutionsmethoden. **A** Resultat erzielt mit einer fixen Anzahl an Kontrollpunkten. **B** Resultat mit der gleichen initialen *spline* wie in **A**, aber mit doppelter Anzahl an Kontrollpunkten. Die blaue Linie stellt in beiden Fällen die Initialisierung durch die blauen Kontrollpunkte dar. Die *polygon snake* (rot) und die *snake spline* (grün) sind mit den dazugehörigen Kontrollpunkten dargestellt. . . . . 88
- 10.3 Segmentierung der Kernmembran. **A** Das extrahierte Canny-Kantenbild mit der initialen *spline* (grün), definiert durch die fünf Kontrollpunkte. **B** Original Grauwertbild mit dem Ergebnis nach der Evolution: *snake spline* (grün) und *polygon snake* (rot). Ebenso sind die anfänglichen (grün) mit den evolvierten (blau) Kontrollpunkten für die *snake spline* aufgetragen. . . . . 89

10.4 Segmentierung der Membran von zwei Tochterkernen. Der Canny Kantenoperator wurde auf die Originaldaten (links unten) angewandt. Die Segmentierung ist für die *polygon snake* (rot) und *snake spline* (grün) unter dem Einfluss des GVF-Felds dargestellt. . . . . 91

11.1 Koksprobe mit Messbalken. . . . . 96

11.2 **Links** Röntgenaufnahme der Koksprobe aus 11.1. **Rechts** Ein rekonstruiertes Schnittbild der Projektion. . . . . 98

11.3 Rekonstruktionen der jeweiligen Struktur: Wand (Koks), Luft und Mineraleinschlüsse (von links nach rechts). . . . 99

11.4 **Links** Anzahl der Poren für die fünf unterschiedlichen Koks-Proben. **Rechts** Gesamtvolumen der Poren für die fünf unterschiedlichen Koks-Proben. Jeweils dargestellt für fünf unterschiedliche Volumensegmente. . . . . 99

11.5 **Links** Verhältnis des Volumens, das durch kleine Poren eingenommen wird zum Volumen der großen, zusammenhängenden Pore. Fünf unterschiedliche Koks-Proben mit jeweils fünf unterschiedlichen Volumensegmenten sind abgebildet. **Rechts** Verteilung des mittleren Durchmessers der Poren für fünf unterschiedliche Koks-Proben. . . . . 100

11.6 Schematische Verdeutlichung des morphologischen Operators *Thinning*. Aus einem Objekt (grün) wird das *Skeleton* extrahiert (rot). Die Engstelle ist schwarz abgebildet. . . 101

11.7 **a** Die verbundenen Regionen nach dem Regionenwachstum. **b** Extrahierte Struktur nach dem *Thinning*. **c** Farbkodierte euklidische Distanzkarte. **d** Multiplikation der euklidischen Distanzkarte (**c**) mit dem der binären Maske (**b**). 102

12.1 Orts- und zeitaufgelöste Visualisierung nach dem *Tracking* von 11 PML-Kompartimenten. **a** Mikroskopbild mit nummerierten PML-Kompartimenten zu einem bestimmten Zeitpunkt. Der horizontale Messbalken hat eine Länge von  $2,5\mu\text{m}$ . **b** Ort-Zeit Rekonstruktion der Bewegung von PML-Kompartimenten. Jedes PML-Kompartiment ist mit einer spezifischen Farbe und Nummer markiert. Die PML-Kompartimente können anhand der Nummerierung in der Rekonstruktion dem Originalbild zugeordnet werden. . . 104

12.2 Ein PML-Kompartiment startet bei (1) und folgt dem quasilinearen Weg, auf dem es mit einem anderen PML-Kompartiment fusioniert (5). Dieses Bild zeigt eine Projektion von fünf zusammengehörigen Bildern. Der Messbalken hat eine Länge von  $1\mu\text{m}$ . . . . . 105

- 12.3 **a** Nummerierte PML-Kompartimente zu einem Zeitpunkt in einem Originalbild, aufgenommen durch ein konfokales Mikroskop. Der Messbalken hat eine Länge von  $5\mu\text{m}$ . **b** Die korrespondierenden PML-Kompartimente werden von einem Stoffwechselenergie abhängigen Mechanismus angetrieben. Die Rekonstruktion der Bewegung ist in Raum und Zeit dargestellt. Diese Kompartimente wurden in drei Phasen aufgenommen, vor ATP-Entzug, während ATP-Entzug und nach dem Auswaschen von *sodium azide*, einem ATP-Hemmstoff. . . . . 107
- 12.4 Geschwindigkeitsverteilung der PML-Kompartimente über drei Phasen. **Links** Ohne Behandlung. **Mitte** Nach Einbringen eines Myosin-Hemmstoffes (BDM) im Zeitintervall von 5-15 Minuten. **Rechts** Zeitintervall von 20-30 Minuten. Die Bewegung der sich schnell bewegenden Klasse von PML-Kompartimenten bricht nach der Behandlung mit BDM dramatisch ein, während die der anderen Klassen auf einem konstanten Niveau bleibt. Die verschiedenen Farben korrespondieren mit einzelnen PML-Kompartimenten aus einem Zellkern. . . . . 108
- 13.1 Für einen Zeitpunkt eines dreidimensionalen Zweifarbeexperimentes sind LBR-YFP als Kernhüllenmarker (grün) und H2B-CFP als Chromatinmarker (rot) abgebildet. **a** Eine mittlere Schicht des dreidimensionalen Bildstapels zeigt zwei Tochterzellkerne in der späten Anaphase (siehe Abschnitt 3.2.1). Der gelbe Pfeil zeigt auf einen LBR Fleck. **b** Das Schnittbild aus **a** wurde mit dem Diffusionsfilter modifiziert. **c** Segmentierung des Chromatins (gelbe Linie) und der LBR Flecken (blaue Linie). **d** Dreidimensionaler Bildstapel der gefilterten optischen Schnitte. Dargestellt sind 8 von insgesamt 15 Schichten in unterschiedlichen Tiefen. **e** Projektion der Intensitäten für einen Bildstapel. **f** Dreidimensionale Rekonstruktion des segmentierten Bildstapels. Diese basiert auf fünf Interpolationsebenen (hellere Umrandung) zwischen den diskreten Schnittbildern. Die Pfeile deuten auf denselben LBR Fleck wie in **a** bis **e** abgebildet. . . . . 111



13.2 Aufbau der Kernhülle um das Chromatin in der späten Anaphase. **a** Eine Zeitserie von 53 Bilder wurde gleichzeitig für LBR-YFP (grün) und H2B-CFP (rot) alle 10s aufgenommen. 10 repräsentative Zeitpunkte sind von links oben bis rechts unten dargestellt. **b** Eine dreifach gefärbte Sequenz über 190 Zeitpunkte wurde gleichzeitig für LBR-YFP, H2B-CFP und  $\gamma$ -tubulin-RFP aufgenommen. Die dreidimensionale Rekonstruktion zeigt Chromatin (rot), LBR Flecken (grün) und Centrosome (blau). **c** LBR-YFP Protein-Verteilung im ER und der Kernhülle für ein Zeitintervall von 35min. . . . . 112

13.3 **a** Expansion von Chromatin (H2B-CFP), dargestellt für beide Tochterkerne zu drei verschiedenen Zeitpunkten. **b** Transparente Überlagerung des Chromatins und Kernhülle (LBR-YFP) für eine Zeitserie von insgesamt 61,5 min. **c** Expansion der Kernhülle und des Chromatins. **d** Expansion des Chromatins der zwei Tochterkerne **e** Relative Kernhüllen- und Chromatinexpansion in sechs Tochterkernen. . . . . 113



# Literaturverzeichnis

- [1] A. Adamczyk, L. Rimai: 2-D Particle Tracking Velocimetry (PTV): Technique and Image Processing Algorithms, *Experiments in Fluids*, volume 6, pp. 373-380, 1988
- [2] C. Athale, M. Gebhard and R. Eils: Examining Spatio-Temporal Dynamics in Cell Nuclei by Image Processing Methods, *FORMATEX Microscopy Book Series in Science, Technology and Education of Microscopy: An Overview*, volume 1, pp. 345-351, 2003
- [3] G. Aumann and K. Spitzmüller: Computerorientierte Geometrie, *B.I. Wissenschaftsverlag*, 1993
- [4] N. Ayache, P. Cinquin, I. Cohen, L. Cohen, F. Leitner and O. Monga: Segmentation of complex three-dimensional medical objects: a challenge and a requirement for computer-assisted surgery planning and performance, *Computer-Integrated Surgery: Technology and Clinical Applications*, *MIT Press*, pp. 59-74, 1996
- [5] H. Blum: A transformation for extracting new descriptors of shape, *Models for the Perception of Speech and Visual Forms*, Cambridge, Massachusetts: MIT Press, pp. 362-380, 1967
- [6] J.C. Bezdek: Pattern Recognition with Fuzzy Objective Function Algorithms, *Plenum Press*, New York, 1981.
- [7] M. J. Black, G. Sapiro, D.H. Marimont and D. Heger: Robust Anisotropic Diffusion, *IEEE Trans. on Image Processing*, volume 7(3), pp. 421-431, 1998
- [8] B. Bhushan, J. C. Wyant and C. Koliopoulos: Measurement of surface topography of magnetic tapes by Mirau interferometry, *Applied Optics*, vol. 24, pp. 1489-1497, 1985
- [9] H. Bornfleth, P. Edelmann, D. Zink, T. Cremer and C. Cremer: Quantitative Motion Analysis of Subchromosomal Foci in Living Cells Using Four-Dimensional Microscopy, *Biophys. Journal*, volume 77(5), pp. 2871-2886, 1999

- [10] M. Both: Messtechnische Optimierung des zellphysiologischen Anwendungsbereichs eines kombinierten konfokalen und multiphotonen Fluoreszenzmikroskopiesystem, *Master Thesis Universität Heidelberg*, 2001
- [11] P. Brigger, J. Hoeg, M. Unser: B-Spline Snake: A Flexible Tool for Parametric Contour Detection, *IEEE transaction on image processing*, volume 9(9), pp. 1484-1496, 2000
- [12] J.F. Canny: A Computational Approach to Edge Detection, *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, volume 8(6), pp. 679-698, Nov. 1986
- [13] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher: Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science*, volume 263, pp. 802-805, 1994
- [14] L. D. Cohen: On active contour models and balloons, *CVGIP, Image Understanding*, volume 53(2), pp. 211-218, 1991
- [15] P. Dulyakarn and Y. Rangsanseri, *Fuzzy c-means clustering using spatial information with application to remote sensing*, 22nd Asian Conference on remote sensing, 5.-9. November 2001, Singapore
- [16] J. L. Eilertsen, S. Rrvik, T. Foosns and H. A. Øye: An automatic image analysis of coke texture, *Carbon*, volume 34(3), pp. 375-385, 1996
- [17] R. Eils, D. Gerlich, W. Tvaruskó, D. L. Spector and T. Misteli: Quantitative Imaging of Pre-mRNA Splicing Factors in Living Cells, *Molecular Biology of the cell*, volume 11, pp. 413-418, 2000
- [18] J. Fieres, J. Mattes and R. Eils: A point set registration algorithm using a motion model based on thin-plate splines and point clustering, Pattern Recognition DAGM 2001, Munich, Germany, *Lecture Notes in Computer Science*, volume 2191, pp. 76-83, Springer-Verlag, 2001
- [19] L.A. Feldkamp, L.C. Davis and J.W. Kress: Practical Cone-beam algorithm, *J. Opt. Soc. Amer.*, pp. 612-619, 1984
- [20] M. Gebhard: Entwicklung eines Verfahrens für dreidimensionales Particle-Tracking in der Bildfolgenanalyse, *Master Thesis Universität Heidelberg*, 2000

- [21] M. Gebhard, J. Mattes and R. Eils: An Active Contour Model for Segmentation Based on Cubic B-Splines and Gradient Vector Flow, *Lecture Notes in Computer Science* 2208, pp. 1373-1375, 2001
- [22] M. Gebhard, R. Eils and J. Mattes: Segmentation of 3D Objects using NURBS Surfaces for Quantification of Surface and Volume Dynamics, *International Conference on Diagnostic Imaging and Analysis*, ICDIA 2002, pp. 125-130, 2002
- [23] M. Gebhard, J. Mattes and R. Eils: Tracking of Nuclear Cell Architecture and Dynamics, *Image Sequence Analysis to Investigate Dynamic Processes*, LNCS Research Monograph, *Springer*, submitted
- [24] D. Gerlich, J. Beaudouin, M. Gebhard, J. Ellenberg and R. Eils: Four-dimensional imaging and quantitative reconstruction to analyse complex spatiotemporal processes in live cells, *Nature Cell Biology*, volume 3, pp. 852-858, 2001
- [25] D. Gerlich: Dynamics of Nuclear Architecture Investigated by Live Cell Microscopy and Quantitative 4-D Reconstruction, *PhD Thesis Universität Heidelberg*, 2002
- [26] D. Gerlich, J. Mattes and R. Eils: Quantitative motion analysis and visualization of cellular structures, *Methods*, volume 29(1), pp. 3-13, 2003
- [27] Gerthsen, Kneser and Vogel: Physik, 16. Auflage, *Springer Verlag*, 1989
- [28] I. Grant: Selected Papers on Particle Image Velocimetry, *SPIE Press*, Milestone Series, MS99, 1994
- [29] R. H. Gting and S. Dieker: Datenstrukturen und Algorithmen, 2. Auflage, *B.G. Teubner Stuttgart*, 2003
- [30] Y. A. Hassan: Full-field bubbly flow velocity measurements using multi-frame particle-tracking technique, *Experiments in Fluids*, volume 12, pp. 49-60, 1991
- [31] F. Hering, C. Leue, D. Wierzimok and B. Jähne: Particle tracking velocimetry beneath water waves, part i: Visualization and tracking algorithms, *Experiments in Fluids*, volume 23, pp. 472-482, 1998
- [32] B. Horn, B. G. Schunck: Determing optical flow, *Art. Intel.*, volume 17, pp. 185-203, 1981

- [33] M. Jäckels: Rekonstruktionsverfahren in der 3D-Rückstretomographie, *PhD Thesis Universität des Saarlandes, Saarbrücken*, 2003
- [34] B. Jähne: Digital Image Processing, 5th edition, *Springer Verlag*, 2002
- [35] A.K. Jain, Fundamentals of digital image processing, *Prentice Hall*, 1989
- [36] M. Kass, A. Witkin, D. Terzopoulos: Snakes: Active contour models, *J. Comp. Vision*, volume 1, pp. 321-331, 1987
- [37] W. G. Kirsch, D. Uttenweiler and R. H. A. Fink: Spark- and ember-like elementary  $\text{Ca}^{2+}$  release events in skinned fibres of adult mammalian muscle, *J. Physiol.*, volume 537(2), pp. 379-389, 2001
- [38] J. R. Lakowicz: Principles of Fluorescence Spectroscopy, *Plenum Press, New York*, 1983
- [39] I. Lang, M. Scholz and R. Peters: Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells, *J. Cell Biol.*, volume 102, pp. 1183-1190, 1986
- [40] A. M. Larie and S. S. Abukmeil: Brain abnormality in schizophrenia: a systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies, *J. Psych.*, volume 172, pp. 110-120, 1998
- [41] F. Leitner, I. Marque, P. Lavallée and P. Cinquin: Dynamic segmentation: Finding edge with snake splines, *Proceedings of International Conference on Curves and Surfaces, Academic Press*, pp. 1-4, Chamonix, France, June 1990
- [42] J. Hoschek and D. Lasser: Grundlagen der geometrischen Datenverarbeitung, *B.G. Teubner Stuttgart*, 2. Auflage, 1992
- [43] C. E. Loo, Andriopoulos, R. D. Dukino: Micro-structural properties of coke, *Japan Australia Workshop: Symposium on Iron and Steel-making, Kyoto, Japan*, 4.-5. April 2002
- [44] D. Marr and E. Hildreth: Theory of edge detection, *Proc. R. Soc. London Ser. B*, volume 207, pp. 187-217, 1980
- [45] J. Mattes, M. Gebhard and R. Eils: Parametric deformable surface and volume models for image sequence processing, *Image Sequence Analysis to Investigate Dynamic Processes*, LNCS Research Monograph, *Springer Verlag*, submitted

- [46] G. G. Maul: Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication, *Bioessays*, volume 20, pp. 660-667, 1998
- [47] T. Misteli: The concept of self-organization in cellular architecture, *J. Cell Biol.*, volume 155(2), pp. 181-186, 2001
- [48] J. Montagnat, H. Delingette and N. Ayache: A review of deformable surfaces: topology, geometry and deformation, *Image and Vision Computing*, volume 19(14), pp. 1023-1040, 2001
- [49] M. Muratani, D. Gerlich, S. M. Janicki, M. Gebhard, R. Eils and D. L. Spector: Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus, *Nature Cell Biology*, volume 4, pp. 106-110, 2002
- [50] News feature: Biology's new dimension, *Nature*, volume 424, pp. 870-872, 2003
- [51] D. Nauck, F. Klawonn and R. Cruse: Foundations of Neuro-Fuzzy-Systems, *Wiley, New York*, 1997
- [52] P. Perona and J. Malik: Proceedings of the IEEE Computer Society Workshop on Computer Vision, *IEEE Computer Society Press, Washington DC*, pp. 16-22, 1987
- [53] R. D. Phair and T. Misteli: High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus, *Nature*, volume 404, pp. 604-609, 2000
- [54] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier: Primary structure of the aequorea victoria green-fluorescent protein, *Gene*, volume 111(2), 229-233, 1992
- [55] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling and B. P. Flannery: *Numerical recipes in C*, Cambridge, second edition, pp. 683-688, 1992
- [56] B. Richards and E. Wolf: Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system, *Proc. Roy. Soc. London A* 253, pp. 358-379, 1959
- [57] A. Rogers: Mathematical Elements for Computer Graphics, 2nd Edition, *McGrawHill*, 1990
- [58] J. A. Sethian: Level Set Methods: Evolving Interfaces in Geometry, Fluid Mechanics, Computer Vision and Materials Science, *Cambridge University Press*, 1996

- [59] M. Sonka and J. M. Fitzpatrick: Handbook of Medical Imaging, *SPIE Press*, volume 2: Medical Image Processing and Analysis, 2000
- [60] D. L. Spector: Nuclear bodies, *J. Cell. Sci.*, volume 114, pp. 2891-2893, 2001
- [61] D. L. Spector: Macromolecular domains within the cell nucleus, *Annu. Rev. Cell Biol.*, volume 9, pp. 265-315, 1993
- [62] D. von Stechow, K. Balto, P. Stashenko, R. Muller: Three-dimensional quantitation of periradicular bone destruction by micro-computed tomography, *J. Endod.*, volume 29(4), pp. 252-258, 2003
- [63] J. White and E. Stelzer: Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells, *Trends Cell Biol.*, volume 9(2), pp. 61-66, 1999
- [64] P. Taylor: Invited review: computer aids for decision-making in diagnostic radiology—a literature review, *Brit. J. Radiol.*, volume 68, pp. 945-957, 1995
- [65] T.I.L.L. Photonics GmbH, Lochhamer Schlag 19, D - 82166 Gräfelfing, Germany: <http://www.till-photonics.de>
- [66] T. Tsukamoto N. Hashiguchi, S.M. Janicki, T. Tumber, A. S. Belmont and D. L. Spector: Visualization of gene activity in living cells, *Nature Cell Biology*, volume 2, pp. 871-878, 2000
- [67] W. Tvaruskó: Zeitaufgelöste Analyse und Visualisierung in lebenden Zellen, *PhD Thesis Universität Heidelberg*, 2000
- [68] W. Tvaruskó, M. Bentele, T. Misteli, R. Rudolf, C. Kaether, D.L. Spector, H. H. Gerdes and R. Eils: Time-resolved analysis and visualization of dynamic processes in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, volume 96, pp. 7950-7955, 1999
- [69] D. Uttenweiler: Mathematical modelling and high resolution fluorescence imaging for studying calcium regulation, *Understanding Calcium Dynamics - Experiments and Theory, Lecture Notes in Physics*, Eds. M. Falcke and D. Malchow, Springer Verlag Heidelberg, in press
- [70] D. Uttenweiler, C. Weber, B. Jaehne, R. H. A. Fink, and H. Scharr: Spatiotemporal anisotropic diffusion filtering to improve signal-to-noise ratios and object restoration in fluorescence microscopic image sequences, *J. Biomed. Opt.*, volume 8, pp. 40-47, 2003



- [71] D. Uttenweiler, C. Veigel, R. Steubing, C. Goetz, S. Mann, H. Hau-ecker, B. Jaehne and R. H. A. Fink: Motion determination in actin filament fluorescence images with a spatio-temporal orientation analysis method, *Biophysical J.*, volume 78(5), pp. 2709-2715, 2000
- [72] S. Wang and T. Hazelrigg: Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis, *Nature*, volume 369, pp. 400-403, 1994
- [73] J. Weickert: Anisotropic Diffusion in Image Processing, *B. G. Teubner Stuttgart*, 1998
- [74] M.P. Wernet: Fuzzy Logic Particle-Tracking Velocimetry, *Proceedings of the SPIE Conference on Optical Diagnostics in Fluid and Thermal Flow*, SPIE, Bellingham, WA, pp. 701-708, 1993
- [75] X. Xu and J. L. Prince: Snakes, Shapes and Gradient Vector Flow, *IEEE Transaction on Image Processing*, pp. 66-71, 1997
- [76] A. P. Zijdenbos and B. M. Dawant: Brain segmentation and white matter lesion detection in MR images, *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, volume 22, pp. 401-465, 1994



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen um mich bei allen zu bedanken, die zu dieser Arbeit in unterschiedlichster Weise beigetragen haben. Durch die Unterstützung folgender Personen wurde es erst möglich, diese Arbeit zu verfassen:

- Für die Betreuung und die Möglichkeit, in seiner recht jungen Arbeitsgruppe *iBioS* (intelligente Bioinformatiksysteme) am Deutschen Krebsforschungszentrum zu arbeiten, möchte ich mich an erster Stelle bei Dr. Roland Eils bedanken. Innerhalb der letzten Jahre ist diese Gruppe stark angewachsen und konnte sich in mehreren Bioinformatikbereichen etablieren was in den regelmäßigen Gruppensitzungen für interessante Einblicke sorgte. Die Möglichkeit, im Ausland laufende Arbeiten zu präsentieren und sich über den aktuellen Stand der Forschung zu informieren wurde in dieser Gruppe gefördert. Für diese wertvollen Erfahrungen möchte ich mich ebenfalls bedanken.
- Die wissenschaftliche Betreuung wurde von Prof. Dr. Bernd Jähne übernommen wofür ich ihm sehr dankbar bin; nur so wurde diese externe Promotion möglich. Ausserdem waren die Diskussionen im Forschergruppencafe eine wissenschaftliche Bereicherung und eine Austauschplattform für Fragen und Antworten rund um die Bildverarbeitung.
- Des weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer, der sich als Zweitgutachter um die Betreuung dieser Arbeit kümmerte und mit seiner Arbeitsgruppe der Forschergruppe nahe stand.
- Bei vielen Kollegen, die meisten sind nicht mehr bei iBioS, möchte ich mich für die schöne Zeit die wir, sowohl innerhalb als auch außerhalb der Arbeit verbracht haben, bedanken. Aus Platzgründen möchte ich nur einige wenige nennen: Daniel Gerlich, Kaan Saracoglu, Chaitanya Athale, Christian Conrad, Johannes Fieres und Christian Bacher. Julian Mattes, der stets ein offenes Ohr für fachliche Probleme hatte und oft Lösungswege aufzeigen konnte, sei hier im speziellen gedankt. Bei vielen Aktivitäten und Diskussionen außerhalb der Arbeit wird mir die Zeit mit Martin Both, Frank Rueß, Ani Kovatcheva, Steffen Hohmann und Frank Zimmermann immer in Erinnerung bleiben.

- Meinen Eltern für die vielfältige Unterstützung all die Jahre hindurch sei nochmal gedankt, wie auch meinem Bruder Stefan und meiner Schwester Elisabeth und deren Familien.
- Meine Freundin Claudia Bayer war für das Korrekturlesen eine große Hilfe, dafür nochmals vielen Dank.
- Für die Möglichkeit eines dreimonatigen Projektaufenthalts in Sydney möchte ich mich bei Dr. R. Eils auf deutscher Seite wie auch Dr. Allan S. Jones auf australischer Seite bedanken. Mit beider Hilfe wurden die bürokratischen Hürden erträglich und der Aufenthalt ein einmaliges Erlebnis.