

ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT
FREIBURG
INSTITUT FÜR INFORMATIK

Lehrstuhl für Mustererkennung und Bildverarbeitung
Prof. Dr. Hans Burkhardt



Feature- und Deformationsmodell-basierte Registrierung

von

3D Volumendaten von Zebrafischen

Diplomarbeit

Mario Emmenlauer

Oktober 2006 – April 2007

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Abschlussarbeit selbstständig verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel verwendet habe und alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, als solche kenntlich gemacht habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass diese Abschlussarbeit nicht, auch nicht auszugsweise, bereits für eine andere Prüfung angefertigt wurde.

Ort, Datum

Unterschrift

28. September 2006

**Aufgabenstellung für die Diplomarbeit
von Herrn Mario Emmenlauer**

**Feature- und Deformationsmodell-basierte Registrierung von 3D Volumendaten
von Zebrafischen**

Nachdem für viele Organismen das komplette Genom sequenziert ist, beschäftigt sich die aktuelle Forschung mit der Frage, welche Gene zu welchem Zeitpunkt an welcher Position abgelesen werden. Das Fernziel ist dabei die Erstellung eines 4D Atlas (3D + Zeit) in dem für alle Gene verzeichnet ist, wann und wo sie abgelesen werden. Die Rohdaten für diesen Atlas liefern hier spezielle Färbeverfahren, die allerdings jeweils nur ein Gen in einem nicht mehr lebenden Individuum markieren können.

Ziel dieser Diplomarbeit ist eine Machbarkeitsstudie zur automatischen Registrierung von konfokal-mikroskopischen Aufnahmen von verschiedenen Zebrafisch-Embryos um daraus einen abstrakten Atlas zu lernen. Dieser Atlas soll dann orts aufgelöst sowohl Features (oder sogar Klassifikatoren) enthalten, die die jeweiligen Strukturen (Punkte, Kurven, Flächen, Volumen) robust beschreiben, als auch ein Deformationsmodell (z.B. B-Splines, FEM oder ein aus Beispielen gelerntes Modell), das die erlaubten Deformationen beschreibt.

Die Arbeit soll in folgende Teilaufgaben gegliedert werden:

- Literaturrecherche zum Thema
- 2D Registrierung mit Standardverfahren von ausgewählten Teilbereichen (z.B. die Augen)
- pixel-/voxelweise Feature-Extraktion um z.B. verschiedene Texturen korrekt zueinander zuordnen zu können
- evtl. Erweiterung auf 3D, Erweiterung auf andere Strukturen, Lernen der Deformationen

Referent: Prof. Dr.-Ing. H. Burkhardt
Betreuer: Dipl.-Phys. O. Ronneberger
Ausgabedatum: 29.9.2006
Abgabedatum: 29.3.2007
Bearbeitungszeit: 6 Monate

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Motivation	11
1.2 Aufbau und Gliederung	11
2 Allgemeine Grundlagen	13
2.1 Genexpression und Atlas	13
2.2 Der Zebrafisch als Forschungsobjekt	14
2.3 Aufzucht, Präparation und Färbung	15
2.3.1 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	15
2.3.2 Fixierung	15
2.3.3 TOTO-3 FisH	15
2.4 Konfokales Laserscanning-Mikroskop	16
2.4.1 Aufbau des konfokalen Laserscanning-Mikroskops	16
2.4.2 Glycerol-Immersion und Objektiv	18
2.4.3 Fehlerquellen und Analyse des konfokalen LSM	18
2.5 Normierte Kreuzkorrelation	19
2.6 Singular Value Decomposition	21
2.6.1 Die Pseudo-Inverse Matrix	21
2.6.2 Bestimmung der Lösung	22
3 Vorverarbeitung	23
3.1 Aufnahmen mit hohem Kontrastumfang	23
3.1.1 Beleuchtung im konfokalen LSM	23
3.1.2 Rekombination mehrerer Belichtungen	24
3.1.3 HDR mit globaler Faktorschätzung	25
3.1.4 HDR mit lokaler Faktorschätzung	27
3.1.5 HDR mit Rausch-Normierung	28
3.2 Positionierung der Bildstapel	30
3.2.1 Anwendung der Korrelation	30
3.2.2 Bestimmung der Positionen	31
3.2.3 Bestimmung der Verzeichnungen	33
3.3 Zusammensetzen der Aufnahmen	35
3.4 Ausbleich-Korrektur	37
3.4.1 Iterative Korrelation und Ausbleich-Korrektur	39
3.4.2 Anwendung auf andere Datensätze	39
3.5 Rekombination von dorsalen und ventralen Aufnahmen	40

4	Registrierung	45
4.1	Lokalisation mit der Houghtransformation	45
4.1.1	Verbesserung der Robustheit der Houghtransformation	46
4.2	Interest Point Detektor	46
4.2.1	Interest Point Detektor basierend auf der zweiten Ableitung	48
4.3	Grauwertprofil-Feature	49
4.4	Gradientenbasierte Feature	50
4.5	Verwendung relativer Bezugsinformation	51
5	Ergebnisse	53
5.1	Ergebnisse des Interest Point Detektors	53
5.1.1	Ergebnisse auf Gradienten der ersten Ableitung	53
5.1.2	Ergebnisse auf Eigenwerten zweiter Ableitung	55
5.1.3	Detektion von Trennflächen	55
5.2	Auswertung der Grauwert-Merkmale	57
6	Zusammenfassung und Ausblick	61
7	Verwendete Software	63
7.1	ImageJ	63
7.2	ITK	63
7.3	gsl	63
7.4	NetCDF	64
7.5	blitz++	64
	Literatur	65
8	Anhang	71
8.1	Erstellte Daten	71

Abkürzungsverzeichnis

FisH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	15
HPF	Hours past Fertilization	15
PBS	Phosphate buffered Saline	15
LSM	Laserscanning-Mikroskop	16
RI	Refraktiver Index	18
NA	Numerische Appertur	18
FWHM	Full Width at half Maximum	18
AU	Airy Unit	19
DFT	Diskrete Fouriertransformation	20
PMT	Photomultiplier	23
HDR	High dynamic Range	23
SVD	Singular Value Decomposition	30

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Motivation

Schon seit einigen Jahren ist der Zebrafisch ein zentrales Objekt der Wirbeltierforschung. Weltweit arbeiten Forschergruppen an der Entschlüsselung der Bedeutung einzelner Gene für die Entwicklung des Organismus und daran, diese auf andere Lebewesen wie auch auf den Menschen zu übertragen. Dabei hat die Frage nach der räumlichen und zeitlichen Interaktion von Genen eine herausragende Bedeutung, da sie viel über den Verlauf der Spezialisierung von universellen Stammzellen hin zu ausdifferenzierten Körperzellen und darüber hinaus auch die Funktion der Zelle aussagt.

Um jedoch die Expression spezifischer Gene für die Entwicklung eines Organismus zu studieren, sind aufwendige Färbeverfahren und mikroskopische Aufnahmen nötig. Ein Genexpressions-Atlas schafft die grundlegende Voraussetzung, diese Informationen zentral zu halten und allgemein zugänglich zu machen. Ebenso erlaubt er es in einmaliger Weise, die Kombination genetischer Information im zeitlichen und räumlichen Verlauf des Organismus zu untersuchen, und neue Information einzubringen.

1.2 Aufbau und Gliederung

Eine erste Analyse des zu Beginn der Arbeit vorhandenen Aufnahmematerials hat dazu geführt, dass in Abstimmung mit dem Biologischen Institut der Schwerpunkt der Aufgabenstellung auf eine bessere Vorverarbeitung verschoben wurde. Starke Deformationen und ein zu niedriger Arbeitsbereich haben eine Registrierung auf den Abbildungen selbst für den Menschen schwierig gemacht. Durch die Verwendung eines neuen Objektivs, und durch eine extensivere Bildvorverarbeitung konnten im Verlauf der Arbeit die Erstellung langfristig nutzbarer Aufnahmen sichergestellt werden.

Anschließend an diese Einleitung werden in Kapitel 2 zuerst die biologischen Fragestellungen, insbesondere Präparation und Färbung der Organismen behandelt. Darauf folgt eine Einführung der technischen Grundlagen, hauptsächlich der konfokalen Laser-scanning-Mikroskopie. Ebenfalls wird darin die verwendete Theorie aus Mathematik und Informatik eingeführt.

In Kapitel 3 werden die einzelnen Schritte der Bildvorverarbeitung erläutert, auf welche in dieser Arbeit besonderen Wert gelegt wurde. Mit ihrer Hilfe wird ein vollständiges dreidimensionales Muster hoher Auflösung und Güte des Zebrafisch-Embryos erstellt. In Kapitel 4 folgt darauf eine Einführung der verwendeten Registrierungsverfahren, welche in Kapitel 5 ausgewertet werden. Zum Schluss wird eine Perspektive möglicher nächster Schritte für die Erstellung des Atlas vorgelegt.



Abbildung 1.1: Zebrafisch (*Danio rerio*)

Kapitel 2

Allgemeine Grundlagen

2.1 Genexpression und Atlas

Um die räumlichen Zusammenhänge zwischen genetischer Aktivität und der Entwicklung eines Organismus nachvollziehen zu können, werden häufig Genexpressions-Färbeverfahren (wie auch in Kapitel 2.3.1 beschrieben) eingesetzt. Durch die Verwendung von Fluoreszenzmarkern mit verschiedenen Emissionsspektren ist es möglich, die Aktivität mehrerer Gene eines Organismus gleichzeitig aufzuzeichnen. Schwierig ist es jedoch, die räumliche und zeitliche Information von einem Organismus auf einen anderen zu übertragen, besonders im Fall von nicht-starren Körpern oder Mutanten. Hierzu müssen die gewonnenen Daten manuell von Experten segmentiert und bezeichnet werden.

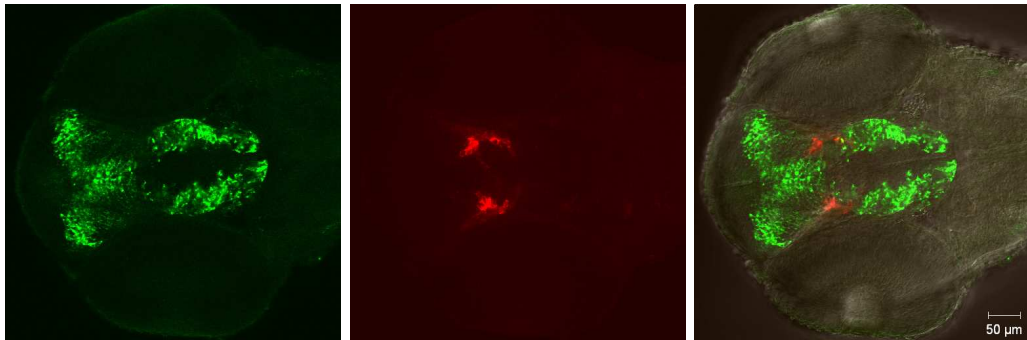


Abbildung 2.1: In-situ Hybridisierung bei 72 HPF Zebrafisch. Links: Das grün gefärbte Gen ist *dlx2*. Rot eingefärbt (Mitte) ist das Protein Tyrosin Hydroxylase. Rechts: die Kombination im Durchlichtkanal DIC.

Ein Genexpressions-Atlas enthält deshalb sowohl ein örtlich aufgelöstes Modell eines gemittelten Organismus, als auch eine örtlich kohärente Darstellung der Genexpressionsmuster. Mit Hilfe nicht-starrer Registrierungsverfahren sollen sich zusätzlich neue Organismen gegen den Atlas registrieren und auch in den Atlas einfügen lassen.

Bisherige Modelle wie der Zebrafisch-Atlas nach [3] bieten keine zeitlich oder räumlich interaktive Navigation und sind auf die vorausgewählten Ansichten beschränkt. Die Aufnahmen aus [3] bilden dabei einen rein anatomischen Atlas der Entwicklungsstufen 24, 48, 72 und 120 HPF Zebrafisch-Embryo, enthalten also keine Genexpressionsdaten.

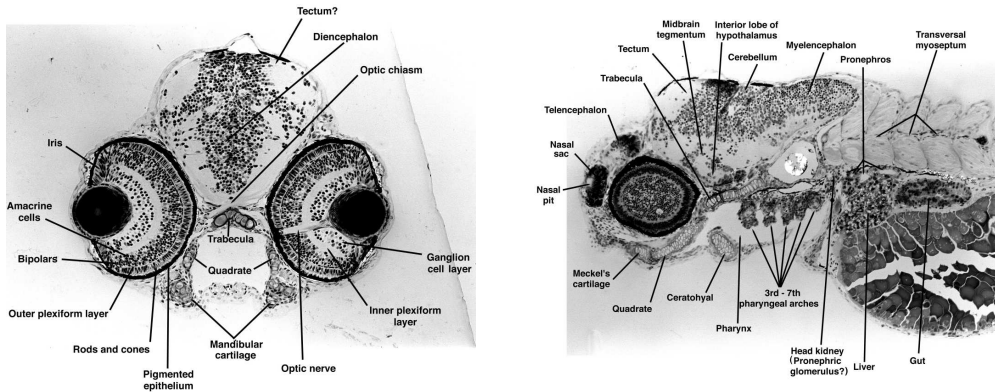


Abbildung 2.2: Zwei Aufnahmen aus dem Zebrafisch-Atlas aus [3], mit 72 Stunden HPF Embryos. Links: Koronaler Schnitt durch den Kopf. Rechts: Medialer Schnitt (leicht schräg) durch den Körper.

2.2 Der Zebrafisch als Forschungsobjekt

Der Zebraquari (*Danio rerio*), auch Zebrafisch genannt, ist ein kleiner tropischer Knochenfisch [4] aus der Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*) [6]. Ursprünglich beheimatet ist der Süßwasserfisch in langsam fließenden oder stehenden Gewässern in Südostasien [6], insbesondere in Indien, Bangladesch und Pakistan. Erstes Interesse hat der Zebrafisch in der Wissenschaft durch die Arbeit von Streisinger et al. 1981 erfahren [7], wonach mit Hilfe einfacher physischer Verfahren Klone des homozygoten, diploiden Fisches hergestellt werden konnten [5]. Erst mit den umfassenden Arbeiten von Haffter et al. 1996, und Driever et al. 1996, die erstmals großangelegte Screens vieler Phänotypen veröffentlichten, ist das genetische Potential voll erfasst worden.

Die Eigenschaften, die den Fisch für die Entwicklungsbiologie besonders geeignet machen, sind dabei vielfältig. Hohe Fruchtbarkeit, eine kurze Zellteilungsdauer und seine schnelle Entwicklung ermöglichen kurze Studienlaufzeiten [4]. Die nach zwölf bis sechzehn Wochen geschlechtsreifen Fische können wöchentlich laichen, wobei die circa zwei- bis vierhundert Eier im Wasser befruchtet werden und sich dann *ex vivo*, also außerhalb des Körpers der Mutter entwickeln. Die Eier sind, wie auch die Embryos, bis zu einem Alter von einigen Tagen fast transparent, weshalb sich die Entwicklung der Organe von Beginn an studieren lässt [9].

Neben den Vorteilen, die der Zebrafisch als Studienobjekt in Züchtung, Haltung und Beobachtung bietet, zeichnet ihn besonders die genetische Ähnlichkeit zum Menschen aus. Als Wirbeltier mit 25 Chromosomen und etwa 1,5 Giga-Basen-Paaren besitzt er Erbgut von etwa der halben Größe des Erbguts eines Säugetiers [9]. Zwar ist sein Erbgut im Gegensatz zu dem des Menschen erst zu etwa drei Vierteln sequenziert [10], es kann jedoch schon jetzt davon ausgegangen werden, dass darin in etwa so viel genetische Information verschlüsselt ist wie bei einem Säugetier. Vielen seiner Gene konnten schon jetzt menschliche Gene mit "sehr ähnlicher Wirkung während der Entwicklung, normaler Körperfunktion oder Krankheit" zugeordnet werden [9].

Mittlerweile gehört der Zebrafisch deshalb nicht nur zu den Vorzeige-Organismen der Entwicklungsbiologie, er spielt auch eine herausragende Rolle in weiteren Bereichen wie der Biomedizin, Neurologie, Genetik und der Toxikologie [8]. Die Trans-NIH Zebrafish Initiative hat ihn deshalb 1997 zum Model-Organismus der Säugetier-Entwicklung ernannt [11].

2.3 Aufzucht, Präparation und Färbung

Für die vorliegende Arbeit wurden Zebrafische *Dario rerio* vom Stamm AB\TL¹ Wildtyp aufgenommen. Aufzucht, Präparation und Färbung wurden übernommen von Frau Dr. Alida Filippi, Abteilung Entwicklungsbiologie, Institut für Biologie I an der Universität Freiburg.

2.3.1 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

Die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FisH) ist ein Verfahren zur örtlichen Lokalisation spezifischer Nukleinsäuren wie DNA- oder RNA-Sequenzen innerhalb intakter Chromosomen. Es eignet sich damit als Detektor für das Auftreten von bestimmten Genen in Chromosomen.

DNA liegt als Doppelstrang komplementärer Moleküle vor. Werden diese Doppelstränge aufgetrennt (denaturiert), so haben sie das Bestreben sich wieder mit einem mehr oder weniger vollständig komplementären Einzelstrang zu verbinden. Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bezeichnet. Um ein bestimmtes Gen zu detektieren, wird ein zu dessen Sequenz möglichst homologes Stück eventuell künstlich synthetisierter DNA-Kette als Gensonde in die Zellen eingebracht. Dort kann es sich anstelle des komplementären DNA-Strangs mit passenden Einzelsträngen des gesuchten Gens kombinieren. Wird die Sonde zusätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Marker versehen, so spricht man von Fluoreszenz in-situ Hybridisierung [13].

2.3.2 Fixierung

Alle Zebrafisch-Embryos wurden vor den Aufnahmen wie folgt behandelt: Bis zu einem Alter von 72 HPF² wachsen die Embryos in Egg Water³ bei 28.8 °C im Brutschrank. Um Melanogenese zu verhindern, wird dem Egg Water nach 24 HPF zusätzlich Phenylthiocarbamid zugegeben.

Nach 72 HPF werden die Embryos zur Fixierung per reversibler Protein-Vernetzung aus dem Egg Water entnommen und über Nacht bei 4 °C in 4% Konzentration Paraformaldehyd gelegt. Das Paraformaldehyd wird mit der Pufferlösung PBS⁴ ausgewaschen. Danach werden die Embryos in Methanol bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.3 TOTO-3 FisH

Für die In-situ Hybridisierung werden die Embryos aus dem Methanol entnommen und schrittweise rehydriert. Dazu wird eine Methanol/PBS-Mischung in den Konzentrationen 75%, 50%, 25% und abschließend reine Pufferlösung verwendet. Um ein leichteres Eindringen des Färbestoffs in den Organismus zu ermöglichen, wird anschließend mit Hilfe des Enzyms Prokinase K die Zell-Permeabilität der rehydrierten Embryos erhöht. Dazu werden die Embryos für 45 Minuten in Prokinase-K-Lösung (10 µg/ml) gegeben. Nach

¹Kreuzung der Stämme AB und TL (Tübingen Long Fin). Der AB-Stamm hat seinen Ursprung im Streisinger-Laboratorium an der University of Oregon, TL hat seinen Ursprung im Nüsslein-Volhard-Laboratorium, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen.

²Stunden nach der Befruchtung der Eier, nach englischen "Hours past Fertilization".

³Egg Water ist eine Lösung der Konzentration 60 µg/ml "Instant Ocean" Meeres-Salz in destilliertem Wasser [12].

⁴Als Pufferlösung wird im Folgenden grundsätzlich Phosphate Buffered Saline (PBS) verwendet

dem Auswaschen der Prokinase K mit Pufferlösung werden die Embryos zur erneuten Stabilisierung des Gewebes für 20 Minuten in Paraformaldehyd gegeben, und anschließend wieder in Pufferlösung gewaschen.

Als Fluoreszenz-Marker wird TOTO-3 verwendet, dessen spektrale Eigenschaften in Abbildung 2.3 dargestellt sind. Es ist in reiner Form kaum fluoreszent, steigert seine Fluoreszenz bei Bindung an Nukleinsäure jedoch um den Faktor 100 bis 1000. Deutlich sichtbar ist der Stokes-Shift⁵. Den Embryos wird für drei Stunden TOTO-3 in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ in PBS zugegeben. Nach dem Waschen in Pufferlösung werden sie in 80% Glycerol in PBS eingebettet. Zur Stabilisierung auf dem Objektträger wird eine Lösung von 80% Glycerol mit 0,5% Agarose in PBS verwendet, welche bei Raumtemperatur eine hohe Viskosität hat und das Objekt auf dem Träger stabilisiert.

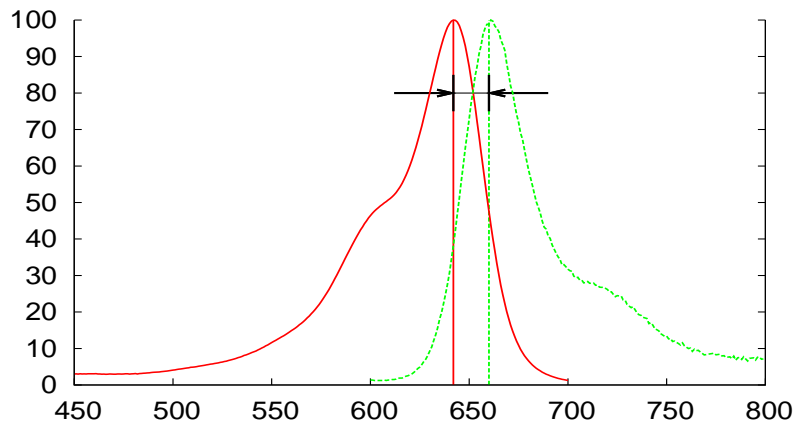


Abbildung 2.3: Absorptions-Spektrum (rot, peak bei 642nm) und Emissions-Spektrum (grün, peak bei 660nm) des Fluoreszenz-Markers TOTO-3 nach Bindung an Nukleinsäure, aufgetragen über der Wellenlänge (nm). Der Stokes-Shift beträgt 18nm.

2.4 Konfokales Laserscanning-Mikroskop

Alle Aufnahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM) erstellt. Durch den prinzipiellen Aufbau des konfokalen LSM lässt sich eine im Vergleich zur Durchlicht-Mikroskopie wesentlich höhere Tiefen-Diskriminierung erreichen, was eine gute Voraussetzung für den Aufbau eines 3D-Schnitt-Stapels ist. Im Folgenden werden der Aufbau und die wesentlichen Merkmale eines konfokalen LSM dargestellt.

2.4.1 Aufbau des konfokalen Laserscanning-Mikroskops

Die Arbeitsweise eines LSM unterscheidet sich grundsätzlich von der eines herkömmlichen Lichtmikroskops. Beim herkömmlichen Mikroskop wird der sichtbare Teil der Probe gleichzeitig, also parallel beleuchtet. Dadurch gelangt Licht aller Tiefenschichten gleichzeitig in den Detektor. Durch die Verwendung von Objektiven mit niedriger Tiefenschärfe kann Licht von Ebenen ober- und unterhalb der optischen Ebene defokussiert werden, es geht jedoch weiterhin als Störung in das Ergebnis ein.

⁵ Als Stokes-Shift wird die Differenz der Wellenlängen von aufgenommenem und abgestrahltem Licht bezeichnet. Die Verschiebung entsteht durch Energieverlust im angeregten Molekül.

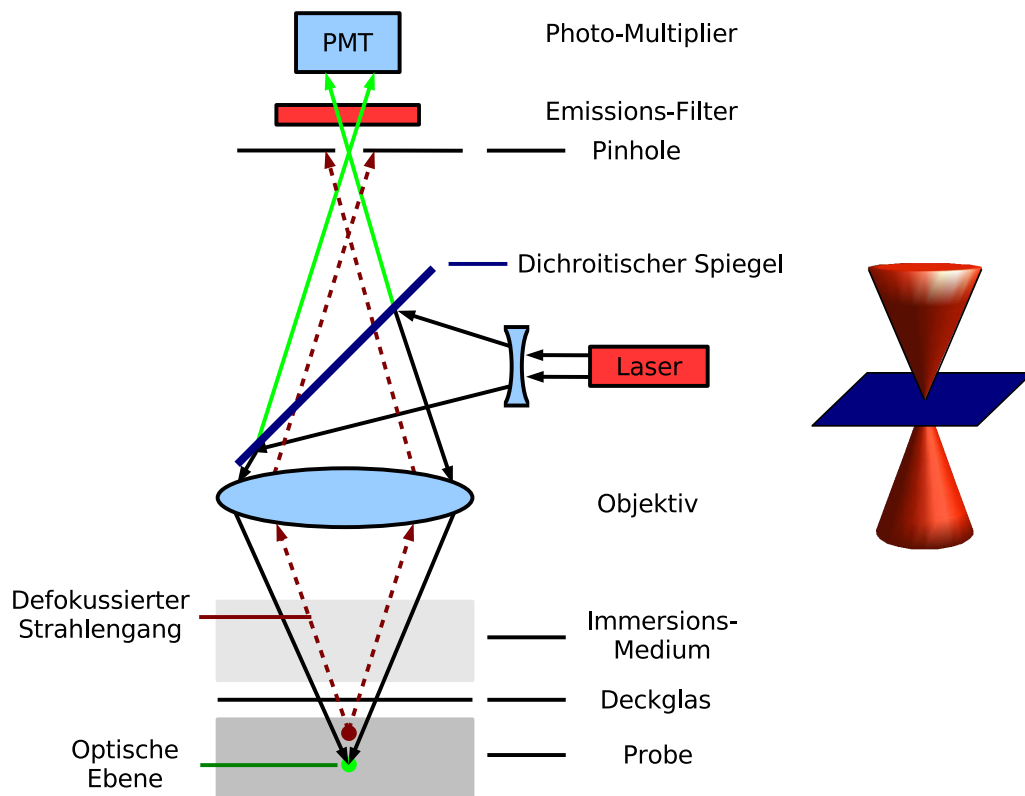


Abbildung 2.4: Links: Schematischer Strahlengang im konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Rechts: Laserlicht mit Fokus in der optischen Ebene bildet im Idealfall einen Doppelkegel.

Beim LSM hingegen wird Licht eines Lasers über ein optisches Ablenssystem⁶ punktweise, also seriell, über die Probe geführt. Das in der Probe fokussierte Laserlicht bildet einen Doppelkegel, dessen Zentrum in der optischen Ebene liegt. Dadurch kann in der optischen Ebene eine idealerweise punktförmige⁷ Anregung der Probe erreicht werden. Das von der Probe emittierte Licht wird durch das optische System zurückgeführt und über einen Strahlteiler auf eine konfokale Aperturblende⁸ geworfen. Der Fokus des Lichts aus der optischen Ebene liegt dabei genau im Zentrum der Aperturblende. Damit kann nur jenes Licht den Detektor erreichen, das auf der Oberfläche des vom Laser angestrahlten Doppelkegels emittiert wird (Abbildung 2.4 rechts). Punkte, die nicht auf der Oberfläche des Kegels liegen, werden unscharf auf der Blende abgebildet und von dieser absorbiert (Abbildung 2.4 links, defokussierter Strahlengang).

Im Zentrum des Kegels erreicht der Laser die höchste Konzentration, weshalb der überwiegende Teil des detektierten Lichts von diesem Punkt im Objekt stammt. Dadurch erreicht ein konfokales LSM selbst im Falle relativ "dicker" Proben eine hohe Diskriminierung des emittierten Lichts aus verschiedenen Tiefenebenen. Üblich sind hier Dicken von einigen 100nm. Das von uns verwendete Objektiv (siehe Kapitel 2.4.2) erlaubt einen überdurchschnittlich hohen Arbeitsabstand von 600nm, welcher für den 400-550nm durchmessenden Kopfteil des Zebrafisch-Embryos benötigt wird.

⁶Üblich sind Systeme mit zwei unabhängig gesteuerten galvanometrischen Spiegeln.

⁷Eine Betrachtung des realen Falls eines endlich ausgedehnten Punktes folgt in Kapitel 2.4.3.

⁸Die konfokale Aperturblende wird üblicherweise englisch als "Pinhole" bezeichnet.

2.4.2 Glycerol-Immersion und Objektiv

Bei der Erstellung der Aufnahmen wurde anfangs mit zwei verschiedenen Objektiven gearbeitet, einem 40x Wasser-Immersion-Objektiv und einem 25x Öl-Immersion-Objektiv. Dabei liegt die Abbildungsleistung des 25x Öl-Immersion-Objektivs deutlich über der des Wasser-Immersion-Objektivs, da der refraktive Index (RI) des Einbettungsmediums und des Fischgewebes dem RI des Immersions-Öls ähnlicher ist als dem von Wasser. Deshalb wurde für die Erstellung der weiteren Aufnahmen ausschließlich mit dem 25x Öl-Immersion-Objektiv gearbeitet. Die folgende Tabelle listet die wesentlichen Merkmale der beiden Objektive auf:

Objektiv	LD LCI Plan Apochromat	LD C-Apochromat
Vergröß. / Apertur	25x / 0,8	40x / 1,1
Arbeitsabstand	600 nm	620 nm
Immersionsmedium	Glycerin/H ₂ O 80:20, RI 1,445	Wasser, RI 1,33

2.4.3 Fehlerquellen und Analyse des konfokalen LSM

Einige der in Kapitel 2.4.1 gemachten Annahmen sind idealisiert und müssen für eine quantitative Betrachtung des konfokalen LSM einer genaueren Analyse unterzogen werden.

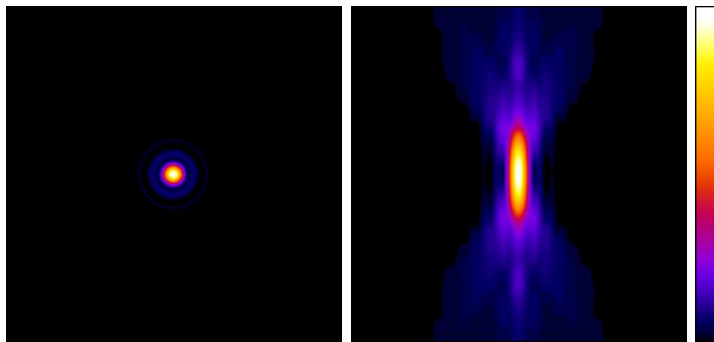


Abbildung 2.5: Ideale Punktbildfunktion. Links: Schnitt durch die x/y-Ebene, Mitte: Schnitt durch die x/z-Ebene. Rechts: Farbskala. Nach [14].

Selbst ein perfektes optisches System kann wegen der Welleneigenschaften des Lichts einen Punkt nicht perfekt als solchen abbilden. Die Abbildungseigenschaften des Systems werden durch die Punktbildfunktion beschrieben, welche für den Fall eines Pinholes als infinitesimaler Punkt in Abbildung 2.5 dargestellt ist. Im realen Fall ist weder der Fokus des Lasers in der Probe noch das Pinhole infinitesimal, beide sind endlich ausgedehnt. Dadurch ändert sich die Punktbildfunktion, ihr Kern⁹ wird größer. Das Rotations-Ellipsoid, innerhalb dessen die Intensität der Punktbildfunktion in lateraler und axialer Richtung um die Hälfte abfällt, wird als "full width at half maximum", kurz FWHM, bezeichnet. Er konzentriert 86% der Energie des Lichts. Die Abmessungen der FWHM sind durch Gleichung 2.2 gegeben, wobei $\bar{\lambda}$ die gemittelte Wellenlänge aus anregendem und von der Probe emittierten Lichts ist (siehe Gleichung 2.1), und NA die Numerische Apertur des Objektivs bezeichnet.

$$\bar{\lambda} = \sqrt{2} \frac{\lambda_{em} \cdot \lambda_{anr}}{\sqrt{\lambda_{em}^2 + \lambda_{anr}^2}} \quad (2.1)$$

⁹Der laterale Kern der Punktbildfunktion wird als "Airy Disk" bezeichnet, woraus sich auch der Name "Airy Unit" in Gleichung 2.3 ableitet.

$$\text{FWHM}_{axial} = \frac{0,88\lambda}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}}, \quad \text{FWHM}_{lateral} = 0,51 \frac{\lambda}{\text{NA}} \quad (2.2)$$

Die FWHM der Punktbildfunktion bestimmt die maximale Auflösung des Mikroskops, da einzelne Strukturen innerhalb des Ellipsoids nicht aufgelöst werden können. Nach [14] ist der beste Kompromiss zwischen Pinhole passierender Beleuchtungsintensität und optischer Auflösung ein Pinhole-Durchmesser von einer "Airy Unit", kurz AU, wie in Gleichung 2.3 definiert. In den von uns erstellten Aufnahmen ist ein HeNe-Laser der Wellenlänge $\lambda_{anr} = 633\text{nm}$ und ein 25x-Objektiv der Apertur $\text{NA} = 0,8$ verwendet worden. Mit dem Stokes-Shift von TOTO-3 von 18nm (siehe Abbildung 2.3) beträgt die Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 651\text{nm}$, womit sich eine mittlere Wellenlänge von $\bar{\lambda} = 642\text{nm}$ ergibt. Damit beträgt der optimale Pinhole-Durchmesser $1\text{AU} = 979\text{nm}$. Dieser ist auch verwendet worden.

$$1\text{AU} = \frac{1,22\lambda}{\text{NA}} \quad (2.3)$$

Nach der Behandlung der biologischen und technischen Grundlagen sollen nun noch zwei verwendete Verfahren aus der Informatik und Mathematik eingeführt werden.

2.5 Normierte Kreuzkorrelation

Die Korrelation $z(\tau)$ für zwei unendlich ausgedehnte, kontinuierliche Signale $A, B \in \mathbb{C}$ ist ein Maß für die Ähnlichkeit der Signale unter der Verschiebung τ . Sie entsteht aus dem Innenprodukt auf der verschobenen Impulsantwort, wie in Gleichung 2.4 angegeben:

$$\begin{aligned} z(\tau) &= (A\#B)(\tau) \\ &= \langle A(t), B(t - \tau) \rangle \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} A(t)B^*(t - \tau)dt \end{aligned} \quad (2.4)$$

Beim Übergang zu diskreten, endlich ausgedehnten Signalen ergibt sich die Korrelation als Summe über das Innenprodukt für die zyklische diskrete Verschiebung. Gleichung 2.5 gibt dies für den zweidimensionalen Fall, $A, B \in \mathbb{R}^2$, mit diskreter Verschiebung (r, s) an, wobei $\pi(k)$ die zyklische Abbildung modulo n darstellt.

$$\begin{aligned} C(r, s) &= (A\#B)(r, s) \\ &= \langle A(i, j), B(\pi(i - r), \pi(j - s)) \rangle \\ &= \sum_i \sum_j A(i, j)B(\pi(i - r), \pi(j - s)) \end{aligned} \quad (2.5)$$

Die Vorgehensweise der Korrelation lässt sich in Abbildung 2.6 erkennen. Für jede Verschiebung (r, s) des Musters B ergibt sich der Eintrag $C(r, s)$ der Korrelationsmatrix als Maß der Übereinstimmung von A und B . Die Position des höchsten Eintrags gibt die Verschiebung an, unter der das Muster A die höchste Übereinstimmung mit Muster B hat.

Ohne eine vorherige Normierung können die nach 2.5 bestimmten Korrelationskoeffizienten nicht miteinander verglichen werden. Eine geeignete Normierung ist folgendermassen gegeben: Zuerst werden von beiden Teilbildern die Mittelwerte subtrahiert, wodurch konstante additive Anteile unterdrückt werden. Der erhaltene Korrelationskoeffizient wird zusätzlich durch die Standardabweichung der Teilbilder dividiert, wodurch auch konstante multiplikative Anteile entfallen. Durch die Normierung werden also alle

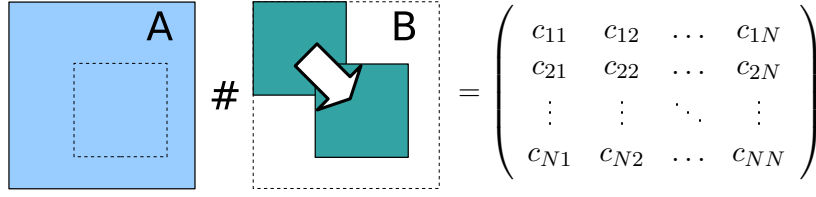


Abbildung 2.6: Korrelation zweier Bilder A und B unterschiedlicher Dimension, hier im 2D-Fall. Bild B wird bis zur Größe von A mit Nullen aufgefüllt, und unter allen (auch den zyklischen) Verschiebungen mit A korreliert.

Signale X, Y mit $X = f \cdot Y + o$ für $f, o \in \mathbb{R}$ auf ein Signal X' abgebildet. Die normierte Kreuzkorrelation ist in Gleichung 2.6 angegeben:

$$C(r, s) = \frac{\sum_{i,j}^N (A(i, j) - \bar{A})(B(i, j)_{\Delta r, \Delta s} - \overline{B_{\Delta r, \Delta s}})}{\sqrt{\sum_{i,j}^N (A(i, j) - \bar{A})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i,j}^N (B(i, j)_{\Delta r, \Delta s} - \overline{B_{\Delta r, \Delta s}})^2}} \quad (2.6)$$

Nach der Normierung mit Mittelwert und Standardabweichung liegen die Koeffizienten $C(r, s)$ im Intervall $[-1, 1]$, wobei 1 eine perfekte Übereinstimmung, und -1 eine inverse Übereinstimmung bedeutet.

Bestimmt man die Korrelation nun für alle möglichen zweidimensionalen, diskreten Verschiebungen $(r, s) \in \{1, \dots, N\} \times \{1, \dots, N\}$, so ergibt sich ein Aufwand von $O(N^4)$. Einen wesentlich schnelleren Algorithmus der Laufzeit $O(N^2 \log N)$ erhält man unter Ausnutzung der Isomorphie der schnellen diskreten Fouriertransformation (DFT) wie in Gleichung 2.7. Die Fouriertransformation erlaubt es, die Korrelation als direktes Produkt der Signale im Spektralbereich zu berechnen:

$$A \# B = DFT^{-1}(DFT(A) \cdot DFT(B)^*) \quad (2.7)$$

Auch hier ist die entsprechende Normierung aus Gleichung 2.6 anzuwenden, um vergleichbare Koeffizienten zu erhalten. Um die DFT effizient anwenden zu können, ist ein Padding der Fenstergröße beider Muster auf die nächsthöhere Zweierpotenz nötig, weshalb im Folgenden $N = 2^k$ gelten soll. Sollen Signale unterschiedlicher Dimension m, n korreliert werden, so werden beide Dimensionen bis zur nächsten Zweierpotenz $N \geq \max(m, n)$, $N = 2^k$ der größeren Dimension $\max(m, n)$ aufgefüllt.

Für die Berechnung der Normierung in Gleichung 2.6 kann eine schnelle Summation nach [15] verwendet werden. Diese nutzt aus dass gilt:

$$\sum_{i,j} (a_{i,j} - \bar{a})(b_{i,j} - \bar{b}) = \sum_{i,j} a_{i,j} b_{i,j} - \frac{1}{2} \bar{a} \bar{b} \quad (2.8)$$

Unter Anwendung von Gleichung 2.8 können Mittelwert und Standardabweichung mit Hilfe der Dynamischen Programmierung in linearer Laufzeit der Mustergröße bestimmt werden. Es wird dabei genutzt, dass sie bei einer Verschiebung (r, s) um jeweils nur eine Position aus den Nachbarwerten hervorgehen.

2.6 Singular Value Decomposition

Als Singular Value Decomposition einer Matrix $M \in \mathbb{R}^{m \times n}$ bezeichnet man eine Zerlegung der Form:

$$M = USV^T \quad (2.9)$$

in die orthogonalen Matrizen $U \in \mathbb{R}^{m \times m}$ und $V \in \mathbb{R}^{n \times n}$ und die Diagonalmatrix $S \in \mathbb{R}^{m \times n}$ mit den nicht-negativen Werten $\sigma_1 \geq \dots \geq \sigma_r = \sigma_{r+1} = \dots = 0$ (üblicherweise absteigend sortiert) auf der Diagonalen. Ist der Rang $r = \min(m, n)$, so hat M vollen Rang. Andernfalls ist $\sigma_s = 0$ für $s \geq r$ und M singulär. Die zu jeder Matrix existierende SVD hat viele Anwendungen, wovon eine die Bestimmung der Pseudo-Inversen Matrix M^- ist.

2.6.1 Die Pseudo-Inverse Matrix

Ist für eine Matrix die SVD nach 2.9 gegeben, so kann die Pseudo-Inverse Matrix M^- wie folgt definiert werden:

$$M^- = VS'U^T \quad (2.10)$$

Dabei ist S' die Diagonalmatrix mit $1/\sigma_i$ für $\sigma_i > 0$ auf der Diagonalen, 0 sonst. Die Pseudo-Inverse hat einige Eigenschaften der inversen Matrix M^{-1} , aber nicht unbedingt alle. Ist $m = n$ und M nicht-singulär, so gilt jedoch $M^- = M^{-1}$. Will man nun ein Gleichungssystem

$$M\mathbf{x} = \mathbf{b} \quad (2.11)$$

für eine überbestimmte Matrix M lösen, so gelingt dies mit der Pseudo-Inversen im Sinne kleinster Fehlerquadrate. Im Folgenden werden zunächst die Eigenschaften der gesuchten Lösung \mathbf{x} skizziert, dann wird gezeigt werden, dass diese Lösung tatsächlich die durch die Pseudo-Inverse bestimmte Lösung ist. Es gilt:

$$\begin{aligned} m > n &\Rightarrow M\mathbf{x} = \mathbf{b} \text{ überbestimmt} \\ &\Rightarrow \mathbf{b} \notin \mathcal{R}(M) \\ &\Rightarrow \nexists \mathbf{x} \in \mathbb{R}^n : M\mathbf{x} = \mathbf{b} \end{aligned} \quad (2.12)$$

Da \mathbf{b} also nicht im Range $\mathcal{R}(M)$ liegt, existiert kein Vektor $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^n$, der von M auf \mathbf{b} abgebildet wird. Deshalb wird stattdessen der Vektor $\mathbf{x}_{LS} \in \mathbb{R}^n$ gesucht, der den Ausdruck $\|\mathbf{x}_{LS} - \mathbf{b}\|$ unter der L_2 -Norm minimiert:

$$\|\mathbf{x}_{LS} - \mathbf{b}\|_2 = \min_x \|M\mathbf{x} - \mathbf{b}\|_2 \quad (2.13)$$

Anschaulich ist dies äquivalent zur Suche nach dem Vektor $\mathbf{y}' \in \mathcal{R}(M)$, der $\|\mathbf{y} - \mathbf{b}\|$ minimiert. Dieses \mathbf{y}' ist durch die orthogonale Projektion von \mathbf{b} auf $\mathcal{R}(M)$ gegeben:

$$\|\mathbf{y}' - \mathbf{b}\| = \min_y \|\mathbf{y} - \mathbf{b}\| \quad (2.14)$$

Zum Vektor \mathbf{y}' kann nun ein $\mathbf{x} \in \mathbb{R}^n$ gefunden werden, so dass $M\mathbf{x} = \mathbf{y}'$. Der Vektor \mathbf{x} ist jedoch für den Fall $\mathcal{N}(M) \neq \{0\}$ noch nicht eindeutig, da die Addition von $\mathbf{z} \in \mathcal{N}(M)$ die Gleichung $M\mathbf{x} = \mathbf{y}'$ nicht verändert:

$$\begin{aligned} \mathcal{N}(M) \neq \{0\} &\Rightarrow \forall \mathbf{z} \in \mathcal{N}(M) : M(\mathbf{x} + \mathbf{z}) = M\mathbf{x} + M\mathbf{z} = M\mathbf{x} + 0 = M\mathbf{x} = \mathbf{y}' \\ &\Rightarrow M(\mathbf{x} + \mathbf{z}) = \mathbf{y}' \end{aligned}$$

Um Eindeutigkeit herzustellen wird das \mathbf{x}_{LS} mit kleinster L_2 -Norm gewählt, das $M\mathbf{x} = \mathbf{y}'$ erfüllt:

$$\forall \mathbf{x} \in \mathbb{R}^n, \mathbf{x} = \arg \min_x \|M\mathbf{x} - \mathbf{b}\| : \|\mathbf{x}_{LS}\| \leq \|\mathbf{x}\| \quad (2.15)$$

2.6.2 Bestimmung der Lösung

Nun soll gezeigt werden, dass diese Lösung \mathbf{x}_{LS} auch die ist, die von der Pseudo-Inversen gefunden wird. Da U und V orthogonal sind, ist $\|U^T\| = 1$ und $VV^T = I$. Damit gilt:

$$\begin{aligned}\|M\mathbf{x} - \mathbf{b}\| &= \|U^T\| \cdot \|M(VV^T)\mathbf{x} - \mathbf{b}\| \\ &= \|(U^T M V)V^T \mathbf{x} - U^T \mathbf{b}\| \\ &= \|S V^T \mathbf{x} - U^T \mathbf{b}\| \\ &= \|S \mathbf{p} - U^T \mathbf{b}\|\end{aligned}\tag{2.16}$$

wobei $V^T \mathbf{x} = \mathbf{p}$ gesetzt wird. Wird die L_2 -Norm als Summe ausgeschrieben, so folgt weiter:

$$\begin{aligned}\|S \mathbf{p} - U^T \mathbf{b}\| &= \sum_{i=0}^m (\sigma_i p_i - u_i^T \mathbf{b})^2 \\ &= \sum_{i=0}^r (\sigma_i p_i - u_i^T \mathbf{b})^2 + \sum_{i=r+1}^m (u_i^T \mathbf{b})^2\end{aligned}\tag{2.17}$$

Offensichtlich wird dieser Ausdruck für $p_i = u_i^T \mathbf{b} / \sigma_i$, $i = 0, \dots, r$ minimal. Die p_i für $i > r$ haben keinen Einfluß auf die Minimierung, können also frei gewählt werden. Um Eindeutigkeit zu gewährleisten, werden die weiteren $p_i = 0$ gesetzt. Damit ist die Norm von \mathbf{p} minimal unter allen \mathbf{p} die 2.17 minimieren. Wegen $\|\mathbf{x}\| = \|V\mathbf{p}\| = \|\mathbf{p}\|$ ist dann auch die Norm von \mathbf{x} minimal. Sei also nun:

$$\begin{aligned}p_i &= \frac{u_i^T \mathbf{b}}{\sigma_i} && \text{für } i = 1, \dots, r \\ p_i &= 0 && \text{für } i = r + 1, \dots, m\end{aligned}\tag{2.18}$$

Es wird also $\|M\mathbf{x} - \mathbf{b}\|$ minimal für $\mathbf{x}_{LS} = V\mathbf{p}$. Dies ist aber genau die gewünschte Lösung \mathbf{x}_{LS} mit kleinsten Fehlerquadraten, die aus der Pseudo-Inversen M^- hervorgeht:

$$\begin{aligned}\mathbf{x}_{LS} &= V\mathbf{p} = V \sum_{i=1}^r p_i = \sum_{i=1}^r \frac{u_i^T \mathbf{b}}{\sigma_i} v_i \\ &= V S^T U^T \mathbf{x} \\ &= M^- \mathbf{x}\end{aligned}\tag{2.19}$$

Es sei an dieser Stelle noch erwähnt, dass mit der Festlegung von \mathbf{p} in 2.18 auch der Fehler (der Residuenvektor) bestimmt ist, der durch den best-approximierenden Vektor \mathbf{x}_{LS} gemacht wird, da für dieses \mathbf{p} in Gleichung 2.17 gilt:

$$\|M\mathbf{x} - \mathbf{b}\| = \sum_{i=r+1}^m (u_i^T \mathbf{b})^2\tag{2.20}$$

Kapitel 3

Vorverarbeitung

Da ein Atlas für einen Organismus ein Nachschlagewerk anatomischer Strukturen darstellt, müssen besondere Ansprüche an die Qualität der Aufnahmen gestellt werden. Deshalb wurde besonders auf die Erstellung und Vorverarbeitung der Aufnahmen geachtet. Im Folgenden werden die Verarbeitungsschritte im Einzelnen erläutert.

3.1 Aufnahmen mit hohem Kontrastumfang

Da die Leuchtdichte innerhalb des Zebrafisch-Organismus stark variiert, müssen Aufnahmen hohen Kontrastumfangs¹ erstellt werden. Es wird nun ein Verfahren beschrieben, welches eine Abbildung mit hohem Kontrastumfang aus mehreren Aufnahmen mit jeweils verschiedenen Belichtungen rekonstruiert. Diese Methode der HDR-Rekonstruktion wurde gewählt, um unabhängig vom Auflösungsvermögen und vom Sättigungsbereich des Sensors einen beliebigen dynamischen Umfang aufnehmen zu können.

Bei bekanntem Photonen- und Auslese-Rauschen ist eine gleichzeitige Fehlernormierung des Bildes möglich. In Kapitel 3.1.5 werden Photonen- und Auslese-Rauschen für das konfokale LSM bestimmt.

3.1.1 Beleuchtung im konfokalen LSM

Beim konfokalen LSM wird das von der Probe emittierte Licht von einem Photomultiplier (PMT) in ein elektrisches Signal umgewandelt. Durch die kontinuierliche laterale Laserbewegung wird dabei örtliche Intensitätsfluktuation in zeitliche übersetzt. Position des Lasers x , Scan-Geschwindigkeit v_{scan} und verstrichene Zeit t bilden den linearen Zusammenhang $x = t \cdot v_{scan}$. Bei einem festen Verhältnis von Pixeln pro Zeile wird über die Scan-Geschwindigkeit folglich die Dauer festgelegt, in der der Laser die Position eines Pixels überstreicht. Sie wird als "Pixelzeit" T bezeichnet. Für ein gutes Signal-/Rauschverhältnis integriert der PMT annähernd die gesamte Pixelzeit über die einfallenden Photonen, wobei seine Ausgangsspannung proportional zur Anzahl einfallender Photonen² ist, mit Proportionalitätskonstante c . Der Grauwert g bildet mit der Pixelzeit T also einen linearen Zusammenhang:

$$g_{T_2} = f_{T_1 T_2} \cdot g_{T_1} \quad \text{für } f_{T_1 T_2} = c \frac{T_2}{T_1} \quad (3.1)$$

Ist die Pixelzeit aller Aufnahmen bekannt, so lassen sich die Faktoren $f(i)$ direkt berechnen.

¹In der Literatur häufig als "High dynamic Range", HDR bezeichnet.

²Das Verhältnis von aufgenommenen Photonen zu ausgegebener Spannung ist nur unterhalb des Sättigungsbereiches proportional.

Anstelle einer Variation der Pixelzeit wurde hier jedoch eine Variation der Laserintensität gewählt, basierend auf der Vermutung, dass kurze hohe Intensitäten zu einer geringeren Ausbleichung des Fluoreszenzmarkers führen als eine länger andauernde, schwächere Belichtung. Dadurch kann gleichzeitig die Gesamtaufnahmedauer geringer gehalten werden³. Auch bei einer Variation der Laserintensität ergibt sich ein linearer Zusammenhang für die resultierende Bildhelligkeit.

Gute Ergebnisse bei der HDR-Rekonstruktion konnten mit je drei verschiedenen Laserintensitäten erzielt werden. Für die Rekombination der unterschiedlich belichteten Aufnahmen ist hier eine Schätzung der Intensitäten nötig. Nachfolgend werden zwei Methoden zur Schätzung der Faktoren vorgestellt.

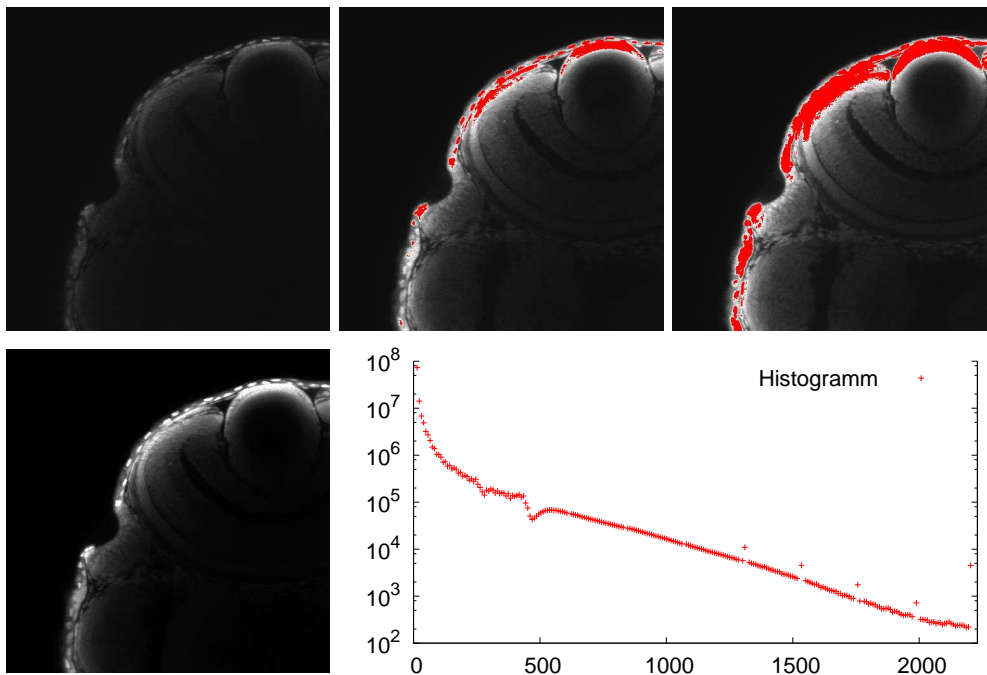


Abbildung 3.1: Obere Reihe: Schnitt aus einem Bildstapel, linke obere Aufnahmeposition, mit den drei Laserintensitäten 1, 5 und 9. Überbelichtete Bildpunkte, also solche der Intensität 255, sind rot eingefärbt. Untere Reihe: Die HDR-Rekonstruktion mit zugehörigem Histogramm.

3.1.2 Rekombination mehrerer Belichtungen

Die Aufnahmen seien nach aufsteigender Belichtungsintensität sortiert. Eine solche Sortierung lässt sich sowohl aus den gespeicherten Laserintensitäten, als auch aus der mittleren Helligkeit einer Aufnahme gewinnen. Das Bild I_n mit der höchsten Belichtungsintensität wird als Referenzbild bezeichnet.

Wie in Kapitel 3.1.1 dargelegt, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Laserintensität und resultierender Bildhelligkeit. Für zwei Bilder i und j sind die Intensitäten I also gegeben durch Gleichung 3.2, wobei $f(i, j)$ der Faktor und $o(i, j)$ der Offset von Bild i nach j sind:

$$I_j = f(i, j) \cdot I_i + o(i, j) \quad (3.2)$$

³Die übliche Dauer für die Aufnahme eines Embryos liegt bei rund zwei Stunden.

Der Offset $o(i, j)$ gibt dabei eine eventuell von Null verschiedene Justierung des Sensors an. Für die theoretischen Vorüberlegungen werden zunächst immer Faktor und Offset zum Referenzbild I_n betrachtet, der Faktor wird dann kurz mit $f(i)$, der Offset mit $o(i)$ bezeichnet. Das Referenzbild selbst hat dabei Faktor $f(n) = 1$, Offset $o(n) = 0$.

$$I_n = f(i) \cdot I_i + o(i) \quad (3.3)$$

Im Falle mehrerer Aufnahmen, die auch überbelichtete Bildpunkte enthalten, erweitert sich Gleichung 3.3 zu Gleichung 3.6, wobei mit $\mathbf{x} \in \mathbb{N}^3$ die Position eines Voxels im Raum bezeichnet ist. Eine Rekonstruktion J aus n Aufnahmen erhält man durch Summation der Bildintensitäten I_i , skaliert mit dem Faktor $f(i)$ zum Referenzbild. Zu beachten ist, dass alle Voxel (auch überbelichtete) der dunkelsten Aufnahme I_1 in die Rekonstruktion eingehen, da keine bessere Rekonstruktion dieser Voxel möglich ist. Normiert wird über die Anzahl summierter Voxel, siehe Gleichung 3.5.

$$K(\mathbf{x}) = f(1)I_1(\mathbf{x}) + o(1) + \sum_{i=2}^n \begin{cases} f(i)I_i(\mathbf{x}) + o(i) & \text{falls } I_i(\mathbf{x}) < 255 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.4)$$

$$L(\mathbf{x}) = 1 + \sum_{i=2}^n \begin{cases} 1 & \text{falls } I_i(\mathbf{x}) < 255 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.5)$$

$$J(\mathbf{x}) = K(\mathbf{x})/L(\mathbf{x}) \quad (3.6)$$

3.1.3 HDR mit globaler Faktorschätzung

Eine Schätzung der Belichtungsintensität geschieht hierbei global, also für alle Positionen des Bildes auf einmal. Die Faktoren $f(i)$ zwischen dem Bild I_i und dem Referenzbild I_n lassen sich aus der Helligkeitsdifferenz der Grauwerte an jeder Position bestimmen. Zuerst sei die Menge aller Vorkommen eines Grauwerts g für $g \in \{0, \dots, 255\}$ in Bild I_i definiert als:

$$P_i(g) = \{\mathbf{x} \mid \mathbf{x} \in \mathbb{N}^3, I_i(\mathbf{x}) = g\} \quad (3.7)$$

Das Histogramm $H_i(g)$ eines Bildes I_i gibt an wie häufig ein bestimmter Grauwert g vorkommt. Mit der Menge der Positionen eines Grauwerts lässt es sich wie folgt definieren:

$$H_i(g) = \sum_{P_i(g)} 1 \quad (3.8)$$

Das Mapping $M_i(g)$ des Grauwerts g von Bild I_i auf das Referenzbild gibt für einen Grauwert an, auf welchen gemittelten Grauwert des Referenzbildes er abgebildet wird. Es entsteht als Summe über die Grauwerte des Referenzbildes an den Positionen $P_i(g)$, normiert mit der Häufigkeit des Grauwerts, dem Histogrammeintrag $H_i(g)$.

$$M_i(g) = \begin{cases} \frac{1}{H_i(g)} \sum_{P_i(g)} I_n & \text{falls } I_n < 255 \forall P_i(g) \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.9)$$

Das Mapping sollte also für jeden Grauwert dem Faktor entsprechen, um den das Referenzbild heller ist. Die gesuchte lineare Funktion $g' = f(i)g + o(i)$, in der g' den Grauwert

im Referenzbild bezeichnet, kann aus dem Mapping mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt werden. Zu minimieren ist folgende Gleichung:

$$\min_{f,o} \left\| \begin{pmatrix} g_0 & 1 \\ \vdots & \vdots \\ g_{n-1} & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} f \\ o \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} g'_0 \\ \vdots \\ g'_{n-1} \end{pmatrix} \right\| \quad (3.10)$$

Diese lässt sich explizit lösen zu:

$$f = \frac{\sum_{j=0}^{m-1} (g_j - \bar{g})(g'_j - \bar{g}')}{\sum_{j=0}^{m-1} (g_j - \bar{g})^2} \quad (3.11)$$

$$o = \bar{g}' - f \cdot \bar{g} \quad (3.12)$$

Bei der Bestimmung der linearen Funktion dürfen Grauwerte, die auf überbelichtete Bildpunkte im Referenzbild abgebildet werden, nicht berücksichtigt werden, da sich aus diesen der Faktor nicht rekonstruieren lässt (Sättigung des Sensors). In der Praxis hat es sich deshalb als günstig erwiesen, nicht von Bild I_i direkt auf das Referenzbild I_n zu mappen, sondern auf das jeweils nächsthellere Bild I_{i+1} . Dadurch steigt der Erwartungswert, nicht-überbelichteten Bildpunkten wieder ebensolche zuzuordnen zu können. Für den tatsächlichen Faktor $f'(i)$ und den Offset $o'(i)$ müssen dann auch alle helleren Bilder berücksichtigt werden:

$$f'(i) = \prod_{j=i}^n f(j) \quad (3.13)$$

$$o'(i) = \sum_{j=i}^n o(j) \quad (3.14)$$

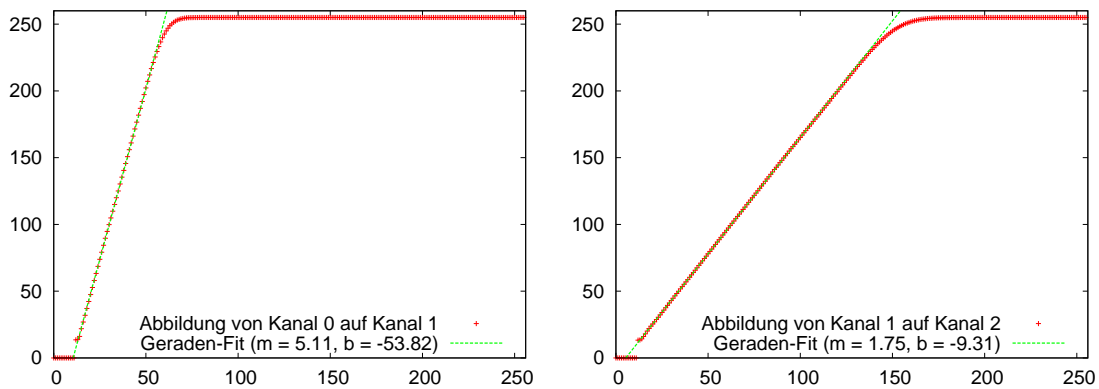


Abbildung 3.2: Mapping der Grauwerte von drei unterschiedlich belichteten Aufnahmen. Links: Kanal 0 auf 1, entsprechend der Laserintensität 1 auf 5. Rechts: Kanal 1 auf 2, entsprechend Laserintensität 5 auf 9.

3.1.4 HDR mit lokaler Faktorschätzung

Die globale Faktorschätzung kann nicht auf lokale Unterschiede in der Probe eingehen, da alle Faktoren für eine Aufnahme auf einmal ermittelt werden. Über lokale, nichtproportionale Änderungen in der Leuchtdichte wird dabei gemittelt, sie gehen also verloren.

Beim Verfahren der lokalen Faktorschätzung wird nicht eine einzelne lineare Funktion wie in Gleichung 3.3 für alle Positionen bestimmt. Stattdessen werden die Faktoren $F_i(\mathbf{x})$ für jeden Voxel an den Positionen \mathbf{x} getrennt berechnet, eine Bestimmung des Offsets entfällt.

$$I' = G(\sigma) * I \quad (3.15)$$

$$F'_i(\mathbf{x}) = \begin{cases} I'_n(\mathbf{x})/I'_i(\mathbf{x}) & \text{falls } I'_i(\mathbf{x}) > 0 \wedge I'_n(\mathbf{x}) < 255 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.16)$$

$$F = G(\sigma) * F' \quad (3.17)$$

Vor der Bestimmung der Faktoren werden die Intensitätsverteilungen I_i tiefpassgefiltert. Dann können die Faktoren durch punktweise Division bestimmt werden. Um die Anfälligkeit gegen Störungen weiter zu verringern, werden die Faktoren F' vor der weiteren Verwendung ebenfalls tiefpassgefiltert. Als Tiefpassfilter wird ein Gaußfilter verwendet, da seine Wirkung im Ortsraum lokal beschränkt ist.

Für die in Gleichung 3.16 ausgenommenen Fälle $I'_i(\mathbf{x}) > 0$ und $I'_n(\mathbf{x}) < 255$ können die Faktoren nicht direkt bestimmt werden. Sie werden deshalb aus Nachbarwerten interpoliert. Aus Effizienzgründen wird eine lineare Interpolation in allen drei Raumrichtungen (hier mit l , r und c für level, row und column bezeichnet) verwendet. Zwischen diesen Werten wird gemittelt, wie in Gleichung 3.18 angegeben:

$$F(x) = \frac{1}{3} \left(f_{l0} + \frac{f_{l1} - f_{l0}}{x_{l1} - x_{l0}} (x_l - x_{l0}) \right) + \frac{1}{3} \left(f_{r0} + \frac{f_{r1} - f_{r0}}{x_{r1} - x_{r0}} (x_r - x_{r0}) \right) + \frac{1}{3} \left(f_{c0} + \frac{f_{c1} - f_{c0}}{x_{c1} - x_{c0}} (x_c - x_{c0}) \right) \quad (3.18)$$

Mit den so bestimmten Faktoren ändert sich Gleichung 3.4 in der HDR-Rekonstruktion zu Gleichung 3.19:

$$K(\mathbf{x}) = F_1(\mathbf{x})I_1(\mathbf{x}) + \sum_{i=2}^n \begin{cases} F_i(\mathbf{x})I_i(\mathbf{x}) & \text{falls } I_i(\mathbf{x}) < 255 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.19)$$

Alle weiteren Schritte zur Bestimmung der HDR-Rekonstruktion J bleiben dann wie in den Gleichungen 3.5 und 3.6 angegeben.

Die gerade vorgestellte lokale Schätzung der HDR-Parameter wurde ursprünglich für Pollenproben entwickelt, bei welchen eine stark unterschiedliche Ausbleichung der Autofluoreszenz der verschiedenen Partikel und des Hintergrundes auftritt. Auf den verwendeten Zebrafisch-Daten hat sie keine Verbesserung gegenüber der in Kapitel 3.1.3 angegebenen globalen Faktorschätzung erbracht. Eine plausible Begründung dafür könnte dadurch gegeben sein, dass für die Färbung im Zebrafisch überall der gleiche Farbstoff verwendet wird, und deshalb eine eher homologe Ausbleichung auftritt. Da die lokale Schätzung zusätzliche Unsicherheit durch die Interpolation fehlender Werte mit sich bringt, wurde sie im Folgenden nicht weiter verwendet.

3.1.5 HDR mit Rausch-Normierung

Im konfokalen LSM kommen hauptsächlich vier Arten von stochastischem Rauschen⁴ vor, und zwar Laserrauschen, Poissonrauschen⁵, Sekundäremissionsrauschen und Dunkelrauschen. Sekundäremissionsrauschen und Dunkelrauschen entstehen im Detektor, haben jedoch bei modernen PMTs eine sehr geringe Größenordnung und werden hier vernachlässigt.

Laserrauschen ist proportional zur Anzahl N einfallender Photonen, und deshalb dominierend ab $N > 10\,000$ Photonen, während sich Poissonrauschen antiproportional zu N verhält und für $N < 1\,000$ die dominierende Störungsquelle ist. Bei üblichen Fluoreszenzaufnahmen ist daher Poissonrauschen dominierend, auf welches sich die Untersuchung konzentrieren wird.

$$P(X = k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda} \quad (3.20)$$

Poissonrauschen entsteht aus den Quanteneigenschaften des Lichts. Das Eintreffen einzelner Photonen im Sensor ist ein Poisson-Prozess nach Gleichung 3.20. Ein Poisson-Prozess ist eine diskrete Wahrscheinlichkeitsverteilung, bei der Erwartungswert und Varianz identisch sind. Abbildung 3.3 (links) zeigt drei Poisson-Verteilungen mit verschiedenen Erwartungswerten λ .

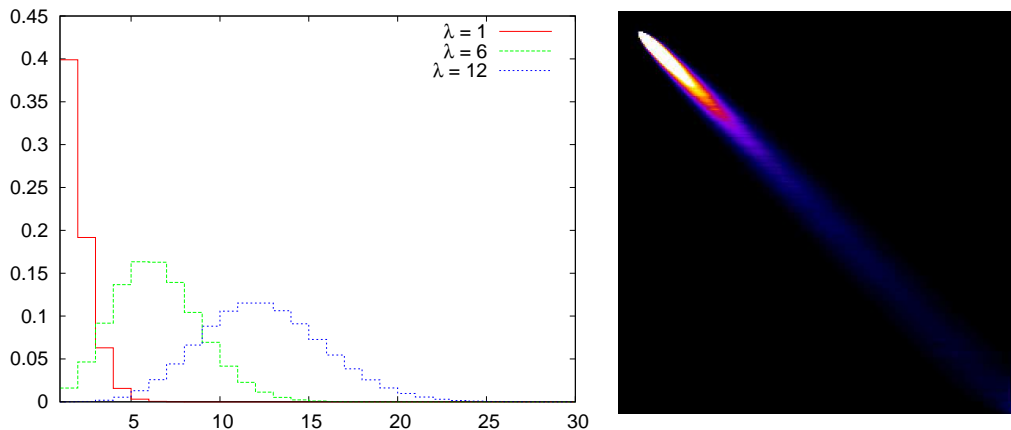


Abbildung 3.3: Links: Poisson-Verteilungen mit Erwartungswert $\lambda = 1$, $\lambda = 6$ und $\lambda = 12$. Rechts: Cooccurrence-Matrix der Grauwerte, aufgetragen über dem mittleren Grauwert.

Für eine bestimmte Laserintensität lassen sich Erwartungswert und Varianz λ der zugrundeliegenden Verteilung wie folgt ermitteln. Es werden n Bilder einer Szene aufgenommen, in der möglichst alle Grauwerte gleichmäßig vorhanden sind. Als Ground-Truth M wird ein Mittelwertbild M der n Bilder erstellt wie in Gleichung 3.21:

$$M = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n I_j \quad (3.21)$$

Nun kann die Cooccurrence-Matrix C der einzelnen Bilder I_j zum gemittelten Bild M

⁴Systematisches Rauschen korreliert zumeist mit defekter Hardware, und kann nach [14] vernachlässigt werden.

⁵Poissonrauschen wird auch als Schrotrauschen bezeichnet. Es bildet den Hauptanteil des Photonenschausens.

erstellt werden, wie in Gleichung 3.22 angegeben. Dabei bezeichnet δ die Dirac-Funktion.

$$C(p, q) = \int_x \int_y \delta(M(x, y) - p) \cdot \delta(I(x, y) - q) dx dy \quad (3.22)$$

Eine Zeile der Cooccurrence-Matrix C entspricht also einem mittleren Grauwert \bar{g} , die Einträge der Zeile sind die Häufigkeiten des Auftretens einer entsprechenden Grauwertabweichung $g - \bar{g}$. Die Varianz eines Grauwerts g lässt sich nun wie in Gleichung 3.23 durch Summation über die Varianz einer Zeile $g_j - \bar{g}$, gewichtet mit den Häufigkeiten $C(\bar{g}, g_j)$, bestimmen.

$$\begin{aligned} \text{var}(g) &= E((g - \bar{g})^2) \\ &= \sum_{j=1}^n p(g_j)(g_j - \bar{g})^2 \\ &= \frac{\sum_{j=1}^n C(\bar{g}, g_j)(g_j - \bar{g})^2}{\sum_{j=1}^n C(\bar{g}, g_j)} \end{aligned} \quad (3.23)$$

Die Anzahl N Photonen pro Grauwert kann nun aus den Varianzen bestimmt werden. Für jeden Grauwert gibt es eine Poissonverteilung der im Detektor eingetroffenen Photonen. Der Faktor, um den sich die Varianz dieser Verteilung zwischen Grauwerten ändert, ist die gesuchte Anzahl Photonen.

Die Anzahl N Photonen pro Grauwert entspricht also der Steigung der Fehlerausgleichs-Geraden, welche durch die Varianzen verläuft. Ein eventueller Offset der Geraden kann vorkommen, wenn der Sensor nicht auf Null justiert ist⁶. Die Bestimmung der Geradensteigung erfolgt wie in Gleichung 3.11, ein Beispiel ist in Abbildung 3.4 gezeigt.

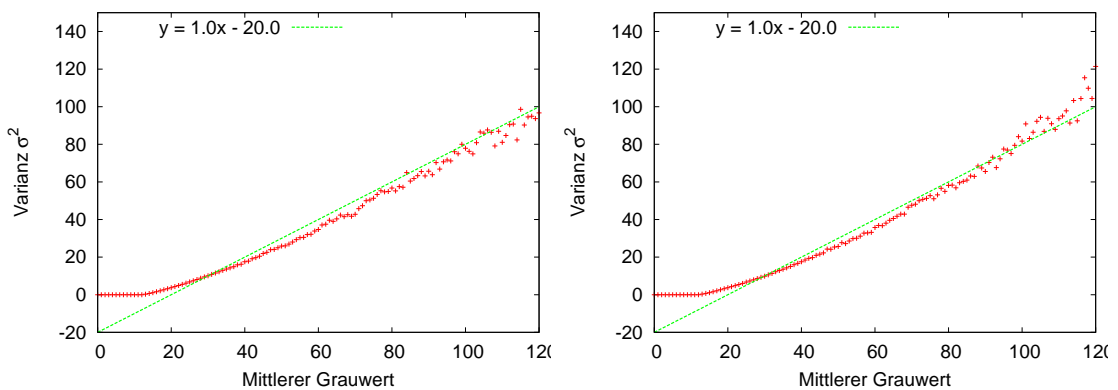


Abbildung 3.4: Grauwertvarianz aufgetragen über dem jeweiligen Grauwert, bei zwei verschiedenen Laserintensitäten. Links: Mittlere Intensität 5. Rechts: Höchste Intensität 9. Nicht dargestellt ist der äquivalente Graph für die niedrigste Intensität 1.

Nach Bestimmung der Anzahl N Photonen pro Grauwert kann die fehlernormierte HDR-Rekonstruktion angegeben werden. Diese bildet das Ergebnis als gewichtetes Mittel

⁶Eine von Null verschiedene Justierung wird verwendet, um negative Rauschanteile nicht zu verlieren. Dies würde sonst zu einem systematischen Fehler führen.

der Einzelbilder, wobei jeder Grauwert g mit seiner Standardabweichung $\sigma(g)$ gewichtet wird. Normiert wird dann über die Summe der Gewichte.

$$\sigma(g) = \frac{\sqrt{g \cdot N}}{N} \quad (3.24)$$

$$K(\mathbf{x}) = \frac{1}{f(1)\sigma(I_1(\mathbf{x}))} [f(1)I_1(\mathbf{x}) + o(1)] \quad (3.25)$$

$$+ \sum_{i=2}^n \begin{cases} \frac{1}{f(i)\sigma(I_i(\mathbf{x}))} [f(i)I_i(\mathbf{x}) + o(i)] & \text{falls } I_i(\mathbf{x}) < 255 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.26)$$

$$L(\mathbf{x}) = f(1)\sigma(I_1(\mathbf{x})) + \sum_{i=2}^n \begin{cases} f(i)\sigma(I_i(\mathbf{x})) & \text{falls } I_i(\mathbf{x}) < 255 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.27)$$

$$J(\mathbf{x}) = K(\mathbf{x})/L(\mathbf{x}) \quad (3.28)$$

Die fehlernormierte HDR-Rekonstruktion $J(\mathbf{x})$ ergibt sich somit wie in Gleichung 3.28.

3.2 Positionierung der Bildstapel

Bei Verwendung eines 25x-Objektivs am LSM ist die sichtbare Fläche des Objektträgers etwa $330 \times 330 \mu\text{m}$. Um mikroskopische Aufnahmen eines Objekts erstellen zu können, welches größere vertikale oder horizontale Abmessungen hat, müssen diese getrennt erstellt und später rekombiniert werden. Der Kopf eines Zebrafisch-Embryos im Alter von 72 HPF misst ca. $400 \times 400 \times 400 \mu\text{m}$, weshalb zwei mal zwei Aufnahmen nötig sind. Die Positionierung des Scanning-Tisches ist nicht im Pixelbereich möglich⁷. Ebenso ist die automatische Rekombination der Aufnahmen mit der Mikroskopie-Software nicht mit zufriedenstellendem Ergebnis gelungen, weshalb eine selbst erstellte Software zum Einsatz kommt.

Das Verfahren zur Rekombination der Bildstapel besteht aus mehreren Schritten. Zuerst wird mit Hilfe der in Abschnitt 2.5 vorgestellten normierten Kreuzkorrelation ein Versatz zwischen überlappenden Bereichen bestimmt. Damit kann in Abschnitt 3.2.2 eine optimale Positionierung aus den paarweisen Versätzen unter Verwendung der Singular Value Decomposition (SVD) bestimmt werden. Zuletzt werden die Bildstapel zusammengefügt, wobei die Grauwertintensität in überlappenden Bereichen aufgrund des Ausbleichens des Fluorophors korrigiert werden muss. Darauf wird in Abschnitt 3.4 eingegangen.

Abschließen wird dieses Kapitel eine erfolgreiche Anwendung des vorgestellten Verfahrens zur Rekombination konfokaler Aufnahmen auf einen anderen Datensatz, auf Gehirnschnitten von Mäusembryonen. Dies wird in Abschnitt 3.4.2 dargestellt werden.

3.2.1 Anwendung der Korrelation

Zur Erstellung der Aufnahmen am konfokalen LSM kann über ein Makro das gewünschte rechteckige Aufnahmegebiet eingestellt werden. Es kann die Anzahl Bildstapel in x - und y -Richtung eingestellt werden, zusammen mit einer prozentualen Überlappung. Die einzelnen Positionen der Bildstapel werden dann vom Scanning-Tisch als Gitter angefahren.

⁷ Als Standard für Scanning-Tische werden wiederholbare Genauigkeiten von etwa $1 \mu\text{m}$ angegeben. Zum Vergleich: Die Pixelgröße beim 25x-Objektiv beträgt in etwa $0,66 \mu\text{m}$, beim 40x-Objektiv in etwa $0,58 \mu\text{m}$.

Aus den bekannten Abmessungen des Aufnahmegebietes und der prozentualen Überlappung wird der paarweise Überlappungsbereich der einzelnen Bildstapel geschätzt. Dadurch reduziert sich der Aufwand der Korrelation erheblich, weil nicht alle möglichen Kombinationen von Stapeln miteinander korreliert werden müssen.

Da zu Beginn unklar ist, mit welcher optischen Verzeichnung die Stapel behaftet sind, werden nicht komplette Überlappungsbereiche miteinander korreliert. Stattdessen werden einzelne Segmente gleichverteilt aus dem Bereich entnommen und mit dem Teilbild derselben Position im Überlappungsbereich des anderen Stapels korreliert. Auf mögliche Verzeichnungen wird in Abschnitt 3.2.3 eingegangen. Aus der normierten Kreuzkorrelation nach Kapitel 2.5 erhält man für die korrelierten Segmente A, B die Matrix der Korrelationskoeffizienten C :

$$C(\mathbf{x}) = (A \# B)(\mathbf{x}) \quad (3.29)$$

Der Korrelationskoeffizient $k \in [-1, 1]$ mit maximalem Wert entspricht der besten Übereinstimmung, seine Position \mathbf{x} entspricht der Verschiebung $\mathbf{v} \in \mathbb{N}^3$, unter der die beste Übereinstimmung erreicht wurde:

$$k = \max_{\mathbf{x}} C(\mathbf{x}) \quad (3.30)$$

$$\mathbf{v} = \arg \max_{\mathbf{x}} C(\mathbf{x}) \quad (3.31)$$

Für die so korrelierten Fenster A, B wird als Ergebnis nur der beste Korrelationskoeffizient k zusammen mit der Verschiebung $\mathbf{v} = \mathbf{x}$ und der Position \mathbf{p} , an welcher korreliert wurde, abgespeichert. Damit gewinnt man die Menge E :

$$E = \{(k, \mathbf{p}, \mathbf{v}) \mid k \in [-1, 1] \text{ und } \mathbf{p}, \mathbf{v} \in \mathbb{N}^3\} \quad (3.32)$$

3.2.2 Bestimmung der Positionen

Für je zwei Bildstapel i und j kann nun aus der Menge E_{ij} der Korrelationskoeffizienten eine Gesamtverschiebung bestimmt werden. Dazu selektiert man per Thresholding mit Threshold δ die Teilmenge $E'_{ij} \subseteq E_{ij}$ mit hohen Koeffizienten⁸ $k \geq \delta$:

$$E'_{ij} = \{(k, \mathbf{p}, \mathbf{v}) \in E_{ij} \mid k \geq \delta\} \quad (3.33)$$

Aus dieser Menge wählt man als beste Verschiebung V_{ij} den komponentenweisen Median, da er unanfälliger gegen Ausreißer ist als z.B. der Mittelwert (siehe auch Abbildung 3.5). Der Korrelationskoeffizient enthält aber noch zusätzliche Information über die Qualität der Korrelation an einem Punkt, die bei reinem Thresholding ungenutzt bleibt. Um diese nicht zu verwerfen, können die Elemente vor der Medianbestimmung mit dem Koeffizienten gewichtet werden. Eine einfache Gewichtung ist gegeben, wenn jedes Element \mathbf{v}_t , $t \in \{1, \dots, |E'_{ij}|\}$, vor der Sortierung mehrfach in die Menge aufgenommen wird, wobei die Anzahl m proportional zum Korrelationskoeffizienten ist:

$$E''_{ij} = \{(k, \mathbf{p}, \mathbf{v})_1, \dots, (k, \mathbf{p}, \mathbf{v})_m \mid (k, \mathbf{p}, \mathbf{v}) \in E'_{ij}, m = \lfloor 10 \cdot (k - \delta) \rfloor\} \quad (3.34)$$

$$V_{ij} = \begin{pmatrix} \text{median}(v_x) \\ \text{median}(v_y) \\ \text{median}(v_z) \end{pmatrix} \quad \text{für alle } \mathbf{v} \in E''_{ij} \quad (3.35)$$

Für die n Bildstapel erhält man also eine quadratische Matrix M der Dimension $n \times n$

⁸Als guter Threshold hat sich 0,7 - 0,8 erwiesen.

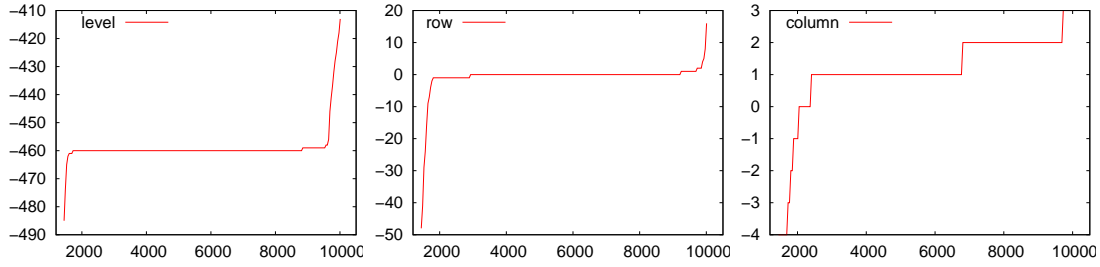


Abbildung 3.5: Aufsteigend sortierte Verschiebungsvektoren der Stapel t2 gegen t3, aus Aufnahme e12. Der längere gerade Abschnitt im mittleren Bereich enthält auch den Median $V_{23} = (-460; 0; 1)$.

der paarweisen Verschiebungen. Es ist

$$M(i, j) = \begin{cases} V_{ij} & \text{falls } j > i \text{ und Stapel } i \text{ und } j \text{ überlappen} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.36)$$

M ist also obere Dreiecksmatrix mit höchstens $n(n-1)/2$ Einträgen. Bildlich kann man sich die Stapel auch als Knoten eines gerichteten Graphen vorstellen, bei dem eine Kante der Relation "Überlappen" entspricht und Knoten nur in aufsteigender Nummerierung verbunden sind. Diese Anschauung ist in Abbildung 3.6 angedeutet. Um aus der Matrix

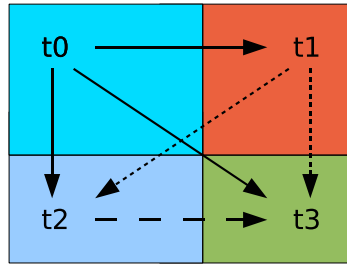


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung von vier Bildstapeln. Die Position im Raum wird hier in 2D angedeutet. Überlappen alle Stapel, so entsteht ein vollständiger Graph mit $n(n-1)/2$ gerichteten Kanten.

der paarweisen Verschiebungen die Positionen der Bildstapel $p(i) \in \mathbb{N}^3$ zu bestimmen, muss also für jede der Komponenten x, y, z ein System von m (mit $m \leq n(n-1)/2$) linearen Gleichungen gelöst werden. Das System ist so bestimmt, dass für jede Verschiebung V_{ij} eine Zeile M_k in M existiert, in der $M_{ki} = -1, M_{kj} = 1$ und $M_{kl} = 0$ sonst ist:

$$V_{ij} \neq 0 \Rightarrow \exists M_k \in M: \quad M_{ki} = -1, M_{kj} = 1, M_{kl} = 0 \text{ sonst} \quad (3.37)$$

Für $m \leq n$ ist das System unterbestimmt bzw. eindeutig zu lösen, diese Fälle sind trivial. Für $m > n$ ist das System jedoch überbestimmt, es können also nicht alle Gleichungen erfüllt werden. Hierzu zieht man die Singular Value Decomposition zu Hilfe, die in Abschnitt 2.6 dargestellt wurde.

Als Beispiel sei hier für die vier Bildstapel aus Abbildung 3.6 das überbestimmte Gleichungssystem angegeben, dessen Lösung die Positionen $p(1), \dots, p(3)$ sind. Die Position

$p(0)$ des ersten Stapels wird vorher auf Null fixiert.

$$\begin{pmatrix} V_{0,1} \\ V_{0,2} \\ V_{0,3} \\ V_{1,2} \\ V_{1,3} \\ V_{2,3} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ -1 & 1 & 0 \\ -1 & 0 & 1 \\ 0 & -1 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} p(1) \\ p(2) \\ p(3) \end{pmatrix} \quad (3.38)$$

Zur Lösung des überbestimmten linearen Gleichungssystems mit Hilfe der Pseudo-Inversen Matrix existieren fertige Implementierungen in Software. Zwei bekannte Algorithmen wie der Golub-Reinsch-Algorithmus oder die Jacobi-Orthogonalisierung sind in der "GNU Scientific Library" vorhanden, welche hier verwendet wurde (siehe Anhang im Abschnitt Software).

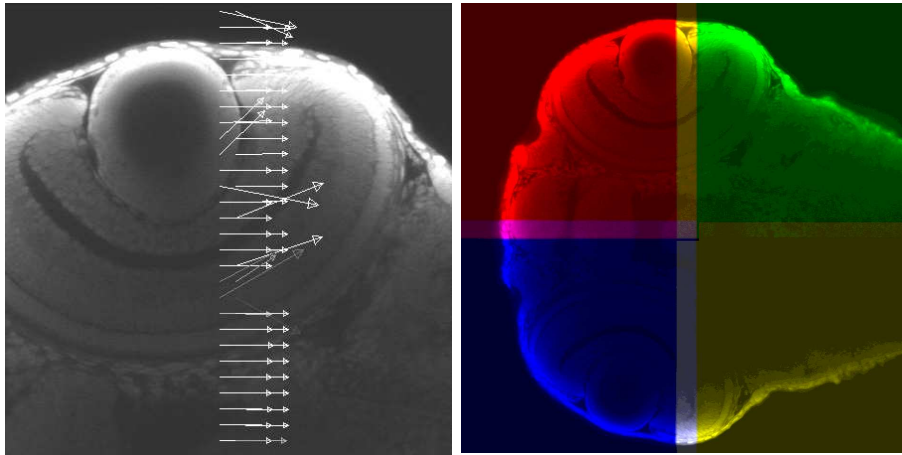


Abbildung 3.7: Links: Verschiebungen der Korrelationsfenster als Vektoren, eingezeichnet für die Bildstapel t_0 und t_1 , mit Grauwert proportional zum Korrelationskoeffizient. Rechts: "Hartes" Stitching in verschiedenen Farbkanälen. Dabei werden nicht perfekt passende Stellen als farbiger Schimmer erkennbar.

3.2.3 Bestimmung der Verzeichnungen

Trotz Verwendung hochwertiger Objektive kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei den Aufnahmen die Randbereiche mit geometrischen Abbildungsfehlern behaftet sind. Zwei häufig vorkommende Verzeichnungen sind die tonnenförmige und die kissenförmige Verzeichnung, wie auch in Abbildung 3.8 für den 2D-Fall dargestellt. Beide sind idealerweise rotationssymmetrisch und lassen sich nach Bestimmung der Abbildungsparameter des optischen Systems mit Hilfe von Software korrigieren. Es sind jedoch auch andere, komplexere Abbildungsfehler möglich.

Während der Bestimmung der Bildstapel-Positionen ist es gleichzeitig möglich, die Aufnahmen auf systematische Verzeichnungen hin zu analysieren. Dazu sind zwei prinzipielle Vorgehensweisen möglich. Die einfachere Methode prüft lediglich, ob in der Menge der Korrelationen eine hohe Varianz vorkommt, ohne diese weiter auf eine Systematik zu untersuchen. Liegt die Varianz über einem bestimmten Schwellwert, so wird die Aufnahme zurückgewiesen.

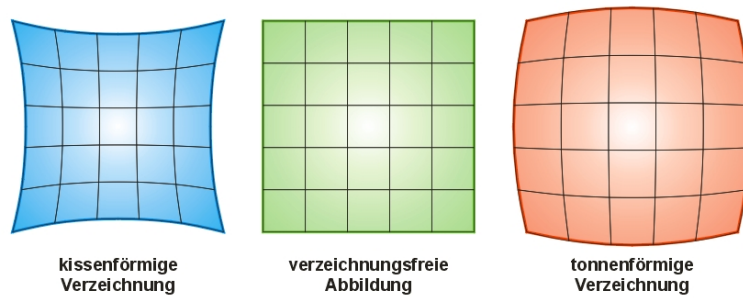


Abbildung 3.8: Häufig vorkommende zweidimensionale Verzeichnungen sind kissenförmige (links) und tonnenförmige (rechts) Verzeichnungen.

Eine bessere Analyse ist das Fitting der vermuteten Verzeichnungsfunktion an die Verschiebungen $\mathbf{v} \in E'_{ij}$. Geht man von einer tonnen- oder kissenförmigen Verzeichnung aus, so ist eine Funktion zweiter Ordnung eine gute Approximation der Verzeichnungsfunktion.

$$f(x) = ax^2 + bx + c \quad (3.39)$$

Da die Verzeichnung in einer der drei Hauptebenen liegt, reicht die Betrachtung des 2D-Falls aus. Exemplarisch wird hier die x - y -Ebene betrachtet, alle Aussagen übertragen sich jedoch analog auf die x - z - und y - z -Ebenen, welche ebenfalls überprüft werden. Für jede Achse der Ebene, hier also x und y , wird nun eine entsprechende Funktion an die Verschiebungen gefittet. Hierbei sei zunächst die x -Achse die untersuchte Achse des Überlappungsbereiches.

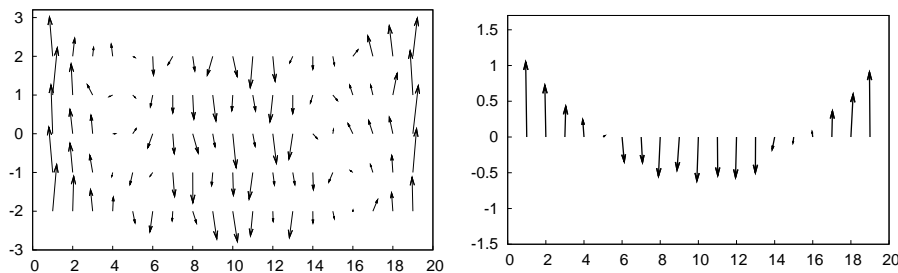


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung von Verschiebungsvektoren mit tonnenförmiger Verzeichnung (links) und gemittelter Komponente (rechts).

Sei $E_{ij}^k \subset E_{ij}$ die Menge der Verschiebungsvektoren im Überlappungsbereich der Stapel i und j auf Niveau $z = k$. Zunächst werden die Vektoren \mathbf{v} über die y -Achse gemittelt, um Rauschteile zu unterdrücken und den Rechenaufwand zu reduzieren:

$$\mathbf{v}_x = \frac{1}{|y_{\text{overlap}}|} \sum_y \mathbf{v}_{xy} \quad (3.40)$$

An die gemittelte y -Komponente der Vektoren kann nun eine Funktion zweiten Grades

angepasst werden, wobei wieder die Pseudo-Inverse Matrix M^- zum Einsatz kommt:

$$\begin{pmatrix} y_1 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_1^2 & x_1 & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ x_n^2 & x_n & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a \\ b \\ c \end{pmatrix} \quad (3.41)$$

Die Krümmung der Funktion ist durch den quadratischen Term bestimmt. Ist die durch den quadratischen Term verursachte Verzeichnung $F = |ax_0^2|/2 + |ax_n^2|/2 - |ax_{n/2}^2|$ größer als ein Pixel (gerechnet auf die halbe Breite n eines Bildes), so ist die Verzeichnung sichtbar und muss korrigiert werden.

Bei den von uns verwendeten Objektiven ist keine sichtbare Verzeichnung aufgetreten, weshalb keine Implementation eines Korrekturalgorithmus nötig war. In Abbildung 3.10 ist jedoch eine ebenfalls am konfokalen LSM entstandene Aufnahme von Neuronen eines Mäusembryos abgebildet, die eine deutlich sichtbare Verzeichnung aufweist.

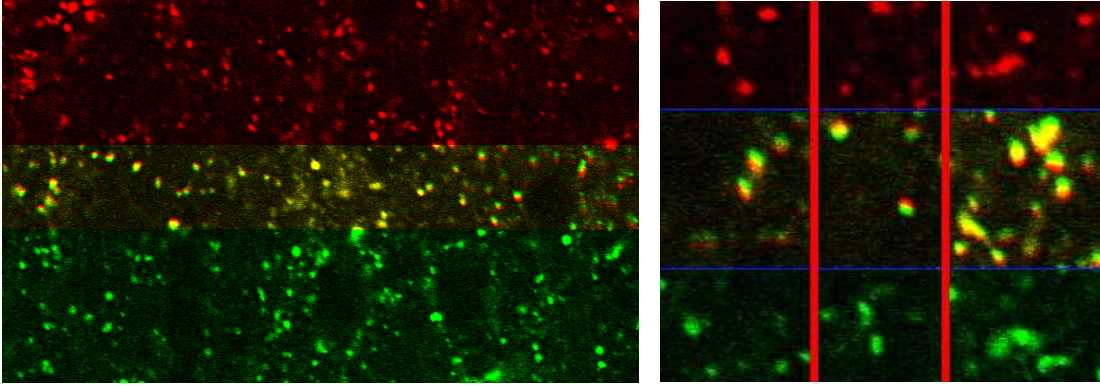


Abbildung 3.10: Gehirnzellen von Mäuseembryonen, aufgenommen mit einem 63x Objektiv. Rechts: Vergrößerte Darstellung aus dem linken, mittleren und dem rechten Teil. Deutlich sichtbar ist die Verzeichnung um mehr als zwei Pixel.

3.3 Zusammensetzen der Aufnahmen

Nach erfolgter Positionierung der Bildstapel bleibt die Frage, mit welcher Methode diese zu einem Gesamtbild verrechnet werden sollen. Sind zwei Stapel i und j positioniert, so ist eine naheliegende Kombination das lineare Überblenden. Der Überlappungsbereich ist gegeben durch:

$$overlap = \begin{pmatrix} \max(p_{ix}, p_{jx}), \min(p_{ix} + s_{ix}, p_{jx} + s_{jx}) \\ \max(p_{iy}, p_{jy}), \min(p_{iy} + s_{iy}, p_{jy} + s_{jy}) \\ \max(p_{iz}, p_{jz}), \min(p_{iz} + s_{iz}, p_{jz} + s_{jz}) \end{pmatrix} \quad (3.42)$$

Eine Gewichtung für lineares Überblenden zwischen i und j kann aus der Distanztransformation D im überlappenden Bereich erzeugt werden. Dazu werden die an Bild i angrenzenden Kanten auf den Wert 1 gesetzt, Null sonst, und darauf die Distanzen berechnet. Aus den Distanzen D_i gewinnt man lineare Gewichtungsfaktoren F_i durch invertieren und abbilden auf $[0, 1]$:

$$F_{ij}(\mathbf{p}) = |D_{ij}(\mathbf{p}) - \max_p(D_{ij}(\mathbf{p}))| / \max_p(D_{ij}(\mathbf{p})) \quad (3.43)$$

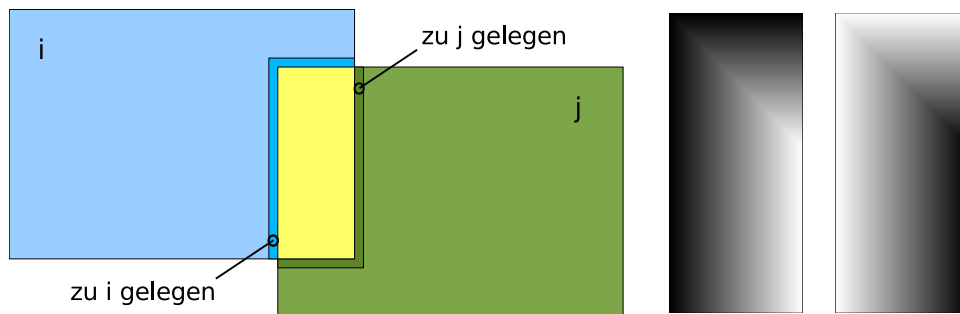


Abbildung 3.11: Links: Überlappender Bereich zweier Bildstapel in gelb, mit eingezeichnetem Grenzbereich zu i (türkis) und j (dunkelgrün). Rechts: Distanztransformation D und resultierende Gewichtung F für Stapel i .

Sind die linearen Gewichtungsfaktoren F_{ij} paarweise für alle Stapel i und j bestimmt, so entsteht das Gesamtbild J in den Überlappungsbereichen durch Summieren über die Intensitäten der gewichteten Einzelbilder I_k , normiert mit dem Gesamtgewicht:

$$J(\mathbf{p}) = \frac{1}{\sum_k F_k(\mathbf{p})} \sum_k F_k(\mathbf{p}) I_k(\mathbf{p}) \quad (3.44)$$

Lineares Überblenden hat zwei wesentliche Nachteile und wurde daher nicht verwendet. Einen Nachteil stellen die entstehenden harten Kanten an den Grenzen des gemittelten Bereiches dar, die am Übergang entstehen, an dem die wachsenden bzw. fallenden Faktoren an das restliche Bild angrenzen. Hier wäre ein stetiger Übergang wünschenswert. Der größere Nachteil ist jedoch, dass lineares Überblenden die Information zweier überlappender Bildstapel als gleichwertig betrachtet. Diese Annahme ist in der Praxis nicht gegeben, da das Färbemittel durch die Lasereinstrahlung ausbleicht, wie in Abbildung 3.14 erkennbar ist. Da beim Ausbleichen Information irreversibel verloren geht, sollte der größtmögliche Bildbereich aus nicht ausgebleichten Stapeln erstellt werden, vergleiche Abbildung 3.6.

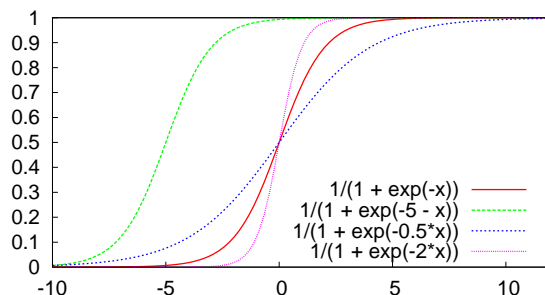


Abbildung 3.12: Sigmoid-Funktion σ (rot) mit Variation von Nulldurchgang (grün) und Steigung (blau und pink).

Ein besseres Verfahren ist also, die Bildstapel in umgekehrter Reihenfolge des Aufnehmens zu überlagern, so dass früher aufgenommene Stapel später aufgenommene überschreiben. Um harte Kanten zu vermeiden, kann in einem schmalen Randbereich b mit

Hilfe der Sigmoid-Funktion überblendet werden:

$$\sigma(x) = \frac{1}{1 + e^{b/2-x}} \quad (3.45)$$

Die Sigmoid-Funktion erreicht bereits in sehr geringem Abstand ihres Nulldurchgangs den Wert konstant 1 beziehungsweise 0, erzeugt also keine harten Kanten trotz eines sehr "schmalen" Überblendbereichs b .

Abbildung 3.13 zeigt das Ergebnis einer solchen Rekombination. Es fällt auf, dass ein hoher Helligkeitsunterschied zwischen früher und später aufgenommenen Bildstapeln besteht. Dieser ist darauf zurückzuführen, dass Streulicht des Lasers in weite Bereiche der Probe abstrahlt und dort zum Ausbleichen des Fluorophors führt.

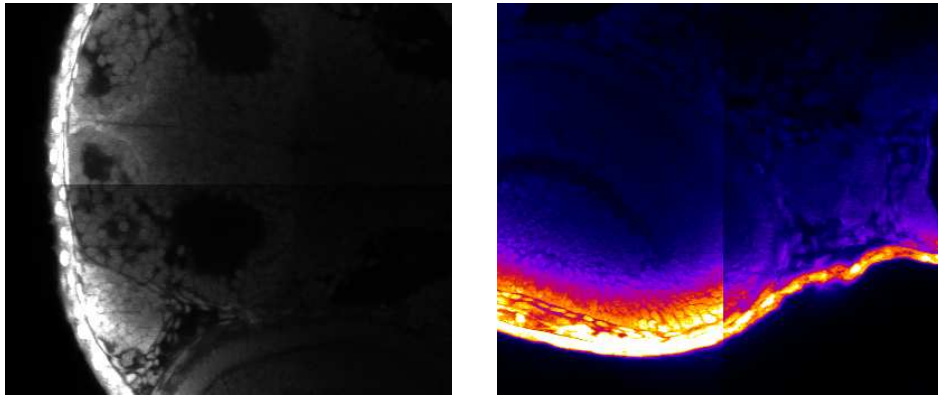


Abbildung 3.13: Rekombination zweier Bildstapel durch "hartes" Stitching. Links: Stapel t_0 auf t_3 . Rechts: Stapel t_3 auf t_4 mit farblicher Hervorhebung der Grauwertintensität.

3.4 Ausbleich-Korrektur

Um den Effekt des Ausbleichens zu korrigieren, ist ein geeignetes Fehlermodell nötig. Im Folgenden soll davon ausgegangen werden, dass die Intensität des Streulichts in der Probe einer dreidimensionalen Gaußverteilung folgt.

$$G(\mu, \sigma, p) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(p-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (3.46)$$

$$G_1(\mu, \sigma, p) = e^{-\frac{(p-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (3.47)$$

Um den Abfall in der Grauwertintensität der Aufnahmen zu schätzen, kann wieder der Überlappungsbereich der Bildstapel verwendet werden. In diesem sind die Intensitäten beider benachbarter Aufnahmen i und j bekannt, es lässt sich also für jede Position \mathbf{p} der Faktor $F_{ij}(\mathbf{p}) = I_i(\mathbf{p})/I_j(\mathbf{p})$ bestimmen. Dies ist in Abbildung 3.14 für einen Ausschnitt dargestellt.

Nun soll aus den ermittelten Intensitätsdifferenzen im Überlappungsbereich auf den Bildbereich in der nahen Umgebung geschlossen werden. Es muss dazu untersucht werden, wie sich Fluorophor im Ausbleichen verhält. Eine erste Näherung ist, den durchschnittlichen Faktor über den Überlappungsbereich zu bilden:

$$\Delta F = \frac{1}{|P|} \sum_p F_{ij}(\mathbf{p}) \quad (3.48)$$

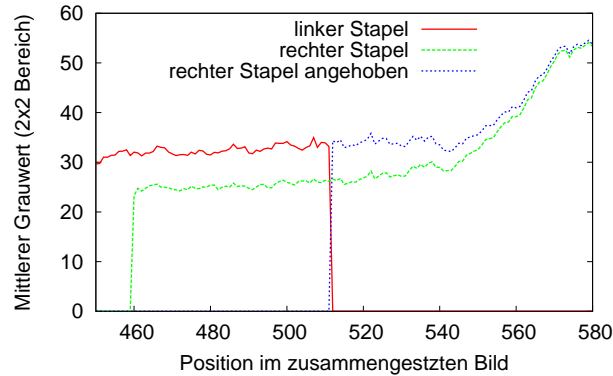


Abbildung 3.14: Grenzbereich zwischen zwei überlappenden Bildstapeln. Eingezeichnet ist der gemittelte Grauwert des linken Stapels (rot) und des rechten Stapels (grün). In Blau dazu der Grauwert nach der Korrektur. Der mittlere Faktor beträgt $f = 1,29$.

Nun wird eine Normalverteilung mit diesem gewichtet. Es wird eine Normalverteilung $G_1(\mu, \sigma)$ wie in 3.47 verwendet, welche ihren Scheitelpunkt bei Eins hat. Ist Stapel j der ausgeblichene Bildstapel, so addiert man an allen Positionen \mathbf{p} zur Intensitätsverteilung die gewichtete Normalverteilung mit Mittelwert $\mu = 0$:

$$I'_j(\mathbf{p}) = (1 + \Delta F \cdot G_1(0, \sigma, p)) I_j(\mathbf{p}) \quad (3.49)$$

und bekommt damit die korrigierte Intensitätsverteilung I'_j . Die Bestimmung der Standardabweichung erfolgt nun experimentell, da sie rechnerisch nicht aus dem inhomogenen Fischgewebe bestimmt werden kann. Gute Ergebnisse konnten bei TOTO-3 gefärbten Fischen mit $\sigma = 13,15\mu\text{m}$ erzielt werden. Für die in Abschnitt 3.4.2 untersuchten Aufnahmen von Mäuseembryonen lag das ermittelte $\sigma = 13,45\mu\text{m}$ im gleichen Bereich.

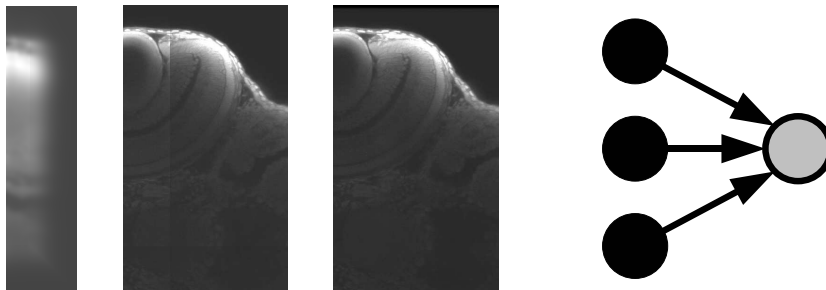


Abbildung 3.15: 1. von links: Faktoren von t_0 nach t_1 . 2. von links: Die Stapel ohne Ausbleichkorrektur zusammengesetzt. 3. von links: Mit Ausbleichkorrektur. Rechts: Extrapolation der Faktoren durch Mittelung über die Nachbarwerte (hier 2D).

Wie man in Abbildung 3.15 links erkennen kann, ist der gemittelte Faktor ΔF_{ij} ; jedoch keine gute Approximation der echten Faktoren, da diese in etwa mit der Helligkeitsverteilung in der Probe korrelieren. Dies kann zwei mögliche Ursachen haben: Fluorophor könnte proportional zu seiner ursprünglichen Leuchtdichte ausbleichen oder aber, das vom Fluorophor emittierte Licht führt selbst zu einer Ausbleichung im umliegenden Gewebe. Der genaue Zusammenhang ist nicht weiter untersucht worden, da mit der folgenden Methode bereits gute Ergebnisse erzielt werden konnten.

Will man von den Faktoren im Überlappungsbereich auf weitere Bereiche der Probe schließen, so muss man lokale Variationen berücksichtigen. Eine Möglichkeit ist, die Werte lokal fortzupflanzen, und dabei zwischen den nächsten Nachbarn zu mitteln, wie in Abbildung 3.15 rechts schematisch für 2D dargestellt.

Um Rauschanteile zu unterdrücken und um feine Positionsunterschiede in den Bildern auszugleichen, werden die Intensitätsverteilungen vor Bestimmung der Faktoren $F_{ij}(\mathbf{p})$ tiefpassgefiltert. Nach der Extrapolation der Faktoren werden diese wie in Gleichung 3.49 auf die Intensitätsverteilung angewendet:

$$\begin{aligned} F_{ij}(\mathbf{p}) &= \frac{G(\mu, \sigma) * I_i(\mathbf{p})}{G(\mu, \sigma) * I_j(\mathbf{p})} \\ I'_j(\mathbf{p}) &= (1 + F_{ij}(\mathbf{p}) \cdot G_1(0, \sigma, \mathbf{p})) I_j(\mathbf{p}) \end{aligned} \quad (3.50)$$

Die damit erzielten Ergebnisse sind von hoher Qualität. In Abbildung 3.16 sind die Bildstapel aus 3.13 dargestellt, diesmal nach Anwendung der Ausbleichkorrektur wie oben beschrieben.

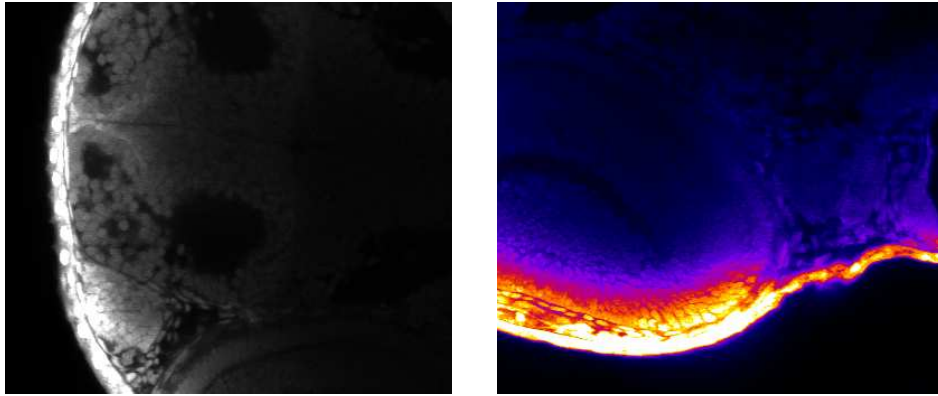


Abbildung 3.16: Die Bildstapel aus Abbildung 3.13 nun mit Ausbleichkorrektur. Links Stapel t0 auf t3, rechts Stapel t3 auf t4 mit farblicher Hervorhebung.

3.4.1 Iterative Korrelation und Ausbleich-Korrektur

Da das Ausbleichen eine nichtlineare Änderung der Grauwertintensität darstellt, ist auch die normierte Kreuzkorrelation nicht vollständig invariant demgegenüber. Basierend auf einer ersten Vorpositionierung lässt sich jedoch die Ausbleich-Korrektur auf die einzelnen Bildstapel anwenden. Danach kann auf den korrigierten Intensitäten erneut korreliert werden. In Abbildung 3.17 sind die aufsteigend sortierten Korrelationskoeffizienten aufgetragen, einmal für die unveränderten Bildstapel und einmal nach der Ausbleichkorrektur. Setzt man die Fenstergröße der normierten Korrelation klein im Verhältnis zur Varianz der Normalverteilung aus Gleichung 3.50, so ist der Einfluss der nichtlinearen Komponente eher gering. Bei einer Fenstergröße von 32 Voxeln $\approx 20\mu\text{m}$ konnte bei den Zebrafisch-Aufnahmen auf einen iterativen Ansatz verzichtet werden, da die Verbesserung der Korrelationskoeffizienten dann nicht mehr zu einer Änderung der resultierenden Positionen führt.

3.4.2 Anwendung auf andere Datensätze

Im Rahmen der Zusammenarbeit mit dem Life Imaging Center am Institut für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg ist das Verfahren des Stitchings auch auf andere

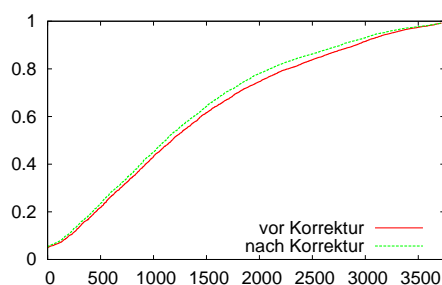


Abbildung 3.17: Korrelationskoeffizienten vor (rot) und nach Ausbleichkorrektur (grün). Mit kleinerer Fenstergröße der Korrelation wird die Differenz geringer.

Datensätze angewendet worden. Abbildung 3.18 zeigt eine Aufnahme von embryonalen Gehirnzellen von Mäusen. Die Abbildung links ist eine Rekombination aus 3×6 Einzelstapeln, rechts aus 5×5 Einzelstapeln. Abbildung 3.19 zeigt noch einmal Kanal 0 der linken Abbildung aus 3.18, einmal mit Ausbleichkorrektur, einmal ohne Ausbleichkorrektur zusammengesetzt.

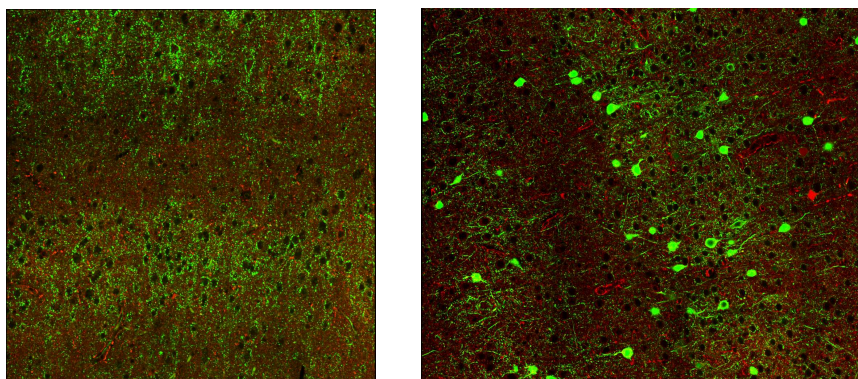


Abbildung 3.18: Ausschnitte aus rekombinierten Abbildungen von Gehirnzellen von Mäuseembryonen. Kanal 0 wurde grün, Kanal 1 rot eingefärbt.

3.5 Rekombination von dorsalen und ventralen Aufnahmen

In den Kapiteln zum konfokalen LSM (Kapitel 2.4.1 und 2.4.2) ist kurz auf den Arbeitsabstand des Objektivs eingegangen worden. Dieser ist definiert als maximale Distanz zwischen der fokalen Ebene und der Frontlinse des Objektivs. Er gibt also an, bis zu welcher Tiefe in der Probe eine scharfe Abbildung möglich ist. Der Arbeitsabstand liefert jedoch keine Information über die Abbildungsleistung in dieser Tiefe. Ab ungefähr zwei Dritteln der Dicke (in etwa $300\mu\text{m}$) erscheint die Probe als unscharf und verwaschen.

Dies lässt sich nur durch die Erstellung einer weiteren Aufnahme der jeweils anderen Probenseite beheben. Bleibt die Probe beim Drehen des Objektträgers starr im Einbettungsmedium, so ist für die Rekombination der dorsalen und ventralen Aufnahme nur die Bestimmung der Transformationsparameter der kongruenten Abbildung nötig, also Translation und Rotation. Der naive Aufwand einer kompletten Korrelation berechnet sich als Produkt über die Mächtigkeiten der Transformationsparameter aller sechs Frei-

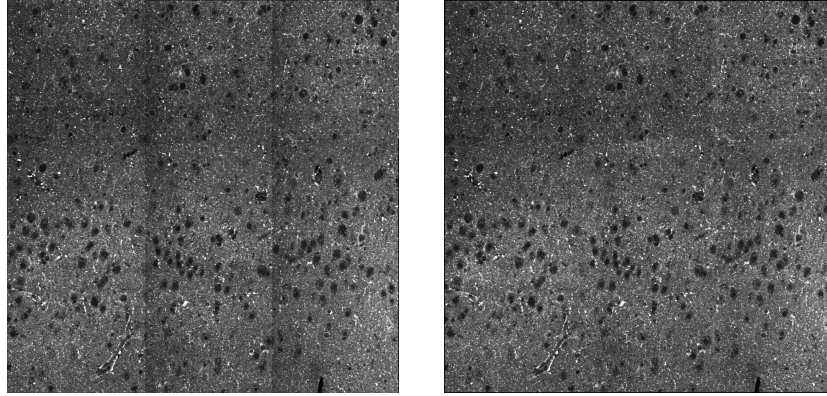


Abbildung 3.19: Rekombination von Gehirnzellen von Mäuseembryonen, Gesamtaufnahme bestehend aus 3×6 Einzelstapeln. Links: Ohne Ausbleichkorrektur. Rechts: mit Korrektur.

heitsgrade, multipliziert mit der Größe der Aufnahme:

$$O(|x| \cdot |y| \cdot |z| \cdot |\varphi| \cdot |\vartheta| \cdot |\psi|) \cdot O(n^3) \quad (3.51)$$

Dabei bezeichnet n^3 die Anzahl Voxel im Objekt, $x, y, z \in \{1, \dots, n\}$ und $\varphi, \vartheta, \psi \in [0, \pi]$. Dieser Aufwand ist für alle praktischen Fälle zu groß. Es ist jedoch möglich, einige der Freiheitsgrade zu fixieren. Eine gute Schätzung der Translation kann aus der Houghtransformation (siehe Kapitel 4.1) gewonnen werden, welche die Positionen der Augen $e_1, e_2 \in \mathbb{R}^3$ als erstes und zweites Maximum e_1, e_2 der Houghmap bestimmt:

$$e_1 = \max_1(HM) \quad (3.52)$$

$$e_2 = \max_2(HM) \quad (3.53)$$

Aus den Maxima der Houghmap lässt sich ein Fixpunkt FP bestimmen:

$$FP = \frac{1}{2}(e_1 + e_2) \quad (3.54)$$

Der erwartete Fehler der Lokalisation des Maximums bei der Houghtransformation wird nun sehr grob mit $\Delta \max(HM) \leq r$ abgeschätzt, wobei r den Kugelradius der Transformation bezeichnet. Mit dieser Abschätzung gilt für den Fehler der Fixpunktbestimmung:

$$\Delta FP = \frac{1}{2}(\Delta e_1 + \Delta e_2) \leq \frac{1}{2}(r + r) = r \quad (3.55)$$

Sind die Positionen e_1, e_2 der Augen bekannt, so können daraus ebenfalls Einschränkungen an die Freiheitsgrade der Rotationen gewonnen werden. Die von e_1 und e_2 aufgespannte Gerade g muss für beide Aufnahmen gleich sein.

$$g(\lambda) = FP + \lambda(e_2 - e_1) \quad (3.56)$$

Wird der Ursprung des Koordinatensystems in den Fixpunkt FP gelegt, so kann eine der Achsen, hier die x -Achse, auf diese Gerade gelegt werden. Dadurch reduziert sich der Freiheitsgrad der Rotationen auf den Winkel um diese Achse. Auch dabei wirkt sich der Fehler Δe_1 beziehungsweise Δe_2 der Houghpunkte aus. Wie in Abbildung 3.20 dargestellt,

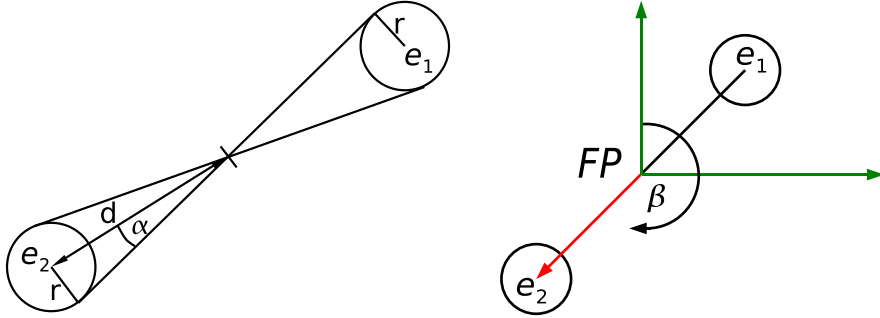


Abbildung 3.20: Links: Aus dem erwarteten Fehler der Houghtransformation lässt sich der Winkel α berechnen. Rechts: Das Koordinatensystem wird so in den Fixpunkt FP gelegt, dass die x -Achse (rot) auf der Gerade zwischen den Augen e_1 und e_2 plaziert ist.

ist der maximale Winkel α , um den die x -Achse gedreht sein kann, wie in Gleichung 3.57 bestimmt:

$$\tan \alpha = \frac{2 \cdot r}{\|e_2 - e_1\|} \quad (3.57)$$

Als Freiheitsgrade der kongruenten Abbildung verbleiben also nach Gleichung 3.55 und 3.57 für Translation und Rotation:

$$\begin{aligned} x, y, z &\in \{-\Delta FP, \dots, \Delta FP\} \\ \varphi, \vartheta &\in [-\alpha, \alpha] \\ \psi &\in [-\beta, \beta] \end{aligned}$$

Dabei ist $\psi \in [-\beta, \beta]$, also die Rotation um die x -Achse, der einzige echte Freiheitsgrad, da über β keine Aussage getroffen werden kann. Im Folgenden werden die Parameter ΔFP , α und β quantisiert. Für den durchschnittlichen Augenabstand $d = \|e_2 - e_1\|$ gilt:

Aufnahme:	e3	e5	e8	e10	e11	e12
Distanz d :	476 μm	471 μm	391 μm	438 μm	413 μm	463 μm

Der durchschnittliche Abstand beträgt $\bar{d} = 442 \mu\text{m}$, den maximalen Abstand nimmt **e3** mit $\max(d) = 476 \mu\text{m}$ ein. Der Radius r zur Bestimmung der Houghtransformation wurde im Bereich $35 \mu\text{m} - 55 \mu\text{m}$ gewählt, der Durchschnitt liegt also bei $\bar{r} = 45 \mu\text{m}$, das Maximum bei $55 \mu\text{m}$. Wählt man die maximierenden Parameter aus obiger Tabelle, so ergeben sich folgende Werte:

$$\Delta FP \leq \frac{1}{2} \max(r) = 28 \mu\text{m} \quad (3.58)$$

$$\alpha = \arctan \frac{2 \cdot \max(r)}{\|\min(d)\|} \approx 16^\circ \quad (3.59)$$

$$\beta = 45^\circ \quad (3.60)$$

Der Rotationswinkel β wurde experimentell bestimmt und muss im Einzelfall vom Benutzer nachjustiert werden. Gute Ergebnisse konnten mit einem Multiskalen-Ansatz erzielt werden, bei dem die Aufnahmen zur Vorpositionierung um den Faktor $F = \frac{1}{4}$ skaliert wurden. Dadurch reduzieren sich die Freiheitsgrade jeweils um denselben Faktor. Anschließend kann in einem feineren Bereich auf den Originaldaten erneut korreliert werden.

Die eigentliche Korrelation wird mit Hilfe der normierten Kreuzkorrelation wie in Kapitel 2.5 eingeführt bewerkstelligt. Nachdem die optimalen Transformationsparameter

bestimmt worden sind, kann die Rekombination der Aufnahmen mit der Ausbleichkorrektur, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, erfolgen. Abbildung 3.21 zeigt das Ergebnis einer dorsalen und ventralen Rekombination nach diesem Verfahren.

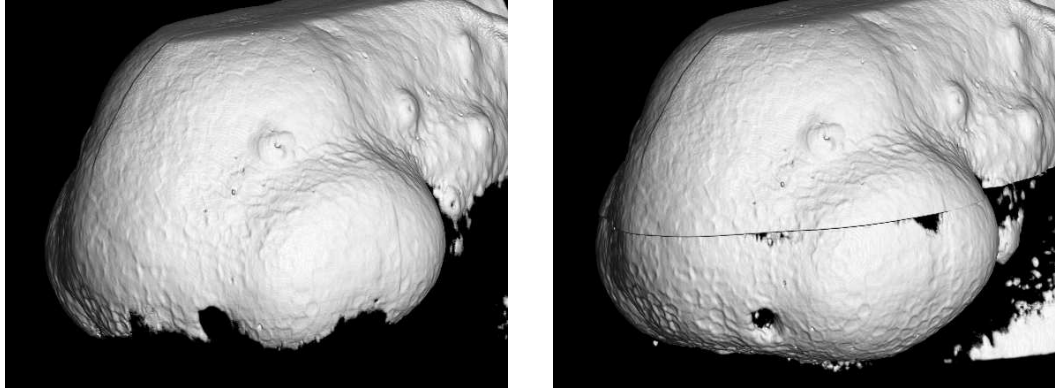


Abbildung 3.21: Oberflächen-Rendering eines Zebrafisch-Embryos. Links die dorsale Aufnahme, die im unteren Bereich wenig Kontrast bietet. Rechts die Rekombination aus dorsaler und ventraler Aufnahme. Die Helligkeitsänderung der Rekombination bleibt als Linie sichtbar, da keine Ausbleichkorrektur verwendet wurde.

Kapitel 4

Registrierung

4.1 Lokalisation mit der Houghtransformation

Die Houghtransformation ist ein Verfahren zur Detektion von Linien in Bildern. Sie wurde 1962 von Paul Hough vorgestellt [17] und kurze Zeit später von Duda und Hart für die Detektion allgemeinerer geometrischer Objekte wie Kurven, Kreisen und Kugeln modifiziert [18]. Der Vorteil liegt darin, dass die Transformation sehr robust ist gegen verschiedene zufällige Störungen. Sie ist ebenso robust gegen teilweise Überdeckung des Musters, und es wird kein Vorwissen über Lage und Anzahl der gesuchten Feature benötigt.

Die grundlegende Idee der Houghtransformation basiert auf der Tatsache, dass geometrische Objekte über ihre Parameterisierung vom Bildraum in einen Parameterraum, den sogenannten Houghraum, abgebildet werden können. In diesem kann der Aufwand der Detektion geringer sein. Für Kreise lautet die Parametergleichung im Bildraum:

$$(x - a)^2 + (y - b)^2 = r^2 \quad (4.1)$$

wobei (a, b) die Koordinaten des Kreismittelpunkts bezeichnet und r den Radius. Der dreidimensionale Parameterraum wird hier von a , b und r aufgespannt, ein Punkt x_i, y_i im Bildraum wird darin auf die durch:

$$(x_i - a)^2 + (y_i - b)^2 = r^2 \quad (4.2)$$

definierte Fläche abgebildet. Ein Punkt im Bildraum bildet also einen Kegel im Parameterraum. Schneiden sich mehrere dieser Kegel in einem Punkt a_0, b_0, r_0 , so liegen die Ursprungspunkte auf dem Kreis, der durch diese Parameter im Bildraum definiert ist. Maxima im Parameterraum korrespondieren also mit den Positionen der stärksten Ausprägung der zugrundegelegten Funktion im Bildraum.

Eine effiziente Implementierung der Transformation nutzt dazu einen Akkumulator, der eine diskretisierte Darstellung des Parameterraums ist. Für jeden Punkt im Bildraum wird zu den entsprechenden Einträgen des Akkumulators, durch die die Fläche nach 4.2 verläuft, eins addiert.

Die Houghtransformation wie oben beschrieben nutzt jedoch keine weiteren Informationen aus, die die Struktur im Bildraum bietet. Eine Verbesserung nach [20] ist die Verwendung der Gradientenrichtung, die im Falle von Kreisen und Kugeln in radialer Richtung verläuft. Der Gradient ist ein stabileres Merkmal für die Existenz eines Kreises, da er auch die Richtung der jeweiligen Kante berücksichtigt:

$$\begin{aligned} \nabla f &= \left(\frac{\partial f}{\partial x}, \frac{\partial f}{\partial y} \right) \\ \phi &= \arccos \frac{\langle \nabla f, x \rangle}{\| \nabla f \| \cdot \| x \|} \end{aligned} \quad (4.3)$$

In dieser Formulierung bildet die Houghtransformation aus dem Bildraum (x, y, ϕ) in den Parameterraum x, y ab, in dem der Gradient eine Linie möglicher Kreismittelpunkte bildet. Für den Winkel ϕ wurde die x -Achse willkürlich gewählt.

4.1.1 Verbesserung der Robustheit der Houghtransformation

In dieser Arbeit ist die Houghtransformation zur Erkennung der Pupillen, die weitgehend Kugeln bilden, verwendet worden. Um die Robustheit der Merkmale weiter zu erhöhen, kann die Transformation um weitere Eigenschaften erweitert werden.

Zusätzlich zu den oben verwendeten Positionen x, y potentieller Kreiszentren im Parameterraum kann in einem weiteren Akkumulator der Winkel ϕ des Gradienten gesammelt werden. Eine grobe Quantisierung ist dafür ausreichend, zusätzlich kann durch Skalierung der Speicheraufwand reduziert werden.

Als weiteres Merkmal kann nach Bestimmung der Maxima des Parameterraums die Grauwertvarianz, welche innerhalb der Pupille sehr gering ist, als Feature ausgewertet werden. Ihre Berechnung ist für Position (a, b) und Radius r im Zweidimensionalen gegeben durch:

$$\mu(r, a, b) = \frac{1}{|P|} \sum_{x,y \in P} I(x, y) \quad (4.4)$$

$$\text{Var}(r, a, b) = \frac{1}{|P|} \sum_{x,y \in P} (I(x, y) - \mu(r, a, b))^2 \quad (4.5)$$

$$\text{mit } P = \{(x, y) \in \mathbb{N}^2 \mid (x - a)^2 + (y - b)^2 \leq r^2\} \quad (4.6)$$

Sollen alle Einträge der Houghmap mit der Varianz im Umkreis r gewichtet werden, so ist eine alternative Berechnung effizienter. Wird anstelle der Menge P aus 4.6 der eingeschlossene Kubus mit Kantenlänge $r/\sqrt{2}$ verwendet, so kann die Varianz an allen n^3 Positionen mit Aufwand $O(n^3)$, also linear in der Größe der Aufnahme, bestimmt werden. Dabei kommt die Berechnung mit Hilfe der Dynamischen Programmierung zum Einsatz, welche bereits in Kapitel 2.5, Gleichung 2.8, eingeführt wurde.

4.2 Interest Point Detektor

Vor der Featureextraktion, die in den Kapiteln 4.3 und 4.4 beschrieben wird, wird ein Interest Point Detektor angewendet, um Punkte hohen erwarteten Interesses zu lokalisieren. Der in dieser Arbeit erstellte Interest Point Detektor arbeitet im Dreidimensionalen und findet unter Einbeziehung räumlicher Nachbarschaften Geraden- und Flächenstücke.

Aus der Theorie des Canny Kantendetektors kann man das Optimalitätskriterium heranziehen, um ein Filter mit gut lokalisierter Antwort auf Signalpegeländerungen zu erstellen. Ist eine ideale Kante gegeben, so kann die Suche nach einem Filter mit dieser Eigenschaft als Optimierungsproblem formuliert werden. Für sprungförmige Kantenverläufe existiert eine parameterisierte geschlossene Form der Lösung. Anstelle dieser wird aber meist als gute Approximation die erste Ableitung der Gaußfunktion verwendet:

$$G'(\sigma, \mu, x) = -\frac{x}{\sqrt{2\pi}\sigma^3} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} \quad (4.7)$$

Für die Anwendung des Filters wird das Signal zunächst tiefpassgefiltert, um stochastische Störungen zu unterdrücken. Danach können die partiellen Differenzen der Grauwertbilder gebildet werden. Dazu wird das in Gleichung 4.7 angegebene separierbare Filter

verwendet. Zur Normierung der Gradienten werden außerdem die Gradientenlängen wie in 4.10 bestimmt:

$$I' = G(\sigma) * I \quad (4.8)$$

$$\nabla I' = \left(\frac{\partial I'}{\partial x}, \frac{\partial I'}{\partial y}, \frac{\partial I'}{\partial z} \right) \quad (4.9)$$

$$M(\mathbf{p}) = \|\nabla I'(\mathbf{p})\| \quad (4.10)$$

$$N = \{\mathbf{p} \in \mathbb{N}^3 \mid M(\mathbf{p}) > \delta\} \quad (4.11)$$

Eine testweise Variation der Standardabweichung σ des Gaußfilters in Gleichung 4.8 zeigt, dass ein schmaleres Filter zur Erhaltung feiner Strukturen, aber auch zu mehr Rauschanfälligkeit führt, während ein breiteres Filter nur grobe Kantenverläufe erhält. Gute Ergebnisse konnten mit $\sigma = 2,0$ erzielt werden. Eine Diskretisierung des Filters aus Gleichung 4.7 ist durch das folgende Filter gegeben:

$$\frac{1}{12} \begin{bmatrix} 1 & -8 & 0 & 8 & -1 \end{bmatrix}$$

Die Menge N enthält die Punkte \mathbf{p} mit hohen Grauwertdifferenzen, also potentielle Geraden- oder Flächenstücke im Raum. Darauf kann nun das non-maximum-suppression Filter $nms(\mathbf{p}, d)$ angewendet werden, um die gewünschte Eigenschaft einer Antwort pro Kante herzustellen. Im Eindimensionalen ist das nms -Filter definiert wie in Gleichung 4.12:

$$nms_{1D}(\mathbf{p}, d) = \begin{cases} 1 & \text{falls } M(\mathbf{p} \pm d \cdot g(\mathbf{p})) < M(\mathbf{p}) \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (4.12)$$

$$\text{mit } g(\mathbf{p}) = \nabla I'(\mathbf{p}) / M(\mathbf{p}) \quad (4.13)$$

Es extrahiert also diejenigen Punkte p , für die die Differenzen $M(p)$ maximal sind bezogen auf die Differenzen in Abstand $\pm d$ entlang des Gradienten. Im Zweidimensionalen entsteht

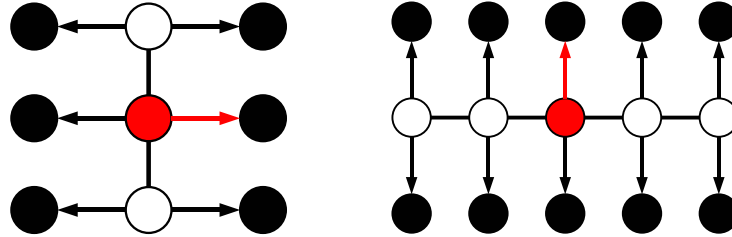


Abbildung 4.1: Links: Das non-maximum-suppression Filter in 2D entsteht durch Anwendung des nms_{1D} in Abstand d orthogonal zum Gradienten (roter Vektor). Rechts: Verschärfung der Maximalitätsbedingung an \mathbf{p} .

das Filter durch zusätzliche Anwendung des nms_{1D} auf die Positionen in Abstand d orthogonal zum Gradienten g :

$$nms_{2D}(\mathbf{p}, d) = \begin{cases} 1 & \text{falls } nms_{1D}(\mathbf{p}, d) = 1 \wedge nms_{1D}(\mathbf{p} \pm g'(\mathbf{p}), d) = 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (4.14)$$

$$\text{mit } g'(\mathbf{p}) = g(\mathbf{p}) \times g(\mathbf{p}) \quad (4.15)$$

Eine Anschauung für das nms_{2D} -Filter ist in Abbildung 4.1 links gegeben. Für 3D folgt die Definition analog durch Anwenden des nms_{2D} -Filters ebenfalls ober- und unterhalb

von \mathbf{p} . Allerdings sind die beiden Vektoren $g'(\mathbf{p})$ und $g''(\mathbf{p})$ orthogonal zu g nicht mehr eindeutig. Dies ist für die Anwendung des Filters aber auch nicht notwendig.

Die Bedingung an einen Interest Point kann weiter verschärft werden, wenn eine höhere Reichweite des Filters gewählt wird, siehe Abbildung 4.1 rechts. In 3D ist es dann sinnvoll, nicht nur in Richtung g' und g'' zu prüfen, sondern auch in den Richtungen g''' und g'''' , die durch Rotation von g' und g'' um 45° um den Vektor g entstehen. Erweitert man das Filter auf Schrittweite zwei, so ist die Bedingung 4.12 für eine praktische Anwendung zu hart. Deshalb wurde ein zusätzlicher Parameter, die Anzahl erlaubter Fehler t , eingeführt. Schlägt einer der Vergleiche fehl, so zählt dies als ein Fehler. Werden an einer Position \mathbf{p} mehr als t Fehler festgestellt, so wird der Punkt als Interest Point verworfen.

4.2.1 Interest Point Detektor basierend auf der zweiten Ableitung

Der Interest Point Detektor wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben verwendet die erste Ableitung $\nabla I'$ der Grauwertintensität als Merkmal für einen Interest Point. Für feine Strukturen, also helle und dunkle Linien anstelle von Kanten, erwartet man von der zweiten Ableitung eine bessere Antwort. Analog zur Konstruktion der Gradienten und deren Norm nach Gleichung 4.9 und 4.10 können für die zweiten partiellen Differenzen der größte Eigenwert und zugehörige Eigenvektor der Hesse-Matrix verwendet werden. Die quadratische Hesse-Matrix $H(I')$ bildet die zweiten partiellen Ableitungen der Grauwertintensität I' in allen Raumrichtungen:

$$H(I') = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 I'}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 I'}{\partial x \partial y} & \frac{\partial^2 I'}{\partial x \partial z} \\ \frac{\partial^2 I'}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 I'}{\partial y^2} & \frac{\partial^2 I'}{\partial y \partial z} \\ \frac{\partial^2 I'}{\partial z \partial x} & \frac{\partial^2 I'}{\partial z \partial y} & \frac{\partial^2 I'}{\partial z^2} \end{pmatrix} \quad (4.16)$$

Die Eigenwerte $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \lambda_3$ der Hesse-Matrix $H(I')$ können als Nullstellen des charakteristischen Polynoms wie in Gleichung 4.17 bestimmt werden. Den zugehörigen Eigenvektor v_1 zum größten Eigenwert λ_1 liefert Gleichung 4.18:

$$\det(H(I') - \lambda E) = 0 \quad (4.17)$$

$$(H(I') - \lambda_1 E)v_1 = 0 \quad (4.18)$$

Mit E ist die Einheitsmatrix bezeichnet. Damit ergibt sich N_2 als Menge der Kandidaten für eine Kante der zweiten Ableitung analog zu Gleichung 4.10:

$$M_2(\mathbf{p}) = \lambda_1(\mathbf{p}) \quad \text{mit } \lambda_1(\mathbf{p}) \text{ größter EW zu } H(I'(\mathbf{p})) \quad (4.19)$$

$$N_2 = \{\mathbf{p} \in \mathbb{N}^3 \mid M(\mathbf{p}) > \delta\} \quad (4.20)$$

Eine vergleichende Darstellung der ersten und zweiten Ableitung findet sich in Abbildung 4.2, links die Gradientenlänge, rechts der größte Eigenwert der Hesse-Matrix. Gut zu erkennen ist der Unterschied in der Feinheit der Struktur.

Nach Bestimmung der Menge N_2 , siehe Gleichung 4.19, kann das non-maximum-suppression Filter angewendet werden wie oben beschrieben. Eine Übersicht über die detektierten Interest Points wird in Kapitel 5.1 gegeben. Da die Verwendung der zweiten Ableitung jedoch keine deutliche Verbesserung gegenüber der ersten ergeben hat, ist sie hier nicht weiter zum Einsatz gekommen.

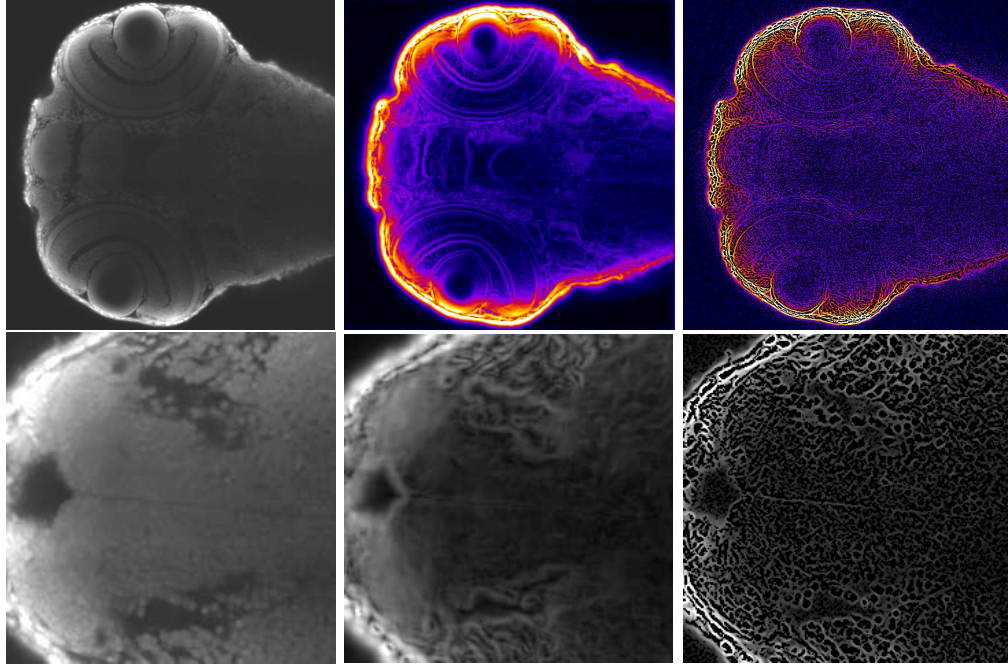


Abbildung 4.2: Linke Spalte: Zwei Schnitte aus Aufnahme e12. Mittlere Spalte: Gradientenlängen für die Schnitte. Rechte Spalte: Größte Eigenwerte der Hesse-Matrix. Deutlich sichtbar sind die feineren Strukturen in der rechten Spalte. Untere Reihe: Die mediale Linie (Bildmitte) ist eine der wenigen Strukturen, die in der zweiten Ableitung besser erkennbar sind.

4.3 Grauwertprofil-Feature

In der vorliegenden Arbeit sind zwei verschiedene Arten Feature erstellt und analysiert worden. Zunächst werden die grauwertprofilbasierten Vektoren vorgestellt, in Kapitel 4.4 folgen dann die gradientenbasierten Feature.

Eine genaue Betrachtung der verwendeten Grauwertbilder von Zebrafischen zeigt, dass viele der gefundenen Interest Points spezifische Strukturen in ihrer direkten Umgebung haben. Beispiele dafür sind die länglichen, radial ausgerichteten Zellen im Auge oder auch die fein strukturierten Neuronen im Gehirn. Als naheliegendes Feature bietet sich deshalb die direkte Verwendung der Grauwertintensität $I(\mathbf{p})$ an.

Zunächst muss dazu für jeden Interest Point \mathbf{p} eine möglichst stabile räumliche Orientierung fixiert werden. Diese kann über den Gradienten $g(\mathbf{p})$ gefunden werden. Zunächst werden die beiden (nicht eindeutigen) orthogonalen Vektoren $g'(\mathbf{p})$ und $g''(\mathbf{p})$ zum Gradienten $g(\mathbf{p})$ gebildet und auf Länge eins normiert. Diese werden dazu verwendet, ein gewichtetes Mittel der Gradienten in der direkten Umgebung zu bilden, um einen stabilen Richtungsvektor $g_d(\mathbf{p})$ zu erhalten, wie in Gleichung 4.21:

$$g_d(\mathbf{p}) = \frac{1}{a} g(\mathbf{p}) + \frac{1}{b} [g(\mathbf{p} \pm g'(\mathbf{p})) + g(\mathbf{p} \pm g''(\mathbf{p}))] \quad (4.21)$$

Als gute Wahl für a , b hat sich $a = 2$, $b = 8$ ergeben. Die Menge S bilden die Positionen entlang des Richtungsvektors $g_d(\mathbf{p})$, um welche herum jeweils Feature extrahiert werden:

$$S = \{\mathbf{p}' \in \mathbb{R}^3 \mid \mathbf{p}' = \mathbf{p} + s \cdot g_d(\mathbf{p}), \text{ für } s \in \{-t, \dots, t\}, t \in \mathbb{N}\} \quad (4.22)$$

Nun kann die gemittelte Grauwertintensität radial um Position p' bestimmt werden. Basierend auf der Vermutung, dass näher am Gradienten liegende Werte eine höhere Aussagekraft besitzen, werden die Grauwerte nach ihrem Abstand mit einer Gaußverteilung gewichtet. Für Position p' ergibt sich das Feature nach Gleichung 4.23:

$$\sum_{\substack{x,y \in \{-d, \dots, d\} \\ x^2 + y^2 < d^2}} G(\sigma, \mu, \sqrt{x^2 + y^2}) \cdot I(\mathbf{p}' + x \cdot g'(\mathbf{p}) + y \cdot g''(\mathbf{p})) \quad (4.23)$$

Der Featurevektor $FV(\mathbf{p})$ gibt für alle $2t$ Positionen $\mathbf{p}' \in S$ den gewichteten Grauwert nach 4.23 an. Er hat also Dimension $2t$ und wertet Grauwerte bis zum radialen Abstand d aus. Vor der Verwendung müssen die Grauwertprofile einer geeigneten Normierung unterzogen werden. Sinnvoll ist eine Normierung mit Mittelwert und Standardabweichung:

$$FV'(\mathbf{p}) = \frac{1}{\sqrt{\text{var}(FV(\mathbf{p}))}} [FV(\mathbf{p}) - \overline{FV(\mathbf{p})}] \quad (4.24)$$

Ergebnisse der grauwertbasierten Feature $FV'(\mathbf{p})$ unter Variation der Parameter t und d finden sich in Kapitel 5.2.

4.4 Gradientenbasierte Feature

Neben den grauwertbasierten Merkmalen sind in dieser Arbeit gradientenbasierte Feature zum Einsatz gekommen. Von ihnen erhofft man sich eine höhere Deskriptivität als von den Grauwertprofilmerkmalen, da sie im weiteren Umfeld des Interest Points spezifische Merkmale extrahieren. Da als Interest Points Kanten detektiert werden, kann man erwarten, im umliegenden Bereich um einen solchen Punkt Strukturen mit ausgeprägten Gradienten zu finden. Die grundlegende Idee des Features ist also, basierend auf der Gradientenrichtung am Interest Point umliegende Gradientenrichtungen zu quantisieren.

Am Interest Point kann nur die Gradientenrichtung als stabiler Richtungsvektor extrahiert werden, was im dreidimensionalen Raum nicht zur eindeutigen Bestimmung relativer Positionen ausreicht. Deshalb wird zur Featureextraktion immer radial um den Richtungsvektor gearbeitet, wodurch eine gewisse Invarianz gegenüber der Wahl des radialen Vektors erreicht werden kann.

Für Position \mathbf{p} wird der Gradientenfeaturevektor wie folgt berechnet. Zunächst wird analog zu Gleichung 4.21 der Richtungsvektor $g_d(\mathbf{p})$ als gewichtetes Mittel der Gradienten in der direkten Umgebung gebildet:

$$g_d(\mathbf{p}) = \frac{1}{a} g(\mathbf{p}) + \frac{1}{b} [g(\mathbf{p} \pm g'(\mathbf{p})) + g(\mathbf{p} \pm g''(\mathbf{p}))] \quad (4.25)$$

$$r \in \mathbb{R}^3, \quad \langle r, g_d(\mathbf{p}) \rangle = 0 \quad (4.26)$$

Da sich der Richtungsvektor damit geändert hat, wird zu $g_d(\mathbf{p})$ erneut ein (beliebiger) orthogonaler Vektor r bestimmt. Dieser wird später verwendet, um ringförmig um den Richtungsvektor $g_d(\mathbf{p})$ herum Punkte zu selektieren. Nun wird, ebenfalls analog zu Kapitel 4.3, die Menge S der Positionen entlang des Richtungsvektors $g_d(\mathbf{p})$, um welche herum nun jeweils Feature extrahiert werden, definiert. Um unnötige Verkomplizierung zu vermeiden, wird die Grenze $t = -10, 10$ hier direkt fixiert:

$$S = \{\mathbf{p}' \in \mathbb{N}^3 \mid \mathbf{p}' = \mathbf{p} + t \cdot g_d(\mathbf{p}), \text{ für } t = -10, \dots, 10\} \quad (4.27)$$

Über r können nun um Position $\mathbf{p}' \in S$ herum in aufsteigendem Abstand $d \in \{1, 2, 3, 4\}$ Ringe gebildet werden, auf denen sich die Gradienten von Interesse befinden. Für jeden

solchen Ring soll ein Gradientenrichtungshistogramm $H(\mathbf{p}', d)$ gebildet werden. Dazu wird jeder Ring in $k_d \in \{4, 8, 8, 16\}$ äquidistante Winkelschritte unterteilt. Sei nun ein bestimmter Abstand d fixiert, so wird für jede der k_d Positionen auf dem Ring der Gradient h ermittelt¹. Dann kann die Projektion von h auf $g_d(\mathbf{p})$ und auf r im Histogramm $H(\mathbf{p}', d)$ akkumuliert werden. Abbildung 4.3 veranschaulicht die Vorgehensweise. Das Hi-

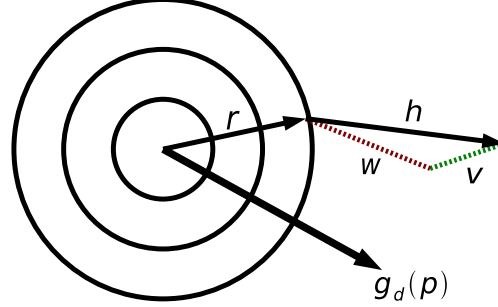


Abbildung 4.3: Entlang des Richtungsvektors $g_d(\mathbf{p})$ werden ringförmig die Projektionen der Gradienten auf $g_d(\mathbf{p})$ (rot) und auf r (grün) als Histogramm aufsummiert.

stogramm $H(\mathbf{p}', d)$ umfasst vier Bins, jeweils zwei für die Projektionen v und w . In diesen werden kollineare beziehungsweise antilineare Projektionen getrennt akkumuliert.

$$v = \langle r, h \rangle \quad (4.28)$$

$$w = \langle g_d(p), h \rangle \quad (4.29)$$

Anschließend muss das Histogramm auf eins normiert werden, um invariant gegenüber den tatsächlichen Gradientenlängen zu sein. Der Featurevektor $FV(\mathbf{p})$ an Position \mathbf{p} wird gebildet durch Aneinanderhängen der Histogramme $H(\mathbf{p}', d)$ für alle Parameter \mathbf{p}' , d . Sind $t \in \{-10, \dots, 10\}$ und $d \in \{1, 2, 3, 4\}$ wie oben angegeben so ergibt sich ein Featurevektor der Dimension 20×4 mal der Histogrammgröße 4, also 320-dimensional.

Eine erste Analyse der gradientenbasierten Merkmale auf den gegebenen Zebrafisch-Daten hat bisher nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen geführt. Ähnliche Ansätze sind jedoch auf Pollendaten schon erfolgreich angewendet worden, weshalb eine extensivere Untersuchung der Parameter und des Histogramm-Binnings vorgenommen werden sollte.

4.5 Verwendung relativer Bezugsinformation

Wie sich nach Analyse der Feature aus Kapitel 4.3 und 4.4 zeigt, ist die Verwendung reiner Featureinformation für eine Registrierung nicht ausreichend. Deshalb wurde die Verwendung relativer Bezugspunkte im Organismus als grundlegende Theorie der weiteren Vorgehensweise entwickelt. Über die in Kapitel 3.5 eingeführte Vorregistrierung ist die Bestimmung eines Fixpunktes FP und einer stabilen Achse $\mathbf{e}_2 - \mathbf{e}_1$ für jede Aufnahme möglich. Damit lassen sich relative Informationen für einen Interest Point \mathbf{p} wie folgt bilden:

$$d = \frac{\|\mathbf{p} - FP\|}{\|\mathbf{e}_2 - \mathbf{e}_1\|} \quad (4.30)$$

$$\alpha = \arccos \frac{\langle \mathbf{e}_2 - \mathbf{e}_1, \mathbf{p} - FP \rangle}{\|\mathbf{e}_2 - \mathbf{e}_1\| \cdot \|\mathbf{p} - FP\|} \quad (4.31)$$

¹Da die Gradienten nur für diskrete Positionen im Raum bestimmt sind, wird für Zwischenpositionen tridiagonal interpoliert.

Die Distanz d zum Fixpunkt und der Winkel α zur Augenachse $\mathbf{e}_2 - \mathbf{e}_1$ werden normiert mit der Distanz $\|\mathbf{e}_2 - \mathbf{e}_1\|$ der Augen, um höhere Invarianz gegenüber lateraler Deformation zu erreichen.

Das Tupel d, α kann als weiteres Feature an die Vektoren angehängt werden. Eine Verbesserung der Featurelokalisation durch Extraktion noch weiterer relativer Bezugsinformationen ist denkbar, im Rahmen dieser Arbeit aber nicht untersucht worden. Die hier beschriebene Verwendung von relativer Bezugsinformation hat die Registrierung der Merkmale deutlich verbessert, eine entsprechende Analyse findet sich in Kapitel 5.2.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 Ergebnisse des Interest Point Detektors

5.1.1 Ergebnisse auf Gradienten der ersten Ableitung

Der Interest Point Detektor bietet als variable Parameter die Schrittweite d und die erlaubte Anzahl Fehler t für einen Interest Point-Kandidaten. Im Folgenden werden die Variationen der Parameter kurz skizziert, und die erwarteten Auswirkungen auf das Verhalten des Detektors dargelegt. Dabei wird besonderes Augenmerk auf spezifische Regionen des Zebrafischs gelegt, im besonderen auf die Augen im allgemeinen, auf die Auglinse, auf den Sehnerv und auf die Ohren. Die folgenden Abbildungen wurden auf Zebrafisch Aufnahme e12 (siehe Anhang) gewonnen, sind aber übertragbar auf alle weiteren Individuen.

Abbildung 5.1 zeigt das Ergebnis des non-maximum-suppression Interest Point Detektors mit einer Schrittweite von zwei, erlaubte Fehler zwei. Dies sind die Einstellungen die die besten Ergebnisse liefern, und im späteren Verlauf der Arbeit dauerhaft eingesetzt wurden.

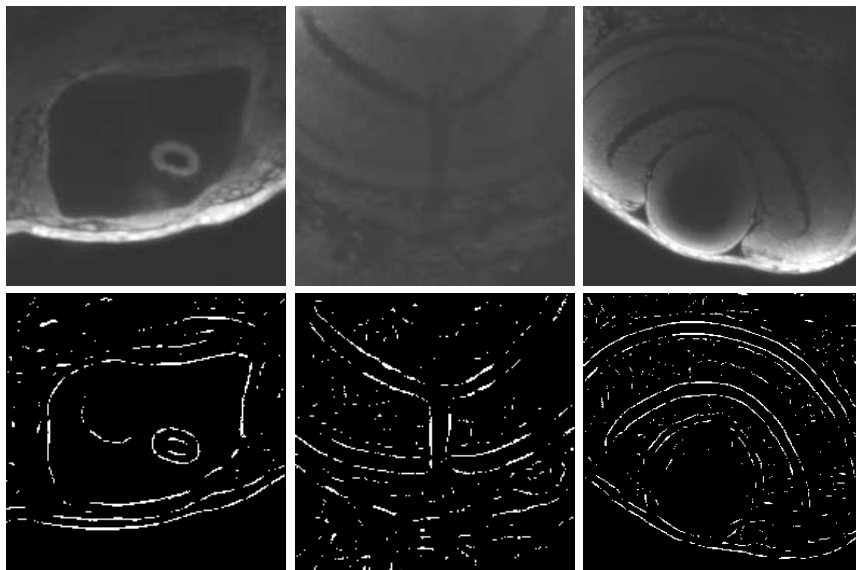


Abbildung 5.1: Interest Points detektiert mit Schrittweite zwei, Fehler zwei. Es werden feine, teils unterbrochene Flächen und Linien an allen wichtigen Strukturen gefunden. Dies ist das gewünschte Resultat der Interest Point Detektion.



Abbildung 5.2: Bei Erhöhung der erlaubten Fehler auf vier (Schrittweite zwei) werden Strukturen stärker, es treten aber auch Doppeldetektionen von stark ausgeprägten Flächen wie der Augenränder auf.



Abbildung 5.3: Links und mitte: Mit erlaubter Fehlerzahl acht wirken die Strukturen übersättigt, Flächen werden teils mehrfach detektiert, es werden zu viele Interest Points gefunden. Rechts: Wird die erlaubte Fehlerzahl auf eins gesenkt, genügen nur noch wenige Punkte der Filterbedingung.

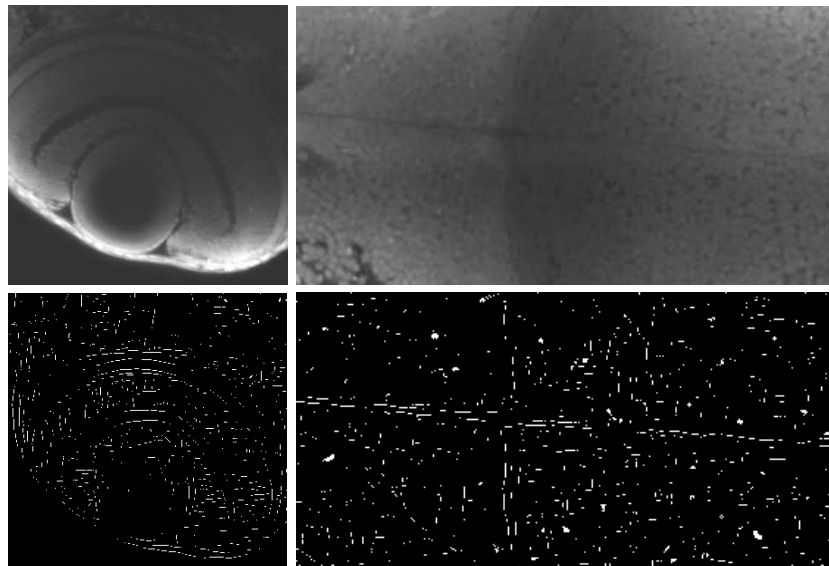


Abbildung 5.4: Wird die Schrittweite auf eins reduziert (Fehler vier), so selektiert das Filter Flächenstücke mit geringer Krümmung. Dies ist für viele der Strukturen nicht wünschenswert. Für die mediale Linie (rechts, Bildmitte), so liefert es jedoch eine gute Antwort.

5.1.2 Ergebnisse auf Eigenwerten zweiter Ableitung

Die Interest Points, die mit dem *nms* Filter auf der Menge $N_2(p)$ der größten Eigenwerte der zweiten Ableitung detektiert werden, haben im allgemeinen die Tendenz sich an feinere Strukturen anzulagern. Dabei gehen teilweise aussagekräftige gröbere Strukturen verloren, weshalb sich die auf der zweiten Ableitung bestimmten Interest Points in erster Linie als Ergänzung der in Abschnitt 5.1.2 bestimmten Punkten auf der ersten Ableitung anbieten.

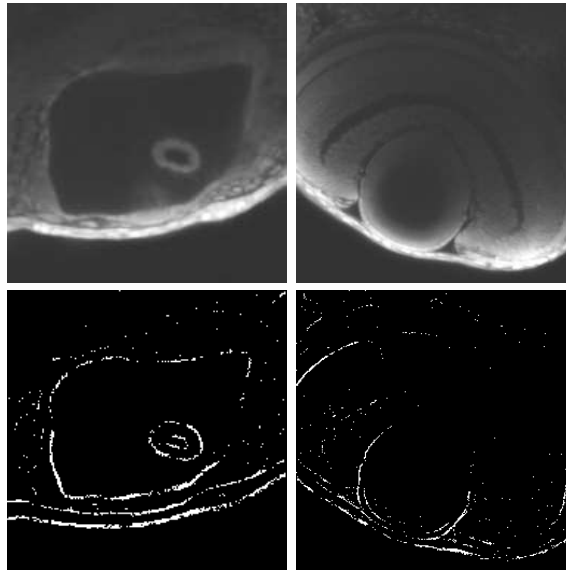


Abbildung 5.5: Interest Points auf der zweiten Ableitung bilden feinere, oft vereinzelte Strukturen.

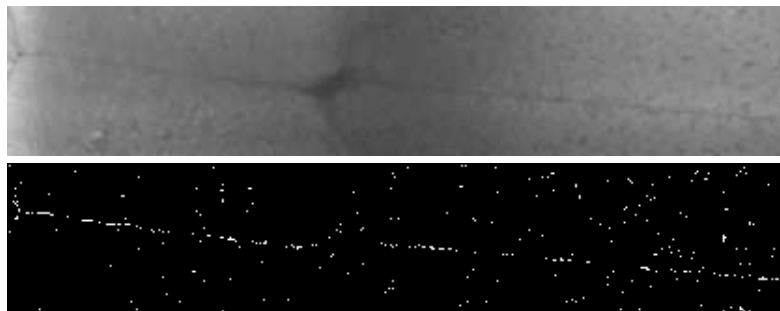


Abbildung 5.6: Die Lokalisation feiner Strukturen wie der medialen Linie (horizontal in der Bildmitte) gelingt gut mit dem Interest Point Detektor basierend auf der zweiten Ableitung.

5.1.3 Detektion von Trennflächen

Ein wichtiges Ziel in der Auswertung der Zebrafisch-Daten ist die Segmentierung des Organismus in getrennte Bereiche, in denen die Expression bestimmter Gene lokalisiert ist. Dabei ist zu beachten, dass die Strukturen innerhalb des Organismus zwar häufig Trennflächen bilden, welche die Struktur aber nicht unbedingt in allen Raumrichtungen

umschließen. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 5.8 gegeben. Für die Registrierung ist deshalb eine wichtige Voraussetzung die robuste Detektion von Trennflächen durch den Interest Point Detektor.

Abbildung 5.7 zeigt einen Schnitt aus einer räumlichen Interest Point Detektion (rechts) neben dem Grauwertbild (links). Darunter die von Experten beschrifteten Abbildung aus dem Zebrafischatlas nach [3].

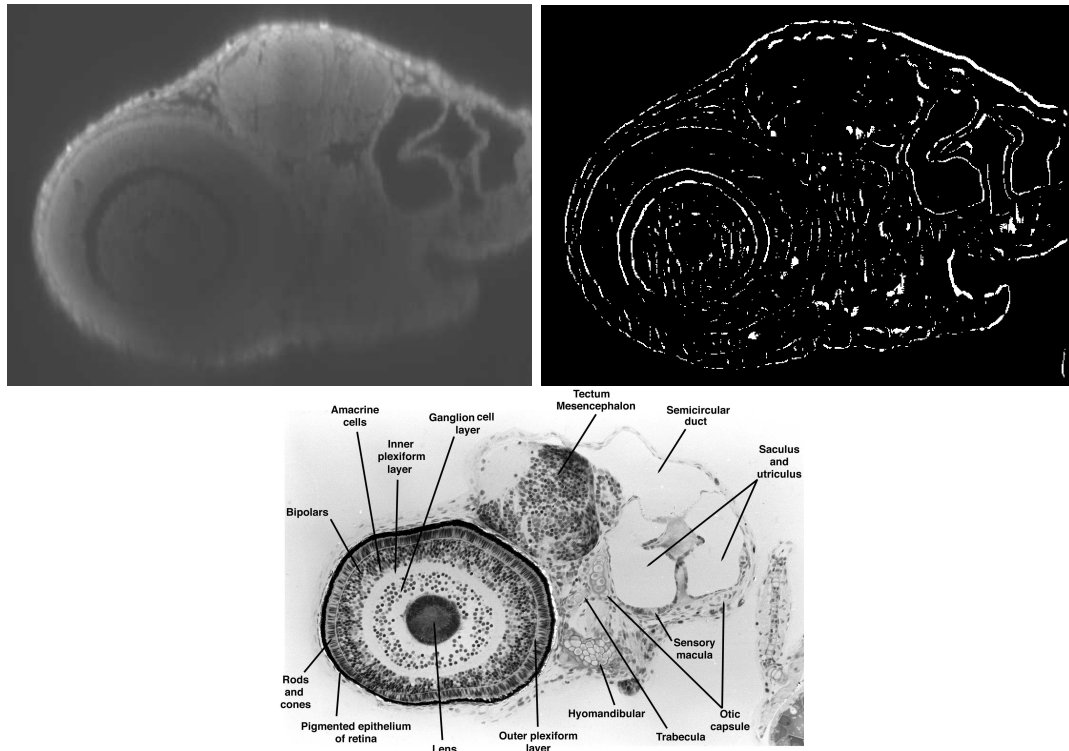


Abbildung 5.7: Oben Links: Schnitt entlang der x - z -Ebene durch Zebrafisch-Aufnahme e12. Oben Rechts: in dieser Ebene detektierte Interest Points. Unten: Abbildung aus dem Zebrafisch-Atlas nach [3], mit Beschriftung.

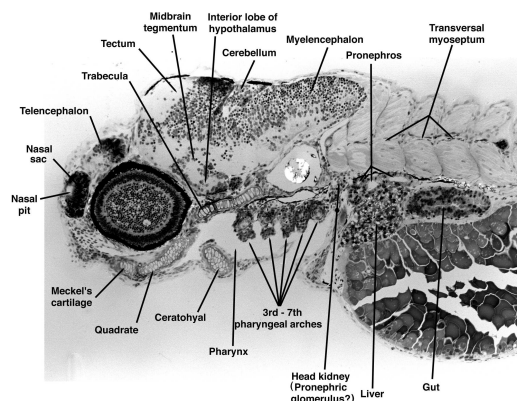


Abbildung 5.8: Ein Beispiel für räumliche Trennflächen, die den abgegrenzten Bereich jedoch nicht einschließen, ist die Trennung von Cerebellum und Myelencephalon (oben Mitte).

5.2 Auswertung der Grauwert-Merkmale

Die Korrespondenzsuche wurde vorwiegend auf aussagekräftige Teilbereiche des Datensatzes konzentriert, um eine leichtere visuelle Kontrolle zu ermöglichen. Die nachfolgenden Beispiele zeigen die Korrespondenzen eines sphärischen Ausschnitts im Datensatz e12 zu verschiedenen anderen Datensätzen. Abbildung 5.9 zeigt einen Schnitt um die Nasenregion von Datensatz e12.

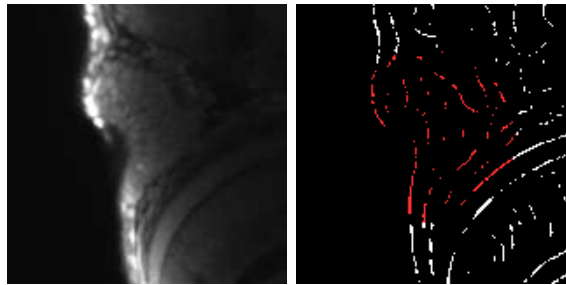


Abbildung 5.9: Linke Nasenregion des Zebrafisch e12. Links: Grauwertintensität. Rechts: Detektierte Interest Points. Rot eingefärbt sind die Positionen, an denen Feature für die Korrespondenzsuche entnommen wurden.

Zunächst sollen die Merkmale, die nach Abschnitt 4.5 um relative Bezugsinformationen erweitert wurden, mit denen ohne diese Erweiterung verglichen werden. Für die Detektion korrespondierender Positionen liefern die Merkmale mit relativer Bezugsinformation wesentlich bessere Ergebnisse, wie in Abbildung 5.10 zu sehen ist. Dies liegt unter anderem am symmetrischen Aufbau des Organismus, wodurch für viele Strukturen eine äquivalente zweite Position existiert.

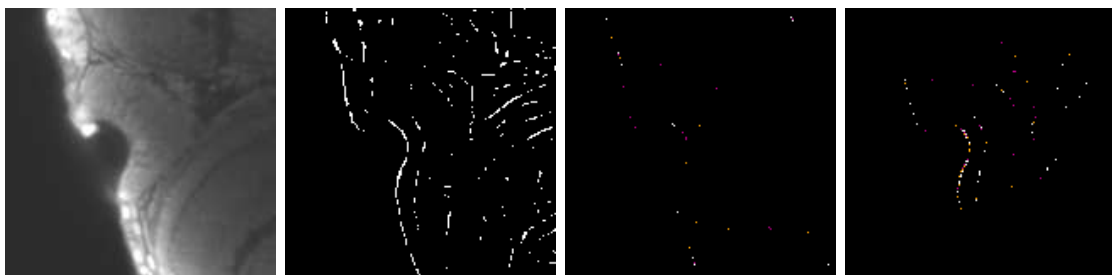


Abbildung 5.10: Korrespondenzsuche der Nasenregion aus Datensatz e12 gegen Datensatz e11 mit Featurevektoren der Dimension 12. 1. von links: Grauwertbild. 2. von links: Interest Points in dieser Region. 3. von links: Merkmale ohne relative Bezugsinformation. 4. von links: Merkmale mit relativer Bezugsinformation.

Kürzere Featurevektoren haben im allgemeinen zu besseren Ergebnissen geführt als längere, wobei für $t = 12$ das Optimum bei den grauwertbasierten Merkmalen bestimmt wurde. Für die nicht-starre Registrierung ist dies eine wesentliche Grundlage, um den Einfluss von Unterschieden im Gewebe zwischen Individuen zu minimieren. Abbildung 5.11 zeigt die Korrespondenzen von Abbildung 5.10, diesmal mit Vektoren der Länge $t = 20$.

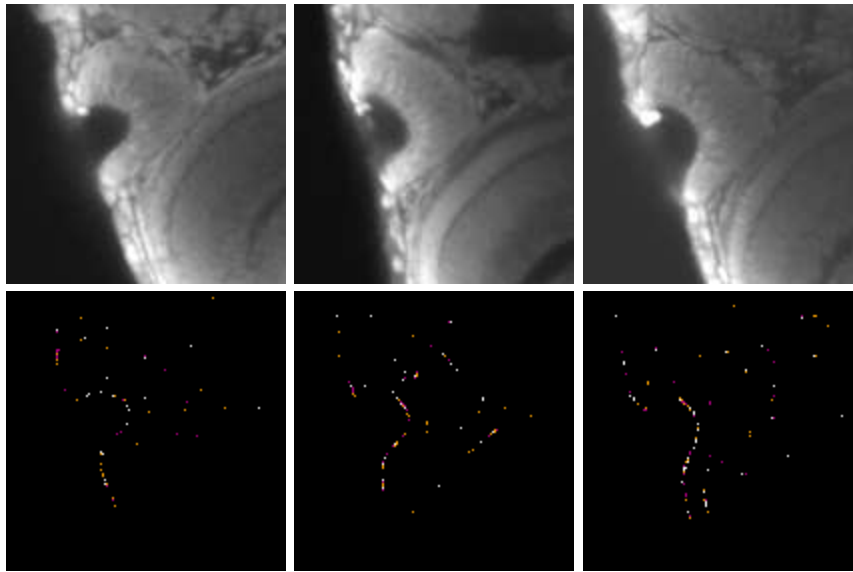


Abbildung 5.11: Längere Feature, hier der Dimension 20, liefern im allgemeinen geringfügig schlechtere Ergebnisse. Dargestellt sind (v.l.n.r.) Datensatz e8, e10 und e11, Korrespondenzsuche gegen Nasenregion von e12, Feature mit relativer Bezugsinformation.

Eine als schwer zu klassifizierend einzustufende Struktur ist der Augennerv, da er wenig Fläche bietet, und im Grauwertprofil dem Rand der Augen ähnelt. Abbildung 5.12 zeigt die Korrespondenzsuche des Datensatzes e12 in dieser Region gegen Datensätze e8, e10 und e11, mit Merkmalen der Dimension 12. Die Struktur des Nervenkanals ist in allen Abbildungen wieder erkennbar.

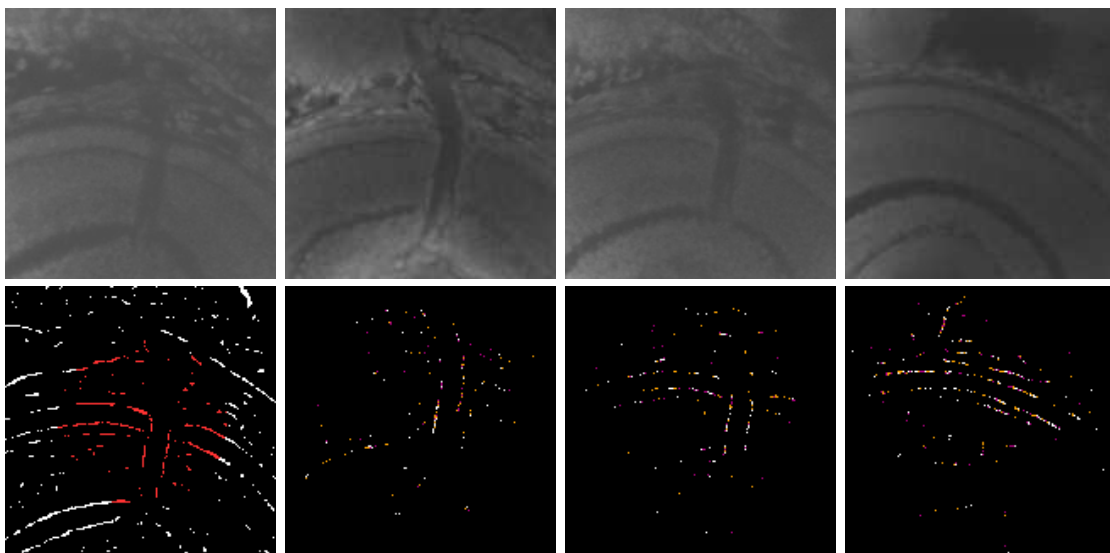


Abbildung 5.12: Region um den oberen Rand des linken Auges von e12 (1. von links). Registriert gegen (v.l.n.r) e8, e11 und e10. Für e10 ist eine tiefer liegende Schicht abgebildet, um die Detektion umliegender Bereiche ebenfalls darzustellen.

Um die Verteilung der Featurevektoren im Merkmalsraum anschaulich darzulegen, wurde ein K-Means-Clustering mit verschiedenen Klustergrößen erstellt. In Abbildung 5.13 ist ein Schnitt durch das farblich hervorgehobene Clustering mit 5 Clustern der Grauwertmerkmale ohne relative Bezugsinformation dargestellt. Gesuchte Strukturen wie das innere Plexiform im Auge (rot) bilden dabei Cluster wie erhofft.

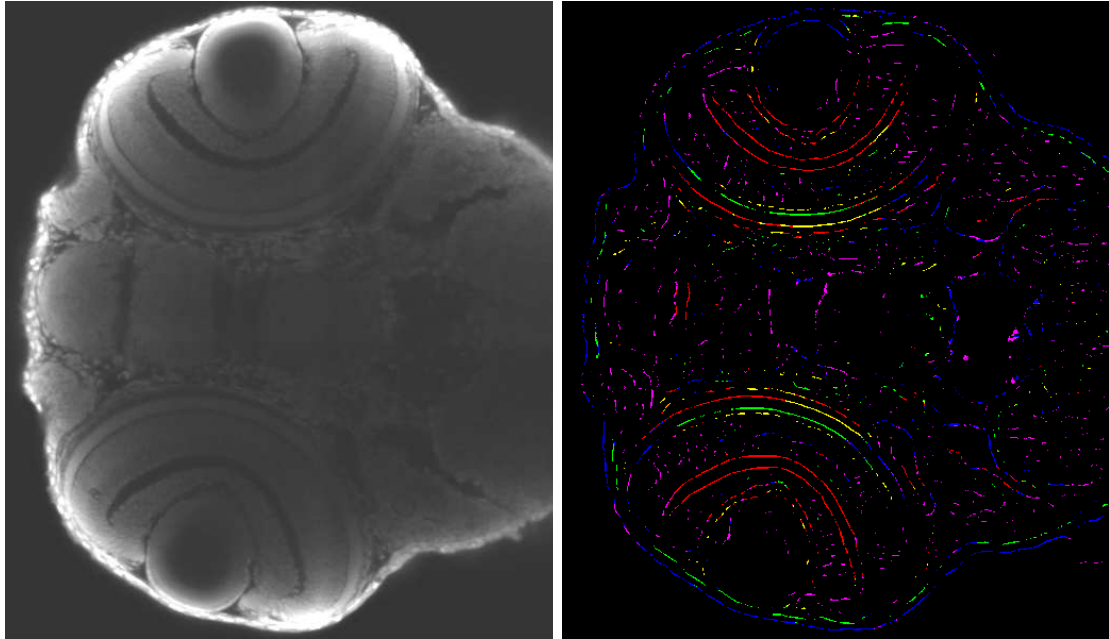


Abbildung 5.13: Rechts: K-Means-clustering der grauwertbasierten Merkmale in fünf Cluster, welche farblich hervorgehoben sind. Links: Grauwertbild des Schnitts.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnten etablierte Methoden der Bildverarbeitung und Bildvorverarbeitung angewendet werden, um dreidimensionale Bildstapel hoher Güte von Zebrafischen zu erstellen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Vorverarbeitung gelegt, um eine dauerhafte Grundlage für die Erstellung eines Genexpressionsatlas zu schaffen. Sowohl die Aufnahmetechnik als auch die biologischen Verfahren zur Genexpressionsfärbung wurden dazu genauer analysiert. Die gewonnenen Erkenntnisse konnten zur Erstellung automatisierter Verfahren der Bildvorverarbeitung genutzt werden, welche robust gegen viele der auftretenden Probleme sind. Die erstellten Programme und Verfahren wurden zusätzlich erfolgreich auf weitere biologische Datensätze angewendet, und es besteht aktives Interesse von Seiten des Biologischen Instituts und deren Kooperationspartner, diese in weiteren Bereichen einzusetzen. Ebenfalls hat Zeiss Jena Interesse an der Umsetzung der Verfahren bekundet.

Es wurden im Weiteren Merkmale zur Lokalisation von Teilbereichen (der Augen) extrahiert. Darauf aufbauend wurde eine Vorregistrierung der Individuen vorgenommen. Die dabei gewonnene Information konnte in der Vorverarbeitung zur Kombination mehrerer Aufnahmen desselben Individuums genutzt werden. Sie wurde zusätzlich erfolgreich als Merkmal in die Registrierung aufgenommen.

Zwei Variationen eines weiterentwickelten Verfahrens zur Selektion von Interest Points wurden angewendet, um Punkte hoher Deskriptivität zu lokalisieren. Der dabei erstellte Interest Point Detektor ist besonders geeignet, die gesuchten Trennflächen im Organismus zu selektieren. Anhand der bestimmten Interest Points konnten zwei Typen lokaler Merkmale, grauwertbasierte und gradientenbasierte, extrahiert und analysiert werden.

Die untersuchten Grauwertprofil- und Gradienten-Feature sind für eine allgemeine Registrierung mehrerer Individuen gegeneinander bisher nicht ausreichend. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die zusätzliche Verwendung relativer Beziehungen der Feature untereinander die Qualität der Ergebnisse wesentlich erhöht. Daraus lassen sich nützliche Schlüsse für die weitere Vorgehensweise gewinnen. Bei weiterer Verwendung von relativen Merkmalsbeziehungen bieten die erstellten Merkmale einen vielversprechenden Ansatz für die nicht-starre Registrierung. Damit konnte in dieser Arbeit ein wichtiger Grundstein für die Erstellung des Zebrafischatlas gelegt werden.

Kapitel 7

Verwendete Software

Dies ist eine vollständige Liste der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Software. Alle Programme und Bibliotheken sind frei verfügbar und können auf den angegebenen Seiten bezogen werden. Die folgenden Beschreibungen sind den jeweiligen Paketen großteils unverändert entnommen worden.

7.1 ImageJ

ImageJ ist ein public domain Java Bildbearbeitungs-Programm, das in einer Java Virtual Machine 1.4 oder neuer auf einer Vielzahl verschiedener Plattformen läuft, unter anderem auf Windows, Mac OS, Mac OS X und Linux. Es beherrscht einige verschiedene Dateiformate und Farbtiefen, kann mit Bildstapeln umgehen und ist sehr leicht durch Plugins zu erweitern. Zusätzlich stehen bereits viele Plugins aus der medizinischen und biologischen Bildverarbeitung für ImageJ zur Verfügung.

Version: Verwendet wurde Version 1.37 in Kombination mit Java 1.6.0.

Bezugsquelle: Frei verfügbar unter <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

7.2 ITK

ITK ist das medizinische "Insight Segmentation and Registration Toolkit", entwickelt an der Nationalbibliothek der USA. Es ist eine Open-Source-Software, die zur Unterstützung des Visible Human Projects entwickelt wird. Zur eigentlichen Bibliothek steht das Insight-Toolkit zur Verfügung, das aus einer Sammlung verschiedener einzelner Tools besteht. Verwendet wurde Insight-Snap, ein Programm zur Segmentierung von Volumendaten.

Version: Verwendet wurde Version 3.0 vom 13.11.2006.

Bezugsquelle: Frei verfügbar unter <http://www.itk.org/>

7.3 gsl

Die Gnu Scientific Library ist eine numerische Bibliothek für C- und C++-Programmierer. Sie ist als freie Software unter der GNU General Public License freigegeben. Die Bibliothek enthält einen breitgefächerten Satz an mathematischen Funktionen, von denen in dieser Arbeit vor allem die Eigenwert- und Eigenvektorerlegung sowie die Bestimmung der Pseudo-Inversen Matrix verwendet wurden.

Version: Verwendet wurde Version 1.7 vom 14.09.2005.

Bezugsquelle: Frei verfügbar unter <http://www.gnu.org/software/gsl/>

7.4 NetCDF

NetCDF, die "network Common Data Form", ist eine Sammlung von frei verfügbaren Software-Bibliotheken und maschinenunabhängigen Datenformaten, die die Erstellung und den Zugriff auf beziehungsweise die Verteilung von array-orientierter wissenschaftlicher Daten unterstützen. Für NetCDF stehen Schnittstellen nach C, Fortran, C++, Java und anderen Sprachen zur Verfügung.

Für ImageJ wurde außerdem im Rahmen dieser Arbeit ein Plugin zum Lesen und Schreiben von NetCDF-Dateien weiterentwickelt, welches auf den Webseiten des Lehrstuhls für Mustererkennung und Bildverarbeitung an der Universität Freiburg unter

<http://lmb.informatik.uni-freiburg.de/lmbsoft/index.en.html> frei verfügbar ist.

Version: Verwendet wurde Version 3.6.2 vom 05.03.2007

Bezugsquelle: <http://www.unidata.ucar.edu/software/netcdf/>

7.5 blitz++

Blitz++ ist eine C++-Klassenbibliothek für wissenschaftliche Berechnungen, die Datenstrukturen und Funktionen mit sehr hoher Zugriffs-Performance bietet (in etwa vergleichbar mit Fortran 77/90). Dazu werden Template-Techniken eingesetzt. Zu den Datenstrukturen gehören Arrays, Vektoren und kleine Matrizen. Darauf sind verschiedene grundlegende und auch weiterführende Rechenoperationen definiert.

Version: Verwendet wurde Version 0.9 vom 14.11.2005.

Bezugsquelle: <http://www.oonumerics.org/blitz/>

Literaturverzeichnis

- [1] Burkhardt, H., Grundlagen der Bilderzeugung und Bildanalyse. Vorlesung am Institut für Informatik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- [2] Burkhardt, H., Algorithmen zur Digitalen Bildverarbeitung. Vorlesung am Institut für Informatik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- [3] Sprague, J., Bayraktaroglu, L., Clements, D., Conlin, T., Fashena, D., Frazer, K., Haendel, M., Howe, D., Mani, P., Ramachandran, S., Schaper, K., Segerdell, E., Song, P., Sprunger, B., Taylor, S., Van Slyke, C., and Westerfield, M. (2006) The Zebrafish Information Network: the zebrafish model organism database. *Nucl. Acids Res.* **34**, D581-D585.
- [4] Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Malicki, J., Stemple, D.L., Stainier, D.Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., and Boggs, C. (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123**: 37-46.
- [5] Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. and Singer, F. (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* **291**, 293-296.
- [6] Bird, N.C., Mabee, P.M. (2003) Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). *Developmental Dynamics* **228**, 337-357.
- [7] Eisen, J. (2003) *for Developmental Dynamics* **228**, 299-300.
- [8] Trevarrow, B., Robison B. (2004) Genetic backgrounds, standard lines, and husbandry of zebrafish. *Methods Cell Biol.* **77**:599-616
- [9] Geisler, R., (2004) ZF-MODELS - Zebrafish Models for Human Development and Disease. Max-Planck-Institute for Developmental Biology. <http://www.zf-models.org/>
- [10] Wellcome Trust Sanger Institute. (2007) The *Danio rerio* Sequencing Project. http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/
- [11] Trans-NIH Zebrafish Initiative. (1997) US National Institutes of Health. <http://www.nih.gov/science/models/zebrafish/>
- [12] Westerfield, M. (2000) *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
- [13] The National Human Genome Research Institute. (2007) US National Institutes of Health. <http://www.genome.gov/>

- [14] Wilhelm, S., Gröbler, B., Gluch, M., Heinz, H. (2003) Confocal Laser Scanning Microscopy - Principles. Carl Zeiss Jena GmbH.
- [15] Ronneberger, O. (1998) Messung aller drei Geschwindigkeitskomponenten mit Hilfe der "Particle Image Velocimetry" mittels einer Kamera und zweier paralleler Lichtschnitte. Forschungsbericht DLR-FB 98-40, ISSN 1434-8454, Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt.
- [16] Østerby, O. (2000) The SVD and Linear Equations. Department of Computer Science, University of Aarhus. DAIMI.
- [17] Hough, P. V. C. (1962) Method and means for recognising complex patterns. Technical report, U.S. Patent No. 3069654.
- [18] Duda, R. O., Hart, P. E. (1972) Use of the Hough Transformation to detect lines and curves in pictures. Communications of the ACM, pp. 11-15, Vol 15, No. 1.
- [19] Kimme, C., Ballard, D. H., and Slansky, J. (1975) Finding circles by an array of accumulators. Communications of the ACM, pp. 120-122, Vol. 18, No. 2.
- [20] Ballard, D. H. (1981) Generalizing the Hough transform to detect arbitrary shapes. Pattern Recognition, 13(2):111-122.
- [21] Lladós, J., (2003) The hough transform as a tool for image analysis. Computer Vision Center - Dept. Informàtica, Universitat Autònoma de Barcelona.
- [22] Trucco, E., Verri, A. (1998) Introductory Techniques for 3-D Computer Vision. Prentice Hall.
- [23] Burkhardt, H., (1999) Bildverarbeitungspraktikum I und II. Veranstaltung am Institut für Informatik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Zebrafisch (<i>Dario rerio</i>)	12
2.1	In-situ Hybridisierung bei 72 HPF Zebrafisch. Links: Das grün gefärbte Gen ist <i>dlx2</i> . Rot eingefärbt (Mitte) ist das Protein Tyrosin Hydroxylase. Rechts: die Kombination im Durchlichtkanal DIC.	13
2.2	Zwei Aufnahmen aus dem Zebrafisch-Atlas aus [3], mit 72 Stunden HPF Embryos. Links: Koronaler Schnitt durch den Kopf. Rechts: Medialer Schnitt (leicht schräg) durch den Körper.	14
2.3	Absorptions-Spektrum (rot, peak bei 642nm) und Emissions-Spektrum (grün, peak bei 660nm) des Fluoreszenz-Markers TOTO-3 nach Bindung an Nukleinsäure, aufgetragen über der Wellenlänge (nm). Der Stokes-Shift beträgt 18nm.	16
2.4	Links: Schematischer Strahlengang im konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Rechts: Laserlicht mit Fokus in der optischen Ebene bildet im Idealfall einen Doppelkegel.	17
2.5	Ideale Punktbildfunktion. Links: Schnitt durch die x/y-Ebene, Mitte: Schnitt durch die x/z-Ebene. Rechts: Farbskala. Nach [14].	18
2.6	Korrelation zweier Bilder A und B unterschiedlicher Dimension, hier im 2D-Fall. Bild B wird bis zur Größe von A mit Nullen aufgefüllt, und unter allen (auch den zyklischen) Verschiebungen mit A korreliert.	20
3.1	Obere Reihe: Schnitt aus einem Bildstapel, linke obere Aufnahme position, mit den drei Laserintensitäten 1, 5 und 9. Überbelichtete Bildpunkte, also solche der Intensität 255, sind rot eingefärbt. Untere Reihe: Die HDR-Rekonstruktion mit zugehörigem Histogramm.	24
3.2	Mapping der Grauwerte von drei unterschiedlich belichteten Aufnahmen. Links: Kanal 0 auf 1, entsprechend der Laserintensität 1 auf 5. Rechts: Kanal 1 auf 2, entsprechend Laserintensität 5 auf 9.	26
3.3	Links: Poisson-Verteilungen mit Erwartungswert $\lambda = 1$, $\lambda = 6$ und $\lambda = 12$. Rechts: Cooccurrence-Matrix der Grauwerte, aufgetragen über dem mittleren Grauwert.	28
3.4	Grauwertvarianz aufgetragen über dem jeweiligen Grauwert, bei zwei verschiedenen Laserintensitäten. Links: Mittlere Intensität 5. Rechts: Höchste Intensität 9. Nicht dargestellt ist der äquivalente Graph für die niedrigste Intensität 1.	29
3.5	Aufsteigend sortierte Verschiebungsvektoren der Stapel t_2 gegen t_3 , aus Aufnahme e_{12} . Der längere gerade Abschnitt im mittleren Bereich enthält auch den Median $V_{23} = (-460; 0; 1)$	32

3.6	Schematische Darstellung von vier Bildstapeln. Die Position im Raum wird hier in 2D angedeutet. Überlappen alle Stapel, so entsteht ein vollständiger Graph mit $n(n - 1)/2$ gerichteten Kanten.	32
3.7	Links: Verschiebungen der Korrelationsfenster als Vektoren, eingezeichnet für die Bildstapel t_0 und t_1 , mit Grauwert proportional zum Korrelationskoeffizient. Rechts: "Hartes" Stitching in verschiedenen Farbkanälen. Dabei werden nicht perfekt passende Stellen als farbiger Schimmer erkennbar. . .	33
3.8	Häufig vorkommende zweidimensionale Verzeichnungen sind kissenförmige (links) und tonnenförmige (rechts) Verzeichnungen.	34
3.9	Schematische Darstellung von Verschiebungsvektoren mit tonnenförmiger Verzeichnung (links) und gemittelter Komponente (rechts).	34
3.10	Gehirnzellen von Mäuseembryonen, aufgenommen mit einem 63x Objektiv. Rechts: Vergrößerte Darstellung aus dem linken, mittleren und dem rechten Teil. Deutlich sichtbar ist die Verzeichnung um mehr als zwei Pixel.	35
3.11	Links: Überlappender Bereich zweier Bildstapel in gelb, mit eingezeichnetem Grenzbereich zu i (türkis) und j (dunkelgrün). Rechts: Distanztransformation D und resultierende Gewichtung F für Stapel i	36
3.12	Sigmoid-Funktion σ (rot) mit Variation von Nulldurchgang (grün) und Steigung (blau und pink).	36
3.13	Rekombination zweier Bildstapel durch "hartes" Stitching. Links: Stapel t_0 auf t_3 . Rechts: Stapel t_3 auf t_4 mit farblicher Hervorhebung der Grauwertintensität.	37
3.14	Grenzbereich zwischen zwei überlappenden Bildstapeln. Eingezeichnet ist der gemittelte Grauwert des linken Stapels (rot) und des rechten Stapels (grün). In Blau dazu der Grauwert nach der Korrektur. Der mittlere Faktor beträgt $f = 1,29$	38
3.15	1. von links: Faktoren von t_0 nach t_1 . 2. von links: Die Stapel ohne Ausbleichkorrektur zusammengesetzt. 3. von links: Mit Ausbleichkorrektur. Rechts: Extrapolation der Faktoren durch Mittelung über die Nachbarwerte (hier 2D).	38
3.16	Die Bildstapel aus Abbildung 3.13 nun mit Ausbleichkorrektur. Links Stapel t_0 auf t_3 , rechts Stapel t_3 auf t_4 mit farblicher Hervorhebung.	39
3.17	Korrelationskoeffizienten vor (rot) und nach Ausbleichkorrektur (grün). Mit kleinerer Fenstergröße der Korrelation wird die Differenz geringer. . .	40
3.18	Ausschnitte aus rekombinierten Abbildungen von Gehirnzellen von Mäuseembryonen. Kanal 0 wurde grün, Kanal 1 rot eingefärbt.	40
3.19	Rekombination von Gehirnzellen von Mäuseembryonen, Gesamtaufnahme bestehend aus 3×6 Einzelstapeln. Links: Ohne Ausbleichkorrektur. Rechts: mit Korrektur.	41
3.20	Links: Aus dem erwarteten Fehler der Houghtransformation lässt sich der Winkel α berechnen. Rechts: Das Koordinatensystem wird so in den Fixpunkt FP gelegt, dass die x -Achse (rot) auf der Gerade zwischen den Augen e_1 und e_2 plaziert ist.	42
3.21	Oberflächen-Rendering eines Zebrafisch-Embryos. Links die dorsale Aufnahme, die im unteren Bereich wenig Kontrast bietet. Rechts die Rekombination aus dorsaler und ventraler Aufnahme. Die Helligkeitsänderung der Rekombination bleibt als Linie sichtbar, da keine Ausbleichkorrektur verwendet wurde.	43

4.1	Links: Das non-maximum-suppression Filter in 2D entsteht durch Anwendung des nms_{1D} in Abstand d orthogonal zum Gradienten (roter Vektor). Rechts: Verschärfung der Maximalitätsbedingung an \mathbf{p}	47
4.2	Linke Spalte: Zwei Schnitte aus Aufnahme e12. Mittlere Spalte: Gradientenlängen für die Schnitte. Rechte Spalte: Größte Eigenwerte der Hesse-Matrix. Deutlich sichtbar sind die feineren Strukturen in der rechten Spalte. Untere Reihe: Die mediale Linie (Bildmitte) ist eine der wenigen Strukturen, die in der zweiten Ableitung besser erkennbar sind.	49
4.3	Entlang des Richtungsvektors $g_d(\mathbf{p})$ werden ringförmig die Projektionen der Gradienten auf $g_d(\mathbf{p})$ (rot) und auf r (grün) als Histogramm aufsummiert.	51
5.1	Interest Points detektiert mit Schrittweite zwei, Fehler zwei. Es werden feine, teils unterbrochene Flächen und Linien an allen wichtigen Strukturen gefunden. Dies ist das gewünschte Resultat der Interest Point Detektion.	53
5.2	Bei Erhöhung der erlaubten Fehler auf vier (Schrittweite zwei) werden Strukturen stärker, es treten aber auch Doppeldetektionen von stark ausgeprägten Flächen wie der Augenränder auf.	54
5.3	Links und mitte: Mit erlaubter Fehlerzahl acht wirken die Strukturen übersättigt, Flächen werden teils mehrfach detektiert, es werden zu viele Interest Points gefunden. Rechts: Wird die erlaubte Fehlerzahl auf eins gesenkt, genügen nur noch wenige Punkte der Filterbedingung.	54
5.4	Wird die Schrittweite auf eins reduziert (Fehler vier), so selektiert das Filter Flächenstücke mit geringer Krümmung. Dies ist für viele der Strukturen nicht wünschenswert. Für die mediale Linie (rechts, Bildmitte), so liefert es jedoch eine gute Antwort.	54
5.5	Interest Points auf der zweiten Ableitung bilden feinere, oft vereinzelte Strukturen.	55
5.6	Die Lokalisation feiner Strukturen wie der medialen Linie (horizontal in der Bildmitte) gelingt gut mit dem Interest Point Detektor basierend auf der zweiten Ableitung.	55
5.7	Oben Links: Schnitt entlang der x - z -Ebene durch Zebrafisch-Aufnahme e12. Oben Rechts: in dieser Ebene detektierte Interest Points. Unten: Abbildung aus dem Zebrafisch-Atlas nach [3], mit Beschriftung.	56
5.8	Ein Beispiel für räumliche Trennflächen, die den abgegrenzten Bereich jedoch nicht einschließen, ist die Trennung von Cerebellum und Myelencephalon (oben Mitte).	56
5.9	Linke Nasenregion des Zebrafisch e12. Links: Grauwertintensität. Rechts: Detektierte Interest Points. Rot eingefärbt sind die Positionen, an denen Feature für die Korrespondenzsuche entnommen wurden.	57
5.10	Korrespondenzsuche der Nasenregion aus Datensatz e12 gegen Datensatz e11 mit Featurevektoren der Dimension 12. 1. von links: Grauwertbild. 2. von links: Interest Points in dieser Region. 3. von links: Merkmale ohne relative Bezugsinformation. 4. von links: Merkmale mit relativer Bezugsinformation.	57
5.11	Längere Feature, hier der Dimension 20, liefern im allgemeinen geringfügig schlechtere Ergebnisse. Dargestellt sind (v.l.n.r.) Datensatz e8, e10 und e11, Korrespondenzsuche gegen Nasenregion von e12, Feature mit relativer Bezugsinformation.	58

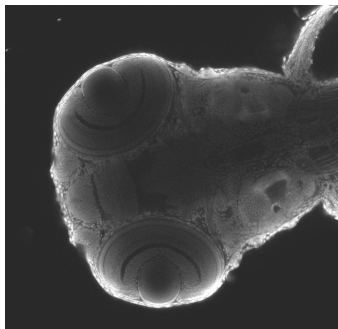
- 5.12 Region um den oberen Rand des linken Auges von e12 (1. von links). Registriert gegen (v.l.n.r) e8, e11 und e10. Für e10 ist eine tiefer liegende Schicht abgebildet, um die Detektion umliegender Bereiche ebenfalls darzustellen. 58
- 5.13 Rechts: K-Means-clustering der grauwertbasierten Merkmale in fünf Cluster, welche farblich hervorgehoben sind. Links: Grauwertbild des Schnitts. 59

Kapitel 8

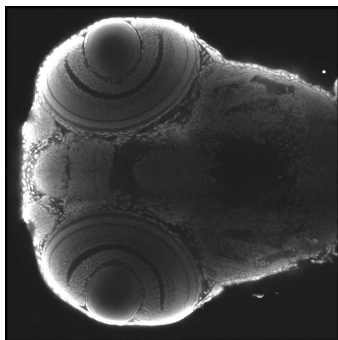
Anhang

8.1 Erstellte Daten

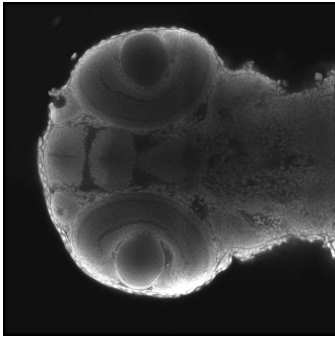
Alle dargestellten Aufnahmen wurden zur besseren Kenntlichmachung zuerst einer Gammakorrektur unterzogen, mit $\gamma = 0,5$. Anschliessend wurden sie Helligkeits- und Kontrastnormiert.



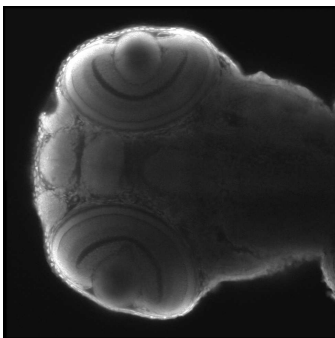
Name, Datum e3, 06.11.2006
Objektiv 40x LD C-Apochromat
Voxelgröße (z,y,x) $1.0\mu\text{m}$, $0.5812\mu\text{m}$, $0.5812\mu\text{m}$
Stapel 3×3
Augenzentrum (μm) r: [193, 254, 273] l: [189, 712, 403]



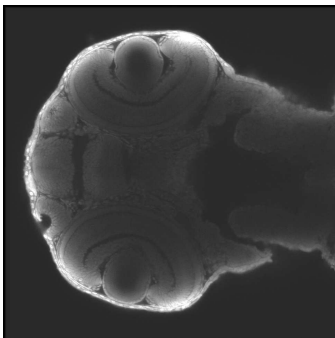
Name, Datum e5, 30.11.2006
Objektiv 25x LD LCI Plan Apochromat
Voxelgröße (z,y,x) $1.0\mu\text{m}$, $0.6576\mu\text{m}$, $0.6576\mu\text{m}$
Stapel 2×2
Augenzentrum (μm) r: [310, 80, 205] l: [315, 551, 209]



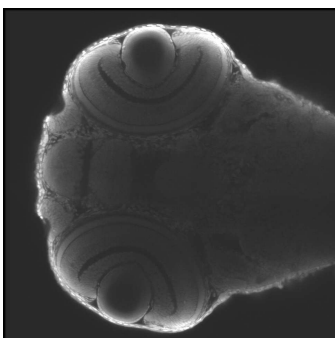
Name, Datum e8, 08.02.2007
Objektiv 25x LD LCI Plan Apochromat
Voxelgröße (z,y,x) $1.0\mu\text{m}$, $0.6576\mu\text{m}$, $0.6576\mu\text{m}$
Stapel 2×2
Augenzentrum (μm) r: [276, 107, 272] l: [297, 498, 262]



Name, Datum e10, 18.02.2007
Objektiv 25x LD LCI Plan Apochromat
Voxelgröße (z,y,x) $1.0\mu\text{m}$, $0.6576\mu\text{m}$, $0.6576\mu\text{m}$
Stapel 2×2
Augenzentrum (μm) r: [311, 92, 258] l: [272, 527, 220]



Name, Datum e11, 27.02.2007
Objektiv 25x LD LCI Plan Apochromat
Voxelgröße (z,y,x) $1.0\mu\text{m}$, $0.6576\mu\text{m}$, $0.6576\mu\text{m}$
Stapel 2×2
Augenzentrum (μm) r: [307, 107, 258] l: [289, 519, 236]



Name, Datum e12, 1.03.2007
Objektiv 25x LD LCI Plan Apochromat
Voxelgröße (z,y,x) $1.0\mu\text{m}$, $0.6576\mu\text{m}$, $0.6576\mu\text{m}$
Stapel 2×2
Augenzentrum (μm) r: [310, 84, 276] l: [304, 545, 232]