

ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT  
FREIBURG  
INSTITUT FÜR INFORMATIK

Lehrstuhl für Mustererkennung und Bildverarbeitung  
Prof. Dr. Hans Burkhardt



**Quantitative Analyse mikroskopischer  
Aufnahmen von Moos-Protoplasten**

Studienarbeit

Matthias Schlachter

Bearbeitungszeitraum: 01.11.06 bis 01.05.07, 6 Monate (halbtags)



# Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der aufgeführten Hilfsmittel erstellt wurde.

Freiburg, den



## **Zusammenfassung**

Gegenstand dieser Arbeit ist die quantitative Analyse mikroskopischer Aufnahmen von Moos-Protoplasten der Gattung *Physcomitrella Patens*. In diesem Zusammenhang wurde ein 3-dimensionales Modell entworfen, welches die Messung morphologischer Parameter wie Länge, Zellzahl und Verzweigungspunkte der Moos-Protoplasten ermöglichte. Verfahren zur 3-dimensionalen Segmentierung und Konturbestimmung wurden untersucht. Dies beinhaltete unter anderem die Extraktion von invarianten Merkmalen und Vorgehensansätze zur Bestimmung von Zellzentren.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>1</b>
1.1	Problemstellung . . . . .	1
1.2	Vorgehensweise und Aufbau der Arbeit . . . . .	1
<b>2</b>	<b>Segmentierung und Konturbestimmung der Filamente</b>	<b>3</b>
2.1	Vollautomatische Bestimmung von Trainingsbeispielen . . . . .	4
2.2	Voxelweise Invarianten . . . . .	4
2.3	Klassifikation mit Support Vektor Maschinen . . . . .	6
2.4	Abbilden von Entscheidungswerten der SVM auf a-Posteriori Wahrscheinlichkeiten . . . . .	8
2.5	Graphcut-Verfahren zur Konturbestimmung . . . . .	8
2.6	Zusammenhangskomponenten . . . . .	10
<b>3</b>	<b>Alternativer Ansatz zur Konturbestimmung</b>	<b>11</b>
3.1	Das Steerable Filter . . . . .	11
3.2	Detektion von orientierten Flächen mit Steerable Filtern . . . . .	12
3.3	Unterdrückung von Nebenmaxima . . . . .	13
3.4	Anmerkung zu den Ergebnissen . . . . .	14
<b>4</b>	<b>Bestimmung morphologischer Parameter</b>	<b>17</b>
4.1	Bestimmung der Zellzentren . . . . .	17
4.2	Minimal Spannende Bäume . . . . .	17
4.3	Klassifizierung von Verzweigungspunkten . . . . .	19
4.4	Bestimmung von Pfadlängen . . . . .	19
<b>5</b>	<b>Experimente und Ergebnisse</b>	<b>21</b>
5.1	Selektion der Trainingsbeispiele . . . . .	21
5.2	Segmentierung . . . . .	23
5.2.1	Grauwert . . . . .	23
5.2.2	2-Punkt Integralinvarianten . . . . .	23
5.2.3	Spherical Harmonic Descriptors . . . . .	26
5.2.4	Lokale Krümmungshistogramme . . . . .	26
5.3	Lokalisierung der Zellzentren . . . . .	29
5.4	Minimal spannende Bäume . . . . .	32
5.4.1	Einfluss der Kostenfunktion . . . . .	37
5.5	Klassifikation der Verzweigungspunkte . . . . .	38
5.6	Schlussfolgerungen und Ausblick . . . . .	41

# Verwendete Begriffe

## Akronyme

**CLSM** Confocal Laser Scanning Microscope

**FFT** Fast Fourier Transform (Schnelle implementation der diskreten Fourier-Transformation)

**SVM** Supportvektormaschine

## Mathematische Notation

$(f * g)(t)$  Faltung von  $f$  und  $g$ :

$$(f * g)(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(\tau) \cdot g(t - \tau) \, d\tau$$

$\|\cdot\|$   $L_2$ -Norm (euklidische Norm)



# 1 Einführung

Auf dem Gebiet der Zellbiologie ist das Moos *Physcomitrella Patens* aufgrund mehrerer Faktoren von großer Bedeutung. Zum einen weil es ein einfaches und nahezu vollständig entschlüsseltes Genom besitzt und zum anderen, weil eine Reihe von genetischen Mutanten zur Verfügung steht, die ermöglichen die Bedeutung bestimmter Gen-Sequenzen im Entwicklungsprozess zu analysieren. Um die Regeneration ab der ersten Zellteilung beobachten zu können, wird dazu ein bestehendes Moos in zellwandlose Einzelzellen zerlegt, was auch als Protoplastierung bezeichnet wird.

## 1.1 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Messung morphologischer Parameter der regenerierten Zellverbände (Filamente). Relevante Größen sind in diesem Zusammenhang die Länge der gebildeten Filamente, Anzahl der Zellen im Verband und die Erkennung von Verzweigungspunkten. Als Datengrundlage standen konventionelle Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmestapel einzelner Zellen und Zellverbände zur Verfügung. Die besondere Schwierigkeit hierbei ist, dass die Filamente sich nicht planar ausbreiten, sondern beliebig ineinander verschlungen auftreten können. Die geringe Auflösung entlang der optischen Achse bei konventioneller Mikroskopie erschwert eine Auswertung noch zusätzlich, und führt selbst bei Experten zu Unsicherheiten. Als Referenzdaten standen konfokale Laserscan Mikroskopieaufnahmen zur Verfügung.

## 1.2 Vorgehensweise und Aufbau der Arbeit

Wie bereits in der Problemstellung formuliert, sollen morphologische Parameter der Protoplasten bzw. der Filamente bestimmt werden. Die Vorgehensweise soll im Folgenden grob umrissen werden.

Zunächst wurde versucht eine vollständige 3-dimensionale Segmentierung und somit implizit die Kontur der Filamente zu bestimmen. In einem anschließenden Schritt wurden über ein Votingverfahren die Zentren der Einzelzellen bestimmt. Die so gewonnenen Ergebnisse wurden dazu verwendet, ein 3-dimensionales Modell der Filamente zu entwerfen, das die Bestimmung der morphologischen Parameter ermöglicht.

Die Kapitel 2 und 3 behandeln Verfahren zur Konturbestimmung. In Kapitel 4 wird ein Modell der Moos-Protoplasten entworfen und erklärt wie sich daraus die morphologisch interessanten Parameter wie Länge, Verzweigungspunkte etc. bestimmen lassen.



## 2 Segmentierung und Konturbestimmung der Filamente

Wie zu Beginn erwähnt, wurde zuerst versucht eine vollständige 3-dimensionale Segmentierung und somit implizit die Kontur der Protoplasten zu bestimmen. Der grobe Ablauf des Segmentierungsschrittes besteht im Wesentlichen aus folgenden Teilschritten :

- Feature Extraktion
- Klassifikation mit SVMs
- Abbilden von Entscheidungswerten der SVM auf a-Posteriori Wahrscheinlichkeiten
- Graphcut-Verfahren zur Konturbestimmung auf Basis von a-Posteriori Wahrscheinlichkeiten

Für die Segmentierung der Objekte kam ein Graphcut-Verfahren zum Einsatz [BFL06]. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein Optimierungsproblem basierend auf einem gewichteten Graphen. Es war nun die erste Schwierigkeit, einen Graphen mit entsprechenden Gewichten aufzubauen, der sowohl globale als auch lokale Eigenschaften mitberücksichtigt.

Die Vorgehensweise war folgendermaßen: Zunächst wurden voxelweise Merkmale extrahiert, die dann mittels SVMs klassifiziert wurden. Da die SVM sich in ihrer Rolle als Klassifikator für oder gegen eine Klasse entscheidet - in diesem Fall für Objekt oder für Hintergrund - sind die Ausgaben der SVM für den Aufbau des Graphen in dieser Form unbrauchbar. Man möchte vielmehr einen Klassifikator, der sich nicht für oder gegen eine Klasse entscheidet, sondern die a-Posteriori Wahrscheinlichkeiten für die Klassenzugehörigkeiten ermittelt. Um dieses Problem zu lösen, wurde auf das in [Pla99] vorgestellte Verfahren zurückgegriffen, mit dem sich die Entscheidungen der SVM in Wahrscheinlichkeiten überführen lassen. Diese bildeten dann zusammen mit lokalen Eigenschaften der Daten die Grundlage für den Aufbau eines gewichteten Graphen, wie er für das Graphcut-Verfahren benötigt wird.

Um eine mühsame Bestimmung der Trainingsmenge, die für das Training der SVM benötigt wurde, zu verhindern, kam ein Verfahren zur vollautomatischen Bestimmung der Trainingsmenge basierend auf einer Schätzung der lokale Schärfe zum Einsatz.

Im Folgenden wird nun auf die einzelnen Zwischenschritte näher eingegangen.

## 2.1 Vollautomatische Bestimmung von Trainingsbeispielen

Die Trainingsbeispiele wurden für jeden Datensatz neu bestimmt. Dies hat zwei Vorteile: Der Trainingsdatensatz muss nicht in mühsamer Handarbeit bestimmt werden und es können Features verwendet werden, die sich nicht ohne weiteres auf mehrere Datensätze übertragen lassen, z.B. der Grauwert selbst. Die Idee war dabei, die Eigenschaften der Mikroskopiedaten auszunutzen, und anhand einer Fokussierungsfunktion die relative lokale Schärfe ( $LS$ ) zu schätzen. Die Fokussierungsfunktion basierte hierbei auf der Filterantwort eines Gradientenfilters. Dass der Gradient ein geeigneter Operator zur Beurteilung des Energiegehalts eines Bildes ist, sieht man, wenn man die Fouriertransformierte eines optimalen Ableitungsoperators betrachtet:

$$\frac{\partial}{\partial x} g(x) \quad \circ \rightarrow \bullet \quad jv \cdot G(v) \quad (2.1)$$

wobei  $g$  ein eindimensionales Signal und  $G$  dessen Fouriertransformierte ist. Eine Differentiation im Ortsbereich bedeutet eine Multiplikation des Frequenzspektrums mit der Ortsfrequenz, also eine Anhebung der hohen Frequenzen. Für ein defokales Bild ist das Leistungsspektrum im hohen Frequenzbereich wegen der Defokussierung gefiltert, deswegen sind die Grauwertkanten nicht mehr so deutlich ausgeprägt wie im fokalen Bild.

Die Fokussierungsfunktion wurde auf lokale Regionen eingeschränkt, um den Energiegehalt lokaler Regionen zu ermitteln. Hierfür wurde jedem Punkt die Summe der Beträge der Gradienten seiner Nachbarschaft zugeordnet die sich in einer radialen Umgebung des betrachteten Punktes befinden.

$$LS(\mathbf{x}) = \int_{\|\mathbf{p}\| \leq r} \|\nabla V(\mathbf{x} + \mathbf{p})\| d\mathbf{p} \quad (2.2)$$

Gleichung 2.1 lässt sich umschreiben zu

$$LS(\mathbf{x}) = (\|\nabla V\| * \mathbf{K}_r)(\mathbf{x}) \quad (2.3)$$

mit

$$K_r(\mathbf{x}) = \begin{cases} 1, & \text{wenn } \|\mathbf{x}\| \leq r \\ 0, & \text{sonst.} \end{cases}$$

und kann somit für jeden Voxel effizient über eine FFT berechnet werden.

Für die Selektion der Trainingsbeispiele wurde die Antwort des Gradientenfilters auf das Einheitsintervall normiert und manuell ein oberer und unterer Schwellwert für Vorder- bzw. Hintergrund festgelegt. Alle Voxel deren Filterantwort größer als der obere Schwellwert war, wurden als Trainingsbeispiele für den Vordergrund verwendet, alle Voxel deren Filterantwort kleiner als der untere Schwellwert war, für den Hintergrund. Ebenfalls wurde eine Obergrenze für die Anzahl der Trainingsbeispiele festgelegt. Wurde diese überschritten, so wurden die Beispiele gleichverteilt aus allen möglichen Kandidaten ausgewählt.

## 2.2 Voxelweise Invarianten

Für die Voxelweise Klassifikation wurden zum einen Integralinvarianten mit Kernfunktionen wie in [RBS02] benutzt, und zum anderen die Spherical Harmonic Descriptors (siehe [KFR03]).

**Invariante Merkmale durch Haarintegration** Ein allgemeiner Ansatz zur Extraktion Invarianter Merkmale bzgl. der Wirkung bestimmter Transformationsgruppen, ist die Integration einer nichtlinearen Kernfunktion über die Wirkung der Transformationsgruppe [SM95]

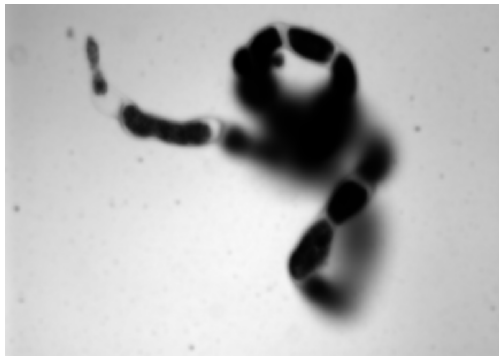
$$\mathbf{I}_f(\mathbf{X}) = \int_G f(g\mathbf{X}) dg \quad (2.4)$$

wobei  $G$  die Transformationsgruppe,  $g \in G$  ein Gruppenelement,  $f$  eine nichtlineare Kernfunktion,  $\mathbf{X}$  ein  $n$ -dimensionaler Datensatz und  $g\mathbf{X}$  der transformierte Datensatz sind.

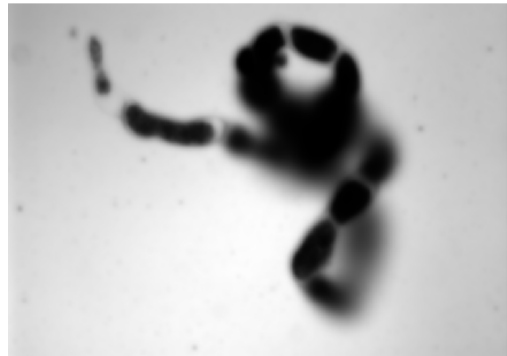
**2-Punkt Integralkerne** Für die Auswertung von (2.2) wurde eine bestimmte Klasse von Kernfunktionen verwendet, so genannte separable 2-Punkt Kerne [RBS02]. Hierbei beruht die Auswertung der Kernfunktion auf

$$f(\mathbf{X}) = f_1(\mathbf{X}(\mathbf{0})) \cdot f_2(\mathbf{X}(\mathbf{r})) \quad (2.5)$$

$f_1, f_2$  sind beliebige nicht lineare Funktionen,  $\mathbf{X}$  ist der zugrunde liegende Datensatz und  $\mathbf{r} \in \mathbb{R}^n$ . Für die Implementierung wurde eine Auswertung von Gleichung 2.5 mittels schneller Faltung verwendet [RBS02]. Ergebnisse der Haarintegration sind in Abbildung 2.1 zu sehen.



(a)  $r = 3\mu\text{m}, f_1 = \sqrt{x}, f_2 = x^2$



(b)  $r = 5\mu\text{m}, f_1 = \sqrt{x}, f_2 = x^2$



(c)  $r = 9\mu\text{m}, f_1 = \sqrt{x}, f_2 = x^2$



(d)  $r = 13\mu\text{m}, f_1 = \sqrt{x}, f_2 = x^2$

Abbildung 2.1: Beispiele für extrahierte Features mittels Haarintegration. In (a)-(d) ist jeweils ein XY-Slice der Features abgebildet.

**Spherical Harmonic Descriptors** Zusätzlich zu den 2-Punkt Integralkernen, wurden Invarianten basierend auf den Spherical Harmonic Descriptors verwendet [KFR03].

Hierbei zerlegt man eine sphärische Funktion  $f(\theta, \phi)$  in die Summe ihrer Harmonischen:

$$f(\theta, \phi) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l C_l^m \cdot Y_l^m(\theta, \phi) \quad (2.6)$$

wobei

$$C_l^m = \int f(s) (Y_l^m)^*(s) ds \quad (2.7)$$

Durch Aufsummieren der Subbänder und anschließender Normbildung erhält man einen rotationsinvarianten Deskriptor, der den Energiegehalt des betrachteten Frequenzbandes der Funktion beschreibt.

$$SH(f) = \{\|f_0(\theta, \phi)\|, \|f_1(\theta, \phi)\|, \dots\} \quad (2.8)$$

wobei

$$f_l(\theta, \phi) = \sum_{m=-l}^l C_l^m \cdot Y_l^m(\theta, \phi) \quad (2.9)$$

Die Ergebnisse der Extraktion von Invarianten mittels Entwicklung in Spherical Harmonics sind in Abbildung 2.2 zu sehen.

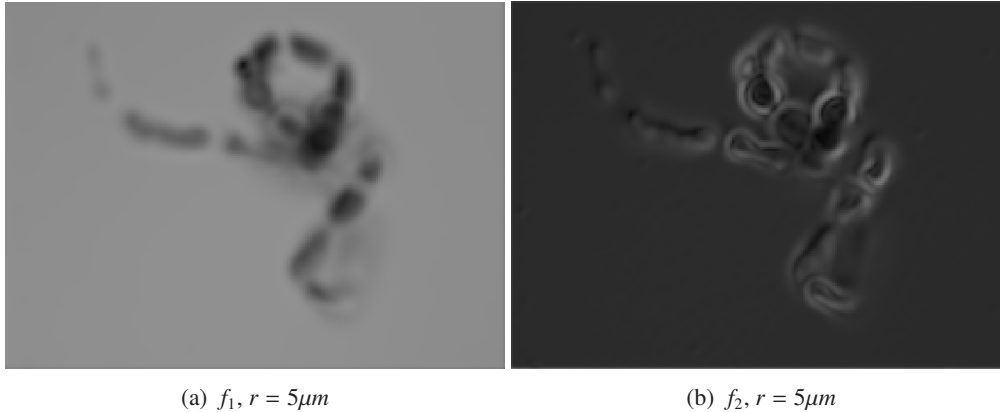


Abbildung 2.2: Ergebnisse der Spherical Harmonic Descriptors. Dargestellt sind die Funktionen  $f_1$  und  $f_2$ . Die Auswertung wurde auf einer Kugel mit Radius  $r = 5\mu\text{m}$  durchgeführt.

**Lokale Krümmungshistogramme** Krümmungshistogramme sind Histogramme über die betragsmäßig größten Eigenwerte der Hessematrix in einer gewissen Umgebung eines Punktes. Der Name Krümmungshistogramm wurde deswegen gewählt, weil ein enger Zusammenhang zwischen lokaler Krümmung und der Hessematrix besteht. Da die Protoplasten innerhalb der Zellen mehr (siehe Abbildung 2.4) Struktur aufweisen als der Hintergrund, sind die Beträge der Eigenwerte in diese Bereichen besonders hoch. Im Hintergrund sind sie dagegen nahe bei Null. Um nun diesen Sachverhalt auszunutzen, wurde zunächst für jeden Punkt des Datensatzes die Hessematrix bestimmt und der betragsmäßig größte Eigenwert bestimmt. Anschließend wurde über eine radiale Umgebung um jeden Punkt ein Histogramm der Beträge der Eigenwerte ermittelt. Für die Berechnung der Histogramme wurden 20 Bins verwendet. Der Radius über den das Histogramm berechnet wurde, lag bei  $6\mu\text{m}$ . In Abbildung 2.3 sind typische Merkmalsvektoren abgebildet.

**Weitere Features** Da der Grauwert selbst ein rotations- und translationsinvariantes Feature ist, wurde untersucht inwiefern sich der Grauwert als Feature eignet. Ein ebenfalls rotations- und translationsinvariantes Feature sind lokale Grauerthistogramme, die die lokalen Grauwertverteilungen eines Voxels repräsentieren. Diese waren ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen.

## 2.3 Klassifikation mit Support Vektor Maschinen

Für die anschließende Klassifikation wurden SVMs verwendet [Bur98]. Für Merkmale basierend auf Histogrammen wurden Histogram Intersection Kerne verwendet, für alle anderen Features wurden radiale Basisfunktionen benutzt. Für die Implementierung wurde die *svmtl* Bibliothek von [Ron04] verwendet.

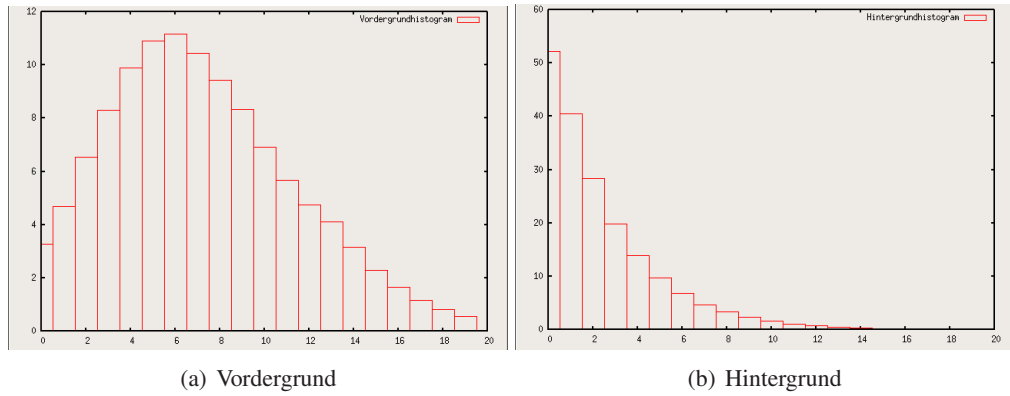


Abbildung 2.3: Typische Merkmalsvektoren der lokalen Krümmungshistogramme.

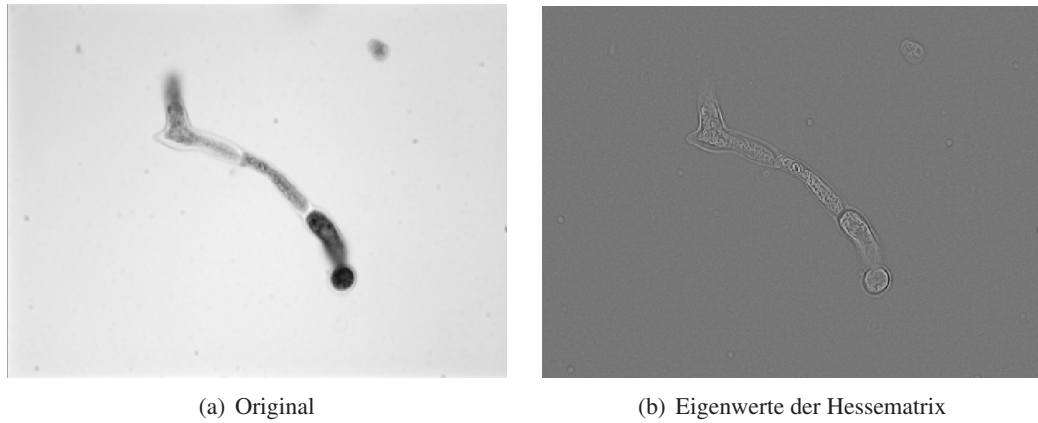


Abbildung 2.4: In (a) ist der Originaldatensatz zu sehen. Die korrespondierenden betragsmäßig größten Eigenwerte der Hessematrix sind in (b) dargestellt.

## 2.4 Abbilden von Entscheidungswerten der SVM auf a-Posteriori Wahrscheinlichkeiten

Als nächstes wurden die Entscheidungswerte der SVM auf a-Posteriori Wahrscheinlichkeiten abgebildet, um für das eingesetzte Graphcut-Verfahren die Kantengewichte für Vorder- bzw. Hintergrund zu belegen.

Bei vorliegender Problemstellung handelt es sich im Wesentlichen um ein binäres Entscheidungsproblem. Gegeben ein Trainingsdatensatz  $\mathbf{x}_i \in \mathbb{R}^n$ ,  $i = 1, \dots, l$ , mit Label  $y_i = \{1, -1\}^1$ , dann ist die Entscheidung einer SVM bzgl. der Klassenzugehörigkeit eines Testdatensatzes  $\mathbf{x}$  gegeben durch  $\text{sgn}(f(\mathbf{x}))$  der Entscheidungsfunktion  $f(\mathbf{x})$ . Für viele Anwendungen ist es jedoch von Interesse die a-Posteriori Wahrscheinlichkeit der Klasse zu bestimmen  $p(y = 1|x)$  anstatt die Klassenzugehörigkeit direkt zu entscheiden. In [Pla99] wird eine Approximation von  $p(y = 1|x)$  durch eine Sigmoidfunktion vorgeschlagen

$$p(\mathbf{x}) = \frac{1}{1 + \exp(Af(\mathbf{x}) + B)} \quad (2.10)$$

mit zu schätzenden Parametern  $A$  und  $B$ . Der Schätzalgorithmus für die Parameter  $A$  und  $B$  wurde [LLW03] entnommen.

Der Algorithmus zur Bestimmung der a-Posteriori Wahrscheinlichkeiten, verwendet zur Schätzung der a-Priori Wahrscheinlichkeiten die im Trainingsdatensatz vergebenen Labels. Da die Trainingsdaten automatisch bestimmt wurden (siehe Abschnitt 2.1) und eine maximale Anzahl von Trainingsbeispielen festgelegt wurde, konnte es je nach Objektgröße vorkommen, dass es für Vorder- und Hintergrund die gleiche Anzahl an Trainingsbeispielen gab. Da dies aber in den meisten Fällen keine gute Approximation der a-Priori Wahrscheinlichkeiten darstellte (üblicherweise mehr als 80% Hintergrund), wurde zur Bestimmung der a-Priori Wahrscheinlichkeiten ein Schwellwertverfahren verwendet, basierend auf der Approximation der Grauwertverteilung durch eine Poissonverteilung.

$$P_\lambda(X = k) = e^{-\lambda} \cdot \frac{\lambda^k}{k!} \quad (2.11)$$

Der Schwellwert wurde ausgehend vom Erwartungswert der Verteilung im Abstand  $\pm$ Standardabweichung gewählt („+“ für die Durchlichtdaten und „-“ für die Konfokal- bzw. Fluoreszenzdaten).

## 2.5 Graphcut-Verfahren zur Konturbestimmung

Um nun die endgültige Kontur der Moos-Protoplasten zu bestimmen, kam das Graphcut-Verfahren aus [BFL06] zum Einsatz. Die Idee des Graphcut-Verfahrens ist, das Bild in Objekt- und Hintergrundsegmente zu zerlegen. Der grobe Ablauf ist hierbei, dass ausgehend von dem Bild zunächst ein Graph aufgebaut wird. Die Knoten des Graphen repräsentieren die Bildpunkte. Alle benachbarten Bildpunkte werden über gewichtete Kanten miteinander verbunden. Die Kantengewichte werden über eine Kostenfunktion berechnet. Das Ziel ist nun, den günstigsten Schnitt zu berechnen, der die Objekte vom Hintergrund trennt. Ein einfaches Beispiel für den Graph eines Binärbildes ist in Abbildung 2.5 zu sehen. Die Dicke der Kanten repräsentiert hierbei das Kantengewicht.

Formal ist ein Graph  $\mathcal{G} = \langle \mathcal{V}, \mathcal{E} \rangle$  definiert als eine Menge von Knoten oder Ecken  $\mathcal{V}$  und einer Menge von Kanten  $\mathcal{E}$ . Benachbarte Knoten sind über eine Kante miteinander verbunden (siehe Abb. 2.5). Die Knoten repräsentieren hierbei Pixel bzw. Voxel. Außerdem gibt es zwei ausgezeichnete Knoten  $S$  (source) und  $T$  (terminal) die das Objekt (Vordergrund) bzw. den Hintergrund repräsentieren. Kanten zu Terminal und Source bezeichnet man als *t-links*. Kanten zwischen benachbarten Voxeln werden als *n-links* bezeichnet. Die Definition der Nachbarschaft ist beliebig, und kann diagonale Kanten sowie andere Arten von *n-links* enthalten.

<sup>1</sup>Das Label „1“ wurde für den Vordergrund und das Label „-1“ für den Hintergrund vergeben.



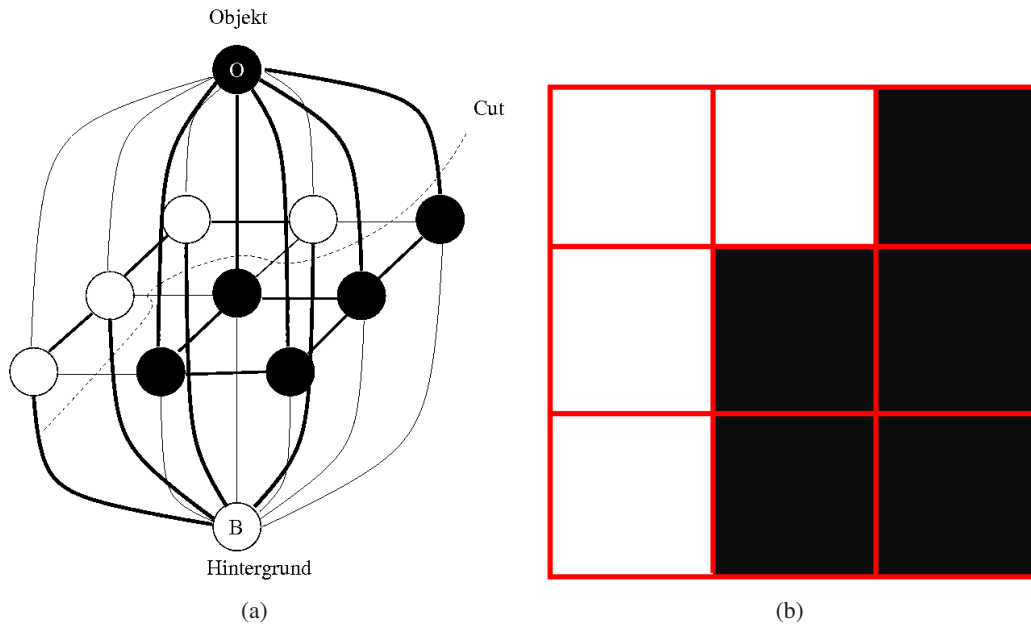


Abbildung 2.5: Beispiel eines Binärbildes (a) mit zugehörigem Graphen (b).

Üblicherweise werden jedoch 8er-Nachbarschaften (2D) oder 26er-Nachbarschaften (3D) verwendet. Die Kanten zu Terminal und Source, sowie zwischen den Voxeln werden mit nicht negativen Gewichten belegt. Ein *cut* oder *s-t-cut* ist eine Teilmenge von Kanten  $\mathcal{C} \subset \mathcal{E}$ , so dass  $S$  und  $T$  auf dem induzierten Graphen  $\mathcal{G}(\mathcal{C}) = \langle \mathcal{V}, \mathcal{E} \setminus \mathcal{C} \rangle$  komplett voneinander getrennt werden. Die Kosten des Cuts sind definiert als Summe der Gewichte von durchtrennten Kanten

$$|\mathcal{C}| = \sum_{e \in \mathcal{C}} w_e \quad (2.12)$$

Ziel ist es nun den günstigsten *cut* zu finden, der Terminal und Source voneinander trennt, also das Objekt vom Hintergrund trennt (gestrichelte Linie in Abbildung 2.5).

**Aufbau des Graphen** Einer der wichtigsten Schritte des Graphcut-Verfahrens ist es den Graphen mit sinnvollen Kantengewichten zu belegen.

Sei hierzu eine Menge  $\mathcal{P}$  von Pixeln oder Voxeln gegeben, mit einem Nachbarschaftssystem repräsentiert durch eine Menge  $\mathcal{N}$  von allen Paaren  $\{p, q\}$ ,  $p, q \in \mathcal{P}$ , die benachbart sind in  $\mathcal{P}$ . Sei  $A = (A_1, \dots, A_p, \dots, A_{|\mathcal{P}|})$  ein binärer Vektor, dessen Komponenten  $A_p$  Zuordnungen zu Elementen  $p \in \mathcal{P}$  repräsentieren. Der Wert von  $A_p$  ist hierbei entweder „Objekt“ oder „Hintergrund“. Der Vektor  $A$  repräsentiert also eine Segmentierung. Die optimale Segmentierung wäre nun diejenige, die bzgl. einer Kostenfunktion, die Kosten eines *s-t-cuts* minimiert. In [BFL06] wird eine Kostenfunktion vorgeschlagen, die sowohl regionale Eigenschaften als auch Kanteneigenschaften miteinbezieht

$$E(A) = \lambda \cdot R(A) + B(A) \quad (2.13)$$

wobei

$$R(A) = \sum_{p \in \mathcal{P}} R_p(A_p) \quad (\text{regionaler Term}) \quad (2.14)$$

$$B(A) = \sum_{\{p,q\} \in \mathcal{N}} B_{p,q} \cdot \delta_{A_p \neq A_q} \quad (\text{Kanteninformationsterm}) \quad (2.15)$$

und

$$\delta_{A_p \neq A_q} = \begin{cases} 1, & \text{wenn } A_p \neq A_q \\ 0, & \text{wenn } A_p = A_q \end{cases} \quad (2.16)$$

Der Koeffizient  $\lambda > 0$  in Gleichung 2.13 gibt die relative Wichtigkeit der regionalen Eigenschaften gegenüber des Kanteninformationsterm  $B(A)$  an.

Der Term  $B(A)$  beinhaltet hierbei die Eigenschaften der Objektgrenzen und kann wenn  $B_{p,q} \geq 0$  ist als eine Art Bestrafungsterm angesehen werden, der Unstetigkeiten zwischen den Pixel  $p$  und  $q$  bestraft. Wenn die Pixel  $p$  und  $q$  sich sehr ähnlich sind, sollte der Term  $B_{p,q}$  sehr groß sein. Sind die Pixel sich jedoch sehr unähnlich, sollte  $B_{p,q}$  nahe bei Null liegen. Die Höhe der Bestrafung sollte mit zunehmendem Abstand der Pixel abnehmen. Dies ist besonders dann wichtig, wenn sehr große Nachbarschaften benutzt werden.

[BFL06] schlagen folgende Bestrafungsfunktion vor:

$$B_{p,q} = \exp\left(-\frac{(I_p - I_q)^2}{2\sigma^2}\right) \cdot \frac{1}{dist(p,q)} \quad (2.17)$$

$I_p$  und  $I_q$  sind hierbei die Intensitäten der Pixel  $p$  und  $q$  und  $dist$  bezeichnet eine Abstandsfunktion. Der Wert von  $\sigma$  wurde empirisch bestimmt.

Für den regionalen Term wurden die a-posteriori Wahrscheinlichkeiten der Klassenzugehörigkeit der einzelnen Voxel als Gewichte verwendet (siehe Abschnitt 2.4). Der Kanteninformationsterm wurde gemäß Gleichung 2.17 gewählt.

## 2.6 Zusammenhangskomponenten

Als letzter Schritt wurden die einzelnen Objekte, durch ein Connected Component Labeling für die Weiterverarbeitung aus den Bildstapeln extrahiert. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abbildung 2.6 dargestellt. Hierbei sind Voxel mit gleichem Grauwert demselben Objekt zuzuordnen. In diesem Fall wurden zwei Objekte extrahiert.



(a) Original



(b) Connected Components

Abbildung 2.6: Beispiel eines Connected Component Labelings. In (a) ist ein Ausschnitt des Originaldatensatzes zu sehen. In (b) sind die Connected Components jeweils mit demselben Grauwert dargestellt.

## 3 Alternativer Ansatz zur Konturbestimmung

In diesem Abschnitt soll ein alternativer Ansatz zur Konturbestimmung basierend auf einer Klasse von Matched Filtern vorgestellt werden, so genannten Steerable Filtern [FA91] [JU04]. Angeregt durch die Ergebnisse von Aguet et al. [AJU05], die erfolgreich Filamente aus Gesteinsproben mit Steerable Filtern extrahiert haben, wurde untersucht ob sich diese Filter ebenfalls dazu eignen, die Filamente der Moose zu detektieren und zu extrahieren. Im Hinblick auf die Problemstellung wurden insbesondere Filter untersucht, die sich dazu eignen Flächen und deren Orientierung im Raum zu detektieren. Der komplette Ablauf gliedert sich hierbei in drei Schritte. Zuerst wird das Eingangssignal gefiltert (Feature Detection). In einem zweiten Schritt werden Nebenmaxima eliminiert (Non-Maximum Suppression) und in einem dritten und letzten Schritt wird ein Schwellwert festgesetzt (Thresholding).

Es folgt nun eine kurze Einführung in die Theorie der Steerable Filter. Anschließend werden die Schritte Feature Detection und Non-Maximum Suppression speziell für Flächen im Raum näher erläutert.

### 3.1 Das Steerable Filter

Das Steerable Filter ist ein Filter das in jede Richtung gedreht werden kann, ohne explizit jede Richtung zu filtern. Das Eingangssignal muss lediglich mit so genannten Basisfiltern gefiltert werden. Die Filterantwort für beliebige Orientierungen lässt sich dann analytisch durch Linearkombinationen der Basisfilter berechnen.

Als einführendes Beispiel in die Theorie der Steerable Filter, betrachte man die rotationssymmetrische zweidimensionale Gaussfunktion

$$G(x, y) = e^{-(x^2+y^2)}. \quad (3.1)$$

Hierbei wurden der Einfachheit halber alle Normierungsfaktoren entfernt.  $G_n$  bezeichne im Folgenden die  $n$ -te Ableitung von  $G$  und  $G^\theta$  bezeichne die um den Winkel  $\theta$  rotierte Funktion  $G$ . Die erste Ableitung in  $x$  Richtung  $G_1^0$  ist

$$G_1^0 = \frac{\partial}{\partial x} e^{-(x^2+y^2)} = -2xe^{-(x^2+y^2)} \quad (3.2)$$

Dieselbe Funktion um 90 Grad gedreht ist

$$G_1^{90} = \frac{\partial}{\partial y} e^{-(x^2+y^2)} = -2ye^{-(x^2+y^2)} \quad (3.3)$$

Man kann eine beliebige Orientierung  $\theta$  von  $G_1$  darstellen als Linerakombinationen von  $G_1^0$  und  $G_1^{90}$ :

$$G_1^\theta = \cos(\theta)G_1^0 + \sin(\theta)G_1^{90} \quad (3.4)$$

$G_1^0$  und  $G_1^{90}$  spannen den Raum der  $G_1^\theta$  Filter auf und werden deshalb auch Basisfilter genannt. Die Terme  $\cos(\theta)$  und  $\sin(\theta)$  sind die entsprechenden *interpolierenden Funktionen* für die Basisfilter.

Nutzt man nun die Linearität der Faltungsoperation aus, so erhält man das Ergebnis der Filterung eines Bildes  $I$  mit einer beliebigen Orientierung  $\theta$  des Filters, durch die Linearkombinationen des mit den Basisfiltern gefilterten Bildes. Sei also

$$R_1^\theta = G_1^\theta * I \quad (3.5)$$

und

$$R_1^{90} = G_1^{90} * I \quad (3.6)$$

dann ist

$$R_1^\theta = \cos(\theta)R_1^0 + \sin(\theta)R_1^{90} \quad (3.7)$$

### 3.2 Detektion von orientierten Flächen mit Steerable Filtern

Angenommen man möchte ein bestimmtes Feature an einer unbekanntem Position und Orientierung im Raum detektieren, so kann dies erreicht werden, indem man das Innenprodukt zwischen dem Eingangssignal  $f(\mathbf{x})$  und dem geshifteten Featuretemplate  $h(-x, -y, -z)$  an jedem Punkt und für alle möglichen Orientierungen auswertet. Ein hoher Wert des Innenprodukts bedeutet ein hohes Maß an Ähnlichkeit des Templates mit dem Original. Um nun für jeden Punkt die optimale Orientierung zu ermitteln, muss folgendes Optimierungsproblem gelöst werden:

$$(\theta(\mathbf{x})^*, \phi(\mathbf{x})^*) = \arg \max_{\theta, \phi} (f(\mathbf{x}) * h(\mathbf{R}_{\theta, \phi} \mathbf{x})) \quad (3.8)$$

wobei  $h(\mathbf{R}_{\theta, \phi} \mathbf{x})$  das Featuretemplate rotiert um die Eulerwinkel  $\theta$  und  $\phi$  ist.

Die Filterantwort  $r^*$  bzgl. der optimalen Raumorientierung ergibt sich dann durch

$$r^*(\mathbf{x}) = f(\mathbf{x}) * h(\mathbf{R}_{\theta^*, \phi^*} \mathbf{x}) \quad (3.9)$$

Da eine direkte Implementierung des Algorithmus für praktische Anwendungen zu rechenintensiv wäre, wird die Steerable Filter Formulierung aus [FA91] verwendet.

Als Familie von Krümmung bzw. Oberflächendetektoren schlagen die Autoren in [AJU05], Linearkombinationen der partiellen Ableitungen  $M$ -ter Ordnung von isotropen 3D Gaussfunktionen  $g(x, y, z)$  als Templates vor:

$$h(x, y, z) = \sum_{k=1}^M \sum_{i=0}^k \sum_{j=0}^{k-i} \alpha_{k,i,j} \underbrace{\frac{\partial^i}{\partial x^i} \frac{\partial^j}{\partial y^j} \frac{\partial^{k-i-j}}{\partial z^{k-i-j}} g(x, y, z)}_{h_{k,i,j}(\mathbf{x})}, \quad \alpha_{k,i,j} \in \mathbb{R} \quad (3.10)$$

Die Faltung des Volumens  $f(\mathbf{x})$  mit einer gedrehten Version des Filters ergibt sich dann zu

$$f(\mathbf{x}) * h(\mathbf{R}_{\theta, \phi} \mathbf{x}) = \sum_{k=1}^M \sum_{i=0}^k \sum_{j=0}^{k-i} \beta_{k,i,j}(\theta, \phi) f * h_{k,i,j}(\mathbf{x}) \quad (3.11)$$

wobei die orientierungsabhängigen Gewichte  $\beta_{k,i,j}(\theta, \phi)$  Polynome in  $(\cos \theta \sin \phi)$ ,  $(\sin \theta \sin \phi)$  und  $\cos \phi$  sind (vgl. Gleichung. 3.7, sowie [JU04] und [FA91]).

In [AJU05] werden, analog zu den Überlegungen in 2D [JU04], optimale Krümmungs- und Oberflächendetektoren hergeleitet, für ein entlang der  $x$ -Achse orientiertes Feature (für eine detailgenaue Herleitung, siehe [AJU05] und [JU04]). Für den optimalen Krümmungsdetektor ergibt sich

$$h_{curve} = \frac{1}{2\sqrt{2\pi}} \left( -\frac{2}{3}g_{xx} + g_{yy} + g_{zz} \right) \quad (3.12)$$

und für den optimalen Oberflächendetektor

$$h_{surface} = \frac{1}{8\pi\sqrt{6}} \left( -4g_{xx} + g_{yy} + g_{zz} \right) \quad (3.13)$$



Abbildung 3.1: Filterantwort des Krümmungs- (a) und Oberflächendetektors (b)

Die Impulsantworten der beiden Filter sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Da sich die beiden Detektoren nur um einen konstanten Faktor vor dem  $g_{xx}$  Term unterscheiden, wird in der weiteren Notation der Parameter  $\alpha$  eingeführt. Es ist dann in jedem Ausdruck  $\alpha = \frac{2}{3}$  für den Krümmungsdetektor und  $\alpha = 4$  für den Oberflächendetektor zu setzen, was zu folgender allgemeineren Darstellung führt:

$$h(\mathbf{x}) = \underbrace{(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})}_{\Delta g} - (\alpha + 1) g_{xx} \quad (3.14)$$

Hierbei bezeichnet  $\Delta g$  den isotropen 3D Laplace von  $g$ , der invariant bzgl. Rotationen ist. Eine Rotation des Features  $h(\mathbf{x})$  zu einer Orientierung gegeben durch  $\mathbf{v} = (\cos \theta \sin \phi, \sin \theta \sin \phi, \cos \phi)$  ergibt

$$h(\mathbf{R}_{\theta, \phi} \mathbf{x}) = (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) - (\alpha + 1) \mathbf{v}^T \mathbf{H}_g \mathbf{v} \quad (3.15)$$

Hierbei bezeichnet  $\mathbf{H}_g$  die 3D-Hessematrix von  $g(\mathbf{x})$ . Der Ausdruck lässt sich vereinfacht schreiben als

$$h(\mathbf{R}_{\theta, \phi} \mathbf{x}) = \mathbf{v}^T \mathbf{A}_g \mathbf{v} \quad (3.16)$$

mit  $\mathbf{A}_g = (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})\mathbf{I} - (\alpha + 1)\mathbf{H}_g$  ( $\mathbf{I}$  bezeichnet hierbei die Identität). Unter Ausnutzung der Linearität der Faltungsoperation erhält man schließlich

$$f(\mathbf{x}) * h(\mathbf{R}_{\theta, \phi} \mathbf{x}) = \mathbf{v}^T \mathbf{A}_{f * g} \mathbf{v} \quad (3.17)$$

Die Lösung des Optimierungsproblems aus Gleichung 3.8 und 3.9 ergibt sich dann aus

$$r^* = \lambda_{max} \quad (3.18)$$

und

$$\mathbf{v}^* = \mathbf{e}_{max} \quad (3.19)$$

$\lambda_{max}$  bezeichnet hierbei den größten Eigenwert der Matrix  $\mathbf{A}_{f * g}$  und  $\mathbf{e}_{max}$  den zugehörigen Eigenvektor.

Für die Umsetzung der Detektoren muss die  $3 \times 3$  Matrix  $\mathbf{A}_{f * g}$  für jede Position im Raum ausgewertet werden. Dazu wird zunächst das Originalbild mit allen Basis Templates ( $g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}, g_{xy}, g_{xz}, g_{yz}$ ) gefaltet. Die Eigenwerte und Eigenvektoren werden dann für jeden Raumpunkt analytisch berechnet.

### 3.3 Unterdrückung von Nebenmaxima

Anschließend an die Feature Detektion werden alle nicht maximalen Punkte verworfen. Da laut Konstruktion des Oberflächendetektors, die optimale Orientierung des Filters orthogonal zum Feature steht, werden diejenigen Punkte entlang der optimalen Orientierung verworfen, die nicht maximal sind. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt.

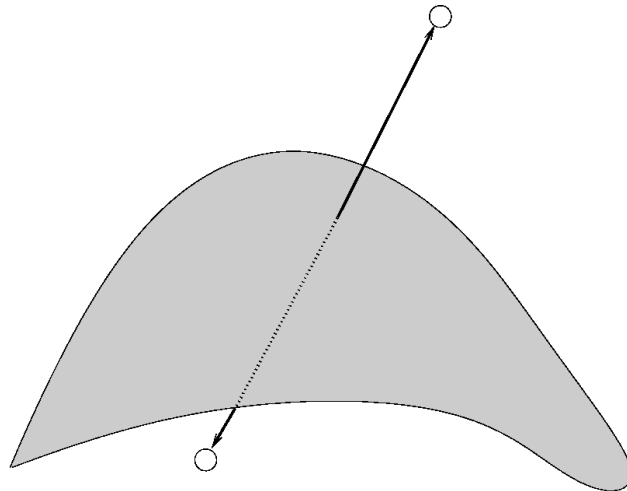


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Unterdrückung von Nebenmaxima

### 3.4 Anmerkung zu den Ergebnissen

Da die Qualität der Ergebnisse auf den als Datengrundlage dienenden Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmestapeln eine weitergehende Verwendung dieses Zwischenschritts unmöglich machte, werden exemplarisch das Ergebnis einer Fluoreszenzaufnahme (siehe Abbildung 3.4) und im Vergleich dazu das Ergebnis eines CLSM Datensatzes (siehe Abbildung 3.3) angeführt.

Auf den CLSM Daten war es möglich, eine zusammenhängende Oberflächenstruktur zu extrahieren. Bei den Durchlicht bzw. Fluoreszenzaufnahmen machten jedoch die geringe Auflösung und die Effekte der Punktbildfunktion entlang der optischen Achse eine Extraktion der Oberfläche unmöglich.

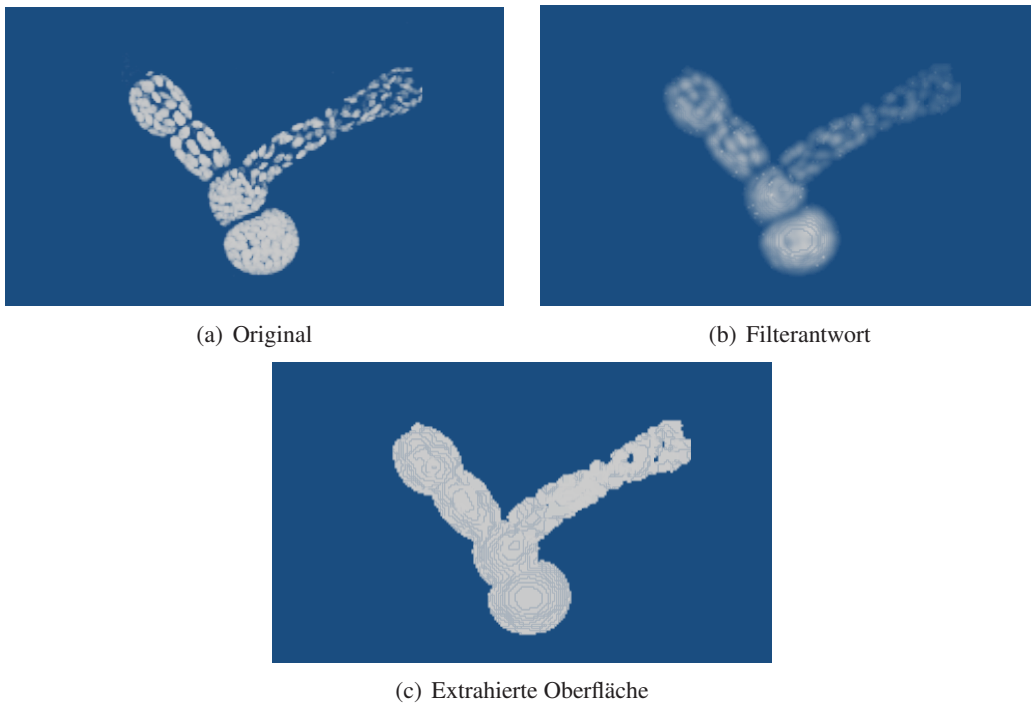


Abbildung 3.3: Ergebnis der Oberflächenextraktion auf einem CLSM Datensatz.

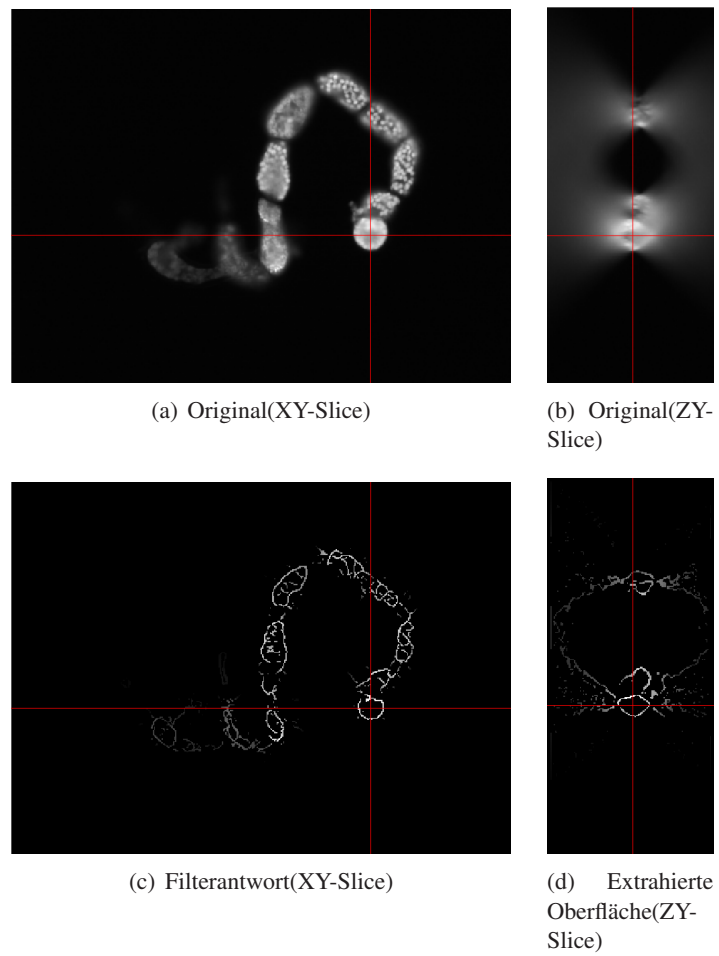


Abbildung 3.4: Ergebnis der Oberflächenextraktion auf einer Fluoreszenzaufnahme.





## 4 Bestimmung morphologischer Parameter

In diesem Kapitel werden Ansätze zur Bestimmung morphologischer Parameter wie Länge, Zellzahl und Verzweigungspunkte der Filamente vorgestellt. Wie in der Einleitung erwähnt, war die Idee, ein 3-dimensionales Modell der Filamente zu entwerfen, anhand dessen diese Parameter bestimmt werden können. Die natürliche Wachstumsweise der Moos-Protoplasten legt einen Baum als adäquates Modell nahe, da die Protoplasten während des Wachstum keine Zykel bilden, die Protoplasten wachsen nicht in sich selbst hinein. Die Knoten des Baumes können hierbei mit den einzelnen Zellen der Filamente identifiziert werden. Dazu müssen zunächst noch die Zellzentren bestimmt werden, was im folgenden Abschnitt behandelt wird. In den weiteren Abschnitten wird dann näher auf das eigentliche Modell und dessen Datenstruktur eingegangen.

### 4.1 Bestimmung der Zellzentren

Zur Bestimmung der Zellzentren wurde ein Votingansatz ähnlich zu dem in [SSR<sup>+</sup>06] verwendet. Die Idee hierbei war, dass die Gradienten orthogonal auf der Zellaussenwand stehen (siehe Abbildung 4.1). Für jeden Voxel wurden nun alle Gradienten aufsummiert, die in dessen Richtung zeigen. Hierbei handelt es sich im Prinzip um eine verallgemeinerte Houghtransformation für Kugeln, mit dem Unterschied zu dem Verfahren aus [SSR<sup>+</sup>06], dass die Werte aller möglichen Kugelradien für die einzelnen Voxel akkumuliert wurden. Um zu verhindern, dass die Gradienten für Voxel voten die weit außerhalb der Zelle liegen, wurde ein oberer Radius von 30  $\mu\text{m}$  festgelegt. Anschließend wurde der so gewonnene Votingraum mit einem Gaussfilter geglättet, und sukzessive Maxima extrahiert (siehe die rot markierten Punkte in Abbildung 4.1(b))

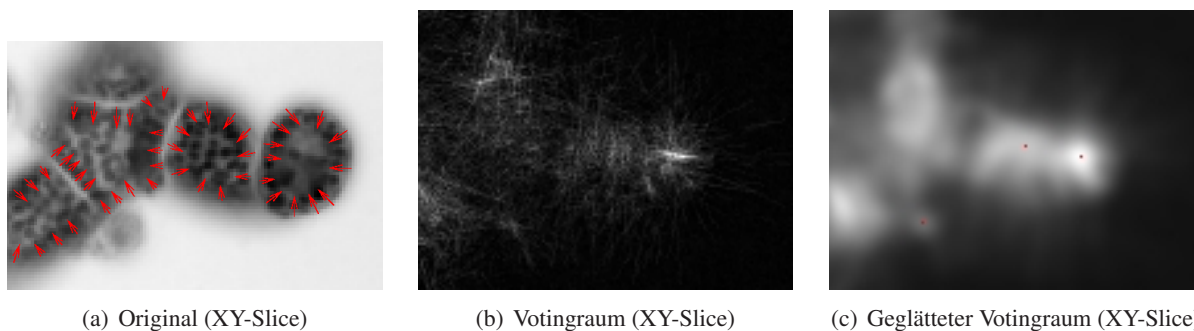


Abbildung 4.1: In (a) ist eine schematische Darstellung des Votingverfahrens zu sehen. Der resultierende Votingraum ist in (b) dargestellt. Der geglättete Votingraum ist in (c) zu sehen. Rot markierte Punkte sind hierbei lokale Maxima.

### 4.2 Minimal Spannende Bäume

Bei einem spannenden Baum handelt es sich um einen azyklischen Teilgraph eines ungerichteten Graphen, der all seine Knoten enthält. Von einem minimal spannenden Baum spricht man dann, wenn es sich um einen gewichteten Graphen handelt und der aufspannende Baum unter allen möglichen aufspannenden Bäumen bzgl. der Summe der Kantengewichte minimal ist. Ein Beispiel für einen minimal spannenden Baum ist in Abbildung 4.2 zu sehen.

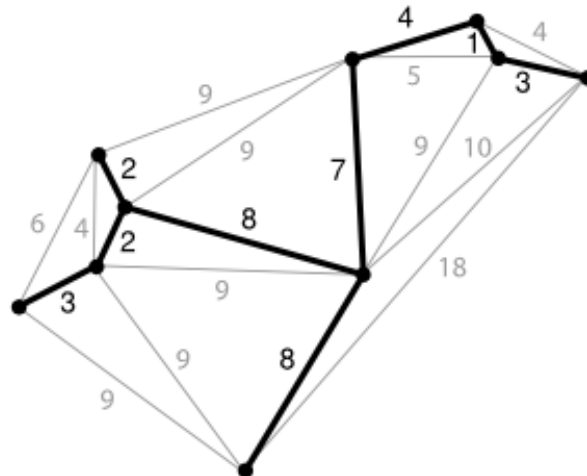


Abbildung 4.2: Ein ungerichteter Graph mit einem minimal spannenden Baum.

Wie bereits angesprochen wurden die Knoten des Graphen mit den lokalisierten Zellzentren identifiziert. Die Kantengewichte wurden gemäß einer Kostenfunktion  $C$  bestimmt. Die naheliegendste Kostenfunktion wäre

$$C(e) = \|p - q\| \quad (4.1)$$

wobei  $e \in E$ ,  $p, q \in V$  und  $e$  ist Kante zwischen  $p$  und  $q$ , also einfach jeder Kante die euklidische Distanz ihrer Knoten zuordnet. Dass diese Kostenfunktion nicht ausreicht um der Struktur der Filamente gerecht zu werden, wird in Abbildung 4.3 ersichtlich. Die gelb markierten Kanten sind Kanten, die das Objekt verlassen. Diese Kanten müssen, um den optimalen Baum zu erhalten (rot markiert) gemäß einer Bestrafungsfunktion  $B$  mit zusätzlichen Kosten belegt werden. Eine Möglichkeit wäre, solche Kanten mit unendlichen Kosten zu belegen, was allerdings sehr restriktiv und nur dann sinnvoll ist, wenn eine optimale Segmentierung und Lokalisation der Zellzentren garantiert werden kann.

Daher wurde eine Bestrafungsfunktion gewählt, die ausgehend von der Segmentierung die Länge  $L$  des Kantensegmentes bestimmt welches außerhalb der Maske liegt, und Kanten mit zusätzlichen Kosten in Abhängigkeit von  $L$  belegt. Dies führt zu folgender Kostenfunktion:

$$C(e) = \|p - q\| + B(L) \quad (4.2)$$

Bei den Durchlicht- bzw. Fluoreszenzdaten sollte - wegen ihrer geringen Auflösung entlang der optischen Achse - die Distanz entlang der optischen Achse ebenfalls zu mehr Kosten führen. Untersucht wurden lineare und exponentielle Bestrafungen der Liniensegmente, die außerhalb der Maske liegen.

Ausgehend von dieser Kostenfunktion wurde dann der Graph aufgebaut. Der minimal spannende Baum wurde mit Hilfe des Algorithmus von Kruskal ermittelt (siehe Algorithmus 1).

---

#### Algorithm 1 Minimal Spannender Baum (Kruskal)

---

- 1: Erzeuge für jeden Knoten einen Baum
  - 2: Erzeuge eine Liste  $L$  der Kanten
  - 3: **while**  $L$  nicht leer **do**
  - 4:   Wähle stets ein Kante mit minimalen Kosten aus, die je zwei Bäume miteinander verbindet und vereinige diese zu einem Baum
  - 5: **end while**
-

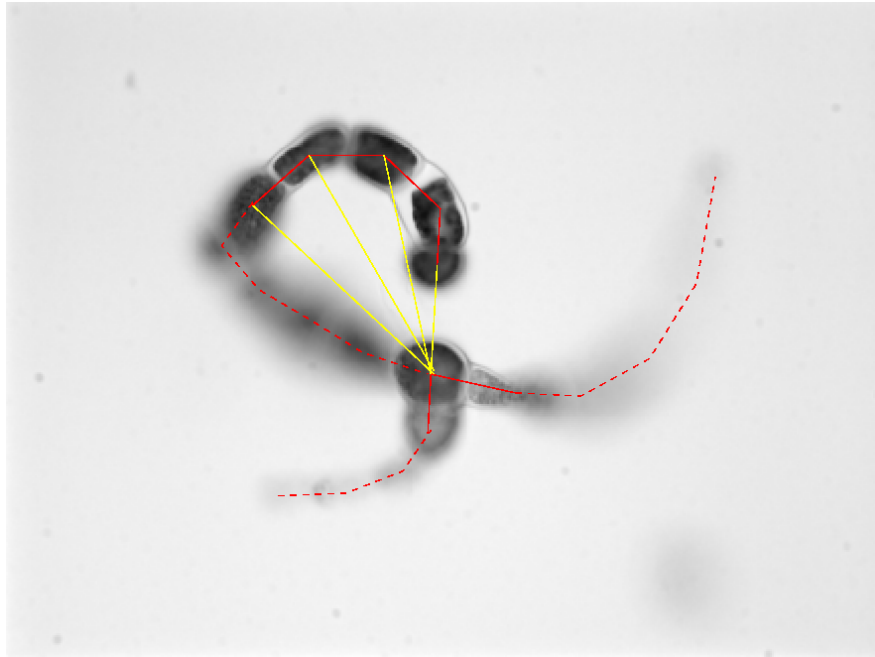


Abbildung 4.3: Ein Moos-Filament mit Distanzgraph. Gelbe Kanten sind Kanten die das Filament verlassen, rote Kanten sind Kanten innerhalb des Filaments.

### 4.3 Klassifizierung von Verzweigungspunkten

Die Klassifizierung der Verzweigungspunkte erfolgte anhand der Adjazenzmatrix des minimal spannenden Baumes. Verzweigungspunkte konnten einfach daran festgemacht werden, dass sie mehr als zwei Verbindungen zu benachbarten Knoten hatten. In Abbildung 4.4 ist ein Filament mit seiner Datenstruktur zu sehen. Für eine Klassifizierung eines Verzweigungspunktes muss man lediglich überprüfen, ob ein Knotenpunkt mehr als zwei Verbindungen zu benachbarten Knoten besitzt. Dies geschah durch zeilenweises Aufsummieren der Adjazenzmatrix. Ist die Summe einer Zeile größer als 2, so handelt es sich bei der mit dem Knoten identifizierten Zelle um einen Verzweigungspunkt. Auf diese Art und Weise lassen sich gleichzeitig die Endpunkte der Filamente bestimmen. Diese haben nämlich nur eine Kante zu einem benachbarten Knoten und somit ist die Zeilensumme der Adjazenzmatrix 1.

### 4.4 Bestimmung von Pfadlängen

Die Bestimmung der Pfadlängen ist ähnlich einfach wie die Klassifizierung von Verzweigungspunkten. Dazu wird jeder Kante die euklidische Distanz ihrer Knoten zugeordnet. Anschließend bestimmt man z.B. den längsten Pfad durch das Filament. Um jedoch eine genauere Messung der Längen zu ermöglichen wurde versucht die Kanten zwischen zwei benachbarten Knoten mit Hilfe des Votingraums aus Abschnitt 4.1 zu verfeinern. Die Idee dabei war, dass der Vote zur Mitte der Zelle zunimmt. Dazu wurde ausgehend von einem der beiden Knoten, mit einer festgelegten Schrittweite nach einem lokalen Maximum im Votingraum gesucht. Da aus biologischer Sicht noch nicht klar ist wie genau die Länge, besonders bei Filamenten mit mehreren Verzweigungen, gemessen werden soll, wurden diesbezüglich keine Daten erhoben. Es soll lediglich angemerkt werden, dass die Grundlage einer Längenmessung geschaffen wurde.

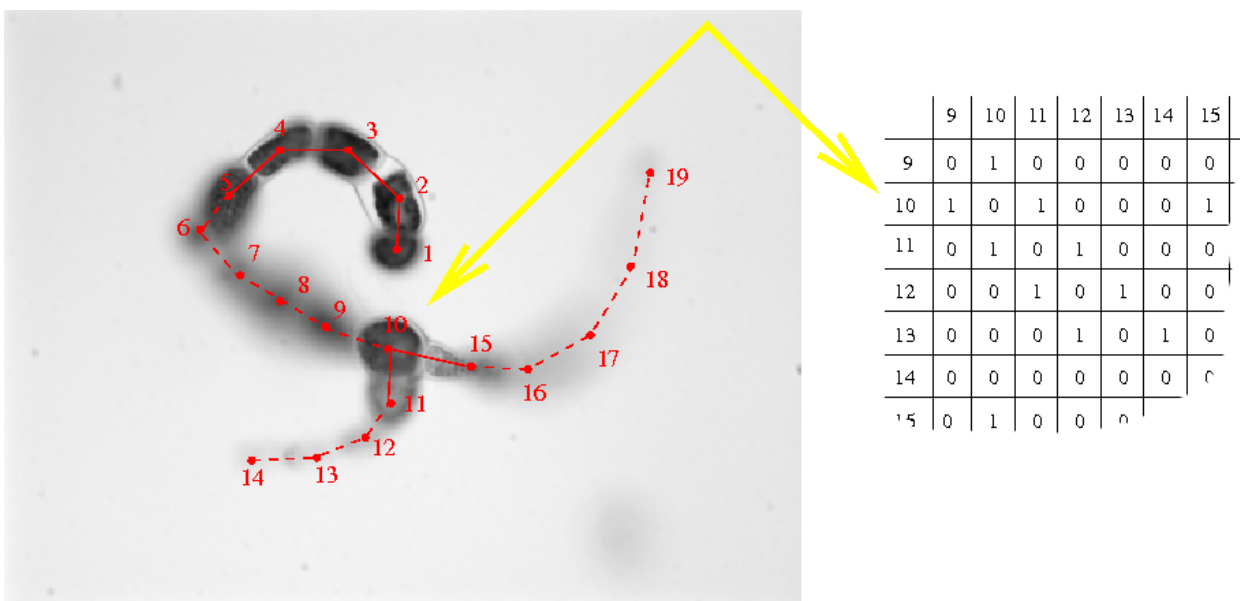
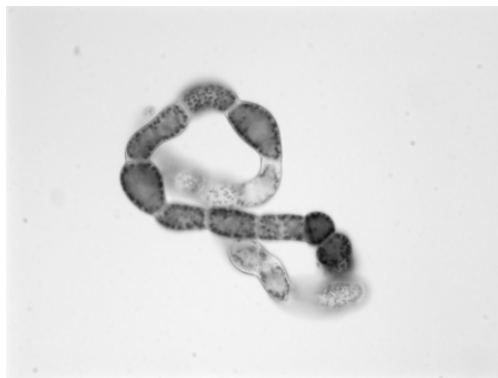


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Lokalisierung von Verzweigungspunkten. Links ist das Filament mit seiner Datenstruktur zu sehen. Rechts ist ein Ausschnitt der zugehörigen Adjazenzmatrix abgebildet.

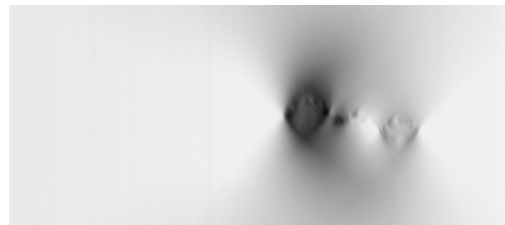
## 5 Experimente und Ergebnisse

### 5.1 Selektion der Trainingsbeispiele

Das Ergebnis der lokalen Schärfeschätzung ist in Abbildung 5.1 zu sehen. Hierbei sind Regionen mit hoher Intensität im Ergebnisbild ((c) und (d)), gut fokussierte Regionen im Originalbild ((a) und (b)).



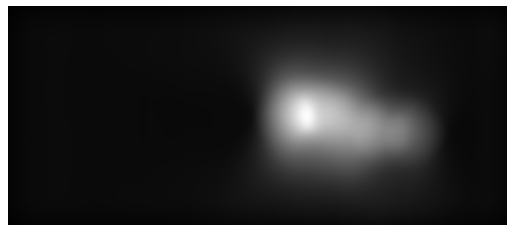
(a) Original



(b) Original



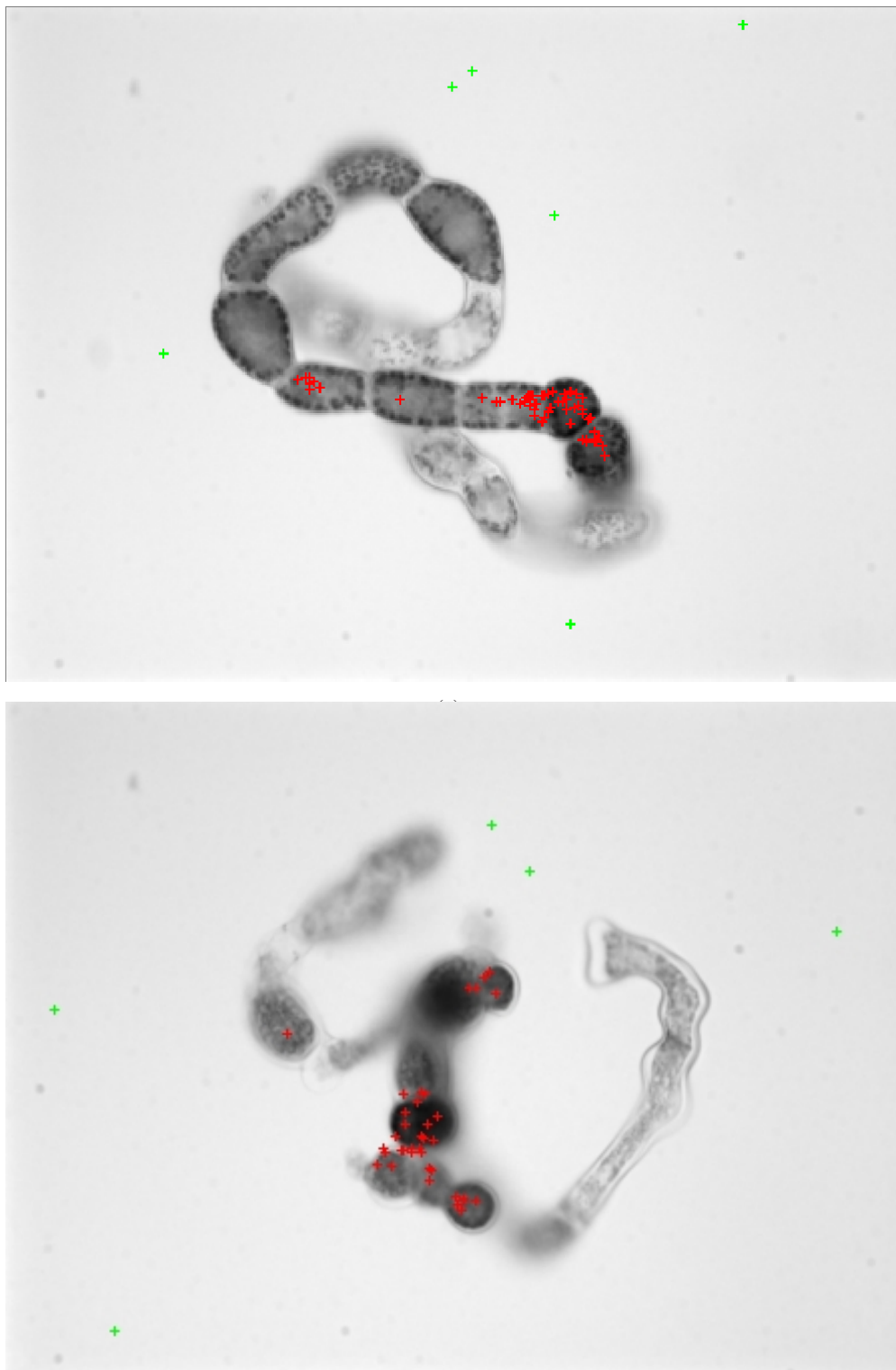
(c) Filterantwort des Gradientenfilters



(d) Filterantwort des Gradientenfilters

Abbildung 5.1: Ergebnis der lokalen Schärfeschätzung.

Ein typisches Ergebnis der automatischen Selektion ist in Abbildung 5.2 zu sehen. Beispiele für den Vordergrund sind rot gekennzeichnet, Beispiele für den Hintergrund sind grün gekennzeichnet. Hierbei ist zu sehen, dass die Beispiele für den Vordergrund sich stark an den dunklen Zellen clustern. Es mangelt an Trainingsbeispielen für die Caulonema (die hellen länglichen Zellen), was sich bei der Featureextraktion bemerkbar machte. Um dem entgegenzuwirken, könnte man versuchen die Anzahl der Trainingsbeispiele variabel zu halten, und über eine grobe Schätzung der Größe des im Datensatz vorliegenden Objekts, z.B über ein Schwellwertverfahren wie für die a-Priori Wahrscheinlichkeiten, mehr Trainingsbeispiele zu bestimmen, die das Gesamtobjekt besser repräsentieren.



(b)

Abbildung 5.2: Ergebnis der automatischen Selektion von Trainingsbeispielen eines Datensatzes. Hierbei sind die Beispiele für den Hintergrund grün und für den Vordergrund rot markiert.

## 5.2 Segmentierung

### 5.2.1 Grauwert

In Abbildung 5.3 sind Ergebnisse der Segmentierung mit dem Grauwert als invariantes Feature zu sehen. Probleme traten hierbei besonders in Bereichen der Caulonema auf. Die Segmentierung entlang der optischen Achse war sehr in die Länge gezogen und nahm oft die Form der Punktbildfunktion an. Die Masken waren oft unvollständig und führten zu unzusammenhängenden Segmentierungsergebnissen.

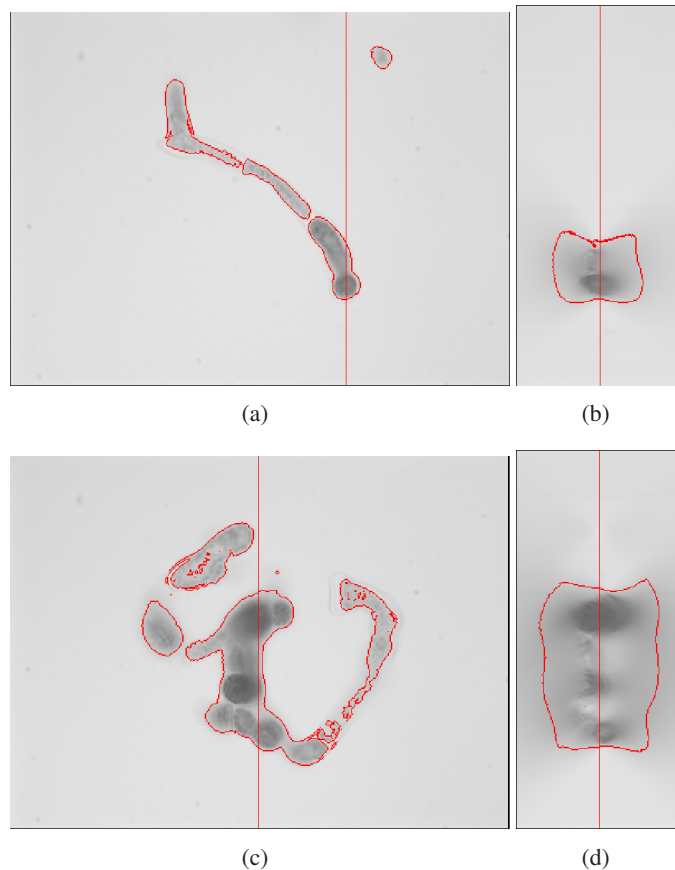


Abbildung 5.3: Ergebnis der Segmentierung mit dem Grauwert als Feature. In den Bildern ist jeweils das Original mit der Außenlinie der Maske (rot) abgebildet. In (a) und (c) sind jeweils ein Ausschnitt ein XY-Slice des Ergebnisses zu sehen, in (b) und (d) der dazugehörige XZ-Slice. Die Schnittebene ist mit einer roten Linie gekennzeichnet.

### 5.2.2 2-Punkt Integralinvarianten

Die Segmentierung auf Basis der 2-Punkt Integralinvarianten hatte ähnlich wie beim Grauwertfeature, Schwierigkeiten im Bereich der helleren Caulonema. Das korrespondierende Ergebnis zu Abbildung 5.3 ist in Abbildung 5.4 dargestellt. Auch hier war die zu geringe Trainingsmenge dafür verantwortlich, dass diese Bereiche nicht als Objekt segmentiert wurden. Zum Vergleich wurden die 2-Punkt Integralinvarianten auf einem handgelabelten Datensatz getestet (siehe Abbildung 5.5). Hier ist das Klassifizierungsergebnis der SVM des Datensatzes aus Abbildung 5.4(c) dargestellt. Die Segmentierung war besonders in den Bereichen der Caulonema besser als auf dem Datensatz mit automatisch selektierten Trainingsbeispielen, was daran lag, dass diese Stellen ausgiebiger gelernt wurden.

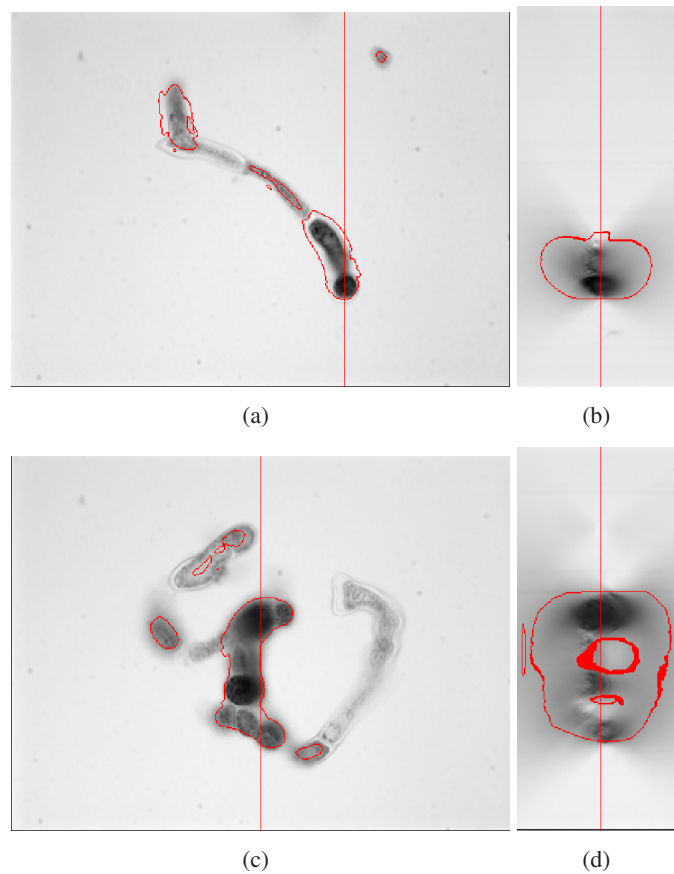


Abbildung 5.4: Ergebnis der Segmentierung mit 2-Punkt Integralinvarianten. In den Bildern ist jeweils das Original mit der Außenlinie der Maske (rot) abgebildet. In (a) und (c) sind jeweils ein Ausschnitt ein XY-Slice des Ergebnisses zu sehen, in (b) und (d) der dazugehörige XZ-Slice. Die Schnittebene ist mit einer roten Linie gekennzeichnet.



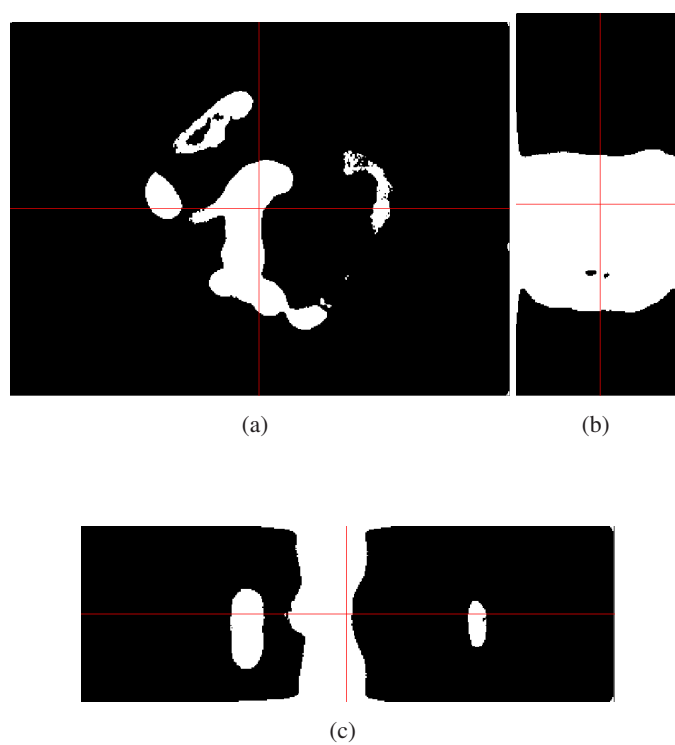


Abbildung 5.5: Ergebnis der Segmentierung mit 2-Punkt Integralinvarianten. Die Trainingsmenge wurde von Hand erstellt. Die Maske repräsentiert die Klassifizierungsergebnisse der SVM. Die roten Linien markieren die jeweilige Schnittebene.

### 5.2.3 Spherical Harmonic Descriptors

Die Spherical Harmonic Descriptors haben zu etwas besseren Ergebnissen als die 2-Punkt Integralinvarianten geführt. Die Probleme waren jedoch ähnlich zu denen der 2-Punkt Integralinvarianten, nämlich die schlechte Segmentierung im Bereich der Caulonema und entlang der optischen Achse. Die Ursache hierfür ist ebenfalls in den mangelnden Trainingsbeispielen für die Caulonema und in den Effekten der Punktbildfunktion zu suchen. Ergebnisse zu den Spherical Harmonic Descriptors sind in Abbildung 5.6 zu sehen.

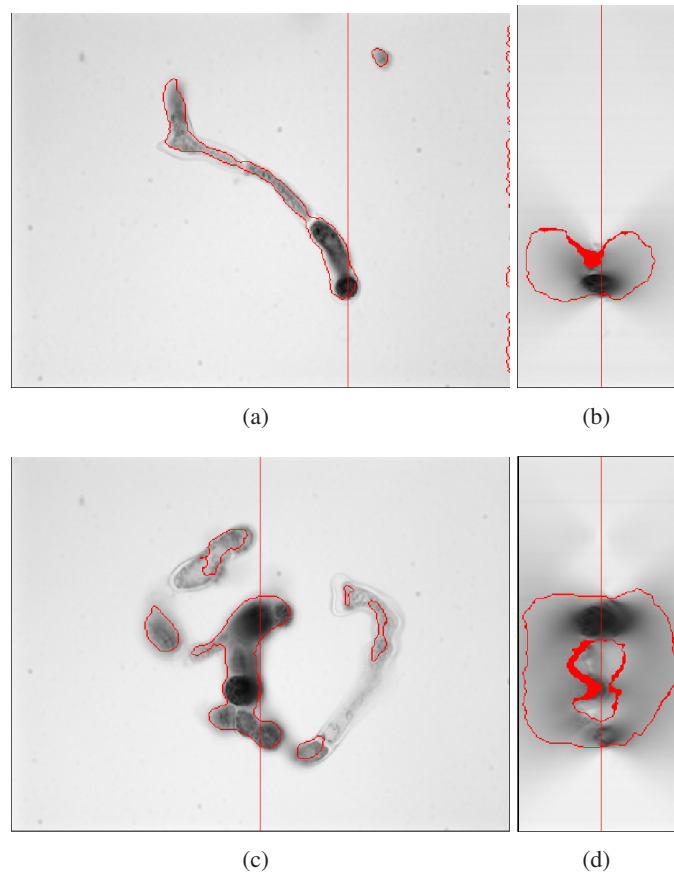


Abbildung 5.6: Ergebnis der Segmentierung mit Spherical Harmonic Descriptors. In den Bildern ist jeweils das Original mit der Außenlinie der Maske (rot) abgebildet. In (a) und (c) sind jeweils ein Ausschnitt ein XY-Slice des Ergebnisses zu sehen, in (b) und (d) der dazugehörige XZ-Slice. Die Schnittebene ist mit einer roten Linie gekennzeichnet.

### 5.2.4 Lokale Krümmungshistogramme

Mit den Krümmungshistogrammen wurden im Vergleich zu den anderen Features die besten Ergebnisse erzielt. Entlang der optischen Achse und in den Bereichen der Caulonema, entsprach die Segmentierung eher der vorhandenen Objektstruktur, als bei den Integralinvarianten oder dem Grauwert. Probleme traten vorwiegend auf, wenn sich die Protoplasten überlagerten. Dies führte teilweise zu großen Löchern in der Maske, wie Abbildung 5.8 zu sehen ist. Bei Betrachtung der Eigenwerte in diesen Bereichen wird deutlich, dass durch die Überlagerung fast die komplette Struktur der Protoplasten verloren ging, was dazu führte dass die Eigenwerte der Hessematrix in diesen Bereichen nahe bei Null lagen. In diesen Bereichen waren die extrahierten Features denen aus den strukturarmen Hintergrundbereichen ähnlicher als denen aus den Vordergrundsbereichen.

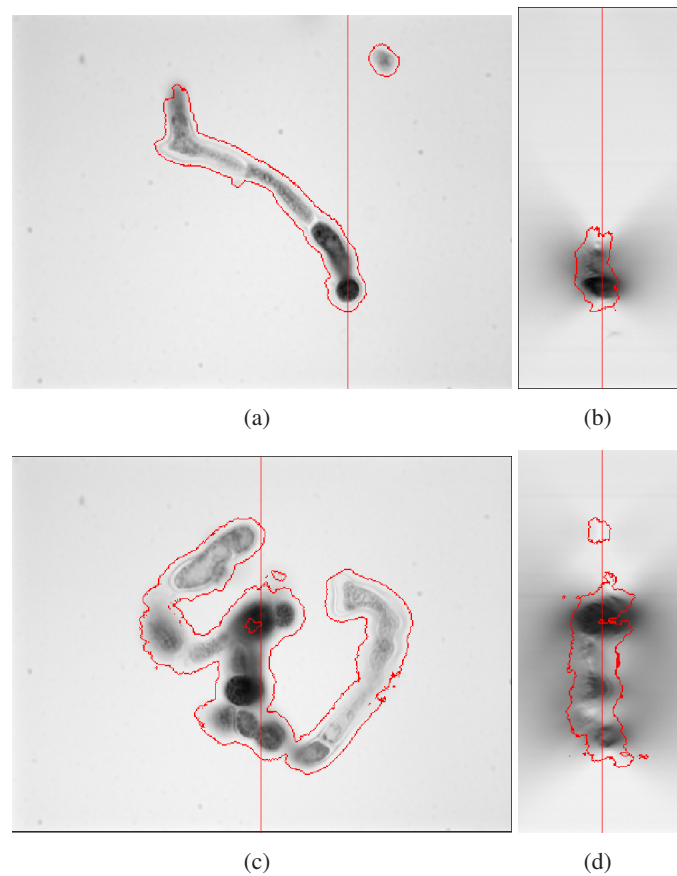


Abbildung 5.7: Ergebnis der Segmentierung mit lokalen Krümmungshistogrammen. In den Bildern ist jeweils das Original mit der Außenlinie der Maske (rot) abgebildet. In (a) und (c) sind jeweils ein Ausschnitt ein XY-Slice des Ergebnisses zu sehen, in (b) und (d) der dazugehörige XZ-Slice. Die Schnittebene ist mit einer roten Linie gekennzeichnet.

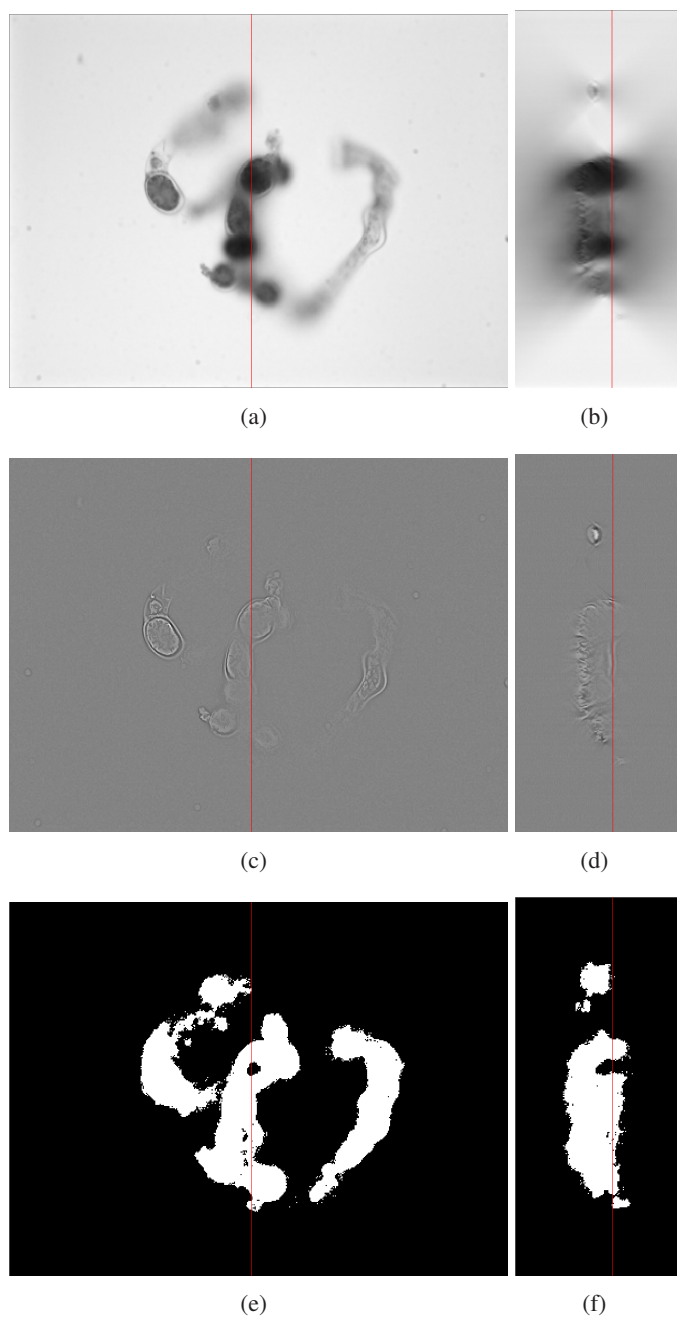


Abbildung 5.8: Probleme die bei der Segmentierung mit Krümmungshistogrammen in Zusammenhang mit Überlagerungen der Protoplasten auftraten: In (a),(b) sind Slices des Originaldatensatzes dargestellt. Die zugehörigen betragsmäßig größten Eigenwerte der Hessematrix sind in (a),(c) zu sehen (auf das Einheitsintervall skaliert). Die resultierende Maske ist in (e),(f) dargestellt. Die rote Linie symbolisiert hierbei die Schnittebene).

### 5.3 Lokalisierung der Zellzentren

Die Zellzentren wurden größtenteils richtig erkannt. Das Voting hat sowohl für einzelne Zellen (siehe Abbildung 5.9), als auch für größere Zellverbände (siehe Abbildung 5.10 und 5.11) gute Ergebnisse geliefert. In Einzelfällen wurden mehrere Maxima für eine Zelle in verschiedenen Ebenen gefunden, was negativen Einfluss auf den Aufbau des Graphen und den daraus resultierenden Baum hatte (siehe Abschnitt 5.4). Ebenso konnte es vorkommen, dass Maxima gefunden wurden, die mit keiner Zelle korrespondierten (siehe Abbildung 5.11(a) oben). Hier wurde ein Maximum zwischen zwei benachbarten Zellen gefunden. Probleme bei der Lokalisation traten auch in Verbindung mit Zellen auf, die sehr verblasst waren (siehe Abbildung 5.11(b)). Hier wurden keine Zellen lokalisiert, da das Voting für die Zellen in diesen Bereichen zu schwach war.

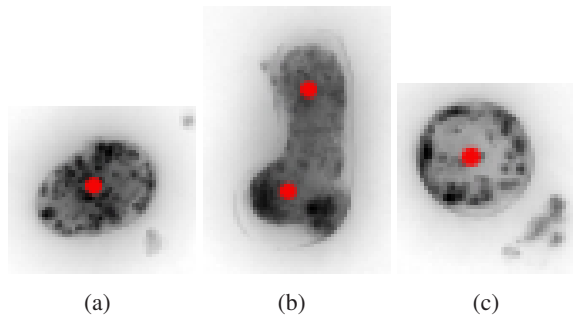


Abbildung 5.9: Ergebnisse der Lokalisation der Zellzentren einzelner Zellen.

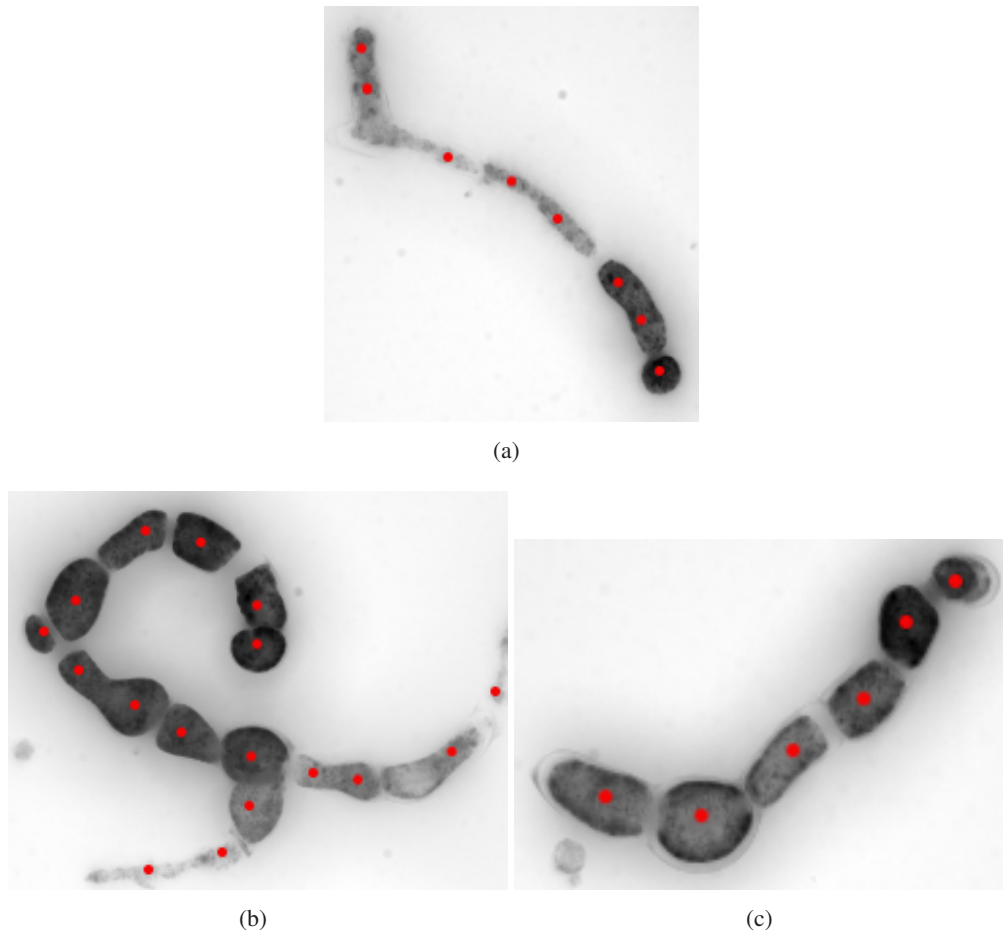
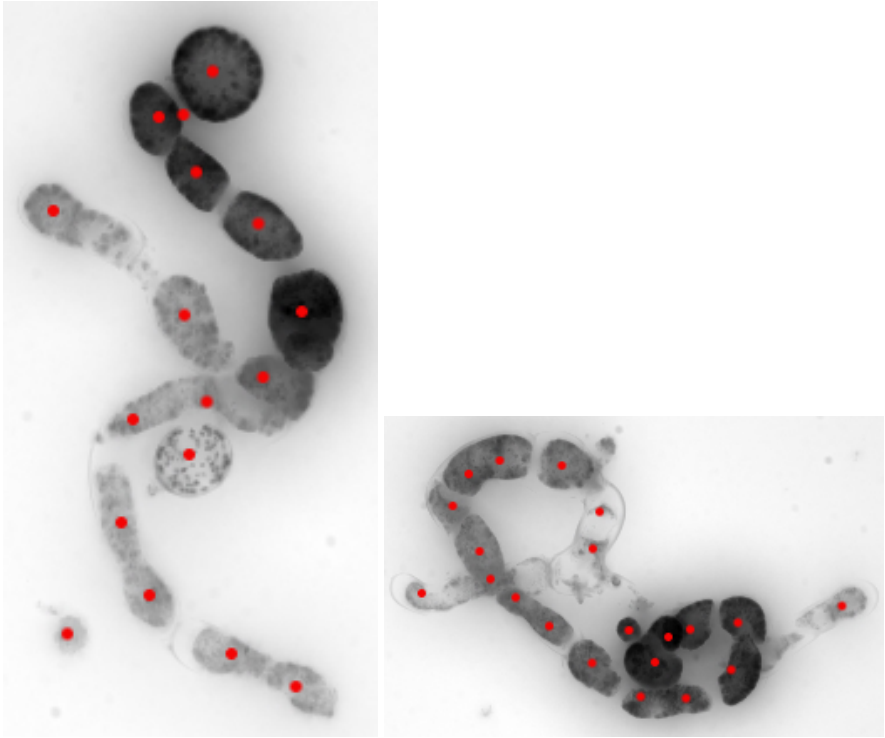
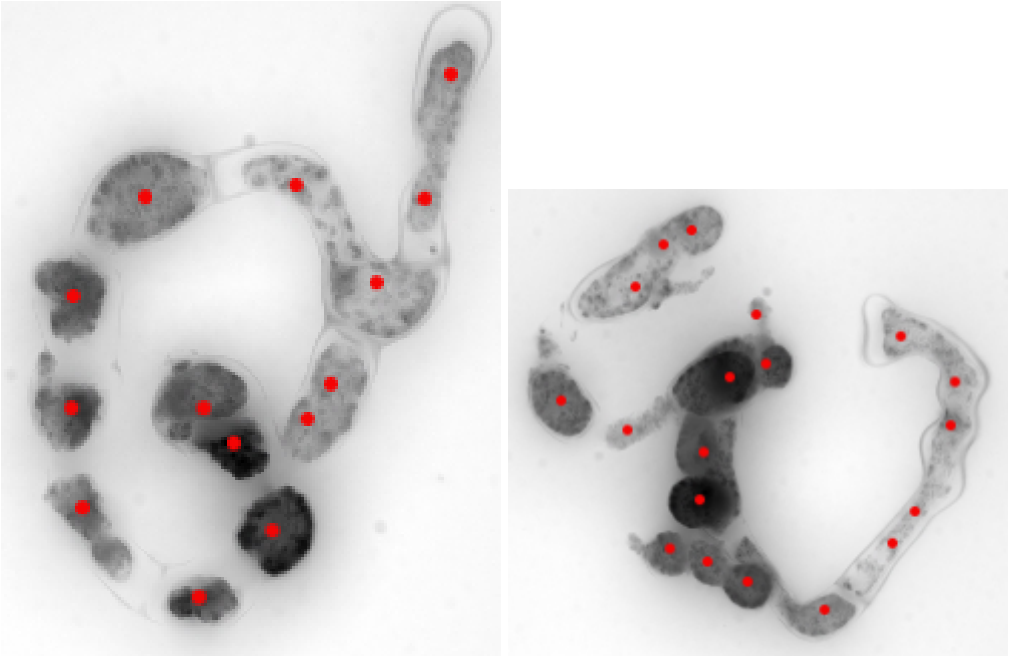


Abbildung 5.10: Ergebnisse der Lokalisation der Zellzentren von Filamenten ohne Überlagerung.



(a)

(b)



(c)

(d)

Abbildung 5.11: Ergebnisse der Lokalisierung der Zellzentren von Filamenten die sich überlagerten.

## 5.4 Minimal spannende Bäume

Die resultierenden Bäume sind in Abbildung 5.12 und 5.13 für eine lineare Bestrafungsfunktion und in Abbildung 5.14 und 5.15 für eine exponentielle Bestrafungsfunktion der Liniensegmente dargestellt, die außerhalb der Maske liegen. Die Ergebnisse sind größtenteils identisch. Für die errechneten Ergebnisse dienten die auf den Krümmungshistogrammen basierenden Segmentierungsergebnisse. Wenn sich die Protoplasten nicht überlagerten, waren die resultierenden Bäume eine gute Approximation für die geometrische Struktur der Protoplasten (siehe Abbildung 5.12 und 5.13). Kam es jedoch zu Überlagerungen mehrerer Protoplasten, waren die resultierenden Bäume keine gute Beschreibung der geometrischen Gegebenheiten. Die Ursachen für eine schlechte Beschreibung der Protoplasten durch das Modell sind jedoch in den Vorverarbeitungsschritten zu suchen. Schlechte Segmentierungsergebnisse und eine ungenaue bzw. fehlerhafte Lokalisation der Zellzentren, führten zu einem nicht repräsentativen Modell der Protoplasten. Ebenfalls ein wichtiger Punkt beim Aufbau des Graphen ist die Kostenfunktion. Die Kostenfunktion war in diesem Fall stark abhängig von der zugrunde liegenden Segmentierung. In Abbildung 5.13(b) ist der Datensatz aus Abbildung 5.8 zu sehen. Hier ist der direkte Einfluss der Segmentierung auf den Graphen deutlich erkennbar. Es führt keine Kante durch das Loch in der Maske, da die Kosten zu hoch sind. Ein Beispiel für die Lokalisation von zwei übereinander liegenden Zellzentren ist in Abbildung 5.13(a) zu sehen. Hier wurden für die dunkle Zelle links unten zwei Maxima gefunden, was später zu einem falsch klassifizierten Verzweigungspunkt führte.



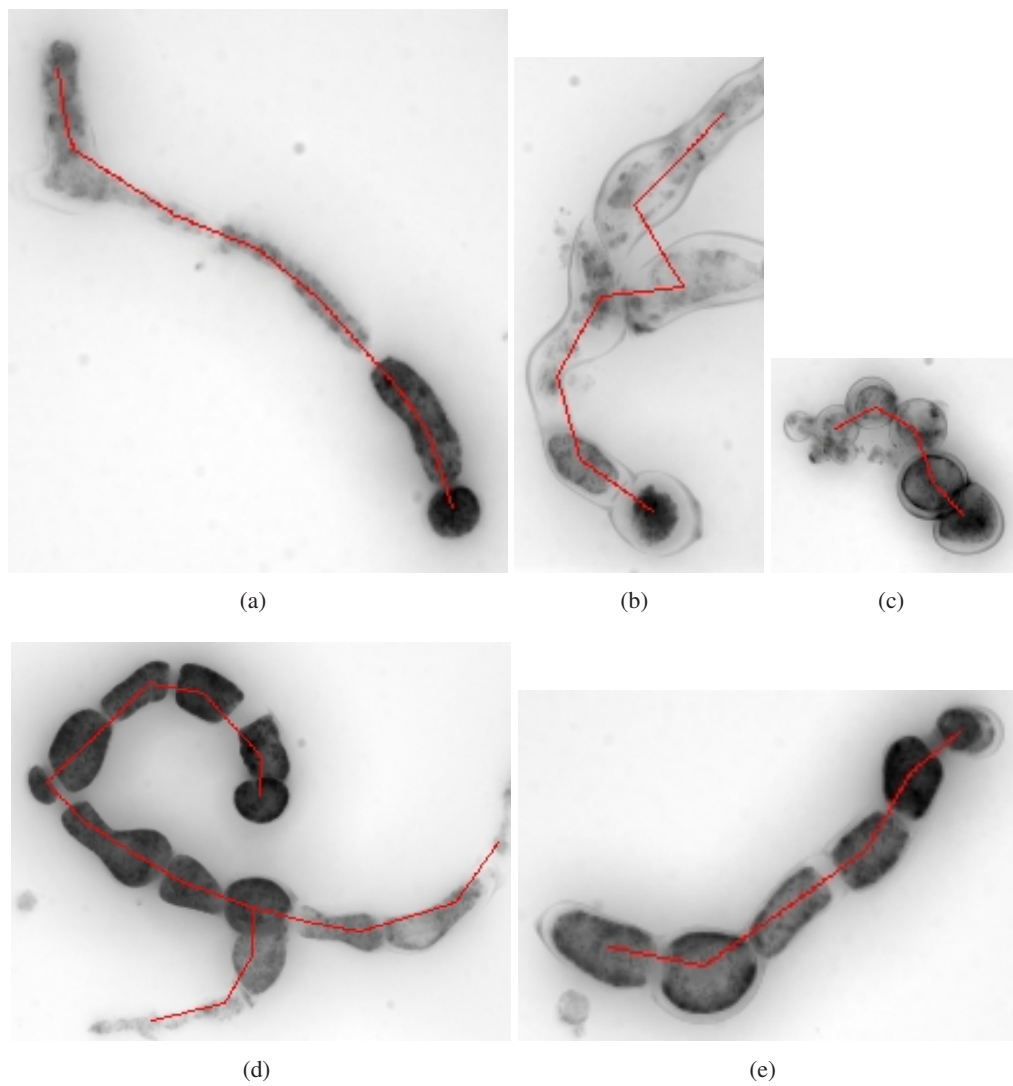


Abbildung 5.12: Resultierender minimal spannender Baum unter Verwendung einer linearen Bestrafungsfunktion. Die abgebildeten Filamente überlagern sich nicht.

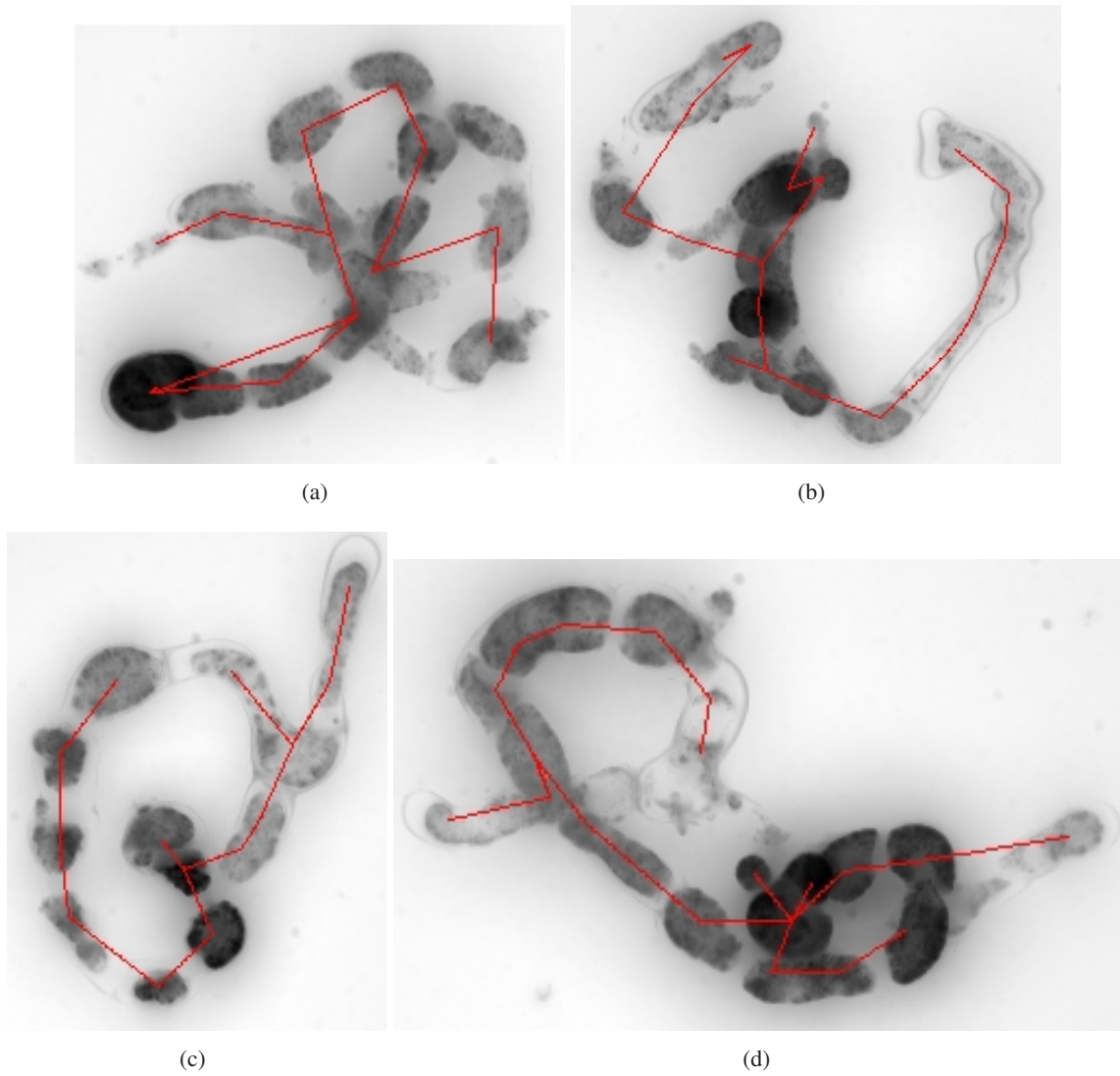


Abbildung 5.13: Resultierender minimal spannender Baum unter Verwendung einer linearen Bestrafungsfunktion. Die abgebildeten Filamente überlagern sich teilweise.

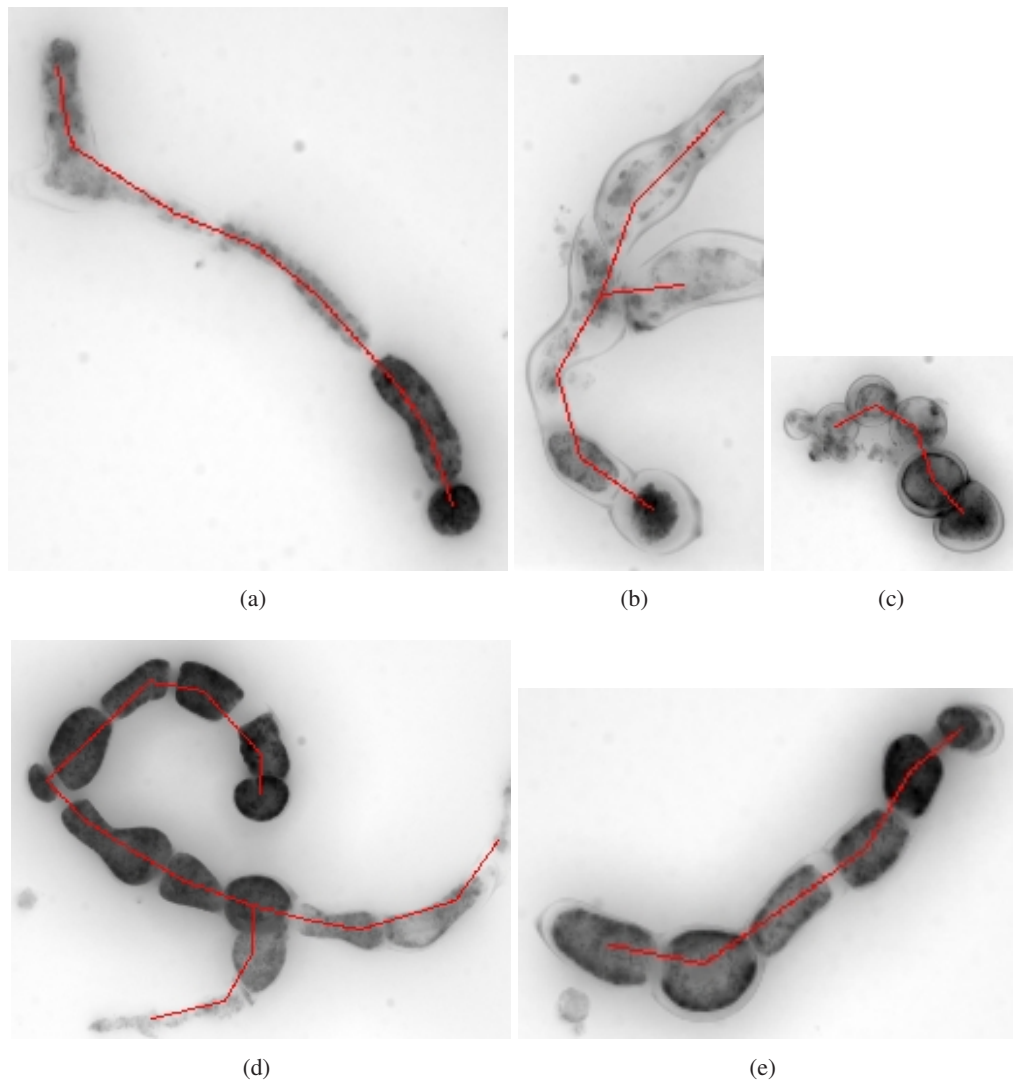


Abbildung 5.14: Resultierender minimal spannender Baum unter Verwendung einer exponentiellen Bestrafungsfunktion. Die abgebildeten Filamente überlagern sich nicht.

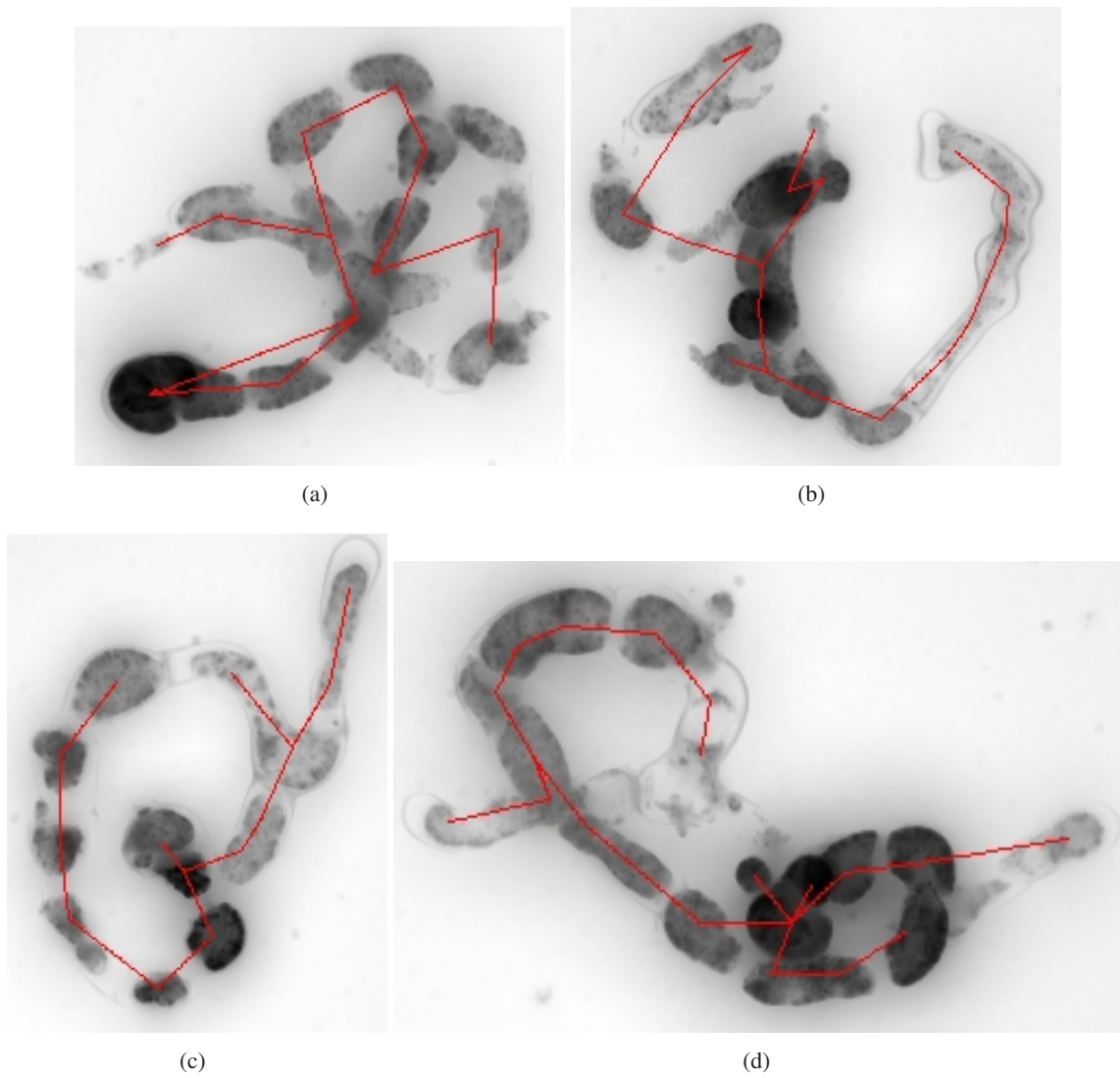
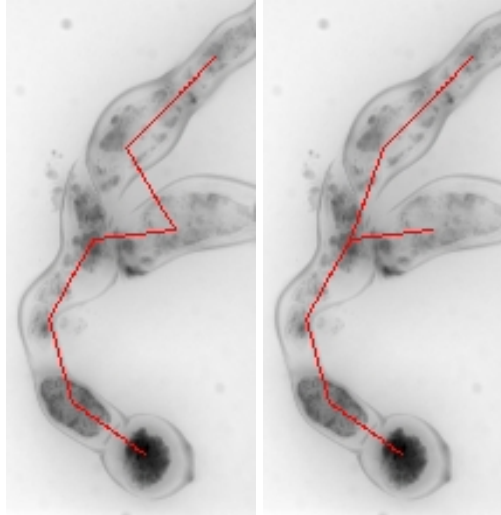


Abbildung 5.15: Resultierender minimal spannender Baum unter Verwendung einer exponentiellen Bestraufungsfunktion. Die abgebildeten Filamente überlagern sich teilweise.

### 5.4.1 Einfluss der Kostenfunktion

Dass die Kostenfunktion einen großen Einfluss auf den resultierenden Baum hat, kann man in Abbildung 5.16 sehen. Die lineare Bestrafung des außerhalb des Objektes liegenden Liniensegments reichte nicht aus um die Kante mit entsprechenden Kosten zu bestrafen.



(a) Lineare Bestrafung (b) Exponentielle Bestrafung

Abbildung 5.16: Beispiele für den resultierenden minimal spannenden Baum mit linearer Bestrafung des Liniensegments das außerhalb der Segmentierung liegt (a) und exponentieller Bestrafung (b).

## 5.5 Klassifikation der Verzweigungspunkte

Auf die Klassifikation der Verzweigungspunkte hat man durch den gewählten Ansatz, nach Aufbau des Graphen keinen Einfluss mehr. Die Probleme die im Zusammenhang mit der Klassifizierung der Verzweigungspunkte auftraten, haben ihre Ursachen im Aufbau des Graphen und damit zusammenhängend in der Segmentierung und Lokalisation der Zellzentren.

Nachfolgend sind die klassifizierte Verzweigungspunkte zu den in den Abbildungen 5.14 und 5.15 dargestellten Protoplasten abgebildet. Als Referenzdaten sind in Abbildung 5.19 Ergebnisse von CLSM Datensätzen zu sehen.

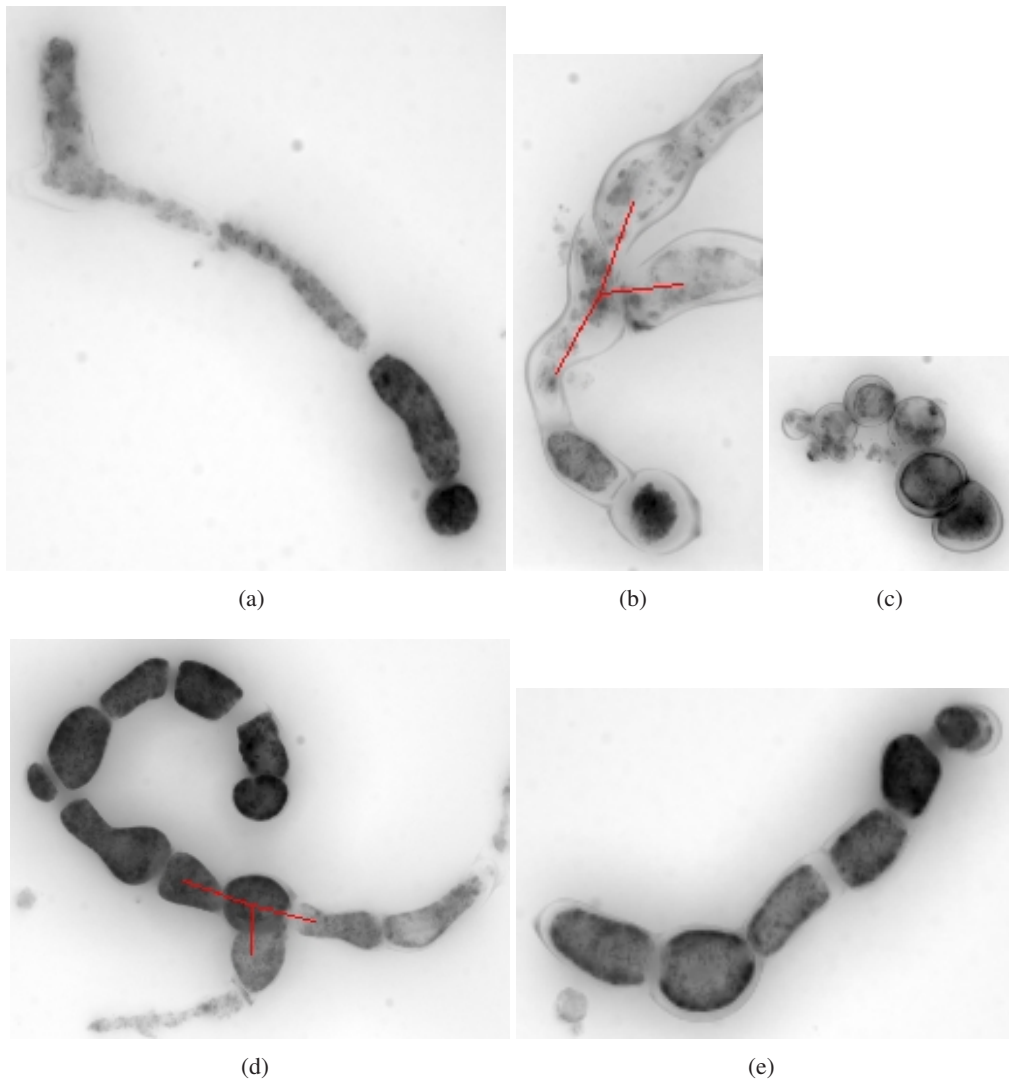


Abbildung 5.17: Klassifizierte Verzweigungspunkte der Protoplasten aus Abbildung 5.14.

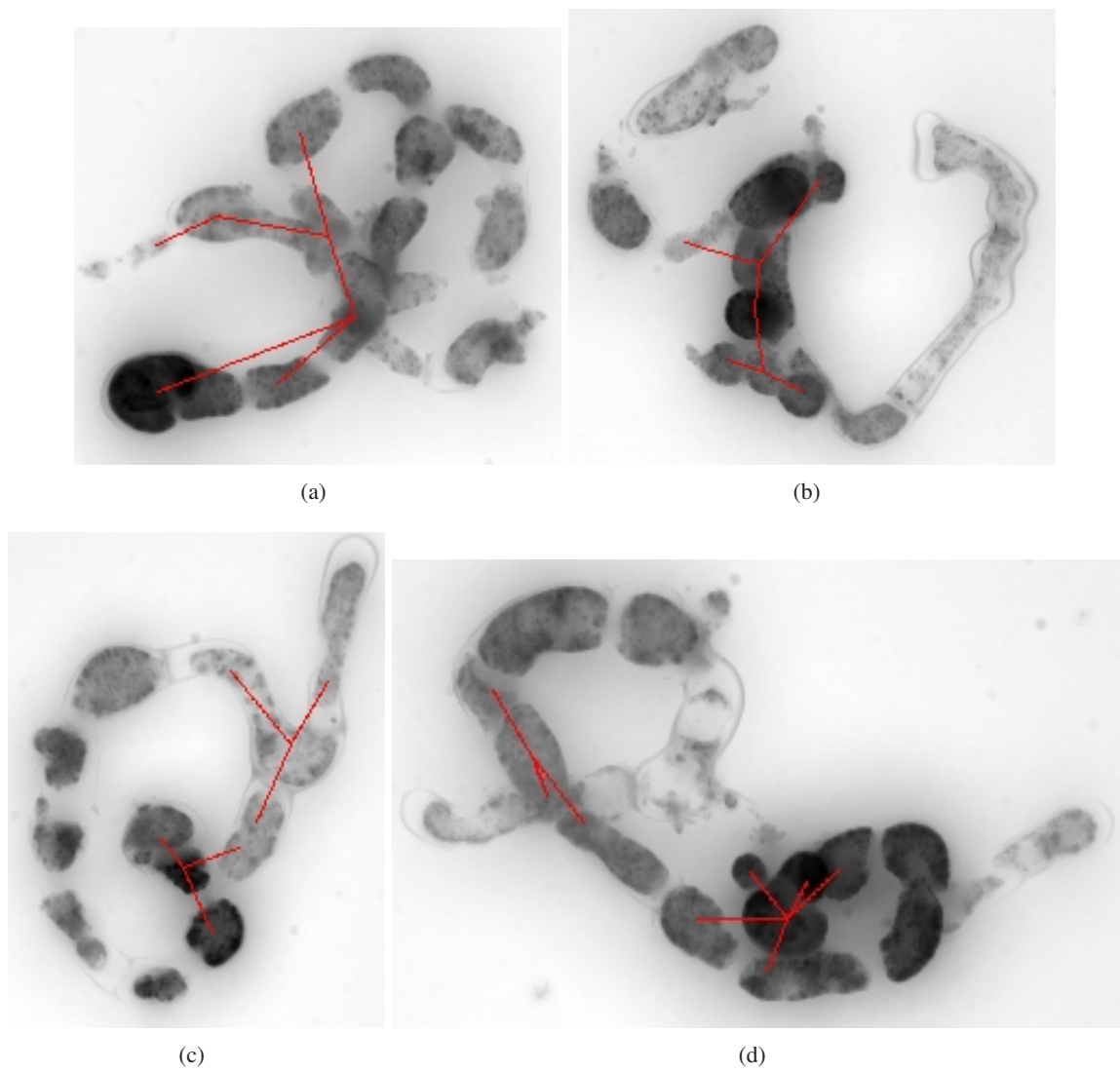


Abbildung 5.18: Klassifizierte Verzweigungspunkte der Protoplasten aus Abbildung 5.15.

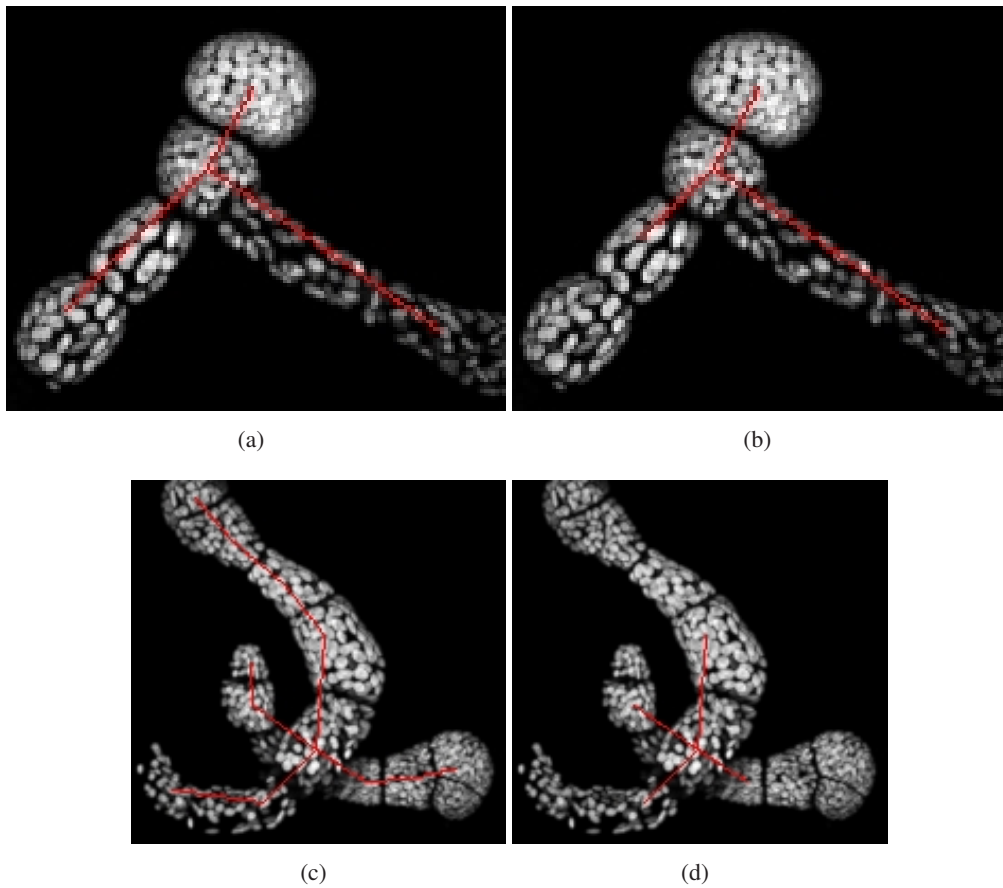


Abbildung 5.19: Ergebnisse auf CLSM Datensätzen. Links sind die minimal spannenden Bäume zu sehen und rechts die klassifizierten Verzweigungspunkte.



## 5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Verfahren untersucht, mit denen aus mikroskopischen Aufnahmen, ein 3-dimensionales Modell der zu untersuchenden Objekte erstellt werden kann.

Die meisten Probleme die dabei aufgetreten sind, waren auf die schlechte Segmentierung zurückzuführen. Zum einen standen durch die automatische Selektion der Trainingsbeispiele zu wenig Beispiele für den Vordergrund im Bereich der Caulonema zur Verfügung, was bei den meisten Features zu einer schlechten Segmentierung führte. Zum anderen waren Effekte der Punktbildfunktion Ursachen für die schlechten Segmentierungsergebnisse entlang der optischen Achse. Es traten vermehrt Probleme auf, wenn sich die Protoplasten entlang der optischen Achse überlagerten. Eine Trennung der Objekte in diesen Bereichen war mit den verwendeten Verfahren nicht möglich.

Auch die Bestimmung der Zellzentren war in Bereichen in denen sich die Protoplasten überlagerten sehr ungenau. Dies hatte zwangsläufig Auswirkungen auf den Aufbau des Graphen und den daraus berechneten minimal spannenden Baum.

Die automatische Selektion der Trainingsbeispiele hat vermehrt zu Problemen bei der Segmentierung geführt, daher sollte untersucht werden, ob die Selektion der Trainingsbeispiele durch Auswahlverfahren verbessert werden kann, die nicht auf einem lokalen Schärfekriterium basieren, wie es hier verwendet wurde.

Ebenso sollte überprüft werden, ob eine Kombination verschiedener Features, die Ergebnisse der Segmentierung, verbessert. Denkbar wäre z.B. eine Kombination der Spherical Harmonic Descriptors und 2-Punkt Integralinvarianten.

Eine Verbesserung bei der Lokalisation der Zellzentren wäre sicherlich dadurch zu erreichen, invariante Merkmale von ausgewählten Trainingsbeispielen zu lernen und in einem zusätzlichen Schritt die lokalisierten Zellzentren zu verifizieren.

Die Kostenfunktion wie sie zur Bestimmung des minimal spannenden Baumes verwendet wurde, sollte ebenfalls noch verbessert werden. Man könnte z.B. große Abweichungen entlang der optischen Achse verbieten, um besonders in den Regionen in denen Überlagerungen der Protoplasten auftreten die Ergebnisse zu verbessern. Die Punktbildfunktion sollte beim Entwurf der Kostenfunktion mitberücksichtigt werden.



# Abbildungsverzeichnis

2.1	Beispiele für extrahierte Features mittels Haarintegration. In (a)-(d) ist jeweils ein XY-Slice der Features abgebildet. . . . .	5
2.2	Ergebnisse der Spherical Harmonic Descriptors. Dargestellt sind die Funktionen $f_1$ und $f_2$ . Die Auswertung wurde auf einer Kugel mit Radius $r = 5\mu\text{m}$ durchgeführt. . . . .	6
2.3	Typische Merkmalsvektoren der lokalen Krümmungshistogramme. . . . .	7
2.4	In (a) ist der Originaldatensatz zu sehen. Die korrespondierenden betragsmäßig größten Eigenwerte der Hessematrix sind in (b) dargestellt. . . . .	7
2.5	Beispiel eines Binärbildes (a) mit zugehörigem Graphen (b). . . . .	9
2.6	Beispiel eines Connected Component Labelings. In (a) ist ein Ausschnitt des Originaldatensatzes zu sehen. In (b) sind die Connected Components jeweils mit demselben Grauwert dargestellt. . . . .	10
3.1	Filterantwort des Krümmungs- (a) und Oberflächendetektors (b) . . . . .	13
3.2	Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Unterdrückung von Nebenmaxima . . . .	14
3.3	Ergebnis der Oberflächenextraktion auf einem CLSM Datensatz. . . . .	14
3.4	Ergebnis der Oberflächenextraktion auf einer Fluoreszenzaufnahme. . . . .	15
4.1	In (a) ist eine schematische Darstellung des Votingverfahrens zu sehen. Der resultierende Votingraum ist in (b) dargestellt. Der geglättete Votingraum ist in (c) zu sehen. Rot markierte Punkte sind hierbei lokale Maxima. . . . .	17
4.2	Ein ungerichteter Graph mit einem minimal spannenden Baum. . . . .	18
4.3	Ein Moos-Filament mit Distanzgraph. Gelbe Kanten sind Kanten die das Filament verlassen, rote Kanten sind Kanten innerhalb des Filaments. . . . .	19
4.4	Schematische Darstellung der Lokalisierung von Verzweigungspunkten. Links ist das Filament mit seiner Datenstruktur zu sehen. Rechts ist ein Ausschnitt der zugehörigen Adjazenzmatrix abgebildet. . . . .	20
5.1	Ergebnis der lokalen Schärfeschätzung. . . . .	21
5.2	Ergebnis der automatischen Selektion von Trainingsbeispielen eines Datensatzes. Hierbei sind die Beispiele für den Hintergrund grün und für den Vordergrund rot markiert. . . . .	22
5.3	Ergebnis der Segmentierung mit dem Grauwert als Feature. In den Bildern ist jeweils das Original mit der Außenlinie der Maske (rot) abgebildet. In (a) und (c) sind jeweils ein Ausschnitt ein XY-Slice des Ergebnisses zu sehen, in (b) und (d) der dazugehörige XZ-Slice. Die Schnittebene ist mit einer roten Linie gekennzeichnet. . . . .	23
5.4	Ergebnis der Segmentierung mit 2-Punkt Integralinvarianten. In den Bildern ist jeweils das Original mit der Außenlinie der Maske (rot) abgebildet. In (a) und (c) sind jeweils ein Ausschnitt ein XY-Slice des Ergebnisses zu sehen, in (b) und (d) der dazugehörige XZ-Slice. Die Schnittebene ist mit einer roten Linie gekennzeichnet. . . . .	24
5.5	Ergebnis der Segmentierung mit 2-Punkt Integralinvarianten. Die Trainingsmenge wurde von Hand erstellt. Die Maske repräsentiert die Klassifizierungsergebnisse der SVM. Die roten Linien markieren die jeweilige Schnittebene. . . . .	25

5.6	Ergebnis der Segmentierung mit Spherical Harmonic Descriptors. In den Bildern ist jeweils das Original mit der Außenlinie der Maske (rot) abgebildet. In (a) und (c) sind jeweils ein Ausschnitt ein XY-Slice des Ergebnisses zu sehen, in (b) und (d) der dazugehörige XZ-Slice. Die Schnittebene ist mit einer roten Linie gekennzeichnet. . . . .	26
5.7	Ergebnis der Segmentierung mit lokalen Krümmungshistogrammen. In den Bildern ist jeweils das Original mit der Außenlinie der Maske (rot) abgebildet. In (a) und (c) sind jeweils ein Ausschnitt ein XY-Slice des Ergebnisses zu sehen, in (b) und (d) der dazugehörige XZ-Slice. Die Schnittebene ist mit einer roten Linie gekennzeichnet. . . . .	27
5.8	Probleme die bei der Segmentierung mit Krümmungshistogrammen in Zusammenhang mit Überlagerungen der Protoplasten auftraten: In (a),(b) sind Slices des Originaldatensatzes dargestellt. Die zugehörigen betragsmäßig größten Eigenwerte der Hessematrix sind in (a),(c) zu sehen (auf das Einheitsintervall skaliert). Die resultierende Maske ist in (e),(f) dargestellt. Die rote Linie symbolisiert hierbei die Schnittebene). . . . .	28
5.9	Ergebnisse der Lokalisation der Zellzentren einzelner Zellen. . . . .	29
5.10	Ergebnisse der Lokalisation der Zellzentren von Filamenten ohne Überlagerung. . . . .	30
5.11	Ergebnisse der Lokalisation der Zellzentren von Filamenten die sich überlagerten. . . . .	31
5.12	Resultierender minimal spannender Baum unter Verwendung einer linearen Bestrafungsfunktion. Die abgebildeten Filamente überlagern sich nicht. . . . .	33
5.13	Resultierender minimal spannender Baum unter Verwendung einer linearen Bestrafungsfunktion. Die abgebildeten Filamente überlagern sich teilweise. . . . .	34
5.14	Resultierender minimal spannender Baum unter Verwendung einer exponentiellen Bestrafungsfunktion. Die abgebildeten Filamente überlagern sich nicht. . . . .	35
5.15	Resultierender minimal spannender Baum unter Verwendung einer exponentiellen Bestrafungsfunktion. Die abgebildeten Filamente überlagern sich teilweise. . . . .	36
5.16	Beispiele für den resultierenden minimal spannenden Baum mit linearer Bestrafung des Liniensegments das außerhalb der Segmentierung liegt (a) und exponentieller Bestrafung (b). . . . .	37
5.17	Klassifizierte Verzweigungspunkte der Protoplasten aus Abbildung 5.14. . . . .	38
5.18	Klassifizierte Verzweigungspunkte der Protoplasten aus Abbildung 5.15. . . . .	39
5.19	Ergebnisse auf CLSM Datensätzen. Links sind die minimal spannenden Bäume zu sehen und rechts die klassifizierten Verzweigungspunkte. . . . .	40

# Literaturverzeichnis

- [AJU05] AGUET, F., M. JACOB und M. UNSER: *Three-Dimensional Feature Detection Using Optimal Steerable Filters*. In *Proceedings of the 2005 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP'05)*, Ausgabe II, S. 1158–1161, Genova, Italy, September 11-14, 2005.
- [BFL06] BOYKOV, YURI und GARETH FUNKA-LEA: *Graph Cuts and Efficient N-D Image Segmentation*. *Int. J. Comput. Vision*, 70(2):109–131, 2006.
- [Bur98] BURGESS, CHRISTOPHER J. C.: *A Tutorial on Support Vector Machines for Pattern Recognition*. *Data Mining and Knowledge Discovery*, 2(2):121–167, 1998.
- [FA91] FREEMAN, W. T. und E. H. ADELSON: *The design and use of steerable filters*. *IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 13(9):891–906, 1991.
- [JU04] JACOB, M. und M. UNSER: *Design of Steerable Filters for Feature Detection Using Canny-Like Criteria*. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 26(8):1007–1019, August 2004.
- [KFR03] KAZHDAN, M., T. FUNKHOUSER und S. RUSINKIEWICZ: *Rotation invariant spherical harmonic representation of 3D shape descriptors*. *Symposium on Geometry Processing*, 5:167–175, 2003.
- [LLW03] LIN, H., C. LIN und R. WENG: *A note on Platt's probabilistic outputs for support vector machines*. *Tech. Report*, Department of Computer Science and Information Engineering, National Taiwan University, 2003.
- [Pla99] PLATT, J.: *Probabilistic outputs for support vector machines and comparison to regularized likelihood methods*. In *MIT Press*, S. 61–74, 1999.
- [RBS02] RONNEBERGER, O., H. BURKHARDT und E. SCHULTZ: *General-purpose Object Recognition in 3D Volume Data Sets using Gray-Scale Invariants...* In *Proceedings of the International Conference on Pattern Recognition*, Quebec, Canada, September 2002.
- [Ron04] RONNEBERGER, O: *Libsvmml - a support vector machine template library*. download at: <http://lmb.informatik.uni-freiburg.de/lmbsoft/libsvmml/>, 2004.
- [SM95] SCHULZ-MIRBACH, HANNS: *Invariant Features for Gray Scale Images*. In *Mustererkennung 1995, 17. DAGM-Symposium*, S. 1–14, London, UK, 1995. Springer-Verlag.
- [SSR<sup>+</sup>06] SCHULZ, J., T. SCHMIDT, O. RONNEBERGER, H. BURKHARDT, T. PASTERNAK, A. DOVZHENKO und K. PALME: *Fast Scalar and Vectorial Grayscale Based Invariant Features for 3D Cell Nuclei Localization and Classification*. In *Proceedings of the 28th Pattern Recognition Symposium of the German Association for Pattern Recognition (DAGM 2006)*, Berlin, Germany. LNCS, Springer, 2006. DAGM Award.