

Tagungsband

Mustererkennung 1994

Erkennen und Lernen

**16. DAGM Symposium
und 18. Workshop der ÖAGM**

Herausgegeben von
Walter G. Kropatsch und Horst Bischof

Inhaltsverzeichnis

Eingeladene Vorträge

<i>C. Fermüller, Y. Aloimonos, (Univ. of Maryland/USA)</i> On the geometry of visual correspondence	1
<i>W. von Seelen, S. Bohrer, Ch. Engels, W. Gillner, H. Janßen, H. Neven, G. Schöner, W.M. Theimer, B. Völpel, (Ruhr Univ. Bochum)</i> Visual Information Processing in Neural Architecture	36
<i>F. Leberl, M. Gruber, P. Uray, F. Madritsch (TU-Graz)</i> Trade-Offs in the Reconstruction and Rendering of 3-D Objects	58

Bildverstehen

<i>V. Müller, (MAZ-Mikroelektronik, Hamburg)</i> Analysis of Optical Reflection. A new Approach to Surface Inspection	74
<i>A. Ueltschi, H. Bunke, (Univ. Bern)</i> Effiziente modellbasierte Objekterkennung in Tiefenbildern	81
<i>A. Kaupp, A. Dölemeyer, R. Schlösser, R. Wilzeck, S. Wolf, D. Meyer- Ebrecht, (RWTH-Aachen)</i> Automatische Analyse der retinalen Morphologie mit einem hierarchischen Bildverarbeitungsansatz	91
<i>F. Kummert, G. Sagerer, (Univ. Bielefeld)</i> Objekterkennung mit Hidden Markov Modellen	101
<i>F. Glazer, (Amerinex Artificial Intelligence/USA)</i> Curve Finding by Ridge Detection and Grouping	109

Räumliches Sehen

<i>D. Reimann, H. Haken, (Univ. Stuttgart)</i> Mustererkennung und Stereoskopie	117
<i>M. Trobina, A. Leonardis, F. Ade, (ETH-Zürich)</i> Grasping Arbitrarily Shaped Objects	126
<i>G.-Q Wei, G. Hirzinger, (DLR-Oberpfaffenhofen)</i> Learning Shape from Shading by Neural Networks	135

<i>T. Scholz, B. Jähne, H. Suhr, G. Wehnert, P. Geissler, K. Schneider</i> (Univ. Heidelberg)	
A new Depth from Focus Technique for In Situ Determination of Cell Concentration in Bioreactors	145
<i>R. Kutka, R. Lacroix, (Siemens-München)</i>	
Bestimmung von Tangentialpunkten zur Unterstützung der Objektrekonstruktion aus Stereobildern	155
Bewegung	
<i>R. Schuster, (TU-München)</i>	
Adaptive Modeling in Color Image Sequences	161
<i>A. Dölemeyer, H. Toonen, A. Kaupp, R. Schlösser, S. Wolf, D. Meyer-Ebrecht, (RWTH-Aachen)</i>	
Bewegungskompensation videofluoreszenzangiographisch gewonnener Bildsequenzen der Netzhaut	170
<i>Ch. Schnörr, (Univ. Hamburg)</i>	
Bewegungssegmentation von Bildfolgen durch die Minimierung konvexer nicht-quadratischer Funktionale	178
<i>N. Navab, S. Mann, (MIT Media Lab/USA)</i>	
Recovery of Relative Affine Structure Using the Motion Flow Field of a Rigid Planar Patch	186
<i>B. Jähne, (Univ. Heidelberg)</i>	
A Comparative Analytical Study of Low-Level Motion Estimators in Space-Time Images	196
Anwendungen & Sprache	
<i>R. Eils, S. Dietzel, E. Bertin, E. Schröck, Y. Usson, M. Robert-Nicoud, T. Cremer, Ch. Cremer, (Univ. Heidelberg)</i>	
3D-Voronoi Diagramme zur quantitativen Bildanalyse in der Interphase-Cytogenetik	207
<i>R. Sablatnig, H. Bischof, (TU-Wien)</i>	
Strukturelle Beschreibung von kunstgeschichtlichen Portraitminiaturen	220
<i>H. Aust, M. Oerder, (Philips-Aachen)</i>	
Generierung einer Datenbankanfrage aus einem gesprochenen Satz mit einer stochastischen attributierten Grammatik	230

<i>A. Jusek, H. Rautenstrauch, G. A. Fink, F. Kummert, G. Sagerer, J. Carson-Berndsen, D. Gibbon, (Univ. Bielefeld)</i>	
Detektion unbekannter Wörter mit Hilfe phonotaktischer Modelle	238

<i>H. Weisser, (Volkswagen AG Wolfsburg)</i>	
Sichtweitenbestimmung durch Rechnersehen	246

Neurale Netzwerke

<i>S. Drüe, R. Hoischen, R. Trapp, (GH Paderborn)</i>	
Tolerante Objekterkennung durch das Neuronale Active-Vision-System NAVIS	253

<i>M. Schlang, M. Haft, K. Abraham-Fuchs, (Siemens München)</i>	
A Comparison of RBF and MLP Networks for Reconstruction of Focal Events from Bioelectric/Biomagnetic Field Patterns	265

<i>H. Bischof, (TU-Wien)</i>	
Learning in Pyramidal Neural Networks	273

<i>M. Klusch, (Univ. Kiel)</i>	
Using a Hybrid Neural System for Astronomical Classification Tasks	281

<i>R. Moratz, S. Posch, G. Sagerer, (Univ. Bielefeld)</i>	
Controlling Multiple Neural Nets with Semantic Networks	288

Theorie

<i>A. Teuner, O. Pichler, B.J. Hosticka, (Univ. Duisburg)</i>	
Unüberwachte Selektion und Abstimmung von dyadischen Gaborfiltern zur Textursegmentierung	296

<i>G. Laufkötter, M.M. Richter, H.- G. Stark, A. Divivier, (Univ. Kaiserslautern)</i>	
Ein Multiskalenansatz zur Klassifikation von Bildinhalten	304

<i>R. Sprengel, Ch. Schnörr, B. Neumann, (Univ. Hamburg)</i>	
Detection of Visual-Data Transitions in "Nonlinear Parameter-Space"	315

<i>H. Schulz-Mirbach, (TU-Hamburg-Harburg)</i>	
Algorithms for the construction of invariant features	324

<i>S. Kröner, (TU-Hamburg-Harburg)</i> Ein neues Verfahren zur Berechnung von Translationsinvarianten	333
---	-----

Lernen

<i>R. Herpers, H. Kattner, G. Sommer, (GSF-Oberschleißheim)</i> GAZE: Eine attentive Verarbeitungsstrategie zum Erkennen und Lernen der visuell auffälligen Gesichtsregionen	341
--	-----

<i>M. Busemann, G. Hartmann, K.O. Kräuter, (GH-Paderborn)</i> Kann ein Robot-Vision-System handgeschriebene Ziffern lesen?	350
--	-----

<i>C.-E. Liedtke, A. Blömer, (Univ. Hanover)</i> Lernen von Konfigurationswissen	359
--	-----

<i>J. Bruske, G. Sommer, (Univ. Kiel)</i> Learning with Dynamic Cell Structures	369
---	-----

<i>B.T. Messmer, H. Bunke, (Univ. Bern)</i> Erkennen und Lernen zweidimensionaler Objekte mittels Subgraph-Isomorphismus	377
--	-----

PLAKATE

Theorie

<i>M.H. Groß, R. Koch, L. Lippert, A. Dreger, (ZGDV-Darmstadt)</i> Segmentierung und Klassifikation von Texturen mittels Wavelets und neuronalen Netzen	387
---	-----

<i>D. Willersinn, (TU-Wien)</i> Parallel Adaptive Contraction for Hierarchical Cellular Complexes	401
---	-----

<i>H. Süße, K. Voss, (Univ. Jena)</i> Affinvariante Standardlagen und Separationsmethode . . .	409
--	-----

<i>M. J. Berchtold, (Carl-Zeiss Oberkochen)</i> Adaptive Resonance Theory and Classical Clustering Algorithms: A Mathematical Analysis	417
--	-----

<i>P. Kohlhepp, (Kernforschungszentrum Karlsruhe)</i>	
Hierarchische Flächenzerlegung von Laserscannerbildern zur Objekterkennung in SOMBRERO	426
<i>H. Winter, T. Holz, (Graphikon GmbH., Berlin)</i>	
Schnelle Hough-Transformation unter Nutzung eines modifizierten Ansatzes zur Geradenparametrisierung	438
<i>A. Kaup, S. Heinen, (RWTH-Aachen)</i>	
Ein Modell zur Kompensation örtlicher Wahrnehmungslücken beim menschlichen Sehen basierend auf lokaler Spektralanalyse	449

Medizinische Anwendungen

<i>D. Richter, R. Schumacher, R. Trabhardt, (FH-Wiesbaden)</i>	
Eindimensionale Fourier-Analyse ultraschall-dokumentierter Schwingungsmuster des Rückenmarks	457
<i>C. Roßmanith, H. Handels, E. Rinast, S.J. Pöpl, (Univ. Lübeck)</i>	
Bildanalytische Verfahren zur Charakterisierung von Hirntumoren in dreidimensionalen MR-Schichtbildfolgen . . .	466
<i>B. Schack, W. Vilser, E. Bareshova, Ch. Bräuer-Burchardt, G. Gießbach, H. Witte, M. Arnold, P. Putsche, (FSU-Jena)</i>	
Anwendung adaptiver Verfahren zur Erfassung der Position und des Durchmessers von Blutgefäßen am Augenhintergrund	474
<i>M. Schreckenberger, M. Joswig, (RWTH Aachen)</i>	
Automatisches Erkennen von Rippenstrukturen in Thorax-Röntgenbildern mittels Hough-Transformation	482
<i>W. Pomrehn, M. Joswig, (RWTH Aachen)</i>	
Pseudoimpedanz statt Echogenität: Ein Beitrag zur Verbesserung der Strukturerkennbarkeit in Ultraschallbildern	490
<i>W. Böcker, W. U. Müller, C. Streffer, (Univ. Klinikum Essen)</i>	
Automated Binucleated Cell Recognition and Micronuclei Counting System	498

Räumliches Sehen

<i>F. Kruggel, G. Lohmann, (Neurologische Klinik München)</i>	
Oberflächen aus Konturen	506

<i>R. Sara, (TU-Prag)</i>	
Physical Correctness of Local Shading Analysis	511
<i>V. Hlavac, T. Pajdla, M. Sommer, (TU-Prag)</i>	
On Curvature Computation Using the Convolution with the Gaussian	519
<i>R. Beß, (Univ. Erlangen-Nürnberg)</i>	
Kalibrierung einer beweglichen, monokularen Kamera zur Tiefengewinnung aus Bildfolgen	524
<i>A. Eder-Hinterleitner, (TU-Wien)</i>	
Ein robustes Rekonstruktionsverfahren zur Bestimmung der Form von Gräben für die archäologische magnetische Prospektion	532
<i>A. Gondring, (Braunschweig)</i>	
Orthographische Projektion perspektivisch verzerrter Tiefenbilder	540
Neurale Netzwerke	
<i>W.-M. Lippe, Th. Feuring, R. Hohenstein, A. Jankrift, (Univ. Münster)</i>	
Klassifikation neuromagnetischer Daten mittels künstlicher neuronaler Netze	548
<i>K. Hrabý, H. Bischof, (TU-Wien)</i>	
Identifizieren von Gesichtern durch Steuerung der visuellen Aufmerksamkeit	557
<i>E. Thurner, H. Bischof, (TU-Wien)</i>	
Modulare neuronale Architekturen in der Mustererkennung	566
<i>G. Hellmann, M. Spreng, H. Stefan, (Univ. Erlangen-Nürnberg)</i>	
Comparison of Spike Detection Algorithms based on Time Series Analysis and Feature Extraction using Neural Networks in Epilepsy Surgery	575
<i>P. Weierich, M. von Rosenberg, J. Leisenberg, H. Niemann, (FORWISS Erlangen)</i>	
Unüberwachte Identifikation von Fahrzuständen mit Hierarchischen Selbstorganisierenden Karten	581

E. Pelikan, F. Vogelsang, B. Schulz, M. Egmont-Petersen, K. Bohndorf, T. Tolxdorff, (TU-Hamburg-Harburg)
Texturbasierte Segmentierung von Röntgenbildern mittels Multilayer-Perzeptron und Topologischer Karte 589

R. Suna, P. Eisenhauer, (Univ. Karlsruhe)
Schweißnahtverfolgung mit Kohonennetzen 601

Hardware/Industrielle Anwendungen

M. Nölle, G. Schreiber, H. Schulz-Mirbach, (TU-Hamburg-Harburg)
PIPS- A general purpose Parallel Image Processing System 609

K.-H. Franke, H. Kempe, D. Kollhoff, M. Gräf, J. Wienecke, H. Ofner, (TU-Ilmenau)
Unschärfe Farbklassifikation und Strukturbewertung zur Echtzeitsegmentierung von Mikrodefekten 624

R. Gämlich, (Diehl GmbH, Röthenbach)
Wissensbasierte Gütebestimmung von Lederhäuten 634

W. Krattenthaler, K.J. Mayer, M. Zeiller, (FZ-Seibersdorf)
Point Correlation: A New Approach for High Speed Template Matching 642

C. Schnörr, (Univ. Stuttgart)
Untersuchungen zur Farb- und Polarisationsinformation des Streulichtes bei der Partikelkontrolle in Ampullen 650

L. Lohmann, B. Nickolay, (FH Inst. IPK Berlin)
Systeme der kanten- und texturorientierten Szenenanalyse am Beispiel der Automatisierung in der Umwelttechnik 658

J. Amelung, G. Lambert, J. Pfister, (TH Darmstadt)
Ein vektorbasiertes Verfahren zur schnellen Fehlererkennung in strukturierten Texturen 666

Bildfolgen

S. Richter, (FORWISS, München)
Modellbasierte Straßenerkennung 676

Ch. Baghdassarian, H. Lange, H. Sahli, E. Laugeau, (ENSM-Paris)
Fast recognition of road markings with use of the model of the scene in each level of processing 685

<i>O. Grau, (Univ, Hanover)</i>	
Bewegungskompensierte Akkumulation verrauschter Bildsequenzen	696
<i>A. Luo, H. Burkhardt, (TU Hamburg-Harburg)</i>	
An Intensity-Based Method for the 3-D Motion and Structure Estimation from Binocular Image Sequences	703
<i>Ch. Born, (Ruhr Univ. Bochum)</i>	
Determining the Focus of Expansion by Means of Flowfield Projections	711
<i>C. Goerick, M. Brauckmann, (Ruhr Univ. Bochum)</i>	
Local Orientation Coding and Neural Network Classifiers with an Application to Real Time Car Detection and Tracking . .	720
Autorenindex	728

3D-Voronoi Diagramme zur quantitativen Bildanalyse in der Interphase-Cytogenetik

Roland Eils^{1,4}, Steffen Dietzel², Etienne Bertin³, Evelin Schröck², Yves Usson³, Michel Robert-Nicoud³, Thomas Cremer², Christoph Cremer^{4,1}

¹Interdisziplinäres Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen (IWR), Universität Heidelberg, INF 368, 69120 Heidelberg, BRD

²Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universität Heidelberg

³Equipe DyoGen and Lab. TIMC (CNRS URA 1618)

Université Joseph Fourier, 38041 Grenoble cedex, France

⁴Institut für Angewandte Physik, Universität Heidelberg

Zusammenfassung. Um die Anordnung von Chromosomen in Zellkernen der Interphase zu untersuchen, wurde ein Verfahren aus der Computergeometrie adaptiert. Dieser Ansatz basiert auf der Zerlegung von dreidimensionalen Bildvolumen mithilfe des Voronoi-Diagramms in konvexe Polyeder. Die graphenorientierte, geometrische Struktur dieses Verfahrens ermöglicht sowohl eine schnelle Extraktion von Objekten im Bildraum als auch die Berechnung morphologischer Parameter wie Volumina, Oberflächen und Rundheitsfaktoren.

In diesem Beitrag wird exemplarisch die dreidimensionale Morphologie von X-Chromosomen in weiblichen Interphasezellkernen mithilfe dieser drei Parameter untersucht. Um diese Zellkerne mit lichtoptischen Methoden zu untersuchen, wurden die Territorien der X-Chromosomen mit einem molekularcytogenetischen Verfahren fluoreszierend dargestellt. Zur Unterscheidung des aktiven und inaktiven X-Chromosoms wurde das Barr-Körperchen zusätzlich markiert und mithilfe eines Epifluoreszenzmikroskops, ausgerüstet mit einer CCD-Kamera, aufgenommen. Anschließend wurden 12 - 25 äquidistante, lichtoptische Schnitte der X-Chromosomenterritorien mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) aufgenommen. Diese lichtoptischen Schnitte wurden mithilfe des Voronoi-Verfahrens segmentiert und analysiert. Methoden aus der Computergraphik wurden zur Visualisierung der Ergebnisse eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß mithilfe des Voronoi-Verfahrens Chromosomen-Territorien anhand der morphologischen Parameter zuverlässig beschrieben werden können.

Schlüsselwörter: 3D-Segmentierung, Voronoi-Diagramme, Quantitative Bildanalyse

1 Einleitung

Untersuchungen zur dreidimensionalen Anordnung der Chromosomen im Zellkern waren aus methodischen Gründen lange nicht durchführbar. Diese Situation hat sich mit der Entwicklung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie grundlegend geändert. In Übereinstimmung mit den frühen Hypothesen von Rabl und Boveri zu Beginn dieses Jahrhunderts (für einen Überblick siehe Cremer, 1985) konnte gezeigt werden, daß Chromosomen im Zellkern distinkte Territorien bilden (Cremer *et al.*, 1984; Lichter *et al.*, 1988). Seitdem konzentrieren sich die Untersuchungen auf die Klärung der Zusammenhänge zwischen der dreidimensionalen Organisation und Anordnung spezifischer Chromosomenterritorien und ihren molekulargenetischen Funktionen (Cremer *et al.*, 1993).

Ein Vergleich der dreidimensionalen Struktur der beiden X-Chromosomen in weiblichen Zellen ist dabei von besonderem Interesse (Walker *et al.*, 1991; Bischoff *et al.*, 1993). Denn es ist schon lange bekannt, daß in jedem Zellkern eines der beiden X-Chromosomen weitgehend biologisch inaktiv ist (Lyon, 1961). Mit wenigen Ausnahmen sind die auf dem inaktiven X-Chromosom (Xi) angesiedelten Gene "abgeschaltet". Mit bestimmten Färbeverfahren kann Xi im Zellkern von Säugetieren als kompaktes, heterochromatisches Territorium, das sogenannte Barr-Körperchen, nachgewiesen werden (Barr und Bertram, 1949). Nach einer verbreiteten ist nur Xi in der Interphase stark kondensiert, während sein aktiver Gegenpart Xa stark dekondensiert ist. Diese Annahme resultiert aus der Vorstellung, daß das stark aufgelockerte Chromatin von Xa die Transkription seiner Gene erleichtert. Nach gängigen Vorstellungen sollte das Volumen von Xa daher um ein Vielfaches größer sein als von Xi. Die selektive Darstellung der beiden X-Chromosomen mittels Fluoreszenzhybridisierung ermöglichte erstmals die experimentelle Überprüfung dieser Vorstellung (Bischoff *et al.*, 1993).

Umfangreiche Versuche zur Bestimmung der Gestalt, Volumina und intranuklearen Position von einzelnen Chromosomen oder definierten Chromosomensubregionen mit konventionellen Fluoreszenz-Mikroskopen oder konfokalen Laser Scanning Mikroskopen (CLSM) (Manuelidis und Borden, 1988; van Dekken *et al.*, 1989; Popp *et al.*, 1990; Geiger *et al.*, 1991) waren bislang stark in ihrer quantitativen Aussagekraft eingeschränkt. Brechungsaberrationen (Visser *et al.* 1992; Hell *et al.*, 1992), Grenzen computergestützter Rekonstruktionsverfahren (Erhard *et al.*, 1985, Laub *et al.*, 1985; Schwarzmann und Wu, 1990) und subjektive Bewertungen bei der interaktiven, computergestützten Analyse von einzelnen Bildern der lichtoptischen Schnitte können einen erheblichen Einfluß auf die Resultate haben. Die Anwendung von einfachen, zweidimensionalen Schwellwertverfahren zur Extraktion von unscharfen Objekten aus einem verrauschten Hintergrund zeigt exemplarisch die Schwierigkeiten solcher Verfahren zur quantitativen Bildanalyse (Rinke *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Die Ergebnisse von Volumenmessungen einzelner Chromosomenterritorien zeigen sich dabei sehr stark abhängig von der Wahl der

Schwellenwerte. Nach unserer Kenntnis wurden bislang in der Literatur bei derartigen Untersuchungen Verfahren zu einer echt dreidimensionalen, quantitativen Bildanalyse nicht angewandt. In diesem Beitrag wird ein dreidimensionales Verfahren aus der Computergeometrie, die Bildzerlegung mithilfe des Voronoi-Diagramms, für die quantitative Bildanalyse von Chromosomenterritorien eingesetzt. Es wird gezeigt, daß dieses Verfahren geeignet ist, um die Ausdehnung, Gestalt und Oberfläche der beiden X-Chromosomenterritorien in weiblichen Zellkernen vergleichend zu untersuchen.

2 Bildformierung

2.1 Objekt-Präparation

In Zellkernen kultivierter, weiblicher Fruchtwasserzellen (46,XX) wurde nach Fixierung mit gepufferten Formalin das Barr-Körperchens mit 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) gefärbt (Dyer *et al.*, 1989; Bischoff *et al.*, 1993). Anschließend wurden die Territorien von Xa und Xi mittels chromosomaler in situ Suppressions (CISS-) Hybridisierung unter Verwendung einer DNA-Bibliothek des menschlichen X-Chromosoms mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) dargestellt und die Zellen in einem "anti-fading" Medium eingebettet (für Einzelheiten siehe Lichter und Cremer, 1992; Bischoff *et al.*, 1993).

2.2 3D-Aufnahme der Chromosomenterritorien

Die Lokalisation des Barr-Körperchens wurde mit Hilfe einer an ein Epifluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) gekoppelten CCD-Kamera (Photometrics) dokumentiert (du Manoir *et al.*, 1993). Anschließend wurden von jedem Zellkern mit einem konfokalen Laser Scanning Fluoreszenz Mikroskop (TCS, Leica) lichtoptische Serienschritte aufgenommen. FITC wurde mit einem Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die Auflösung des verwendeten Objektivs (Plan Apo 63x/NA 1.4 Öl) beträgt 200 nm lateral und 500 nm entlang der optischen Achse. Um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wurde jede Bildlinie 16 mal gescannt und gemittelt. Für jeden optischen Schnitt wurde ein digitalisiertes Fluoreszenzbild mit einer Größe von 256 x 256 Pixel und 8-Bit-Tiefe erzeugt. Der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Schnitten betrug jeweils 300 nm. Für jeden Zellkern wurde in Abhängigkeit von der Höhe des Kerns 12 bis 25 Schnitte durchgeführt (Abb. 1). Dieses Datenvolumen wurde auf einer magneto-optischen Platte (ProOpt 650) gespeichert und zur Weiterverarbeitung auf eine Silicon Graphics (SGI) Workstation transferiert (SGI IRIS INDIGO, CPU R4000, 100 MHz, 64 MB RAM, Elan-Grafik).

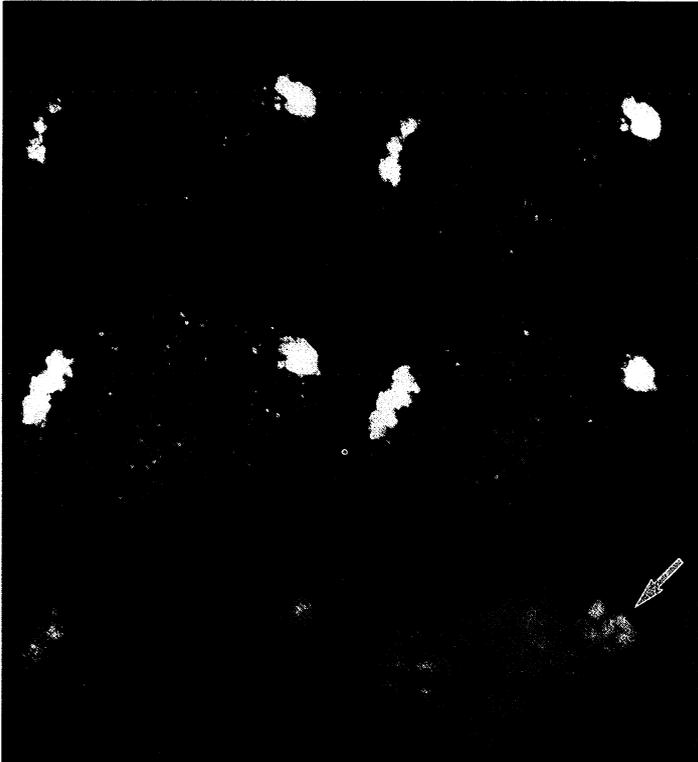


Abb. 1. Von oben links nach unten rechts: Optische Serienschritte eines Zellkerns (gezeigt sind 5 von insgesamt 12 Schnitten). Das rundere X-Chromosom (rechts) zeigt eine teilweise Deckung mit dem Barr-Körperchen (s. Pfeil im Bild unten rechts). Das ausgedehntere X-Chromosom (links) ist das aktive X-Chromosom (X_a).

3 Das 3D-Voronoi-Diagramm

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zur quantitativen Bildanalyse besteht aus den folgenden Schritten: Am Anfang steht der inkrementelle Aufbau des Voronoi-Diagramms (3.1), im folgenden werden die Objekte im Bildraum extrahiert (3.2) und zuletzt wird eine Parametrisierung und Quantifizierung der morphologischen Information durchgeführt (3.3).

3.1 Inkrementeller Aufbau des Voronoi-Diagramms

Das 3D-Voronoi-Diagramm ist die Partition des Raumes in konvexe Polyeder. Jeder dieser Polyeder wird mit genau einem Punkt (sog. Seeds) assoziiert, und jeder Punkt des Bildraumes wird einem Polyeder zugeordnet. Die grundlegenden Definitionen des Voronoi-Diagramms lassen sich mathematisch wie folgt formulieren.

Sei S eine endliche Menge $S=\{p_1, \dots, p_n\}$ von Seeds im Raum. Für jeden Punkt $p_i \in S$ ist der mit p_i assoziierte Voronoi-Polyeder $Vor(p_i)$ definiert durch die Region des Raumes, die näher zu p_i liegt als zu jedem anderen Punkt $p_j \in S$:

$$Vor(p_i) = \{x \in \mathbb{R}^3 \mid d(x, p_i) \leq d(x, p_j) \forall i \neq j\}$$

wobei d der euklidische Abstand ist.

Also erhält man $Vor(p_i)$ durch die Schnittmenge aller Halbebenen $H(p_i, p_j)$, definiert durch den senkrechten Bisektor von $\overline{p_i p_j}$, der p_i enthält.

$$Vor(p_i) = \bigcap_{i \neq j} H(p_i, p_j)$$

Diese Schnittmenge ist somit ein konvexer Polyeder mit maximal $n-1$ Seiten (Facetten) (Preparata und Shamos, 1988).

Das zum Voronoi-Diagramm duale Diagramm ist die Delaunay-Zerlegung. Zwei Seeds, p_i und p_j , sind verknüpfte Knoten im Delaunay Graphen dann und nur dann, wenn ihre assoziierten Voronoi-Polyeder eine gemeinsame Fläche haben.

$$Del(S) = \{(p_i, p_j) \in S^2 \mid Vor(p_i) \cap Vor(p_j) \neq \emptyset\}$$

Die gesamte Nachbarschaftsinformation, die im Voronoi-Diagramm enthalten ist, kann also mittels der Delaunay-Zerlegung dargestellt werden. Zusammen mit dem Voronoi-Diagramm, das die Morphologie von 3D-Objekten beschreibt, hat man somit ein umfangreiches Werkzeug zur Beschreibung von 3D-Objekten und ihrer Relation zueinander an der Hand.

3.1.1 Der Algorithmus:

Der Aufbau des Voronoi-Diagramms und der dualen Delaunay-Zerlegung folgt dem inkrementellen Ansatz (für eine detaillierte Beschreibung s Bertin *et al.*, 1992; Bertin *et al.*, 1993). Die Idee hierbei ist, daß in Gebieten, in denen eine große Grauwertvarianz vorliegt, eine hohe Dichte von Seeds erforderlich ist. Da die Lage der Seeds a priori nicht bekannt ist, ist ein dynamisch geregelter

des Voronoi-Diagramms erforderlich. In der Terminologie der Datenstruktur werden simultan zwei Graphen aufgebaut: Mit jedem Seed wird ein Voronoi-Polyeder (Voronoi-Graph) und ein Pointer auf die Liste seiner Nachbarn (Delaunay-Graph) assoziiert.

Initialisierung: Ausgehend von einer kleinen Zahl von Startpunkten (ca. 30 bis 70), die gemäß einer Poisson-Verteilung im Bildraum plziert werden, wird im ersten Schritt das Voronoi-Diagramm zu diesen Seeds berechnet (s. Abb. 2). Für jeden dieser Polyeder werden die mit ihm assoziierten geometrischen Parameter wie Volumen, Oberfläche, Mittelwert und Varianz der Grauwerte der Voxel, die in diesem Polyeder liegen, berechnet.

Propagierung: Im nächsten Schritt wird berechnet, ob jeder einzelne der Polyeder nach bestimmten Kriterien homogen oder inhomogen ist. Homogen ist ein Polyeder in diesem Bericht dann und nur dann, wenn der mit ihm assoziierte Varianzwert einen gewissen Schwellenwert (Standardabweichung der Grauwertverteilung des Bildraumes) unterschreitet oder seine Volumen eine gewissen Wert (Mindestgröße eines Polyeder = 10 Voxel) unterschreitet. In diesem Falle wird der Polyeder nicht weiter unterteilt. Ist der Polyeder noch nicht homogen, so wird er weiter unterteilt, indem ein neuer Seed auf dem Schwerpunkt der Begrenzungsfläche zweier benachbarter, nicht homogener Polyeder plziert wird. (Abb. 3)

Abbruchkriterium: Der Algorithmus ist abgeschlossen, wenn kein Polyeder entsprechend der gewählten Homogenitätskriterien weiter unterteilt werden kann.

Abb. 2. Startkonfiguration der dreidimensionalen Voronoi-Zerlegung. Die Kanten der Polyeder erscheinen aufgrund eines Gouraud-Shadings rund.

Abb. 3. Schrittweiser Aufbau des Voronoi-Diagrammes. Aus Darstellungsgründen wird die Voronoizerlegung nur zweidimensional an einem mittleren optischen Schnittbild (Bild Mitte oben) aus Abb. 1 demonstriert. Die Seeds sind rot dargestellt. Die Polygone bekommen als Grauwert den mittleren Grauwert aller der jeweils zu ihnen gehörenden Pixel zugewiesen. Von links oben nach rechts unten: Voronoizerlegung nach ein bis fünf Iterationen.

Abb. 4. Visualisierung der dreidimensionalen Voronoi-Zerlegung für den in Abb. 1 gezeigten Zellkern mittels Ray-Tracing. Die Chromosomenterritorien wurden bei einem festen Schwellenwert ($SW=80$) extrahiert (X_a gelb, X_i rot). Der Zellkern wurde durch ein Ellipsoid modelliert. Die Größe der Halbachsen wurde aus anderen Experimenten abgeschätzt. a) von vorne b) von der Seite betrachtet.

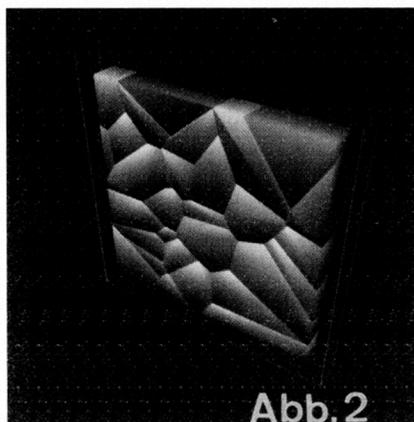


Abb. 2

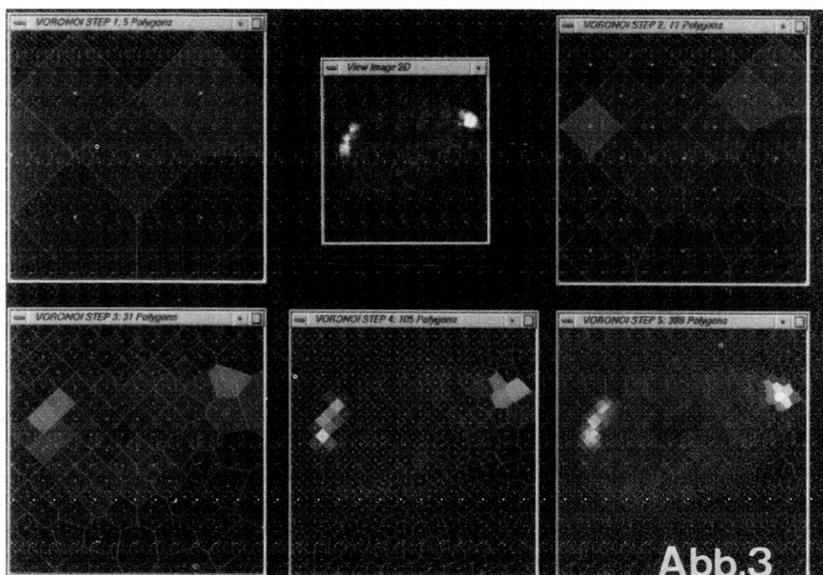


Abb. 3

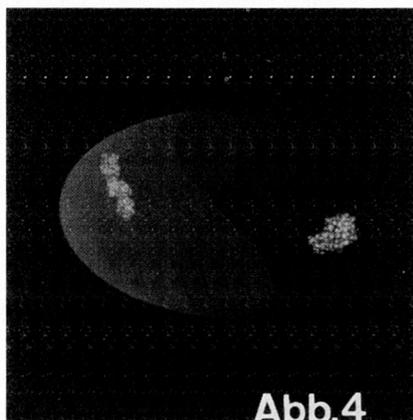
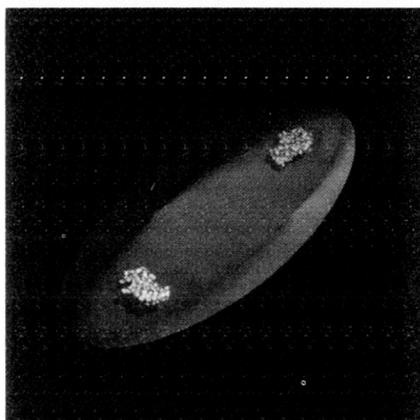


Abb. 4

3.2 Extraktion der Objekte

Nach vollständigem Aufbau des Voronoi-Diagramms wird entsprechend der Vorgabe, wieviele Objekte im Bildraum zu extrahieren sind (z. B. zwei Chromosomenterritorien), im dualen Delaunay-Graph nach bedingt zusammenhängenden Komponenten gesucht (Abb. 5). Werden mehr Objekte extrahiert als vorgegeben, werden die Objekte mit dem kleineren Gesamtvolumen verworfen. In der Praxis hat sich gezeigt, daß das Volumen zusammenhängender Hintergrundobjekte maximal 10% der Volumina der Chromosomenterritorien beträgt und somit eine eindeutige Unterscheidung zwischen Objekt und Hintergrund möglich ist.

```
While (Liste aller Polyeder( $L_{poly}$ ) im Voronoi-Diagramm  $L_{poly} \neq \emptyset$ ) do  
  Pop P das erste Element aus Liste  $L_{poly}$   
  if ((Bedingung=FALSE) or (p in Liste der schon behandelten Polyeder ( $L_a$ )))  
    continue  
  Push P in die Liste der zu behandelnden Polyeder ( $L_{temp}$ ) und in  $L_a$   
  While ( $L_{temp} \neq \emptyset$ ) do  
    Pop das erste Element  $P_f$  aus  $L_{temp}$   
    Push  $P_f$  in die Liste des Objektes  $O_i$  und  $L_a$   
    for ((alle Nachbarn V von  $P_f$ ) and (V nicht in  $O_i$ )) do  
      if (Bedingung = TRUE) do  
        Füge V in die Liste  $L_{temp}$  ein  
      end for  
    end while  
  Inkrementiere Objektindex i  
end while
```

Abb. 5. Algorithmus zur Extraktion bedingt zusammenhängender Komponenten im Delaunay-Graph

Als Bedingung können vielfältige Kriterien eingesetzt werden. Hier wurde zunächst der mittlere Grauwert der Voxel eines Polyeders bestimmt. Überschreitet dieser für einen Polyeder einen vordefinierten Schwellenwert, so ist die Bedingung für diesen Polyeder erfüllt. Dies bedeutet, daß zwei benachbarte Polyeder zu einem Objekt gehören, dann und nur dann, wenn die ihnen zugeordneten Grauwertmittelwerte einen vordefinierten Schwellenwert überschreiten.

3.3 Parametrisierung und Quantifizierung der morphologischen Information

Für jedes der extrahierten Objekte wurden drei geometrische bzw. morphologische Parameter bestimmt. Das *Gesamtvolumen* bestimmt sich aus der aufaddierten Anzahl aller Voxel in allen Polyedern des Objektes multipliziert mit der Größe eines Voxelvolumens.

Zur Bestimmung der *Objektoberfläche* müssen alle Facetten bestimmt werden, die an der Oberfläche des Objektes liegen. Auch hier muß der Delaunay-Graph nach Voronoi-Polyedern durchsucht werden, die mindestens einen Nachbarn im Delaunay-Graphen haben, der nicht zum Objekt gehört. Die Begrenzungsflächen solcher Nachbarpaare gehören gerade zur Oberfläche des Objektes. Die Suche nach den entsprechenden Polyedern gestaltet sich analog wie im obigen Algorithmus. Der *Rundheitsfaktor* (RF) wird als gewichtetes Verhältnis von Volumen (V) und Oberfläche (S) berechnet:

$$RF = 36\pi \frac{V^2}{S^3} \quad ; \quad 0 < RF \leq 1$$

Der Rundheitsfaktor ist für eine Kugel gleich eins und für alle weiteren, dreidimensionalen Objekte kleiner als eins, da eine Kugel das dreidimensionale Objekt ist, das bei vorgegebenem Volumen die kleinste Oberfläche annimmt. Die Größe dieses Rundheitsfaktors stellt somit ein (dimensionsloses) Maß für die räumliche Ausdehnung eines Objektes dar.

3.4 Resultate

Das Voronoi-Zerlegungsverfahren wurde zur quantitativen Analyse dreidimensionaler Bilder von weiblichen Interphasezellkernen angewandt, in denen die beiden X-Chromosomenterritorien dargestellt wurden. Das Bildvolumen eines solchen Zellkerns bestand aus 12 - 25 Schichtbildern á 256x256 Pixel. Der Segmentierungsalgorithmus konvergierte nach der Generierung von ca. 3000 bis 5000 Polyeder (Abb. 4). Die Berechnung des Voronoi-Diagramms, sowie die Extraktion und Berechnung der morphologischen Parameter für einen vorgegebenen Schwellenwert dauerte ca. 1 Minute auf einer SGI-Workstation.

Anhand dieses Voronoi-Diagramms wurde interaktiv eine obere und untere Grenze des Schwellenwertes bestimmt. Der obere Schwellenwert ergab sich, wenn zwei oder mehrere unabhängige Objekte (Chromosomenterritorien oder auch Hintergrundobjekte) ineinander verschmolzen. Beim unteren Schwellenwert zerfielen die einzelnen Territorien in zwei oder mehrere Teile.

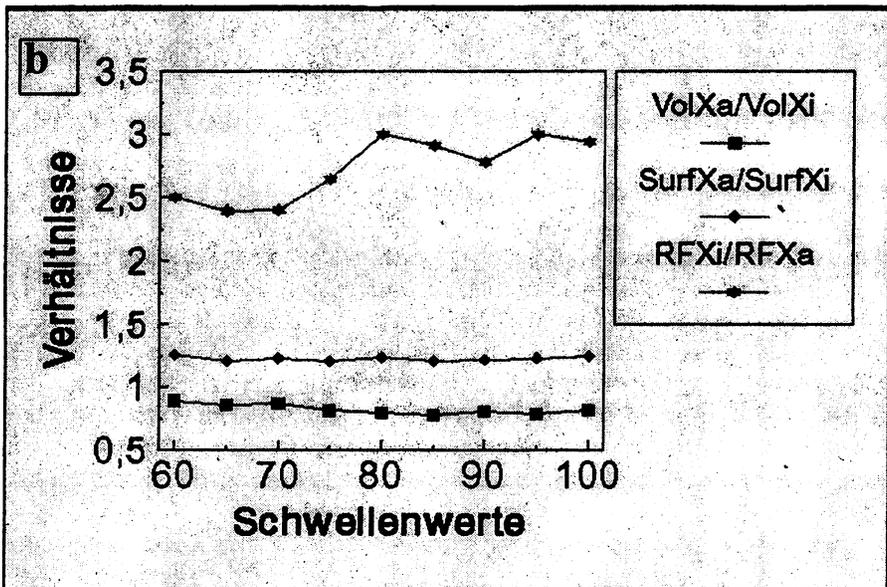
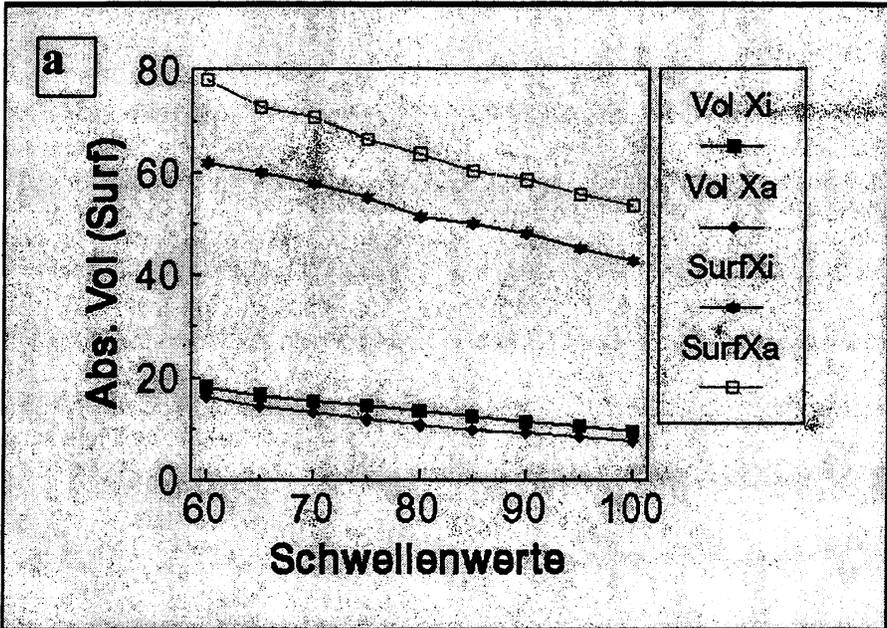


Abb. 6. Diagramme der geometrischen und morphologischen Parameter der in Abb. 1 und Abb. 4 gezeigten X-Chromosomenterritorien. a) Schätzwerte der absoluten Volumina ($VolX_i$ und $VolX_a$; μm^3) und Oberflächen ($SurfX_i$ und $SurfX_a$; μm^2) der beiden X-Chromosomenterritorien b) Darstellung der Volumenverhältnisse ($VolX_a/VolX_i$), Oberflächenverhältnisse ($SurfX_a/SurfX_i$) und Rundheitsfaktorverhältnisse (RFX_i/RFX_a).

Die beiden Chromosomenterritorien wurden anschließend ohne Interaktion für alle dazwischenliegenden Schwellwerte mit einer Schrittweite von 5 extrahiert (bei einer typischen Differenz zwischen oberem und unterem Schwellenwert von 20 bis 30).

Zu jedem dieser möglichen Schwellenwerte wurden die oben beschriebenen morphologischen Parameter bestimmt. Dieser Analyseschritt dauerte je nach Schwellwertbereich zwischen ein und zwei Minuten. In dem hier aufgeführten Beispiel zeigt das über die Barr-Körperchen-Anfärbung identifizierte Xi einen größeren Rundheitsfaktor und dementsprechend eine kleinere Oberfläche als Xa. Die Volumina von Xi und Xa sind dagegen nahezu identisch (Abb. 6). Dieses Resultat erwies sich bei der Bewertung von insgesamt 54 Zellkernen als typisch (Eils *et al.*, Manuskript eingereicht).

4 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine Struktur aus der Computergeometrie, das Voronoi-Diagramm, zur Segmentierung zellbiologischer Objekte eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß die graphenorientierte, geometrische Struktur des Verfahrens eine geeignete Umgebung bereitstellt, um Objekte im Bildraum effektiv zu extrahieren und Parameter wie Volumina, Oberflächen, sowie Rundheitsfaktoren zu bestimmen. Da sich auch weitere geometrische Parameter wie Ausdehnung, Lage, Orientierung und Abstände mit Hilfe des Voronoi-Diagramms leicht bestimmen lassen, kann das Verfahren mit seiner raschen Durchführbarkeit und den graphischen Darstellungsmöglichkeiten der Resultate als ein vielschichtiges Werkzeug zur quantitativen Bildanalyse verschiedener Strukturen im Zellkern dienen. Exemplarisch wurde aufgezeigt, daß eine Beschreibung des aktiven bzw. inaktiven X-Chromosoms in weiblichen Fruchtwasserzellen mithilfe dieses Verfahrens durchgeführt werden kann. Das gezeigte Beispiel (Abb. 4) stützt die Hypothese, daß durch die unterschiedliche, dreidimensionale Gestalt der X-Chromosomenterritorien die Oberflächengröße der beiden Territorien geregelt wird. Möglicherweise wird das aktive X-Chromosom in eine ausgedehntere Struktur als das inaktive X-Chromosom gezwungen, um eine Lokalisation einer erhöhten Anzahl von Genen an der Oberfläche zu realisieren (Cremer *et al.*, 1993). Weiterhin könnten Faltungen der Chromosomenterritorien zu einer weiteren Oberflächenvergrößerung führen. Diese Vermutungen werden zur Zeit anhand eines umfangreichen Datenmaterials überprüft.

Ein deutlicher Vorteil des vorgestellten Verfahrens im Gegensatz zu den gängigen Schwellwertverfahren liegt darin, daß bedingt durch die dreidimensionale, regionenbezogene Orientierung des Algorithmus die Volumina-, Oberflächen- und Rundheitsfaktorenverhältnisse für Chromosomenterritorien viel geringer über den gesamten Schwellenwertbereich schwanken als bei den üblichen zweidimensionalen Schwellenwert-Verfahren.

Um genauere Messungen der absoluten Volumina und Oberflächen für Chromosomenterritorien zu erhalten, werden verbesserte Verfahren zur Darstellung der Chromosomenterritorien unter Vermeidung von Hintergrundfärbung, sowie verbesserte Verfahren zur Clusterbildung im Voronoidiagramm benötigt. Auf diese Weise sollte eine nicht-subjektive, eindeutige Segmentierung von Chromosomenterritorien und anderen Zellkernstrukturen möglich werden.

Literatur.

1. Barr ML, Bertram EG (1949) A morphological distinction between neurons of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 163: 676.
2. Bertin E, Marcelpoil R, Chassery JM (1992) Morphological algorithms based on Voronoi and Delaunay graphs: microscopic and medical applications. *Image algebra and morphological image processing III*, SPIE ed., San Diego, 18-23 July, pp 356-357.
3. Bertin E, Parazza F, Chassery JM (1993) Segmentation and Measurement based on 3D Voronoi diagramm: Application to confocal microscopy. *Comp.Med.Imaging and Graphics* (3), vol 17: 175-182.
4. Bischoff A, Albers J, Kharboush I, Stelzer EHK, Cremer T, Cremer C (1993) Differences of size and shape of active and inactive X-chromosome domains in human amniotic fluid cell nuclei. *J. Micr. Res. Techn.* 25: 68-77.
5. Cremer T (1985) Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie. *Naturwissenschaftliche Erkenntnis und Theorienwechsel in der frühen Zell- und Vererbungsforschung*. Springer Verlag Berlin.
6. Cremer T, Baumann H, Nakanishi K, Cremer C (1984) Correlation between interphase and metaphase chromosome arrangements as studied by laser-uv-microbeam experiments. In: *Chromosomes Today*, 8 eds M D Bennet, A Cropp, U Wolf, Allean and Unwin, London pp 203-212.
7. Cremer T, Kurz A, Zirbel R, Dietzel S, Rinke B, Schröck E, Speicher MR, Mathieu U, Jauch A, Emmerich P, Scherthan H, Ried T, Cremer C, Lichter P (1993) Role of Chromosome Territories in the Functional Compartmentalization of the Cell Nucleus. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* Vol. 58, in press.
8. Dyer KA, Canfield TK, Gartler SM (1989) Molecular cytological differentiation of active from inactive X domains in interphase: implications for X chromosome inactivation. *Cytogenet. Cell. Genet.* 50: 116-120.
9. Erhardt A, Zinser G, Komitowski D, Bille J (1985) Reconstructing 3-D light - microscopic images by using digital image processing. *Appl. Opt.* 24: 194-200.
10. Geiger B, Komitowski D, Jauch A, Hausmann M, Cremer C (1991) Optical sectioning and 3d-image reconstruction to determine the volume of specific chromosome regions in human interphase cell nuclei. *Optik* 86: 113-119.
11. Hell S, Reiner G, Cremer C, Stelzer EHK (1993) Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. *J. Microsc.* 169: 391-405.
12. Laub GA, Lenz R, Reinhardt ER (1985) Three-dimensional object representation in microscopic imaging system. *Opt. Eng.* 24: 901-905.
13. Lichter P & Cremer T (1992) Chromosome analysis by non-isotopic in situ hybridization. In *Human Cytogenetics—A practical approach*, 2nd edition, Vol. 1 (ed. by D.E. Rooney and B.H. Czepulkowski), pp. 157-192. IRL Press, Oxford.

14. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* 80: 224-234.
15. Lyon MF (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 190: 372-373.
16. du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T (1993) Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet.* 93: 590.
17. Manuelidis L, Borden J (1988) Reproducible compartmentalization, of individual chromosome domains in human CNS cells revealed by in situ hybridization and three-dimensional reconstruction. *Chromosoma* 96: 397-410.
18. Popp S, Schöll HP, Loos P, Jauch A, Stelzer EHK, Cremer C, Cremer T (1990) Distribution of chromosome 18 and X centric heterochromatin in the interphase nucleus of cultured human cells. *Exp. Cell Res.* 189: 1-12.
19. Preparata JP, Shamos MI (1988) *Computational Geometry, an introduction.* Springer-Verlag, New York.
20. Schwarzmann P, Wu X (1990) 3D-microscopy - quantitative approaches. In: *Advances in Analytical Cellular Pathology.* eds G Burger, M Oberholzer, G P Vooijs, Excerpta Medica, Amsterdam New York Oxford, pp 47-48.
21. Van Dekken H, Pinkel D, Mullikin J, Trask B, van den Engh G, Gray J (1989) Three-dimensional analysis of the organization of human chromosome domains in human-hamster hybrid interphase nuclei. *J. Cell. Sci.* 94: 299-306.
22. Visser TD, Oud JL, Brakenhoff GJ (1992) Refractive index and axial distance measurements in 3-D microscopy. *Optik* 90: 17-19.
23. Walker CL, Cargile CB, Floy KM, Delannoy M, Migeon BR (1991) The Barr body is a looped X chromosome formed by telomere association. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 88: 6191.