

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

Aus dem Institut für Molekularbiologie des Universitätsklinikums Essen
und
der Biomedical Imaging Group der Fachhochschule Dortmund

**Räumliche Visualisierung und Koloalisation
von Proteinen in ceramidreichen Domänen**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaft in der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Christian Imhäuser
aus Wuppertal

2015

- Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. E. Gulbins
 2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. M. Gunzer
 3. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. M. T. Figge, Jena

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Februar 2016

Publikationen

Imhäuser, C., Gulbins (Grassmé), H., Gulbins, E. und Lipinski, H.-G. (2010a): 3D Topology and Arrangement of Proteins Inside Ceramide-rich Domains. In: Thull, R. und Gradinger, R. (Hrsg.): Biomaterials and Biomechanics, Fundamentals and Clinical Applications. 12th International and Interdisciplinary NRW Symposium; S. 44. München: Neuer Merkur

Tagung: Biomaterials and Biomechanics - Fundamentals and Clinical Applications, March 17 - 19, 2010, Essen, Germany.

Imhäuser, C., Gulbins (Grassmé), H., Gulbins, E. und Lipinski, H.-G. (2010b): 3D-Visualisierung und Kollokalisierung von Proteinen und ceramidreichen Domänen. In: Deserno, T. M., Handels, H., Meinzer, H.-P. und Tolxdorff, T. (Hrsg.): Bildverarbeitung für die Medizin; S. 211–215. Berlin, Heidelberg, New York: Springer

Tagung: BVM - Bildverarbeitung für die Medizin, 14. - 16. März, 2010, Aachen, Deutschland.

Imhäuser, C., Gulbins (Grassmé), H., Gulbins, E. und Lipinski, H.-G. (2010c): 3D Topology and Arrangement of Proteins Inside Ceramide-rich Domains. In: Popp, J., Drexler, W., Tuchin, V. V. und Matthews, D. L. (Hrsg.): Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care II. SPIE Vol. 7715; S. 77152N. Bellingham, Washington: SPIE

Tagung: SPIE - Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care II, April 12 - 16, 2010, Brussels, Belgium.

Imhäuser, C., Gulbins (Grassmé), H., Gulbins, E. und Lipinski, H.-G. (2013): A Novel Approach for Determining Spatial Colocalization of Proteins Inside Ceramide-rich Domains, Online-Publikation; http://www.gcb2013.de/system/resources/BAhbB1sH0gZmSSItMjAxMy8wOC8yNy8xNF8yN18zNF80MV9nY2IxM19wb3N0ZXJzLnBkZgY6BkVU/gcb13_posters.pdf

Tagung: GCB - German Conference Bioinformatics, 10. - 13. September, 2013, Göttingen, Deutschland.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
2	Material und Methoden	10
2.1	Präparation der Zellen	10
2.2	Bildakquise	11
2.3	Bildvorverarbeitung	20
2.3.1	Kontrastverbesserung	20
2.3.2	Rauschunterdrückung und Kantenerhaltung	21
2.4	Volumenvisualisierung	25
2.4.1	Raycasting	27
2.4.2	Texturemapping	30
2.4.3	Oberflächenrekonstruktion	32
2.5	Software-Bibliotheken ITK, VTK und Qt-Framework	33
2.6	Entwicklungsumgebung	35
3	Ergebnisse	38
3.1	Bildvorverarbeitung	38
3.1.1	Kontrastverbesserung	40
3.1.2	Logarithmische Skalierung	40
3.1.3	Anisotrope Diffusions- und bilaterale Filterung	44
3.2	Visualisierung	47
3.2.1	Volumerendering	48
3.2.2	Oberflächenrekonstruktion	56
3.2.3	Shading und Clipping	58
3.3	Räumliche Kolokalisation	60
3.3.1	Qualitative Analyse	61
3.3.2	Quantitative Analyse	75
4	Diskussion	89

5 Zusammenfassung	99
Literaturverzeichnis	100
Danksagung	109
Lebenslauf	110

1 Einleitung

Viele menschliche Krankheiten wie Krebs, Entzündungen, Alzheimer, Depression, Autoimmunerkrankungen sind bis heute nicht heilbar oder schwierig zu therapieren. Eine Heilung und neue Therapieansätze erfordern ein tiefes Verständnis der grundlegenden molekularbiologischen Prozesse in einer menschlichen Zelle. Aus diesem Grund sollen molekulare Mechanismen der Infektion mammalischer Zellen oder der Immortalisierung maligner Tumorzellen identifiziert werden, z. B. wie pathogene Bakterien in Makrophagen eindringen und diese schädigen können, oder unter welchen Bedingungen programmierter Zelltod (wie Apoptose) beispielsweise in entarteten Tumorzellen nicht funktioniert. Für solche Vorgänge gilt es herauszufinden, welche zellulären Bestandteile involviert sind. Hierunter fallen beispielsweise Proteine, deren Funktion durch ihre Aktivität, ihrer räumlichen Verteilung und der komplexen Interaktion mit anderen Proteinen bestimmt wird. Ihre räumliche Verteilung wird ferner sowohl durch Protein-Protein-Interaktionen als auch durch ihre Aufteilung in Membran-Domänen festgelegt.

Die Aggregation von Proteinen, insbesondere die von Rezeptormolekülen in einer Zellmembran, können von Sphingolipiden beeinflusst sein, die eine bedeutsame Rolle bei grundlegenden molekularbiologischen Prozessen zu spielen scheinen. In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Ceramide, die zu den Sphingolipiden gehören, nicht nur morphologische Zellbestandteile darstellen, sondern zentrale zelluläre Funktionen wie Zelltod, Zelldifferenzierung und Migration regulieren (Teichgraber et al. 2008; Bielawska et al. 1992; Bieberich 2011), und auch bei pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind, u. a. an bakteriellen und viralen Entzündungen, zystischer Fibrose und Depression (Simonis et al. 2014; Grassmé und Becker 2013; Grassmé et al. 2005; Grassmé et al. 2013; Grassmé et al. 2014; Kornhuber et al. 2014; Gulbins et al. 2013). Daher stehen Ceramide im wissenschaftlichen Fokus der vorliegenden Arbeit. In der Zellmembran bildet sich diese zelluläre Komponente durch Hydrolyse von Sphingomyelin (Gulbins und Kolesnick 2003; Bock et al. 2003; Popov et al. 2008), und formiert sich spontan zu Mikrodomänen, die sich zu Makrodomänen zusammenschließen können (Holopainen et al. 1998). Diese ceramid-

reichen Membran-Plattformen ermöglichen z. B. die Regulierung von Ionenkanälen sowie die Aggregation von Rezeptor- und signalgebenden Molekülen (Grassmé et al. 2007; Grassmé et al. 2001a; Bock et al. 2003).

In der für diese Arbeit bereitgestellten Untersuchung konnte am Beispiel von JY-Zellen gezeigt werden, dass nach einer Stimulation via CD95, einem Apoptose auslösenden Rezeptor, insbesondere die saure Sphingomyelinase (kurz: ASM für Acid Sphingomyelinase) aus intrazellulären Kompartimenten zur extrazellulären Membranoberfläche translozierte. Dort setzte das aktivierte Enzym (ASM) durch Hydrolyse von Sphingomyelin extrazellulär orientiertes Ceramid frei, welches sich spontan zu Mikro-Domänen formierte (Grassmé et al. 2001a). Das katalysierte Ceramid ermöglichte schließlich das Clustering von CD95 in den sphingolipidreichen Membran-Plattformen sowie die Induktion zur Apoptose (Grassmé et al. 2001a).

Die Rolle von Ceramid an dem CD95-Clustering sowie der CD95-Signaltransduktion konnte experimentell nachgewiesen werden, optisch derzeit lediglich konfokalmikroskopisch. Eine tiefer gehende visuelle Analyse fehlt bislang. Zudem ist bis heute weder der Mechanismus des Rezeptor-Clusterings vollständig entschlüsselt noch die exakte (räumliche) Verteilung der Proteine innerhalb der ceramidreichen Membran-Domänen bekannt. Diesbezüglich ist besonders die Frage von großem Interesse und zu klären, mit welcher Konzentration und wie dicht die Moleküle beieinanderliegen, oder mit welchem Grad sie kolokalisieren. Zur Klärung dieser molekularbiologischen Problemen bedarf es Bildverarbeitungsmethoden, welche eine Untersuchung der genauen Ceramid- und CD95-Verteilungen und deren Kolokalisationen unterstützen.

Für die Bildanalyse werden Schichtbilder aus CD95-stimulierten JY-Zellen generiert, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt sind. Ein Laser-Scanning-Mikroskop tastet die einzelne Zellprobe in axialer Fokusebene ab und wandelt die emittierten Fluoreszenzintensitäten in Bilddaten um, die abhängig von der registrierten Zellkomponente in Bildkanäle separiert abgespeichert werden. Auf diese Weise können mehrere Stapel von Schichtbildern erzeugt werden, welche die verschiedenfarbig leuchtenden Zellbestandteile wiedergeben (Becker 1996; Arndt-Jovin et al. 1985; Pawley 2006). Die Bildpunktintensitäten korrelieren hierbei mit entsprechenden Molekülkonzentrationen, und können insbesondere mit einem erzeugten Overlay

einer Schicht zwischen den Bildkanälen Rückschlüsse auf Kollokationen geben. Die Analyse ist jedoch erheblich eingeschränkt durch den lediglich schichtweisen, zweidimensionalen bildlichen Vergleich. Demgegenüber ist eine dreidimensionale, interaktive Visualisierung der Bilddaten wünschenswert, um eine räumliche Analyse der exakten Molekül-Verteilungen und ihrer Kollokationen durchführen zu können.

Am Markt stehen zahlreiche Software-Lösungen (z. B. „CoLocalizer Pro“ von CoLocalization Research Software, „Volocity“ von PerkinElmer etc.) zur Verfügung, um Kollokationen zu analysieren. Gängige, insbesondere von den Mikroskop-Herstellern angebotene Programme erlauben zumeist lediglich eine 2D-Analyse kollokalisierter Bildbereiche. Die spezifischen Eigenschaften des verwendeten Zelltyps und der aus diesem erzeugten Bilder (wie charakteristische Intensitätsverläufe, Bildstörungen etc.) stellen zudem besondere Anforderungen an die anzuwendenden Bildverarbeitungsmethoden. Hierzu müssen methodische Teile der Software anpassbar und/oder erweiterbar sein, um optimierte Bildergebnisse zu erzielen und damit die Analyse für den spezifischen Zelltyp zu verbessern. Dieses erfordert zumeist einen freien Zugriff auf den Quellcode der Applikation. Kommerzielle Software-Lösungen sind indes üblicherweise nicht quelloffen und damit grundsätzlich für die externe Entwicklung nicht modifizier-/erweiterbar. Lediglich wenige bieten eine funktionelle Erweiterbarkeit z. B. über eine Plugin-Schnittstelle, über die sich jedoch keine tiefer gehenden Änderungen an dem speziellen Anwenden komplexer Filter zur Bildvorverarbeitung oder an Kernalgorithmen wie räumlichen Visualisierungstechniken vornehmen lassen. Demgegenüber bieten andere existierende Software-Lösungen auf reiner Open-Source-Basis einen einfachen, direkten Zugang zum Quellcode sowie dessen Erweiterbarkeit. Viele dieser Programme wie „ImageJ“ sind in der Programmiersprache Java entwickelt worden, und/oder erheben für sich den Anspruch, auf möglichst vielen verschiedenen Betriebssystem-Plattformen zu funktionieren. Unter dieser plattformunabhängigen Architektur der Programmiersprache leidet jedoch oftmals die Performanz komplexer Bildverarbeitungsmethoden, besonders im Bereich der interaktiven, räumlichen Visualisierung. Darüber hinaus werden die Möglichkeiten zur Optimierung durch die von der jeweiligen Software-Applikation vorgegebenen Datenstrukturen sowie den starren Aufbau der Programmkomponenten

erschwert und eingeschränkt.

Aus den erwähnten Gründen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Entscheidung getroffen, eine für die genannte molekularbiologische Fragestellung maßgeschneiderte Software zu entwickeln, in welcher bekannte und validierte Bildverarbeitungsalgorithmen genutzt und individuell angepasst werden sollten, um die spezifischen Eigenschaften des zur Verfügung stehenden Bildmaterials zu berücksichtigen. Mit Hilfe der Software sollten sich räumliche Modelle von Ceramid- und Protein-Verteilungen aus Bildstapeln mikroskopischer Schichtbilder erzeugen lassen. Zur Unterstützung der Analyse sollten die Visualisierungen interaktiv sein, d. h. sie sollten durch Benutzeraktionen räumlich rotiert, skaliert und verschoben werden können. Für den qualitativen Vergleich wäre der Einsatz mehrerer verschiedener Visualisierungstechniken wünschenswert. Des Weiteren sollten computergestützte Methoden und Werkzeuge erweitert und neuartige entwickelt werden, um räumliche Molekül-Kolokalisationen semi-automatisiert aufzuspüren sowie diese qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Insgesamt sollte durch die Computerapplikation das Verständnis über den Prozess der räumlichen Rezeptor-Anordnung und Formation von Zellmembran-Domänen verbessert werden.

Das folgende Kapitel widmet sich den verwendeten Materialien und Methoden. Neben dem Zellmaterial und der Bildakquise werden insbesondere vor mathematischem Hintergrund Methoden und Werkzeuge beschrieben, mit denen sich die im anschließenden Kapitel erläuterten Ergebnisse erzielen ließen. Hier werden ebenso die eigens entwickelten Verfahren erörtert. Anschließend werden in der Diskussion die Ergebnisse bewertet, der Nutzen der verwendeten Methoden kritisch beurteilt und eine molekularbiologische Deutung durchgeführt. Mit der Zusammenfassung schließt diese Arbeit.

2 Material und Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden zahlreiche Materialien und Methoden verwendet. In den einzelnen folgenden Abschnitten werden die Eigenschaften des zur Verfügung stehenden molekularbiologischen Materials sowie die genauen Präparationsschritte der Zellproben erläutert. Weiter wird das technische Equipment und die mit dessen Hilfe durchgeführte Bildgenerierung beschrieben. Anschließend werden Methoden vorgestellt, die für die Bildvorverarbeitung und Visualisierung herangezogen wurden. Abschließend wird auf die gesamte Software-Entwicklungsumgebung näher eingegangen, in welcher die Applikation „Ceramide3D“ eigens entwickelt wurde.

2.1 Präparation der Zellen

Als molekularbiologisches Material dienten eine besondere Form von B-Lymphozyten, sogenannte JY-Zellen, die von einer lymphoblastoiden Zelllinie entstammten. Erzeugt und immortalisiert wurde diese Zelllinie durch die Infektion peripherer B-Lymphozyten mit dem Epstein-Barr-Virus. Die Zellen wurden stabil mit einem Vektor für die saure Sphingomyelinase (pEF-ASM) transfiziert und in einer RPMI-1640-Zellkulturlösung gezüchtet, der 10 % fetales Kälberserum (FCS), 2 mM HEPES (7,4 pH), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 mM verschiedene Aminosäuren, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin zugesetzt wurden (sämtliches Material von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Die Zellen wurden mit anti-CD95-Antikörpern (Klon CH11, 100 ng/ml, von Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) für zwei Minuten stimuliert, oder blieben unstimuliert.

Anschließend wurden die Zellen einmal in HEPES/Kochsalzlösung (nachfolgend als H/S abgekürzt; 132 mM NaCl, 20 mM HEPES (7,4 pH), 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 0,7 mM MgCl₂) gewaschen und für zehn Minuten in phosphatgepufferten Salzlösung (kurz: PBS; 7,3 pH) mit 2 % Paraformaldehyd fixiert. Erneut wurden die Zellen gewaschen und in H/S mit 5 % FCS 15 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungen der im Nachfolgenden eingesetzten Antikörper weitgehend zu unterbinden. Dann wurden die Zellen aufeinanderfolgend mit monoklonalen anti-Ceramid- (1:100, von Glycobiotech GmbH, Kükels, Deutschland) und anti-CD95-

Antikörpern (1:100, Klon APO 1-3, Alexis, von Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland) für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ein weiteres Mal wurden die Proben gewaschen und mit entsprechendem Cy3-Esel-anti-Maus-IgM und FITC-gekoppeltem Esel-anti-Maus-IgG (von Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) inkubiert. Alle sekundären Antikörper wurden 1:1000 verdünnt. Schließlich wurden die Zellen zweimal mit H/S gewaschen und in Mowiol eingebettet, und waren damit vorbereitet für die anschließende Mikroskopierung.

2.2 Bildakquise

Die mikroskopische Analyse der präparierten Zellproben wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops des Typs DM IRE2 (Leica, Deutschland) durchgeführt. Das mit einem TSP2-Modul (Leica, Deutschland) verbundene Mikroskop war mit einem Öl-Immersionsobjektiv (Typ: HCX PL APO CS) ausgestattet, welches eine numerische Apertur von 1,4 und ein Vergrößerungsvermögen von 100 aufwies. Wie oben erwähnt, wurden die JY-Zellen mit Antikörpern inkubiert, die an den zu untersuchenden Zellkomponenten binden sollten. Die Antikörper waren jeweils mit Fluoreszenzfarbstoffen aus der Gruppe der Cyanine (Cy3) und Fluoresceinisothiocyanat (kurz: FITC) gekoppelt. Zur Bildakquirierung regte ein am Mikroskop verbauter Laser mit zwei verschiedenen Wellenlängen die Fluorophore spezifisch zur Fluoreszenz an. Hier betragen die Wellenlängen für Cy3 543 nm und für FITC 488 nm .

Hinsichtlich der Funktionsweise des Mikroskops tasten die durch einen dichroitischen Strahlenteiler zusammengeführten und von dem Objektiv fokussierten Laserstrahlen die Zellprobe Punkt für Punkt ab, so dass lediglich ein Lichtpunkt der abgebildeten Zellprobe zu einem bestimmten Zeitpunkt bildlich erfasst wird. Das von der Probe reflektierte und von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wird durch das Objektiv auf eine im Strahlengang angeordnete Lochblende fokussiert, um außer-fokales Licht zu blockieren. Dadurch wird Licht aus einer sehr kleinen Schicht um die eingestellte Fokalebene im Zellpräparat zum Detektor durchgelassen (Wilhelm et al. 2003; Kühnle 2000). Auf diese Weise ist eine Abtastung von Schichten in axialer Richtung des Präparates möglich. Ein hinter der Konfokalöffnung angeordneter lichtempfindlicher Punktdetektor erfasst das inner-fokale Licht als analoges



Abbildung 1: Bild des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops Leica DM IRE2 (Mitte) mit erforderlichem technischem Equipment. Mit Hilfe dieses Mikroskop-typs wurde die Bildakquise durchgeführt (Bildquelle: Französischer Produktka-talog von Leica; http://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20DM%20IRE2/Brochures/Brochure_DM_IRE2_fr.pdf).

Signal, welches digitalisiert und an einen Computer gesendet wird. Die registrierte Fluoreszenzintensität wird dabei bestimmt durch die Anzahl der Anhaftungen der fluoreszierenden Antikörper an den zu untersuchenden Zellkomponenten. Durch das kontinuierliche, aufeinanderfolgende punktweise Abtasten der Zellprobe und die Erfassung der emittierten Lichtpunkte rekonstruiert eine Computer-Software aus den ermittelten Daten ein Gesamtbild in der entsprechenden Fokusebene. Die Bilddaten werden schließlich anhand ihrer enthaltenen Farbinformationen automatisch oder manuell einem Farbkanal zugeordnet und abgespeichert. Auf diese Weise können optische Schichtbildaufnahmen mit hoher Bildschärfe erzeugt werden.

Mit Hilfe dieses Verfahrens standen am Ende des gesamten Scanvorgangs zehn Bildstapel der zu untersuchenden Zellkomponenten Ceramid und CD95, jeweils in ih-

Tabelle 1: Mehrere relevante Eigenschaften der drei ausgewählten, untersuchten Zellproben und der aus ihnen erzeugten Bildstapel in ihren originalen Benennungen „CerCD952min1“, „JYASM5min3“, „JYASM5min4“ sowie eingestellte Mikroskopie-Parameter: Alle Werte wurden aus der Text-Datei ausgelesen, die nach jedem Scanvorgang von der Mikroskopie-Software automatisch generiert wurde.

Achse	Logische Größe in <i>Pixel</i>	Physikalische Größe in μm	Anzahl der Bilder	Refraktions- index	Zoomfaktor
CerCD952min1					
x	512	20,07	6	1,515	7,47
y	512	20,07			
z	-	4,26			
JYASM5min3					
x	512	43,36	8	1,515	3,46
y	512	43,36			
z	-	4,62			
JYASM5min4					
x	512	38,12	8	1,515	3,94
y	512	38,12			
z	-	6,34			

ren entsprechenden zugeordneten Farbkanälen Rot und Grün, zur Verfügung. Von diesen digitalisierten Zellproben wurden drei mit den abgespeicherten originalen Bezeichnungen „CerCD952min1“, „JYASM5min3“, „JYASM5min4“ hinsichtlich ihrer optisch erkennbaren Intensitätsabdeckung und Separationsgüte der Zellobjekte für die nachfolgende Bildverarbeitung und räumliche Visualisierung herangezogen. Der Tabelle 1 lassen sich mehrere relevante Eigenschaften dieser ausgewählten Zellproben bzw. Bilder wie logische oder physikalische Dimensionen und eingestellte Mikroskopie-Parameter entnehmen. Alle verwendeten Bilder wiesen eine Farb-/Tonwerttiefe von 8 *Bit* auf, und konnten damit einen Raum von maximal 256 möglichen Intensitätswerten ausschöpfen.

Die Punktdichte der akquirierten Bilder wird durch viele Parameter bestimmt. Dies-

bezüglich spielt das Auflösungsvermögen des Mikroskops bzw. der in ihm verbauten Komponenten wie das verwendete Objektiv eine wichtige Rolle. Das Auflösungsvermögen kann als die minimale Distanz zwischen zwei in einer Zellprobe festgelegten Punkten aufgefasst werden, die als solche noch voneinander optisch unterschieden werden können. Bedingung dafür ist das sogenannte Rayleigh-Kriterium, welches voraussetzt, dass das Auflösungsvermögen wie bei einem physikalisch idealen Objektiv nur durch seine Beugung begrenzt wird (Kühnle 2000; Cox 2012). Insbesondere wird die axiale Auflösung oder Tiefenschärfe durch die Größe der Lochmaskenöffnung, durch die Wellenlänge des Anregungslichts, durch die numerische Apertur des Objektivs und den Brechungsindex des verwendeten Immersionsmediums bestimmt. Bei der durchgeführten Mikroskopierung wurde eine Lochblende mit genau einer Airy Unit (kurz: AU) verwendet. Unter dieser Bedingung gelten nach (Amos et al. 2011; Wilhelm et al. 2003) folgende mathematische Zusammenhänge für die Berechnung der lateralen und axialen Auflösungen:

$$d_{lateral} = \frac{0,51 \cdot \lambda}{NA} \quad d_{axial} = \frac{0,88 \cdot \lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}. \quad (1)$$

Mit den in der Untersuchung vorgegebenen Parameterwerten für die numerische Apertur $NA = 1,4$ und den Brechungsindex $n = 1,515$ ließen sich nach den Gleichungen (1) in Abhängigkeit der verschiedenen Wellenlängen des Anregungslichts $\lambda = [488 \text{ nm}, 543 \text{ nm}]$ laterale Auflösungen von $0,17 \mu\text{m}$ bzw. $0,20 \mu\text{m}$ und axiale von $0,45 \mu\text{m}$ bzw. $0,51 \mu\text{m}$ ermitteln. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass die Dimensionen der erfassten Probenregionen wesentlich über den verfügbaren Auflösungen lagen. Insbesondere befanden sich die minimalen Bildschichtdicken der ausgewählten Zellproben im Intervall von $0,66 \mu\text{m}$ bis $0,91 \mu\text{m}$. Folglich genügten die verfügbaren Auflösungen des Mikroskops der optischen Erfassung aller relevanter molekularbiologischer Strukturen.

Neben dem Auflösungsvermögen der technischen Aparatur ist die Abtastfrequenz bedeutend für die Akquirierung der Bilddaten. Hierbei entspricht die Abtastfrequenz nicht nur der Frequenz, mit welcher die Zellproben von den einzelnen Anregungslasern gescannt werden, sondern auch derjenigen, mit welcher der Punktdetektor die emittierten Lichtsignale pro Zeiteinheit erfasst und schließlich digitalisiert. Für eine

nahezu verlustfreie Umwandlung von analogen Signalen in digitale ist das sogenannte Nyquist-Shannon-Abtasttheorem essenziell. Es fordert eine minimale Abtastfrequenz, um alle im Signal vorkommenden Frequenzen vollständig zu erfassen:

$$f_{Abtastung} > 2 \cdot f_{Signal,max}. \quad (2)$$

Gemäß der Bedingung (2) muss ein Signal mit mehr als der doppelt so hohen wie die höchste ($f_{Signal,max}$), im Signal vorkommende Frequenz ($f_{Abtastung}$) abgetastet werden, damit eine nahezu exakte digitale Rekonstruktion des Signals möglich wird. Theoretisch ist eine genaue Nachbildung des Signals nur durch eine unendlich hohe Abtastfrequenz zu realisieren. In der Praxis beschränkt man sich auf die durch das Abtasttheorem postulierte endliche Frequenz, und rekonstruiert die fehlenden Abtastwerte durch Interpolation.

In Bezug auf (2) versteht man unter der Nyquist-Frequenz die halbe Abtastfrequenz:

$$f_{Nyquist} = \frac{1}{2} \cdot f_{Abtastung}. \quad (3)$$

Dieses Kriterium lässt sich ebenso auf die korrespondierenden Nyquist-Abtastabstände übertragen, die auch als kritische Abtastabstände bezeichnet werden. Es gelten für konfokale Mikroskope folgende Gleichungen, um optimale laterale und axiale Abtastabstände zu bestimmen (Scientific Volume Imaging 2013; Sheppard 1986a; Sheppard 1986b):

$$\Delta_{Nyquist,lateral} = \frac{\lambda_{Anregung}}{8 \cdot n \cdot \sin(\alpha)} \quad \Delta_{Nyquist,axial} = \frac{\lambda_{Anregung}}{4 \cdot n \cdot (1 - \cos(\alpha))}, \quad (4)$$

wobei $\lambda_{Anregung}$ die Wellenlänge des Anregungslichts repräsentiert, n den Brechungsindex des Immersionsmediums und α den Öffnungswinkel des Objektivs. Mit Hilfe von NA als numerische Apertur und $\alpha = \arcsin(\frac{NA}{n})$ lassen sich α und damit gemäß (4) die Abtastabstände berechnen.

Mit den bekannten Parametern (vgl. Gleichungen (1)), die zur mikroskopischen Analyse eingestellt waren, konnten die lateralen und axialen Nyquist-Abtastabstände in Abhängigkeit der verwendeten Laserwellenlängen für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe ermittelt werden. Tabelle 2 zeigt die resultierenden Werte.

Im idealen Fall sollten zur Mikroskopierung die gewählten Abtastabstände maximal

Tabelle 2: Berechnete laterale ($\Delta_{Nyquist,lateral}$) und axiale ($\Delta_{Nyquist,axial}$) Nyquist-Abtastabstände in Abhängigkeit der angewandten Wellenlängen $\lambda_{Anregung}$ des Anregungslichts.

Fluorophor($\lambda_{Anregung}$ in nm)	$\Delta_{Nyquist,lateral}$ in nm	$\Delta_{Nyquist,axial}$ in nm
FITC(488)	43,57	130,35
Cy3(543)	48,48	145,04

diesen Werten entsprechen. Kann die Bedingung des Abtasttheorems auf Grund technischer Beschränkungen nicht erfüllt werden, oder liegen die Abtastdistanzen signifikant über den entsprechenden empfohlenen Nyquist-Abtastabständen, wird das Signal nur unvollständig digital abgebildet. Die Digitalisierung wäre damit verlustbehaftet, und es würden Ungenauigkeiten in Form von Bild-Artefakten im digitalen Abbild beobachtet werden. Signifikant kleinere Werte als die geforderten würden hingegen nur unwesentlich zu einer Qualitätsverbesserung der digitalen Bilddaten beitragen, jedoch die Erfassungsdauer der Daten erhöhen sowie größere Datenmengen generieren (Scriven et al. 2008). Zudem würden sehr kleine Nyquist-Abtastabstände zu einer Ausbleichung der Fluorophore führen, da jede Laserabtastung die Fluoreszenz-Fähigkeit der Farbstoffe, auch unter und über der jeweiligen Fokusebene schwächt. Dieser vielfach in Fachkreisen diskutierte Bleaching-Effekt begrenzt die maximal mögliche Anzahl der zu erfassenden Schichtbilder (Preim und Bartz 2007; Rittscher et al. 2008; Russ 2007; Wu et al. 2008). Aus diesen Gründen sind die Abtastfrequenzen derart zu wählen, dass ein Kompromiss im Hinblick auf Mindest-Abtastfrequenz, Bildqualität, informationellem Zugewinn und Ausbleichung der Fluoreszenzfarbstoffe erzielt wird. Dadurch lassen sich auch die relativ kleinen Bilddimensionen von $512 \times 512 \text{ Pixel}$ sowie die geringe Anzahl der Bildschichten erklären (vgl. Tabelle 1).

Auf den folgenden Abbildungen werden die drei selektierten, vom Mikroskop erzeugten Bildstapel der Zellproben jeweils einzeln dargestellt. Aus Übersichtlichkeitsgründen wurden das erste, letzte und lediglich ein beliebig dazwischenliegendes Schichtbild jeweils aus einem Bildstapel pro Einfarbkanal (Grün und Rot) ausgewählt.

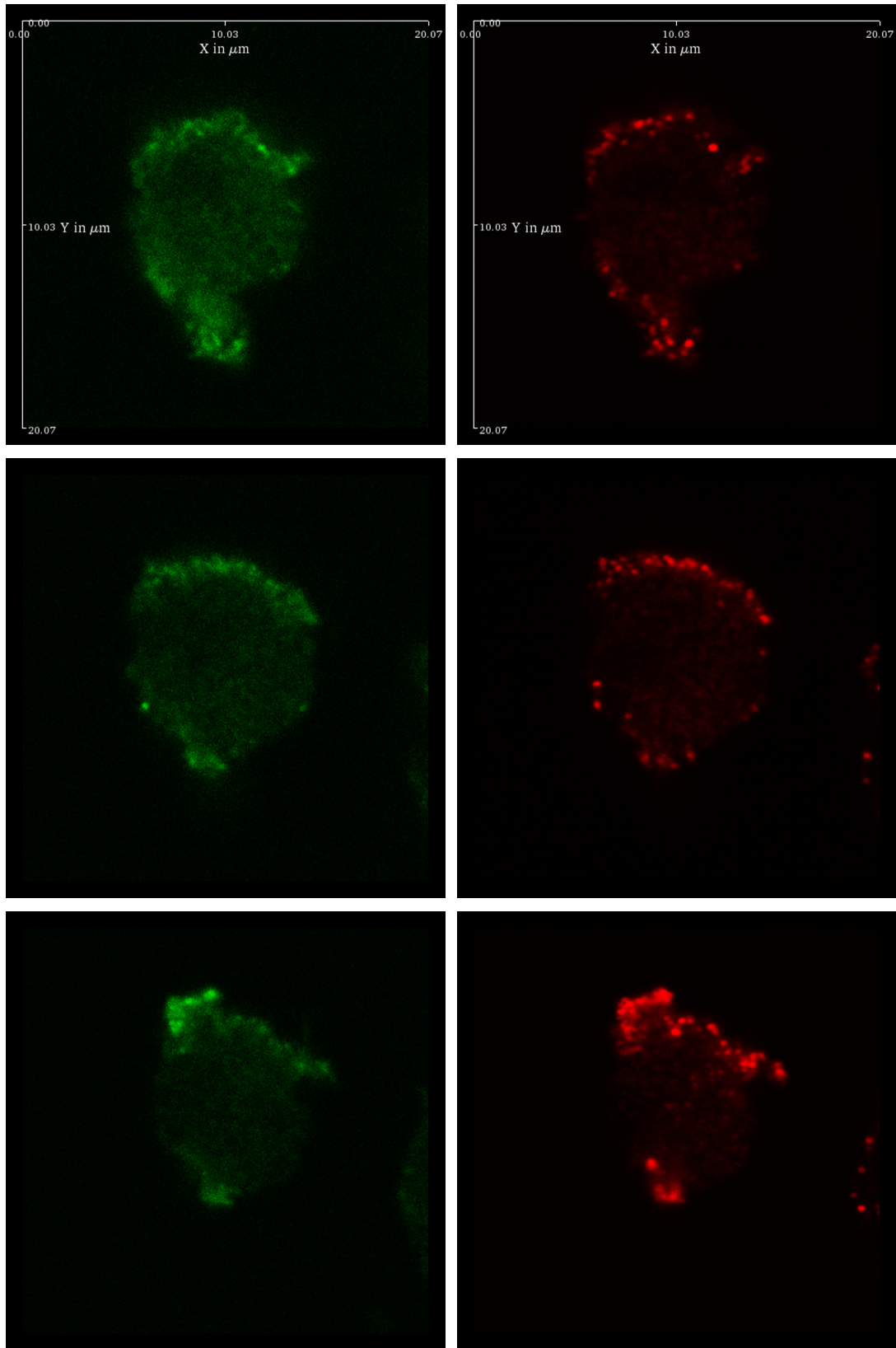


Abbildung 2: Partieller Bilddatensatz der Zellprobe „CerCD952min1“: Linke Spalte zeigt Schichtbilder des CD95-Bildkanals (grün) in aufsteigender Fokusebene (von oben nach unten). Rechte Spalte entsprechend Bilder des Ceramid-Bildkanals (rot).

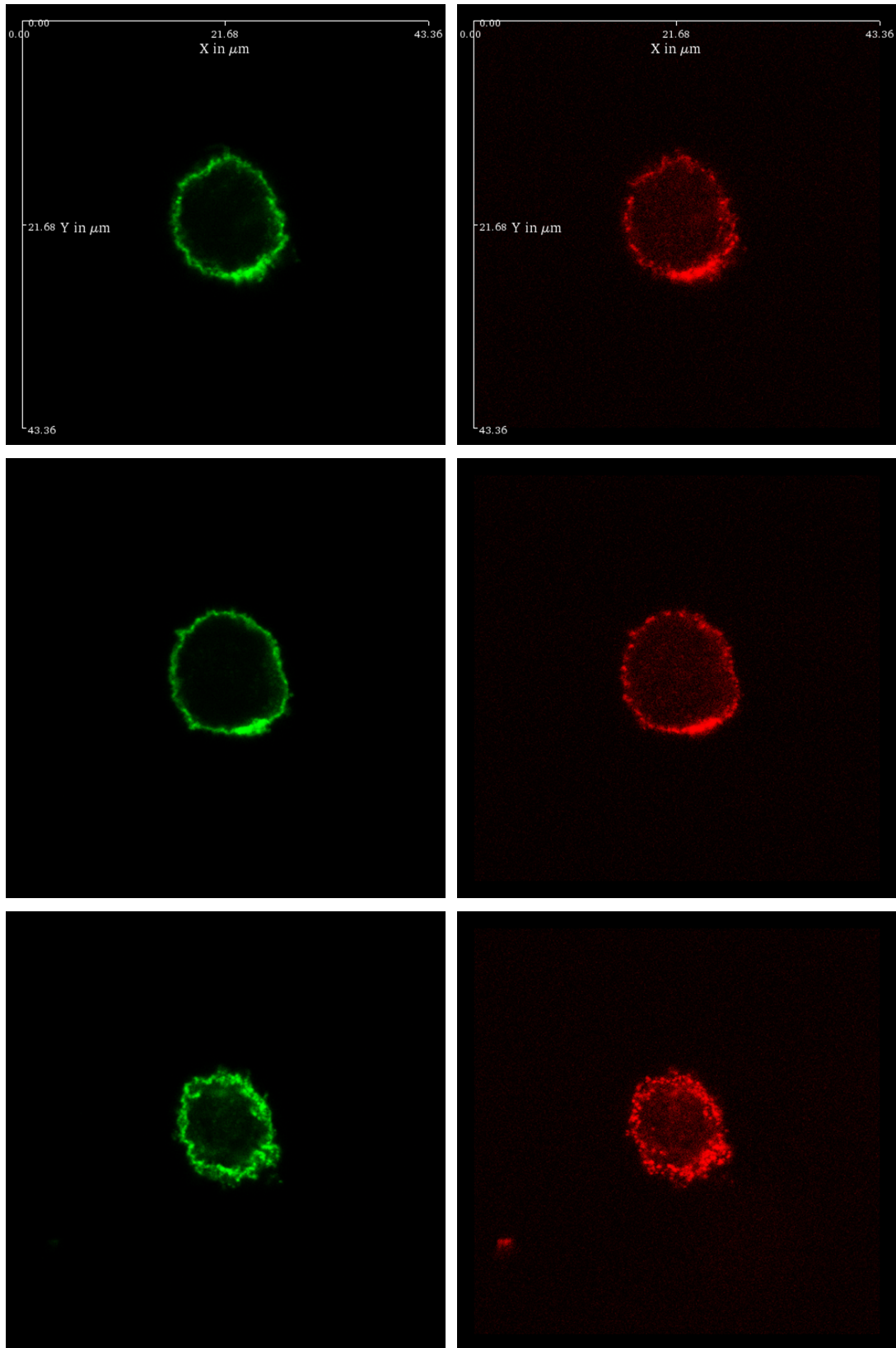


Abbildung 3: Partieller Bilddatensatz der Zellprobe „JYASM5min3“: Linke Spalte zeigt Schichtbilder des CD95-Bildkanals (grün) in aufsteigender Fokusebene (von oben nach unten). Rechte Spalte entsprechend Bilder des Ceramid-Bildkanals (rot).

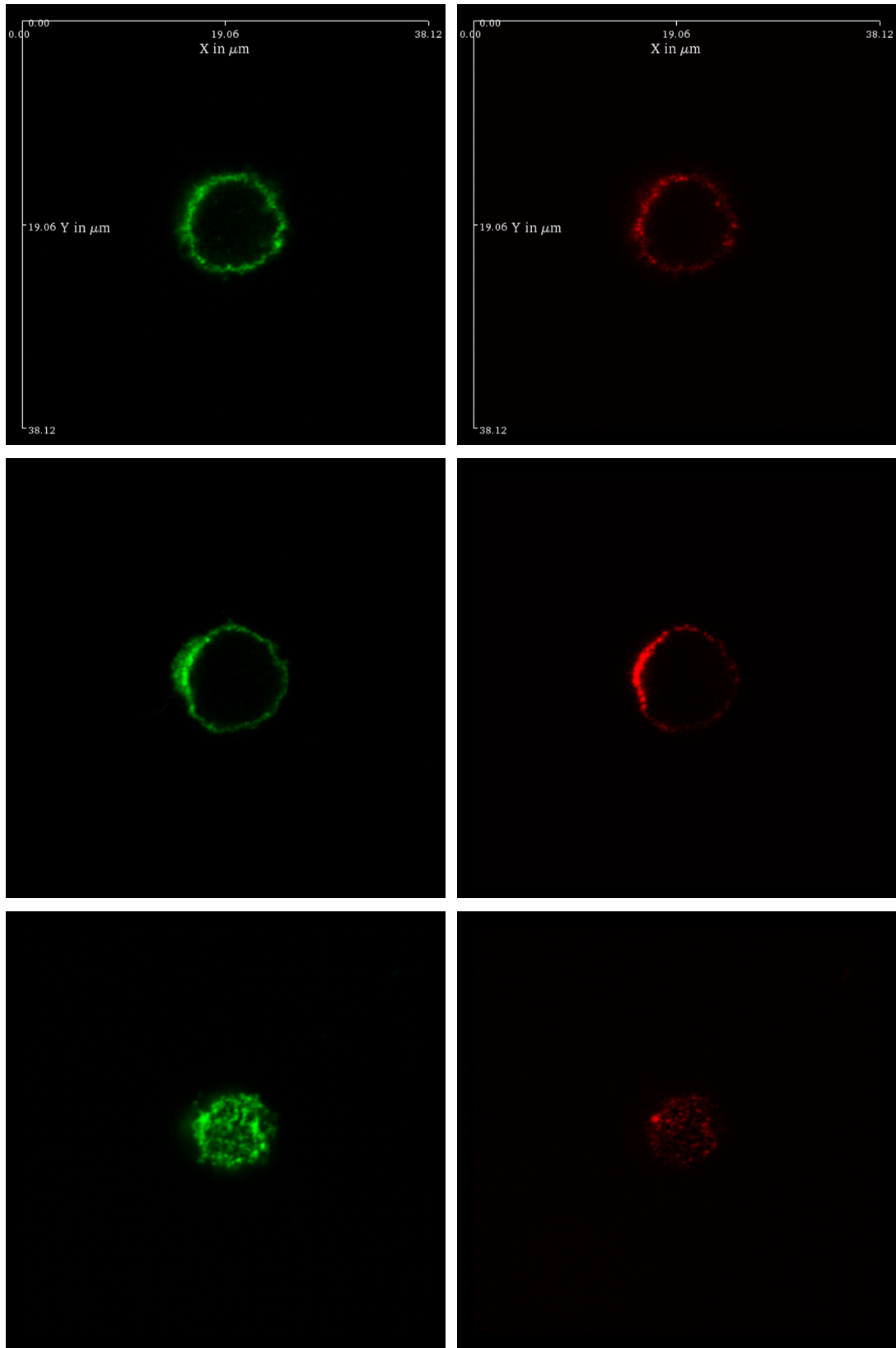


Abbildung 4: Partieller Bilddatensatz der Zellprobe „JYASM5min4“: Linke Spalte zeigt Schichtbilder des CD95-Bildkanals (grün) in aufsteigender Fokusebene (von oben nach unten). Rechte Spalte entsprechend Bilder des Ceramid-Bildkanals (rot).

2.3 Bildvorverarbeitung

Neben dem aufnahmebedingten typischen Rauschen wiesen die gewonnenen Bilder Kontrastarmut und unausgewogene Helligkeitsverteilungen auf. Gerade homogene Intensitätsverteilungen, die mit den entsprechenden Zellbestandteilen assoziiert sind, sind für eine anschließende Kollokalisationsanalyse essenziell. Gründe für die inhomogenen Intensitätsverteilungen können in den nicht optimalen Parametereinstellungen während der Bildakquise und/oder in den beschränkten technischen Eigenschaften der Apparatur hinsichtlich geringer Sensorempfindlichkeit liegen. Daher sind vorbereitende Schritte zur Bildverbesserung und damit für eine spätere optimierte Visualisierung wichtig.

2.3.1 Kontrastverbesserung

Die Bildanalyse ergab, dass die gewonnenen Bilder einen geringen Kontrast aufwiesen, welcher durch die Interpretation der entsprechenden Histogramme bestätigt wurde. Hierbei zeigten die einzelnen Histogramme eine einseitige Verteilung der Intensitäten und eine mangelnde Ausnutzung des verfügbaren Tonwerttraumes (maximal 256 mögliche Tonwerte; vgl. Bildeigenschaften in 2.2). Der Kontrast K eines Bildes ist maximal und optimal, wenn jede Intensität im beschränkten Farb-/Tonwertraum relativ gleich verteilt vorkommt. Er kann wie folgt mathematisch aufgefasst werden (Shannon 2001; Polasek 1994; Handels 2009):

$$K = -\frac{1}{\log_2(G)} \cdot \sum_{g=0}^G p(g) \cdot \log_2(p(g)), \quad (5)$$

wobei G den größten im Bild vorkommenden Tonwert und $p(g)$ die Häufigkeit eines einzelnen Tonwertes g repräsentieren. Die Gleichung (5) ähnelt der Definitionsgleichung der Entropie aus der Informationstheorie. Der klassischen Entropiegleichung fehlt lediglich der Faktor $\frac{1}{\log_2 G}$, welcher die Kontrastwerte auf das Intervall $[0, 1]$ normiert. Der Kontrast eines Bildes kann demgemäß mit der Entropie, mit dem Grad des Informationsgehaltes eines Bildes gleichgesetzt werden: Je mehr unterschiedliche Tonwerte im Bild vorhanden sind, desto höher ist der Informationsgehalt der Tonwertmenge und desto höher ist der Speicherbedarf hinsichtlich der Kodierung

eines einzelnen Tonwertes. Der Kontrast ist hierbei hoch. Liegen demgegenüber die Tonwerte innerhalb des Histogramms dicht beieinander und kommen einige Werte nur selten oder gar nicht vor, ergibt sich ein niedriger Informationsgehalt des Bildes bzw. Speicherbedarf des zu kodierenden Tonwertes (Schmidt 2005). In diesem Fall ist der Kontrast klein.

Bei niedrigen ermittelten Kontrastwerten sollte eine sogenannte Tonwertkorrektur vorgenommen werden. Hierbei kann die Kontrastanpassung durch eine lineare Transformation erzielt werden. Dazu werden die Tonwerte aus einem Tonwertraum in Werte aus einem modifizierten (gespreizten) Raum transformiert. Mit Hilfe folgendes mathematischen Zusammenhanges lässt sich eine solche Transformation bewerkstelligen (Ibáñez et al. 2005):

$$g' = T(g) = \frac{g - g_{min}}{g_{max} - g_{min}} \cdot (g'_{max} - g'_{min}) + g'_{min}, \quad (6)$$

mit g_{min} , g_{max} jeweilig für den minimalen und maximalen Intensitätswert. Gemäß (6) kann ein Tonwert g von einem Tonwertraum in einen anderen überführt werden, indem sein Wert zunächst in den Ursprung verschoben wird (entspricht einer Verschiebung des gesamten Raumes in den Ursprung), ferner normiert wird (Dividend $g_{max} - g_{min}$), darauf um den modifizierten Tonwertbereich skaliert und schließlich um den minimalen Tonwert des transformierten Raumes verschoben wird. Mit (6) lässt sich folglich eine Spreizung und eine Stauchung des Tonwertraumes umsetzen. Das entsprechende implementierte Bildbearbeitungsfilter, welches die oben beschriebene Kontrastanhebung mit Hilfe einer linearen Transformation durchführt, und dessen bildliche Resultate werden in 3.1.1 detailliert beschrieben.

2.3.2 Rauschunterdrückung und Kantenerhaltung

Die Mikroskopie-Bilder wiesen neben der Kontrastarmut ebenso ein Hintergrundrauschen auf. Dieses Phänomen, welches häufig bei durch Sensor erfassten Bildern auftritt, ist zufällig in Form von störenden Bildpunkten innerhalb eines Bildes verteilt und kann irrelevante Bildbereiche z. B. den Hintergrund vor dem zu interessierenden Objekt betreffen. Die Ursachen für diese Bildstörungen können neben der eingestellten Toleranzschwelle der Sensorempfindlichkeit auch von biologischer Bedeutung

sein. So können die Eigenfluoreszenz der Zellen und unspezifische Bindungen der Antikörper mit ihren fluoreszierenden Farbstoffen dazu führen, dass Intensitäten an unerwarteten Bereichen registriert werden und nachher als Ausreißer in der Intensitätsverteilung beobachtet werden können.

Um dieses Hintergrundrauschen weitgehend entfernen zu können, gibt es in der Bildverarbeitung mehrere Ansätze. Hierbei ist es aus biologischer Sicht wichtig, die störenden Bildpunkte zu entfernen und dabei objektrelevante Informationen wie Kanten und granuläre Strukturen zu erhalten. Ein denkbarer, einfacher Ansatz wäre das Prinzip der Schwellenwertfilterung, bei der ein festzulegender Schwellenwert bestimmt, welche Intensitäten dem Objekt und Hintergrund zugeordnet werden. Etwaige störende Bildpunkte könnten auf die Intensität des Hintergrundes gesetzt werden. Allerdings hat dieses Verfahren einen erheblichen Nachteil: Denn durch die manuelle Festlegung des Schwellenwertes könnten ebenso auch wichtige Bildinformationen wie schwache zwischen starken Intensitäten verloren gehen.

Auf Hintergrundrauschen zurückzuführende Störungen können sich häufig in niedrigen Frequenzen im Zeit-Frequenz-Bereich eines Bildes widerspiegeln. Durch die Festlegung eines geeigneten Schwellenwertes könnte eine Schwellenwertfilterung in Form einer Hochpassfilterung funktionieren. Allerdings kann eine solche Frequenzverteilung nicht garantiert werden.

Aus den erwähnten Gründen werden häufig in der medizinischen und biologischen Bildverarbeitung Filter benötigt und genutzt, die mit den Bildinformationen subtil umgehen, da jeder im Bild innewohnende Intensitätswert von relevanter Bedeutung sein kann. So geben etwa die in den verwendeten Bildern beobachteten granulären Strukturen, welche meist von Objektkanten wie Zellmembranen umschlossen sind, wichtige biologische Hinweise darüber, wie und mit welcher Konzentration die zellulären Bestandteile innerhalb der Zelle verteilt sind. Solche Objektkanten korrelieren in der Regel mit hohen, aus dem Bild zu ermittelnden Gradienten, anhand derer ein adäquates Bildverarbeitungsfilter die Kanten detektieren und entsprechend seine Filterungsstärke regulieren kann. Die sogenannten nicht linearen (anisotropen) Diffusionsfilter weisen diese Merkmale auf. Ihre mathematische Formulierung und Entwicklung geht auf Perona und Malik zurück, welche 1990 die instationäre Diffu-

sionsgleichung

$$\frac{\partial g}{\partial t} = \operatorname{div}(D \cdot \nabla g) \quad (7)$$

erweiterten, welche sich durch Einsetzen des Fick'schen Gesetzes

$$j = -D \cdot \nabla g \quad (8)$$

in die Kontinuitätsgleichung

$$\frac{\partial g}{\partial t} = -\operatorname{div} j \quad (9)$$

ergibt, wobei g dem Originalbild entspricht (Weickert 1998). Beide Gleichungen (8) und (9) beschreiben hierbei den einer Diffusion zugrunde liegenden Transportprozess, der zum natürlichen Ausgleich von Konzentrationsdifferenzen führt, ohne dem Prozess Masse zu- oder abzuführen. Hinsichtlich der Erweiterung der instationären Diffusionsgleichung, ersetzten Perona und Malik den Diffusionstensor D durch eine Funktion, welche die lokale Bildstruktur adaptiert und die Diffusivität $h()$ in den Bildbereichen herabsetzt, in denen mit großer Wahrscheinlichkeit Objektkanten zu erwarten sind. Durch $|\nabla g|$ kann diese Wahrscheinlichkeit abgeschätzt werden, und es ergibt sich (Perona und Malik 1990):

$$\frac{\partial g}{\partial t} = \operatorname{div}(h(|\nabla g|)\nabla g), \quad (10)$$

mit folgenden vorgeschlagenen Funktionen $h()$ zur weitgehenden Kantenerhaltung

$$h(|\nabla g|) = \frac{1}{1 + \frac{|\nabla g|^2}{\lambda^2}} \quad \text{mit } \lambda > 0 \quad (11)$$

$$h(|\nabla g|) = \exp\left(\frac{-|\nabla g|^2}{\lambda^2}\right) \quad \text{mit } \lambda > 0. \quad (12)$$

Der frei wählbare Parameter λ bestimmt hierbei das Maß der Filterungsabschwächung an der Kante. Da dieses von Perona und Malik vorgeschlagene Diffusionsfilter keinen Diffusionstensor mehr verwendet, findet demgegenüber lediglich eine Glättung statt, die senkrecht zur Kante verläuft. Parallel zur Diffusion verlaufende Kanten bleiben verrauscht. In den meisten Fällen ist es wünschenswert, dass die detektierten Objektkanten in alle Richtungen geglättet werden. Des Weiteren lag der Fokus bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analyse auf die inner-zellulären granulären Strukturen. Daher wurde eine spezialisierte Form eines

Diffusionsfilters verwendet, welches einer anisotropen Glättung bei weitgehender Erhaltung detaillierter Strukturen innerhalb eines von Objektkanten eingeschlossenen Bildbereichs gerecht wurde. Für die Umsetzung dieser an den Filterprozess gestellten Anforderungen musste die Perona-Malik-Gleichung (10) erweitert werden.

Whitaker und Xue schlugen in ihrer Arbeit aus dem Jahre 2001 folgende modifizierte Diffusionsgleichung vor,

$$\frac{\partial g}{\partial t} = |\nabla g| \kappa_c \quad (13)$$

welche mit

$$\kappa_c = \operatorname{div} \left(h(|\nabla g|) \frac{\nabla g}{|\nabla g|} \right) \quad (14)$$

die sogenannte MCDE (Abkürzung für Modified Curvature Diffusion Equation) ergab (Whitaker und Xue 2001):

$$\frac{\partial g}{\partial t} = |\nabla g| \operatorname{div} \left(h(|\nabla g|) \frac{\nabla g}{|\nabla g|} \right). \quad (15)$$

Mit der ausgewählten Funktion $h()$ aus (11) zur Festlegung der Diffusivität ist das Ziel, die vollständige Gleichung (15) zu lösen. Hierzu bietet ITK eine Lösung und fertige Implementierung des beschriebenen Diffusionsfilters an, welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Die detaillierte Beschreibung über die Nutzung des Filters sowie seiner Bildresultate erfolgt in 3.1.3.

Um die resultierende Bildqualität des verwendeten Diffusionsfilters vergleichen und bewerten zu können, wurde die bilaterale Filterung genutzt. Das Filter wurde im Jahre 1998 von Tomasi und Manduchi als Alternative zu den damals gebräuchlichsten Glättungsfilters vorgestellt. Insbesondere weist es ähnlich wie die nicht lineare anisotrope Diffusionsfilterung rauschunterdrückende und kantenerhaltende Merkmale auf. Die Glättungsmethode des Filters basiert auf einer nicht linearen Kombination benachbarter Bildpunkte. Hierzu werden die einzelnen Intensitäten anhand ihrer metrischen Distanz und fotometrischen Ähnlichkeit während eines nicht iterativen Prozesses kombiniert, und diejenigen Bildpunkte zur Kalkulation des resultierenden Punktes präferiert, die sowohl räumlich als auch farblich sehr dicht beieinander liegen (Tomasi und Manduchi 1998). Das Filter kann wie folgt mathematisch formuliert werden (Ibáñez et al. 2005; Tomasi und Manduchi 1998):

$$h(x) = k^{-1}(x) \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(\epsilon) c(\epsilon, x) s(f(\epsilon), f(x)) d\epsilon \quad (16)$$

mit dem Normalisierungsfaktor

$$k(x) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} c(\epsilon, x) s(f(\epsilon), f(x)) d\epsilon, \quad (17)$$

wobei x die Koordinaten eines im Mittelpunkt befindlichen Bildpunktes und ϵ die eines dazu benachbarten repräsentieren. $f()$ und $h()$ entsprechen jeweils dem originalen und gefilterten Bild. Mit $c()$ und $s()$ lassen sich Funktionen definieren, welche festlegen, wie die räumlichen und farblichen Distanzen berechnet werden. Folglich haben diese einen entscheidenden Einfluss auf den Filterungsprozess. Tomasi und Manduchi nutzten und schlugen in ihrer Arbeit Gauss'sche Faltungskerne vor, die folgendermaßen mathematisch beschrieben werden können (Ibáñez et al. 2005):

$$c(\epsilon, x) = \exp\left(\frac{\|\epsilon - x\|^2}{\sigma_c^2}\right) \quad (18)$$

und

$$s(f(\epsilon), f(x)) = \exp\left(\frac{\|f(\epsilon) - f(x)\|^2}{\sigma_s^2}\right), \quad (19)$$

mit σ_c und σ_s als einstellbare Parameter zur Festlegung der Filter-Empfindlichkeit. Die bilaterale Filterung bietet im Vergleich zu anderen Glättungsfilttern (auch zur anisotropen Diffusionsfilterung) mehrere Vorteile. Diesbezüglich ist die Anwendung des Filters auf Farbbilder unproblematisch, da es alle Farbkanäle im Verlauf der Glättung synchron berücksichtigen kann. Das bildliche Resultat ist im Gegensatz zu anderen Glättungsverfahren frei von fehlerhaften Farbkombinationen. Des Weiteren unterstützt das Filter Funktionen zur Definition der geometrischen Distanz und fotometrischen Ähnlichkeit. Angesichts dessen können Metriken für den Filterungsprozess gewählt werden, die der menschlichen Wahrnehmung zur Unterscheidung von Objekten und Objektkanten entsprechen (Tomasi und Manduchi 1998).

Implementierung, Modifikation und Nutzung des Filters sowie dessen visuellen Ergebnisse werden in 3.1.3 näher erläutert.

2.4 Volumenvisualisierung

Um die Mechanismen der Rezeptor-Clusterbildung besser zu verstehen und die exakte Verteilung von CD95-Proteinmolekülen innerhalb ceramidreicher Domänen zu bestimmen, ist eine räumliche Interpretation der akquirierten zweidimensionalen

Schichtbilddaten unerlässlich. In diesem Abschnitt wird beschrieben, welche grundlegenden Techniken zur räumlichen Visualisierung existieren und häufig ihre Anwendung in der medizinischen sowie biologischen Bildverarbeitung finden.

Generell stellt eine Volumenvisualisierung eine simultane visuelle Repräsentation aller Bilder eines räumlichen Bilddatensatzes dar. Die einzelnen Bildelemente (Voxel) werden durch Verfahren selektiert, gewichtet, kombiniert und schließlich auf eine Bildebene wie Bildschirm projiziert. Die Projektionsebene fungiert hierbei als eine Art Fenster zu den Bilddaten, welche ein Betrachter zu analysieren beabsichtigt (Preim und Bartz 2007). Die grundlegenden Schritte, welche aufeinanderfolgend zu einer Volumenvisualisierung führen, sind nach der Bildakquise und Bildvorverarbeitung wie Filterung zur Bildverbesserung oder Segmentierung von Objekten, die Selektion eines zu interessierenden Bereichs des Bilddatensatzes (Clipping), die Berechnung der Normalen sowie die Klassifikation jedes einzelnen Voxels und schließlich die Projektion der räumlichen Bildelemente auf eine Ebene bzw. in ein resultierendes Bild durch entsprechende Rendering-Methoden. Eine wichtige Bedeutung kommt insbesondere der Klassifikation zu, da durch sie optische Eigenschaften wie Farben, Transparenz bzw. Opazität räumlichen Regionen innerhalb des Volumens zugewiesen werden. Die Zuweisung geschieht mit Hilfe von sogenannten Transferfunktionen, die mathematisch formuliert verschiedene Datenwerte eines Voxels V_i auf eine Menge optischer Merkmale O_i abbilden. Zumeist weisen die Voxel zugrunde liegender medizinischer oder biologischer Bilddatensätze lediglich einen einzelnen Datenwert wie einen Intensitätswert auf, so dass eine eindimensionale Transferfunktion genügt, um eine Klassifikation durchzuführen. Dieser einzelne Datenwert kann jedoch entweder auf einen Tupel optischer Eigenschaften O_i durch eine einzige Transferfunktion (20), oder auf jeweils einzelne optische Merkmale durch individuelle Transferfunktionen (21) abgebildet werden (Preim und Bartz 2007):

$$tf_0 : V \rightarrow O_0 \times O_1 \times \dots \times O_{n-1} \quad (20)$$

$$\begin{aligned}
tf_0 : V &\rightarrow O_0 \\
tf_1 : V &\rightarrow O_1 \\
&\vdots \\
tf_{n-1} : V &\rightarrow O_{n-1}.
\end{aligned}
\tag{21}$$

Ein häufig in der Bildverarbeitung verwendetes Farbmodell ist das RGB α -Modell, mit welchem der gesamte diskrete Farbraum aus den Grundfarben Rot, Grün und Blau genutzt werden kann. Zusätzlich bestimmt der α -Wert die Opazität jeder einzelnen Farbe, so dass dadurch additive Mischungen räumlich übereinanderliegender Farben möglich werden. In Bezug auf (21) lassen sich einzelne Transferfunktionen für jeweils einen Voxel-Wert im RGB α -Modell wie folgt definieren:

$$\begin{aligned}
tf_R : V &\rightarrow R \\
tf_G : V &\rightarrow G \\
tf_B : V &\rightarrow B \\
tf_\alpha : V &\rightarrow \alpha.
\end{aligned}
\tag{22}$$

Im Allgemeinen werden unter der Volumenvisualisierung direkte und indirekte Verfahren subsumiert, die sich in weitere Kategorien einteilen lassen. Die zugehörigen und verwendeten Algorithmen werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

2.4.1 Raycasting

Raycasting ist ein klassischer Algorithmus zur direkten Volumenvisualisierung, mit der ein räumlicher Bilddatensatz direkt visuell dargestellt wird. Hierbei wird auf die Generierung einer Meta-Repräsentation verzichtet, die bei indirekten Verfahren einer polygonalen Darstellung von Oberflächen entspricht (Preim und Bartz 2007). Das eigentliche Rendern, die Berechnung der räumlichen Szene aus dem zugrunde liegenden Bildmaterial wird durch viele Faktoren beeinflusst. Neben der Interaktion zwischen Licht, Objekten und Medium spielt dabei das Nachahmen von physikalischen Prozessen wie Emission und Absorption von Licht eine bedeutende Rolle. Diesbezüglich fasst das von Sabella im Jahre 1988 vorgestellte physikalische Standardmodell der Volumenvisualisierung jedes im Volumen gleichverteilte Partikel als

eine Art kleine Lichtquelle auf, von welcher Licht durch das Volumen hindurch emittiert und durch Absorption während der Volumen-Traversierung abgeschwächt wird (Sabella 1988). Die Intensität des emittierten Lichtes I von der Lichtquelle $Q(s)$ mit der Richtung s lässt sich dabei auf folgende Art und Weise mathematisch modellieren (Preim und Bartz 2007):

$$\frac{dI}{ds} = Q(s). \quad (23)$$

s kann hierbei auch als ein Strahl, welcher von dem Auge des Betrachters ins Volumen eintritt, und $Q(s)$ als ein resultierender Wert am Austrittspunkt dieses Strahls aus dem Volumen aufgefasst werden. Durch Integration lässt sich die Differentialgleichung (23) lösen und es ergibt sich:

$$I(s) = I_{s_0} + \int_{s_0}^s Q(t)dt, \quad (24)$$

wobei I_{s_0} der Initialwert der Lichtintensität am Eintrittspunkt s_0 des Strahls ins Volumen darstellt. Da das oben erwähnte physikalische Modell auf der Interpretation der Volumendaten als eine Art von Cluster innerhalb eines homogenen Mediums basiert, muss die Abschwächung des emittierten Lichts durch dieses Medium berücksichtigt werden (Preim und Bartz 2007). Die Absorption lässt sich nach (Max 1995) wie folgt mathematisch formulieren:

$$\frac{dI}{ds} = -\tau(s) \cdot I(s) \quad (25)$$

mit $\tau(s)$ als Abschwächungskoeffizienten. Durch Integration von (25) ergibt sich

$$I(s) = I_{s_0} \cdot \exp\left(-\int_{s_0}^s \tau(t)dt\right), \quad (26)$$

wobei $\exp()$ den Initialwert der Lichtintensität I_{s_0} an der Position s entlang des Strahls abschwächt (Preim und Bartz 2007). Durch die Kombination der Gleichungen (24) und (26) ausgedrückt als Differentialgleichung

$$\frac{dI}{ds} = Q(s) - \tau s \cdot I(s) \quad (27)$$

kann mit Hilfe der Integration die sogenannte Volumerendering-Gleichung bestimmt werden (Max 1995):

$$\begin{aligned} I(s) &= I_{s_0} \cdot \exp\left(-\int_{s_0}^s \tau(t)dt\right) + \int_{s_0}^s Q(p) \cdot \exp\left(-\int_p^s \tau(t)dt\right) dp \\ &= I_{s_0} \cdot T_{s_0}(s) + \int_{s_0}^s Q(p) \cdot T_p(p)dp, \end{aligned} \quad (28)$$

wobei $T_{s_0/p}(s_0/p) = \exp\left(-\int_{s_0/p}^s \tau(t)dt\right)$ die Abschwächungsfunktionen repräsentieren. Das dieser Gleichung (28) zugrunde liegende physikalische Standardmodell von Sabella beschränkt sich lediglich auf die Emission und Absorption eines in ein Volumen verfolgten Lichtstrahls. Im Vergleich zu der äußerst rechenintensiven räumlichen Visualisierung mit Hilfe des sogenannten Raytracing-Algorithmus werden Reflektionen, Refraktionen von Licht sowie die Einflussnahme sekundärer Strahlen für das Rendern nicht berücksichtigt. Demzufolge stellt das Raycasting eine beschnittene Variante des Raytracing-Algorithmus dar.

Für alle Transferfunktionen lässt sich die Gleichung (28) auf analytischem Wege nicht lösen; sie muss numerisch gelöst werden. Mit Hilfe der daraus gewonnenen diskreten Volumerendering-Gleichung vollzieht der Raycasting-Algorithmus dabei folgende geordnete, methodische Schritte (Preim und Bartz 2007):

1. **Sampling:** Gemäß der definierten Volumerendering-Gleichung wird die räumliche Visualisierung mit Hilfe von Lichtstrahlen umgesetzt, welche vom Betrachtungspunkt durch die Projektionsebene und durch den volumetrischen Datensatz verfolgt werden. Entlang eines Strahls werden alle abgetasteten Volumenelemente an diskreten Positionen im Volumen akkumuliert und damit ein konkreter Voxelwert bzw. Intensitätswert bestimmt. In diesem Zusammenhang wird der Zugriff auf diese spezifischen Positionen als Sampling verstanden. Sowohl durch die Sampling-Rate bzw. Abtastfrequenz (vgl. Nyquist-Shannon-Abtasttheorem in 2.2) als auch durch die verfügbare und gewählte Interpolationsmethode (typischerweise trilineare Interpolation) wird das Sampling beeinflusst.
2. **Klassifikation und Beleuchtung:** Die durch das Sampling gewonnenen Daten (Position und Wert eines Volumenelements) werden bei der Klassifikation genutzt, um den gesampelten Voxelwert mit Hilfe von Transferfunktionen auf einen Grau- oder Farbwert abzubilden. Anschließend wird der resultierende Wert für die Berechnung des finalen, auf der Projektionsebene darzustellenden Wertes (vgl. $Q(s)$ in Gleichung (23)) auf Basis eines gewählten Beleuchtungsmodells herangezogen. Häufig wird hierbei das sogenannte Phong'sche

Beleuchtungsmodell verwendet.

3. **Komposition** Im letzten Schritt werden alle illuminierten Werte entlang des Strahls gemäß des zugrunde liegenden physikalischen Modells unter Verwendung einer sogenannten Blending-Funktion zusammengefasst (Komposition).

Mit diesen Schritten schließt der Algorithmus die Bereitstellung des Bildes aus einem festgelegten Blickwinkel auf die 3D-Szene ab. Nach jeder interaktiven Veränderung des Blickwinkels beginnt der Algorithmus den Renderingsprozess von vorne.

Das Raycasting ist ein bewährtes und häufig eingesetztes Verfahren. Auf Grund seiner resultierenden hoch-qualitativen räumlichen Visualisierungen wurde es für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analyse verwendet. Seine Implementierung, Paramtereinstellungen und visuellen Ergebnisse werden in 3.2.1 erörtert. Da der Algorithmus auf Grund seiner Komplexität sehr rechenintensiv ist, ist die Interaktivität der 3D-Szene zeitverzögert. Dieser Nachteil wird in 4 diskutiert.

2.4.2 Texturemapping

Zu qualitativen Vergleichszwecken wurde ein alternativer Algorithmus zur direkten Volumenvisualisierung herangezogen. Das verwendete Texturemapping-Volumerendering (im Folgenden als Texturemapping genannt) verfolgt im Gegensatz zum vorher beschriebenen bildraumorientierten Raycasting einen objektraumorientierten Ansatz. Ursprünglich wurde das Texturemapping entwickelt, um mit Hilfe von Texturen komplexe Oberflächenstrukturen auf polygonisierten Objektoberflächen darzustellen. Auf Grund seiner inzwischen breiten Unterstützung durch die Grafikhardware wird es auch für die direkte räumliche Visualisierung von Objekten eingesetzt (Cabral et al. 1994). Der Algorithmus lässt sich in zweidimensionales und dreidimensionales Texturemapping unterteilen. Beide Varianten stellen unterschiedliche Anforderungen an die verfügbare Grafikhardware und verfahren algorithmisch verschieden. So lädt das 3D-Texturemapping im ersten Schritt den volumetrischen Datensatz vollständig in den Texturespeicher der Grafikhardware, sofern die Größe des Speichers es erlaubt. Das darauf folgende Rendern erfolgt durch Wiederabtastung bzw. (erneutes) Schneiden des Datensatzes in Schnitte, die parallel zur Bild-

ebene und orthogonal zur Blickrichtung verlaufen. Anschließend werden die durch Clipping polygonisierten Schichten mit Hilfe von speziellen Funktionen der Grafikkarte wie der OpenGL-Alpha-Blending-Funktion von hinten nach vorne (die vom Betrachter entfernteste Schicht zuerst) mit den entsprechenden Texturen belegt. Durch trilineare Interpolation ist der Algorithmus im nächsten Schritt in der Lage, Zwischenschichten zu erzeugen, und damit eine nahezu beliebig hohe Detailtreue der 3D-Visualisierung unter bestmöglicher Vermeidung von Bildartefakten zu erreichen (Preim und Bartz 2007; Schroeder et al. 2004). Dadurch erlaubt das Verfahren im Vergleich zum zweidimensionalen Texturemapping beliebige Blickwinkel auf das visualisierte Objekt ohne bedeutsame Qualitätseinbußen.

Beim 2D-Texturemapping wird der Datensatz als eine Menge aus orthogonal angeordneten Schichten aufgefasst, die nicht mehr parallel sondern fast-parallel zur Bild-/Projektionsebene orientiert sind. Auf jeder dieser polygonisierten, rechteckigen Schicht wird die entsprechende Textur projiziert. Um den gewünschten Detailgrad der 3D-Visualisierung zu erzielen, extrahiert der Algorithmus weitere Schichten aus dem Volumendatensatz mit Hilfe der Nearest-Neighbor-, bilinearen oder trilinearen Interpolation, deren einzelne Verfügbarkeit von der verwendeten Grafik-Hardware abhängt. Auf diese Weise werden texturierte Schnitte gewonnen, die von hinten nach vorne (vom Betrachter aus gesehen) in den Grafikspeicher geschrieben, dort mit Hilfe von speziellen Blending-Funktionen zusammengeführt werden und damit das gesamte Volumen umspannen (Schroeder et al. 2004).

Beide Varianten des Texturemappings erlauben eine Klassifikation der gesampelten Bildelemente. Ähnlich wie beim Raycasting (vgl. 2.4.1) können hierfür Transferfunktionen definiert werden, mit deren Hilfe räumlichen Regionen innerhalb des Volumens Farben und Opazität zugewiesen werden können. Moderne Grafikkarten ermöglichen mittlerweile die Beleuchtung im Texturemapping visualisierter 3D-Objekte. Zu diesem Zweck werden spezielle Funktionen wie Pixel- und Vertex-Shader der Grafik-Hardware benötigt und genutzt, welche die Anforderungen des zugrunde liegenden Beleuchtungsmodells (Beleuchtung durch Umgebungs- und diffuses Licht) umsetzen (Preim und Bartz 2007).

Auf Grund der gegebenen Hardwarekonfiguration (vgl. 2.6) wurde insbesondere

das dreidimensionale Texturemapping für die Analyse des zur Verfügung stehenden Bildmaterials verwendet. Die spezifischen Vor- und Nachteile beider beschriebenen Verfahren werden in 4 ausführlich diskutiert.

2.4.3 Oberflächenrekonstruktion

Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Verfahren der direkten Volumenvisualisierung, mit deren Hilfe auch innen liegende Strukturen eines 3D-Objektes dargestellt werden können, lassen sich mittels der Oberflächenrekonstruktion lediglich Oberflächen oder Konturen aus einem Volumendatensatz extrahieren. Diese Rekonstruktion kann insbesondere sinnvoll sein, wenn bei einer Studie Begrenzungen oder Oberflächen von Objekten im Vordergrund stehen. Indes kann sie für die molekularbiologische Analyse nützlich sein, in Erfahrung bringen zu können, z. B. in welchem räumlichen Ausmaß die Kolokalisationen von Ceramid und CD95-Proteinen ausfallen. Daher wurde die Oberflächenrekonstruktion als unterstützendes Mittel für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bildanalyse herangezogen.

Die Oberflächenrekonstruktion gehört zu den Verfahren der indirekten Volumenvisualisierung, da sie 3D-Objekte nicht unmittelbar aus den Informationen des Volumendatensatzes extrahiert, sondern die Bildinformationen auf eine Meta-Repräsentation abbildet. Diese Meta-Darstellung kann verschieden beschaffen sein. Der verwendete Marching-Cube-Algorithmus, welcher die indirekte Volumenvisualisierung umsetzt, erzeugt das 3D-Objekt mit Hilfe vernetzter Polygonflächen (Dürst 1988; Lorensen und Cline 1987). Hierbei wird der volumetrische Bilddatensatz als ein Quader bestehend aus Pixeln bzw. Skalarwerten aufgefasst, deren Anordnung sich aus dem Übereinanderlegen der Schichtbilder ergibt. In einem iterativen Prozess durchläuft die einfachste Variante des Algorithmus die Bilddaten in einem räumlichen Ausschnitt, in welchem acht Pixel aus zwei unmittelbar übereinanderliegenden Schichtbildern in einer würfelartigen Struktur angeordnet liegen. Jeder Skalarwert wird mit einem vorher definierten Schwellen- bzw. Konturwert verglichen, welcher empirisch ermittelt wird und die Schwelle angibt, ab welcher Intensitäts- bzw. Skalarwerte Objektkonturen repräsentieren. Häufig werden dabei die Werte oberhalb des Konturwertes der Objektoberfläche zugeordnet, und die übrigen dem Bildhin-

tergrund. Diese Art der Klassifikation stellt eine eindimensionale binäre Transferfunktion dar, mit deren Hilfe den räumlichen Bildregionen lediglich zwei mögliche optische Eigenschaften zugewiesen werden (maximale und keine Sichtbarkeit). Dadurch erhalten alle Skalarwerte optische Zustände, die bitweise als Zugriffsindex kodiert werden. Es ergeben sich 2^8 (= 256) mögliche Werte und polygonale Darstellungsformen der in der würfelartigen Volumenzelle zu erzeugenden Oberflächenteile. Diese Darstellungskonfigurationen lassen sich durch Spiegeln, Rotation und Umkehrung auf fünfzehn Formen reduzieren (Preim und Bartz 2007), deren zugehörige Informationen wie relative Vertizes in einer Lookup-Tabelle verfügbar gehalten werden. Dadurch ist mit Hilfe des oben erwähnten Index ein unmittelbarer algorithmischer Datenzugriff möglich. Durch lineare Interpolation werden die Vertizes angepasst, um eine stufenartige Rekonstruktion der vollständigen Oberfläche weitgehend zu kompensieren. Für eine spätere Beleuchtung des erzeugten 3D-Objektes werden die Normalen der einzelnen Oberflächenteile berechnet. Anschließend setzt der Algorithmus seine Ausführung mit der nächsten zu verarbeitenden Volumenzelle fort. Auf diese Weise wird schrittweise die Oberfläche aus dem Volumendatensatz extrahiert. Der Nutzen dieser Art der Visualisierung wird in 4 bewertet.

2.5 Software-Bibliotheken ITK, VTK und Qt-Framework

Aus den im Abschnitt 2.3 genannten Gründen musste das verwendete Bildmaterial auf Grund seiner Bildqualität mit Bildverarbeitungsmethoden zur Kontrastverbesserung, logarithmischer Skalierung und Rauschunterdrückung mit Kantenerhaltung vorbereitet werden. Für die anschließende räumliche Analyse bedurfte es verschiedener Techniken zur dreidimensionalen Visualisierung.

Am Anfang der vorliegenden Arbeit wurde zwischen der Eigenentwicklung aller zu erfordernden Algorithmen und der Nutzung vorhandener optimierter Methoden entschieden. Auf Grund der Komplexität dieser Algorithmen, insbesondere die für die räumliche Visualisierung, und deren Validierung durch umfangreiche Tests hätte eine eigene Implementierung einen enormen Entwicklungsaufwand verursacht, und hätte den Rahmen der vorliegenden Arbeit mit ihren definierten Zielen gesprengt. Daher wurden Software-Bibliotheken genutzt, die partiell den Umfang der benötigten

Methoden umfassten. Neben dem notwendigen Vorhandensein validierter Algorithmen war bei der Wahl der geeigneten Bibliothek deren öffentliche Erweiterbarkeit wichtig, um eigene neue Funktionen hinzufügen zu können und bestehende Algorithmen den individuellen Bedürfnissen anzupassen. Angesichts dessen wurden kostenfreie Open-Source-Bibliotheken genutzt, mit deren Hilfe mehrere Bildverarbeitungsfilter adaptiert und neuartige Methoden zur qualitativen sowie quantitativen Analyse von Kollokationen umgesetzt werden konnten. Weiterhin konnten so die neu-entwickelten Verfahren als Open Source für weiterführende Arbeiten verfügbar gehalten werden.

Für die in Abschnitt 2.3 beschriebenen und durchgeführten Techniken zur Bildvorverarbeitung wurde die Programmbibliothek Insight Segmentation and Registration Toolkit (kurz: ITK) verwendet. In Zusammenarbeit mit Partnern aus Industrie, Universitäten und Instituten wurde die Entwicklung von ITK 1999 von der US National Library of Medicine initiiert (Ibáñez et al. 2005). Ursprünglich nur auf das Visible Human Project beschränkt, ist es heute durch seine offenen Schnittstellen und die rege weltweite Beteiligung von Entwicklern, insbesondere aus Wissenschaft und Forschung, zu einer sehr umfangreichen Bibliothek herangewachsen, und bietet hinsichtlich Qualität und Performanz optimierte Bildverarbeitungsmethoden speziell für medizinische und biologische Anwendungen.

Für die anschließende räumliche Visualisierung des vorverarbeiteten Bildmaterials wurde das Visualization Toolkit (kurz: VTK) verwendet, welches eine Sammlung von Algorithmen zur Darstellung mehrdimensionaler Bilddaten sowie verschiedene Möglichkeiten zur Interaktion und Analyse bereithält. Die Ursprünge von VTK gehen bis in das Jahr 1993 zurück, in welchem mehrere Wissenschaftler aus der Forschungs- und Entwicklungsabteilung von General Electric Corporate für ihr Buch über 3D-Visualisierungsverfahren eine frei zugängliche Software-Bibliothek für Anwendungen aus diesem Bereich schufen (Schroeder et al. 2004). Ähnlich wie bei ITK wird VTK bis heute fortwährend von der weltweiten Community erweitert und verbessert, so dass es sich inzwischen zu einem sehr umfassenden Paket aus optimierten Algorithmen und Funktionen etabliert hat. Durch den permanenten Einsatz in der Medizin und Biologie sind die Methoden beider Bibliotheken genügend validiert. Auf Grund

der inzwischen von dem Unternehmen Kitware Inc. verwalteten Entwicklung beider Pakete sind ihre gegenseitige Kompatibilität und Interoperabilität wie etwa der einfache Austausch von Bilddaten gewährleistet.

Die im Rahmen dieser Arbeit eigens entwickelte Software-Anwendung „Ceramide3D“ wurde mit Hilfe des sogenannten Qt-Frameworks implementiert. Qt wurde im Jahr 1991 von den zwei norwegischen Programmierern und Gründern des Unternehmens Trolltech entwickelt, die mit den damaligen Lösungen zur plattformübergreifenden Software-Entwicklung in der Programmiersprache C++ unzufrieden waren. Das Framework gibt eine Art Implementierungsstruktur vor, in welcher die gesamte Applikation entwickelt wird. Neben einer grafischen Benutzeroberfläche (GUI) zur komfortablen Bedienung der Applikation bietet es des Weiteren nützliche erweiterte Funktionen wie die Unterstützung von Threads, der einfache I/O-Zugriff auf Dateien/Verzeichnisse oder das automatische dynamische Speichermanagement. Qt kann plattformübergreifend kompiliert werden, und kann damit ein gleiches Erscheinungsbild der GUI und Funktionalität auf verschiedenen Betriebssystemen garantieren. Durch die in das Framework bereits integrierten und nutzbaren Entwurfsmuster lässt sich die Entwicklungsdauer verkürzen. Auf Grund seiner hervorragenden offenen Architektur und Schnittstellen lassen sich die Funktionen und Algorithmen von ITK und VTK in das Framework einbinden und nutzen. Hierdurch stand eine leistungsstarke Software-Konstellation zur Verfügung, mit deren Hilfe eine stabile Applikation mit wiederverwendbaren Komponenten erstellt werden konnte.

Es wurden die Versionen der Software-Bibliotheken ITK v3.12.0 und VTK v5.4.0 genutzt. Qt wurde in der Version 4.4.2 verwendet, da die zum Entwicklungszeitpunkt aktuelle verfügbare Ausführung (ab v4.5.0) von dem Unternehmen Nokia aufgekauft wurde und damit zunächst nicht mehr lizenzfrei zur Verfügung stand.

2.6 Entwicklungsumgebung

Dieser Abschnitt widmet sich der gesamten Entwicklungsumgebung, welche die verwendete Hardware und Entwicklungssoftware umfasst. Folgende Hardware-Komponenten standen während der Software-Entwicklung zur Verfügung:

- Vierkernprozessor mit 3,2 *GHz*
- 4 *GB* Arbeitsspeicher
- Grafikkarte AMD Radeon HD 6850 mit 1 *GB* GDDR5 und 775 *MHz* Taktfrequenz

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Software-Applikation unter der oben aufgelisteten Hardware-Konfiguration entwickelt und für die Erstellung und Analyse der 3D-Visualisierungen verwendet. Die Angaben sind jedoch lediglich als empfohlene Leistungsmerkmale zu verstehen. Insbesondere stellte die Leistung der oben erwähnten Grafikkarte eine zügige Bereitstellung sowie flüssige Darstellung der räumlichen Visualisierungen bei nahezu unmittelbarer Interaktion sicher. Obligatorisch ist indes deren OpenGL-Fähigkeit mit den entsprechenden Treibern, da die verwendete Visualisierungsbibliothek VTK größtenteils auf diese Schnittstelle zurückgreift. Demgegenüber unterstützen gängige Grafikkarten mittlerweile standardmäßig OpenGL, so dass Kompatibilitätsprobleme ausgeschlossen werden dürfen. Leistung des Prozessors und Menge an Arbeitsspeicher stellen zweitrangige Anforderungen an das Computersystem dar, da diese vorwiegend einer zügigen und damit komfortablen Kompilierung der Software dienlich sind.

Die Entwicklung der Applikation wurde in nachstehender Softwareumgebung durchgeführt:

- Integrierte Entwicklungsumgebung Microsoft Visual Studio 2008 Express Edition
- Entwicklungswerkzeug CMake v2.8.10.2
- Betriebssystem Microsoft Windows XP Professional Edition

In der integrierten Entwicklungsumgebung (IDE) Visual Studio 2008 Express Edition von Microsoft wurde die Software-Anwendung programmiert. Im Vergleich zu Vollversionen stellen Express-Editionen IDEs dar, welche auf die wesentlichen Funktionen zur Software-Entwicklung zugeschnitten sind. Ihnen fehlen meistens professionelle Werkzeuge (z. B. Profiler). Sie werden von Microsoft kostenfrei zur Verfügung

gestellt und sind frei nutzbar (auch für kommerzielle Zwecke).

Die Applikation wurde vollständig in der Programmiersprache C++ implementiert. Hierbei stellte sich CMake als nützliches Werkzeug heraus, mit dessen Hilfe sich die Verknüpfung zwischen ITK, VTK und Qt unter einer Projektdatei für die IDE erstellen ließ. Ursprünglich speziell für ITK kreiert, generiert CMake hinsichtlich einer plattformübergreifenden Entwicklung alle erforderlichen betriebssystemspezifischen Dateien. Microsoft Windows XP Professional Edition wurde genutzt, da es zum Implementierungszeitpunkt von „Ceramide3D“ das meist eingesetzte Betriebssystem war und sich bis heute durch seine hohe Zuverlässigkeit auszeichnet. Auf Grund der Wahl der oben erwähnten Software-Konstellation ist die Erstellung der Applikation für andere Betriebssysteme wie Linux oder Mac OS durch Neu-Kompilierung problemlos möglich.

3 Ergebnisse

Im Hinblick auf eine optimierte Visualisierung wurde im ersten Schritt eine Vorverarbeitung zur Bildverbesserung angewandt, welche zunächst anhand von beispielhaft ausgewählten Bildern erläutert wird. Anschließend erfolgt die Darstellung der 3D-Visualisierungen in ihren verschiedenen Formen sowie diverser Einstellungsmöglichkeiten, um die Analyse zu unterstützen. Der letzte Teil dieses Kapitels widmet sich der räumlichen Kolokalisation, welche zunächst näher erläutert wird. Im Anschluss erfolgen die Beschreibung der entwickelten Methoden zur Bestimmung der Kolokalisationen und die Veranschaulichung der Resultate aus der qualitativen und quantitativen Analyse anhand von diversen Beispiel-Visualisierungen.

Alle nachfolgend beschriebenen Ergebnisse wurden mit der eigens hierfür entwickelten Software-Applikation „Ceramide3D“ erzielt.

3.1 Bildvorverarbeitung

Aus den in 2.3 erwähnten Gründen musste das verwendete Bildmaterial für eine optimierte Visualisierung und erleichterte Analyse aufbereitet werden. Im Hinblick auf die Implementierung wurden die jeweiligen Filter aus der ITK-Bibliothek genutzt, erweitert und in die ITK-Pipeline integriert. Folgende schematische Darstellung zeigt die Verkettung dieser Filter (siehe Abbildung 5).

Diese Filter-Pipeline wurde dergestalt umgesetzt, dass jedes Filter einzeln konfiguriert und de- bzw. aktiviert werden konnte. Durch separate Gewichtung wurden die Filter in ihrer Verkettung aufeinander abgestimmt und in idealer rigider Rangfolge ausgeführt. Dadurch konnten optimierte Filterergebnisse erzielt werden. Des Weiteren konnte zu jedem Zeitpunkt der anschließenden Visualisierung die gesamte vorkonfigurierte Filterumgebung manuell zugeschaltet/ausgeschlossen werden. Auf diese Weise konnten die Filterresultate unmittelbar mit den originalen Bilddaten verglichen werden. In Abbildung 5 lässt sich diese Möglichkeit anhand der mit Pfeilen verdeutlichten Aktivierung/Umgehung der Filterung durch Umreferenzierung erkennen. Die Möglichkeit zur Umreferenzierung wirkte sich positiv auf den Speicherverbrauch der Software-Applikation aus, da die vorher erzeugten Filter-Instanzen

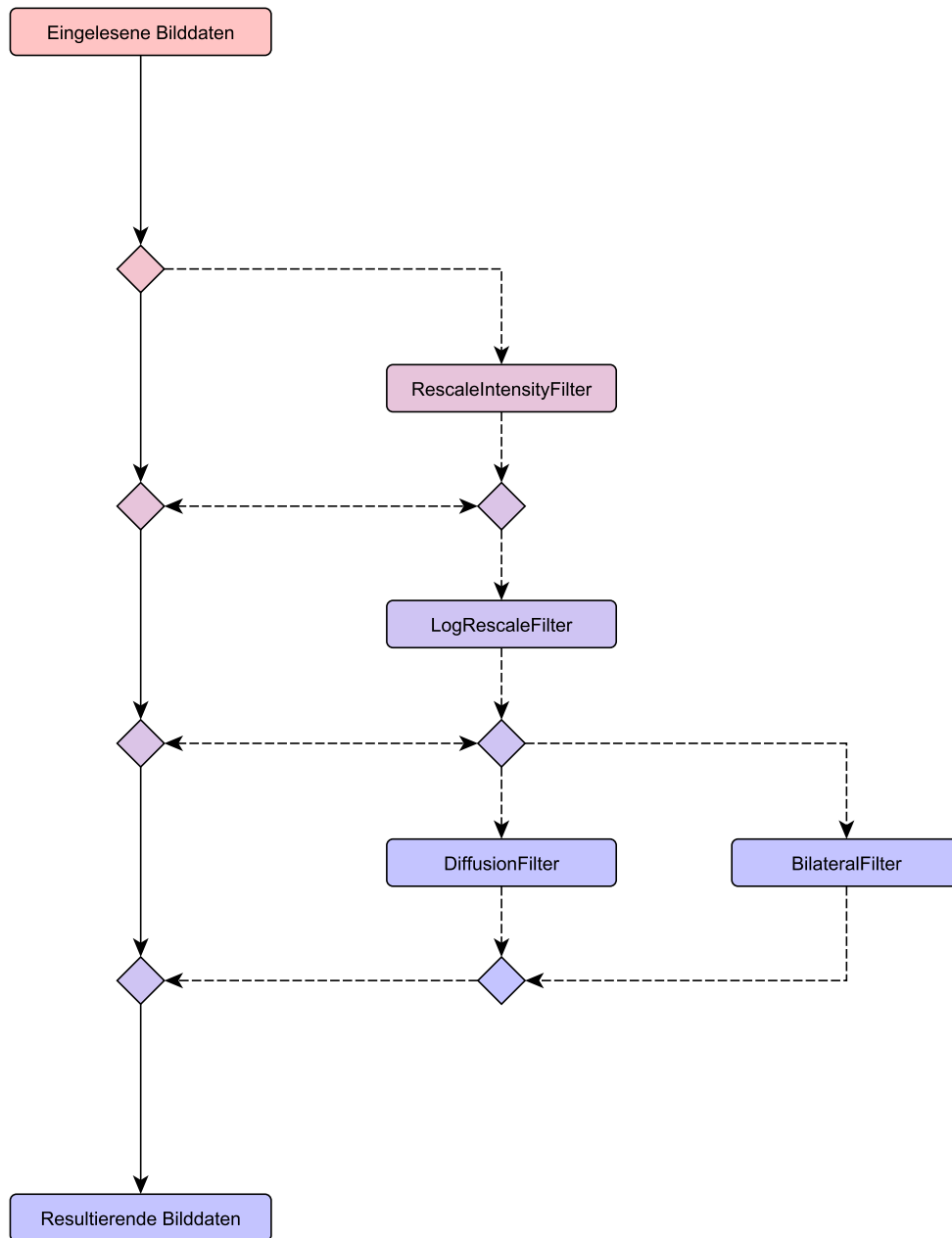


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Filter-Pipeline: An den rauteähnlichen Verknüpfungspunkten lässt sich ein Bildverarbeitungsfilter beliebig in die Pipeline integrieren oder in ihr umgehen (gestrichelte Linien). Durch die hierarchische Struktur wird hierbei die rigide Filter-Rangfolge gewahrt.

wiederverwendet werden konnten.

In den folgenden Abschnitten wird erläutert, wie die Bildanalyse-Filter im Einzelnen realisiert wurden.

3.1.1 Kontrastverbesserung

Das verwendete Bildmaterial wies u. A. Kontrastarmut und unausgewogene Helligkeitsverteilungen auf. Zur Verbesserung dieser ungünstigen Bildeigenschaften wurde das „RescaleIntensityFilter“ aus der ITK-Bibliothek genutzt, um den Kontrast mit Hilfe einer linearen Transformation zu optimieren und so eine homogene Intensitätsverteilung zu schaffen. Die Transformation wurde in 2.3.1 mathematisch formuliert.

Das Filter wurde nach seiner Instanziierung mit Hilfe der Memberfunktionen „SetOutputMinimum“ und „SetOutputMaximum“ parametrisiert, über welche das resultierende Spektrum des modifizierten Tonwerttraumes festgelegt werden konnte. Hierbei wurde der mit einem 8-*Bit*-Tonwertindex maximal auszuschöpfende Bereich zwischen 0 und 255 bestimmt. Anschließend wurde das Filter in die ITK-Pipeline integriert. In Abbildung 6 wird der Effekt der Filterung auf ein beispielhaft ausgewähltes Bild und seine zugehörigen Histogramme veranschaulicht.

Für die später geplante Analyse der Kolo-kalisationen der relevanten fluoreszierenden Zellbestandteile war die vollständige Ausnutzung des verfügbaren Tonwertbereichs eine notwendige Bedingung, um korrekte Rückschlüsse auf Zusammenhänge der zu untersuchenden Moleküle treffen zu können.

3.1.2 Logarithmische Skalierung

Wie in 2.2 erwähnt, basiert die Gewinnung der Bildinformationen durch die Laser-Scanning-Mikroskopie auf dem Mechanismus der substanzspezifischen Anhaftungen fluoreszierender Antikörper. Der anschließende registrierte Wert der Intensität wird durch die Anzahl dieser Anhaftungen bestimmt, d. h. je mehr Antikörper sich an die relevante Zellkomponente binden, desto höher ist die erfasste Intensität. In der Regel korreliert dabei die Höhe der Intensität mit der Konzentration der gebundenen Moleküle. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten indirekten Methode zur Molekülmarkierung ist es denkbar, dass sich mehrere fluoreszenzmarkierte Antikör-

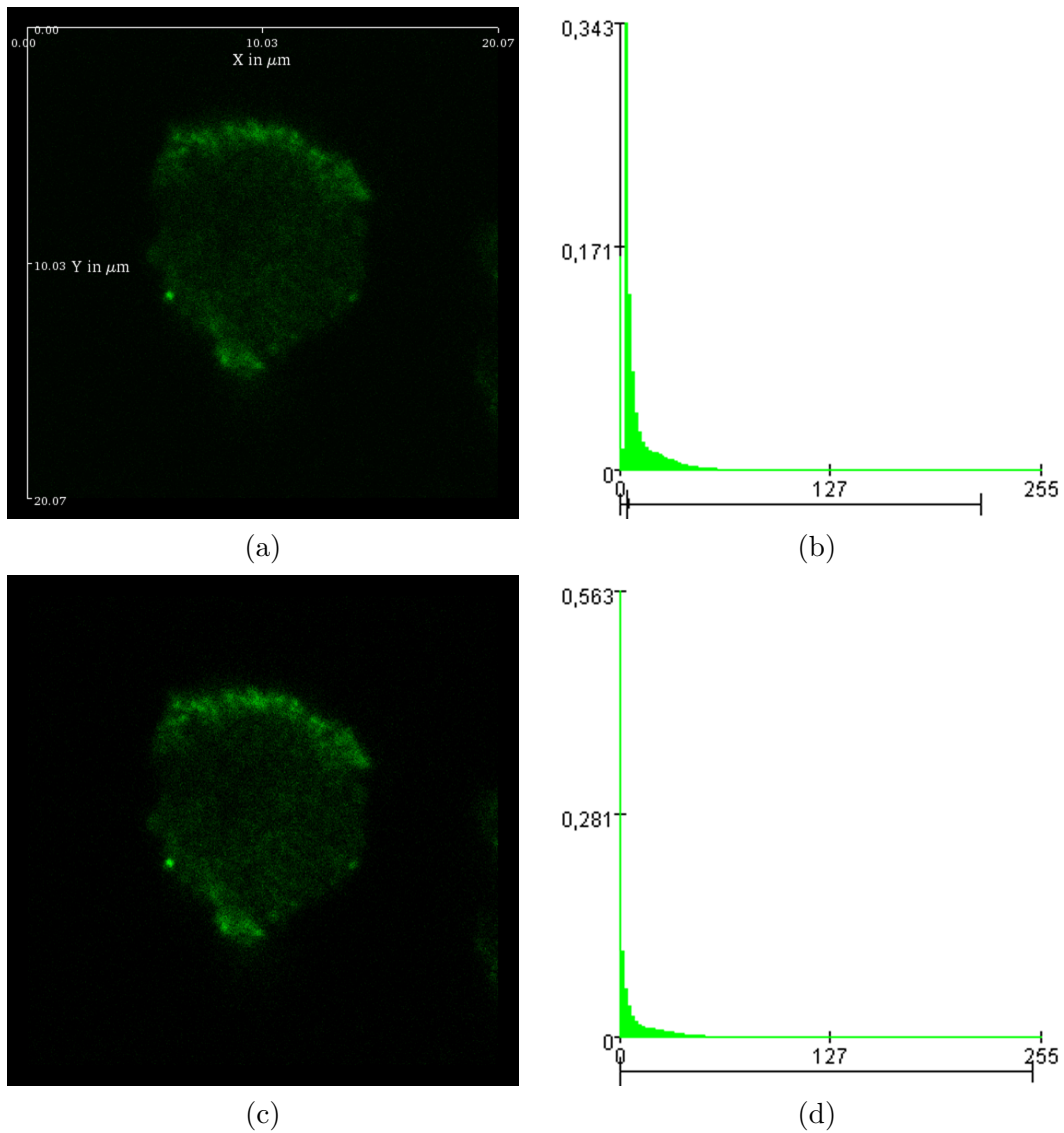


Abbildung 6: Auswirkung der Kontrastverbesserung: (a) Exemplarisch gewähltes Schichtbild aus dem Bildstapel „CerCD952min1“. Originales Einzelfarbkanalbild mit schwach wahrnehmbaren CD95-Intensitäten. (c) Nach Kontrastverbesserung. Deutlich sind die CD95-Konzentrationen in der Zellmembran zu erkennen. Die Bildoptimierung spiegelt sich auch in den jeweiligen Histogrammen wider, wobei im Vergleich zu (b) der verfügbare Intensitätsraum nach der Filterung im resultierenden Histogramm (d) bestmöglich ausgeschöpft wird.

per (Sekundär-Antikörper) an einen Primär-Antikörper heften können, der an einem zellulären Bestandteil bindet. Hinzu kommt, dass die Wahrscheinlichkeit für solche vermeintlichen Anhaftungen sogar mit der Höhe bestehender Bindungen zunimmt. Daraus ergibt sich ein nicht linearer Zusammenhang zwischen akquirierter und realer Intensität. Es wird von einem exponentiellen Zusammenhang ausgegangen. Auf Grund dieser Annahme wurde vorgeschlagen, die Bildinformationen durch eine Bildverarbeitungsmethode nachträglich zu korrigieren. Diese Korrektur wurde mit Hilfe eines eigens entwickelten Bildanalyse-Filters umgesetzt, welches alle Intensitätswerte im Bild logarithmisch skalierte, um den vermuteten exponentiellen Tonwertverlauf in einen linearen zu überführen. Folgende mathematische Transformation kam dabei zur Anwendung (Imhäuser et al. 2010c):

$$f(i, j) = 255 \cdot \log_{256}(g(i, j) + 1) \quad (29)$$

mit $0 \leq g(i, j) \leq 2^8 - 1$, wobei $f()$ und $g()$ jeweilig das gefilterte und das auf diesen Filterprozess bezogene originale Bild repräsentieren. Grundlage dieser Gleichung stellt der Logarithmus dar, welcher mit seiner Basis von 256 die maximale Anzahl der mit einem 8-*Bit*-Tonwertindex darstellbaren Intensitätswerte ausschöpft. Da $g()$ Werte von 0 bis 255 annehmen kann, muss sein Wertebereich für den Definitionsbereich des Logarithmus um 1 positiv verschoben werden (vgl. Funktionsargument $g(i, j) + 1$ in Gleichung (29)). Die fehlende Verfügbarkeit des genannten Logarithmus als implementierte Funktion in der verwendeten Programmierumgebung hätte eine zusätzliche algorithmische Lösung erfordert. Daher wurde die Gleichung (29) mathematisch umgeformt bzw. vereinfacht, um die verfügbaren Logarithmus-Implementierungen nutzen zu können. Durch die Anwendung der Logarithmengesetze auf (29) ergab sich:

$$\begin{aligned} f(i, j) &= 255 \cdot \frac{\log_{10}(g(i, j) + 1)}{\log_{10}(256)} \\ &= \frac{255}{8 \cdot \log_{10} 2} \cdot \log_{10}(g(i, j) + 1) \end{aligned} \quad (30)$$

mit $0 \leq g(i, j) \leq 2^8 - 1$. Mit (30) ließ sich die logarithmische Skalierung auf den implementierten Logarithmus zur Basis 10 zurückführen.

Das Filter wurde mit Hilfe der ITK-Klasse „AdaptImageFilter“ realisiert, welche

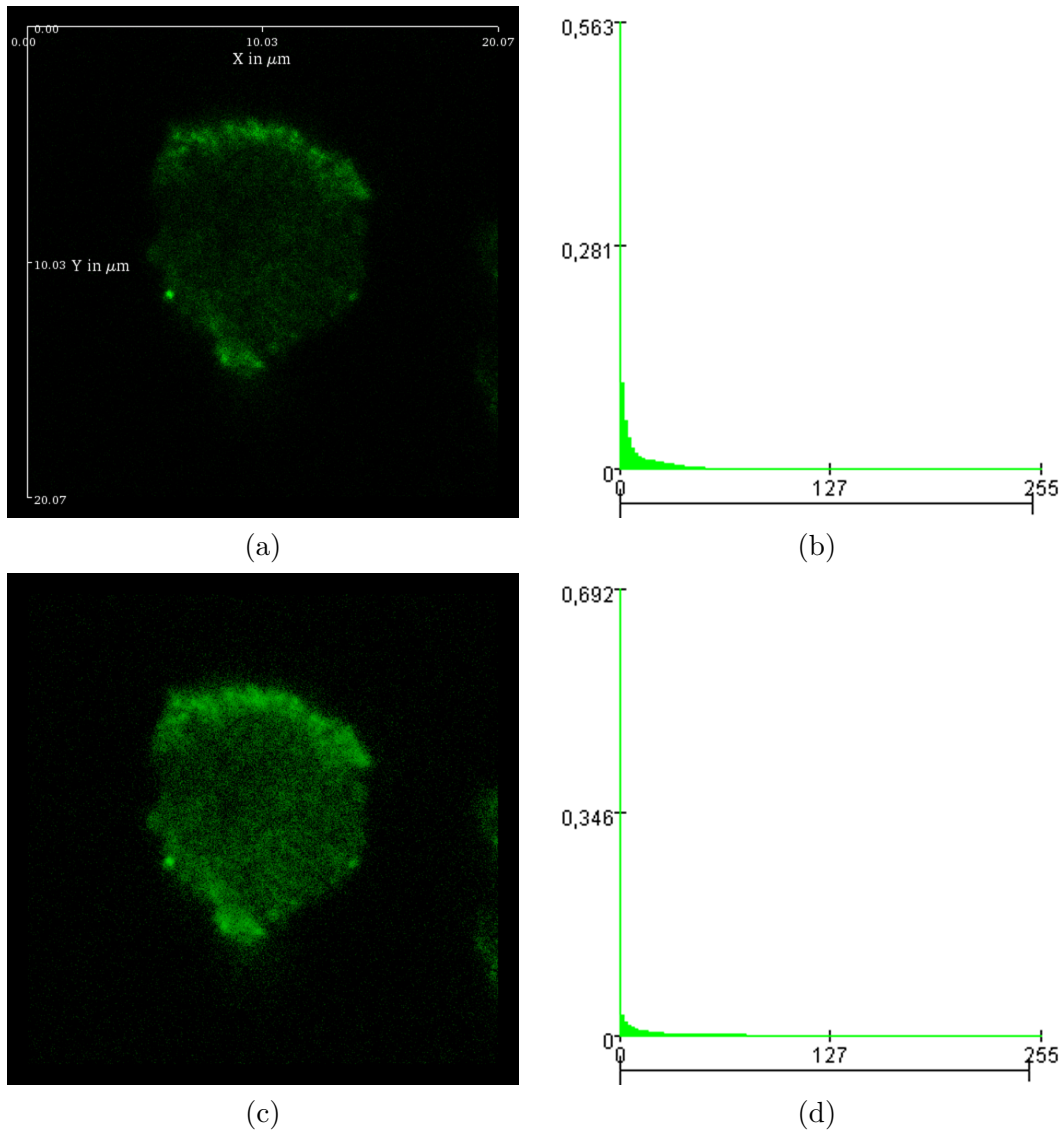


Abbildung 7: Effekt der logarithmischen Skalierung: (a) Exemplarisch gewähltes Schichtbild aus dem Bildstapel „CerCD952min1“. Einzelfarbkanaalbild mit kontrastoptimierten CD95-Intensitäten. (c) Nach logarithmischer Skalierung. Niedrige CD95-Intensitäten werden deutlich angehoben. Der Bildverarbeitungsschritt spiegelt sich auch in den jeweiligen Histogrammen wider. Hierbei ist das Intensitätsspektrum im Vergleich zu (b) nach der Filterung im resultierenden Histogramm (d) gestaucht.

einen unmittelbaren Zugriff auf die einzelnen Pixelwerte über sogenannte „Accessor“-Klassen erlaubt. Hierbei wurde eine eigene Klasse entwickelt, deren durch die „Accessor“-Struktur vorgegebenen Memberfunktionen „Set“ und „Get“ implementiert wurden. In der letztgenannten Funktion wurde die logarithmische Skalierung gemäß der Gleichung (30) umgesetzt. Auf diese Weise wurde bei einem von der Filter-Pipeline ausgehenden Lesezugriff automatisch ein transformierter Wert eines aus den Originaldaten stammenden Pixelwertes zurückgegeben. Durch diesen softwaretechnischen Mechanismus war eine nahtlose Integration des Filters in die ITK-Pipeline gegeben.

Die Abbildung 7 verdeutlicht die Wirkung der logarithmischen Skalierung auf ein exemplarisch selektiertes Bild und dessen zugrunde liegendes Histogramm.

3.1.3 Anisotrope Diffusions- und bilaterale Filterung

Die im Bildmaterial vorkommenden Bildstörungen in Form von Hintergrundrauschen und Intensitätsspitzen wurden unter Verwendung spezialisierter Glättungsfilter weitgehend entfernt. Solche Filter glätten verrauschte, dem Bildhintergrund zugeordnete Strukturen, können jedoch von Objektkanten umschlossene Bildregionen weitgehend erhalten. Aus biologischer Sicht sind diese eingegrenzten granulären Bildstrukturen bedeutend, da sie zumeist mit den zu untersuchenden Konzentrationsverteilungen zellulärer Bestandteile korrelieren. Aus diesem Grund wurden ein besonderes anisotropes Diffusionsfilter und zu Vergleichszwecken ein bilaterales Filter genutzt. Beide wurden in 2.3.2 mathematisch formuliert sowie ihre Filtereigenschaften beschrieben.

Das „CurvatureAnisotropicDiffusionFilter“ wurde als spezielle Form der Diffusionsfilter aus der ITK-Bibliothek verwendet. Das Filter ist eine direkte Implementierung der in 2.3.2 beschriebenen MCDE (vgl. Gleichung (15)). Im Vergleich zu der klassischen Version weist es keine Objektkanten hervorhebenden Filtereigenschaften auf (Ibáñez et al. 2005). Da Kanten wie etwa die Ränder von Zellmembranen für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht im Vordergrund standen, war die Kontrastverbesserung von Objektkanten nicht bedeutsam. Essenziell war demgegenüber die Eigenschaft des verwendeten Diffusionsfilters, seine Glät-

tungsstärke den Bildeigenschaften während der Filterung dynamisch anzupassen und damit die detaillierten Strukturen innerhalb einer von Objektkanten umschlossenen Bildregion wie etwa einer granulären Zellstruktur weitgehend zu erhalten.

Das von ITK bereitgestellte Filter konnte nach seiner Instanziierung vielfältig parametrisiert werden. Über die Memberfunktion „SetConductanceParameter“ ließ sich der freie Parameter λ (vgl. Gleichung (11) in 2.3.2 auf S. 21) für den Kantenkontrast festlegen, welcher die Glättung der Filterung beeinflusste. Mit Hilfe der Funktion „SetTimeStep“ wurde die effektive Größe t des Filterfensters eingestellt. Hierbei wurde der empfohlene Wert $t = 0,0625$ für räumliche Bilddaten verwendet (Ibáñez et al. 2005), da das zur Verfügung stehende Bildmaterial aus mehreren übereinanderliegenden Schichtbildern bestand. Die Filterung erfolgte in einem iterativen Prozess. Diesbezüglich wurde die Filteranwendung mit der identischen Parameterkonfiguration automatisch mehrfach wiederholt, um ein Bildresultat in der gewünschten Filterungsqualität zu erzielen. Die Anzahl N dieser Iterationen wurde durch die Memberfunktion „SetNumberOfIterations“ festgelegt. Die verwendeten Parameterwerte t , $\lambda = 3$ und $N = 3$ genügten, um die Balance zwischen Abschwächung von Bildstörungen und weitgehender Erhaltung der relevanten zellulären Strukturen zu wahren (vgl. Abbildung 8).

Um die Bildergebnisse der Diffusionsfilterung qualitativ vergleichen und bewerten zu können, wurde ein alternatives Glättungsverfahren eingesetzt. Das verwendete bilaterale Filter ist dem nicht linearen anisotropen Diffusionsfilter in seinen Eigenschaften sehr ähnlich, basiert dennoch auf einer gänzlich anderen mathematischen Idee, welche in 2.3.2 erläutert wurde. Die hierzu entsprechende Implementierung stellte die Klasse „BilateralImageFilter“ zur Verfügung, die vielgestaltig parametrisiert werden konnte. Über die Memberfunktionen „SetDomainSigma“ und „SetRangeSigma“ konnten hierbei die entsprechenden, in 2.3.2 beschriebenen Filter-Empfindlichkeiten σ_c und σ_s festgelegt werden. Im Vergleich zur Diffusionsfilterung erfolgte der bilaterale Filterprozess nicht iterativ, d. h. das Filter konnte seine Daten in einem Schritt bzw. in einer Anwendung verarbeiten, und damit das gefilterte Bild unmittelbar bereitstellen. Dennoch war die Filteranwendung auf das verfügbare räumliche Bildmaterial mit einer hohen Verarbeitungsdauer verbunden, da die

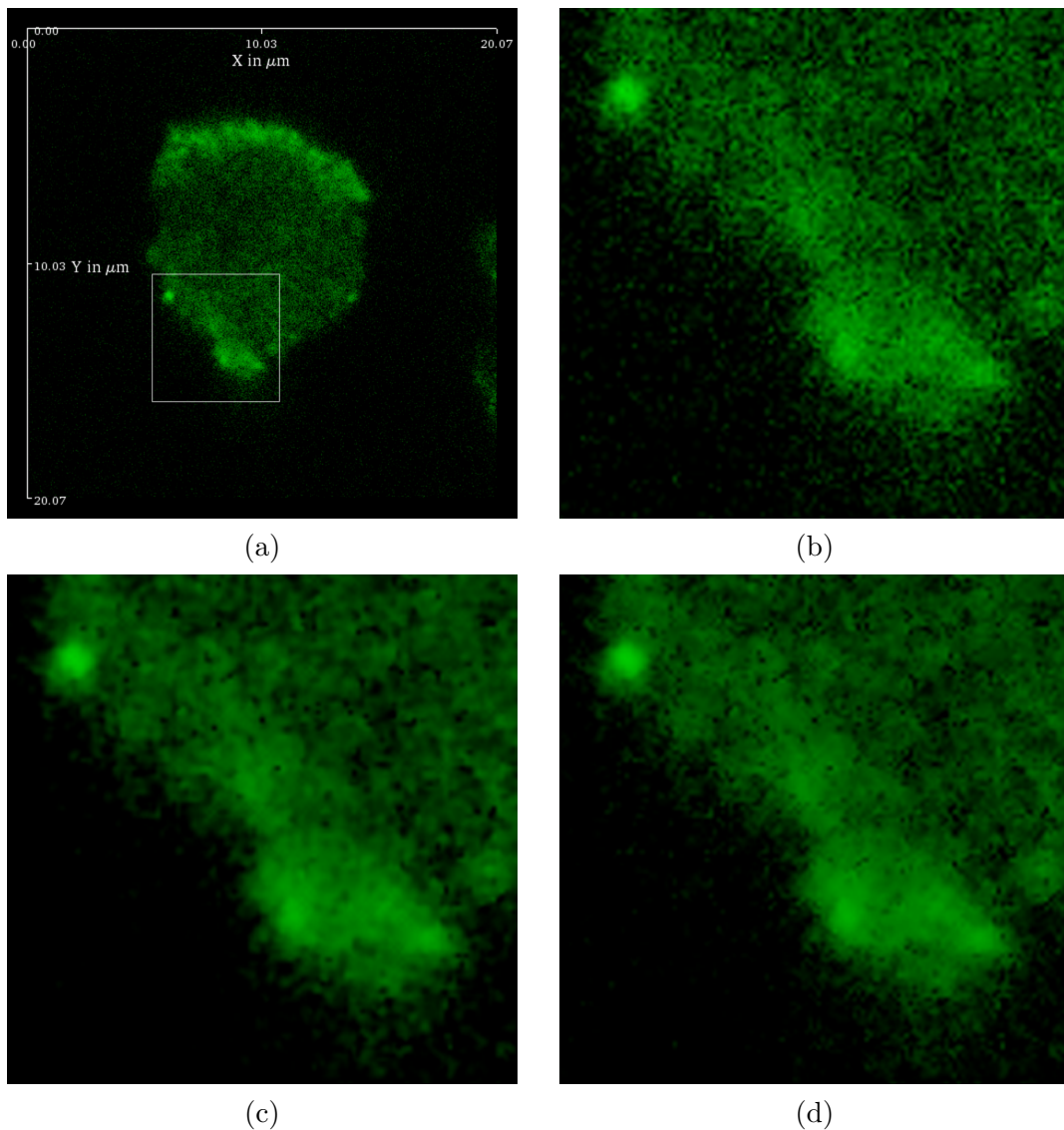


Abbildung 8: Effekt der Diffusions- und bilateralen Filterung: (a) Exemplarisch gewähltes Schichtbild aus dem Bildstapel „CerCD952min1“. Einzelfarbkanalbild mit CD95-Intensitäten nach Kontrastverbesserung und logarithmischer Skalierung. (b)–(d) Jeweiliger vierfach vergrößerter Ausschnitt des in (a) positionierten Bereichs des Bildes (b) im Originalen, (c) nach geschilderter anisotroper Diffusionsfilterung ($N = 3$, $\lambda = 3$, $t = 0,125$) und (d) nach bilateraler Filterung ($\sigma_s = 30$, $\sigma_c = 2$). Beide Filter-Varianten entfernen die Bildstörungen sehr gut. Das bilaterale Filter glättet vergleichsweise die Objektkanten weniger bei besserer Erhaltung der granulären Bildstrukturen.

dem Filter zugrunde liegenden Gauss'schen Faltungskerne eine hohe Rechenintensität erforderten. Aus diesem Grunde wurde der originale Quelltext des Bilateralfilters modifiziert und im Anschluss neu kompiliert. Im Hinblick auf die Modifikation wurde mit Hilfe der verfügbaren ITK-Makros der Zugang zu dem Parameter „DomainMu“ geschaffen, welcher die Größe des Faltungskerns und damit die Verarbeitungsdauer maßgeblich beeinflusste. Das Herabsetzen dieses Parameterwertes auf den Wert 1,25 führte zu einer Beschleunigung der Filterung um das Mehrfache, dennoch auch zu Einbußen in der Qualität des Filterresultates. Diese qualitativen Unterschiede fielen lediglich optisch marginal aus und hatten für die Bildanalyse keine Relevanz. Mit den Parameterwerten $\sigma_s = 30$ und $\sigma_c = 2$ konnten vergleichbare Bildresultate zu der Diffusionsfilterung erzielt werden.

Anhand der Abbildung 8 wird der qualitative Vergleich der Bildresultate durch die jeweiligen Filter ausgehend von einem exemplarisch ausgewählten Zellbild dargelegt.

3.2 Visualisierung

Die zuvor geschilderte Filterung zur Bildvorverarbeitung wurde für alle ausgewählten Schichtbildstapel durchgeführt. Im Hinblick auf die Funktionsweise der Schnittstelle zwischen der ITK- und VTK-Pipeline wurde jedes Schichtbild einzeln von den konfigurierten Filtern in ihrer rigiden Rangfolge (Kontrastverbesserung \rightarrow logarithmische Skalierung \rightarrow Rauschunterdrückung) zunächst verarbeitet, bevor der resultierende optimierte Bildstapel dem Visualisierungsverfahren zugeführt wurde. Von großer Wichtigkeit ist die Einhaltung des korrekten Verhältnisses zwischen der axialen und lateralen Ausdehnung der räumlichen Rekonstruktion. Lediglich in zufälligen Fällen erfolgt die Bildakquise axial wie lateral in denselben metrischen Abständen. Darüber hinaus behandeln die Bibliotheken ITK und VTK die Eingabedaten standardmäßig mit einem Bildpunktabstand von 10 in den drei orthogonalen Richtungen, wenn keine zusätzlichen Meta-Informationen in den digitalen Daten vorliegen. Derartige Informationen wurden den verfügbaren akquirierten Bilddaten nicht hinzugefügt, obgleich die Mikroskopie-Software das Grafik-Format „TIFF“ für die Datenabspeicherung nutzte. Stattdessen legte die Software nach der Bildakquirierung zusätzliche Informationen wie Abmessungen der gescannten

Proben, Anzahl der Schichtbilder und räumliche Pixelabstände automatisch in einer separaten Textdatei ab (vgl. 2.2). Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Software-Applikation „Ceramide3D“ konnte diese Angaben auslesen, und ließ sie in die 3D-Rekonstruktion einfließen. Insbesondere mit Hilfe des gewonnenen axialen Pixelabstands und der axialen Abmessung der Zellprobe konnte die korrekte Relation der räumlichen Bildpunktabstände gewahrt werden. Hierfür wurde die Klasse „vtkImageChangeInformation“ aus der VTK-Bibliothek genutzt. Das sich aus der Instanziierung ergebene Objekt ließ sich über die Memberfunktion „SetOutputSpacing“ auf die ermittelten und gewünschten Werte einstellen. In die VTK-Pipeline integriert, fungierte das Objekt als eine Art Filter, durch welches auch die interaktive Manipulation des axialen Abstands ermöglicht wurde. Dadurch konnte die räumliche Relation im Falle eventuell nicht verfügbarer axialer Informationen nachträglich, in Echtzeit geändert werden. Hierbei waren die verwendeten Visualisierungsalgorithmen im Stande, durch ihre automatischen, zumeist trilinearen Interpolationstechniken zusammenhängende räumliche Rekonstruktionen zu generieren.

Mit Hilfe des beschriebenen Filters und der folgenden Verfahren zur Visualisierung ergaben sich maßstabsgetreue visuelle Rekonstruktionen der mit Lasern räumlich abgetasteten Zellproben.

3.2.1 Volumerendering

Unter Verwendung der in 2.4 erläuterten Verfahren zum Volumerendering wurden räumliche Modelle aus dem zugrunde liegenden Zellbildmaterial gewonnen. Die Visualisierung wird hierbei durch definierte Transferfunktionen beeinflusst, die Volumenbereichen Opazitäten und Farben zuweisen. Liegen keine Informationen über grundlegende optische Merkmale wie Farb- und Intensitätsverteilungen des zu analysierenden Materials vor, müssen die Transferfunktionen flexibel definiert werden können, um die besonders zu interessierenden visualisierten Bereiche hervorheben und andere ausblenden zu können. Hierfür muss in der zu entwickelnden Software eine interaktive, bevorzugt in Echtzeit durchführbare Veränderbarkeit der Transferfunktionen implementiert werden.

In der vorliegenden Arbeit waren die optischen Eigenschaften des Zellmaterials und Akquirierung der Bilddaten bekannt. Daher genügte es, die geforderte Flexibilität der Transferfunktionen partiell umzusetzen. Diesbezüglich wurde lediglich eine geringe und beschränkte Anzahl von frei wählbaren Stützpunkten zur stückweisen Definition der Funktionen vorgegeben.

Die Implementierung des Volumerendings mit VTK erforderte die Festlegung von zwei Transferfunktionen. Hierbei bildete die erste Funktion jede Intensität I auf die entsprechende optische Eigenschaft Opazität O ab:

$$tf_{Intensität} : I \rightarrow O. \quad (31)$$

Durch diese Definition und eine zusätzliche vorgenommene Konfiguration gab eine frei wählbare Stützstelle denjenigen Intensitätswert vor, ab welchem alle aufsteigenden Intensitäten visualisiert werden sollten. Ein weiterer frei einstellbarer Punkt konnte dazu genutzt werden, das zu visualisierende Intensitätsband ausgehend vom Maximalwert zu beschränken. Auf diese Weise fungierte die Transferfunktion als ein räumliches Schwellenwertverfahren. Für die Analyse wurde die Funktion derart eingestellt, dass die trotz Filterung abgeschwächten, jedoch übrig gebliebenen Bildstörungen (z. B. Hintergrundrauschen) nahezu vollständig ausgeblendet werden konnten.

Die zur Verfügung stehenden Zellbilder wurden als Ein-Komponenten-Bilder akquiriert. Ihre Bildpunkte wurden als 8-*Bit*-Datenwerte kodiert, und intern von VTK ohne Farbzugehörigkeit behandelt. Daher war es notwendig, die Intensitätswerte mit den korrespondierenden Farben und ihren Helligkeiten zu assoziieren. Dieses wurde durch die zweite Transferfunktion erreicht, die jeder Intensität I die entsprechende optische Eigenschaft Farbe $F_{Rot/Grün}$ zuordnete:

$$tf_{Intensität} : I \rightarrow F_{Rot/Grün}. \quad (32)$$

Diese Transferfunktion wurde bei der Initialisierung der entwickelten Software als starre lineare Funktion definiert und war damit nicht interaktiv veränderbar. Die Zuordnung der Farbe war davon abhängig, welche Zellkomponente bzw. welcher Farbkanal einzeln zur Visualisierung ausgewählt wurde (Ceramid = rot, CD95 =

grün). Sollten hingegen beide zellulären Komponenten in einer räumlichen Szene visualisiert werden, mussten die Farbwerte der 3D-Modelle entsprechende Opazitäts- bzw. Transparenzwerte aufweisen, um die Unterstützung eines Overlays bzw. eines Vermischens der Farbkanäle umzusetzen. Hierzu fand eine Unterscheidung in der Festlegung der Opazität-Transferfunktionen abhängig von der eingestellten Art der Visualisierung (Einfarb- oder Zweifarbkanal-Visualisierung) statt. Anhand der in Abbildung 9 dargestellten Graphen von exemplarisch konfigurierten Opazität-Transferfunktionen lässt sich dieser Unterschied nachvollziehen. Insbesondere wurde mit Hilfe der Memberfunktion „SetClamping“ des aus der Instanziierung ergebenden Objekts der Klasse „vtkPiecewiseFunction“, die für die Definition der Transferfunktionen benutzt wurde, die Behandlung von Werten außerhalb des eingestellten zu visualisierenden Intensitätsbandes bestimmt. Damit konnten eingestellte Werte außerhalb des Intervalls im Falle einer Visualisierung im Einfarbkanalmodus auf 0 abgebildet werden. Dieses führte zu einem gewollten sprunghaften Anstieg der Opazität für die einbezogenen Intensitäten, um sie schließlich mit der jeweiligen maximalen Helligkeit zu visualisieren. Für die Zweifarbkanal-Visualisierung hingegen wurden durch die erwähnte Memberfunktion an den Intervallgrenzen der Opazität-Transferfunktion stetige Funktionsteilstücke definiert, die für eine lineare Steigung der Transparenz sorgten. Auf diese Weise konnte eine mögliche farbliche Vermischung der 3D-Modelle erreicht werden. Ergänzend dazu wurde die Möglichkeit zur Einstellung der im Prozess der Volumenvisualisierung auszuführenden Blending-Funktion implementiert, durch welche das Overlay unterstützt werden konnte. Insbesondere für die Darstellung des Overlays erwies sich die MIP-Funktion (MIP steht für Maximum Intensity Projection) als am adäquatesten, da sie Farbüberlagerungen erzeugte und damit erste beobachtbare Kollokalisierungen der zellulären Bestandteile sichtbar machte.

Unter Zuhilfenahme von Stützstellen konnten die Transferfunktionen lediglich als lineare Funktionsteilstücke definiert werden. Nicht lineare wie exponentielle oder logarithmische Korrelationen konnten nicht festgelegt werden. Daher stellte ein der Visualisierung vorgeschaltetes Bildverarbeitungsfilter (siehe 3.1.2) die einzige Möglichkeit dar, die erforderte logarithmische Skalierung zu implementieren.

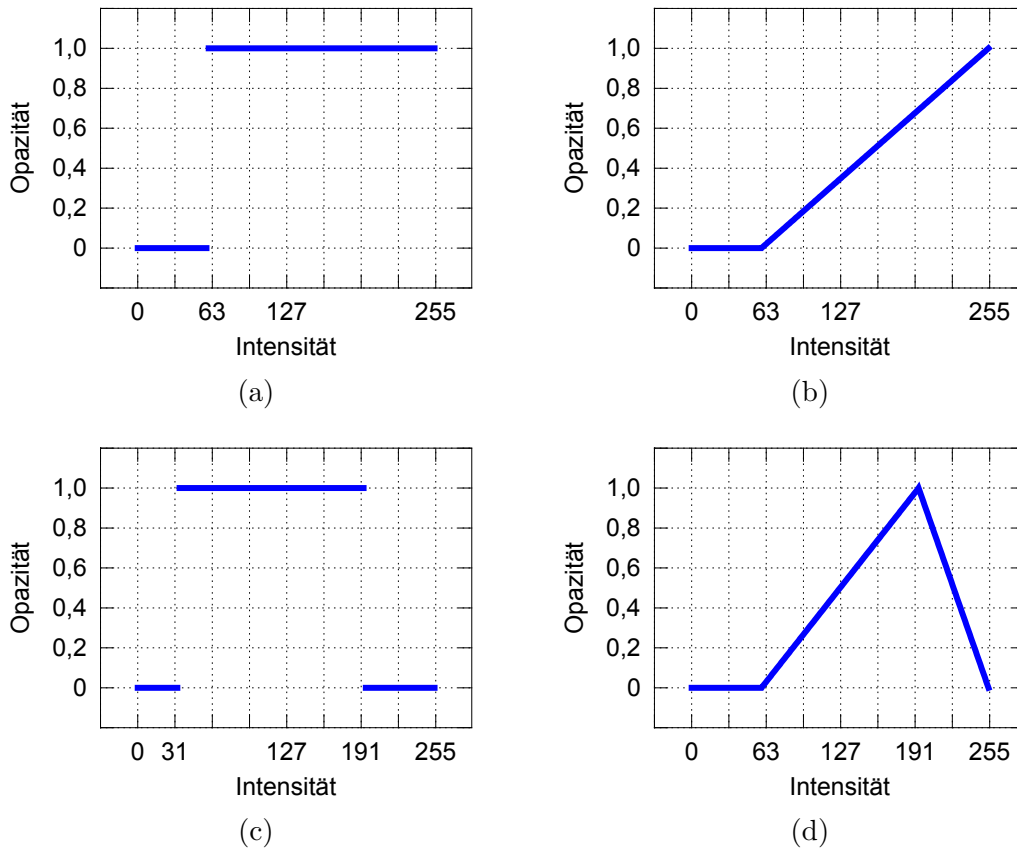
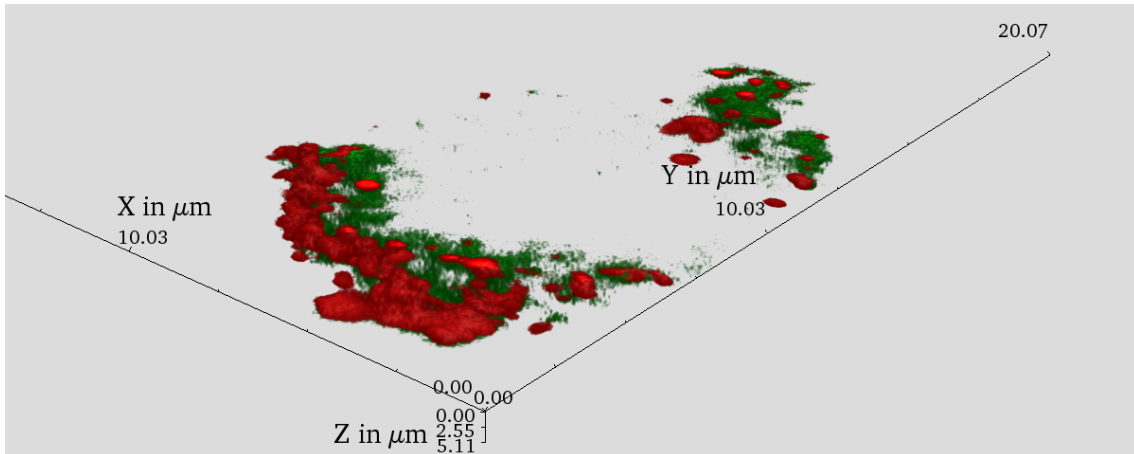


Abbildung 9: Exemplarisch eingestellte Opazität-Transferfunktionen für verschiedene Visualisierungstypen: (a),(c) Transferfunktionstyp für Einzelfarbkanal-Visualisierungen (a) mit einem Schwellenwert bzw. (c) mit Unter- und Oberschwellenwert. Die einbezogenen Intensitäten werden mit der maximalen Helligkeit visualisiert (siehe sprunghaften Anstieg der Opazität auf 1). Alle übrigen Werte werden auf die Opazität = 0 bzw. auf die maximale Transparenz (demnach auf die Hintergrundintensität) abgebildet. (b),(d) Arten von Transferfunktionen im Zweifarbkanalmodus mit Definition (b) eines Schwellenwertes und (d) von Unter-/Oberschwellenwert. Durch sogenanntes Clamping werden Intensitätswerte außerhalb des definierten Bereichs auf die jeweiligen Intervallgrenzen linear abgebildet. Es ergibt sich eine lineare Steigung der Opazitätswerte bzw. der Transparenzen. Dadurch kann eine farbliche Vermischung mehrerer Volumenvisualisierungen in einer räumlichen Szene erreicht werden.

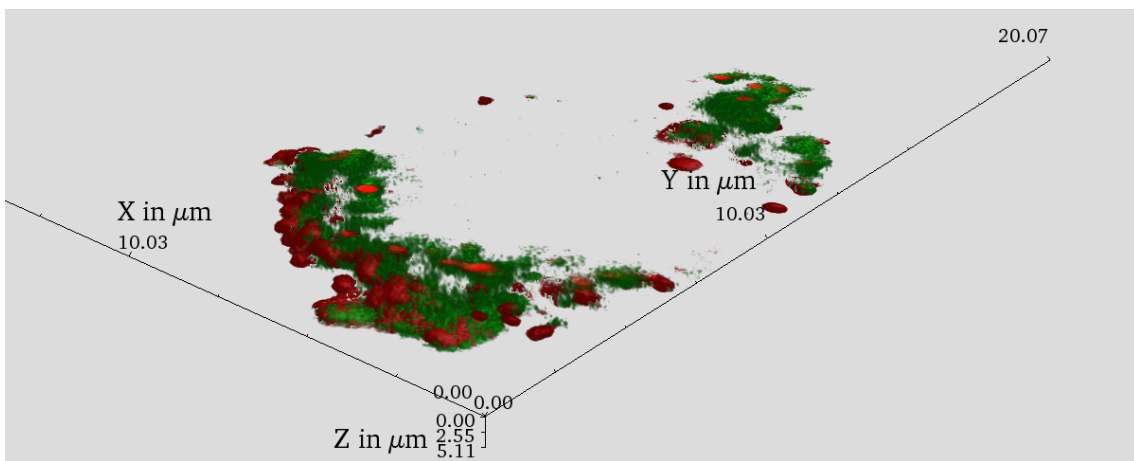
Das Raycasting wurde über die VTK-Klasse „vtkVolumeRayCastMapper“ umgesetzt, welche die in 2.4.1 erörterte Volumerendering-Gleichung (vgl. (28) auf S. 28) direkt implementierte. Mit Hilfe des erstellten Objekts dieser Klasse konnten grundlegende Parameter zur Volumenvisualisierung wie der Detailgrad der Visualisierung oder die selektierte Blending-Funktion gesetzt werden. Ferner konnte diesem Objekt über die Memberfunktion „AddVolume“ mehrere Volumen hinzugefügt werden, deren jeweilige verschiedene optische Eigenschaften mit erzeugten Objekten aus der Klasse „vtkVolumeProperty“ näher bestimmt werden konnten. Zu diesen Eigenschaften gehörten die Definition der Opazität- und Farb-Transferfunktionen mit Hilfe der entsprechenden Funktionen „SetScalarOpacity“ und „SetColor“ wie auch die Festlegung von Materialmerkmalen, die von dem optional aktivierbaren Shading genutzt wurden. Mit der Memberfunktion „SetVolumeRayCastFunction“ konnte des Weiteren zwischen den Blending-Funktionen „Composite“, „Isosurface“ und „MIP“ gewählt werden.

Die Konfiguration des Texturemappings, dessen Objekt entweder aus der VTK-Klasse „vtkVolumeTextureMapper2D“ oder „vtkVolumeTextureMapper3D“ erzeugt und genutzt wurde, war mit der des Raycastings nahezu identisch. Die Spezialisierung des Objekts erfolgte in Abhängigkeit von der verfügbaren Grafik-Hardware. Eine eigens hierfür entwickelte Programmroutine traf die Auswahl des Verfahrens anhand dessen Verfügbarkeit und Unterstützung durch die Hardware, und integrierte automatisch das korrespondierende Objekt in die VTK-Pipeline. Hierbei wurde das dreidimensionale Texturemapping priorisiert, da es im Vergleich zum zweidimensionalen Verfahren eine durch Hardware beschleunigte Interaktivität bei gleicher Visualisierungsqualität aufweisen konnte.

Aus den drei ausgewählten Zellbildstapeln (CerCD952min1, JYASM5min3/-4) wurden räumliche Modelle mit den jeweiligen beschriebenen Visualisierungsverfahren erzeugt. Die Abbildungen 10–12 zeigen im Einzelnen diese Visualisierungen, zwischen denen Unterschiede in der optischen Qualität festgestellt werden können. Diesbezüglich generiert das Raycasting-Verfahren die 3D-Modelle vergleichsweise in der besten, detailliertesten Güte. Das Texturemapping erstellt die Modelle in hoher Qualität, erzeugt jedoch streifenartige räumliche Muster in den Visualisierungen abhängig

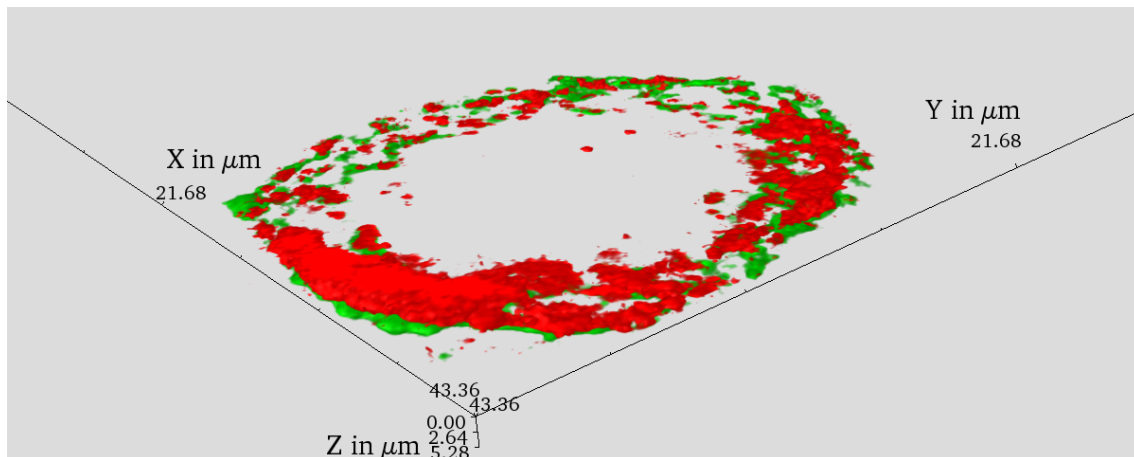


(a)

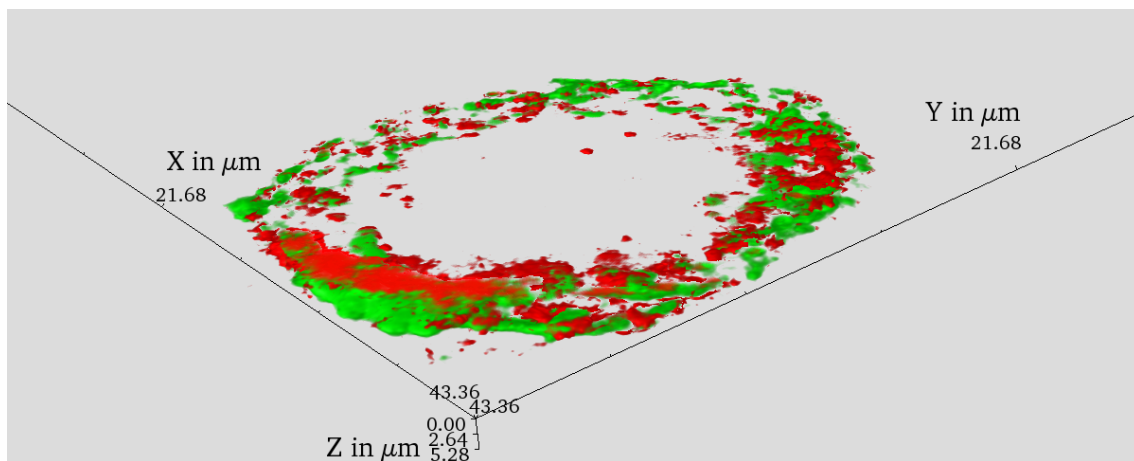


(b)

Abbildung 10: Volumenvisualisierungen des Zellbildstapels „CerCD952min1“ als Overlay (CD95 = grün, Ceramid = rot): Räumliche Intensitätsverteilungen mit Hilfe des (a) Raycasting- (Transferfunktionswerte für CD95/Ceramid = 42/82; Blending-Funktion = Composite; keine Transparenz) und (b) 3D-Texturemapping-Verfahrens (Transferfunktionswerte für CD95/Ceramid = 44/59; keine Transparenz). Aus drucktechnischen Gründen wurden zur präzisen Darstellung beider Modelle Transparenzen nicht angewandt. Werden (a) im Raycasting-Modell CD95-Regionen von solchen mit Ceramid auf Grund der eingestellten Blending-Funktion nahezu vollständig überdeckt, ist demgegenüber (b) im Texturemapping-Modell eine räumliche Vermengung dieser Bildbereiche sichtbar. Hier sind ebenso kleine Artefakte zu beobachten.

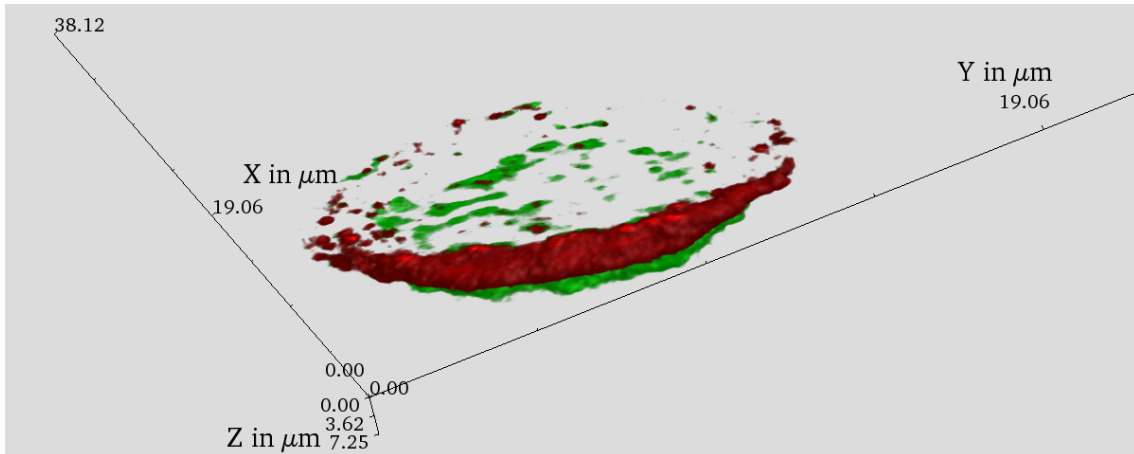


(a)

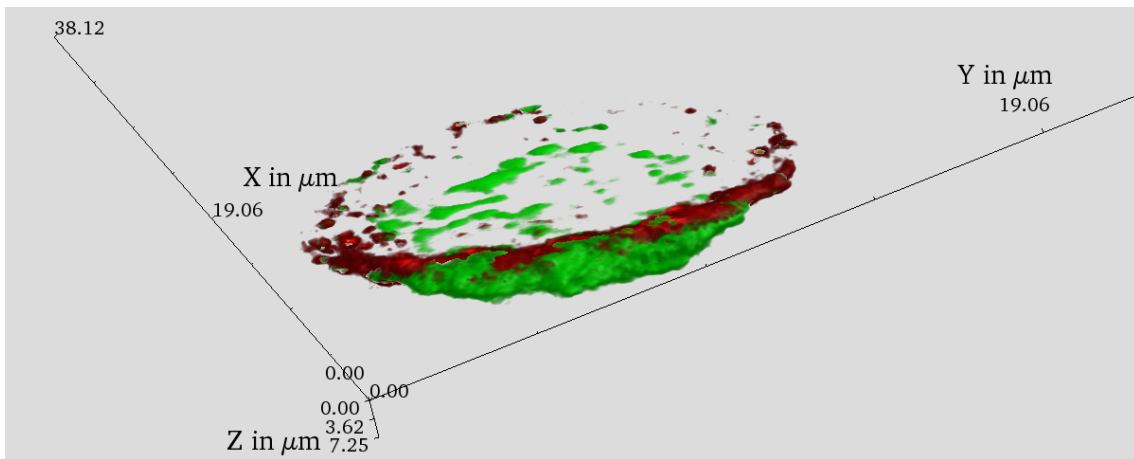


(b)

Abbildung 11: Volumenvisualisierungen des Zellbildstapels „JYASM5min3“ als Overlay (CD95 = grün, Ceramid = rot): Räumliche Intensitätsverteilungen mit Hilfe des (a) Raycasting- (Transferfunktionswerte für CD95/Ceramid = 115/147; Blending-Funktion = Composite; keine Transparenz) und (b) 3D-Texturemapping-Verfahrens (Transferfunktionswerte für CD95/Ceramid = 120/135; keine Transparenz). Aus drucktechnischen Gründen wurden zur präzisen Darstellung beider Modelle Transparenzen nicht angewandt. Werden (a) im Raycasting-Modell CD95-Regionen von solchen mit Ceramid auf Grund der eingestellten Blending-Funktion nahezu vollständig überdeckt, ist demgegenüber (b) im Texturemapping-Modell eine räumliche Vermengung dieser Bildbereiche sichtbar. Hier sind ebenso kleine Artefakte zu beobachten.



(a)



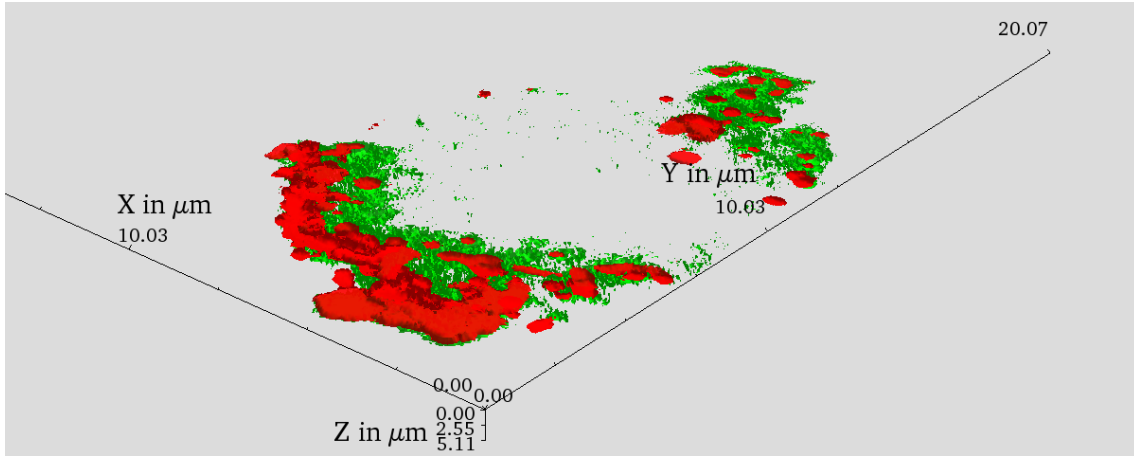
(b)

Abbildung 12: Volumenvisualisierungen des Zellbildstapels „JYASM5min4“ als Overlay (CD95 = grün, Ceramid = rot): Räumliche Intensitätsverteilungen mit Hilfe des (a) Raycasting- (Transferfunktionswerte für CD95/Ceramid = 87/54; Blending-Funktion = Composite; keine Transparenz) und (b) 3D-Texturemapping-Verfahrens (Transferfunktionswerte für CD95/Ceramid = 89/46; keine Transparenz). Aus drucktechnischen Gründen wurden zur präzisen Darstellung beider Modelle Transparenzen nicht angewandt. Werden (a) im Raycasting-Modell CD95-Regionen von solchen mit Ceramid auf Grund der eingestellten Blending-Funktion nahezu vollständig überdeckt, ist demgegenüber (b) im Texturemapping-Modell eine räumliche Vermengung dieser Bildbereiche sichtbar. Hier sind ebenso kleine Artefakte zu beobachten.

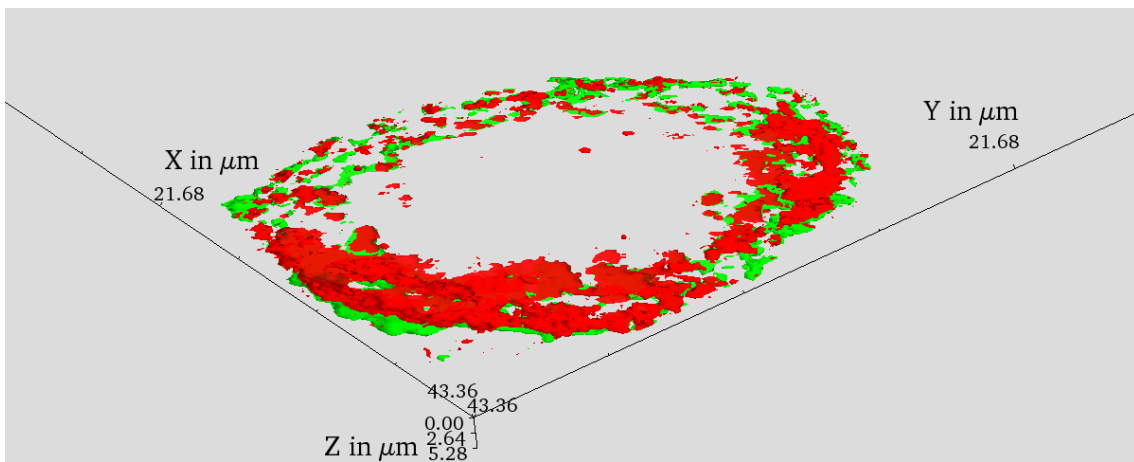
vom eingestellten Blickwinkel auf die 3D-Szene. Die Ursache für dieses Phänomen wird in 4 erörtert. Im Kontrast dazu funktioniert die Interaktivität mit den räumlichen Modellen beim Texturemapping nahezu ohne Verzögerung. Ein zeitverzögertes Interagieren und eine höhere Bereitstellungsdauer der 3D-Szene weist hingegen das Raycasting insbesondere in der höchsten Detailstufe auf, da die rechenintensiven ProgrammROUTINEN des Verfahrens standardmäßig nicht durch Hardware unterstützt und beschleunigt werden. Auf Grund dieser Eigenschaften war es zweckmäßig, beide Visualisierungsverfahren für die räumliche Bildanalyse zu verwenden.

3.2.2 Oberflächenrekonstruktion

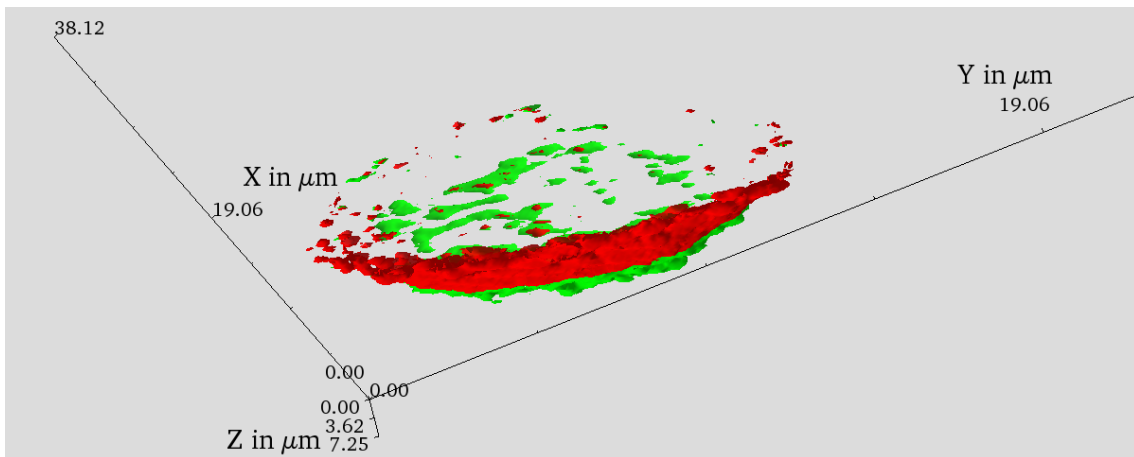
Mit Hilfe der erstellten Volumenvisualisierungen ließen sich die räumlichen Verteilungen der Ceramid- und CD95-Moleküle untersuchen. Anhand der dargestellten Intensitäten konnten erste Rückschlüsse auf die entsprechenden Konzentrationen sowie mögliche KOKOLISATIONEN dieser zellulären Komponenten gezogen werden. Ferner war es von Interesse, die exakten räumlichen Ausmaße sowie Abgrenzungen dieser zellulären Substanzen innerhalb des 3D-Modells bestimmen zu können. Eine solche Untersuchung konnte von den generierten Volumenvisualisierungen lediglich partiell unterstützt werden, da die Intensitäten granulär verteilt waren und damit Kanten bzw. Konturen nicht eindeutig zu lokalisieren waren. Insbesondere war die menschliche Wahrnehmung nicht dazu geeignet, sehr schwache Intensitäten, welche in der Regel mit sehr niedrigen Konzentrationen korrelierten, von dem Bildhintergrund zu differenzieren. Aus diesem Grunde wurden mit Hilfe der Oberflächenrekonstruktion räumliche Konturen zellulärer Komponenten aus dem BildDATENSATZ extrahiert. Hierfür wurde die VTK-Klasse „`vtkMarchingContourFilter`“ genutzt, die in Abhängigkeit spezifischer Eigenschaften der Bilddaten automatisch den adäquaten Algorithmus (meist Marching-Cube-Algorithmus) zur Oberflächenrekonstruktion spezialisierte und nutzte. Eine Instanz dieser Klasse wurde in die VTK-Pipeline integriert und parametrisiert. Hierzu wurden mit Hilfe der Memberfunktionen „`SetValue`“ und „`GenerateValues`“ die Unter- und Oberschwellenwerte bzw. Konturwertintervalle für jede spezifische Zellkomponente eingestellt. Die Abbildung 13 zeigt die Oberflächenrekonstruktionen der drei selektierten BildDATENSATZE



(a)



(b)



(c)

Abbildung 13: Oberflächenrekonstruktionen aller drei selektierten Zellbildstapel als Overlay (CD95 = grün, Ceramid = rot) mit den jeweiligen Konturwerten für CD95/Ceramid: (a) „CerCD952min1“ = 47/86. (b) „JYASM5min3“ = 131/164. (c) „JYASM5min4“ = 105/77. Gut erkennbar ist die räumliche Verteilung der zellulären Bestandteile. Deren Intensitäten lassen sich aus den Modellen nicht ableiten.

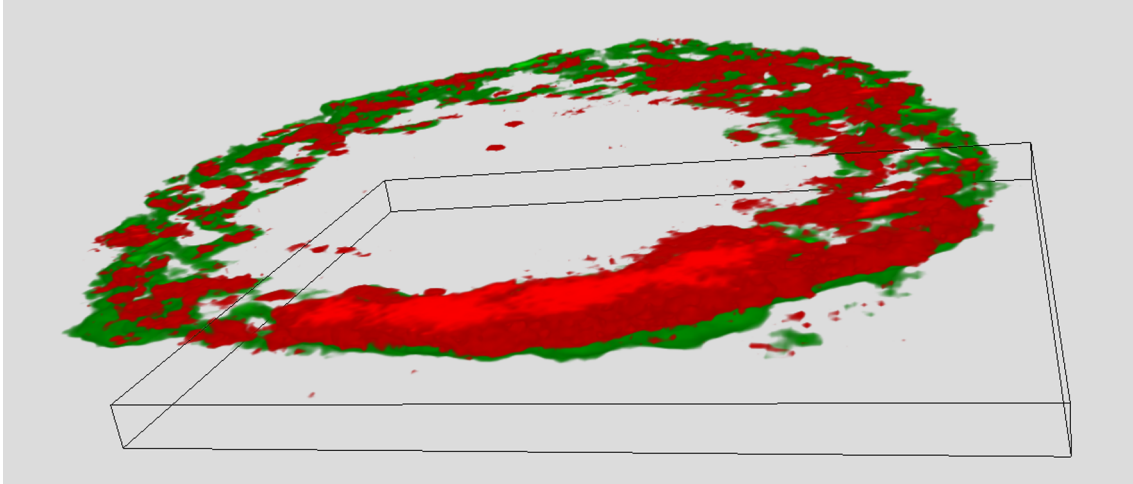
mit ihren jeweiligen Konturwert-Konfigurationen.

In Entsprechung zu den Verfahren zur Volumenvisualisierung konnten die Zellkomponenten entweder einzeln oder zusammen in einer räumlichen Szene visualisiert werden. Dabei wurden deutlich voneinander abgegrenzte, konturierte Oberflächenmodelle generiert. Durch die Möglichkeit zur Einstellung von Transparenzen konnten die zellulären Strukturen als räumliches Overlay dargestellt werden. Auf diese Weise führten die in Betracht kommenden additiven Farbüberlagerungen zu beobachtbaren Bereichen von Kolo-kalisationen, über deren Grad jedoch keine Aussagen getroffen werden konnten, da die Intensitätswerte des Visualisierungsverfahrens wegen nicht mehr zur Verfügung standen.

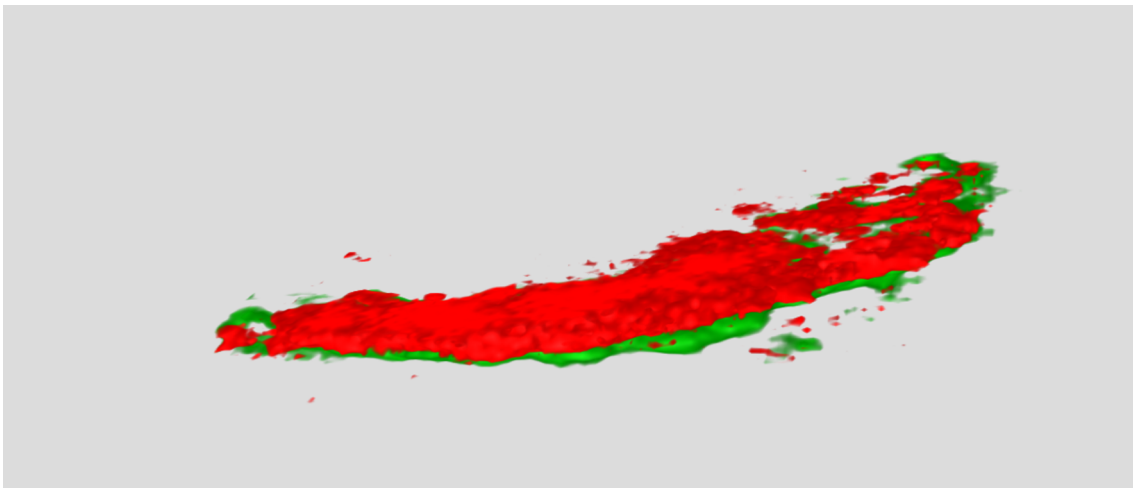
3.2.3 Shading und Clipping

Jede räumliche Szene war interaktiv manipulierbar. Diesbezüglich konnten die extrahierten 3D-Modelle durch entsprechende Mausgesten in Echtzeit rotiert, vergrößert/-kleinert und in allen Achsen verschoben werden, und ließen sich damit aus beliebigen Sichten räumlich analysieren. Um den Tiefeneindruck der räumlichen Darstellung zu verstärken, wurde das Hinzuschalten einer künstlichen Lichtquelle implementiert. Über das erstellte Objekt der Klasse „vtkLight“ konnte das Licht vielfältig parametrisiert werden. Hierbei ließen sich die Richtung des Lichteinfalls mit Hilfe der Memberfunktion „setPosition“ festlegen, die Lichtstärke mit der Funktion „setIntensity“. Jeder mit VTK durchgeführten Visualisierung liegt ein komplexes Beleuchtungsmodell zugrunde, welches Objektreflexionen unter Umgebungs-, diffusem und spiegelndem Licht berücksichtigt. Jede Art dieses Lichts, dessen Quelle als unendlich weit entfernte Punktlichtquelle mit parallel verlaufenden Lichtstrahlen aufgefasst wird, bestimmt dabei die Reflexionen am räumlichen Objekt.

Die Farben sowie z. T. die Stärke jeder Lichtart ließen sich über entsprechende Memberfunktionen festlegen. Da die Definition einer künstlichen Lichtquelle lediglich als unterstützendes Mittel zur 3D-Analyse gedacht war, wurde das Beleuchtungsmodell auf Reflexionen unter Umgebungslicht beschränkt, dessen Farbe und Intensität mit der Memberfunktion „setAmbientColor“ festgelegt wurde. Die übrigen Lichtarten wurden jeweils mit ihren Initialwerten belegt. Anhand der Abbildung 14 lassen



(a)



(b)

Abbildung 14: Zusätzliche optionale 3D-Einstellmöglichkeiten: Exemplarische Volumenvisualisierung eines Zellbildstapels mit Hilfe des Raycasting-Verfahrens (a) mit eingeblendetem Schnittquader. (b) Entsprechender räumlicher Ausschnitt nach Anwendung des Clippings (ROI) und Shadings. Unter Einfluss einer eingestellten künstlichen Lichtquelle (ambientes Licht) wird die Plastizität des partiellen räumlichen Modells hervorgehoben.

sich die Auswirkungen einer eingestellten Lichtquelle auf ein exemplarisch gewähltes Lymphozyten-Modell erkennen. Für die Unterstützung der 3D-Analyse genügte lediglich die Definition des Umgebungslichts, um die Plastizität des Oberflächenmodells hervorzuheben und die räumliche Orientierung zu fördern.

Zum Zwecke der Fokussierung auf einen besonders zu interessierenden Bereich innerhalb des räumlichen Modells (häufig genannt als Region Of Interest, oder ROI) konnten die visualisierten Zellobjekte an beliebigen Stellen grafisch zugeschnitten werden. Diese grafische Technik wird Clipping genannt. Mit Hilfe eines eingeblendeten Schnittquaders konnten Position und räumliche Ausdehnung des Schnittes festgelegt werden (siehe Abbildung 14). Der daraus resultierende Bereich verfügte über eine reduzierte Anzahl von Bildinformationen. Dadurch konnte die Bereitstellungsdauer der kompletten 3D-Szene verkürzt und die Interaktivität beschleunigt werden. Beliebig konnte während der 3D-Analyse der ausgeblendete Bereich wieder eingeblendet werden, um die räumliche Orientierung des Schnittquaders innerhalb der gesamten 3D-Szene überprüfen zu können.

Diese grafische Möglichkeit trug dazu bei, durch verschiedene Sichten auf zugeschnittene Bereiche innen liegende fluoreszierende Zellregionen einfacher und subtiler räumlich analysieren zu können.

3.3 Räumliche Kollokalisierung

Neben der Analyse der räumlichen Verteilung von Rezeptormolekülen innerhalb ceramidreicher Membran-Domänen mit Hilfe interaktiver Visualisierungen ist die räumliche Korrelation dieser Zellbestandteile zueinander relevant, um das Verständnis über den exakten Mechanismus der Formation von Zellmembran-Domänen zu verbessern. Als biologische Erscheinung wird diese räumliche Korrelation auch Kollokalisierung genannt und ist definiert durch die Existenz verschiedener Moleküle, die sehr dicht beieinander lokalisiert sind. Sie kann als eine Art Überlagerung physikalisch-erfassbarer Verteilungen von Molekül-Konzentrationen innerhalb eines dreidimensionalen Volumens interpretiert werden (Bolte und Cordelières 2006; Wu et al. 2008). Im Innern des einzelnen, im Mikroskop zu untersuchenden Zellbereichs deutet eine Kollokalisierung darauf hin, dass Moleküle möglicherweise an demselben

Rezeptor gebunden sind. In der digitalen Bildverarbeitung bedeutet dieses, dass die verschiedenen emittierten Fluoreszenzfarben der an den Molekülen gebundenen Antikörper sich dieselben Bildpunkte teilen und zu neuen Farben überlagern.

Bedingt durch die beschränkten technischen Eigenschaften der Apparatur zur Bildakquise können die Bilder einer Schicht nicht mit der exakt identischen Höhe zur Abtastebene im jeweiligen Bildkanal registriert werden. Infolgedessen findet eine plane Überlagerung zweier Schichtbilder zur Detektion von Kollokationen nicht unter einer optimalen Bedingung statt, da die jeweiligen axialen Positionen der Schichten pro Farbkanal, wenn auch lediglich marginal, voneinander abweichen können. Eine mögliche räumliche Überlagerung kann jedoch helfen, die genannten Abweichungen visuell zu kompensieren, indem die entsprechende räumliche Visualisierungsmethode die fehlenden axialen Bildinformationen interpoliert.

Räumliche Kollokationen können sowohl qualitativ als auch quantitativ dargestellt und bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Arten der Analyse angewandt, um die Aussagekraft einzelner Kollokationsergebnisse zu erhöhen. Die folgenden Abschnitte widmen sich der oben genannten Analysetechniken.

3.3.1 Qualitative Analyse

Mit Hilfe einer simplen Überlagerung der Schichtbilder in ihren Farbkanälen kann bereits eine qualitative Darstellung der Kollokation erreicht werden. Eine geeignete Farbwerttabelle legt dabei eine Pseudo-Farbe für den Grad der Kollokation fest. Dementsprechend führt die Überblendung des roten Farbkanals für Ceramid und der grüne für CD95-Rezeptorproteine zu gelben Hotspots, an deren Positionen diese Moleküle kollokalisieren und die gleichen Bildpunkte innehaben. Auch in der 3D-Visualisierung können mit Hilfe von Transparenzwerten eine Vermischung der emittierten Fluoreszenzfarben erreicht werden. Dennoch hängt die Existenz bzw. Stärke solcher gelben Hotspots hochgradig von dem relativen Intensitätswert in jedem Bildkanal ab (Bolte und Cordelières 2006). Infolgedessen müssen die Schichtbilder ähnliche Tonwertsättigungen bzw. gleich verteilte Intensitäten aufweisen, damit das resultierende überlagerte, räumliche Bild Kollokationen verlässlich repräsentieren kann. Im zu analysierenden Bildmaterial kommen jedoch inhomogene Intensi-

tätsverteilungen und Kontrastarmut vor, welche die visuelle Bestimmung der Grade der Kolokalisationen erschweren sowie die Interpretation derer verfälschen können. Daher kommt der Vorverarbeitung des Bildmaterials eine große Bedeutung zu.

Die im Rahmen der Bildvorverarbeitung durchgeführte Kontrastverbesserung mit Hilfe des Rescale-Intensity-Filters sorgte für eine weitgehende homogene Intensitätsverteilung der Bilder und schuf so die Basis für eine dreidimensionale Darstellungsmöglichkeit der Kolokalisationen. Dennoch war im räumlichen Fall festzustellen, dass auf Grund der Überlagerungen der einzelnen Schichten die Grade der Kolokalisationen vom menschlichen Auge nur sehr undifferenziert wahrgenommen und nicht präzise bestimmt werden konnten. Dieser ungünstige Effekt wird dadurch verstärkt, dass die resultierenden vermischten Intensitäten einer Schicht, algorithmisch bedingt, ihre Transparenz beibehalten müssen, um von anderen Intensitäten in perspektivischer Richtung überlagert und auf diese Weise räumlich visualisiert zu werden. Hierbei können insbesondere schwache Kolokalisationsgrade beispielsweise durch die Überlagerung mit der Hintergrundfarbe Schwarz abgeschwächt werden, so dass sie nicht mehr als Kolokalisation visuell wahrgenommen werden können.

Eine nicht zu vernachlässigende Rolle nehmen auch die Eigenschaften verschiedener Monitore ein, da es große Abweichungen hinsichtlich der Farbwiedergabe der Geräte geben kann. Hierbei kann es durchaus vorkommen, dass z. B. die Farbe Gelb auf verschiedenen Wiedergabegeräten in unterschiedlichen Gelbtönen reproduziert wird. Neben den gleichen Grundeinstellungen wie Helligkeit und Kontrast gilt es daher, die Farbprofile in einem umfassenden Farbmanagement des jeweiligen Gerätes zu beachten, zu nutzen und ggf. anzupassen, um die akquirierten Bildinformationen auf verschiedenen Wiedergabeapparaten möglichst gleich visualisieren zu können. Zu dem selektierten Farbprofil gehört ggf. ebenso die Durchführung einer Gamma-Korrektur am erzeugten Bild, um die Darstellung linear ansteigender Intensitäten an die menschliche Wahrnehmung zu adaptieren (Burger und Burge 2006).

Auf Grund all dieser erwähnten komplexen Anforderungen an eine korrekte Visualisierung von Kolokalisationen wurden verschiedene Methoden entwickelt und angepasst, um eine automatisierte Detektion kolokalisierter Regionen zu ermöglichen und die qualitative Analyse derer zu unterstützen.

Grundlage der beiden folgenden eigens entwickelten Methoden ist die Interpretation der gesamten Bilddaten als eines räumlichen Datensatzes, aufgeteilt in Würfel mit jeweils identischer Kantenlänge, die auf Pixel-Ebene festgelegt wird (Imhäuser et al. 2010b; Imhäuser et al. 2010c). Innerhalb jedes Würfels werden die Intensitätswerte erfasst bzw. gezählt, die über einen definierten Schwellenwert liegen. Diese Schwelle wird in Abhängigkeit von der gewählten Visualisierungsmethode entweder durch das festgelegte Intensitätsband über die Opazitätsfunktion des Volumerendings oder durch die Unter- bzw. Oberkonturwerte der Oberflächenrekonstruktion bestimmt. Für die anschließende Berechnung des Kollokalisationsgrades werden die minimalen und maximalen, axialen Positionen der detektierten Bildpunkte zwischengespeichert. Die resultierenden Summen gezählter Intensitäten innerhalb einer Volumenzelle eines jeden Kanals werden bei dem zuerst erläuterten Verfahren multipliziert. Auf Grund dieses Produkts und dessen anschließender Normalisierung ist die Methode Produktintensität genannt worden, die sich mit folgenden mathematischen Beziehungen zusammenfassen lässt (Imhäuser et al. 2010c):

$$p(x', y', z') = \frac{255}{v^2} \sum_{z=0}^{z_{max}} \sum_{x=0}^{x_{max}} \sum_{y=0}^{y_{max}} \sigma_1(x + x', y + y', z + z') \cdot \sum_{z=0}^{z_{max}} \sum_{x=0}^{x_{max}} \sum_{y=0}^{y_{max}} \sigma_2(x + x', y + y', z + z') \quad (33)$$

mit

$$x' = i \cdot x_{max} \quad y' = j \cdot y_{max} \quad z' = k \cdot z_{max}$$

und

$$\sigma_1(x, y, z) = \begin{cases} 1 & \text{für } f(x, y, z) > \theta_1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad \text{und} \quad \sigma_2(x, y, z) = \begin{cases} 1 & \text{für } g(x, y, z) > \theta_2 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}, \quad (34)$$

wobei v die Voxel-Dimension ist, f und g die Intensitätswerte an den Koordinaten x, y, z sowie $\theta_{1/2}$ die definierten Schwellenwerte des jeweiligen Bildkanals repräsentieren. Der konstante Faktor $\frac{255}{v^2}$ normalisiert hierbei die Produktsummen und gewährleistet, dass die resultierenden Kollokalisationsgrade $p()$ auf das gewöhnliche Intensitätsintervall $[0, 255]$ abgebildet werden. Jedem dieser Intensitätswerte wird

eine Pseudo-Farbe durch eine adäquate Transferfunktion zugeordnet, welche linear steigende Gelbwerte verfügbar hält. Schließlich wird die über i, j, k selektierte Volumenzelle ausgehend von den Positionen x und y , entlang der Voxel-Dimensionen, jedoch innerhalb der vorher abgespeicherten axialen Positionen mit dem Intensitätswert des berechneten Kolokalisationsgrades gefüllt. Im weiteren algorithmischen Schritt wird der räumliche Ausschnitt um die Voxel-Ausdehnung (x', y', z') verschoben und die Bestimmung der Kolokalisation für die nächste Volumenzelle fortgesetzt. Dieses Prozedere wird solange wiederholt, bis der vollständige Volumendatensatz durchlaufen worden ist.

Durch die Aufteilung und Betrachtung der Volumendaten in gleich große räumliche Areale für die Bestimmung der Kolokalisationen werden nicht nur einzelne Bildpunkte, sondern alle anderen um sie herum innerhalb des räumlichen Areals berücksichtigt. Diese Vorgehensweise ist sinnvoll, da physikalisch betrachtet Moleküle (wie CD95 und Ceramid) sich nicht die identische räumliche Position teilen können, jedoch höchstens sehr dicht beieinanderliegen können. Abhängig von dem Auflösungsvermögen der technischen Apparatur zur Bildakquise können folglich die entsprechenden Koordinaten der erfassten Intensitäten u. U. voneinander abweichen. Solche Abweichungen können bei einer pixelgenauen Analyse dazu führen, dass Kolokalisationen nicht detektiert werden können, obgleich die Moleküle an den relevanten Positionen dicht beieinanderliegen. Bei einer Betrachtung in räumlichen Regionen von Bildpunkten entfällt dieser Nachteil, da auch benachbarte Pixel innerhalb des gewählten Areals inkludiert werden. Hierbei können schwache Intensitäten, insbesondere durch die normalisierte Multiplikation der beschriebenen Produktintensität, gewichtet in die Berechnung des Kolokalisationsgrades miteinbezogen werden (vgl. Gleichung (33)). Dadurch können Kolokalisationsgrade von Bilddaten auch mit inhomogener Intensitätsverteilung hervorgehoben werden.

Trotz dieser Hervorhebung ist das menschliche Auge oftmals nicht in der Lage, sehr schwache Kolokalisationsgrade wahrzunehmen oder von anderen Bildbereichen zu differenzieren, insbesondere dann, wenn schwache und starke Grade dicht zusammenliegen. Um auch solche Kolokalisationen zu detektieren und im Besonderen zu lokalisieren, wurde eine weitere Methode entwickelt. Von der bereits erläuterten Pro-

duktintensität unterscheidet sich diese lediglich in der Bestimmung des Kolokalisationsgrades aus den Produktsummen (siehe Gleichung (33)). Statt die Summen durch Multiplikation in Korrelation zu setzen, vergleicht das Verfahren sie pro Bildkanal mit dem relativen Schwellenwert ρ , der prozentual in Bezug auf die Gesamtheit der Bildpunkte in der selektierten Volumenzelle festgelegt wird (Imhäuser et al. 2010c):

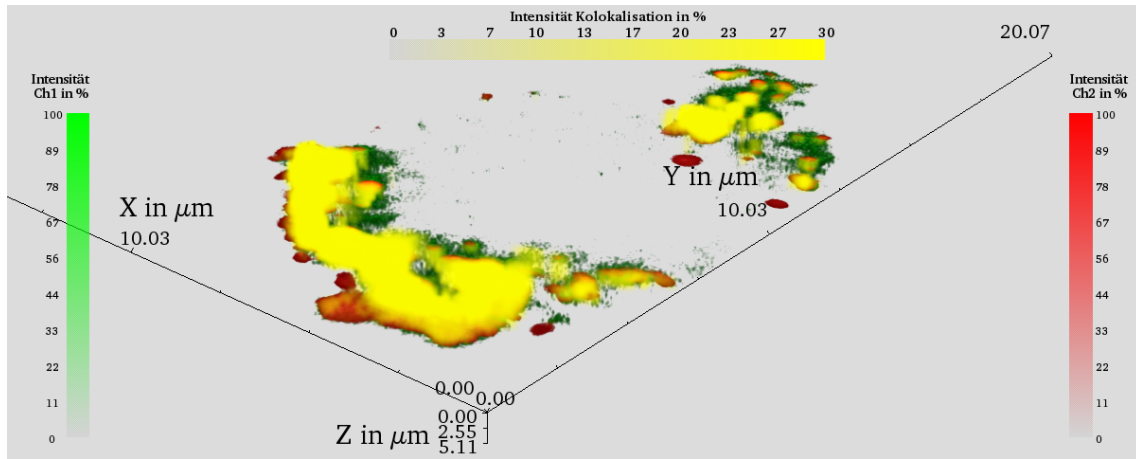
$$b(x', y', z') = 255 \cdot \begin{cases} 1 & \text{für } \phi_1(x', y', z') > \rho \text{ und } \phi_2(x', y', z') > \rho \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (35)$$

mit

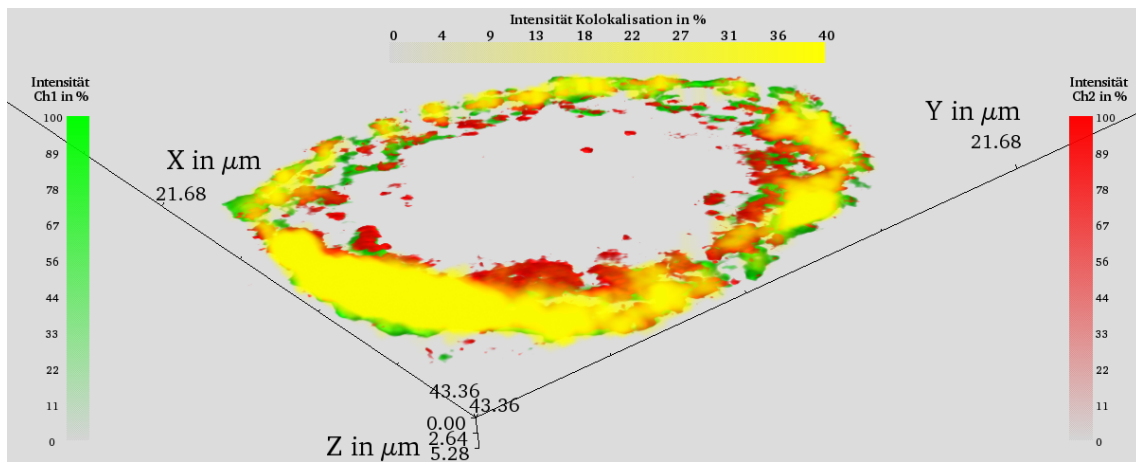
$$\phi_{1/2}(x', y', z') = \sum_{z=0}^{z_{max}} \sum_{x=0}^{x_{max}} \sum_{y=0}^{y_{max}} \sigma_{1/2}(x + x', y + y', z + z'). \quad (36)$$

Liegen die aufsummierten Intensitäten beider Bildkanäle $\phi_{1/2}()$ über den festgelegten Schwellenwert ρ , wird die Kolokalisation im selektierten räumlichen Areal als maximal aufgefasst. Entsprechend wird die Volumenzelle mit dem Maximalwert (= 255) aus dem verfügbaren Intensitätsspektrum belegt bzw. gefüllt. Wird die Bedingung in der Gleichung (35) hingegen nicht erfüllt, wird für den betrachteten Bereich keine Kolokalisation angenommen. In der Volumenzelle wird der minimale Intensitätswert (= 0) bzw. ein Wert mit minimaler Opazität abgelegt. Die Gleichung erzeugt demnach lediglich zwei unterschiedliche Intensitätswerte für Kolokalisationen mit größtmöglichem Kontrast für eine optimale optische Unterscheidbarkeit. Da alle sich aus den Intensitätssummen $\phi_{1/2}()$ ergebenden Kolokalisationsgrade entsprechend auf einen Minimal- bzw. Maximalwert abgebildet werden, findet eine binäre Aufteilung der Grade statt. Das Verfahren ist daher Binärisierung genannt worden. Auf Grund dieser Verteilung ist eine qualitative Darstellung und Analyse der Grade lediglich indirekt über den relativen Schwellenwert ρ möglich. Durch die Markierung mit dem maximalen Intensitätswert kann jede noch derart kleine detektierte Kolokalisation hervorgehoben und identifiziert werden.

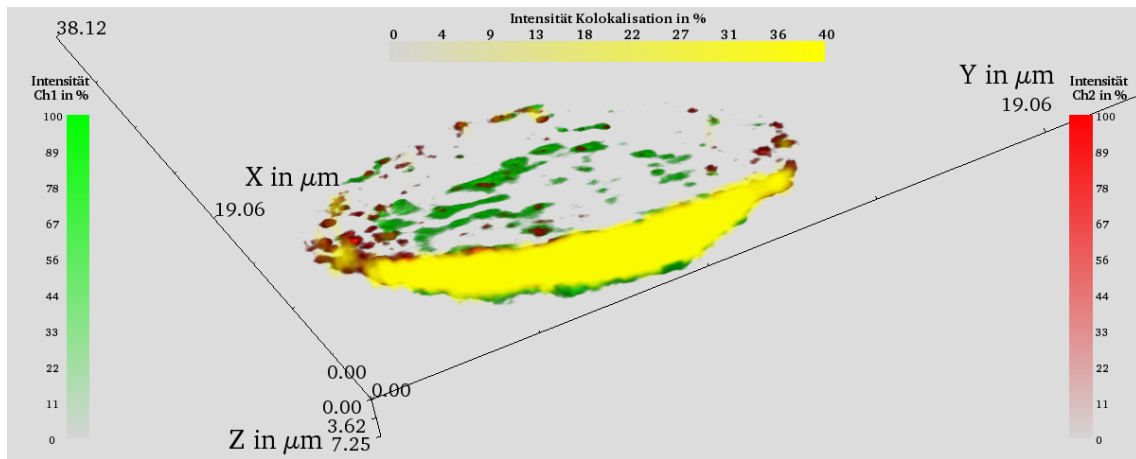
Die beiden erläuterten Verfahren wurden auf alle drei ausgewählten Zellbildstapel angewandt. Die Abbildungen 15–16 zeigen hierzu die bildlichen Ergebnisse, für die lediglich Volumenvisualisierungen herangezogen wurden, die mit Hilfe des genutzten Raycasting-Verfahrens eine sehr hohe optische Qualität aufweisen. In diesen Zellvisualisierungen können Kolokalisationen deutlich identifiziert werden, die durch die



(a)

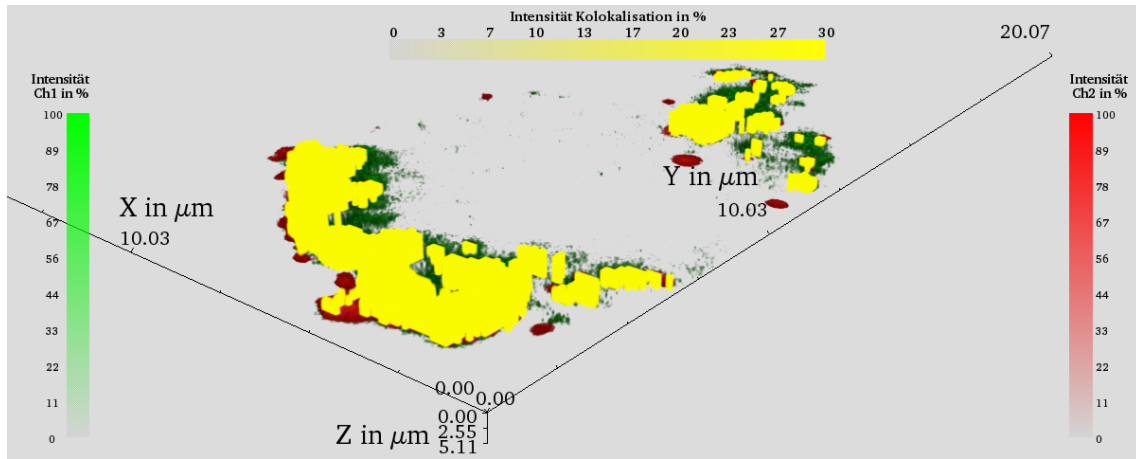


(b)

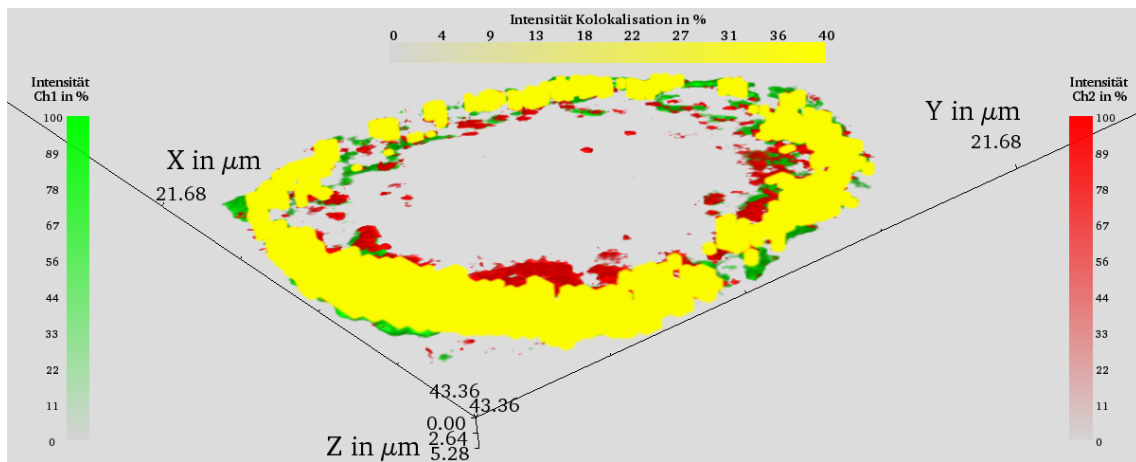


(c)

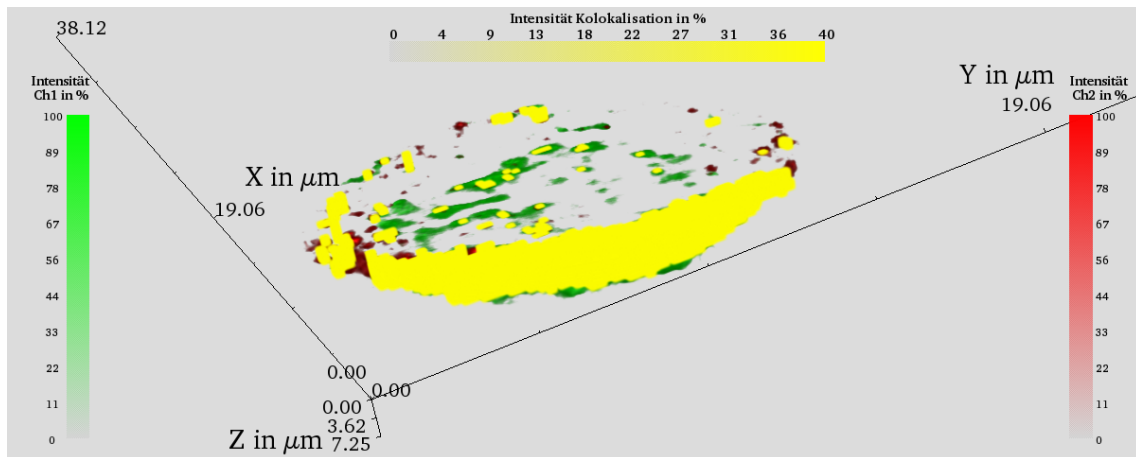
Abbildung 15: Visualisiertes Ergebnis der angewandten Produktintensität: Als Overlay (CD95 = grün, Ceramid = rot, gelb = Kolokalisation) wurden die berechneten Werte via Raycasting in die 3D-Modelle der Zellbildstapel (a) „CerCD952min1“, (b) „JYASM5min3“ und (c) „JYASM5min4“ eingebettet. Anhand der unterschiedlichen gelben Intensitäten lassen sich die Kolokalisationen qualitativ abschätzen.



(a)



(b)



(c)

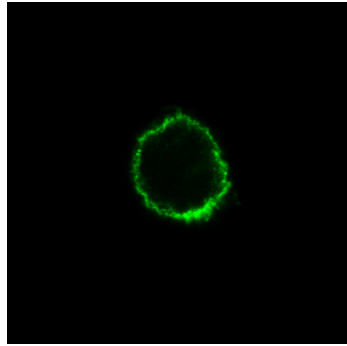
Abbildung 16: Visualisiertes Ergebnis der angewandten Binärisierung: Als Overlay (CD95 = grün, Ceramid = rot, gelb = Kolokalisation) wurden die berechneten Werte via Raycasting in die 3D-Modelle der Zellbildstapel (a) „CerCD952min1“, (b) „JYASM5min3“ und (c) „JYASM5min4“ eingebettet. Mit Hilfe der gelben Markierungen lassen sich auch kaum wahrnehmbare Kolokalisationen detektieren.

hellgelben Intensitäten indiziert sind. Algorithmisch bedingt, werden diese Kollokalisationsgrade in räumlichen Blöcken bzw. Volumenzellen erzeugt und durch die Produktintensität farbadäquat verstärkt. Niedrige Kollokalisationsintensitäten, die trotz dieser Hervorhebung nicht von der menschlichen Wahrnehmung erfasst zu werden vermögen, können hingegen mit Hilfe der Binärisierung mit maximaler Intensität markiert und damit sichtbar gemacht werden. Folglich stellt das Verfahren eine ideale Ergänzung zu der Produktintensität dar, und es liegt nahe, beide Techniken simultan anzuwenden und mit ihnen zu analysieren.

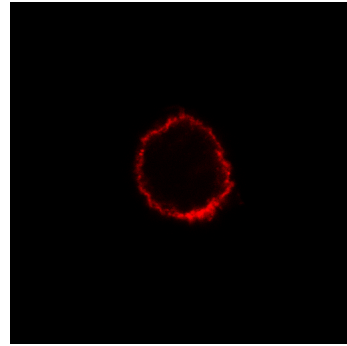
Um die entwickelten Methoden auf ihre korrekte Funktionsweise zu validieren, wurden Testbilddaten erzeugt. Partiiell auf der Basis von Daten originaler Zellschichtbilder wurden hierzu drei verschiedene mögliche Szenarien von Kollokalisierungen nachgebildet. Hinsichtlich des ersten Szenarios wurde durch simple Vervielfältigung der Schichtbilder eines Kanals für den anderen eine identische Kopie hergestellt. Unter Verwendung dieser ersten Testdaten wurden maximale Kollokalisierungen in den Bildresultaten prognostiziert. Für das zweite Szenario wurden alle Schichtbilder eines Kanals um einen beliebigen, jedoch festen räumlichen Abstand verschoben. Bei Betrachtung dieser Daten als Overlay wurden Kollokalisierungen an den Stellen erwartet, an denen sich die Zellstrukturen bildlich überschneiden. Im dritten Szenario wurden die Schichtbilder eines Kanals um einen definierten Winkelwert axial rotiert. Entsprechend wurden keine maximalen Kollokalisationsgrade in den Bildstrukturen angenommen.

Die erzeugten Testdaten wurden beiden Kollokalisationsverfahren zugeführt, und anschließend die Bildresultate mit den aufgestellten Hypothesen verglichen. Diesbezüglich deckten sich die Ergebnisse weitgehend mit den erwarteten. Damit ließ sich die wesentliche korrekte Funktionsweise der Verfahren bestätigen. Die Abbildungen 17–19 zeigen die einzelnen Szenarien sowie die entsprechenden Kollokalisationsergebnisse.

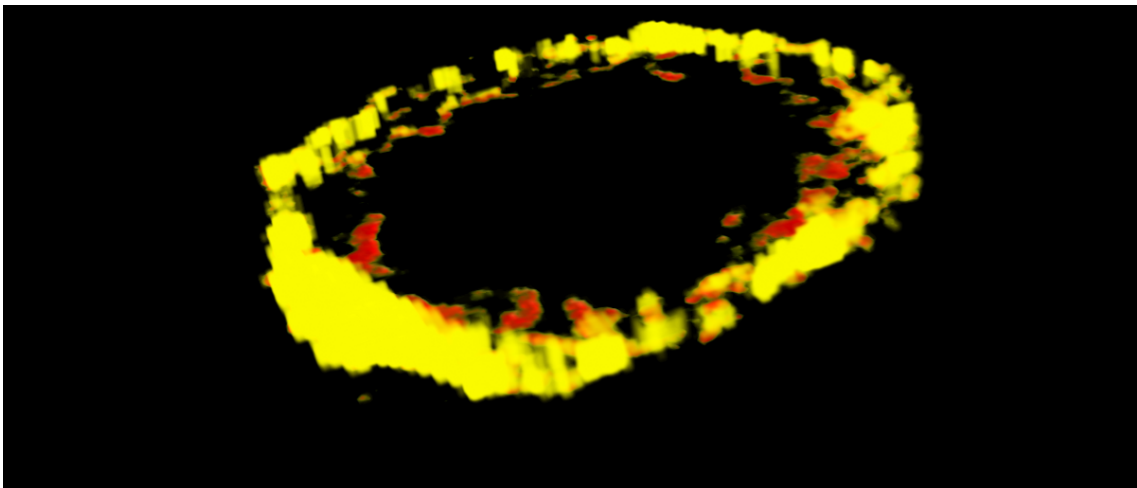
Um die eigens entwickelten Kollokalisationsverfahren ergänzend zu testen und um ein weiteres Werkzeug für die qualitative Kollokalisationsbestimmung zur Verfügung zu haben und nutzen zu können, wurde eine alternative Bildanalysetechnik verwendet. Hierfür wurden die Eigenschaften einer auf Bilddaten angewandten



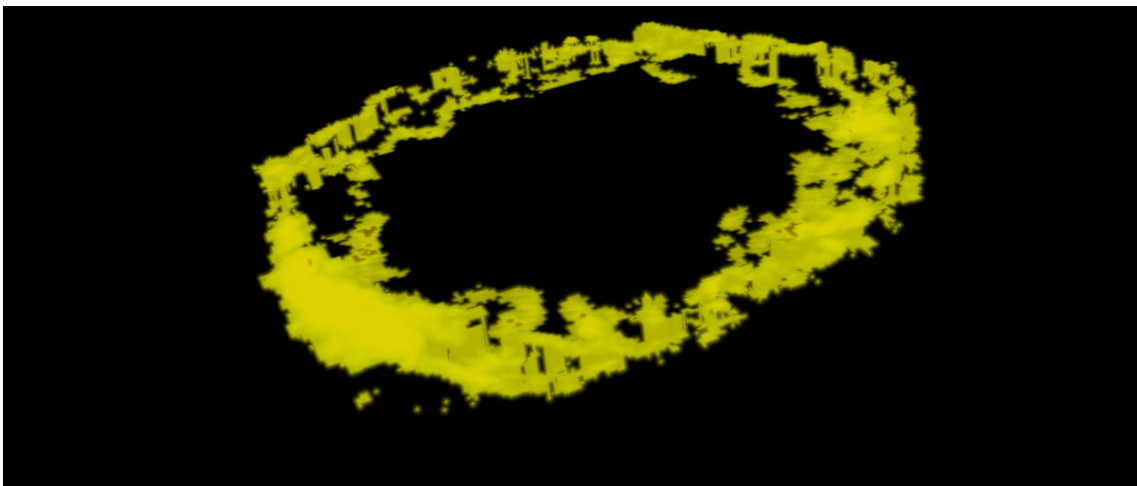
(a)



(b)

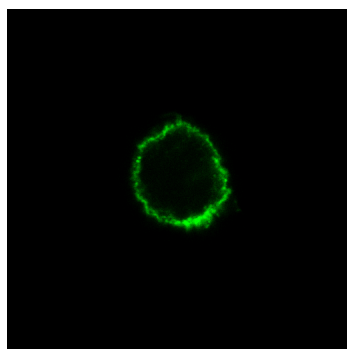


(c)

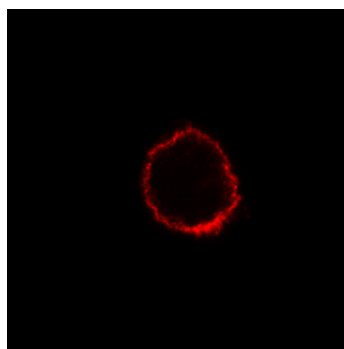


(d)

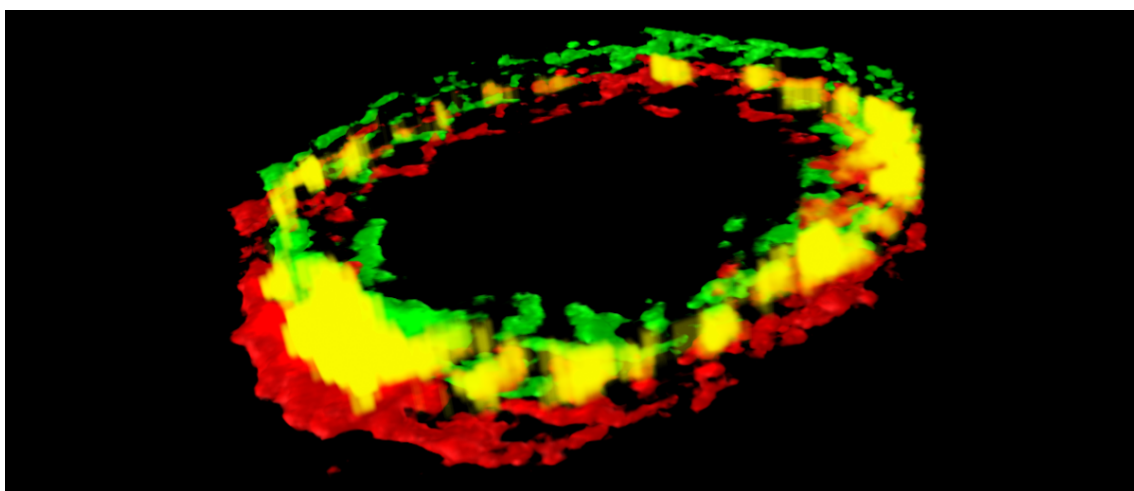
Abbildung 17: Visueller Test der Kollokalisationsverfahren: (a),(b) Exemplarisch gewählte Schichtbilder aus dem Testdatensatz. Die Bilder sind hinsichtlich ihrer Intensitätsverteilungen identisch. Visualisierter Testbilddatensatz (via Raycasting) und Resultate der Kollokalisationsverfahren: Wie erwartet, zeigt (c) die Produktintensität (Composite) maximale Kollokationen besonders in Bildregionen mit hochgradigen Intensitäten, während (d) die Binärisierung (MIP) alle Bereiche markiert.



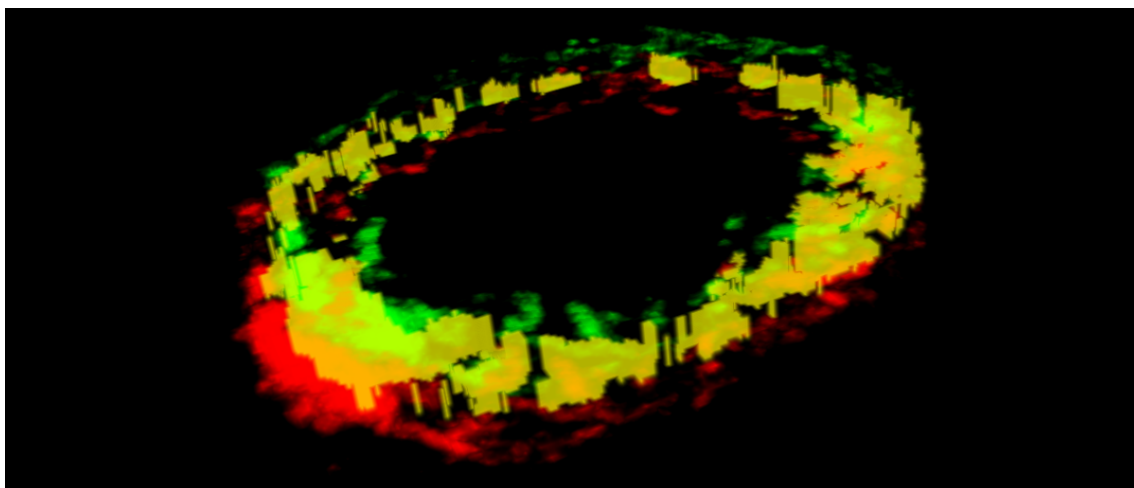
(a)



(b)

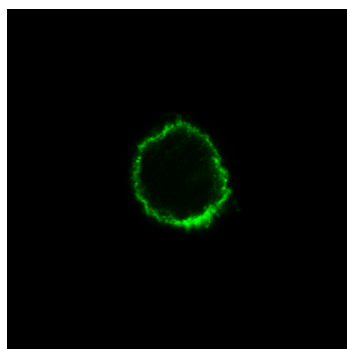


(c)

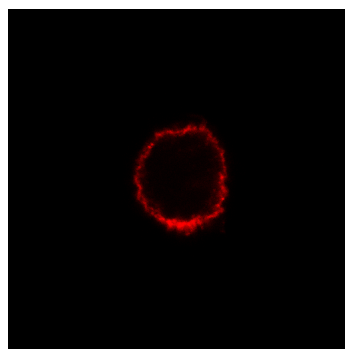


(d)

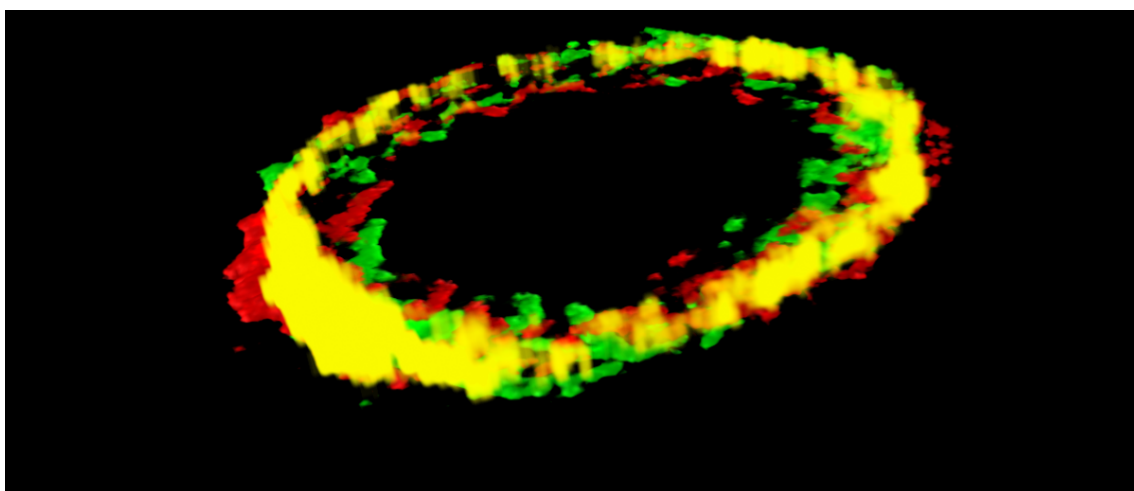
Abbildung 18: Visueller Test der Kolokalisationsverfahren: (a),(b) Exemplarisch gewählte Schichtbilder aus dem Testdatensatz. (b) ist gegenüber (a) in X-/Y-Richtung um $15/10 \text{ Pixel}$ verschoben. Visualisierter Testbilddatensatz und Resultate der Kolokalisationsverfahren (c) Produktintensität (Raycasting, Composite) und (d) Binärisierung (Raycasting, MIP): Beide Verfahren zeigen Kolokalisationen ausschließlich an räumlichen Überschneidungen der Modelle (wie prognostiziert).



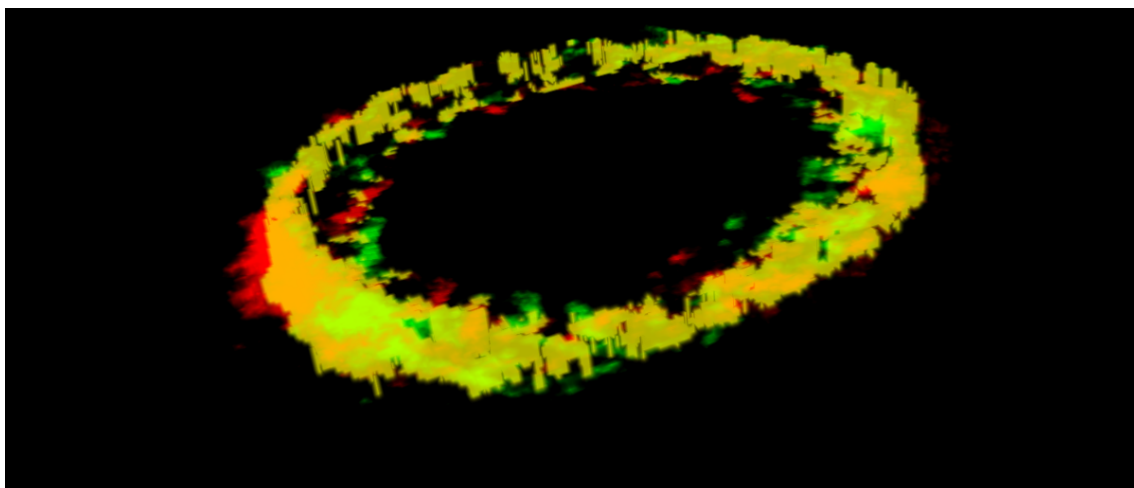
(a)



(b)



(c)



(d)

Abbildung 19: Visueller Test der Kolokalisationsverfahren: (a),(b) Exemplarisch gewählte Schichtbilder aus dem Testdatensatz. Im Vergleich zu (a) ist (b) um 23° im Uhrzeigersinn gedreht. Visualisierter Testbilddatensatz und Resultate der Kolokalisationsverfahren (c) Produktintensität (Raycasting, Composite) und (d) Binärisierung (Raycasting, MIP): Beide Verfahren ergeben die erwarteten hochgradigen Kolokalisationen sowie eine hohe globale Übereinstimmung beider Modelle.

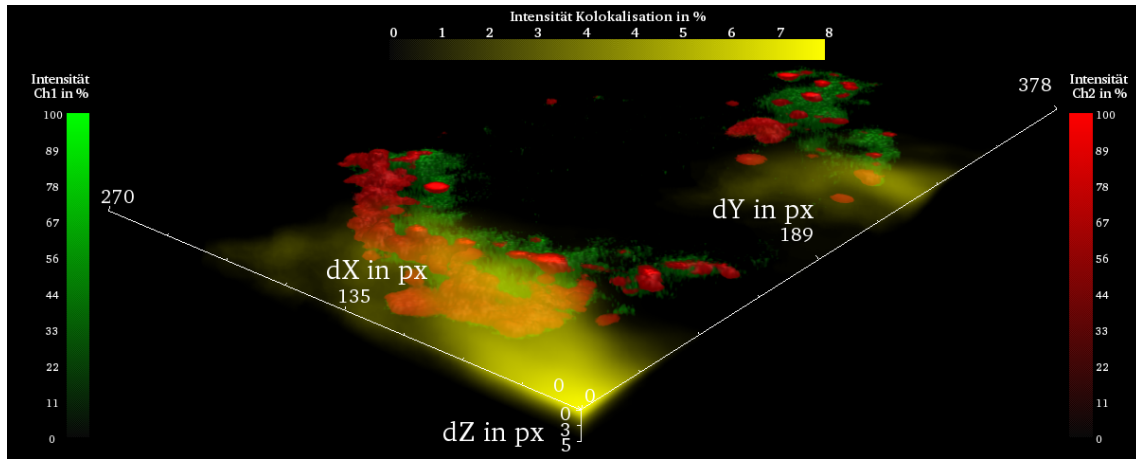
Kreuzkovarianzfunktion (kurz: KKF) genutzt, deren ermittelte Werte als ein Ähnlichkeitsmaß zwischen registrierten Bildern interpretiert werden kann (Imhäuser et al. 2010c). Diese Bildähnlichkeiten können ebenso als ein gesamtheitlicher Grad von Kollokationen angesehen werden. Hinsichtlich der grob umrissenen Darstellung des Algorithmus einer KKF wird ein digitales Bild gegen das zu vergleichende Bild diskret verschoben und für diese beliebige, jedoch feste räumliche Verschiebung ein linearer Ähnlichkeitswert berechnet. Für Bilder einer einzelnen Schicht ergibt sich demnach eine Matrix aus Similaritätskoeffizienten. Erweitert und angewandt auf zwei räumliche Bilddatensätze $f(i, j, k)$ und $g(i, j, k)$, kann deren diskrete KKF wie folgt mathematisch formuliert werden (Toennis 2012):

$$KKF_{f,g}(i', j', k') = \sum_{i,j,k} (f(i, j, k) - \bar{f}) \cdot (g(i + i', j + j', k + k') - \bar{g}). \quad (37)$$

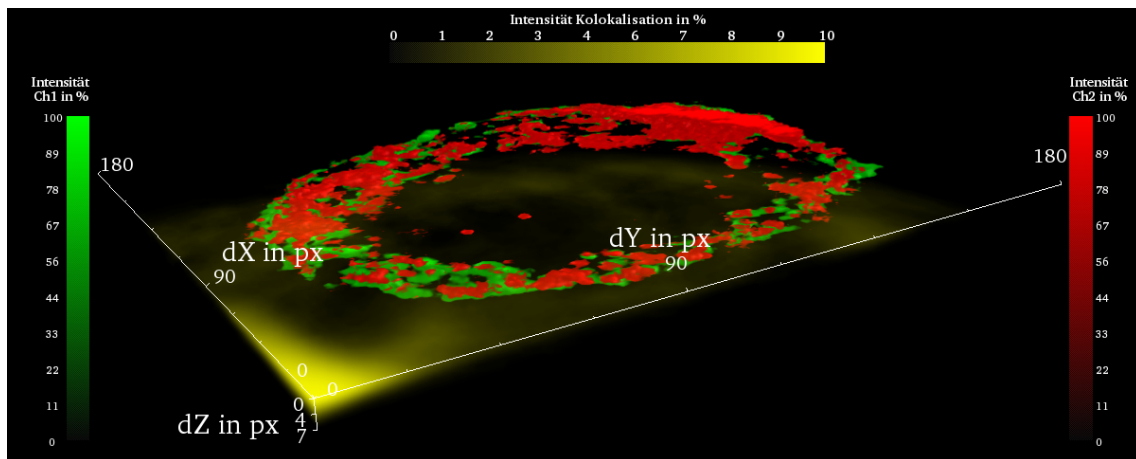
Hierbei entsprechen i', j', k' den Verschiebungen in die korrespondierende Richtung und \bar{f}, \bar{g} den gemittelten Intensitätswerten der vergleichenden Bilder einer Schicht. Da Korrelationen innerhalb des Bildstapels in axialer Richtung (k') für die Analysen ohne Bedeutung waren, wurde die Bestimmung der Korrelationen auf die Berechnung einer zweidimensionalen KKF für jede Schichtposition beschränkt, so dass folgende, zu (37) vereinfachte Gleichung angewandt werden konnte (Imhäuser et al. 2010c):

$$KKF_{f,g}(i', j') = \sum_{i,j,k} (f(i, j, k) - \bar{f}) \cdot (g(i + i', j + j', k) - \bar{g}). \quad (38)$$

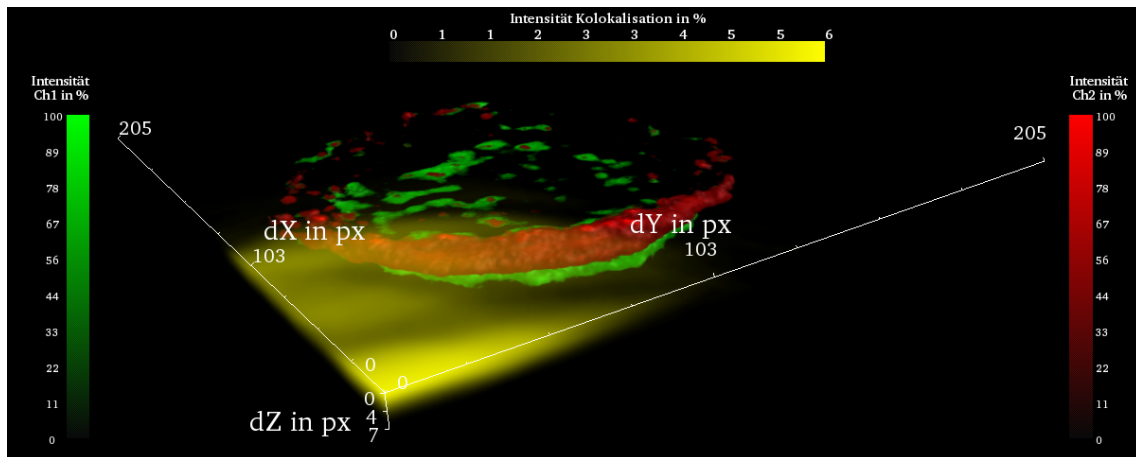
Mit Hilfe der Klasse „ImageCorrelation“ aus der VTK-Bibliothek wurde diese Gleichung (38) algorithmisch umgesetzt. Ähnlich den Filtern zur Bildvorverarbeitung wurde eine Instanz dieser Klasse wie eine Art Filter in die Visualisierungspipeline eingebunden. Über die Memberfunktion „SetDimensionality“ dieses Filters konnte Einfluss auf die Interpretation der Eingabedaten genommen werden. Hierbei wies der Wert 3 das Filter an, den Quell-Bilddatensatz als einen räumlichen aufzufassen und zu verarbeiten. Basierend auf (38) erzeugte das Verfahren gestapelte Matrizen aus Ähnlichkeitswerten in identischen Dimensionen der zugrunde liegenden Bilddatensätze. Um die Interpretation dieser Werte zu unterstützen, wurden die gewonnenen Daten als Volumen visualisiert. Hierfür mussten die Werte zunächst mit einem eingebundenen Filter auf ein adäquates Intensitätsintervall $[0, 255]$ re-



(a)



(b)



(c)

Abbildung 20: Visualisiertes Ergebnis der angewandten KKF: In die 3D-Modelle der Zellbildstapel (a) „CerCD952min1“, (b) „JYASM5min3“ und (c) „JYASM5min4“ wurden die berechneten Werte via Raycasting als Overlay (CD95 = grün, Ceramid = rot, Kolokalisation = gelb) integriert. Die Konzentration hoher gelber Intensitäten um den Ursprung lässt auf eine hohe globale Kolokalisation schließen.

skaliert werden (siehe „RescaleIntensityFilter“, 3.1.1). In Analogie zu den vorher erläuterten Verfahren Produktintensität und Binärisierung wurden mit Hilfe des Raycasting-Verfahrens hoch-qualitative Visualisierungen erzeugt und in die zu analysierende räumliche Szene eingefügt. Da eine farbliche Überdeckung des räumlichen Kolokalisations- und bestehenden Zellmodells nicht gewünscht war, wurde die Darstellung der Kolokalisationsgrade durch die Definition eines linearen Anstiegs der Opazitäten bzw. Transparenzen bestimmt, während die Farbzuoordnung auf die konstante maximale Farbe Gelb festgesetzt wurde. Folglich wurden alle Intensitäten auf den maximalen Gelbwert abgebildet, jedoch mit der Transparenz in Höhe ihres Intensitätswertes. Durch diese Festlegungen der entsprechenden Transferfunktionen konnte eine Komposition der räumlichen Visualisierungen erreicht werden. Dieses diente der vereinfachten Orientierung sowie Assoziation der Kolokalisationen zu den Zellstrukturen.

Die Abbildung 20 zeigt die bildlichen Resultate der auf alle drei selektierten Zellbildstapel angewandten KKF. In allen Visualisierungen ist deutlich zu erkennen, dass nur am Ursprung der räumlichen KKF die höchsten Intensitäten lokalisiert sind. Dieses lässt den Schluss zu, dass sich die Bilder auf einer Schichtposition für kleine diskrete Verschiebungen ($\Delta x \approx 0$, $\Delta y \approx 0$) in Struktur und zugehörigen Intensitäten sehr ähneln. Folglich kann auf eine hohe gesamtheitliche Kolokalisation der Bildstrukturen geschlossen werden. Ein genaues Maß dieser Korrelation kann hieraus jedoch nicht abgeleitet werden.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Verfahren zur qualitativen Bestimmung von Kolokalisationen wurden in ein eigens entwickeltes VTK-Filter implementiert, und konnten damit nahtlos in die VTK-Pipeline integriert werden. Dadurch ließen sich die Vorzüge einer Pipeline nutzen (z. B. automatische Update-Traversierung). Da die Verfahren, insbesondere die räumliche KKF, eines enormen, zeitintensiven Rechenaufwandes bedurften, war es erforderlich, die Methoden in einer Thread-Architektur zu implementieren. Hierdurch wurden die Berechnungen in einem nebenläufigen Prozess ausgeführt. Auf diese Weise konnte eine maßgebliche Verbesserung der Interaktivität der Hauptapplikation während der Berechnungen erzielt werden.

3.3.2 Quantitative Analyse

Im vorherigen Abschnitt wurden Verfahren erläutert, mit deren Hilfe sich Kollokalisierungen zellulärer Bestandteile lokalisieren sowie die Grade dieser räumlichen Korrelationen einstufen/abschätzen ließen. Für eine Analyse kann es darüber hinaus von Bedeutung sein, welche exakten Werte, als prozentuale Zahlenwerte formuliert, solche Kollokalisationsgrade innerhalb eines spezifischen Bildbereichs annehmen. Zu diesem Zweck müssen die Grade mit adäquaten Methoden quantifiziert werden. Basierend auf den daraus neu gewonnenen Daten können Annahmen zu molekularbiologischen Prozessen in Zellen untermauert und/oder ggf. weitere aufgestellt werden. Diesbezüglich kann es konkret für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analyse bedeutsam sein, die Frage zu klären, wie groß das exakte Mengen- bzw. Konzentrationsverhältnis zwischen Rezeptor- und Ceramidmolekülen innerhalb eines spezifischen, lokalen räumlichen Kollokalisationsbereichs ist. Die resultierenden Werte können anschließend helfen, das Verständnis über den Mechanismus der Formation von Zellmembran-Domänen zu präzisieren. Aus diesem Grund wurden Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Kollokalisierungen verwendet, um überdies die Ergebnisse aus der qualitativen Analyse zu ergänzen.

Für die Quantifizierung von Kollokalisierungen stehen bereits zahlreiche erprobte Methoden zur Verfügung, welche sich hinsichtlich ihrer Vorgehensweise bei der Auswertung von Kollokalisierungen unterscheiden. Die Verfahren weisen hierbei oftmals unterschiedliche Sensitivitäten auf und stellen entsprechende Anforderungen an die Bildeigenschaften des zu analysierenden Materials (Zinchuk et al. 2007; Bolte und Cordelières 2006). Hiernach richtet sich ferner die Eignung bzw. Anwendbarkeit der jeweiligen Methode. Da die Bildeigenschaften nicht immer bekannt sind oder den Anforderungen entsprechend durch die Bildvorverarbeitung nicht optimiert werden können, werden häufig mehrere Analysetechniken simultan verwendet, um Schlussfolgerungen einzelner Resultate zu bestätigen bzw. deren Aussagekraft zu erhöhen. Ein Standardverfahren zur quantitativen Bestimmung von Kollokalisierungen bedient sich der Berechnung des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten, welcher auch bei unbekanntem Bildeigenschaften verlässlich einen initialen Wert und dadurch eine ge-

eignete Abschätzung für den Grad der Kolo-kalisation gibt. Basierend auf der Bewertung einer Korrelation zwischen den Intensitäten zweier Bilder mit Hilfe der linearen Regression, stellt dieser Koeffizient eine nicht lineare Abschätzung der Güte dieser Approximation dar (Bolte und Cordelières 2006; Gonzalez und Woods 2008). Ferner werden für den Koeffizienten ausschließlich Ähnlichkeiten zwischen den Ausprägungen der Signale (Bildpunkte) unabhängig ihrer Intensitäten berücksichtigt (Zinchuk et al. 2007). Dadurch ist der Koeffizient nicht sensitiv gegen differente Intensitätsverteilungen der zu vergleichenden Bilder (Meijering und Cappellen 2007). Er lässt sich wie folgt mathematisch formulieren (Manders et al. 1993; Costes et al. 2004; Pawley 2006):

$$PK_{f,g} = \frac{\sum_{i,j}(f(i,j) - \bar{f}) \cdot (g(i,j) - \bar{g})}{\sqrt{\sum_{i,j}(f(i,j) - \bar{f})^2 \cdot \sum_{i,j}(g(i,j) - \bar{g})^2}}, \quad (39)$$

wobei f, g die entsprechenden Intensitäten von Bildpunkten an den Koordinaten i, j sowie \bar{f}, \bar{g} die jeweiligen arithmetischen Mittelwerte aller Intensitätswerte eines Bildes repräsentieren. Der Wertebereich des Koeffizienten erstreckt sich von $-1,0$ bis $1,0$. Hierbei deutet der Wert 0 auf keine Korrelation hin, 1 auf eine signifikante. Demgegenüber lassen negative Werte keine eindeutigen Schlüsse zu. Auch deshalb sollte in Ergänzung zu diesem Koeffizienten der Überdeckungskoeffizient nach Manders bestimmt werden, dessen mathematische Formulierung sich lediglich in dem Fehlen der gemittelten Intensitäten von (39) unterscheidet. Der Koeffizient gibt ein Maß dafür an, wie stark sich die Intensitäten der zu analysierenden Bildkanäle überlagern. Dementsprechend stellt er den realen Grad von Kolo-kalisationen dar. Zudem ist der Koeffizient nicht sensitiv gegen den in der fluoreszierenden Bildgebung häufig auftretenden Bleaching-Effekt sowie anderen Einschränkungen (Zinchuk et al. 2007). Nach (Manders et al. 1993) lässt er sich auf folgende Weise definieren:

$$MK_{f,g} = \frac{\sum_{i,j} f(i,j) \cdot g(i,j)}{\sqrt{\sum_{i,j}(f(i,j))^2 \cdot \sum_{i,j}(g(i,j))^2}} \quad (40)$$

mit den gleichen Parametern wie bei (39). Die Werte des Manders'schen Überdeckungskoeffizienten liegen im Bereich von 0 bis $1,0$, und geben prozentual an, wie viele Pixel/Intensitäten sich in beiden Bildkanälen überlagern.

Wird die Gleichung (40) quadriert, lässt sich der Bruch des Koeffizienten in die

zwei folgenden Faktoren mit vereinfachten Nennern aufteilen (Bolte und Cordelières 2006; Manders et al. 1993):

$$\begin{aligned}
(MK_{f,g})^2 &= \left(\frac{\sum_{i,j} f(i,j) \cdot g(i,j)}{\sqrt{\sum_{i,j} (f(i,j))^2 \cdot \sum_{i,j} (g(i,j))^2}} \right)^2 \\
&= \frac{\sum_{i,j} f(i,j) \cdot g(i,j)}{\sum_{i,j} (f(i,j))^2} \cdot \frac{\sum_{i,j} f(i,j) \cdot g(i,j)}{\sum_{i,j} (g(i,j))^2} \\
&= uek_1 \cdot uek_2.
\end{aligned} \tag{41}$$

Mit der Berechnung von uek_1 und uek_2 , kann jeweils einzeln ein Grad der Überlagerung im Fokus des zu interessierenden Bildkanals ermittelt werden. Aus diesem Grund werden die Faktoren Überlagerungskoeffizienten genannt. Da ihre Berechnung von den Intensitäten des jeweiligen anderen Bildkanals abhängt, sind die Koeffizienten sensitiv gegen unterschiedliche Intensitätsräume der zu vergleichenden Bilder (Zinchuk et al. 2007). Um diesen Nachteil zu vermeiden, kann die Bestimmung der Koeffizienten um definierte Bedingungen erweitert werden. Hierbei werden die Intensitäten eines Bildkanals nur ins Kalkül gezogen, wenn sich die korrespondierende Intensität des anderen Kanals von der Hintergrundfarbe (Intensitätswert 0) unterscheidet. Diese Bedingung kann mit Hilfe einer mathematischen Fallunterscheidung formuliert werden. Da sich die Kalkulation ausschließlich auf einen Bildkanal beschränkt, werden nur dessen Intensitätswerte berücksichtigt. Daraus ergeben sich folgende, im Vergleich zu (41) vereinfachte Definitionen von Koeffizienten, die Manders'sche Kolokalisationskoeffizienten mk_1, mk_2 genannt werden (Manders et al. 1992; Manders et al. 1993; Comeau et al. 2006; Wu et al. 2008):

$$mk_1 = \frac{\sum_{i,j} f(i,j) \cdot \sigma_f(i,j)}{\sum_{i,j} f(i,j)} \qquad mk_2 = \frac{\sum_{i,j} g(i,j) \cdot \sigma_g(i,j)}{\sum_{i,j} g(i,j)}$$

mit

$$\sigma_f(i,j) = \begin{cases} 1 & \text{für } g(i,j) > 0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \qquad \sigma_g(i,j) = \begin{cases} 1 & \text{für } f(i,j) > 0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}.$$

Die Werte von mk_1 und mk_2 liegen im Bereich von 0 bis 1,0, und lassen sich auf ähnliche Weise wie jene der oben erörterten Überlagerungskoeffizienten interpretieren. Bezogen auf das für diese Arbeit verfügbare Bildmaterial, zeigen z. B. die Koeffizientenwerte 1,0 und 0,23 an, dass alle Ceramid-Bildsignale mit denen von CD95

kolokalisieren, jedoch nur 23 % der CD95-Intensitäten mit denen von Ceramid.

Die Berechnungen der oben beschriebenen Koeffizienten sind Teile erprobter Algorithmen, die standardmäßig und am häufigsten für die quantitative Bestimmung von Kolokalisationen herangezogen werden (Agnati et al. 2005; Manders et al. 1993; Zinchuk et al. 2007). Oftmals beschränken sich diese Verfahren jedoch auf den Vergleich eines Bildpaares. Für räumliche Bilddaten mussten die Methoden erweitert werden. Hierfür wurde die Berechnung eines Koeffizienten separat für jede einzelne Schichtposition durchgeführt und die resultierenden Werte entsprechend zu einem Koeffizienten vereint.

Für alle drei ausgewählten Zellbildstapel wurden die oben erläuterten Koeffizienten berechnet, die mannigfaltige Sensitivitäten gegen Bildeigenschaften wie Bleaching, Bildrauschen etc. aufwiesen. Hierbei waren die in 3.1 durchgeführten Methoden zur Bildvorverarbeitung relevant, um optimierte Bilddaten für die quantitative Analyse zu erzeugen. Insbesondere wies der Pearson'sche Korrelationskoeffizient eine hohe Sensitivität gegen Bildrauschen auf (Bolte und Cordelières 2006), welches mit Hilfe der in 3.1.3 angewandten Diffusions- bzw. bilateralen Filterung weitgehend entfernt werden konnte. Infolgedessen konnten die Werte genauer interpretiert werden. In der Tabelle 3 sind die resultierenden Koeffizientenwerte aufgelistet.

Um die Werte der Korrelationskoeffizienten vergleichbar zu machen, zu überprüfen und über ein weiteres Mittel für die quantitative Bestimmung von Kolokalisationen verfügen zu können, wurde eine alternative und im Vergleich zu den oben beschriebenen Verfahren andersartige Herangehensweise gewählt. Deren Grundlage ist die Neu-Interpretation der räumlichen Bilddaten mit Hilfe einer mathematischen Abbildung. Hierbei fungieren die Intensitäten meist zweier Bildkanäle $(f(i, j), g(i, j))$ als Definitionsbereich bzw. Koordinaten einer zweidimensionalen Funktion FL , die wie folgt formuliert werden kann:

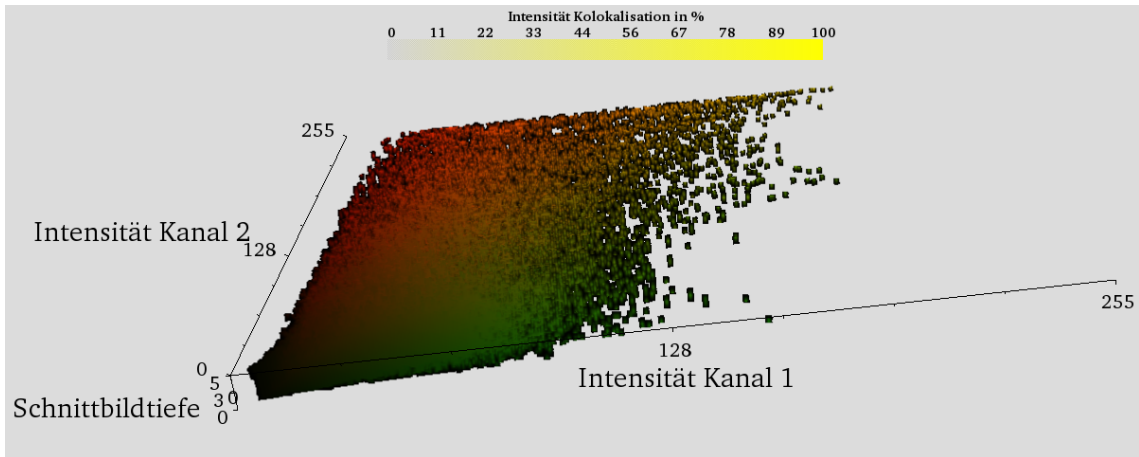
$$FL : (f(i, j), g(i, j)) \mapsto \begin{pmatrix} f(i, j) \\ g(i, j) \end{pmatrix}. \quad (42)$$

Gemäß (42) werden die Intensitäten/Tonwerte beider Kanäle an jeder Bildkoordinate auf das Tupel bzw. Komponentenpaar der Intensitäten abgebildet. Wird diese Zuordnung grafisch dargestellt, ergibt sich eine Art Punktwolke/Streudiagramm

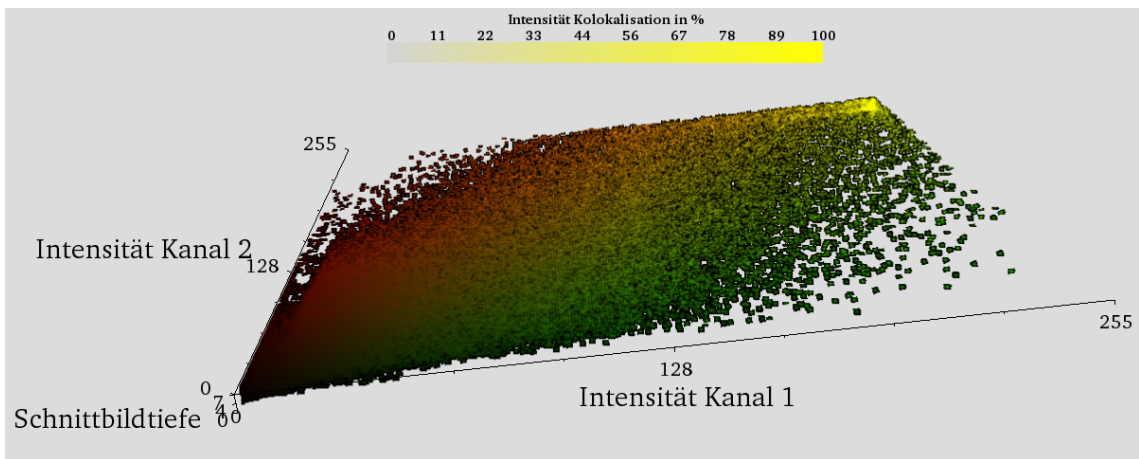
Tabelle 3: Resultierende Werte von Kolokalisationskoeffizienten erprobter Verfahren nach ihrer räumlichen Anwendung auf die drei selektierten Bildstapel „CerCD952min1“, „JYASM5min3“ und „JYASM5min4“: Insbesondere zeigten die relevanten, kanalunabhängigen Koeffizienten PK, MK für alle Bildstapel Kolokalisationsgrade von über 80 %, durch welche geschlussfolgert werden konnte, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit eine solch quantitativ hohe globale Kolokalisation in allen Bildstapeln vorlag.

Pearson'scher Korrelations- koeffizient PK	Manders'scher Überdeckungs- koeffizient MK	Überlagerungs- koeffizienten uek_1 uek_2		Kolokalisations- koeffizienten mk_1 mk_2	
CerCD952min1					
0,8250	0,8787	1,0532	0,7571	1,0000	1,0000
JYASM5min3					
0,8728	0,8133	1,1003	0,6016	1,0000	0,3987
JYASM5min4					
0,8539	0,8028	0,7670	0,9093	1,0000	0,2936

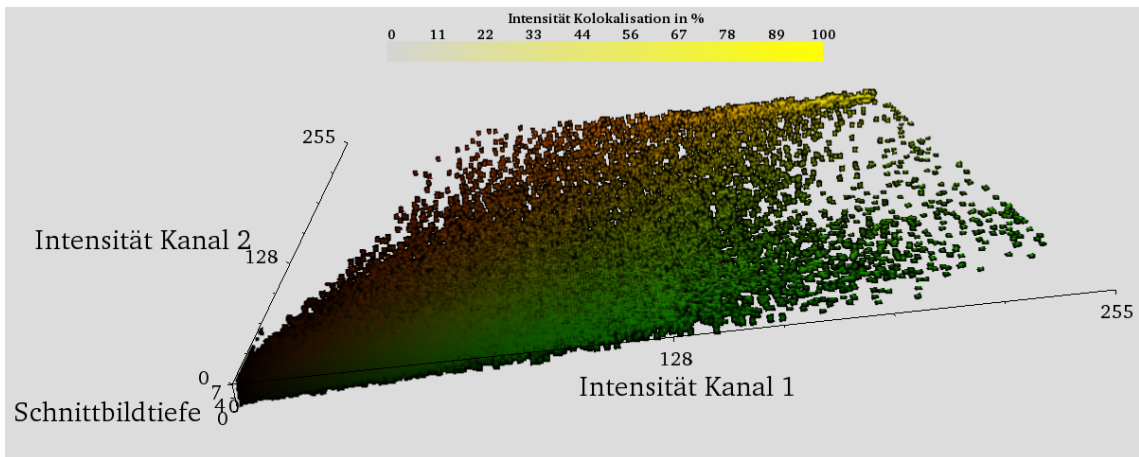
von Intensitätsparen, die über keine Bildkoordinaten-Informationen verfügen. Geeignete Farbwerttabellen ordnen dabei den Tonwerten Pseudo-Farben zu, welche den zur Bildakquise verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen entsprechen (McIntosh et al. 2003; Illenberger et al. 2003). Insbesondere in der Fluoreszenz-Mikroskopie wird eine solche grafische Darstellung Fluorogramm genannt und häufig genutzt, um u. a. Kolokalisationen direkt visuell identifizieren und abschätzen zu können. Hierbei werden üblicherweise solche Diagramme lediglich für ein Bildpaar an einer Schichtposition erstellt und visualisiert. Die Fluorogramme der für diese Arbeit ausgewählten Zellbildstapel wurden demgegenüber räumlich erzeugt und mit Hilfe eines spezialisierten Raycasting-Verfahrens als Volumenmodelle visualisiert, um eine räumliche interaktive, präzise Analyse der Diagramme zu ermöglichen (siehe Abbildung 21). Zur Volumenvisualisierung wurde die Klasse „vtkFixedPointVolumeRayCastMapper“ herangezogen, die als einzige in der VTK-Bibliothek Quellbilddaten mit mehreren



(a)



(b)



(c)

Abbildung 21: Räumliche Fluorogramme: Aus den drei selektierten Bildstapeln „CerCD952min1“, „JYASM5min3“ und „JYASM5min4“ wurden via spezialisiertes Raycasting räumliche Fluorogramme erzeugt (a)–(c). Insbesondere im oberen Fluorogrammquadranten von (b) und (c) sind hellgelbe Intensitäten zu erkennen, die im lokalen Bereich innerhalb des 3D-Modells auf hochgradige Kolokalisationen deuten.

Farbkomponenten verarbeiten konnte. Mit Hilfe einer Instanz dieser Klasse konnten über einen Index-Parameter der Memberfunktionen „SetScalarOpacity“ und „SetColor“, die entsprechenden Transferfunktionen für jede Komponente einzeln festgelegt werden. Dadurch ließ sich die räumliche Erzeugung der Fluorogramme elegant implementieren. Ferner wurde die Farb-Transferfunktion jeder Komponente als eine im Ursprung beginnende, lineare Funktion definiert, deren Steigung durch einen veränderbaren Schwellenwert bestimmt wurde. Die zugehörigen Opazität-Transferfunktionen hingegen wurden auf einen konstanten, jedoch interaktiv modifizierbaren Wert gesetzt, da die verwendete Klasse eine Farbmischung der Komponenten durch eine bestimmte Blending-Funktion (MIP) vorgab und umsetzte. Hierdurch wurden rote und grüne Intensitäten, welche jeweils nahezu den gleichen Abstand zu ihren Achsen aufwiesen, zu deutlichen gelben Bildpunkten zusammengefügt.

Neben der Detektion und qualitativen Abschätzung von Koloalisationen können Fluorogramme dazu dienen, verschiedene (unerwünschte) Bildeigenschaften oder ungünstige Intensitätsverteilungen der Bildkanäle aufzudecken. Hierzu gehören die Differenzierung des Hintergrundes sowie die Identifizierung inhomogener Intensitätsverläufe, des Bleaching-Effekts und fehlender Intensitäten auf Grund einer eingeschränkten Bildakquise (Demandolx und Davoust 1997). Die Abbildung 22 verdeutlicht einige dieser Bildmerkmale anhand mehrerer beispielhafter Fluorogramme verschiedener räumlicher Bilddaten. Diesbezüglich können schwache Intensitäten eines Punktpaares sehr dicht beieinanderliegen oder sich ideal zu gelben Bildpunkten mischen. Solche koloalisierten Punkte sind in einem verhältnismäßig kleinen Bereich insbesondere um den Ursprung des Fluorogramms zu beobachten (vgl. Abbildung 22(a)), und deuten in der Regel nicht auf koloalisierte Molekülverteilungen hin, sondern auf in beiden Bildkanälen vorkommende, gleiche Hintergrundintensitäten (Demandolx und Davoust 1997; Bolte und Cordelières 2006). Aus diesem Grunde sollte im Rahmen einer Bildvorverarbeitung dieses Bildrauschen durch ein Filter detektiert und unterdrückt bzw. weitgehend entfernt werden (Landmann und Marbet 2004). Ferner können Intensitäten für beide Kanäle inhomogen verteilt sein. In dem Fluorogramm drückt sich diese Verteilung in Punktwolken aus, die räumlich beschränkt sind und damit den verfügbaren Raum im Diagramm nicht vollständig

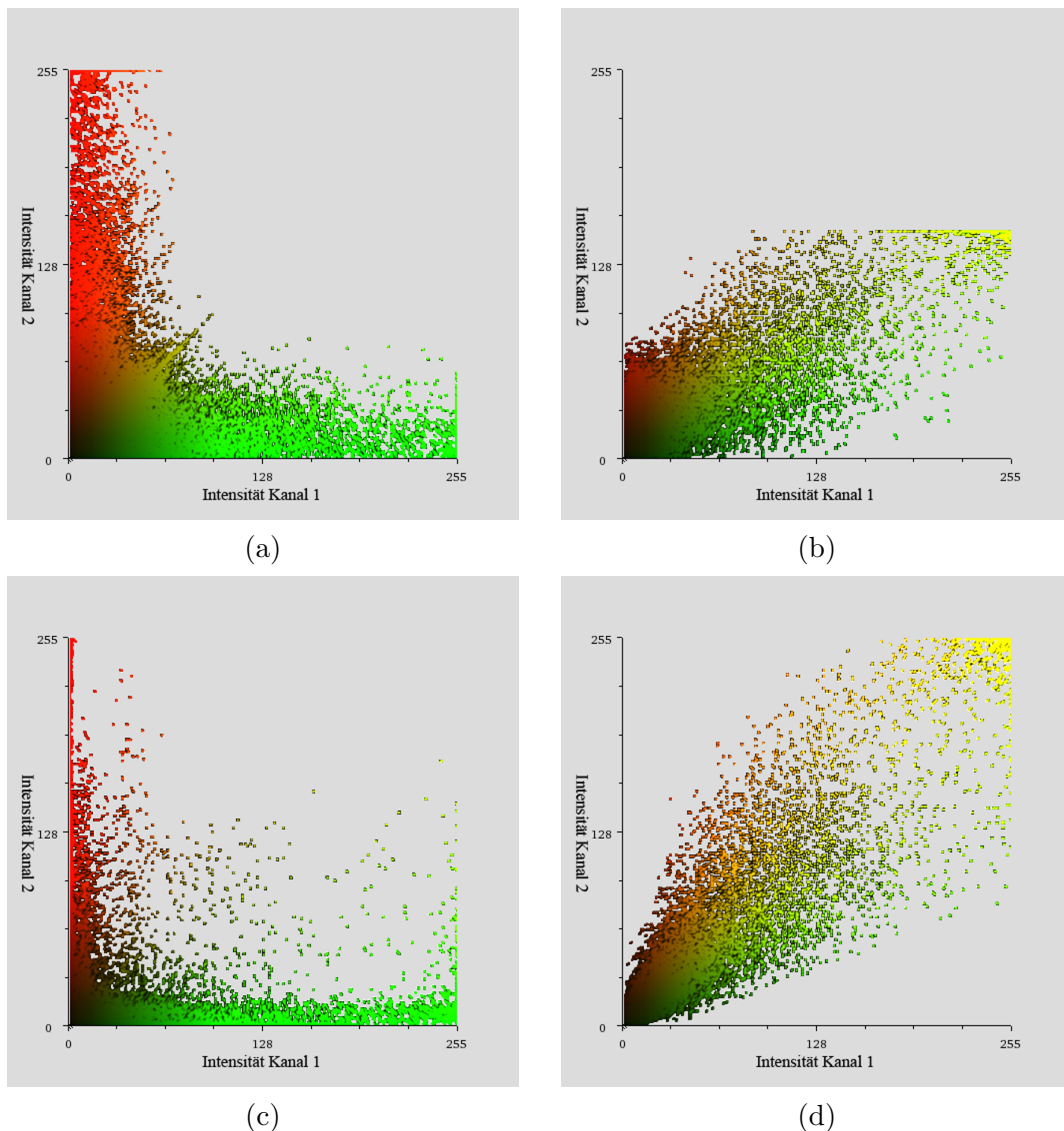


Abbildung 22: Exemplarische Fluorogramme zur Veranschaulichung unterschiedlicher Bildeigenschaften: (a) Die Aggregation niedriger, sich zu Gelb mischender Intensitäten im nahen Bereich des Ursprungs können auf gleiche Hintergrundintensitäten der Bildkanäle deuten. (b) Eine einseitige, räumlich beschränkte Intensitätsverteilung lässt vermuten, dass während des Prozesses der Bildakquise der Bleaching-Effekt aufgetreten ist. (c) Eine zweiseitige Tendenz der Intensitätsverteilung zu der entsprechenden Diagrammachse schließt in der Regel die Existenz signifikanter Kollokationen aus. (d) Eine homogene Verteilung der Intensitätspaare weist auf eine ideale Ausschöpfung des Intensitätsspektrums hin. Mittlere bis hohe gelbe Intensitäten zeigen hier hochgradige Kollokationen an.

einnehmen, und/oder die eine zu große räumliche, ein-/zweiseitige Tendenz zu der jeweiligen Diagrammachse aufweisen (vgl. 22(b)–(c)). Hierbei kann ein einseitiges Missverhältnis darauf hindeuten, dass im Prozess der Bildakquise ein Bleaching-Effekt stattgefunden hat (Bolte und Cordelières 2006; Pawley 2006), der ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe, z. B. auf Grund einer zu hoch eingestellten Laserleistung zur Probenabtastung, darstellt. In der Regel lassen sich solche einseitig abfallenden Intensitätsverläufe durch eine Skalierung der Intensitäten bei Kenntnis der Bleaching-Kurve kompensieren (Axelrod et al. 1976; Wu et al. 2008). Eine zweiseitige ungleichmäßige Verteilung lässt demgegenüber den Schluss zu, dass die Intensitäten beider Kanäle paarweise sehr stark differieren (22(c)). Daraus lässt sich ableiten, dass die Intensitäten nicht miteinander korrelieren und keine signifikanten Kollokationen von zellulären Bestandteilen im Bildmaterial existieren (Bolte und Cordelières 2006). Wie in den Fluorogrammen der ausgewählten Zellbildstapel zu erkennen ist (Abbildung 21 auf S. 80), können darüber hinaus Intensitätspaare gleichmäßig über das Spektrum verteilt sein (vgl. auch 22(d)). Zudem können mehrere mittlere bis hohe, zu Gelb gemischte Intensitäten festgestellt werden, die jeweils die annähernd gleichen Distanzen zu ihren Diagrammachsen (Abszisse und Ordinate) besitzen. Solche Intensitäten aggregieren an lokalen Stellen im Fluorogramm und sind von großem Interesse, da sie auf Kollokationen hindeuten. Hierbei korreliert nicht die Helligkeit des Gelbtönen, sondern dessen farbige Ausprägung mit dem Grad der Kollokation. Dadurch lässt sich in etwa die Stärke dieser räumlichen Korrelation abschätzen. Ihre Position innerhalb der zugehörigen Zellbildvisualisierung lässt sich indes nicht ohne zusätzliche Methoden bestimmen, da die im Fluorogramm gespeicherten Intensitäten koordinatenunabhängig sind.

Bei einer fiktiven Integration einer linearen Funktion mit der Steigung 1 in das Fluorogramm können die Abstände der Intensitäten zu dieser Referenzgerade bestimmt werden. Hierbei ist festzustellen, dass im Besonderen die Intensitätspunkte, aus denen sich Kollokationen ableiten lassen (wie oben erörtert), die kleinsten Abstände aufweisen. Aus dieser Beobachtung entstand die Idee eines neuartigen Ansatzes, um Kollokationen quantitativ zu bestimmen. Offenbar lagen die zu interessierenden Punkte in einer definierten räumlichen Umgebung um die Referenzgerade. Für das

Verfahren diene dieser Bereich als Kriterium, welches sich auf folgende Art und Weise mathematisch definieren ließ:

$$f(i, j) - g(i, j) \leq \varepsilon \text{ mit } \varepsilon > 0. \quad (43)$$

Aus der Bedingung, die Intensitäten $f(i, j)$ und $g(i, j)$ müssten sehr nahe an der gedachten Gerade mit der Steigung 1 liegen, wurde gefolgert, dass die Differenzen der Intensitäten 0 bzw. einen beliebig wählbaren, jedoch festen Wert ε nahe 0 annehmen müssten. Hieraus ergab sich die Gleichung (43), die jedoch für $g(i, j) > f(i, j)$ unerwünschte Intensitätspunkte bzw. Punkte berücksichtigte, die außerhalb der zu definierenden Umgebung lagen. Aus diesem Grunde musste die Gleichung durch eine Fallunterscheidung präziser formuliert werden. Es resultierte:

$$\begin{aligned} f(i, j) - g(i, j) \leq \varepsilon \text{ für } f(i, j) \geq g(i, j) \\ g(i, j) - f(i, j) \leq \varepsilon \text{ für } g(i, j) > f(i, j) \end{aligned}, \text{ und mit } \varepsilon > 0. \quad (44)$$

Der letzte Term dieser Fallunterscheidung (44) konnte zu $-(f(i, j) - g(i, j))$ umgeformt werden. Damit ergab sich folgende zusammengefasste, kurze Schreibweise für (44) mit der Definition eines Koeffizienten (Imhäuser et al. 2013):

$$AD_{f,g} := |f(i, j) - g(i, j)| \leq \varepsilon \text{ mit } \varepsilon > 0. \quad (45)$$

Nur die Intensitätspaare, die diese Bedingung (45) erfüllten, wurden gezählt und zu der Gesamtmenge ins Verhältnis gesetzt. Daraus konnte ein Kolokalisationsmaß gewonnen werden, welches auf Grund seiner mathematischen Definition (Betragsfunktion und Differenz) Absolut-Delta-Koeffizient genannt wurde. Hierbei konnte der Koeffizient Werte von 0 bis 1,0 annehmen, die sich auf ähnliche Weise wie jene der weiter oben beschriebenen Koeffizienten interpretieren ließen. Der für ε eingestellte Wert von 10 % der Fluorogrammgröße stellte sich während der Analyse als geeignet heraus, um alle sichtbaren, auf Kolokalisationen deutenden Intensitäten durch die ε -Umgebung zu erfassen. Da der Koeffizient hochgradig sensitiv gegen inhomogene Intensitätsverteilungen war, wurden durch Berechnungen die Intensitäten entsprechend skaliert, bevor sie dem Koeffizientenalgorithmus zugeführt wurden. Der entwickelte Koeffizient wurde mit Hilfe von Testdaten validiert. Hierfür wurden dieselben erzeugten Daten verwendet, welche für das Testen der Verfahren

Tabelle 4: Resultierende Werte des Absolut-Delta-Koeffizienten nach seiner räumlichen Anwendung auf die drei unterschiedlichen Testbilddatensätze zum Zwecke der Validierung. Hierzu wurden dieselben Testdaten verwendet, welche zur Überprüfung der Verfahren zur qualitativen Kolokalisationsbestimmung herangezogen wurden (vgl. Abbildungen 17–19 auf S. 69–71). In Ergänzung wurden zu diesen Datensätzen die anderen erörterten Kolokalisationskoeffizienten berechnet, deren resultierende Werte als Vergleichs-/Referenzwerte dienten. Von diesen wichen die Werte des Absolut-Delta-Koeffizienten insgesamt lediglich marginal ab.

Absolut-Delta-Koeffizient <i>AD</i>	Pearson'scher Korrelationskoeffizient <i>PK</i>	Manders'scher Überdeckungskoeffizient <i>MK</i>	Überlagerungskoeffizienten <i>uek₁ uek₂</i>		Kolokalisationskoeffizienten <i>mk₁ mk₂</i>	
Identische Bilddatensätze						
1,0000	1,0000	1,0000	1,0029	0,9971	1,0000	1,0000
Gegeneinander verschobene Bilddatensätze (um jeweils x/y = 15/10 <i>Pixel</i> verschoben)						
0,4958	0,3642	0,3872	0,3883	0,3860	0,9262	0,9367
Gegeneinander rotierte Bilddatensätze (um 23° im Uhrzeigersinn gedreht)						
0,6340	0,6825	0,6938	0,6958	0,6919	0,9566	0,9627

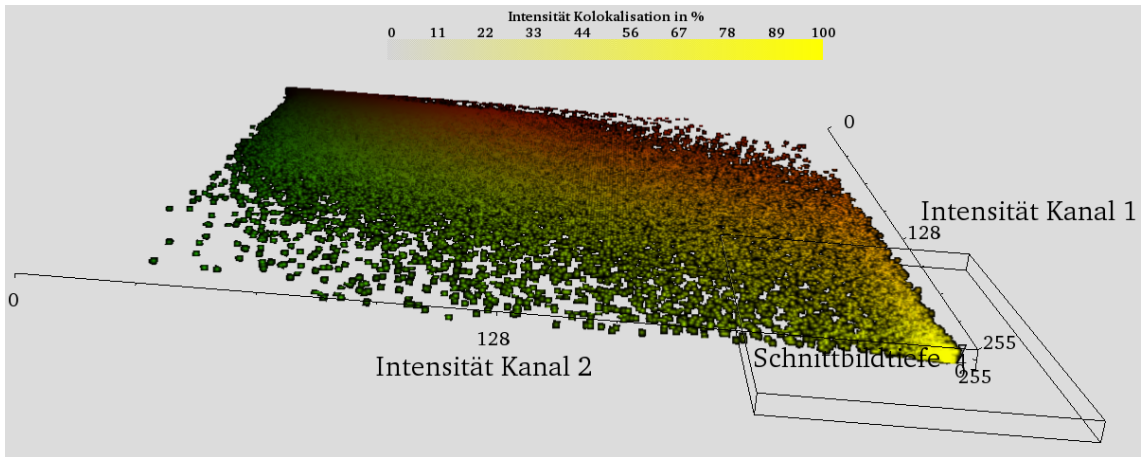
zur qualitativen Kolokalisationsbestimmung herangezogen wurden. Diesbezüglich wurden für beide Bildkanäle Sätze identischer, gegeneinander linear verschobener sowie rotierter Bilddaten basierend auf einem beispielhaft ausgewählten Zellbildstapel genutzt. Es wurden entsprechende Koeffizientenwerte erwartet, die sich mit den resultierenden verglichen ließen. Ergänzend dazu, wurden die Testdaten den Algorithmen der erprobten Kolokalisationskoeffizienten (Koeffizienten nach Pearson und Manders, siehe weiter oben) zugeführt, um anhand deren Ergebnisse die Werte des entwickelten Koeffizienten zusätzlich zu bewerten. Diesbezüglich konnten geringfügige, unbedeutende Unterschiede zwischen den Werten des Absolut-Delta- und der weiteren Koeffizienten festgestellt werden (vgl. Tabelle 4). Zudem entspra-

Tabelle 5: Resultierende Werte des Absolut-Delta-Koeffizienten nach seiner räumlichen Anwendung auf die drei ausgewählten Bildstapel „CerCD952min1“, „JYASM5min3“ und „JYASM5min4“, zusammen mit den Werten der Kolokalisationskoeffizienten aus Tabelle 3 (s. S. 79) in einer zusammengeführten Auflistung: Der Absolut-Delta-Koeffizient zeigte hier gegenüber dem Manders’schen Überdeckungskoeffizienten die geringsten Unterschiede. Dieses ließ auf ähnliche Charakteristika beider Koeffizienten schließen.

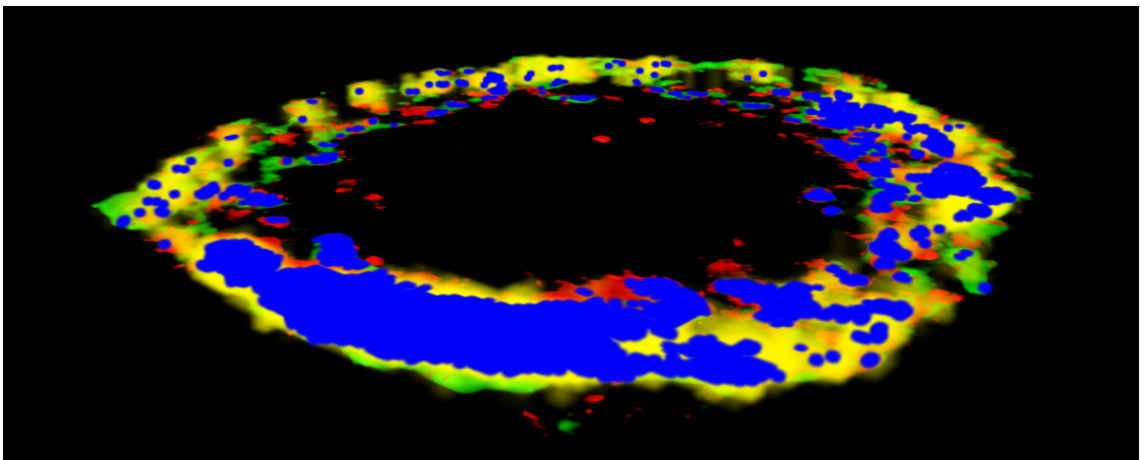
Absolut-Delta-Koeffizient <i>AD</i>	Pearson’scher Korrelationskoeffizient <i>PK</i>	Manders’scher Überdeckungskoeffizient <i>MK</i>	Überlagerungskoeffizienten		Kolokalisationskoeffizienten	
			<i>uek₁</i>	<i>uek₂</i>	<i>mk₁</i>	<i>mk₂</i>
CerCD952min1						
0,9207	0,8250	0,8787	1,0532	0,7571	1,0000	1,0000
JYASM5min3						
0,8277	0,8728	0,8133	1,1003	0,6016	1,0000	0,3987
JYASM5min4						
0,6619	0,8539	0,8028	0,7670	0,9093	1,0000	0,2936

chen die Werte den erwarteten. Hieraus konnte die Korrektheit des Koeffizienten und seines zugrunde liegenden Algorithmus im Wesentlichen gefolgert werden. Der Absolut-Delta-Koeffizient wurde anschließend für alle drei ausgewählten Zellbildstapel berechnet und zu den bereits kalkulierten Koeffizienten ergänzt.

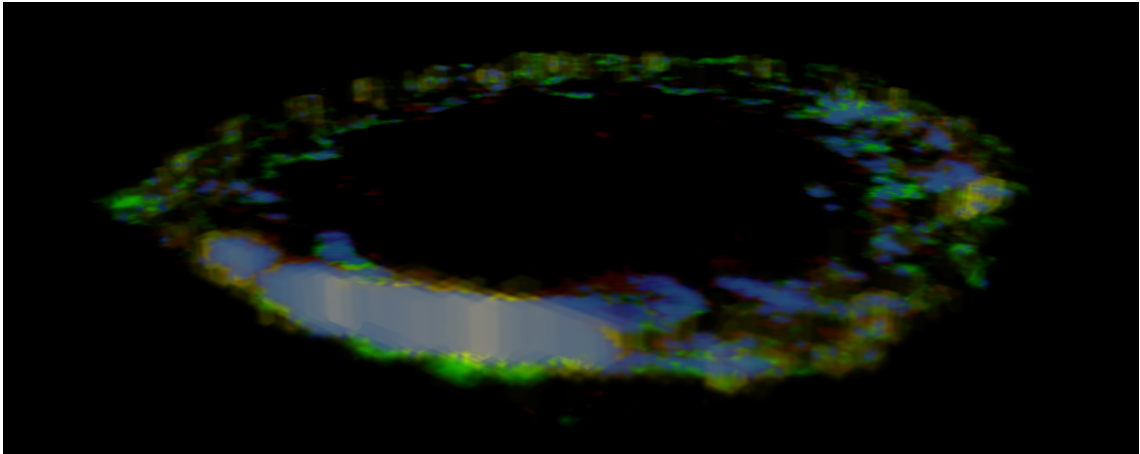
In der Tabelle 5 sind die aus der Auflistung 3 (siehe S. 79) übernommenen Werte und ergänzten Absolut-Delta-Koeffizientenwerte zusammengefasst. Anhand dieser Tabelle ist zu erkennen, dass der Absolut-Delta-Koeffizient für alle verwendeten Zellbildstapel ähnliche Werte wie die Referenzkoeffizienten erzeugt. Die geringsten Unterschiede zeigt er hierbei gegenüber dem Manders’schen Überdeckungskoeffizienten, wodurch geschlussfolgert werden kann, dass beide Koeffizienten gleiche Sensitivitäten gegen bestimmte Bildeigenschaften aufweisen und bez. der Interpretation ihrer Werte als äquivalent anzusehen sind. Der Nutzen des Absolut-Delta-Koeffizienten und die Bewertung der in Tabelle 5 aufgelisteten Werte werden in 4 erörtert.



(a)



(b)



(c)

Abbildung 23: 3D-Re-Assoziierung am Beispiel des Zellbildstapels „JYASM5min3“: Das 3D-Werkzeug erlaubte es, Werte (a) aus einer festgelegten ROI im Fluorogramm ins korrespondierende Raycasting-Modell zurück zu assoziieren, als blaufarbiges Volumenmodell zu visualisieren und (b) im Composite-Modell als blaue Markierungen oder (c) im MIP-Modell als bläulich-weiße Hotspots sichtbar zu machen.

Für die durchgeführte quantitative Kolokalisationsanalyse wurde als Teil der Applikation „Ceramide3D“ die separate Klasse „Cer3DQuantColocalization“ entwickelt, in welcher die interaktive Visualisierung der Fluorogramme, die Algorithmen und die grafische Darstellung aller oben beschriebenen Koeffizienten in Form von Kuchen- und Balkendiagrammen integriert wurden. Darüber hinaus wurde in die Programmkomponente ein weiteres 3D-Werkzeug implementiert, mit dessen Hilfe die innerhalb des Fluorogramms erkannten Kolokalisationen in dem zugrunde liegenden räumlichen Zellmodell sichtbar gemacht und lokalisiert werden konnten. Hierzu wurde in der Fluorogrammvisualisierung das Einblenden eines grafischen Quaders ermöglicht, dessen Position und räumliche Ausdehnung bestimmt werden konnten. Dadurch konnte in dem Fluorogramm eine räumliche ROI festgelegt werden, innerhalb deren Bereichs alle Intensitäten in das räumliche Zellmodell zurück assoziiert werden konnten. Diese Re-Assoziation wurde dergestalt umgesetzt, dass die durch die ROI vorgegebenen Intensitäten aus den Ursprungsbilddaten extrahiert und gesondert als räumliches Modell volumenvisualisiert wurden (vgl. Abbildung 23). Ähnlich der Visualisierung der qualitativen Kolokalisation wurde die Farb-Transferfunktion auf einen konstanten Blauwert, die Opazität-Transferfunktion auf einen linear ansteigenden Wert gesetzt, um eine Farbmischung mit weiteren visualisierten Zellstrukturen zu begünstigen. Die für die Farb-Transferfunktion verwendete Farbe Blau schuf die Möglichkeit, dass die an bestimmten räumlichen Bildbereichen lokalisierten, drei Farbinformationen (Ceramid = rot, CD95 = grün, Kolokalisation im Fluorogramm = blau) sich zu deutlich erkennbaren weißen Hotspots additiv mischen konnten. Diese hervorgehobenen Bildbereiche erlaubten einen unmittelbaren Rückschluss von relevanten Fluorogrammbereichen auf die Stärke der Kolokalisation. Durch dieses grafische Mittel konnte die Analyse unterstützt werden.

4 Diskussion

Heutzutage stehen moderne Techniken in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie zur Verfügung, um Zellproben in aufeinanderfolgenden Fokusebenen bildlich zu erfassen. Auf diese Weise lässt sich eine Serie von Schichtbildern in der Regel mit mehreren Bildkanälen gewinnen, in denen zelluläre Bestandteile anhand der durch Fluoreszenz emittierten Intensitäten erkannt und analysiert werden können. Anhand der örtlichen Verteilung dieser Intensitäten können in menschlichen Zellen ablaufende molekularbiologische Prozesse wie komplexe Protein-Protein-Wechselwirkungen oder die Formation von ceramidreichen Membranplattformen verfolgt werden. Insbesondere steht die räumliche Korrelation aggregierter Ceramid- und CD95-Moleküle innerhalb der Zellmembran im Fokus der vorliegenden Arbeit und zahlreicher Untersuchungen (Grassmé et al. 2001a; Grassmé et al. 2001b). Zumeist werden diese Kollokalisierungen in einem zweidimensionalen Overlay zweier Bildkanäle grafisch dargestellt. Eine dreidimensionale Visualisierung erlaubt es indes, diese Kollokalisierungen interaktiv zu analysieren und dadurch das Verständnis der funktionellen Eigenschaften der Zellmembran zu verbessern sowie bestehendes Wissen darüber zu vertiefen. Aus diesem Grund wurden Methoden genutzt, entwickelt und in eine eigene Computerapplikation implementiert, um dreidimensionale Visualisierungen von Ceramid- und CD95-Molekülkonzentrationen zu erstellen. Ferner wurden computergestützte Verfahren entwickelt, um die räumliche Kollokalisationsanalyse zu unterstützen.

Der Vorverarbeitung des Bildmaterials kam eine große Relevanz zu. Die Bilder wiesen zwischen ihren Kanälen divergente Intensitätsspektren auf, welche die entsprechenden Histogramme bestätigten. Besonders die Ceramid-Bilder zeigten niedrige Intensitäten, die im Durchschnitt lediglich die Hälfte des maximal verfügbaren Intensitätsraumes einnahmen. Daher wurden mit Hilfe einer Methode zur Kontrastverbesserung die Bildpunktintensitäten auf das größtmögliche Spektrum linear transformiert. Auf diese Weise konnten die differenten Intensitätsverteilungen einander angeglichen werden. Diese Angleichung verbesserte nicht nur maßgeblich die optische Differenzierung der Ceramid-Intensitäten, sondern war insbesondere für die

Korrektheit der später durchgeführten Kollokalisationsanalyse eine wichtige, von Fachkreisen postulierte Bedingung (Bolte und Cordelières 2006; Wu et al. 2008). Ebenso waren alle Bilder verrauscht. Dieses Rauschen trat in Form einzelner Bildpunkte auf, die sich nicht nur auf lokale Bereiche beschränkten, sondern global im Bild verteilt lagen. Diese Bildstörungen können in einer zu hoch eingestellten Sensorempfindlichkeit und/oder der Eigenfluoreszenz der in den Antikörpern enthaltenen Farbstoffen begründet liegen. In der Regel kann ein natürliches Verrauschen während der Bildakquise nicht ganz vermieden werden (Bolte und Cordelières 2006). Daher wurden nachträglich Bildanalyse-Filter angewandt. Hierbei lag die Herausforderung in der Wahl und Anwendung eines geeigneten Filters, um Hintergrundrauschen und Intensitätsspitzen weitgehend zu entfernen bzw. abzuschwächen, jedoch die meist in der Umgebung von Objektkanten vorkommenden oder von Rändern umschlossenen, feinen, granulären Bildstrukturen (wie Zellmembran und Zellinnern) durch Regulierung der Filterstärke nahezu unverändert zu lassen. Für diesen Zweck wurde eine spezielle Form eines anisotropen Diffusionsfilters der Klasse „CurvatureAnisotropicDiffusionFilter“ eingesetzt. Dieser Filter nutzt im Gegensatz zum „GradientAnisotropicDiffusionFilter“ statt Gradienten die in 2.3.2 beschriebene MCDE, um Kanten im Bild zu detektieren und die Glättungsstärke innerhalb des Filterfensters entsprechend zu variieren. Dadurch war das Diffusionsfilter im direkten Vergleich zur gradientenbasierten Variante bei ähnlichen Filtereigenschaften und -ergebnissen performanter hinsichtlich der Ausführungsgeschwindigkeit.

Zur zusätzlichen vergleichenden Betrachtung wurde das Bilateralfilter angewandt. Hier zeigte sich, dass die bilaterale Filterung, ähnlich wie die Diffusionsfilterung, homogene Bildbereiche mit wenigen Intensitätsspitzen glättete, bildliche Strukturen an Kanten jedoch weitgehend erhielt. Angewandt auf das verfügbare Bildmaterial, wurden hierbei die Bildstörungen (wie Rauschen) erkennbar abgeschwächt, während die Zellränder im Vergleich zur Diffusionsfilterung unerwartet, deutlich weniger geglättet wurden. Da das Bilateralfilter für den Glättungsprozess von Gauss'schen Faltungskernen Gebrauch machte, war das Filtern sehr rechenintensiv und insbesondere bei räumlicher Anwendung auf die Bilddaten mit einer sehr hohen Verarbeitungsdauer verbunden. Diesbezüglich gelang es, durch eine Code-Modifikation im Quelltext des

Filters die Ausführungsgeschwindigkeit um das Mehrfache zu steigern, bei für die Analyse unbedeutenden Qualitätseinbußen im Filterresultat. Für ähnliche Bildresultate aus der Diffusionsfilterung war die bilaterale Filterung überdies insgesamt performanter. Auf Grund dieser Vorteile wurde ausschließlich das Bilateralfilter für den weiteren Verlauf der Bildvorverarbeitung und -analyse herangezogen.

Trotz der modernen softwaretechnischen Möglichkeiten zur nachträglichen Aufbereitung bzw. Korrektur von Bilddaten sollte indes geprüft werden, ob vor und während der Bildakquise die Parameter zur Bildregistrierung optimiert werden können, um die für eine Analyse ungünstigen Bildeigenschaften (wie Kontrastarmut, Rauschen, Bleaching-Effekt) bereits vor der Weiterverarbeitung weitgehend zu vermeiden (Zucker 2006a; Zucker 2006b; Bolte und Cordelières 2006). Ferner könnten für an die vorliegende Arbeit anknüpfende Untersuchungen andere, modernere Mikroskopieverfahren wie FRAP (Abkürzung für Fluorescence Recovery after Photobleaching), Multiphotonen- oder STED-Mikroskopie (STED steht für Stimulated Emission Depletion) nach Verfügbarkeit in Betracht gezogen werden, um die Qualität der Bilddaten zu verbessern (Hell und Wichmann 1994) und auf diese Weise auf Methoden zur Bildvorverarbeitung ggf. gänzlich zu verzichten. Denn es sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass durch die Glättung des angewandten Filters zur Rauschunterdrückung auch wenige Bildinformationen verloren gehen können, die für die Analyse relevant sind (Zinchuk et al. 2007).

Im nächsten Schritt wurden die optimierten Bilddaten den räumlichen Visualisierungsverfahren zugeführt. Die ausgewählten Bildstapel fielen hierbei jeweils durch ihre relativ geringe Schichtbildanzahl auf (sechs und acht Schichten), die darin begründet war, dass die digitale Erfassung der Zellproben mit Laserlicht durch das rasche Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt bzw. beschränkt wurde (Wu et al. 2008). Wie in 2.2 erörtert, musste zur Bildakquise die Abtastfrequenz derart eingestellt werden, dass mit ihr alle relevanten molekularbiologischen Strukturen erfasst wurden (vgl. Nyquist-Theorem in 2.2), axial die höchstmögliche Auflösung erreicht und der Effekt des vorzeitigen Ausbleichens der Fluoreszenzfarbstoffe weitgehend vermieden wurde. Dieser sogenannte Bleaching-Effekt (oder auch Photobleaching) tritt im Besonderen auf, wenn der spezifische Fluorophor zu lange und/oder mit

einer zu hohen Energie des Anregungslasers bestrahlt bzw. abgetastet wird. Insbesondere in der für das vorliegende Bildmaterial angewandten, gewöhnlichen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie kann der Effekt zu unerwünschten Bild-Artefakten führen, welche die weiterführende Analyse erschweren oder sogar zunichtemachen können (Song et al. 1995; Wu et al. 2008). Bei anderen modernen Mikroskopieverfahren wie FRAP wird hingegen die Ausbleichdauer des Fluorophors genutzt, um die korrelierte Stoffkonzentration zu messen und diese auf einen Intensitätswert digital abzubilden.

Die geringe Anzahl der verfügbaren Schichtbilder war jedoch für den Visualisierungsschritt ohne Bedeutung, da die verwendeten Visualisierungstechniken intern über spezialisierte Interpolationsmethoden verfügten (meist trilineare Interpolation) und diese nach Bedarf ausführten, um u. a. eine ausreichende axiale Auflösung zu gewährleisten (Elvins 1992; Kaufman und Mueller 2004). Um die Verfahren hinsichtlich ihrer Visualisierungsqualität vergleichen zu können und ihre für die Analyse eventuellen ungünstigen Merkmale gegeneinander auszugleichen (Elvins 1992; Razdan et al. 2001), wurden mehrere Rekonstruktionsalgorithmen genutzt. Im Ergebnis hatten alle drei eingesetzten Visualisierungsverfahren ihren jeweiligen Nutzen, und ihre Anwendung richtete sich nach dem Zweck der Analyse. Mit Hilfe des Raycastings ließen sich diesbezüglich räumliche Modelle in der besten Qualität erzeugen (nahezu Raytracing-Qualität). Da das Verfahren sehr rechenintensiv war und u. a. Oversampling nutzte, um eine hohe Darstellungsauflösung zu erreichen (Lauer et al. 2004; Suwelack et al. 2010), war die Bereitstellungsdauer der 3D-Szene hoch und die Interaktivität entsprechend zeitverzögert. Durch die temporäre Verminderung der einstellbaren Detailgüte konnte die Neuerzeugung der Visualisierung während der Interaktionen beschleunigt werden. Eine präzise Analyse war hierbei jedoch durch die niedrige Detailstufe nahezu unmöglich. Hierfür waren räumliche Modelle, erzeugt durch das Texturemapping-Verfahren, geeigneter. Insbesondere das 3D-Texturemapping erlaubte vergleichsweise ein verzögerungsfreies Interagieren, da die rechenintensiven Software-Routinen des Verfahrens auf die Grafik-Hardware ausgelagert und damit parallel sowie beschleunigt ausgeführt werden konnten. Jedoch waren in den erzeugten Modellen störende Verzerrungen in Form von linienartigen Strukturen zu

beobachten, deren Ausprägung mit spezifischen Blickwinkeln auf die 3D-Szene korrelierte. Im zweidimensionalen Texturemapping konnten mehr dieser Bildstörungen festgestellt werden, die sich in beiden Verfahren durch Verändern der Blickrichtung nicht maßgeblich reduzieren ließen. Eine direkte Regulierung der Detailstufe war nicht möglich. Erst mit Hilfe der softwaretechnischen Umsetzung zum Verkleinern des räumlichen Bildpunktabstands konnten die Bild-Artefakte sichtbar vermindert werden. Diese Einstellung führte demgegenüber dazu, dass die 3D-Modelle wesentlich mehr Ressourcen und Speicher in Anspruch nahmen. Auch die mit Raycasting erstellten Visualisierungen profitierten von der Erhöhung der räumlichen Auflösung. Die granulären Zellstrukturen konnten noch detaillierter dargestellt werden. Die Interaktivität der Modelle wurde jedoch zusätzlich eingeschränkt.

Die Ursache für die beobachtbaren Bildstörungen ist dem jeweiligen Verfahren als solchem geschuldet. Sowohl das zweidimensionale als auch dreidimensionale Texturemapping erzeugen das räumliche Abbild durch Projizieren bzw. Schneiden des zugrunde liegenden Volumendatensatzes senkrecht zur momentanen Blickrichtung (vgl. 2.4.2). Dieser Schritt geschieht nahezu ohne Berechnung und damit frei von eventuellen Verzerrungen, falls die Blickrichtung genau parallel zu der Reihenfolge verläuft, in welcher die Schichtbilder initial eingelesen wurden. Andere Blickwinkel hingegen veranlassen den entsprechenden Algorithmus zur Textur-Projektion bzw. Erzeugung künstlicher Bildschichten durch Interpolation. Hierbei führt der jeweilige Algorithmenschritt zu einer lediglich angenäherten und damit ungenauen räumlichen Wiedergabe der erzeugten Schichten (Rezk-Salama et al. 2000). Aus dieser Ungenauigkeit resultieren die sichtbaren linienartigen Bild-Verzerrungen.

Für die Visualisierungen mit Hilfe der beiden genannten Volumerendering-Methoden mussten geeignete Farb- und Opazität-Transferfunktionen in Kombination mit einer adäquaten Blending-Funktion gefunden und festgelegt werden, um Farbtransparenzen zu ermöglichen und damit für die später erfolgte Kolokalisationsanalyse erste kolokalisierte Bereiche der Modelle von Ceramid- und CD95-Konzentrationen darstellen zu können. Bei den gewonnenen Oberflächenmodellen hingegen gestaltete sich die Darstellung als Overlay einfacher, da die Farbüberlagerung durch die Möglichkeit der direkten Transparenzmachung der Objektfarbe des Ceramid- und CD95-

Modells umgesetzt werden konnte. Algorithmisch bedingt, erlaubten diese Modelle keine Untersuchung der Intensitätsverteilungen und ließen keine Rückschlüsse auf die verschiedenen Konzentrationen von Ceramid und CD95 zu. Die Oberflächenrekonstruktion diente dazu, die räumlichen Ausdehnungen der Ceramid- und CD95-Aggregationen sowie deren Kolokalisationen untersuchen und abschätzen zu können, und verstand sich im Ergebnis als ergänzendes Mittel zur Analyse der Volumenvisualisierung.

Für alle räumlichen Modelle wurde eine stereoskopische Visualisierung in Erwägung gezogen. Diese Möglichkeit wurde nicht genutzt, da durch sie ein signifikanter Nutzen insbesondere im Hinblick auf die im Fokus gelegene, qualitative sowie quantitative Kolokalisationsbestimmung nicht erwartet wurde.

Wie erwähnt und begründet, waren die durchgeführten Methoden zur Bildvorverarbeitung essenziell für eine aussagekräftige, korrekte Kolokalisationsanalyse. Aus den ausgewählten Bildstapeln konnten insbesondere mit Hilfe des Volumerendings räumliche Modelle erzeugt werden, in denen die granulären Bildbereiche (Intensitäten) wichtige Rückschlüsse auf die lokalen Konzentrationen der zugehörigen Zellkomponenten (Ceramid und CD95) gaben. Die Kolokalisationen beider Moleküle konnten räumlich visualisiert werden, indem eine additive Farbmischung durch Transparenzmachung der übereinanderliegenden Modelle (Overlay) ermöglicht wurde. Hierbei erhöhte eine in die Bildvorverarbeitung integrierte logarithmische Skalierung den beobachtbaren Grad der Kolokalisation. Da durch diese Methode die hohen Intensitäten angehoben wurden, die typischerweise mit hohen Molekülkonzentrationen korrelieren, konnte die Darstellung von Hotspots kolokalisierter Bereiche verbessert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch die logarithmische Skalierung nicht evaluiert werden. Wie in 3.1.2 erläutert, ist ein nicht linearer bzw. exponentieller Zusammenhang zwischen registrierter Intensität und realer Molekülkonzentration auf Grund der Kopplung sekundärer Antikörper denkbar. Solche unerwünschten Bindungen sind bekannt und konnten im Prozess der Präparation der Zellen zur Bildakquise nicht vollständig unterbunden werden (vgl. 2.1). Ebenso hypothetisch war ein nicht linear verlaufendes Detektionsprofil des in der Kamera verbauten Sensors (Wu et al. 2008; Pawley 2006). Da die beschriebenen Annahmen

durch fehlende Messungen nicht bestätigt werden konnten, konnte die Grundlage der logarithmischen Skalierung nicht eindeutig geklärt werden. Diese Bildverarbeitungsmethode hatte daher einen theoretischen Nutzen und wurde als optionales Mittel zur Bildkorrektur verwendet.

Unterstützt wurde die Kolokalisationsanalyse von den in 3.3.1 evaluierten qualitativen Methoden dadurch, dass sie die räumlichen Korrelationen der Moleküle hervorhoben und damit die Abschätzung der Position und Grad der Kolokalisationen vereinfachten. Ergänzt wurde diese Bestimmung durch die räumliche Darstellung der berechneten KKF, aus deren Werte jedoch kein genaues Kolokalisationsmaß im lokalen Bereich abgeleitet werden konnte (vgl. 3.3.1). Für die quantitative Analyse wurden die Standardverfahren (Koeffizienten nach Pearson und Manders; Überlagerungskoeffizienten) erweitert und räumlich angewandt, um die Kolokalisationen eines gesamten Bildstapels zu quantifizieren. In Ergänzung dessen boten die räumlichen Fluorogramme, als Volumenmodelle visualisiert, einen unmittelbaren Überblick über den Kolokalisationsgrad und über diverse Eigenschaften (Rauschen, Bleaching-Effekt etc.) des zugrunde liegenden Bildmaterials. Diesbezüglich wurde ein Verfahren entwickelt, welches die vom Benutzer durchgeführte Interpretation des Fluorogramms zur Kolokalisationsbestimmung partiell automatisierte. Zu diesem Zweck konnte ein alternativer Kolokalisationskoeffizient formuliert und evaluiert werden, welcher ähnlich dem Manders'schen Überdeckungskoeffizienten invariant gegenüber unterschiedlichen Intensitätsverteilungen der Bilder war.

Hinsichtlich einer molekularbiologischen Bewertung zeigten die räumlichen Modelle aus allen ausgewählten Bildstapeln ringförmig angeordnete Aggregationen bzw. Formationen von Ceramid- und CD95-Molekülen. Insbesondere im Randbereich dieser beobachtbaren Struktur, welche der Oberfläche der Zellmembran zuzuordnen war, konnten hohe und/oder deutlich gelbe Intensitäten festgestellt werden. Die räumlichen Farbüberlagerungen deuteten auf molekulare Kolokalisationen hin, die qualitativ wie quantitativ bestimmt wurden. Für jeden der ausgewählten Bildstapel ließen hierbei die in 3.3.2 berechneten Koeffizientenwerte (siehe Tabelle 5 auf S. 86) auf eine hohe globale Kolokalisation des Ceramids und der CD95-Rezeptormoleküle schließen. Zudem konnten Kolokalisationen im jeweiligen oberen Fluorogrammbe-

reich festgestellt werden, durch dessen Selektion und Re-Assoziierung Hotspots kolokalisierter Bereiche im 3D-Modell sichtbar wurden. Diese hochgradigen Kolokalisationen und die hohen Koeffizientenwerte deuteten darauf hin, dass beide Moleküle in hoher Konzentration sehr dicht beieinanderlagen. Dieses wies darauf hin, dass insbesondere das Ceramid nicht nur als struktureller zellulärer Bestandteil anzusehen war/ist, sondern offenbar aktiv am molekularbiologischen Prozess des CD95-Clusterings involviert war/ist. Zahlreiche Untersuchungen legten diesbezüglich die Vermutung nahe und konnten experimentell zeigen, dass viele Rezeptoren in sphingolipidreichen Mikrodomänen aggregieren (Simons und Ikonen 1997; Maxfield und Mayor 1997; Anderson 1993; Grassmé et al. 2001a; Grassmé et al. 2001b). Dieses Spezifikum konnte besonders durch die mit Hilfe des Volumerendings erzeugten räumlichen Modelle der Zellbildstapel zum ersten Mal für den verwendeten Zelltyp visuell bestätigt werden. Ferner konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass durch Unterbrechung des zellulären Cholesterin-Stoffwechsels (beispielsweise durch Filipin oder Nystatin) oder durch Neutralisation des extrazellulär orientierten Ceramids (u. a. mit Anti-Ceramid-Antikörper 15B4) es zu einer Auflösung der sphingolipidreichen Domänen kommt und damit zu einem Abbruch des CD95-Clusterings (Grassmé et al. 2001a). Demnach nimmt Ceramid eine entscheidende Rolle in der CD95-Signaltransduktion ein (Grassmé et al. 2001a). Da es sich bei der Aggregation von Rezeptoren in ceramidreichen Membranen um einen generellen zellulären Mechanismus handelt, spielt Ceramid bei sehr vielen (patho)physiologischen Prozessen, wie z. B. bei Zelltod, Zelldifferenzierung, Migration und auch bei Infektion mit pathogenen Bakterien und Viren, eine bedeutsame Rolle (Cremesti et al. 2001; Dumitru und Gulbins 2006; Bieberich 2011; Grassmé et al. 2008; Grassmé et al. 2003; Grassmé et al. 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die stabile Software „Ceramide3D“ entwickelt werden, mit deren Hilfe sich Kolokalisationen räumlich visualisieren ließen und deren Analyse unterstützt werden konnte. Durch den Einsatz von quelloffenen Software-Bibliotheken war es möglich, validierte Bildverarbeitungsalgorithmen anzupassen und zu erweitern, um die spezifischen Eigenschaften des zugrunde liegenden Bildmaterials zu berücksichtigen. Hierunter fiel die Optimierung diverser

Filter zur Bildvorverarbeitung, jedoch im Besonderen auch die automatisierte Verarbeitung erzeugter Akquisedaten. Im Vergleich zu am Markt erhältlichen Software-Lösungen (vgl. „Volocity“, „Colocalization Analyzer“, „BioImageXD“) war die Applikation im Stande, die von der Mikroskop-Software (der Firma Leica) abgespeicherten Mikroskopie-Parameter, wie Schichtbildabstand oder physikalische Größen, automatisch auszulesen und in die 3D-Rekonstruktion einfließen zu lassen. Auf diese Weise war die maßstabsgetreue Darstellung und die korrekte Relation von axialer und lateraler Ausdehnung der erzeugten räumlichen Modelle gewahrt. In vergleichbaren Applikationen muss hierfür der Schichtbildabstand sowie die physikalischen Größen manuell eingepflegt werden. Ferner konnten adäquate Filter zur Bildvorverarbeitung angepasst und geeignet verkettet werden, um die räumlichen Ergebnisse zu optimieren. Insbesondere die Optimierung und Parameteranpassung komplexer Filter zur Rauschunterdrückung (Bilateralfilter) ermöglichte eine performante räumliche Filteranwendung. Solche Modifikationen waren bei vergleichbaren proprietären, zumeist kommerziellen Software-Lösungen nicht möglich. Bei quelloffener und frei erhältlicher Software wie „ImageJ“ mit zusätzlichen Plugins (z. B. „JACoP“) wären diese Anpassungen nur sehr eingeschränkt oder mit einem softwaretechnischen Aufwand verbunden gewesen, welcher dem der Eigenentwicklung geglichen, wenn nicht diesen überstiegen hätte. Ferner ermöglichte die Nutzung und Anpassung validierter Methoden aus der VTK-Bibliothek die performante Erzeugung und Interaktivität hochauflösender räumlicher Visualisierungen. Die hohe Programmleistung, insbesondere im 3D-Bereich, konnte im direkten Vergleich „ImageJ“ nicht erbringen, da die Java-Applikation zugunsten ihrer Plattformunabhängigkeit hardwarenahe Grafikroutinen nicht nutzen konnte. Demgegenüber muss der Quellcode von „Ceramide3D“ für jede Betriebssystemplattform kompiliert werden, um die Applikation für gängige Betriebssysteme (Windows, Linux-Derivate, Mac OS) bereitzustellen. Die Möglichkeit zur Beschleunigung rechenintensiver Visualisierungstechniken (wie Raycasting) durch Auslagerung der Grafikroutinen auf die GPU wurde nicht implementiert, und hätte diesbezüglich den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt. Darüber hinaus erlaubte die Eigenentwicklung räumliche Fluorogramme und die Re-Assoziierung von Fluorogrammbereichen zur verbesserten Analyse. Diese Methoden boten die

zum Zeitpunkt der Entwicklung recherchierten, verglichenen Applikationen nicht. Gleichwohl weist „Ceramide3D“ im Vergleich zu anderer Software diverse Einschränkungen auf. Auf Grund der Anpassungen der erwähnten Bildverarbeitungsalgorithmen ist die Applikation auf molekularbiologisches Bildmaterial bzw. durch Laser-Scanning-Mikroskopie gewonnenen Daten spezialisiert und entsprechend auf die von der Mikroskop-Software vorgegebene Datenstruktur beschränkt. Die Applikation unterstützt lediglich wenige Grafikformate und zwei Bildkanäle in den jeweiligen rigiden Fluoreszenzfarben. Hingegen ist die Applikation nicht derart konzipiert, um sich ausschließlich auf die Analyse von CD95- und Ceramid-Verteilungen zu beschränken. Das Computerprogramm kann ebenso für Untersuchungen beliebiger anderer zellulärer, durch Fluoreszenz erfasster Bestandteile (z. B. Rab5-Proteine, CD40 etc.) herangezogen werden. Die Darstellung von mehr als zwei verschiedenen Komponenten ist hingegen nicht möglich. Andererseits ist „Ceramide3D“ durch die Nutzung quelloffener Bibliotheken und Bereitstellung des Quellcodes selbst offen und damit beliebig funktionell erweiterbar.

Auch mit Blick auf weiterführende Arbeiten stellen die hier entwickelten neuartigen und erweiterten Methoden zur räumlichen Kolo-kalisation ein sinnvolles Bildanalyse-Werkzeug dar, welches einen relevanten methodischen Beitrag zum Verständnis molekularbiologischer Prozesse in lebenden Zellen leisten kann.

5 Zusammenfassung

Das Clustering von Rezeptor- und Signal-Molekülen (wie CD95 oder CD40) innerhalb ceramidreicher Membran-Domänen führt zu sehr hohen Dichten dieser Proteine. Hierdurch werden die Aktivierung entsprechender Enzyme, der Ausschluss hemmender Moleküle und/oder die Gewinnung weiterer Signal-Moleküle erleichtert, um das entsprechende Signal des Rezeptors in die Zellen zu übertragen. Bis heute sind die Mechanismen des Rezeptor-Clusterings nicht entschlüsselt und die genaue Verteilung von Proteinen innerhalb ceramidreicher Domänen unbekannt. Daher wurden unter Zuhilfenahme eines Laser-Scanning-Mikroskops Schichtbilder aus Zellproben von JY-Zellen erzeugt, die mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten anti-Ceramid- und Cy3-markierten anti-CD95-Antikörpern gefärbt waren. Aus dem Bildmaterial konnten nach der Bildvorverarbeitung mittels geeigneter Filter zur Kontrastverbesserung und Rauschunterdrückung räumliche Modelle mit Hilfe angepasster Verfahren des Volumerendings und der Oberflächenrekonstruktion generiert werden. Die erzeugten interaktiven Visualisierungen unterstützten die räumliche Analyse, und es konnte für den verwendeten Zelltyp (JY-Zellen) eine räumliche Darstellung der Ceramid- und CD95-Verteilungen sowie deren Kolokalisationen erstmals gezeigt werden. Durch erweiterte und eigens entwickelte, evaluierte Methoden (Produktintensität, Binärisierung) sowie die räumliche Anwendung der Kreuzkovarianzfunktion (KKF) konnte die Bestimmung des qualitativen Kolokalisationsgrades vereinfacht werden. Ferner konnten räumliche Fluorogramme erzeugt werden, aus denen ein neuartiges, alternatives Verfahren (Absolut-Delta-Koeffizient) zu den ebenso räumlich angewandten Standardverfahren zur quantitativen Kolokalisationsbestimmung abgeleitet wurde. Die resultierenden Werte der Kolokalisationsanalyse bestätigten das bedeutsame Mitwirken des Ceramids an dem CD95-Clustering. Insgesamt verbesserte die eigens entwickelte Software das Verständnis über den Prozess des CD95-Clusterings, und wurde generisch konzipiert, um für weiterführende Arbeiten eingesetzt werden zu können.

Literaturverzeichnis

- 1 Agnati, L. F., Fuxe, K., Torvinen, M., Genedani, S., Franco, R., Watson, S., Nussdorfer, G. G., Leo, G., Guidolin, D. (2005): New Methods to Evaluate Colocalization of Fluorophores in Immunocytochemical Preparations as Exemplified by a Study on A2A and D2 Receptors in Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 941–953.
- 2 Amos, W. B., McConnell, G., Wilson, T. (2011): Confocal Microscopy. *In*: Egelman, E. H. (Hrsg.): *Handbook of Comprehensive Biophysics* Vol. 2; S. 3–23. Amsterdam: Elsevier.
- 3 Anderson, R. G. (1993): Caveolae: Where incoming and outgoing messengers meet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10909–10913.
- 4 Arndt-Jovin, D. J., Robert-Nicoud, M., Kaufman, S. J., Jovin, T. M. (1985): Fluorescence digital imaging microscopy in cell biology. *Science.* 230, 247–256.
- 5 Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., Webb, W. W. (1976): Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* 16, 1055–1069.
- 6 Becker, P. L. (1996): Quantitative Fluorescence Measurements. *In*: Wang, X. F., Herman, B. (Hrsg.): *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy*; S. 109–118. New York: John Wiley & Sons.
- 7 Bieberich, E. (2011): Ceramide in Stem Cell Differentiation and Embryo Development: Novel Functions of a Topological Cell-Signaling Lipid and the Concept of Ceramide Compartments. *J. Lipids.* 2011, Article ID 610306.
- 8 Bielawska, A., Linaudic, C. M., Hannun, Y. A. (1992): Modulation of cell growth and differentiation by ceramide. *FEBS Lett.* 307, 211–214.
- 9 Bock, J., Szabó, I., Gamper, N., Adams, C., Gulbins, E. (2003): Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 890–897.

- 10 Bolte, S., Cordelières, F. P. (2006): A Guided Tour into Subcellular Colocalization Analysis in Light Microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232.
- 11 Burger, W., Burge, M. J. (2006): *Digitale Bildverarbeitung, Eine Einführung mit Java und ImageJ*. 2. Ed. Berlin, Heidelberg: Springer; s. bes. S. 74.
- 12 Cabral, B., Cam, N., Foran, J. (1994): Accelerated Volume Rendering and Tomographic Reconstruction using Texture Mapping Hardware. *In: VVS '94 Proceedings of the 1994 symposium on volume visualization*; S. 91–98. New York, USA: ACM New York.
- 13 Comeau, J. W. D., Costantino, S., Wiseman, P. W. (2006): A Guide to Accurate Fluorescence Microscopy Colocalization Measurements. *Biophys. J.* 91, 4611–4622.
- 14 Costes, S. V., Daelemans, D., Cho, E. H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., Lockett, S. (2004): Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells. *Biophys. J.* 86, 3993–4003.
- 15 Cox, G. (2012): *Optical Imaging Techniques in Cell Biology*. 2. Ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- 16 Cremesti, A., Paris, F., Grassmé, H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., Gulbins, E., Kolesnick, R. (2001): Ceramide enables fas to cap and kill. *J. Biol. Chem.* 276, 23954–23961.
- 17 Demandolx, D., Davoust, J. (1997): Multicolour analysis and local image correlation in confocal microscopy. *J. Microsc.* 185, 21–36.
- 18 Dougherty, G. (2009): *Digital Image Processing For Medical Applications*. New York: Cambridge University Press.
- 19 Dumitru, C. A., Gulbins, E. (2006): TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene.* 25, 5612–25.
- 20 Dürst, M. J. (1988): Additional Reference to Marching Cubes. *Computer Graphics.* 22, 72–73.

- 21 Elvins, T. T. (1992): A Survey of Algorithms for Volume Visualization. *ACM SIGGRAPH Computer Graphics*. 6, 194–201.
- 22 Epstein, C. L. (2007): Introduction to the Mathematics of Medical Imaging. 2. Ed. Philadelphia: Society for Industrial, Applied Mathematics.
- 23 Gonzalez, R. C., Woods, R. E. (2008): Digital Image Processing. 3. Ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall.
- 24 Grassmé, H., Becker, K. A. (2013): Bacterial infections and ceramide. *Handb. Exp. Pharmacol.* , 305–320.
- 25 Grassmé, H., Becker, K. A., Zhang, Y., Gulbins, E. (2008): Ceramide in bacterial infections and cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* 389, 1371–1379.
- 26 Grassmé, H., Bock, J., Kun, J., Gulbins, E. (2002): Clustering of CD40 Ligand Is Required to Form a Functional Contact with CD40. *J. Biol. Chem.* 277, 30289–30299.
- 27 Grassmé, H., Carpinteiro, A., Edwards, M. J., Gulbins, E., Becker, K. A. (2014): Regulation of the inflammasome by ceramide in cystic fibrosis lungs. *Cell. Physiol. Biochem.* 34, 45–55.
- 28 Grassmé, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., Gulbins, E. (2001a): CD95 Signaling via Ceramide-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* 276, 20589–20596.
- 29 Grassmé, H., Jendrossek, V., Riehle, A., Kürthy, G. von, Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R., Gulbins, E. (2003): Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-enriched membrane rafts. *Nat. Med.* 9, 322–330.
- 30 Grassmé, H., Riehle, A., Wilker, B., Gulbins, E. (2005): Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *J. Biol. Chem.* 280, 26256–26262.
- 31 Grassmé, H., Riethmüller, J., Gulbins, E. (2007): Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. *Prog. Lipid. Res.* 46, 162–170.

- 32 Grassmé, H., Riethmüller, J., Gulbins, E. (2013): Ceramide in cystic fibrosis. *Handb. Exp. Pharmacol.* , 265–274.
- 33 Grassmé, H., Schwarz, H., Gulbins, E. (2001b): Molecular Mechanisms of Ceramide-Mediated CD95 Clustering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 1016–1030.
- 34 Gulbins, E., Kolesnick, R. (2003): Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene.* 22, 7070–7077.
- 35 Gulbins, E., Palmada, M., Reichel, M., Luth, A., Bohmer, C., Amato, D., Muller, C. P., Tischbirek, C. H., Groemer, T. W., Tabatabai, G., Becker, K. A., Tripal, P., Staedtler, S., Ackermann, T. F., Brederode, J. van, Alzheimer, C., Weller, M., Lang, U. E., Kleuser, B., Grassmé, H., Kornhuber, J. (2013): Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nat. Med.* 19, 934–938.
- 36 Handels, H. (2009): *Medizinische Bildverarbeitung*. 2. Ed. Wiesbaden: Vieweg+Teubner; s. bes. S. 80.
- 37 Hell, S. W., Wichmann, J. (1994): Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* 19, 780–782.
- 38 Holopainen, J. M., Subramanian, M., Kinnunen, P. K. J. (1998): Sphingomyelinase Induces Lipid Microdomain Formation in a Fluid Phosphatidylcholine/Sphingomyelin Membrane. *Biochem.* 37, 17562–17570.
- 39 Ibáñez, L., Schroeder, W., Ng, L., Cates, J. (2005): *The ITK Software Guide*. 2. Ed. New York: Kitware Inc.
- 40 Illenberger, D., Walliser, C., Strobel, J., Gutman, O., Niv, H., Gaidzik, V., Kloog, Y., Gierschik, P., Henis, Y. I. (2003): Rac2 Regulation of Phospholipase C-beta 2 Activity and Mode of Membrane Interactions in Intact Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 8645–8652.

- 41 Imhäuser, C., Gulbins (Grassmé), H., Gulbins, E., Lipinski, H.-G. (2010a): 3D Topology and Arrangement of Proteins Inside Ceramide-rich Domains. In: Thull, R., Gradinger, R. (Hrsg.): Biomaterials and Biomechanics, Fundamentals and Clinical Applications. 12th International and Interdisciplinary NRW Symposium; S. 44. München: Neuer Merkur.
- 42 Imhäuser, C., Gulbins (Grassmé), H., Gulbins, E., Lipinski, H.-G. (2010b): 3D-Visualisierung und Kolo-kalisation von Proteinen und ceramidreichen Domänen. In: Deserno, T. M., Handels, H., Meinzer, H.-P., Tolxdorff, T. (Hrsg.): Bildverarbeitung für die Medizin; S. 211–215. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- 43 Imhäuser, C., Gulbins (Grassmé), H., Gulbins, E., Lipinski, H.-G. (2010c): 3D Topology and Arrangement of Proteins Inside Ceramide-rich Domains. In: Popp, J., Drexler, W., Tuchin, V. V., Matthews, D. L. (Hrsg.): Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care II. SPIE Vol. 7715; S. 77152N. Bellingham, Washington: SPIE.
- 44 Imhäuser, C., Gulbins (Grassmé), H., Gulbins, E., Lipinski, H.-G. (2013): A Novel Approach for Determining Spatial Colocalization of Proteins Inside Ceramide-rich Domains, Online-Publikation; http://www.gcb2013.de/system/resources/BAhbB1sH0gZmSSItMjAxMy8wOC8yNy8xNF8yN18zNF80MV9nY2IxM19wb3N0ZXJzLnBkZgY6BkVU/gcb13_posters.pdf.
- 45 Kaufman, A., Mueller, K. (2004): Volume Visualization. In: Tucker, A. B. (Hrsg.): Computer Science Handbook Vol. 2; S. 41.1–41.31. Boca Raton, Florida: Chapman & Hall/CRC.
- 46 Kaufman, A., Yagel, R., Cohen, D. (1993): Volume Graphics. IEEE Computer. 26, 51–64.
- 47 Kornhuber, J., Muller, C. P., Becker, K. A., Reichel, M., Gulbins, E. (2014): The ceramide system as a novel antidepressant target. Trends Pharmacol. Sci. 35, 293–304.
- 48 Kühnle, R. (2000): True Confocal Scanner Leica TCS SP II - Benutzerhandbuch. 1.4. Heidelberg: Leica Microsystems; s. bes. S. 7–8.

- 49 Landmann, L., Marbet, P. (2004): Colocalization analysis yields superior results after image restoration. *Microsc. Res. Tech.* 64, 103–112.
- 50 Lauer, H. C., Wu, Y., Bhatia, V., Seiler, L. (2004): Volume Rendering by Ray-Casting in Shear Image Order. *In:* Herbert, A., Jones, K. S. (Hrsg.): *Computer Systems: Theory, Technology, and Applications*; S. 153–164. New York: Springer.
- 51 Lorensen, W. E., Cline, H. E. (1987): Marching Cube: A High Resolution 3D Surface Construction Algorithm. *Computer Graphics.* 21, 163–169.
- 52 Manders, E. M. M., Stap, J., Brakenhoff, G. J., Driel, R. van, Aten, J. A. (1992): Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J. Cell Sci.* 103, 857–862.
- 53 Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., Aten, J. A. (1993): Measurement of colocalization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc.* 169, 375–382.
- 54 Max, N. (1995): Optical Models for Direct Volume Rendering. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 1, 99–108.
- 55 Maxfield, F. R., Mayor, S. (1997): Cell surface dynamics of GPI-anchored proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 419, 355–364.
- 56 McIntosh, A. L., Gallegos, A. M., Atshaves, B. P., Storey, S. M., Kannoju, D., Schroeder, F. (2003): Fluorescence and Multiphoton Imaging Resolve Unique Structural Forms of Sterol in Membranes of Living Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 6384–6403.
- 57 Meijering, E., Cappellen, G. van (2007): Quantitative Biological Image Analysis. *In:* Shorte, S. L., Frischknecht, F. (Hrsg.): *Imaging Cellular and Molecular Biological Functions*; S. 59. Berlin, Heidelberg: Springer.
- 58 Pawley, J. B. (2006): Confocal Microscopy. *In:* Egelman, E. H. (Hrsg.): *Handbook of Biological Confocal Microscopy Vol. 3*; S. 668–669. New York: Springer Science+Business Media.

- 59 Perona, P., Malik, J. (1990): Scale-Space and Edge Detection Using Anisotropic Diffusion. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 12, 629–639.
- 60 Polasek, W. (1994): *EDA Explorative Datenanalyse*. 2. Ed. Berlin (usw.): Springer; s. bes. S. 235–236.
- 61 Popov, J., Vobornik, D., Coban, O., Keating, E., Miller, D., Francis, J., Petersen, N. O., Johnston, L. J. (2008): Chemical Mapping of Ceramide Distribution in Sphingomyelin-Rich Domains in Monolayers. *Langmuir*. 24, 13502–13508.
- 62 Preim, B., Bartz, D. (2007): *Visualization in Medicine - Theory, Algorithms, and Applications*. Amsterdam (usw.): Elsevier.
- 63 Razdan, A., Patel, K., Farin, G. E., Capco, D. G. (2001): Volume visualization of multicolor laser confocal microscope data. *Comput. Graph.* 25, 371–382.
- 64 Rezk-Salama, C., Engel, K., Bauer, M., Greiner, G., Ertl, T. (2000): Interactive Volume Rendering on Standard PC Graphics Hardware Using Multi-Textures and Multi-Stage Rasterization. In: Spencer, S. N. (Hrsg.): *HWWS '00 Proceedings of the ACM SIGGRAPH/EUROGRAPHICS workshop on Graphics hardware*; S. 109–118. New York, USA: ACM.
- 65 Rittscher, J., Machiraju, R., Wong, S. T. C. (2008): *Microscopic Image Analysis for Lifescience Applications*. Boston, London: Artech House.
- 66 Russ, J. C. (2007): *The Image Processing Handbook*. 5. Ed. Boca Raton, New York, Abingdon: Taylor & Francis.
- 67 Sabella, P. (1988): A Rendering Algorithm for Visualizing 3D Scalar Fields. In: *SIGGRAPH '88 Proceedings of the 15th Annual Conference on Computer Graphics and Interactive Techniques*; S. 51–58. New York, USA: ACM New York.
- 68 Schmidt, U. (2005): *Professionelle Videotechnik*. 4. Ed. Berlin, Heidelberg: Springer; s. bes. S. 132.
- 69 Schroeder, W., Martin, K., Lorensen, B. (2004): *The Visualization Toolkit*. 3. Ed. New York: Kitware Inc.

- 70 Scientific Volume Imaging (2013): The Nyquist rate, Online-Publikation; <http://www.svi.nl/NyquistRate>.
- 71 Scriven, D. R. L., Lynch, R. M., Moore, E. D. W. (2008): Image acquisition for colocalization using optical microscopy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294, C1119–C1122.
- 72 Shannon, C. E. (2001): A mathematical theory of communication. *ACM SIG-MOBILE Mobile Computing and Communications Review.* 5, 3–55.
- 73 Sheppard, C. J. R. (1986a): The spatial frequency cut-off in three-dimensional imaging. *Optik.* 72, 131–133.
- 74 Sheppard, C. J. R. (1986b): The spatial frequency cut-off in three-dimensional imaging II. *Optik.* 74, 128–129.
- 75 Sheppard, C. J. R., Choudhury, A., Gannaway, J. (1977): Electromagnetic field near the focus of wide-angular lens and mirrors systems. *IEEE J. Microwaves Opt. Acoust.* 1, 129–132.
- 76 Simonis, A., Hebling, S., Gulbins, E., Schneider-Schaulies, S., Schubert-Unkmeir, A. (2014): Differential activation of acid sphingomyelinase and ceramide release determines invasiveness of *Neisseria meningitidis* into brain endothelial cells. *PLoS Pathog.* 10, e1004160.
- 77 Simons, K., Ikonen, E. (1997): Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387, 569–572.
- 78 Song, L., Hennink, E. J., Young, I. T., Tanke, H. J. (1995): Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy. *Biophys. J.* 68, 2588–2600.
- 79 Suetens, P. (2009): *Fundamentals of Medical Imaging.* 2. Ed. New York: Cambridge University Press.
- 80 Suwelack, S., Heitz, E., Unterhinninghofen, R., Dillmann, R. (2010): Adaptive GPU Ray Casting Based on Spectral Analysis. *In:* Liao, H., Edwards, P. J., Pan, X., Fan, Y., Yang, G.-Z. (Hrsg.): *LNCS: Medical Imaging and Augmented Reality* Vol. 6326; S. 169–178. Berlin, Heidelberg: Springer.

- 81 Teichgraber, V., Ulrich, M., Endlich, N., Riethmuller, J., Wilker, B., Oliveira-Munding, C. C. De, Heeckeren, A. M. van, Barr, M. L., Kurthy, G. von, Schmid, K. W., Weller, M., Tummler, B., Lang, F., Grassmé, H., Doring, G., Gulbins, E. (2008): Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat. Med.* 14, 382–391.
- 82 Toennis, K. D. (2012): *Guide to Medical Image Analysis*. 1. Ed. London (usw.): Springer; s. bes. S. 218.
- 83 Tomasi, C., Manduchi, R. (1998): Bilateral Filtering for Gray and Color Images. In: *Proceedings of the Sixth International Conference on Computer Vision*; S. 839–846: IEEE Computer Society Press.
- 84 Weickert, J. (1998): *Anisotropic Diffusion in Image Processing*. 2. Ed. Stuttgart: B. G. Teubner.
- 85 Whitaker, R. T., Xue, X. (2001): Variable-Conductance, Level-Set Curvature for Image Denoising. In: *International Conference on Image Processing Vol. 3*; S. 142–145: IEEE.
- 86 Wilhelm, S., Gröbler, B., Gluch, M., Heinz, H. (2003): *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie*. 09/03. Jena: Carl Zeiss Mikroskopsysteme.
- 87 Wu, Q., Merchant, F., Castleman, K. R. (2008): *Microscope Image Processing*. Amsterdam (usw.): Elsevier.
- 88 Zinchuk, V., Zinchuk, O., Okada, T. (2007): Quantitative Colocalization Analysis of Multicolor Confocal Immunofluorescence Microscopy Images: Pushing Pixels to Explore Biological Phenomena. *Acta Histochem. Cytochem.* 40, 101–111.
- 89 Zucker, R. M. (2006a): Evaluation of Confocal Microscopy System Performance. In: Taatjes, D. J., Mossman, B. T. (Hrsg.): *Cell Imaging Techniques Vol. 319*; S. 77–135. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- 90 Zucker, R. M. (2006b): Quality assessment of confocal microscopy slide based systems: Performance. *Cytometry.* 69A, 659–676.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Erich Gulbins für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, für seine Unterstützung und Geduld während der gesamten Promotion.

Dank gebührt ebenso Frau Dr. Heike Gulbins für die Erzeugung und Bereitstellung des mikroskopischen Bildmaterials, welches für meine Arbeit zur Verfügung gestellt werden konnte.

Sehr herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Hans-Gerd Lipinski für seine Betreuung und die Ermöglichung dieser Arbeit danken. Er unterstützte mich in vielerlei Hinsicht und stand mir allzeit mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite.

Ich danke meinen Eltern, meinem Bruder, Tante Leni und meinen Freunden, deren Unterstützung und Motivation mich durch alle Phasen der Promotion begleiteten.

Mein innigster Dank gilt meiner Ehefrau Melanie, die mich in allen Belangen unterstützte, und mir mit ihrer Liebe, Geduld und Zuversicht die Kraft gab, diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.