

Abschlußbericht des Projektes

# AUTOZELL

**Entwicklung eines Softwaresystems  
zur vollautomatisierten Zellverfolgung in 3D-Kollagenmatrices**

Laufzeit: 01.05.1999 – 30.06.2001

Prof. Dr. Christoph Schlieder  
*Technologie-Zentrum Informatik, Universität Bremen*

Gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (bmb+f)  
im Rahmen des Schwerpunktprogramms *Ersatzmethoden zum Tierversuch* im Fachprogramm  
Biotechnologie 2000



**Projektpartner:**

**Technologie-Zentrum Informatik (TZI)**

Universität Bremen, Fachbereich 3, Mathematik/Informatik

Prof. Dr. C. Schlieder

Universitätsallee 21-23

28359 Bremen

*Förderkennzeichen: 0311807, Teilprojekt 2*

**Universitätshautklinik Würzburg**

Arbeitsgruppe Zellmigration

Dr. P. Friedl

Josef-Schneider-Str. 2

97080 Würzburg

*Förderkennzeichen: 0311808, Teilprojekt 1*

Dokument:	Abschlußbericht
Version:	Endgültige Fassung
Datum:	30.06.2001

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>DAS PROJEKT AUTOZELL</b>	<b>1</b>
1.1	AUFGABENSTELLUNG	1
1.2	VORAUSSETZUNGEN	2
<b>2</b>	<b>PLANUNG UND ABLAUF DES VORHABENS</b>	<b>3</b>
2.1	PLANUNG DES VORHABENS	3
2.2	ABLAUF DES VORHABENS	4
<b>3</b>	<b>ERZIELTE ERGEBNISSE</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>ANFORDERUNGSDEFINITION</b>	<b>5</b>
3.1.1	ANWENDUNGSBEREICH	5
3.1.2	ZIELDEFINITION	5
3.1.3	AUSGANGSZUSTAND	6
3.1.4	INITIALE INTERAKTIONEN DURCH DEN BENUTZER	6
3.1.5	ERGEBNISSE	7
3.1.6	WIEDERAUFFINDEN ZEITLICH RELEVANTER ABSCHNITTE	8
3.1.7	INTERAKTIVE TRAJEKTORIEN-NACHBEARBEITUNG	9
3.1.8	ZIELGRÖßEN	9
<b>3.2</b>	<b>REALISIERUNG</b>	<b>11</b>
3.2.1	KONZEPTION DER LOKALITÄT	11
3.2.2	AUFNAHMESYSTEM	11
3.2.3	GRAFISCHE BENUTZERSCHNITTSTELLE	11
3.2.4	ZELL-ERKENNUNG	13
3.2.5	ZELL-TRACKING	16
3.2.6	BEHANDLUNG VON SPEZIALFÄLLEN	16
3.2.7	SYSTEMÜBERBLICK	19
<b>4</b>	<b>PATENTIERUNG</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
<b>5</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>VERWERTUNG</b>	<b>21</b>

# 1 Das Projekt AUTOZELL

## 1.1 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung des Projektes AUTOZELL besteht in der Entwicklung eines vollautomatischen Zellverfolgungsverfahrens, das die digitale Erfassung der Migration einer großen Anzahl von Zellen in einer 3D-Zellkultur für größere Untersuchungsserien gestattet.

Dem biomedizinisch gebildeten Anwender soll ermöglicht werden, digitalisierte Bildfolgen lichtmikroskopischer Aufnahmen biologischer Zellen mit dem System AUTOZELL zu analysieren. Hierzu ist es erforderlich, ein transparentes System zu haben, das dem Benutzer erlaubt, alle wesentlichen Schritte nachzuvollziehen. Dies betrifft die Erkennung der Zellen in Einzelbildern, die Auflösung des Korrespondenzproblems zwischen jeweils zwei aufeinanderfolgenden Bildern einer Bildserie sowie die vom System automatisch gewählte Behandlung von Problemfällen. Letzteres umfasst Zellkollisionen, Defokussierungen, Zellteilungen und Pfadüberschneidungen.

Der Forderung nach der Nachvollziehbarkeit der Extraktion der Zelltrajektorien kann nur durch eine Visualisierung entsprochen werden, die in der Darstellung der vom System automatisch erkannten Zellkonturen der zu verfolgenden Zellen besteht. Hierbei muss der Benutzer durch eine Bildserie navigieren können und zugleich die extrahierten Zellkonturen verfolgen. Dabei zeigt sich dann, ob das Korrespondenzproblem zwischen aufeinanderfolgenden Bildern korrekt gelöst worden ist.

Ebenso muss ein Nachvollzug der automatischen Behandlung von Problemfällen möglich sein. Dieser ergibt sich zum Teil auch aus der visuellen Inspektion über die Darstellung der Zellkonturen.

Zur Überprüfung der relevanten Abschnitte, in denen es zu Zellkollisionen oder Zellteilungen kommt, soll der Benutzer zusätzlich gezielt vom System geführt werden, um in angemessener Zeit auch lange Bildserien bis zu 800 Bildern überprüfen zu können. Dementsprechend müssen solche Abschnitte vom System automatisch erkannt, dokumentiert und dem Benutzer über die Benutzungsoberfläche zugänglich gemacht werden. Dies schließt insbesondere auch eine Möglichkeit zur Korrektur der ansonsten automatisch aufgelösten Problemfälle mit ein.

Eine parametrisierbare Zellerkennung und parametrisierbare Verfahren zur Bestimmung der Trajektorie sollen dem Anwender ein skalierbares System zur Verfügung stellen, das mit Bildmaterial zurecht kommt, das hinsichtlich seiner optischen Eigenschaften variiert. Ursache dieser Variationen ist die Vielzahl der Umgebungsbedingungen des gesamten Aufnahmesystems. Hierzu gehören vor allem die aktuellen Lichtverhältnisse, Temperaturbedingungen, Spannungsschwankungen in elektrischen Leitungen, was an die Lichtquellen, Infrarotlampen, CCD-Kamera und Computer mit Framegrabberkarte zur Aufnahme und Abspeicherung der mikroskopischen Aufnahmen angeschlossen sind.

Die Parametrisierung der Trackingverfahren erlaubt zugleich dem Benutzer eine Wahl hinsichtlich eines genauen langsamer ablaufenden Trackinglaufs oder weniger genauen, dafür aber schneller ablaufenden Trackingverfahren. Je nach Qualität des Bildmaterials und je nach Dichte der in der Kollagenmatrix schwimmenden Zellen, ist es sinnvoll eine entsprechende Trackingvariante auszuwählen.

Die Parametrisierung der Zellerkennung betrifft nicht nur die Variationsvielfalt des Bildmaterials. Das AUTOZELL-System erlaubt die Betrachtung verschiedener Zelltypen. Je nach optischen Eigenschaften, dies betrifft im wesentlichen die Homogenität oder Heterogenität der Zellen und ebenso des Hintergrundes, aber auch die morphologischen Eigenschaften verschiedener Zelltypen, können die Zellerkennungs-Parameter angepasst werden.

Für eine leichte Handhabung der Systemskalierung ist eine entsprechende grafische Benutzungsoberfläche notwendig, die dem Anwender eine angemessene Wahl der Parameter erlaubt, ohne dass dieser auf mathematische Kenntnisse zurückgreifen muss. Dies ist nur durch eine Visualisierung verschiedener Parametereinstellungen möglich.

Hervorzuheben ist ferner der Vergleich des AUTOZELL-Systems mit der herkömmlichen Methode bei der Zellverfolgung, die darin besteht, dass unterschiedliche Anwender mit Hilfe eines Trackballs und durch subjektives Augenmaß die Trajektorien der Zellen nachvollziehen. Diese Methode führt zu verschiedenen Ergebnissen nicht nur bei unterschiedlichen Benutzern, sondern auch bei gleichen Benutzern und verschiedenen Trackingläufen. Das AUTOZELL-System dagegen arbeitet mit Hilfe deterministischer Methoden und gelangt unter der Voraussetzung gleicher Anfangsbedingungen zu denselben Ergebnissen. Dadurch wird die Vergleichbarkeit der Trajektorien verschiedener Zellen und eine objektive Verwertung der Messergebnisse erst möglich.

## 1.2 Voraussetzungen

Das AUTOZELL-Projekt hat als Kooperationspartner das ZELLTRACK-Projekt der Universitätshautklinik Würzburg. Das ZELLTRACK-Projekt ist als Anwender der Ergebnisse des AUTOZELL-Projektes zu verstehen. Entsprechend sind in Kooperation mit dem ZELLTRACK-Projekt die Anforderungen für das AUTOZELL-Projekt definiert worden.

## 2 Planung und Ablauf des Vorhabens

### 2.1 Planung des Vorhabens

Der Arbeitsplan des AUTOZELL-Projektes sieht 5 Arbeitspakete vor, die sich an der zeitlichen Ablauflogik der Systemfunktionalität orientieren. Die Arbeitsinhalte der einzelnen Schritte der Arbeitspakete werden im folgenden näher beschrieben.

Im **ersten Arbeitspaket** ist eine für unterschiedliche Zelltypen geeignete Identifikationskomponente zu entwickeln. Dies schließt sowohl Bildverbesserungs- als auch Segmentierungsverfahren ein.

Zu diesem Zweck stellt die Hautklinik Würzburg Aufnahmen von exemplarisch ausgewählten Zelltypen unter verschiedenen Aufnahmebedingungen bereit. Bei den Zelltypen handelt es sich um MV3 Melanomzellen und Lymphozyten. Die Variationen der Aufnahmebedingungen betreffen die Parameter Vergrößerung des Mikroskops, verschiedene Zustandsformen der Melanomzellen und Lymphozyten, Dicke des Kollagengel in dem die Zellen schwimmen und verschiedene Beleuchtungsbedingungen.

Des weiteren ist eine Anforderungsdefinition des Gesamtsystems zu erstellen, die festlegt, was den Benutzern für Möglichkeiten gegeben werden, um das AUTOZELL-System effizient nutzen zu können und zugleich eine Formalisierung der Problemstellung mit einschließt.

Im **zweiten Arbeitspaket** ist ein erster gemäß der Anforderungsdefinition zu entwickelnder Prototyp, der bereits eine erste Version einer Zell-Identifikationskomponente darstellt, in der Hautklinik Würzburg zu installieren und unter realen Umweltbedingungen zu testen. Insbesondere ist vor Ort im Rahmen einer Feldstudie zu testen, wie gut die Zell-Erkennung von Zellen unterschiedlichen Typs und unterschiedlicher Kontrastierung funktioniert. Des weiteren ist eine Einarbeitung des Personals an der Hautklinik Würzburg erforderlich.

Ziel des **dritten Arbeitspakets** ist die Ergänzung des Prototypen um einen Tracking Algorithmus. Dieser soll dazu in der Lage sein, vom Benutzer ausgewählte Zellen in Folgebildern wieder zu finden. Hierzu werden verschiedene Bildsequenzen, die von der Hautklinik Würzburg aufgenommen werden, getestet. Die einzelnen Bildsequenzen unterscheiden sich jeweils durch die Variationen der Zelldichte, der Geldichte oder der Migrationsgeschwindigkeit der Zellen. Die Testergebnisse werden wieder wechselseitig einerseits zur Entwicklung eines Zellverfolgungsalgorithmus und an der Hautklinik Würzburg zur Festlegung der Rahmenbedingungen für ein automatisches Zellverfolgungssystem genutzt.

Das **vierte Arbeitspaket** erweitert die bereits entwickelten Zell-Erkennungs- und Tracking-Verfahren um die Behandlung von Spezialfällen. Dazu ist die Konzeption und Entwicklung von Lösungen zum Auftauchen, Abtauchen, Verdecken, Fusionieren und Teilen von Zellen erforderlich. Die entwickelten Module müssen in das Gesamtsystem eingebaut und getestet werden. Abschließend ist das entwickelte System durch Tests auf Robustheit und Plausibilität anhand von vorher definierten Kriterien zu prüfen.

Im **fünften Arbeitspaket** ist eine einfach zu bedienende Benutzungsschnittstelle zu entwickeln, die dem Forschungspersonal an der Hautklinik Würzburg einen leichten Zugang zu dem Soft-

waresystem ermöglicht. Dazu muss in Kooperation mit den Benutzern eine an die Aufgaben angepasste Benutzungsschnittstelle entworfen und implementiert werden.

## 2.2 Ablauf des Vorhabens

Die geplanten Arbeitspakete konnten alle realisiert werden. Abweichungen gab es in der zeitlichen Reihenfolge: Es war erforderlich die Entwicklung einer graphischen Benutzungsoberfläche vorzuziehen und zusätzliche Benutzer-Interaktionen zu entwickeln.

Des weiteren wurde aus Anwendersicht eine über die Arbeitspakete hinaus definierte Behandlung der Kollisionsproblematik als wesentlich eingestuft. Diese wurde in der Zeit vom 1.4.2001 bis 30.6.2001 im Rahmen einer kostenneutralen Verlängerung behandelt.

Da erst mit dem 1.5.1999 ein Wissenschaftler eingestellt wurde, hat sich der Projektbeginn um einen Monat verzögert.



---

## 3 Erzielte Ergebnisse

### 3.1 Anforderungsdefinition

Es werden die Qualitätsmerkmale des AUTOZELL-Systems aus Anwendersicht dargestellt.

#### 3.1.1 Anwendungsbereich

Das Zell-Tracking funktioniert pro Bildserie für einen einzigen Zelltyp, d.h. eine Bildserie enthält nur einen der betrachteten Zelltypen:

- a) MV3 Melanomzellen oder
- b) T Lymphozyten.

Das System ist auf andere Zelltypen erweiterbar.

Es wird pro Zeitpunkt nur eine zweidimensionale Aufnahme gemacht. Da die Aufnahme über eine Tiefenschärfe von mehreren Mikrometern hinausreicht, sind auf einer Aufnahme nicht nur Zellen in der Fokusebene, sondern auch oberhalb und unterhalb der Fokusebene zu sehen. Es werden Zellen verfolgt, die oberhalb, unterhalb oder in der Fokusebene einer einzigen Aufnahme sind.

Die Zelldichte der Aufnahmen ist so gering, dass es nur selten zur Bildung von Zellkontakten und Überschneidungen von Zellkanten kommt.

Die Vergrößerung der Aufnahmen erlaubt die Darstellung von bis zu 100 Zellen.

#### 3.1.2 Zieldefinition

Das Ziel besteht in der Angabe der zweidimensionalen Trajektorie in kartesischen Koordinaten für jede zu trackende Zelle einer Bildserie.

Eine Trajektorie besteht aus einer Folge von Punkten, die punktuell den Ort der Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt der Zellmigration markieren. Der Ort der Zelle wird jeweils durch einen zu bestimmenden Punkt dargestellt, der innerhalb der Zell-Fläche liegt.

Die Trajektorienbestimmung für eine Zelle bricht ab, wenn

1. die Bildserie beendet ist,
2. die Zelle den Sichtbereich der Aufnahme verlässt oder
3. sich das Erscheinungsbild der Zelle so sehr verändert, dass eine Zuordnung zu den vorherigen Bildern nicht mehr möglich ist.

Diese Fälle werden protokolliert und sind durch das Protokoll und gegebenenfalls zusätzlich durch eine visuelle Inspektion nachvollziehbar.

### 3.1.3 Ausgangszustand

#### 3.1.3.1 Material

Bild-Eigenschaften:

Die digitalisierten Bilder sind im TIF-Format gespeichert.

Jede Bildserie wird in einem separaten Verzeichnis abgelegt.

Die Bilder haben eine Bildbreite von maximal 768 Pixel und eine Bildhöhe von 576 Pixel.

Die achtstelligen Dateinamen der Bilder sind von 0 angefangen aufsteigend nummeriert. Die letzten 4 Ziffern kennzeichnen die Bildnummer, z.B. gvim0001.

Bildfolgen-Eigenschaften:

Die zeitlichen Abstände aufeinanderfolgender Bilder sind derart, dass sich jede Zell-Fläche mindestens auf drei Folgebildern überlappt.

Die Bilder einer Bildserie werden aus einer einzigen Position mit einer einzigen Vergrößerung aufgenommen.

#### 3.1.4 Initiale Interaktionen durch den Benutzer

Im ersten Bild ist eine sequentielle, punktuelle Auswahl der zu verfolgenden Zellen mit der Maus durchzuführen.

Der ausgewählte Punkt muss innerhalb der Zelle liegen, was mit einer Zoom-Funktion gewährleistet werden kann, die die Zelle vergrößert darstellt.

Eine Anzeige visualisiert, wie der Computer die Auswahl registriert hat. Hiernach kann entschieden werden, ob man die Auswahl beibehält oder verwirft.

Der Operator hat in einer Datei die eine Bildserie beschreibenden Daten vor der Analyse mit AUTOZELL wie folgt festzuhalten:

1. Name der Bildserie: Versuchsbezeichnung, maximal 60 Zeichen  
[BS-<Start-Datum>-<Start-Zeit>-<Laufende Bildserien-Nummer>]
2. Untersucher Zelltyp: [{MV3 Melanome, T Lymphozyten}]  
weitere Versuchsbedingungen
3. Frame-Rate: [Zeitdauer]  
Beschreibt den Zeitabstand zweier aufeinanderfolgender Bilder. Dieser Zeitabstand ist für alle direkt aufeinanderfolgenden Bilder gleich.

Der Name dieser Datei setzt sich wie folgt zusammen:

BS-<Start-Datum>-<Start-Zeit>-<Laufende Bildserien-Nummer>.

Diese Datei wird in dem Verzeichnis abgelegt, in dem die Bilder der Bildserie abgelegt sind.

Das System prüft zu Beginn, ob die Datei existiert. Falls dies nicht der Fall ist, startet das System nicht.

Am Ende der automatischen Bildserienanalyse wird diese Datei von dem Programm automatisch mit der Endzeit der Analyse erweitert. Dies zeigt dem Operator an, ob die Analyse ohne abubrechen durchgeführt worden ist.

### 3.1.5 Ergebnisse

Als Ergebnis des Trackings wird eine „Bildserien-Tabelle“ erzeugt.

#### 3.1.5.1 Bildserien-Tabelle

Als Ergebnis der Analyse einer Bildserie wird für jedes Bild der Serie und für jede erkannte Zelle pro Bild ein Eintrag in die Tabelle „Bildserien-Tabelle“ erzeugt.

Der Name dieser Datei setzt sich wie folgt zusammen:

BT-<Start-Datum>-<Start-Zeit>-<Laufende Bild-Tabellen-Nummer>.

Diese Datei wird in dem Verzeichnis erzeugt, in dem die Bilder der Bildserie abgelegt sind.

Bildserien-Tabelle

1. Frame-Nummer:  $[k \in \mathbb{N}]$   
Bild-Nummer der Bildserie
2. Zell-Nummer:  $[k - l - n - \dots k, l, n \in \mathbb{N}]$   
Eine laufende Nummer zur Unterscheidung der Zellen.
3. Zell-Pixel:  $[x; y \in \mathbb{N}]$   
Ein Pixel innerhalb der Zelle, d.h. die x-y-Koordinaten der zweidimensionalen Ebene.
4. Zell-Cluster:  $[{\text{true, false}}]$   
true: Es treffen mehrere Zellen aufeinander und können nicht mehr unterschieden werden.
5. Zell-Ende:  $[{\text{true, false}}]$   
true: Die Zelle ist abgestorben oder aus dem Sichtbereich verschwunden.

#### 3.1.5.2 Anmerkungen zu den Tabelleneinträgen der Bildserien-Tabelle

1. Die Frame-Nummern werden in aufsteigender Reihenfolge automatisch vergeben. Sie dienen der Ermittlung des Zustandes zu einem bestimmten Zeitpunkt.
2. Die Zell-Nummern werden von 1 bis <Anzahl im ersten Bild gewählter Zellen> automatisch vergeben. Nach Zell-Teilungen vergrößert sich diese Anzahl entsprechend. Die Zell-Nummern dienen zur Unterscheidung der Zellen voneinander.
3. Als Zell-Pixel wird der Schwerpunkt benutzt.  
(Nur in den seltensten Fällen liegt der Schwerpunkt nicht in der Zelle, da Zellen i.d.R. nicht derart gekrümmt sind, dass sie eine konkave Form haben.)  
Es stehen neben dem Zentroid mehrere Möglichkeiten zur Verfügung, wie z.B. ein gewichteter Zentroid.

Anhand des Zell-Pixels kann die Trajektorie dargestellt werden, da dieses Pixel für jede Zelle mit jeder beliebigen Form existiert.

Es existieren in der Bildserien-Tabelle nicht nur Einträge für Zellen, die im vorliegenden Bild

erkannt werden, sondern auch für alle Zellen, die in vorherigen Bildern erkannt worden waren, im vorliegenden Bild aber nicht mehr erkannt werden können. Das Zell-Pixel einer nicht mehr zu erkennenden Zelle bleibt aus technischen Gründen dasselbe bis zum Ende der kompletten Analyse. Der Eintrag Zell-Ende ermöglicht die Unterscheidung einer nicht mehr erkannten Zelle, (Zell-Ende = true), und dem bloßen Verharren der Zelle an einem Ort, (Zell-Ende = false).

4. Zell-Cluster bilden sich beim Aufeinandertreffen mehrerer Zellen. Zell-Cluster werden wie folgt berücksichtigt:  
In der Tabelle ist der Eintrag „Zell-Cluster“ für jede Zelle „true“, die Teil eines Zell-Clusters ist.  
Diese Markierungen kennzeichnen, dass keine Unterscheidung zwischen den Zellen mehr möglich ist. Das Programm führt nach Auflösung des Cluster eine Analyse durch, deren Ergebnisse, die Trajektorien, vom Operator interaktiv korrigiert werden können.  
Eng verbunden mit der Bildung von Zell-Clustern ist die gegenseitige Verdeckung zweier oder mehrerer Zellen, die sich in Ebenen an unterschiedlichen vertikalen Positionen der Kollagenmatrix befinden. In diesem Fall treffen die Zellen nicht aufeinander und bilden keine Cluster. Stattdessen bewegen sie sich in ihren jeweiligen verschiedenen Ebenen aneinander vorbei.  
Nur aus der Perspektive der zweidimensionalen Aufnahme scheinen die Zellen aufeinander zutreffen. Daher wird dieser Fall nicht von der Cluster-Bildung unterschieden und genauso behandelt.
5. Das Zell-Ende wird auf true gesetzt, sobald das System die Zelle nicht mehr wiederfindet. Das ist dann der Fall, wenn keine Zuordnung der Zelle zu einer Zelle im vorliegenden Folgebild durchgeführt werden kann, die Zelle die Bildebene verlassen hat, die Zelle den Sichtbereich verlassen hat, also nicht mehr im Bereich der Tiefenschärfe ist, oder sich ihre Erscheinung so sehr verändert hat, dass das System eine Zuordnung nicht mehr durchführen kann.

Sobald eine Zelle in der Bildserien-Tabelle einen Eintrag erhalten hat, werden bis zum Ende der Bildserie für diese Zelle Einträge erzeugt, auch wenn sich die Einträge nicht mehr ändern sollten, weil z.B. die Zelle abgestorben ist. Daher wächst die Tabelle relativ zur Bildfolge monoton an.

Neben der Erzeugung der Tabelle werden die Trajektorien aller Zellen einer Bildserie in der zweidimensionalen Ebene graphisch dargestellt. Zell-Teilungen und Zell-Cluster werden hervorgehoben visualisiert.

### 3.1.6 Wiederauffinden zeitlich relevanter Abschnitte

Mithilfe der Framerate, die in den Bildserieneigenschaften steht, und der Framenummer jedes Bildes kann der Zustand zu jedem Zeitpunkt abgefragt werden.

Anhand des Eintrages Zell-Cluster der Bildserien-Tabelle können gezielt diejenigen Abschnitte der Bildserie ermittelt werden, zu denen Zell-Cluster-Bildungen stattfinden.

### 3.1.7 Interaktive Trajektorien-Nachbearbeitung

Jede Trajektorie kann interaktiv durch den Operator korrigiert werden.

Da im Falle von Zell-Clustern die Trajektorien der Zellen u.U. nicht korrekt vom System erkannt werden, kann der Operator sich durch derartig problematische Fälle vom System automatisch führen lassen, um die Trajektorien an diesen kritischen Stellen nachbessern zu können, ohne einen Problemfall zu übersehen.

### 3.1.8 Zielgrößen

#### 3.1.8.1 Zellsegmentierung

Die von dem System zu erkennenden Zellen haben eine wählbare Mindestbreite in horizontaler und vertikaler Richtung und eine wählbare Mindestanzahl von Pixeln, von denen jeder einzelne mindestens mit einem der übrigen über eine 4er-Nachbarschaft verbunden ist (das bedeutet ein horizontaler oder vertikaler Nachbar, aber kein diagonalen). Hierzu zählt nicht der typischerweise eine Zelle umschließende Rand.

Das Ziel der Zellsegmentierung besteht darin, ausreichend genaue Informationen zu erhalten, mit denen jeweils das Zellpixel so bestimmt werden kann, dass eine Trajektorie ermittelt werden kann, die den im folgendem Abschnitt beschriebenen Anforderungen genügt.

Eine hinreichende Segmentierung ergibt sich damit aus der notwendigen Qualität der ermittelten Trajektorien.

#### 3.1.8.2 Trajektorien

Von den zu verfolgenden Zellen sind mindestens 75% korrekt zu verfolgen.

Entscheidend sind die Trajektorien 3er unterschiedlicher Personen, die jeweils dieselben Zellen per Hand verfolgen.

Für eine bestimmte Zelle muss die automatisch ermittelte Trajektorie innerhalb eines Korridors liegen. Dieser Korridor bestimmt sich aus den 3 Trajektorien der nicht automatischen Zell-Verfolgungen. Hierbei wird eine Abweichung vom Korridor um weniger als 10% akzeptiert.

#### 3.1.8.3 Performanz

Der allgemeine Aufwand:

Der Zeitbedarf für das Tracken verhält sich direkt proportional zur Summe des Zeitbedarfs für die Segmentierung  $s$  eines Bildes und der Zuordnungsanalyse  $z$  zweier aufeinanderfolgender Bilder. Der Aufwand steigt linear mit dem Produkt aus der Anzahl der Bilder und der Anzahl der Zellen.

Bei  $k$  Zellen und  $b$  Bildern ergibt sich der Aufwand:  $k * b * (s + (l * z))$ .

Der Faktor  $l$  ist 1 für den Fall, dass die Zuordnungsanalyse jeweils nur für aufeinanderfolgende Bilder durchgeführt wird. Denkbar ist aber auch ein zusätzlicher Vergleich von nicht direkt aufeinanderfolgenden Bildern. In diesem Fall wird  $l$  größer 1.

Vor allem gilt dieser Zeitaufwand aber nicht für Verfahren, die nicht den Umstand nutzen, dass eine Zuordnungsanalyse zweier aufeinanderfolgender Bilder insofern beschränkt werden kann,

als eine Zelle von einem Bild zum nächsten Bild nicht ihre *nähere Umgebung* verlassen kann. Wird dieser Umstand nicht genutzt, würde der Aufwand exponentiell mit der Anzahl der Zellen steigen.

Zur Veranschaulichung ein konkretes Beispiel:

Bei dem derzeitig verwendeten Segmentierungsalgorithmus, einem grauwert-adaptiven Bereichswachstumsverfahren, dauert die Segmentierung einer Zelle im Durchschnitt 2 Sekunden. Ein prototypisches Trackingverfahren nutzt eine Zuordnungsanalyse, die aus der Messung von Flächeninhalt, Umfang, Kompaktheit und mittlerem Grauwert der Zelle besteht. Außerdem wird der Umstand genutzt, dass eine Zelle sich in der näheren Umgebung ihres Ortes auf dem Vorgängerbild befinden muss. Dies erlaubt eine effiziente Zuordnungsanalyse, die pro Zelle bei etwa 1 Sekunde liegt.

Für das konkrete Beispiel von 30 Zellen und 100 Bildern liegt damit der komplette Tracking-Aufwand bei den genannten Verfahren bei  $30 * 100 * (2 + 1)$  Sekunden = 2.5 Stunden.

Bei 50 Zellen und 700 Bildern liegt der komplette Tracking-Aufwand bei  $50 * 700 * (2 + 1)$  Sekunden = 29.2 Stunden.

Zur Abschätzung dieses Zeitbedarfs wird ein 500 Mhz Pentium III PC zugrundegelegt.

#### **3.1.8.4 Speicherplatz**

Die Bildgröße ist 450 KB.

Bei 50 Zellen pro Bild und 10 KB Speicherplatzaufkommen pro Zelle und Bild beträgt der Speicherplatz für Zellmessungen pro Bild  $50 * 10$  KB = 500 KB.

Der maximale Speicherplatz zur Bearbeitung einer Bildserie mit 700 Bildern beträgt:

$$(700 * 450 \text{ KB}) + (700 * 500) = 315000 \text{ KB} + 350000 \text{ KB} = 665 \text{ MB.}$$

#### **3.1.8.5 Systemtransparenz**

Eine transparente, parallele Systemversion erlaubt die Ergebnisse der Zwischenschritte zu verfolgen.

Dies betrifft die Visualisierung von Segmentierungsergebnissen und Messergebnissen, wie etwa der Darstellung des berechneten Zell-Pixels auf dem entsprechenden Bild. Die Visualisierung kann für jeden Zeitpunkt einer Bildserie, für jede Zelle durchgeführt werden.

## 3.2 Realisierung

### 3.2.1 Konzeption der Lokalität

Es hat sich in den Experimenten herausgestellt, dass Verfahren, die lediglich lokale Bildinformationen nutzen, zu den gewünschten Ergebnissen führen. Insbesondere zwei wesentliche Gründe sprechen für lokale Verfahren:

- Trotz Optimierungen des Aufnahmesystems treten teilweise leichte Beleuchtungsschwankungen über das Gesamtbild auf. Derartige Helligkeitsunterschiede erfordern verschiedene Parametrisierungen der zu verwendenden Verfahren für die Zell-Erkennung und das Tracking.
- Starke Performanzeinbußen treten auf, wenn ein jedes Gesamtbild als Eingabe in die Verfahren verwendet wird, obwohl lediglich einige bestimmte Bereiche (Region of Interests) relevant sind.

Dieses Lokalitäts-Konzept, das nur relevante, rechteckige Bildausschnitte betrachtet, zieht sich durch die gesamte Systemrealisierung einschließlich bis hin zur Benutzungsschnittstelle, über die der Anwender entsprechende Parameter zur Steuerung der Handhabung lokaler Bildinformation anzugeben hat.

### 3.2.2 Aufnahmesystem

Für die Bildaufnahme am Mikroskop wird eine monochrome CCD-Kamera eingesetzt. Um einen reproduzierbaren und stabilen Abgleich der Helligkeit zu gewährleisten, muss die Kamera einen fest einstellbaren elektronischen Shutter (Verschluss) besitzen. Darüber hinaus muss die Verstärkung fest einstellbar sein. Diese Voraussetzungen werden von der eingesetzten Kamera DMK 3002/C erfüllt.

Die aufgenommenen Bilder werden analog in Form eines CCIR-Standard-Videosignals zum Bildverarbeitungsrechner übertragen. Dort übernimmt ein Framegrabber die Wandlung des analogen Signals in digitale Videobilder. Alle digitalen Übertragungsmöglichkeiten setzen entweder eine verlustbehaftete Kompression ein, die die nachfolgende Bildverarbeitung erschwert oder unmöglich macht, oder verursachen Kosten, die um den Faktor fünf bis zehn höher liegen, als die analoge Variante. Der Qualitätsgewinn der digitalen Variante für das Projekt Autozell ist irrelevant.

Als Framegrabber kommt die Meteor der Firma Matrox zum Einsatz. Neben Bildqualität und guter Programmierbarkeit war das Vorhandensein von vier Eingängen entscheidend für die Auswahl dieser Komponente. Durch die vier umschaltbaren Eingänge können Bildserien von vier Mikroskopen gleichzeitig aufgezeichnet werden.

Nach der Digitalisierung liegen die Bildserien im Bildverarbeitungsrechner als Dateien vor und stehen so der automatischen Tracking-Software zur Verfügung.

### 3.2.3 Grafische Benutzungsschnittstelle

Zur leichten System-Handhabung wurde von Seite des Projektpartners in Würzburg viel Wert darauf gelegt, eine entsprechend gestaltete Benutzungsschnittstelle zur Verfügung zu haben.

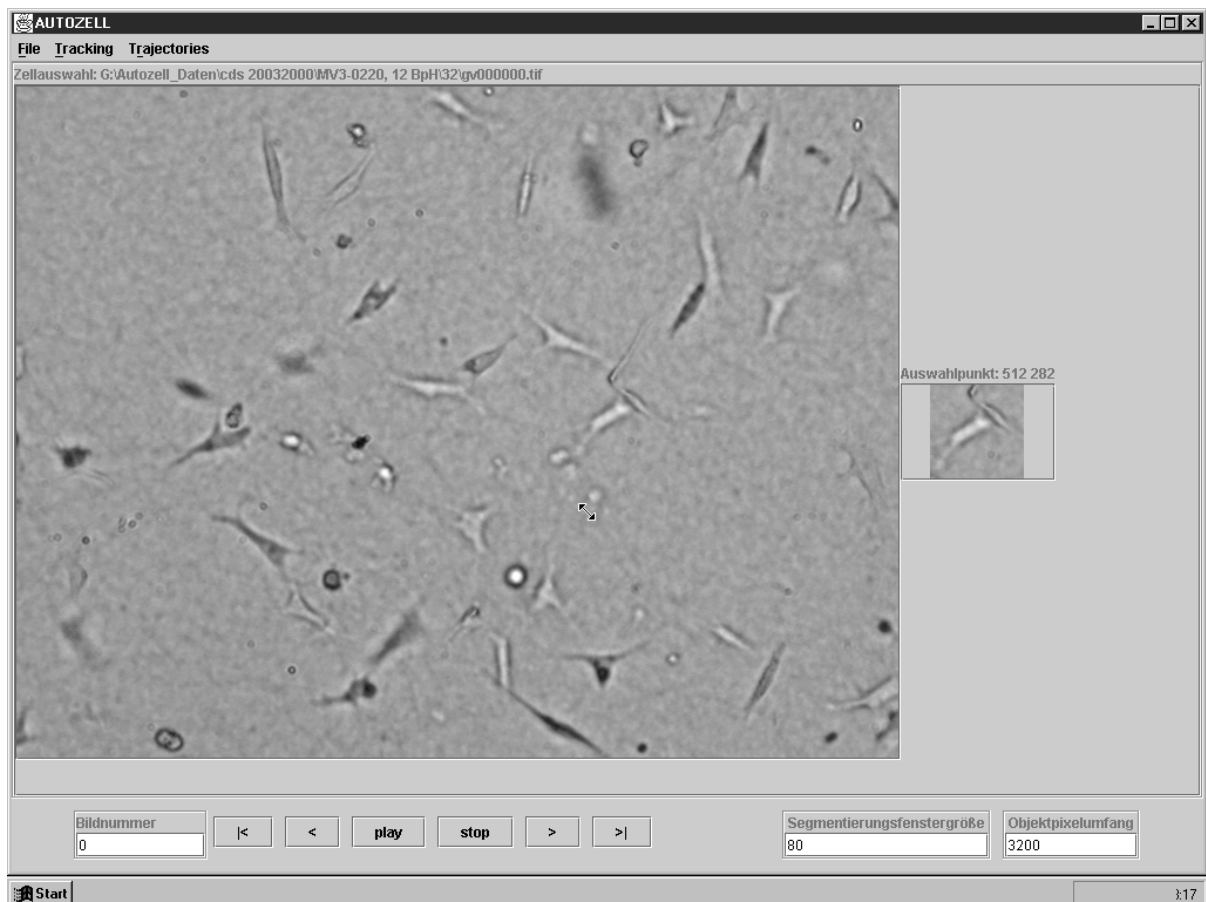


Abbildung 1: Die AUTOZELL Benutzeroberfläche

### 3.2.3.1 Parametereinstellungen

Zur Steuerung des Systems werden drei Bereiche unterschieden: die Segmentierung der Zellen, das Tracking der ausgewählten Zellen über die Bildserie und die Kollisionsbehandlung. Jeder dieser Bereiche erfordert die Steuerung vermittelt verschiedener Parameter.

#### 3.2.3.1.1 Segmentierung

- streng vertraulich -

#### 3.2.3.1.2 Tracking

Es gibt verschiedene Trackingverfahren:

- a) Eine statische Variante: es finden keine Parameteranpassungen für verschiedene Bilder der Bildserie statt; es werden lediglich die Anfangseinstellungen für die Segmentierungsparameter benutzt, um Zellen in Folgebildern wiederzufinden.



- b) Mehrere dynamische Varianten: hier finden separat für alle Zellen Parameteranpassungen über die Bildfolgen statt; Kriterien für diese Anpassungsverfahren leiten sich aus den Segmenteigenschaften der Zellen in ihrer jeweiligen Biographie ab.
- c) Es können optional verschieden Glättungsverfahren ausgewählt werden:
  - Kreiseinbeschreibung: es wird in das Zellsegment der größtmögliche Kreis einbeschrieben und dessen Mittelpunkt als Trajektoriepunkt benutzt;
  - Ellipseneinbeschreibung: es wird durch die Flächenpunkte des Zellsegmentes eine Ellipse gelegt und der Mittelpunkt der Längsachse als Trajektoriepunkt benutzt;

### 3.2.3.1.3 Kollisionsbehandlung

In der Kollisionsbehandlung werden folgende Parameter benutzt:

- a) Cluster-Bereichsgröße: was innerhalb dieses Bereichs liegt, gehört zu dem jeweiligen Cluster;
- b) Anormaler Zuwachs / Schwund: gibt an, wann die kritische Größe überschritten wird, damit ein Segment als Cluster identifiziert wird, bzw. wann eine Cluster-Beendigung identifiziert wird;
- c) Automatisch / Interaktiv: siehe Beschreibung unten;

### 3.2.3.2 Bildfolgenavigation

Zur Navigation durch die Bildserie wird ein entsprechendes Navigationstool bereitgestellt, mit dessen Hilfe beliebig durch eine Bildserie navigiert werden kann. Dies ist vor allem dann von Bedeutung, wenn nach einem Trackinglauf die Ergebnisse visuell überprüft werden sollen. Da die erkannten Zellsegmente der zu verfolgenden Zellen visualisiert werden, wird dem Benutzer hiermit die Möglichkeit gegeben, unmittelbar die Korrektheit eines Trackinglaufs zu überprüfen und außerdem interaktiv Verbesserungen in die Daten durch visuelle Tools einzupflegen. Derartige Verbesserungen werden unmittelbar in den Ausgabedaten übernommen und stehen zur Auswertung zur Verfügung.

### 3.2.4 Zell-Erkennung

Aufgrund der Versuche wurde ein Segmentierungsverfahren entwickelt, das sich durch seine Robustheit gegenüber der Variationsbreite des Bildmaterials hinsichtlich Grauwertveränderungen auszeichnet.

*- streng vertraulich -*

Folgende Beispielsegmentierungen zeigen die Ergebnisse der Zellsegmentierungsmethode.

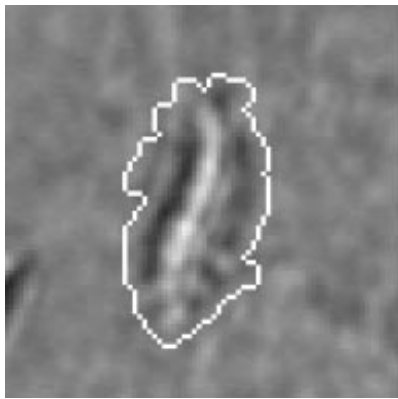


Abbildung 2

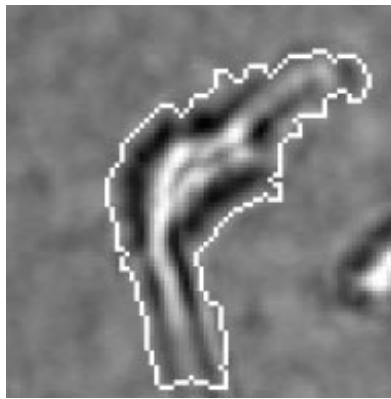


Abbildung 3

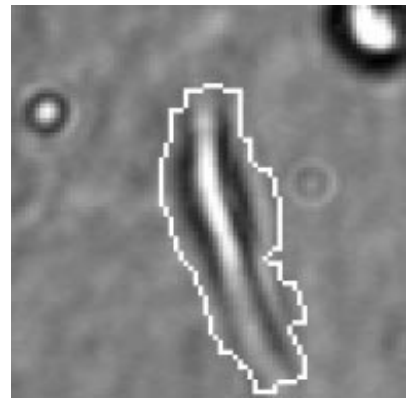


Abbildung 4

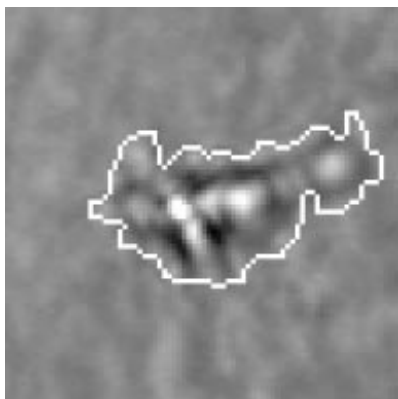


Abbildung 5

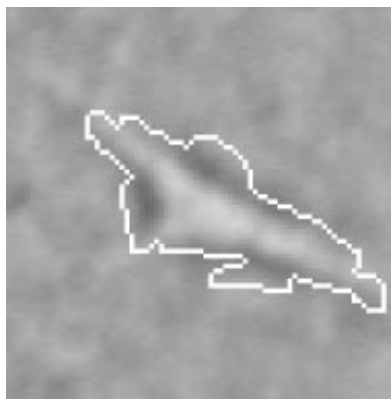


Abbildung 6

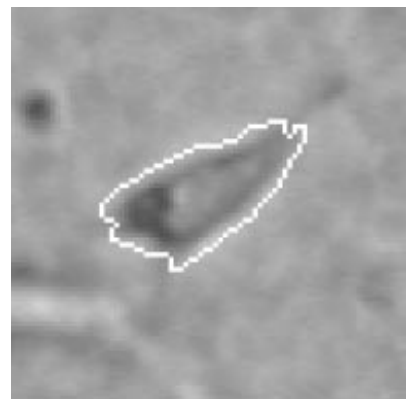


Abbildung 7

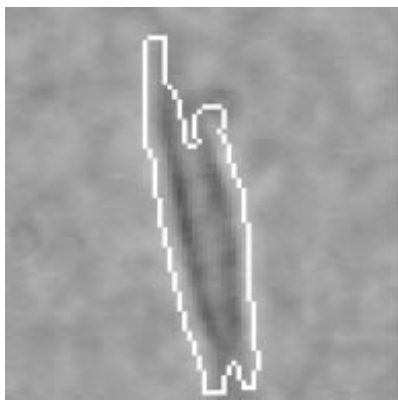


Abbildung 8

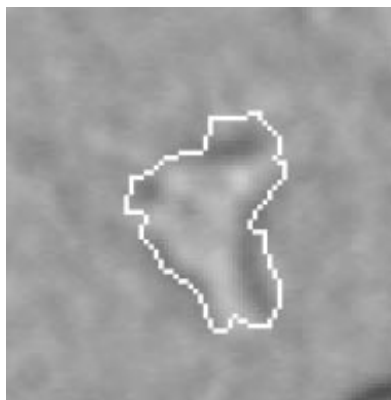


Abbildung 9

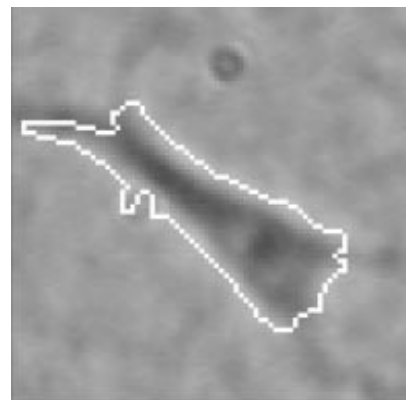


Abbildung 10

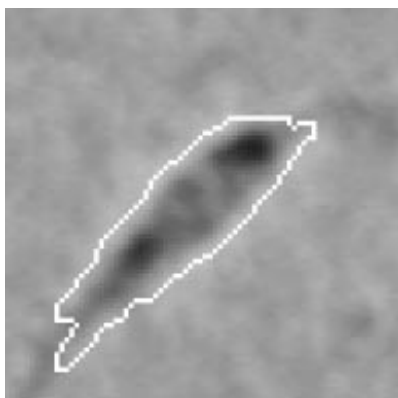


Abbildung 11

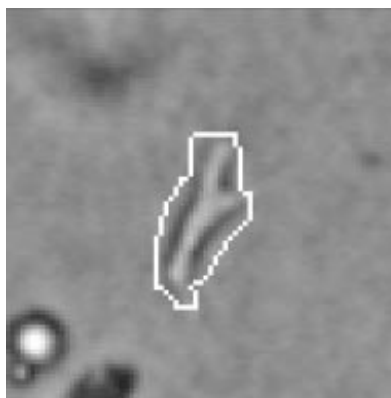


Abbildung 12

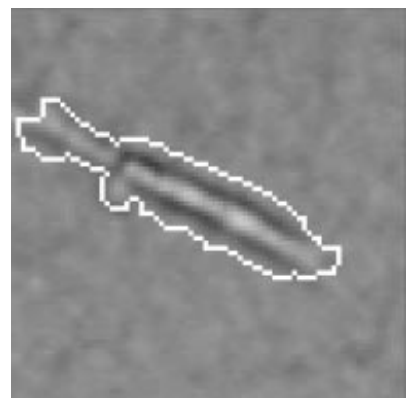


Abbildung 13

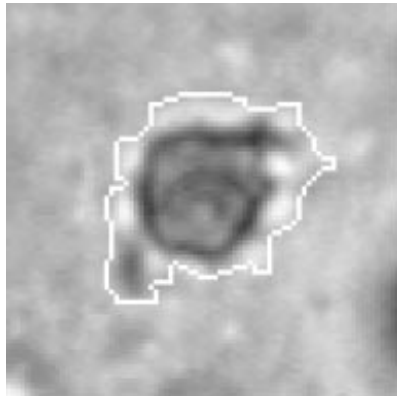


Abbildung 14

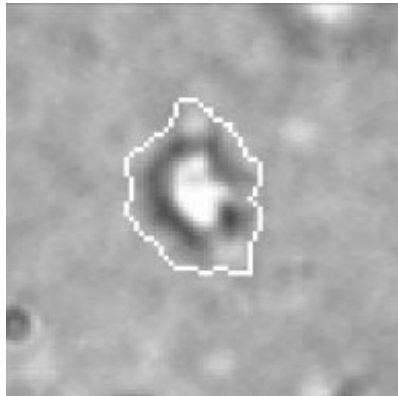


Abbildung 15

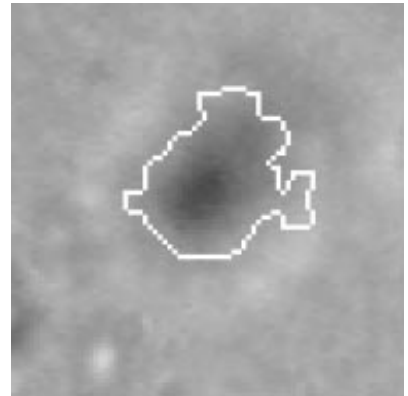


Abbildung 16

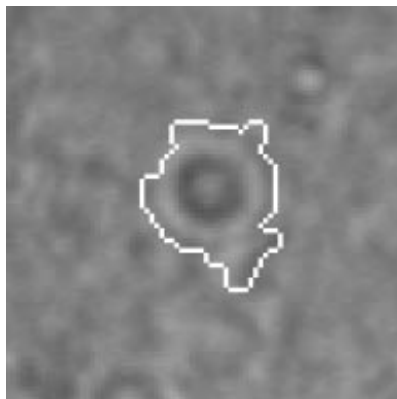


Abbildung 17

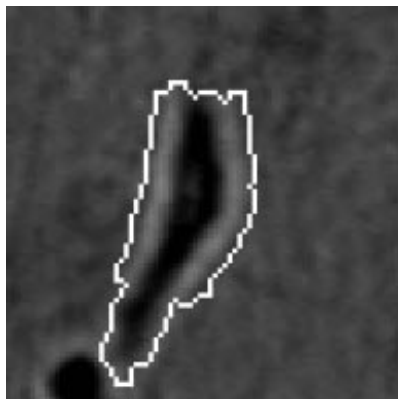


Abbildung 18

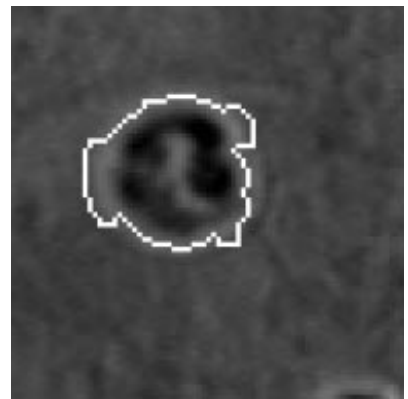


Abbildung 19

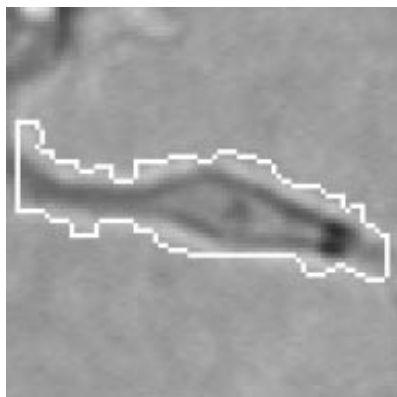


Abbildung 20

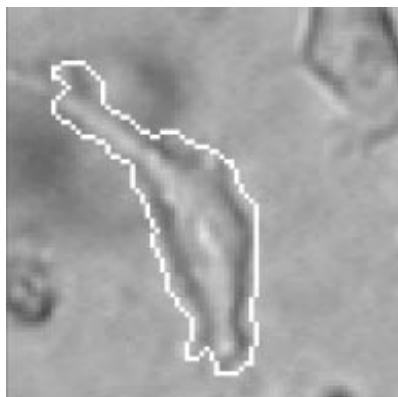


Abbildung 21

### 3.2.5 Zell-Tracking

- a) Statisches Verfahren: Dieses Verfahren stellt eine Version zur Zellverfolgung dar, die jedes Folgebild als unabhängig von der bisherigen Bildsequenz betrachtet. Es werden lediglich in jedem Bild über die Lokalisationsinformationen aus dem vorherigen Bild neue Zellsegmente gesucht und über die Regel der nächsten Nachbarschaft zugeordnet.
- b) Dynamische Verfahren: Bei diesen Verfahren werden die Segmentierungsparameter dynamisch für alle Zellen separat so verändert, dass die Zellsegmente einer Zelle über mindestens zwei Folgebilder möglichst selbstständig sind. Hierzu wird der Parameterraum, der sich aus den möglichen Segmentierungsparametern ergibt aufgespannt und bei einigen Varianten systematisch, bei anderen heuristisch durchsucht, um effizientere Ergebnisse zu bekommen.

### 3.2.6 Behandlung von Spezialfällen

Da in einer Probe in der Regel viele Zellen schwimmen, kann es zu diversen Komplikationen kommen. Hierzu gehören Pfadüberschneidungen, Kollisionen, Zellteilungen sowie das Ab- und Auftauchen von Zellen. Diese Fälle müssen angemessen definiert und behandelt werden.

#### 3.2.6.1 Pfadüberschneidungen

Im Falle von Pfadüberschneidungen schwimmt eine Zelle über einer anderen. Dieser Fall lässt sich visuell im allgemeinen Fall nicht unterscheiden von einer realen Kollision, da dies die zweidimensionale Bildinformation nicht hergibt.

Im Falle von Pfadüberschneidungen kommt es nicht zu gegenseitigen Störungen der betroffenen Zellen, was den Verlauf ihrer Trajektorien betrifft. In der Auswertung der vom AUTOZELL-System ermittelten Trajektorien werden lediglich die mittleren Geschwindigkeiten der zu verfolgenden Zellen benötigt. Aus diesem Grund ist es nicht notwendig, nach einer Pfadüberschneidung eine korrekte Zellzuordnung durchzuführen.

Im Falle von Pfadüberschneidungen wird, wie im Abschnitt *Zell-Cluster* beschrieben, verfahren.

#### 3.2.6.2 Kollisionen

Im Gegensatz zu Pfadüberschneidungen treffen im Falle von Kollisionen mindestens zwei Zellen in derselben Tiefenebene aufeinander.

Im Falle von Kollisionen wird, wie im Abschnitt *Zell-Cluster* beschrieben, verfahren.

#### 3.2.6.3 Zellteilungen

Zellteilungen können automatisch daran erkannt werden, dass das Flächensegment zunächst allmählich anwächst und irgendwann im Segmentierungsfenster zwei Zellen voneinander unterschieden werden können.

Zellteilungen werden als Spezialfall von Zell-Cluster aufgefasst, bei denen es vor Bildung des Clusters nicht zu einer Kollision kam. Entsprechend werden Zellteilungen behandelt, wie im Abschnitt *Zell-Cluster* beschrieben wird.

### 3.2.6.4 Zell-Cluster

Zell-Cluster entstehen entweder dann, wenn zwei Zellen real aufeinandertreffen oder wenn eine Zelle über einer anderen Zelle in einer anderen Ebene herschwimmt.

Im AUTOZELL Kontext bedeutet *Kollision* das wie auch immer geartete aufeinandertreffen von mindestens zwei Zellen aus der Perspektive der zweidimensionalen Bildebene, unabhängig davon, ob zwei Zellen tatsächlich in derselben Ebene aufeinanderstoßen (das sind Kollisionen) oder die eine Zelle über der anderen herschwimmt (das sind Pfadüberschneidungen). Mit *Cluster* wird das Gesamtsegment bezeichnet, das der Segmentierungsalgorithmus automatisch detektiert. Dieses Gesamtsegment ist gleich der Summe aller Zellsegmente die in der zweidimensionalen Bildebene kollidiert sind.

Das AUTOZELL-System stellt dem Benutzer zwei Varianten zur Verfügung: eine interaktive Kollisionsbehandlung, d.h. eine halb-automatische Version, die einige Benutzerinteraktionen erforderlich macht, sowie eine vollautomatische Variante.

In beiden Fällen überprüft das System für jede einzelne Zelle die Existenz einer Kollision, eines Zell-Clusters und die Beendigung eines Zell-Clusters. Sind zwei Zellen in demselben Zell-Cluster einbezogen, dann wird dieses für jede Zelle festgestellt und in ihrer Biographie fortgeschrieben. Auf der Ebene der Datenstrukturen für Cluster wird dagegen protokolliert, welche Zellen zur selben Cluster-Struktur gehören.

#### 3.2.6.4.1 Kriterien für den Bereich eines Cluster

Ein Cluster existiert von Bild  $k$  bis Bild  $l$  ( $l$  ist maximal das Ende der Bildserie).

a) statische Variante:

Ein Cluster hat einen Gültigkeitsbereich, der durch einen linken oberen und einen rechten unteren Eckpunkt definiert ist. Die Punkte ergeben sich aus dem Schwerpunkt der Zelle beim ersten Auftreten des Clusters und der Definition der Höhe und Breite eines Clusters.

b) dynamische Variante:

Ein Cluster hat einen Mittelpunkt (der aktuelle Schwerpunkt des Clustermittgliedes mit Index 0) und eine Umgebung um diesen Mittelpunkt, die sich aus der Definition der Höhe und Breite eines Clusters ergibt.

Eine Zelle kann nur in einem Bild  $n$  zum Bereich eines Clusters gehören, wenn

1. der Cluster in Bild  $n$  noch nicht beendet ist,
2. der Cluster in Bild  $n$  schon existiert,
3. der Schwerpunkt der Zelle im Gültigkeitsbereich (s.o.) liegt,
4. der Schwerpunkt der Zelle in der Fläche der ersten Clusterzelle liegt.

### 3.2.6.4.2 Interaktive Kollisionsbehandlung

Es werden Informationen über die letzte Segmentierung im vorherigen Bild benutzt. Die Schwellwerte für einen anormalen Zuwachs bzw. Schwund des Zellsegmentes werden vom eingestellten Trackingverfahren übernommen.

a) Wenn ein plötzlicher starker Größenzuwachs vorliegt, wird untersucht, ob die Zelle zum Bereich eines bereits bestehenden Clusters gehört.

Wenn dies der Fall ist, wird die Zelle, wenn sie bisher noch nicht zum Cluster gehörte, dem Cluster hinzugefügt. Eine Zelle, bei der ein erneutes starkes Wachsen zu beobachten ist und die bereits zu einem Cluster gehört, wird als zu dem entsprechenden Cluster als zugehörig erkannt. Andernfalls begründet die Zelle einen neuen Cluster, dessen Bereich aus dem Schwerpunkt der Zelle und zusätzlichen Parametern berechnet wird.

b) Wenn ein plötzlicher starker Größenschwund vorliegt, wird untersucht, ob die Zelle zu einem bereits bestehenden Cluster gehört

Wenn das der Fall ist, wird der Cluster aufgehoben und die Benutzerinteraktion aufgerufen, bei der der Benutzer Zuordnungen zwischen den Raumpunkten der Zellen des Clusters im letzten Bild vor dem Cluster und dem ersten Bild nach dem Cluster vornehmen kann.

D.h. wenn ein Cluster von Bild  $k$  bis Bild  $l$  existiert, dann sind Zuordnungen zwischen Bild  $k-1$  und Bild  $l+1$  zu machen.

Wenn bestimmten Zellen mehrere Nachfolger zugeordnet werden, werden diese zusätzlich neu instantiiert, vorausgesetzt, dass diese erfolgreich segmentiert werden können.

Bisher wird der Cluster aufgehoben, sobald bei einer Zelle des Clusters der Schwund auftritt. Die interaktiven Zuordnungen erfolgen nur einmal für alle Zellen des Clusters.

In einer Variante können einzelne Zu- und Abgänge von Zellen zu einem Cluster verwaltet werden. Der Cluster wird erst dann endgültig aufgehoben, wenn keine weiteren Zellen verklumpt sind. Die interaktive Zuordnung erfolgt dann bei jedem einzelnen Abgang.

Andernfalls wird der Schwund als mögliche Zellteilung interpretiert und die Benutzerinteraktion aufgerufen, bei der der Benutzer die Kinderzellen auswählen kann, die in die Population aufgenommen werden sollen. Bei nur einer Nachfolgezelle wird die Instanz beibehalten, ansonsten lebt die Elternzelle ab und die Kinderzellen werden neu instantiiert.

Dieser Fall entspricht auch einem plötzlichen Verlieren einer Zelle aufgrund schlechten Bildmaterials, bzw. aufgrund des Abtauchens einer Zelle.

### 3.2.6.4.3 Automatische Kollisionsbehandlung

Auch in dieser Variante werden Informationen über die letzte Segmentierung im vorherigen Bild benutzt.

a) Wenn ein plötzlicher starker Größenzuwachs vorliegt, wird untersucht, ob die Zelle zum Bereich eines bereits bestehenden Clusters gehört

Wenn das der Fall ist, wird die Zelle, wenn sie bisher noch nicht dazugehörte, zum Cluster hinzugefügt.

Andernfalls begründet die Zelle einen neuen Cluster.

b) Wenn ein plötzlicher starker Größenschwund vorliegt, wird untersucht, ob die Zelle zu einem bereits bestehenden Clusters gehört

Wenn das der Fall ist, wird der Cluster aufgehoben und versucht, alle möglichen Hinterbliebenen Zellen des Clusters zu bestimmen. Wenn eine Verklumpung mit einer Zelle vorlag, die nicht ursprünglich ausgewählt wurde, wird diese als möglicher Nachfolger der bisher getrackten Zelle neu instantiiert.

Andernfalls wird der Schwund als mögliche Zellteilung interpretiert und versucht, alle möglichen Kinderzellen der Zelle zu bestimmen. Eine Neuinstantiierung findet hier nur statt, wenn die Kinderzelle nicht den Ort einer bereits existierenden Zelle einnimmt. Wenn keine Kinderzelle den Ort der Elternzelle einnimmt, stirbt diese ab. Dieser Fall entspricht auch einem plötzlichen Verlieren einer Zelle aufgrund schlechten Bildmaterials.

### 3.2.6.5 Abtauchen / Auftauchen von Zellen

Aufgrund der Dreidimensionalität der Kollagenmatrix schwimmen Zellen nicht nur in einer Ebene, sondern verlassen gelegentlich ihre Ebene. Zellen verändern ihre optischen Eigenschaften hinsichtlich ihrer Grauwertverteilungen beim Auf- und Abtauchen. Dieser Umstand wird in der Zell-Identifikationskomponente insofern berücksichtigt, als das Segmentierungsverfahren grauwertinvariant ist.

### 3.2.7 Systemüberblick

Das AUTOZELL-System ist objektorientiert realisiert worden. Auf diese Weise konnte eine System-Modularität verwirklicht werden, die eine Flexibilität ermöglicht, die durch die erforderlichen Parametrisierungen der Verfahren notwendig ist.

In der Systemrealisierung sind die Bereiche Grafische-Benutzungsoberfläche, Zellsegmentierung, Zelltracking, Kollisionsauflösung und Ergebnis-Protokollierung zu unterscheiden.

Im folgenden UML-Diagramm ist die AUTOZELL- Systemrealisierung dargestellt. Die im System als relativ zu einander betrachteten Black-Box-Größen, sind durch grüne Rechtecke dargestellt (*Objekte*). Die Verbindungslinien veranschaulichen die Beziehungen der Objekte in dem AUTOZELL-System.

Das Diagramm zeigt lediglich die statischen Aspekte der Datenstrukturen. Die Algorithmen betreffen jeweils bestimmte Systemkomponenten und sind in den entsprechenden Objekten realisiert.

Insbesondere legen die Verfahren, die das Verhalten der Objekte bestimmen, fest, welche Aggregations- und Kompositionsbeziehungen zwischen den Objekten, zu welchen Zeitpunkten entstehen und vergehen.





## **4 Veröffentlichungen**

Aufgrund der Patentierungsabsichten (siehe Erfolgskontrollbericht) konnten bisher keine Veröffentlichungen gemacht werden.

## **5 Verwertung**

Auf ausdrücklichem Wunsch des Projektpartners Herrn Friedl sind alle Ergebnisse des Projektes geheimgehalten. Über zukünftige Verwertungen des Gesamtsystems finden derzeit noch Verhandlungen zwischen den Projektpartnern statt.

**Universität Bremen, den**