

DISS. ETH NO. 14998

**Algorithms for Detection and Tracking of Objects with  
Super-Resolution in 3D Fluorescence Microscopy**

**A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH**

For the degree of  
**Doctor of Sciences**

Presented by

**Dominik Michael Thomann**

Dipl. Phys. ETHZ

Born 06.08.1973

Citizen of Basel and Affeltrangen

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Gaudenz Danuser, examiner

Prof. Dr. Peter K. Sorger, co-examiner

Prof. Dr. Andreas Stemmer, co-examiner

2003

## Zusammenfassung

In dieser Doktorarbeit werden Algorithmen beschrieben zur automatisierten Analyse von Chromsomen-Dynamik in Hefezellen während der Zellteilung. Bei der Zellteilung werden die beiden replizierten Schwester-Chromatiden auseinander gezogen und die genetische Information auf die Mutter- und Tochterzelle verteilt. Um diesen Prozess zu sichtbar zu machen, markiert man die relevanten Proteine oder Proteinkomplexe mittels fluoreszierenden Marker und beobachtet den Ablauf in vivo unter dem Mikroskop. Das experimentelle Manipulieren und Visualisieren der Mechanismen sind dabei meist nicht die Hauptschwierigkeit. Die Probleme liegen vielmehr bei: i) der limitierten Auflösung von optischen Mikroskopen. Wenn die Schwester-Chromatide sich zu trennen beginnen, spielen sich Interaktionen im Nanometerbereich ab, was weit unter der klassischen Auflösung von Mikroskopen liegt. Und ii) der Analyse der riesigen Datenmenge. In Hefezellen dauert das Separieren der Chromsomen etwa eine halbe Stunde, wobei man die Marker während der gesamten Zeit filmt. Eine solche Untersuchung ergibt riesige Datensätze (>100MB) und ist deshalb enorm aufwändig.

In dieser Doktorarbeit wird ein Weg eingeschlagen, der diese beiden Probleme mit Hilfe von automatisierter, rechnergestützter Bildanalyse lösen will. Die Algorithmen beschränken sich dabei auf die Erkennung, Lokalisierung und das Tracking von einer beschränkten Anzahl fluoreszierenden Marker in stark verrauschten 3D Daten. Es wird vorausgesetzt, dass die Größe der Marker unterhalb der Auflösung des Mikroskops liegen und damit das Bild der Marker genau der Point-Spread-Function entspricht.

Die erreichbare Genauigkeit einer Messung in den Bilddaten ist begrenzt durch die Qualität der Daten. Deshalb es wichtig, dass Fehler beim Aufnehmen der Daten vermieden werden oder zumindest genau bekannt sind, damit man sie im nachhinein korrigieren kann. In biologischer 3D Mikroskopie treten vor allem bei dickeren Objekten Verzerrungen im Bild auf wenn sich der Brechungsindex ändert. Im ersten Teil der Arbeit wird deshalb ein Verfahren präsentiert, wo mit Hilfe von

Kalibrationskörpern solche Fehler punktuell gemessen und dann auf das Ganze beobachtete Feld interpoliert werden. Damit lassen sich die Abbildungsfehler in den biologischen Daten im nachhinein zurückrechnen.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Detektierung und der Lokalisierung der Fluoreszenz-Marker. Die beiden Hauptprobleme dabei sind das geringe Signal-Rausch Verhältnis(SNR) und die Signalinterferenz wenn zwei oder mehr Marker nahe beieinander liegen. Der beschriebene Algorithmus kann Marker, die sich in einem Abstand bis zur Hälfte der klassischen Auflösungsgrenze befinden, korrekt lokalisieren, selbst bei tiefen SNR-Werten im Bereich zwischen 5 bis 10. Die Leistung des Algorithmus wird an Hand der Detektierung von Marker in realen Hefe-Daten aufgezeigt.

Im dritten Teil wird ein Tracking Algorithmus präsentiert, der auf dem Detektions Algorithmus aufbaut. Im Gegensatz zur Detektion, wo die Marker im Datensatz zu jedem Zeitpunkt unabhängig von den anderen Zeitpunkten lokalisiert werden, findet im Tracker eine dynamische Analyse von zwei aufeinanderfolgenden Zeitschritten statt. Dies hat zur Folge, dass erstens die Auflösung weiter erhöht werden kann und zweitens die Analyse stabiler wird. Ausserdem erhält man auf Grund der dynamischen Analyse automatisch auch die Trajektorien der Marker über die gesamte Zeitserie, diese benötigt man für weitergehende Untersuchungen der biologischen Prozesse.

## Summary

This thesis reports an integrated software system for the analysis of chromosome dynamics during mitosis of yeast cells. Mitotic chromosome segregation is the process by which replicated sister chromatids are divided equally into two physically separated sets around which daughter cells form. To visualize this process, relevant proteins or protein complexes are labeled with fluorescent tags and their dynamics is observed in live cells under the microscope. It turns out that the experimental manipulation and visualization are not the main difficulty. In fact, the problems are rather due to: i) The limited resolution of optical microscopes. At the onset of mitosis the sister chromatids interact on the nanometer scale, which is far below the optical diffraction limit. ii) The second problem is the amount of data generated. The chromosome segregation in yeast cells lasts for about half an hour during which the movement is recorded. Such an assay yields enormous data sets (>100MB) whose analysis is very cumbersome.

In this thesis we suggest therefore to address this problems with the help of automated computer analysis. The presented algorithms are designed for the detection, localization and tracking of a finite number of fluorescent markers in noisy 3D data. It is assumed that the tags are sub-resolution features and thus their image corresponds to the point spread function of the microscope.

The accuracy of measurements performed in the acquired images is limited by the quality of the data. It is therefore important that errors in the acquisition process are eliminated or at least that the error is exactly known, such that it can be corrected in post processing. In 3D microscopy of biological samples image distortions occur because of changes in refractive index. This effect is especially prominent in thick samples. In the Chapter 2 of this thesis a framework is presented, that measures imaging errors with the help of calibration objects at random positions and interpolates the distortions to the full depth of field. With this information the acquired biological data can be corrected in mathematical post processing.

In Chapter 3 an algorithm is presented for the detection and localization of fluorescent tags. The two main problems addressed are the low signal-to-noise ratio

(SNR) and the signal interference when two or more tags are at very close distances. Using synthetic data it is shown that the algorithm is capable of localizing tags that are separated by half the classical resolution limit even for SNR-values as low as 5 to 10. The performance of the algorithm is confirmed on yeast data for the detection of fluorescent tags.

In Chapter 4 the detection algorithm is extended to a full relative tracker. In contrast to the detection, where tag segmentation is performed at single time points, the tracker includes dynamic information of subsequent time points. This results in a further increase in resolution and more robust tag localization. An additional advantage of the dynamic information extraction is that the full tag trajectories are obtained, which are required for a subsequent analysis and interpretation of the biological data.