

Konfokale Lichtscheiben–Fluoreszenzmikroskopie

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich–Wilhelms–Universität Bonn

vorgelegt von

Eugen Baumgart

aus

Krasnogorka (MD)

Bonn, Juni 2014

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck
2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel

Tag der Promotion: 29. September 2014

Erscheinungsjahr: 2014

Für Sarah

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Lichtscheiben–Fluoreszenzmikroskopie	8
1.3	Zielsetzung	11
2	Theorie	13
2.1	Geometrische Optik	13
2.2	Fokale, afokale und telezentrische Systeme	14
2.3	Fokussierung von Gaußstrahlen	16
2.4	Theorie der konfokalen Bildentstehung im wellenoptischen Bild	17
2.5	Das konfokale Mikroskop	20
2.6	Die Punktabbildungsfunktion beim konfokalen LSFM	22
2.7	Wellenoptik und Seidel–Aberrationen	23
2.8	Definition des Bildkontrastes	25
3	Beschreibung des Mikroskops und seiner Spezifikationen	27
3.1	Prinzip	29
3.2	Beschreibung des experimentellen Aufbaus	30
3.3	Der Einfluß der Probenküvette	33
3.4	Defokus–Korrektur	35
3.5	CMOS Detektor und der Rolling Shutter	38
3.6	Elektronik zur Steuerung des Mikroskops	40
3.7	Synchronisation zwischen Scanspiegel und Kamera	42

3.8	Die Rolle der Kalibrationsspiegel bei der Strahlpositionierung	44
3.8.1	Berechnung der beleuchteten Scanebene	46
4	Numerische Optimierung und Analyse der Abbildungsleistung	49
4.1	Konzeption der Beleuchtung	49
4.2	Raytracing	50
4.2.1	Optimieren der Strahlaufweitung	50
4.2.2	Optimieren des optischen Relais	50
4.2.3	Axialer chromatischer Fehler	54
4.3	Die Punktabbildungsfunktion des konfokalen LSM	55
4.3.1	Ausdehnung des Beleuchtungsfokus und der Abbildungs-PSF	55
4.3.2	Auswirkung des Schlitzdetektors auf die Punktabbildungsfunktion	57
4.4	Tiefendiskriminierung	60
4.5	Beleuchtungshomogenität	61
5	Charakterisierung des Mikroskops	63
5.1	Das Beleuchtungsobjektiv und die Lage der fokalen Ebenen	63
5.2	Detektion der Strahlposition und Kalibrierung des Mikroskops	65
5.2.1	Messung der Lage des Beleuchtungsstrahls und der Position des Anregungsfokus	65
5.2.2	Gemessene Rayleighlänge und Fokusdicke des Beleuchtungsstrahls	68
5.2.3	Berechnete Strahl-Positionierungsgenauigkeit	69
5.2.4	Gemessene Strahl-Positionierungsgenauigkeit und Linearität der Strahlbewegung	70
5.3	Anpassen der Scanebene	72
5.4	Optimierung der Synchronisation von Beleuchtung und Rolling Shutter	72
5.5	Kompensation des Defokus während der Probenpositionierung	74
5.5.1	Quantifizierung des Beleuchtungs-Defokus	74
5.5.2	Quantifizierung des Detektions-Defokus	74
5.5.3	Weitere Quellen für Defokus	74
5.6	Quantifizierung des konfokalen Effekts	76

5.6.1	Die Auswirkung des Spaltendetektors auf die Punktabbildungsfunktion	76
5.6.2	Verbesserung von Kontrast und Signal zu Rausch Verhältnis	78
5.6.3	Residuelles Streulicht	80
6	Biologische Anwendungen	81
6.1	Abbildung eines mit BABB behandelten Mausembryo-Gehirns	85
6.2	Abbildung der Polytänchromosomen im Kern der <i>C. tentans</i> Speicheldrüsenzelle	89
6.3	Abbildung der Myelinisierung von Zebrafisch-Axonon durch Oligodendrozyten	92
6.3.1	Vergleich von konventioneller und konfokaler Detektion	93
6.3.2	Kontrast als Funktion der Abbildungstiefe	95
7	Diskussion und Ausblick	99
7.1	Zusammenfassung der numerischen Ergebnisse	101
7.2	Vergleich von konventionellen und konfokalen Daten	103
7.3	Ausblick	104

Zusammenfassung

Mit dem Aufkommen der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie hat sich eine Möglichkeit der dreidimensionalen Abbildung biologischer Proben mit einem bis dahin noch nie dagewesenem Signal-zu-Hintergrundverhältnis eröffnet. Durch punktwises Beleuchten und Verwendung einer sogenannten konfokalen Blende in einer zum Objektivfokus konjugierten Ebene kann eine sehr scharfe Trennung zwischen Fluoreszenzlicht, das aus der beobachteten Objekzebene herrührt, und unspezifischem Hintergrundlicht erzielt werden. Nachteilig jedoch ist zum einen eine lange Aufnahmedauer, da die Probe Punkt für Punkt gerastert werden muss, und zum anderen eine hohe Belastung durch das Anregungslicht, was insbesondere beim Aufnehmen von dreidimensionalen Datensätzen zu starkem Bleichen der Fluoreszenzmoleküle in der Probe und zu phototoxischen Effekten führt.

Einen alternativen Ansatz bietet seit einigen Jahren die Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie. Hier sind Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang getrennt und orthogonal zueinander angeordnet, mit dem Resultat, dass nur die untersuchte Fokusebene beleuchtet wird und so die Gesamtbeleuchtungsintensität bei der Bildaufnahme deutlich reduziert ist. Die Detektor-Blende ist hier obsolet, da die axiale Selektivität aus der eingegrenzten Beleuchtungsintensitätsverteilung resultiert. Nichtsdestotrotz könnte ein konfokales Detektionsschema auch bei der selektiven Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie von Vorteil sein, da dann Streulicht, das zu einer Verminderung des Bildkontrastes führt, unterdrückt würde. Im Rahmen dieser Arbeit soll eine solche Kombination realisiert und eine mögliche Verbesserung der Bilddaten untersucht werden. Hierzu wurde ein Lichtscheibenmikroskop mit gerastertem Beleuchtungsstrahl entwickelt. Zum ersten Mal wurde bei einem solchen Mikroskop eine konfokale Zeilendetektion mit Hilfe des sogenannten *Rolling Shutters* einer CMOS-Kamera (*Complementary metal-oxide-semiconductor*) verwirklicht. Im Fokus stand die Untersuchung der optischen Eigenschaften einer solchen Kombination von Lichtblatt-Beleuchtung und konfokaler Zeilendetektion. Die theoretische Form der Punktabbildungsfunktion wurde berechnet und mit praktischen Messungen verglichen. Insbesondere wurde der Frage nachgegangen, wie stark hierbei der Gewinn in der Bildqualität ist und welche potentiellen Vorteile beim Studium biologischer Proben hierdurch entstehen. Als Herausforderung hat sich die Konstruktion eines solchen Gerätes herausgestellt, da es höchste Anforderung an mechanische Präzision und zeitliche Synchronisation zwischen Beleuchtung und Detektion stellt.

Zuletzt wurden mit dem entwickelten Mikroskop unterschiedliche biologische Modellorganismen aus aktuellen Forschungsbereichen untersucht. Dies sollte die Vorteile des konfokalen Detektionsschemas in der Anwendung demonstrieren. Im Fokus lag dabei die Untersuchung der Myelinisierung von Axonen entlang des Rückenmarks in Zebrafischen. Myelinscheiden,

die sich um die Nervenfasern bilden, befinden sich in einer Tiefe von 50 bis 100 μm im Organismus und haben einen Durchmesser von etwa einem Mikrometer. Da das Fluoreszenzlicht aus diesen Probenbereichen eine große Strecke durch heterogenes biologisches Gewebe zurücklegen muss, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es dabei gestreut wird. Dies führt zu einem unspezifischen Signal im resultierenden Bild und vermindert den Kontrast. Die Untersuchung mit einem Lichtscheibenfluoreszenzmikroskop ohne konfokale Diskriminierung wird in diesem Fall erschwert, da feine Details häufig nicht mehr zu erkennen sind.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Motivation

Ein abbildendes System wird in erster Linie durch sein Auflösungsvermögen charakterisiert, da dieses bestimmt bis zu welchem Detailgrad Strukturen im Bild erkennbar sind und quantitativ erfasst werden können. Unter idealen Bedingungen und frei von Aberrationen ist die Abbildung beugungsbegrenzt und erreicht eine untere Grenze, die durch die Wellenlänge und numerische Apertur des Objektivs bestimmt wird. Für die Fluoreszenzmikroskopie bedeutet dies, dass die kleinsten zu erkennenden Strukturen durch die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes definiert werden. Das Bild eines Punktemitters wird durch eine Airy-Funktion beschrieben, charakterisiert durch den Airy-Radius. Dieser ist gleich dem Abstand zwischen dem zentralen Intensitätsmaximum und dem ersten Minimum ([Hec01]):

$$r = \frac{0.61\lambda}{NA} \tag{1.1}$$

wobei NA die numerische Apertur des Systems und λ die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist. Hierbei handelt es sich um das Rayleigh-Kriterium, ein heuristischer Ansatz zur Beschreibung des Auflösungsvermögens. Es besagt, dass die Bilder von zwei Punktemittern dann noch gerade unterschieden werden können, wenn das Hauptmaximum des Ersten auf das erste Intensitätsminimum des Zweiten fällt. Daneben gibt es noch weitere äquivalente Maße zur Charakterisierung der Abbildungsleistung, wie z.B. das Sparrow-Kriterium ([Spa16]) oder die Strehl-Zahl ([Str95]). Da die numerische Apertur einer Linse maximal gleich dem Brechungsindex des umgebenden Mediums sein kann, wird somit eine fundamentale Auflösungsgrenze durch die Wellenlänge des Lichtes gesetzt. Jedoch geht man dabei davon aus, dass das von den Punktemittern ausgesandte Lichtfeld sich ungestört zur Linse bewegen kann.

Die Realität zeichnet allerdings ein anderes Bild. Die Vielfalt und Komplexität der In-

teraktion von Licht mit biologischem Gewebe ist nur schwer berechenbar und kann einen starken Einfluss auf das resultierende Bild haben. Zugleich ist man bei der Mikroskopie biologischer Proben häufig an Strukturen und Prozessen interessiert, die tief im untersuchten Objekt liegen. Um den Anteil des Bildhintergrunds zu reduzieren, der durch in der Probe gestreutes Licht sowie durch Licht von außerhalb des Bildfokus entsteht, werden traditionell Gewebeschnitte mit einer Dicke von nicht mehr als $10 - 20 \mu\text{m}$ angefertigt, so dass diese mit einem Durchlicht- oder Auflichtmikroskop (auch *Epi*-Mikroskop genannt) betrachtet werden können. Auch kann die Transparenz einer Probe durch chemische Behandlung erhöht werden ([SAP⁺02]). Soll die Probe allerdings möglichst intakt sein oder gar ein lebender Organismus untersucht werden, muss man sich der Problematik der Abbildung in ausgedehnten biologischen Systemen stellen. Hierbei treten Prozesse auf, die die Bewegung der Photonen durch das Gewebe beeinflussen und zu Streuung, unspezifischem Hintergrund und Kontrastverlust führen ([BEJ⁺95]), ([HD05]). Dies macht eine differenziertere Betrachtung des Abbildungsprozesses erforderlich.

Eine detaillierte Beschreibung der dreidimensionalen Abbildung eines punktförmigen Objekts im Ortsraum wird durch die Punktabbildungsfunktion (auch Punktspreizfunktion, PSF) beschrieben. Je kleiner deren Ausdehnung ist, desto besser ist das Auflösungsvermögen eines Mikroskops. Ihr Äquivalent im Frequenzraum ist die optische Transferfunktion (OTF). Abb. 1.1 soll die enge Verknüpfung zwischen räumlichem Auflösungsvermögen und Kontrast eines Bildes veranschaulichen. PSF und OTF können ausgehend von der Amplituden- und Phasenverteilung $T(x,y)$ in der Pupillenebene einer Linse oder eines Objektivs berechnet werden. Die Fourier-Transformierte von $T(x,y)$ beschreibt dann die Feldverteilung $A(x_F,y_F)$ im Fokus des Objektivs und wird Amplituden-PSF genannt. Der Absolutbetrag hiervon ist die Intensitäts-PSF $S(x_F,y_F)$. Durch Fourier-Transformation dieser gelangt man zur OTF $F(\omega_x,\omega_y)$. Alternativ kann mit Hilfe des Korrelationstheorems für die Fourier-Transformation die OTF auch direkt durch Autokorrelation von $T(x,y)$ berechnet werden ([MM04]).

Die optische Transferfunktion ist eine komplexe Größe und kann geschrieben werden als $F(\omega) = M(\omega) \exp(i\Phi(\omega))$. Das Amplitudenspektrum $M(\omega)$ der Fourier-Transformation der PSF ist die Modulationstransferfunktion (MTF). Das Phasenspektrum $\Phi(\omega)$ wird Phasentransferfunktion (PTF) genannt. Die MTF beschreibt den Abbildungscontrast eines sinusförmigen Intensitätsgitters, also wie gut die einzelnen Linien bei unterschiedlichen räumlichen Frequenzen voneinander zu unterscheiden sind.

Im wellenoptischen Bild wird eine ideale Linse dadurch definiert, dass sie eine ebene elektromagnetische Welle in eine sphärische Welle transformiert. Die Oberflächen konstanter Phase des elektrischen Feldes bilden dann perfekte Kugelsegmente die konzentrisch zum Fokuspunkt konvergieren. Bei realen Linsen kann die Form der Phasenoberfläche allerdings abweichen, was zu Abbildungsfehlern führt. Die Abbildungsqualität wird deshalb unter anderem durch die Differenz der Oberfläche konstanter Phasen der realen fokussierten Welle

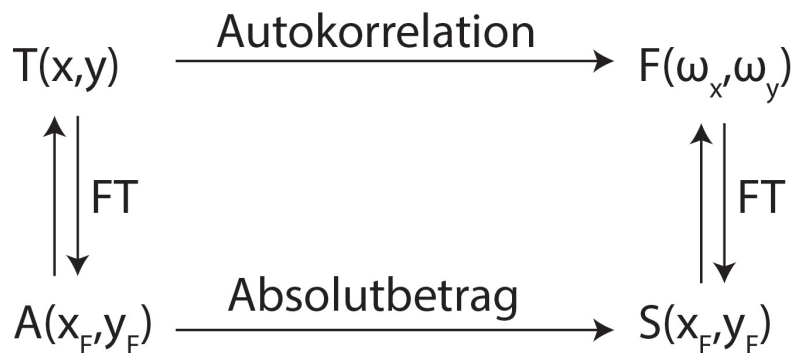


Abbildung 1.1: Zusammenhang zwischen der Pupillenfunktion $T(x,y)$, der Amplituden-PSF $A(x_F, y_F)$, der Intensitäts-PSF $S(x_F, y_F)$ und der Optischen Transferfunktion $F(\omega_x, \omega_y)$. Die OTF ist eine komplexe Größe und beschreibt Phase und Kontrast eines abgebildeten, periodischen Gitters. Ihr Realteil, die MTF, beschreibt dabei wie gut der Kontrast des Gitters erhalten bleibt. MTF und OTF sind demnach direkt miteinander verknüpft. Verschlechtert sich zum Beispiel der Kontrast durch Auftreten eines unspezifischen Bildhintergrundes, wirkt sich dies direkt nachteilig auf das Auflösungsvermögen des gesamten Systems aus.

zu einer idealen sphärischen Welle gemessen. Werden optische Aberrationen soweit minimiert, dass die maximale Abweichung von der idealen Wellenfront kleiner als $\lambda/4$ ist, so ist auch die Übertragung des Kontrastes maximiert ([BAR65]). Bildschärfe und Kontrast hängen jedoch nicht nur von dem abbildenden System ab, sondern auch von den Strukturen in der Probe selbst.

Der Beleuchtungsstrahlengang eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops gleicht dem eines Auflichtmikroskops. Die Probe wird mit einer Lichtquelle beleuchtet, deren Wellenlänge auf das Anregungsmaximum der verwendeten Fluorophore abgestimmt ist und diese zur Fluoreszenz anregt.

Auf dem Weg durch die Probe unterliegt das emittierte Licht unterschiedlichen Prozessen, die die Propagationsrichtung und Energie der Photonen ändern oder diese gar gänzlich auslöschen können ([Nie07]). Hierzu gehören Beugung und Reflexion an Grenzschichten mit unterschiedlichen Brechungsindizes, die elastische und stark wellenlängenabhängige Rayleigh-Streuung an Molekülen und die wellenlängenunabhängige und anisotrope Mie-Streuung an größeren Objekten wie Zellorganellen, die von der Umgebung abweichende Brechungsindizes haben. Trifft ein Photon auf ein Elektron, kann es vollständig absorbiert oder auch mit einer größeren oder kleineren Energie re-emittiert werden, man spricht dann von Raman-Streuung.

Durch diese Prozesse wird die Phasenoberfläche der Welle an verschiedenen Punkten im Raum unterschiedlich stark deformiert. Eine von einem Fluorophor ausgehende, sphärische Welle wird durch ein ideales Mikroskopobjektiv in eine planare Welle umgewandelt. Diese wiederum wird durch die Tubuslinse auf einem Flächendetektor wie z.B. einem CCD- oder CMOS-Sensor fokussiert. Analog zur Deformation der Phasenoberfläche durch optische

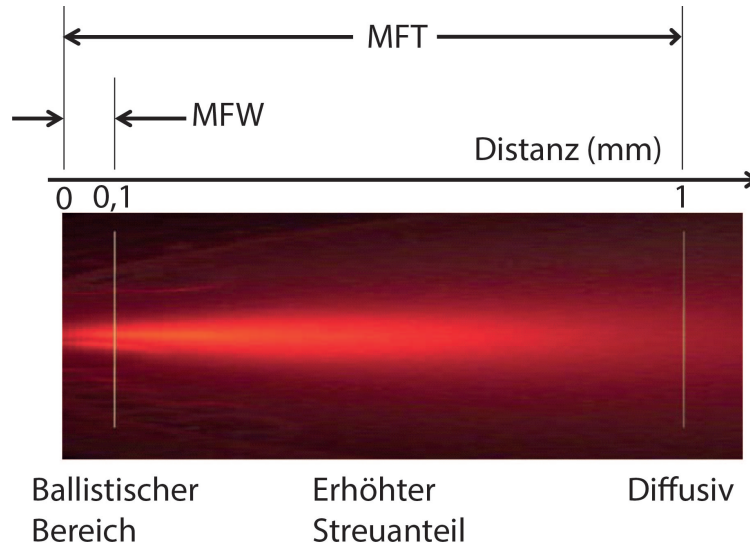


Abbildung 1.2: Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon gestreut wird hängt vom Streukoeffizienten ab. Je weiter die Strecke ist, die es durch ein optisch inhomogenes Medium zurücklegen muss, desto wahrscheinlicher ist es, dass es einmal oder mehrmals gestreut wird. Bei biologischem Gewebe beträgt die Weglänge, ab der der Anteil gestreuter Photonen dominiert, etwa $100 \mu\text{m}$. Nach [NTZ10].

Aberrationen führt eine Störung der elektromagnetischen Welle durch die Probe allerdings auch zu einem Verlust von Kontrast und Auflösung der Bilddaten.

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines dieser Prozesse beim Durchqueren einer bestimmten Strecke durch ein inhomogenes Medium folgt einem exponentiellen Gesetz und wird durch den Absorptionskoeffizienten μ_a und den Streukoeffizienten μ_s bestimmt. Die Summe $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ nennt man Extinktionskoeffizient und dessen reziproken Wert $1/\mu_t$ die mittlere freie Weglänge (MFW). Biologisches Gewebe ist im Submillimeterbereich transparent, es überwiegen die Streuprozesse gegenüber der Absorption. Somit kann vereinfacht der Extinktionskoeffizient dem Streukoeffizienten gleichgesetzt werden: $\mu_t \approx \mu_s$.

Streuung ist ein Prozess bei dem ein Photon von der Elektronenwolke eines Moleküls absorbiert und wieder re-emittiert wird. Kleine Moleküle, die vereinfacht als Hertzsche Dipole genähert werden können deren räumliche Orientierung zufällig ist, streuen Photonen isotrop. Um die anisotrope Streuung an größeren Proteinen und Zellorganellen zu beschreiben wird ein Anisotropie-Faktor g eingeführt. Dieser ist gleich der Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon in Vorwärtsrichtung gestreut wird. Der reduzierte Streukoeffizient kann durch $\mu'_s = (1 - g)\mu_s$ definiert werden ([BOCY97],[Arr99], [BOCY94], [Sch97]). Bei anisotroper Streuung beschreibt der reziproke Wert $1/\mu'_s$ die mittlere freie Transportlänge (MFT), nach der ein Photon diffusives Verhalten aufweist, seine ursprüngliche Richtungsinformation also vollständig verloren gegangen ist. Analog zur MFW bei isotroper Streuung geht bei anisotroper Streuung die Richtungsinformation der Photonen ab einer Strecke gleich der MFT verloren.

Im Fall elastischer Streuung kann man die vom Emitter ausgehenden und vom Bildsensor detektierten Photonen in sog. ballistische und gestreute unterteilen. Als ballistisch bezeichnet man dabei solche, die ohne Wechselwirkung die Probe passieren. Bei Weglängen weit unterhalb der MFW tragen ballistische Photonen dominierend zum entstehenden Bild bei. Mit zunehmender Abbildungstiefe, in dieser Arbeit definiert als der Abstand zwischen dem Deckglas und der Betrachteten Objektebene, erhöht sich allerdings der Anteil gestreuter Photonen. Bei Abbildungstiefen jenseits der MFW erfährt der Großteil der Photonen mindestens ein Streueignis. Liegt die Abbildungstiefe in der Größenordnung der MFT, ist die Bewegung der Photonen durch das Gewebe durch Diffusion dominiert und eine direkte Abbildung nicht mehr möglich.

Abb. 1.2 veranschaulicht diesen Sachverhalt und zeigt, dass drei Zonen existieren: Der ballistische Bereich, ein Bereich mit erhöhtem Streuanteil und ein diffusiver Bereich. Die mittlere freie Weglänge in diesem Beispiel beträgt $100\ \mu\text{m}$, was auch etwa der Größenordnung für biologisches Gewebe entspricht ([BEJ⁺95]).

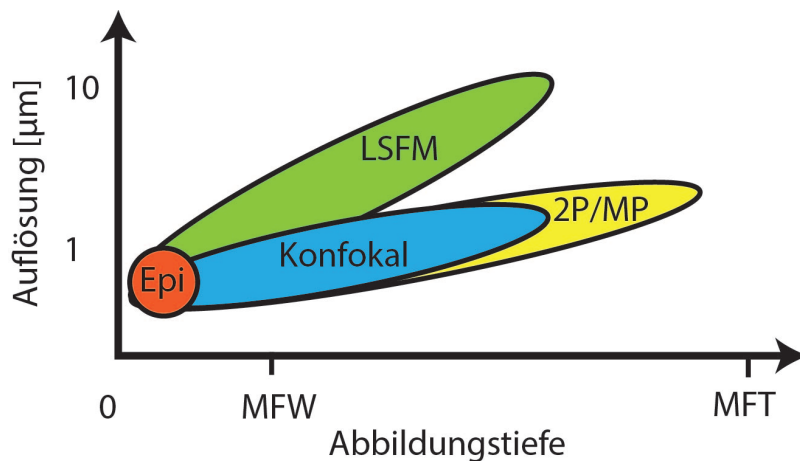


Abbildung 1.3: Vergleich des effektiven Auflösungsvermögens als Funktion der Abbildungstiefe. Der beugungsbegrenzte Bereich bei der *Epi*-Mikroskopie ist auf relativ dünne Proben wie histologische Schnitte oder dünne Zellschichten am Deckglas beschränkt. Durch die Beleuchtung der gesamten Probe entsteht ein dominanter, unspezifischer Bildhintergrund. Durch selektive Beleuchtung der Ebene im Beobachtungsfokus kann mit *LSFM* die Abbildungstiefe signifikant erhöht werden. Allerdings nimmt auch hier der Bildkontrast jenseits der *MFW* stark ab. Konfokale Mikroskopie verbessert hier die Auflösung, da durch die konfokale Lochblende Streulicht gefiltert wird. Zwei-Photonen- und Multiphotonenmikroskopie (*2P/MP*) erhöhen die Abbildungstiefe durch das Ausnutzen der höheren Eindringtiefe im nahen infraroten Wellenlängenbereich und durch eine räumlich begrenzte Fluoreszenzanregung. Abbildung modifiziert nach [NTZ10].

Abb. 1.3 gibt einen qualitativen Vergleich der effektiv erreichbaren Auflösung in Abhängigkeit der Abbildungstiefe unterschiedlicher Methoden der Fluoreszenzmikroskopie wieder. So kann bei *Epi*-Fluoreszenzmikroskopie zwar beugungsbegrenzte Auflösung erreicht werden, allerdings ist diese auf Zell-Monolagen oder Gewebeschnitte mit einer Dicke von maximal $10 - 20\ \mu\text{m}$ beschränkt. Der Grund liegt darin, dass für Anregung und Detektion der gleiche

Strahlengang verwendet wird, wodurch das gesamte Probenvolumen beleuchtet wird. Dies führt zu einem hohen, unspezifischen Bildhintergrund.

Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie (LSFM) verringert dieses Problem, indem nur die beobachtete Ebene mit einem dünnen Lichtblatt beleuchtet wird ([SZ03], [VBS93], [San11]). Dies ermöglicht die Erhöhung der Abbildungstiefe auf ein Mehrfaches der MFW. Dabei ist zu beachten, dass die mögliche Auflösung mit zunehmender Eindringtiefe deutlich abnimmt. Die Probe kann durch Behandlung mit BABB (1:2 Benzylalkohol und Benzylbenzoat) optisch homogenisiert werden, jedoch ist dieses Verfahren nur bei Post-mortem-Untersuchungen anwendbar. Für Studien an lebende Proben ist ein physikalischer Ansatz notwendig.

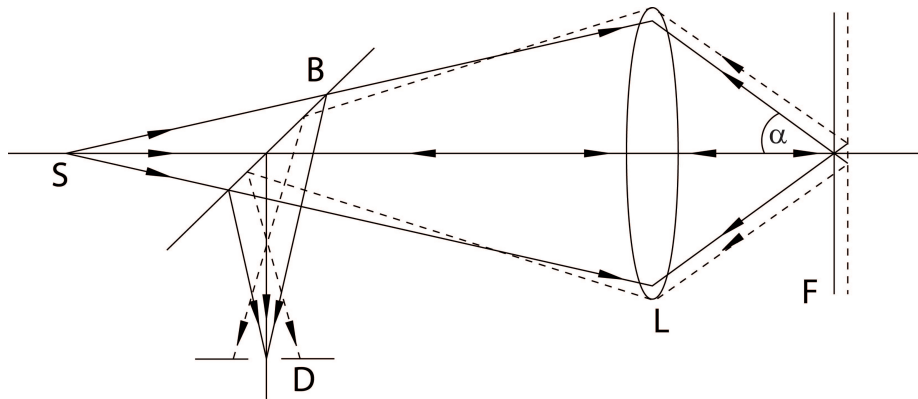


Abbildung 1.4: Prinzip der konfokalen Mikroskopie nach [Min61]. *S* ist die Lichtquelle und regt ein Fluorophor im Fokus *F* der Linse *L* an. Fluoreszenzlicht wird durch die gleiche Linse über einen Dichromaten *B* auf einen Punktdetektor *D* fokussiert. Die Position des Punktdetektors und des Anregungsfokus sind zueinander konjugiert. Licht von außerhalb des Beleuchtungsfokus (gestrichelte Linie) wird nicht in *D* fokussiert und somit nicht detektiert. Hierzu zählen Hintergrundfluoreszenz und gestreute Photonen.

Konfokale Mikroskopie erlaubt eine Erhöhung der Abbildungstiefe bei gleichzeitigem Beibehalten der optischen Abbildungsleistung. Erreicht wird dies durch Filtern des Hintergrundlichtes mittels eines Punktdetektors oder mit einem Flächendetektor mitsamt einer Lochmaske in dem zum Beleuchtungsfokus konjugierten Punkt. Die Beleuchtung erfolgt mit einem fokussierten Laser, der die untersuchte Probenebene Punkt für Punkt rastert und so Pixel für Pixel ein Bild erzeugt. Die Kombination aus räumlich begrenzter Anregung der Probe und räumlich selektiver Detektion führt zu einer konfokalen Diskriminierung (Abb. 1.4). Licht aus dem Anregungsfokus *F* der Linse *L* wird über einen Dichromaten in den Mittelpunkt einer Lochblende in der Bildebene *D* fokussiert. Hintergrundlicht, in der Abbildung durch die gestrichelte Linie dargestellt, kann die Blende nicht passieren und wird somit nicht detektiert. Streulicht wird ebenfalls nicht ins Zentrum der Blende fokussiert und somit ausgeschlossen. Dies ermöglicht die Aufnahme von dreidimensionalen Bilddaten mit hohem Kontrast und guter Tiefenselektion.

In der Zweiphotonen- (2P) oder Multiphotonenmikroskopie (MP) werden Fluorophore nichtlinear angeregt ([HD05]). Wird bei der linearen Mikroskopie jeweils aus einem Anregungs-Photon ein Fluoreszenz-Photon, werden hier zwei oder mehr Photonen verwendet, die innerhalb eines kurzen Zeitintervalls (ca. 0,5 fs) von der Elektronenwolke eines Fluorophors absorbiert werden müssen, um diese auf ein höheres Energieniveau anzuregen. Die anschließende Relaxation durch Fluoreszenz erfolgt in gleicher Weise wie im linearen Fall, wobei hier die Energie des emittierten Photons in etwa gleich der Summe der Energien der absorbierten Photonen ist. Diese Prozesse erfordern eine sehr hohe Lichtintensität, die zum Beispiel durch Fokussierung des Anregungsstrahls durch ein Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur erzielt werden kann. Da die Intensität außerhalb des Beleuchtungsfokus rasch abnimmt, ist das Anregungsvolumen sehr klein und vergleichbar mit dem Volumen aus dem Fluoreszenz beim konfokalen Einzelphotonenmikroskop detektiert wird. Bei der Multiphotonenmikroskopie wird somit nur die Anregungsebene selektiv angeregt, was eine hohe Tiefendiskriminierung ermöglicht und das Bleichen von Farbstoffen außerhalb des Anregungsfokus vermeidet. Als Lichtquelle werden gepulste Laser mit Wellenlängen im Nahinfraroten Bereich (etwa 800 nm–1300 nm) und Pulslängen in der Größenordnung von 100 fs verwendet. Da neben der räumlichen auch die zeitliche Fokussierung für die Multiphotonenanregung von Bedeutung ist, kann die Fluoreszenzintensität durch Verkürzen der Laserpulsdauer und Pulswiederholfrequenz gesteigert werden. Durch die punktuelle Fluoreszenzanregung ist die Verwendung einer konfokalen Lochblende obsolet und es können sogar gestreute Fluoreszenzphotonen zur Bilderzeugung genutzt werden. Aufgrund der Verwendung von Infrarotlicht wird der Anteil des durch die wellenlängenabhängige Rayleighstreuung abgelenkten Anregungslichts verringert und die Ausdehnung des Anregungsvolumens verkleinert.

Darüber hinaus gibt es bei einem *Epi*-Fluoreszenzmikroskop die Möglichkeit mit Hilfe von strukturierter Beleuchtung (SIM, *Structured Illumination Microscopy*) den Bildkontrast durch Diskriminieren des Hintergrundes zu erhöhen ([LM63], [Gus00], [MK10], [Mer11]). Diese Methode basiert darauf, dass die Probe mit einem meist sinusförmigen Muster beleuchtet wird. Dabei sind mehrere Beleuchtungsschritte mit unterschiedlicher Phase (0° , 120° und 240°) notwendig. Das kontrastverbesserte Bild I lässt sich dann aus diesen Bildern (I_{0° , I_{120° , I_{240°) berechnen ([NJW97]):

$$I = \sqrt{\frac{1}{2} ((I_{0^\circ} - I_{120^\circ})^2 + (I_{120^\circ} - I_{240^\circ})^2 + (I_{240^\circ} - I_{0^\circ})^2)} \quad (1.2)$$

Die Nachteile sind zum einen, dass mehrere Belichtungsschritte mit unterschiedlicher Phase des Intensitätsgitters nötig sind. Zum anderen hängt das Resultat auch vom Kontrast des Beleuchtungsmusters selber ab. Da die Rohdaten in *Epi*-Konfiguration aufgenommen werden, kann dieser durch Streuung verringert werden, was wiederum zu einer schlechteren Hintergrundunterdrückung führt.

1.2 Lichtscheiben–Fluoreszenzmikroskopie

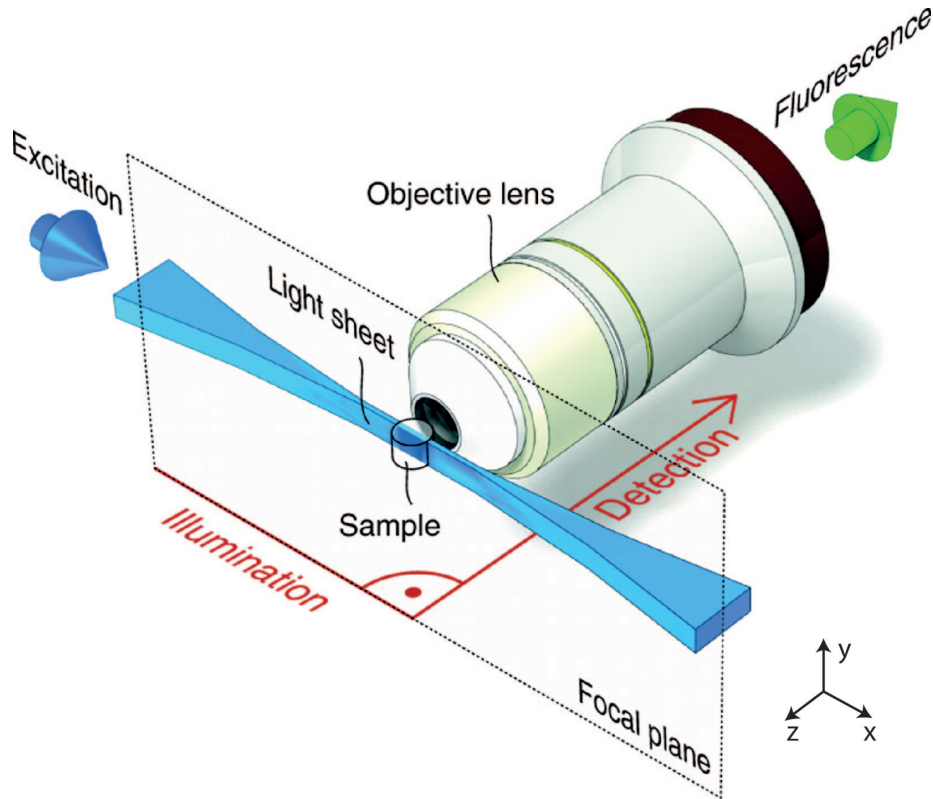


Abbildung 1.5: Prinzip der Lichtscheiben–Fluoreszenzmikroskopie. Der Beleuchtungsstrahl (blau) wird mit Hilfe von zylindrischen Linsen so geformt, dass er in z -Richtung fokussiert und in y -Richtung aufgeweitet und kollimiert ist. Dadurch entsteht in der Fokusebene des Detektions–Objektivs ein dünnes Lichtblatt, das nur in dieser dünnen Schicht Fluoreszenz anregt. Das Bild (grün) wird durch eine Tubuslinse auf einen Flächendetektor abgebildet. Aus [HS09]

Lichtscheiben–Fluoreszenzmikroskopie basiert auf der selektiven Beleuchtung der Objektebene mit einem dünnen Lichtblatt und bietet viele Vorteile gegenüber der *Epi*–Fluoreszenzmikroskopie ([HSDB⁺04], [RVS⁺08], [RVV⁺10], [WWK10]). Während bei der Mikroskopie mit *Epi*–Beleuchtung optische Beleuchtungs– und Detektionsachse überlappen, werden bei LSFM die Strahlengänge voneinander getrennt. Die optischen Achsen von Beleuchtungs– und Detektionsobjektiv stehen dann orthogonal zueinander (vgl. Abb. 1.5). Der Anregungslaser wird durch ein Zylinderlinsen–Teleskop in z -Richtung kollimiert aufgeweitet. In y -Richtung wird der Strahl in die hintere Fokalebene (HFE) des Beleuchtungsobjektivs fokussiert. Dieses Lichtblatt ist in z fokussiert und in y kollimiert. Hierdurch wird nur eine dünne Schicht in der Probe mit einem elliptischen Gaußstrahl ([Ald03]) beleuchtet. Es wird nur die tatsächlich betrachtete Ebene in der Probe angeregt, was zu einer drastischen Steigerung des Kontrastes und des Auflösungsvermögens führt. So können auch kleinere Details aufgelöst werden, die ansonsten im hohen Hintergrundsignal verloren gingen.

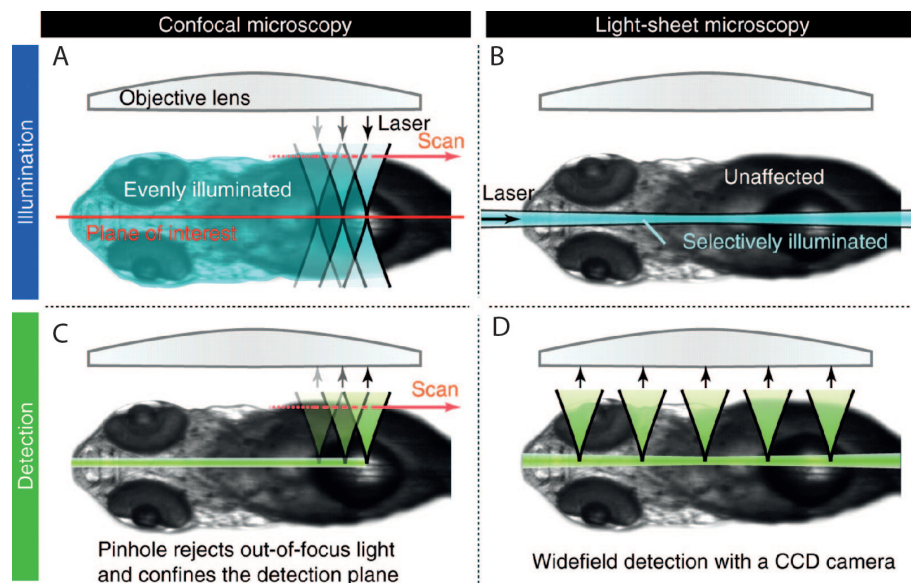


Abbildung 1.6: Vergleich von Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie und einem konfokalen Scanning-Mikroskop. **A:** Bei Aufnahme einer einzelnen Bildebene wird bei einem konfokalen Mikroskop das gesamte Probenvolumen beleuchtet. **B:** LSFM beleuchtet nur die abgebildete Probenschicht und reduziert Photobleichen und phototoxische Effekte in der gesamten Probe. **C:** Der konfokale Punktscanner nimmt das Bild Pixel für Pixel auf, was zu einer langen Bildaufnahmedauer führt. **D:** Bei LSFM können Flächensensoren verwendet werden, was die zeitliche Auflösung drastisch erhöht. Aus [HS09]

Gleichzeitig können Bildsensoren wie CCD- oder CMOS-Kameras mit hoher Sensitivität und hoher Bildrate eingesetzt werden. Durch selektive Beleuchtung können auch dreidimensionale Bilddaten mit hoher Tiefendiskriminierung aufgenommen werden. Bei einem solchen Bildstapel ist der Grad der Trennung der einzelnen Ebenen von der Dicke des Lichtblatts abhängig. Je dünner dieses ist, desto höher ist die Tiefendiskriminierung. Die axiale Auflösung kann sogar unter die beugungslimitierte Grenze des Detektionsobjektivs gesenkt werden, wenn das Lichtblatt dünn genug ist. Dies ist leicht zu realisieren, wenn für die Anregung sowie für die Abbildung Objektive mit gleicher numerischer Apertur verwendet werden ([ES06]). Auch das Erreichen einer hohen, räumlich nahezu isotropen Auflösung ist möglich, wie in [PGM⁺11] mit adhären Zellen demonstriert wurde. Die räumliche Auflösung von LSFM liegt in der Regel in der Größenordnung von 1–10 μm .

Die wesentlichen Vorteile von LSFM gegenüber den oben genannten konfokalen Methoden sind zum einen die höhere Aufnahmegeschwindigkeit, da Flächensensoren wie CCD- oder CMOS-Detektoren eingesetzt werden können. So erreichen aktuelle Modelle Bildraten von über 100 Hz mit einem Bildfeld von über 1000 Pixeln Kantenlänge. Zum anderen ist die gesamte Lichtintensität der eine Probe bei der Aufnahme des gleichen Bildfeldes ausgesetzt ist, gegenüber einem üblichen konfokalen Punkt- oder Zeilenscanning-Mikroskop deutlich reduziert.

In Abb. 1.6 werden die bei LSFM und einem konfokalen Punktscanner beleuchteten Volumina miteinander verglichen. Da bei einem konfokalen Punkt-Scanning-Mikroskop, ähnlich wie bei *Epi*-Fluoreszenzmikroskopie, Beleuchtungs- und Detektionsachse kollinear sind, wird die gesamte Probe bei der Aufnahme eines Bildes einer hohen Intensität ausgesetzt. Fluorophore außerhalb des Fokus werden angeregt und können durch Photobleichen zerstört werden. Dies erhöht auch die Belastung der Probe durch phototoxische Prozesse ([DFN07]). Die Stärke von LSFM wird besonders bei der Aufnahme von dreidimensionalen Bildstapeln

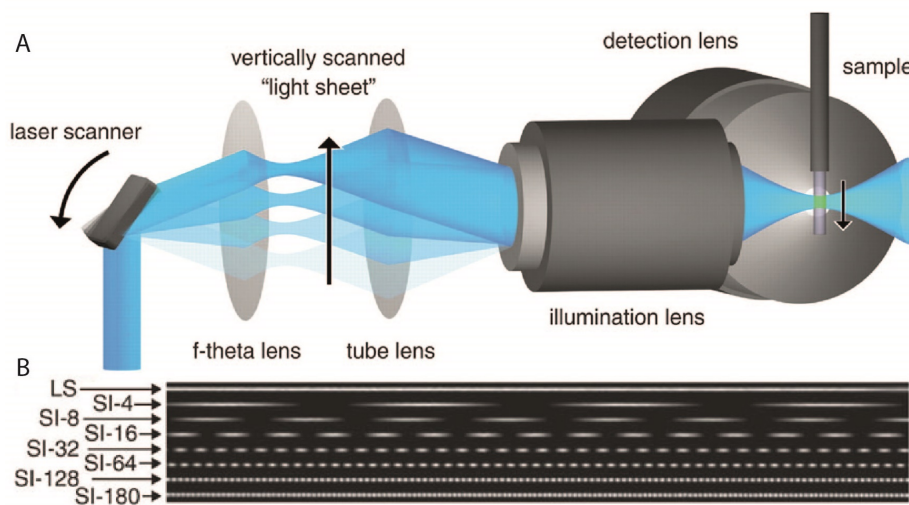


Abbildung 1.7: **A:** Prinzip der gescannten Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie. Mittels einer Scanlinse und einer Tubulinse wird ein Scanspiegel in die hintere fokale Ebene des Beleuchtungsobjektivs abgebildet. Das Kippen des Spiegels führt zu einer parallelen Verschiebung des Beleuchtungsstrahls in der Probe. So wird im Fokus des Beleuchtungsobjektivs effektiv ein Lichtblatt generiert. **B:** Durch Modulation des Beleuchtungslasers kann eine strukturierte Beleuchtung mit unterschiedlichen Phasen und Frequenzen erzeugt werden. Aus [KSS⁺ 10].

oder bei Studien über einen langen Zeitraum mit vielen nacheinander aufgenommenen Bildern deutlich. Werden N Bilder aufgenommen, so belichtet ein konfokaler Punktscanner die gesamte Probe bei jeder Aufnahme. Ist man beim letzten Bild angelangt, so wurde dieser Bereich bereits $N-1$ mal belichtet. Entsprechend wenige noch intakte Fluorophore stehen dann zur Fluoreszenzanregung zur Verfügung. Im Vergleich zum ersten Bild ist die Signalqualität drastisch vermindert und wertvolle Informationen sind somit verloren. Dahingegen belichtet LSFM nur die tatsächlich betrachtete Ebene.

Ein Nachteil ist, neben dem höheren Streulichtanteil durch die *Epi*-Detektion, das Auftreten von Streifenartefakten. Diese werden dadurch verursacht, dass das Anregungslicht beim Durchqueren der Probe gebeugt wird und durch die hohe Kohärenz des Lasers Interferenz entsteht. Zum anderen wird Licht absorbiert und erzeugt Schatten im Bild. Zwar treten solche Prozesse auch bei konfokalen Mikroskopen auf, sind bei SPIM aber deutlicher sichtbar, da die Beleuchtungsstrahlen in der Bildebene verlaufen. Solche Artefakte können

eliminiert werden, indem die Probe gedreht wird und so Aufnahmen mit unterschiedlichen Beleuchtungsrichtungen entstehen ([KGS⁺12]). Aus den so erhaltenen Bilddaten kann dann mittels Registrierungsalgorithmen ein dreidimensionaler Datensatz mit verbessertem Kontrast und Auflösung rekonstruiert werden ([PSST10], [TORO⁺12]). Das Lichtblatt kann auch um die Detektionsachse gedreht werden. Mit einem schnellen Scanspiegel kann eine Reduktion von Streifenartefakten so schon bei der Aufnahme auch bei hohen Bildraten geschehen ([HS07]).

Neben der statischen Erzeugung des Lichtblatts mit Hilfe von Zylinderlinsen, kann dieses auch durch einen fokussierten und gerasterten Laserstrahl erzeugt werden (Abb. 1.7). Der Scanner muss in der hinteren fokalen Ebene des Objektivs positioniert werden, damit der Beleuchtungsstrahl fokussiert und immer parallel zur optischen Achse liegt während er durch die Probe geführt wird. Im Vergleich zum statischen Lichtblatt, das durch die Natur des Gaußstrahls, aus dem es geformt wird, eine entlang des Bildfeldes inhomogene Beleuchtung aufweist, bleibt die Intensitätsverteilung entlang der Scanrichtung konstant. Der Kameradetektor muss, während der Strahl über die Probe streicht, aktiv sein. Das Fluoreszenzsignal wird so aus der gesamten Objektebene aufgenommen und so effektiv eine Lichtblattbeleuchtung erzeugt. Auch können die für SPIM üblichen Streifenartefakte durch die teilweise Inkohärenz dieser Beleuchtungsart reduziert werden. Durch Modulation des Lasers kann ebenfalls auf einfache Weise die Probe mit einem inkohärenten Intensitätsgitter belichtet werden, um den Bildhintergrund mittels strukturierter Beleuchtung zu reduzieren und den Kontrast zu verbessern.

1.3 Zielsetzung

Die PSF und die MTF eines Mikroskops sind eng miteinander verknüpft. Dabei werden Auflösung und Kontrast nicht nur durch die optischen Elemente alleine bestimmt, sondern auch durch Interaktion von Photonen mit biologischem Gewebe. Konfokale Mikroskope verbessern Auflösung und Kontrast mit Hilfe einer konfokalen Blende, können aber nur vergleichsweise geringe Bildraten erreichen und setzen die Probe einer hohen Lichtintensität aus. LSFM löst diese Probleme, muss aber Einbußen in der Bildqualität in Proben mit hohem Streukoeffizienten hinnehmen.

Hier sollte eine Möglichkeit gefunden werden die Vorteile beider Techniken in einem Gerät zu vereinen und den Anteil von Streulicht zu verringern, ohne die Probe zusätzlich zu belasten und ohne Einbußen in der Bildrate hinnehmen zu müssen. Zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit existierten bereits Ideen Lichtscheibenmikroskopie mit gerastertem Anregungsstrahl und konfokale Zeilendetektion miteinander zu kombinieren. So wurde dies als eine Möglichkeit vorgeschlagen, den Einfluss der Nebenmaxima von Besselstrahlen zu reduzieren ([FSR10], [FR12], [FGA⁺13]). Hier wurde die konfokale Detektion durch

sequentielle Aufnahmen einer Objektebene mit verschobenem Anregungslaserstrahl und nachfolgender Anwendung einer digitalen Schlitzmaske realisiert. Ein Ansatz die konfokale Detektion in Echtzeit zu realisieren wurde in [SBS⁺12] publiziert. Hier wurde das Bild des Beleuchtungsstrahls mit Hilfe von zwei Scanspiegeln, im optischen Detektionsstrahlengang platziert, durch eine Schlitzblende gefiltert und wieder auf eine CCD-Kamera gerastert.

In dieser Arbeit wurde ein Ansatz verfolgt, der den *Rolling Shutter* einer CMOS-Kamera ausnutzt, wie es in [Spi11] vorgeschlagen wurde.

Das Prinzip ist an die konfokale Zeilenmikroskopie mit linienförmiger Beleuchtung angelehnt, die Beleuchtung wird nun jedoch analog zur LSFM mit einem gerasterten Gaußstrahl realisiert.

Zu jedem Zeitpunkt der Bildaufnahme ist jeweils nur eine geringe Anzahl aneinander angrenzender Kamerazeilen gleichzeitig aktiv. Diese fungieren dann als konfokaler Schlitzdetektor. Die Besonderheit liegt nun darin, dass Zeilen unterhalb dieses aktiven Bereichs sequentiell aktiviert und solche oberhalb deaktiviert werden können. Die aktive Region streicht somit von oben nach unten über den Sensor. Gleichzeitig wird der Beleuchtungsstrahl so durch die Probe bewegt, dass er stets konjugiert zu den aktiven Detektorzeilen ist. Hierdurch kann auf zusätzliche Elemente im Fluoreszenzstrahlengang verzichtet und die geringe Probenbelastung sowie eine hohe Bildaufnahmezeit beibehalten werden.

Kapitel 2

Theorie

Dieser Abschnitt fasst die wesentlichen theoretischen Grundlagen der konfokalen Lichtscheiben-Fluoreszenz-Mikroskopie zusammen. Es werden die optischen Eigenschaften des Beleuchtungsstrahlengangs untersucht sowie die Mechanismen, die das resultierende Bild bestimmen. Zunächst erfolgt eine Analyse des für die Beleuchtung entworfenen optischen Systems. Begonnen wird mit der einfachsten Methode, dem paraxialen Modell. Mit Hilfe der Wellenoptik (Fourier-Optik) wird dieses weiter verfeinert. Der nächste Schritt untersucht den Effekt eines konfokalen Schlitzdetektors auf die Bildqualität. Die hier zusammengefasste Theorie dient in nachfolgenden Abschnitten zur Beschreibung der optischen Eigenschaften eines konfokalen LSFM. Paraxiale Optik wird in Kap. 4.1 verwendet, um einen grundlegenden Entwurf des Mikroskops zu schaffen. Des Weiteren erfolgt eine kurze Zusammenfassung der Fourier-Optik, die in Kap. 4.3.1 für die Simulation der Punktabbildungsfunktion Verwendung findet. Auch wird ein Überblick über die wichtigsten Wellenfrontaberrationen gegeben. Diese spielen beim Entwurf der Beleuchtungsoptik eine wesentliche Rolle. Zuletzt wird das Konzept der Messung des Bildkontrastes diskutiert. Hiermit wurde in Kap. 5.6 die Verbesserung der Bildqualität von LSFM durch konfokale Zeilendetektion quantifiziert.

2.1 Geometrische Optik

Eine grundlegende Möglichkeit die Abbildungseigenschaften optischer Systeme zu betrachten bietet die geometrische Optik. Die Ausbreitung des Lichts wird in Form von Strahlen beschrieben, die nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz an Oberflächen gebrochen werden. Bei hinreichend kleinen Wellenlängen bietet dieses Modell eine gute Näherung der optischen Eigenschaften eines Systems und wird auch von optischen Designprogrammen für die Optimierung einzelner Linsen und Linsensysteme verwendet. Eine weitere Vereinfachung ergibt sich, wenn nur Strahlen nahe der optischen Achse betrachtet werden. Dann

spricht man von paraxialer Optik. Diese dient als Hilfsmittel, um bestimmte Systemeigenschaften prinzipiell zu verstehen und um eine Ausgangsgeometrie für weitere Optimierungen mittels Raytracing-Software zu schaffen. Paraxiale Linsen besitzen keine optischen Aberrationen und können für Planung und Entwurf verwendet werden und zur Ermittlung eines Ausgangspunktes für Optiken, die mit Raytracing-Software optimiert werden sollen.

2.2 Fokale, afokale und telezentrische Systeme

Ein fokales Linsensystem fokussiert einen kollimierten Strahl in dessen Brennpunkt. Im Gegensatz hierzu verlässt der gleiche Lichtstrahl ein afokales System wiederum kollimiert. Zwar kann ein Lichtbündel innerhalb dieses Systems konvergieren oder divergieren, wird aber vor dem Verlassen wieder kollimiert. Für ein solches System kann keine Brennweite definiert werden. Beispiele für afokale Systeme sind Galileische- und Keplersche Teleskope, Bildinvertierer für terrestrische Teleskope und Relaislinsen sowie beidseitig telezentrische Objektive, [Lai10].

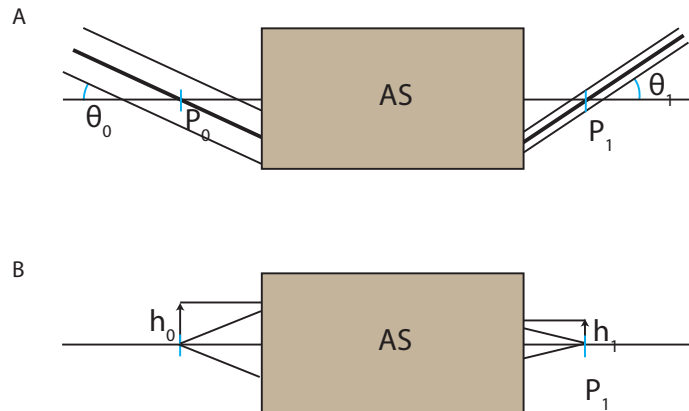


Abbildung 2.1: **A** Parallele Lichtbündel, die in ein afokales System eintreffen, verlassen dieses wieder parallel. Allerdings können der Durchmesser, Einfallswinkel und Höhe des Hauptstrahls durch das System modifiziert werden. **B** Ein Objekt, das sich in einem endlichen Abstand vor dem System befindet, wird dahinter abgebildet. Dabei kann das Bild vergrößert, verkleinert oder invertiert werden ([Wet04]).

In Abb. 2.1 **A** ist der Effekt eines afokalen Systems dargestellt (AS), in das von links ein paralleles Lichtbündel einfällt. Der Hauptstrahl schneidet die optische Achse im Punkt P_0 mit dem Winkel θ_0 . Nach Passieren des Systems schneidet der Strahl die optische Achse in P_1 mit dem Winkel θ_1 . Hierbei können sich Winkel und Durchmesser des bildseitigen Strahls von dem Objektseitigen unterscheiden. Die Winkelvergrößerung beträgt ([Wet04])

$$M = \frac{\tan \theta_1}{\tan \theta_0}. \quad (2.1)$$

Der Strahldurchmesser wird dabei auch verändert. Besitzt der einfallende Strahl einen Durchmesser d_0 und der Austretende einen Durchmesser d_1 , verhält sich die Strahlvergrößerung umgekehrt zur Winkelvergrößerung:

$$\frac{d_1}{d_0} = \frac{1}{M}. \quad (2.2)$$

Obwohl für ein afokales Objektiv keine Brennweite im klassischen Sinne definiert werden kann, ist es damit möglich eine Abbildung zu erzeugen (Abb. 2.1 B). Befindet sich ein Objekt mit Höhe H_0 im Punkt P_0 , so wird es in den Punkt P_1 abgebildet. Für die Bildvergrößerung m gilt dabei

$$m = \frac{h_1}{h_0} = \frac{1}{M}. \quad (2.3)$$

Ein Beispiel hierfür sind beidseitig telezentrische Messobjektive, die eine geometrietreue Abbildung ermöglichen ([Alb05], [KWK01]).

Gleichungen (2.1) und (2.2) sind insbesondere für Scan-Relais-Systeme wichtig. Die Vergrößerung beeinflusst direkt die Strahlapertur und den Kippwinkel in der hinteren fokalen Ebene des Scanobjektivs. In Abb. 2.2 ist ein optisches Relais skizziert, wie es für die Abbildung des Scanspiegels in die hinteren fokale Ebene (HFE) eines Objektivs verwendet wird. Es besteht aus zwei Linsen L_1 und L_2 mit Brennweiten f_1 und f_2 . Im Punkt P_0 befindet sich ein Scanspiegel, der einen kollimierten Lichtstrahl in dieses System lenkt, im Bild farbig dargestellt. Der Scanpunkt wird in den Punkt P_B abgebildet. Der Strahldurchmesser in P_B wird durch Glg. (2.2) und den Strahldurchmesser in P_0 bestimmt. Der Kippwinkel in P_B wird durch den Kippwinkel in P_0 und die Vergrößerung m bestimmt, Glg. (2.1) und Glg. (2.3).

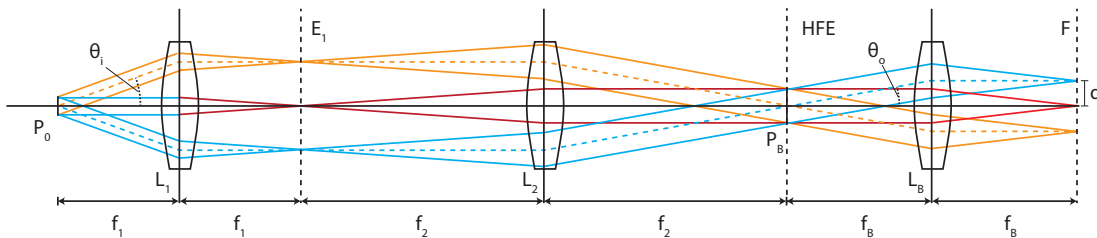


Abbildung 2.2: Skizze eines afokalen optischen Relais wie es für Laserscanner verwendet wird. Die Linsen L_1 und L_2 mit den Brennweiten f_1 und f_2 haben den Abstand $f_1 + f_2$ zueinander. Die Pupille in P_0 wird in P_B mit einer Vergrößerung von $M = f_2/f_1$ abgebildet. Der Scanwinkel verkleinert sich um den Faktor $m = 1/M$. Befindet sich die HFE der Beleuchtungslinse L_B bei P_B , so sind die Hauptstrahlen im Fokus parallel zur optischen Achse.

Die Linse L_1 sollte die Eigenschaft besitzen, dass der Fokus unabhängig vom Winkel θ_1 zur optischen Achse des einlaufenden Strahls in der Ebene E_1 rechts von der Linse liegt. Auch

soll die winkelabhängige Verzerrung des Fokuspunktes durch Koma und Astigmatismus so klein wie möglich sein. Aus diesem Grund wird häufig ein für diesen Zweck optimiertes Scanobjektiv verwendet.

Die Linse L_2 transformiert die in dieser Ebene fokussierten Strahlen wieder in parallele Lichtbündel, deren Hauptstrahlen sich im Punkt P_B schneiden. Die Funktionsweise ähnelt der eines Okulars, das ein ebenes Zwischenbild in E_1 ins Unendliche abbildet, mit der Pupille in P_B .

Setzt man nun eine Linse L_B vor die Relais-Optik, so dass die hintere Fokalebene (HFE) der Linse auf den Punkt P_B fällt, erhält man eine sogenannte telezentrische Konfiguration des Strahls in der Fokusebene F. Der Hauptstrahl verläuft dann unabhängig vom Winkel des Scanspiegels parallel zur optischen Achse, da er den hinteren Fokuspunkt von L_B schneidet. Gleichzeitig ist der Lichtstrahl in der HFE des Beleuchtungsobjektivs kollimiert und wird somit hinter L_B fokussiert. Für den Abstand d des Strahls von der optischen Achse in der Fokusebene F gilt:

$$d = f_B \tan \theta_1 \quad (2.4)$$

Er hängt von der Brennweite f_B des Objektivs und dem Scanwinkel θ ab. Bei einigen Anwendungen mit gescanntem Strahl ist ein linearer Zusammenhang $d \propto f \cdot \theta$ zwischen dem Strahlwinkel und der Strahlauslenkung wünschenswert. Ein Objektiv mit dieser Eigenschaft wird f - θ -Objektiv genannt, [Fus06].

2.3 Fokussierung von Gaußstrahlen

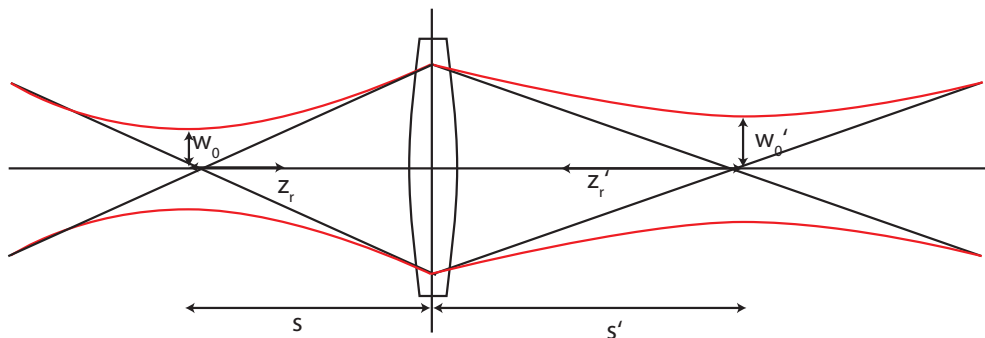


Abbildung 2.3: Ein Strahl mit Gaußischem Intensitätsprofil und Strahltaile in einem Abstand s vor einer Sammellinse wird fokussiert. w_0 und z_r bezeichnen jeweils den $1/e^2$ -Radius und die Rayleighlänge des einlaufenden Strahls. Die Strahltaile wird in einem Abstand s' hinter der Linse abgebildet. Der neue Fokusradius w'_0 und die Rayleighlänge z'_r werden durch die Gleichungen (2.8) und (2.9) beschrieben. Aus [Sel83].

Die meisten Laser weisen im Idealfall ein transversales gaußförmiges Profil auf. Die trans-

versale Intensitätsverteilung im Fokus wird beschrieben durch

$$I(r,z) = I_0 \exp\left(-2(r/w(z))^2\right). \quad (2.5)$$

w ist der $1/e^2$ -Radius des Strahlprofils entlang der optischen Achse:

$$w(z) = w_0[1 + (z/z_r)^2]^{1/2}. \quad (2.6)$$

z_r wird Rayleighlänge genannt. Diese ist definiert durch $I(0,z_r) = I_0/\sqrt{2}$ und wird länger, je größer der Strahlradius im Fokus ist:

$$z_r = (\pi w_0^2/\lambda). \quad (2.7)$$

Trifft der Strahl auf eine Linse mit positiver Brennweite wird der Fokuspunkt hinter dieser abgebildet (Abb. 2.3). Der Abbildungsmaßstab beträgt

$$m = \frac{w'_0}{w_0} = \frac{1}{\left[(1 - (s/f))^2 + (z_r/f)^2\right]^{1/2}}. \quad (2.8)$$

Für die neue Rayleighlänge gilt dann ([Sel83])

$$z'_r = m^2 z_r. \quad (2.9)$$

Bei einem durch eine Linse fokussierten Strahl wird angenommen, dass sich die einfallende Strahltaile an der Position der Linsen befindet, also $s = 0$ ist. Des Weiteren geht man davon aus, dass der einlaufende Strahl kollimiert und dessen Taille w_0 groß ist, so dass $f \ll z_r$ und $z_r/f \gg 1$ ist. Der Nenner vereinfacht sich zu z_r/f und man erhält, mit Gleichung (2.7), für den Radius der neuen Strahltaile hinter der Linse ([Mes08]):

$$w'_0 \approx \frac{\lambda f}{\pi w_0}. \quad (2.10)$$

2.4 Theorie der konfokalen Bildentstehung im wellenoptischen Bild

Nach dem Huygensschen Prinzip stellt jeder Punkt einer elektromagnetischen Welle einen Ausgangspunkt für Elementarwellen dar, deren Summe das resultierende Feld in einem beliebigen Punkt ist (Abb. 2.4).

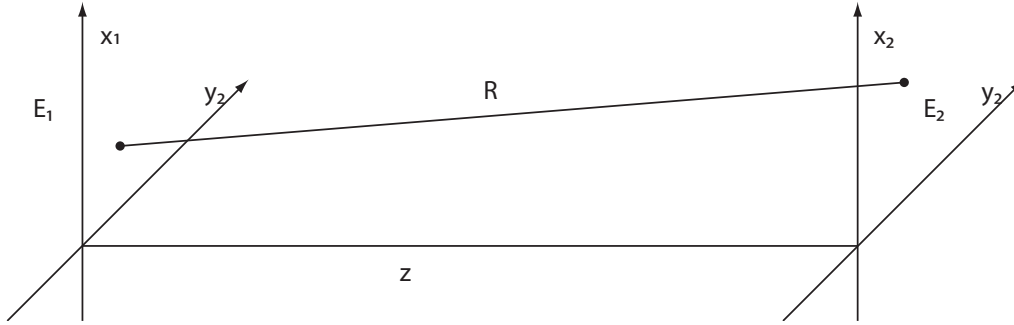


Abbildung 2.4: Eine elektromagnetische Welle bewegt sich entlang der z -Achse. Jeder Punkt (x_1, y_1) der Ebene E_1 ist Ursprung einer Elementarwelle. Deren Superposition erzeugt die elektrische Feldverteilung in einem Punkt (x_2, y_2) der Ebene E_2 . R ist der Abstandsvektor zwischen den Quellen der Elementarwellen und dem Punkt (x_2, y_2) . Dies wird das Huygenssche Prinzip genannt. Aus [WS84].

\mathbf{k} sei der Wellenvektor im Vakuum. Für paraxiale Strahlen wird dies durch das Huygens-Fresnel-Prinzip beschrieben ([Goo08], [Ste04], [BW80]):

$$U_2(x_2, y_2) = \iint \frac{1}{i\lambda R} U_1(x_1, y_1) \exp(-i\mathbf{k}\mathbf{R}) dx_1 dy_1. \quad (2.11)$$

U_1 und U_2 stellen jeweils die komplexen Wellenamplituden in den Ebenen E_1 und E_2 dar. \mathbf{R} ist der Richtungsvektor zwischen den Punkten (x_1, y_1) und (x_2, y_2) in den beiden Ebenen. Wenn wir annehmen, dass $R \approx z$ ist, so kann man Glg. (2.11) in Fresnelscher Näherung ($z \gg x_1, x_2$) schreiben:

$$U_2(x_2, y_2) = \frac{\exp(-ikz)}{i\lambda z} \iint_{-\infty}^{\infty} U_1(x_1, y_1) \exp\left(-\frac{ik}{2z} \{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2\}\right) dx_1 dy_1. \quad (2.12)$$

Hierbei ist $U_1(x_1, y_1)$ die Amplitude des elektromagnetischen Feldes einer ebenen Welle im Punkt (x_1, y_1) und $U_2(x_2, y_2)$ das resultierende Feld im Punkt (x_2, y_2) in der Entfernung z vom Ausgangspunkt. Um eine ideale Linse in der ersten Ebene mit der Brennweite f zu modellieren, wird die ebene Welle in (x_1, y_1) durch eine sphärische Welle ersetzt, deren Krümmungsradius der Brennweite entspricht. Hierzu multipliziert man die ebene Welle mit einer zusätzlichen Phase $\exp\left(\frac{ik}{2f}(x_1^2 + y_1^2)\right)$:

$$U_2(x_2, y_2) = \frac{\exp(-ikz)}{ikz} \iint_{-\infty}^{\infty} U_1(x_1, y_1) \exp\left(\frac{ik}{2f}(x_1^2 + y_1^2)\right) \exp\left(-\frac{ik}{2z}\{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2\}\right) dx_1 dy_1. \quad (2.13)$$

Hieraus ergibt sich die Feldamplitude im Fokus der Linse, wenn $z=f$ gesetzt wird. Durch Umformen fallen die quadratischen Terme von x_1 und y_1 weg und man erhält:

$$U_2(x_2, y_2) = \frac{\exp(-ikf)}{i\lambda f} \exp\left(-\frac{ik}{2f}(x_2^2 + y_2^2)\right) \iint_{-\infty}^{\infty} U_1(x_1, y_1) \exp\left(\frac{ik}{f}\{x_1 x_2 + y_1 y_2\}\right) dx_1 dy_1. \quad (2.14)$$

Der Ausdruck unter dem Integral kann als zweidimensionale Fourier-Transformation der Feldverteilung $U(x_1, y_1)$ in der Pupille der Linse mit den räumlichen Frequenzen $\frac{kx_2}{f}$ und $\frac{ky_2}{f}$ aufgefasst werden. Ist die Linsenapertur rund und gleichförmig ausgeleuchtet, kann die Feldverteilung im Fokus analytisch berechnet werden. Hierzu wird zunächst die optische Koordinate $v = kr_2 \sin \alpha \approx 2\pi r_2 a / \lambda f$ eingeführt. a ist der Radius der Pupille der Linse, $\sin \alpha$ die Numerische Apertur (NA) und $r_2 = (x_2, y_2)$. Für die elektrische Feldverteilung folgt damit nach [WS84]:

$$U_2(v) = -iN \exp(-ikf) \exp\left(\frac{-iv^2}{4N}\right) \left[\frac{2J_1(v)}{v}\right]. \quad (2.15)$$

Die Intensitätsverteilung ist somit proportional zu

$$[2J_1(v)/v]^2. \quad (2.16)$$

Bei einer ringförmigen Apertur ist die Fokusverteilung proportional zu

$$[2J_0(v)]^2. \quad (2.17)$$

J_0 und J_1 sind Besselfunktionen erster Art der Ordnung 0 und 1. Glg. (2.17) ist auch gleich der Intensitäts-Punktabbildungsfunktion einer Linse mit einer unendlich dünnen, ringförmigen Apertur. Glg. (2.16) ist die bekannte Airy-Scheibe. Die Lösung in Glg. (2.17) beschreibt das transversale Profil eines Besselstrahls, mit einem schmalen Hauptmaximum aber stärker ausgeprägten Nebenmaxima.

Will man die Intensität nun auch in einer Ebene im Abstand δz vom Fokus berechnen, geht

man wieder von der Fresnelschen Näherung Glg. (2.12) aus und setzt für die Feldverteilung U_1 eine konvergierende, sphärische Welle $P_1(r_1) \exp\left(\frac{ik}{2f}r_1^2\right)$ ein. Durch Umformen erhält man dann den Ausdruck

$$P_2(r_2) = \frac{\exp(-ikz)}{i\lambda z} \exp\left(-\frac{ik}{2z}r_2^2\right) \iint_{-\infty}^{\infty} P_1(r_1) \exp\left(\frac{ikr_1^2}{2}\left(\frac{1}{f} - \frac{1}{z}\right)\right) \exp\left(\frac{ik}{z}r_1r_2\right) dr_1. \quad (2.18)$$

Hier ist $r_1 = (x_1, y_1)$ und $r_2 = (x_2, y_2)$. Für z setzt man die neue Distanz $z = f + \delta z$ ein, wobei δz der Abstand zur fokalen Ebene ist. Dieses Integral entspricht einer Fourier-Transformation des Terms $P_1(r_1) \exp\left(\frac{ikr_1^2}{2}\left(\frac{1}{f} - \frac{1}{z}\right)\right)$, also der Feldamplitude in der Pupille der Linse multipliziert mit einem Phasenterm der den Defokus mit berücksichtigt.

Die Fourier-Transformation kann vereinfacht werden, indem die Radialsymmetrie von $P_1(r_1)$ ausgenutzt wird ([WS84]). Des Weiteren wird der Abstand zur fokalen Ebene durch die optische Koordinate $u = 4k\delta z \sin^2(\alpha/2)$ beschrieben.

Die axiale Feldverteilung durch den Fokus entlang der optischen Achse wird lautet dann

$$P_2(u) = -iN \exp(-ikz) \exp\left(\frac{-iu}{4}\right) \left[\frac{\sin(u/4)}{u/4}\right], \quad (2.19)$$

woraus für die Intensität folgt

$$I(u) = N^2 \left[\frac{\sin(u/4)}{u/4}\right]^2. \quad (2.20)$$

Hat die beleuchtete Apertur die Form eines dünnen Rings, so dass ein Besselstrahl erzeugt wird, gilt für die Intensität entlang der optischen Achse:

$$I_2(u, v) \propto J_0(v)^2. \quad (2.21)$$

Die Intensität ist somit nicht abhängig von der axialen Position. Dies bedeutet, dass Besselstrahlen, im Gegensatz zu Gaußstrahlen, nicht divergieren ([DEM88]).

2.5 Das konfokale Mikroskop

Ein konventionelles Mikroskop verwendet einen zweidimensionalen CCD- oder CMOS Sensor, um das gesamte Bild gleichzeitig aufzunehmen. Demgegenüber beleuchtet ein Scanning-Mikroskop einen räumlich begrenzten Teil der Probe, indem das Anregungslicht in diesen

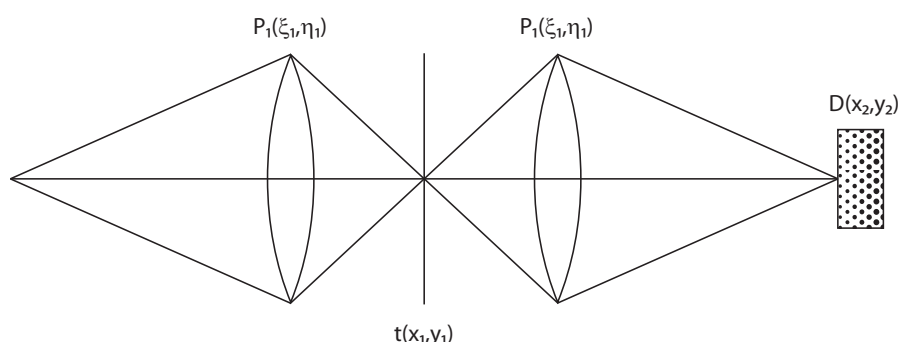


Abbildung 2.5: Prinzip des Scanning Mikroskops. Der Beleuchtungsstrahl kommt von links und wird durch die erste Linse in die Probe fokussiert. Durch bewegen der Probe entlang zwei Achsen oder durch Scannen des Beleuchtungsfokus wird die Probe Punkt für Punkt aufgenommen. Nur wenn Beleuchtung und Detektion räumlich begrenzt sind setzt ein konfokaler Effekt ein. Nach [WS84].

Bereich fokussiert wird und das transmittierte, reflektierte oder durch Fluoreszenz erzeugte Licht aus dieser Region detektiert wird. Das gesamte Bild wird aufgenommen, indem entweder die Probe oder der Beleuchtungsfokus zweidimensional gerastert wird. In [WS84] wird zwischen zwei Arten von Scanning-Mikroskopen unterschieden: Dem vom Typ 1, das ähnliche optische Eigenschaften wie die *Epi*-Mikroskopie besitzt und dem vom Typ 2, welches konfokal ist. Der erste Fall liegt vor, wenn die gesamte Probe beleuchtet wird und ein Punktdetektor oder eine Lochblende bei $D(x_2, y_2)$ verwendet wird (Typ 1a) oder wenn die Probe punktuell beleuchtet wird, aber der Detektor eine ausgedehnte Fläche einnimmt (Typ 1b). Das Typ 2 oder konfokale Mikroskop liegt dann vor, wenn Beleuchtung als auch Detektion räumlich begrenzt sind. Dies ist die notwendige Bedingung für eine konfokale Abbildung.

Die Herleitung der PSF eines konfokalen Mikroskops wurde in der Literatur ausführlich diskutiert. Für den Fall eines konfokalen Punktscanners mit einem punktförmigen Detektor verbessert sich die PSF lateral als auch axial ([Wil80]). Sie ist das Produkt der PSF der Beleuchtungs- und der Detektionslinse. Wird dabei das gleiche Objektiv verwendet und ist $h(\mathbf{r})$ dessen PSF, so ist die PSF des konfokalen Mikroskops gleich $h(\mathbf{r})^2$. Für den realen Fall eines Detektors endlicher Größe kann diese auch kompliziertere Formen annehmen. Eine analytische Beschreibung ist dann nicht immer möglich ([WC87], [WC88], [Wil90]). Eine Verkleinerung der PSF wurde auch bei konfokalen Schlitzdetektoren verifiziert. Der konfokale Effekt auf die Punktabbildungsfunktion ist hier auf die Richtung orthogonal zum Detektorschlitz limitiert. Eine detaillierte Analyse findet sich in [SM88], [WKZ06] und [DDV⁺07].

2.6 Die Punktabbildungsfunktion beim konfokalen LSFM

In der Bildebene gleicht die PSF bei LSFM der eines *Epi*-Fluoreszenzmikroskops. Durch die orthogonale Beleuchtung kann allerdings die axiale Ausdehnung deutlich reduziert werden ([SL94]). Wird ein fluoreszierendes Teilchen durch den Detektionsfokus in axialer Richtung bewegt, so wird die Fluoreszenzintensität mit der Beleuchtungsintensitätsverteilung gewichtet. Ist die Ausdehnung der Beleuchtung kleiner als die axiale Ausdehnung der Abbildungs-PSF, wird die Gesamt-PSF in axialer Richtung entsprechend verkleinert.

Zunächst wird der Fall der Beleuchtung mit einem statischen fokussierten Gauß-Strahl untersucht. Die Detektion sei gleich dem konventionellen Fall, bei dem alle Pixel gleichzeitig aktiv sind. $h_B(\mathbf{r})$ sei die Intensitätsverteilung des Beleuchtungsstrahls, $h_D(\mathbf{r})$ die Punktabbildungsfunktion des Detektionsobjektivs und $C(\mathbf{r})$ die Verteilung von Fluoreszenzmolekülen in der Probe. Des Weiteren ist der Beleuchtungsstrahl um einen Betrag $\mathbf{b}_y = (0, b_y, 0)$ von der optischen Achse ausgelenkt. Die Probe kann in Detektionsrichtung um $\mathbf{b}_z = (0, 0, b_z)$ verschoben werden. Dann ist das dreidimensionale, inkohärente Bild beschrieben durch ([FR12]):

$$I_S(b_y, b_z, \mathbf{r}) = (C(\mathbf{r} - \mathbf{b}_z) \cdot h_B(\mathbf{r} - \mathbf{b}_y)) \otimes h_D(\mathbf{r}). \quad (2.22)$$

\otimes stellt den Faltungsoperator dar. Wird der Strahl während der Integrationszeit des Detektors durch die Probe geführt, erhält man für das Bild

$$I_{LS}(b_y, b_z, \mathbf{r}) = \left(C(\mathbf{r} - \mathbf{b}_z) \cdot \int h_B(\mathbf{r} - \mathbf{b}_y) dx \right) \otimes h_D(\mathbf{r}). \quad (2.23)$$

Nun wird eine Schlitzmaske der Form $\delta(y - y_0)$ parallel zum Beleuchtungsstrahl angewendet. Befindet sich der Sensor in der Ebene $z = z_0$, ist das zweidimensionale Bild

$$I_{CLS}(b_y, b_z, x, y_0, z_0) = \int I_S(b_y, b_z, \mathbf{r}) \delta(y - y_0) \delta(z - z_0) dx dy. \quad (2.24)$$

Wird I_S aus Gleichung 2.22 eingesetzt, so führt dies zum Resultat, dass das Bild in Beleuchtungsrichtung analog dem konventionellen Fall gleich $(C \cdot h_I) \otimes h_D$ ist. Die hierzu orthogonalen Komponenten in y und z -Richtung sind gleich $C \otimes (h_I \cdot h_D)$ ([FR12], [SM88]). Dies bedeutet, dass LSFM mit konfokaler Zeilendetektion in Scanrichtung und in z -Richtung eine höhere Auflösung besitzt als LSFM mit *Epi*-Detektion.

2.7 Wellenoptik und Seidel–Aberrationen

Konvergiert eine elektromagnetische Welle nach Passage einer Sammellinse exakt auf einen Punkt auf der optischen Achse, besitzen die Flächen konstanter Phase die Form eines perfekten Kugelsegments. Ihr Ursprung befindet sich im Fokus der Linse und der Radius der Kugelwelle direkt hinter der Linse ist gleich der Brennweite. Dies ist die ideale Wellenform eines fokussierenden optischen Systems. Die Ausdehnung der PSF ist dann minimiert und beugungsbegrenzt. Weicht die Welle von der idealen Form ab, spricht man von Aberrationen. Diese führen zu einer Verbreiterung der Punktabbildungsfunktion und somit zu einem verringerten Auflösungsvermögen. Setzt man den Scheitelpunkt der idealen kugelförmigen Welle in den Mittelpunkt der Austrittspupille und bildet die Differenz mit der realen Wellenfront gleicher Phase, erhält man die Funktion der optischen Pfaddifferenz (OPD-Funktion) $W(x,y)$. Diese kann durch eine Polynomreihe, in der Regel Seidel– oder Zernike–Polynome, ausgedrückt werden. Das Seidelpolynom kann in Polarkoordinaten der Austrittspupille geschrieben werden:

$$W = \sum_{i,j,k} W_{i,j,k} \bar{H}^i \rho^j \cos^k \phi. \quad (2.25)$$

ρ ist normiert auf den Pupillenradius und \bar{H} ist der normierte Feldwinkel (Einfallswinkel des Hauptstrahls zur optischen Achse). Die ersten fünf Terme mit $i+j=4$ nennt man die Seidel–Koeffizienten. Diese beschreiben die sphärische Aberration, Koma, Astigmatismus, Feldkrümmung und Verzerrung. Der axiale chromatische Fehler kann hierbei als Defokus bei unterschiedlichen Wellenlängen behandelt werden. Darüber hinaus werden auch Zernike–Polynome verwendet. Diese besitzen eine orthonormale Basis und werden bei der Messung von Aberrationen benutzt.

Defokus

Defokus ist keine Aberration im engeren Sinne. Allerdings kann zum Beispiel durch Verwendung ebener Oberflächen mit unterschiedlichen Brechungsindizes im Strahlengang die tatsächliche Fokusposition von der Paraxialen abweichen, was bei einer festen Bildebene zu Unschärfe führt.

Sphärische Aberration

Stellt man sich die Pupille einer Linse unterteilt in konzentrische Zonen, mit unterschiedlichem Abstand zur optischen Achse, vor, können diese Zonen voneinander abweichende Brennweiten haben. Der Fokuspunkt ist dann eine Superposition der einzelnen Teil–Foki

und wird dadurch axial wie auch lateral verbreitert. Sphärische Aberrationen können durch Verwendung von asphärischen Linsen, Linsen mit optimiertem Formfaktor, Korrekturplatten oder durch Verteilen der Brechkraft, also der reziproken Brennweite, auf mehrere Linsen minimiert werden.

Koma

Ist ein einfallendes Lichtbündel relativ zur optischen Achse gekippt, dann ist die Neigung der Linsenoberfläche, die von den Strahlen gesehen wird, in der unteren Linsenhälfte kleiner als in der Oberen. Es kommt zu einer Bildvergrößerung, die von der Bildhöhe abhängig ist. Ein in die Fokusebene abgebildeter Punkt wird konisch verzerrt, was an die Form eines Kometenschweifens erinnert.

Astigmatismus

Astigmatismus entsteht durch unterschiedliche Brennweiten in der tangentialen und sagittalen Ebene. Dies kann zum Beispiel durch plane Elemente, die nicht exakt orthogonal zur optischen Achse stehen, erzeugt werden ([KJ09]). Eine Linse besitzt ebenfalls einen feldwinkelabhängigen Astigmatismus, der durch die Coddington-Gleichungen beschrieben wird ([Goo04]).

Feldkrümmung und Verzerrung

Im Fall einer idealen Linse werden Strahlen mit unterschiedlichen Einfallswinkeln auf eine plane Ebene fokussiert. Tritt Feldkrümmung auf, bilden diese Punkte eine gekrümmte Oberfläche, deren Radius R_P durch die sogenannte Petzval-Summe gegeben ist. Für ein System aus dünnen Linsen lautet sie

$$1/R_P = \sum \frac{\Phi_i}{n_i} \quad (2.26)$$

Φ_i ist die Brechkraft der i -ten Linse ($\Phi_i = 1/f_i$) und n_i der Brechungsindex des Linsenmaterials. Die Größe des Fokus auf der Petzval-Fläche wird nicht beeinträchtigt.

Ähnliches gilt für die Bildverzerrung. Hier liegen die Fokuspunkte in der Bildebene und werden somit scharf abgebildet. Das Bild ist jedoch geometrisch verzerrt. Beispiele sind Tonnen-, Kissen- und Trapezverzerrung.

Chromatische Aberration

Aufgrund der Dispersion der verwendeten Gläser unterscheidet sich die Brennweite einer Linse bei unterschiedlichen Wellenlängen. Der Grad der Dispersion eines Glases wird durch

die Abbe-Zahl beschrieben, definiert durch

$$\nu = \frac{n_d - 1}{n_F - n_C} \quad (2.27)$$

n_d ist der Brechungsindex bei der Wellenlänge der d-Linie des Fraunhofer-Spektrums (587,6 nm), die in der Mitte des Intervalls liegt, das durch Wellenlängen der Fraunhofer F (486,1 nm) und C Linie (656,3 nm) gebildet wird. Bei zwei dünnen, sich berührenden Linsen mit den Brechkraften Φ_a und Φ_b ist $d\Phi$ die Brechkraftdifferenz zwischen den Wellenlängen bei F und C:

$$d\Phi = \frac{\Phi_a}{\nu_a} + \frac{\Phi_b}{\nu_b}. \quad (2.28)$$

2.8 Definition des Bildkontrastes

Anschaulich beschreibt der Bildkontrast, wie gut sich ein bestimmtes Detail vom Hintergrund in der direkten Nachbarschaft abhebt. Die Messung des Bildkontrastes in einem Bild mit einer komplexen Intensitätsverteilung stellt jedoch eine Herausforderung dar. Sie hängt zum einen von der Modulationstransferfunktion des abbildenden Objektivs ab und zum anderen von der Struktur der Probe, [Pel90]. Die Interaktion zwischen Photonen und Gewebe bildet ein Schlüsselement der Kontrastentstehung. Aus diesem Grund ist der Vergleich des Abbildungskontrastes unterschiedlicher Systeme meist nur durch das Abbilden periodischer Gitter oder einzelner Punkte vor einem homogenem Hintergrund sinnvoll.

In diesem Fall kann nach [Mic95] der Kontrast als Differenz des maximalen und des minimalen Intensitätswertes durch die Michelson Formel definiert werden:

$$C = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}}. \quad (2.29)$$

Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, dass für einen Vergleich von Konfokalen und konventionell aufgenommenen Daten, die Definition nach Michelson (Glg. (2.29)) ausreichend war, da meist Probenregionen mit einfachen Mustern gefunden werden konnten, die sich zur Anwendung des Michelson-Kontrastes eigneten. Zum anderen wurde für einen quantitativen Vergleich beider Methoden immer der gleiche Bereich einer Probe konfokal als auch konventionell aufgenommen.

Daneben existieren in der Literatur weitere Kontrastmaße wie der Weber-Kontrast für ein punktförmiges isoliertes Element vor konstantem Hintergrund ([Wes85]), der Quadratwurzelkontrast, der die Standardabweichung der Intensität misst ([PSRV87], [RS84]) sowie Kontrastmaße im Fourierraum, wie der bandlimitierte Kontrast ([HBP83]) oder der sinnvolle Kontrast ([TSK⁺11]). Diese Kontrastmaße eignen sich zur Analyse von unterschiedlichen, komplexen Bildern, wie es in der Bildsensorik, zum Beispiel im Bereich der Robotik, notwendig ist.

Kapitel 3

Beschreibung des Mikroskops und seiner Spezifikationen

Das hier beschriebene Instrument wurde auf Basis eines inversen Mikroskopstativ (Eclipse Ti-U, Nikon Instruments), wie es auch in [RSKK11] verwendet wurde, entworfen und gebaut. Das Lichtblatt sollte durch Rastern eines telezentrischen Gaußschen Laserstrahls, analog zu [KSWS08], generiert werden. Hierbei wird der Strahl im Zentrum des Bildfeldes fokussiert. Während der Bewegung entlang des Bildfeldes ist er stets parallel zur optischen Achse ausgerichtet. Gegenüber dem statischen mit zylindrischen Linsen erzeugten Lichtblatt hat dies zum einen den Vorteil, dass das Bildfeld entlang der Scanrichtung deutlich homogener ist, zum Anderen werden sog. Schatten-Artefakte reduziert. Hierbei handelt es sich um Streifen im Bild, die durch Beugung, Absorption oder Reflexion des Anregungslichts während der Passage durch die Probenkammer und Probe entstehen. Mitunter entstehen sie durch Interferenz des Anregungslichts. Dies wird durch das Rastern des Lasers vermieden, da es zu einer inkohärenten Beleuchtung führt.

Der Hauptgrund für die Verwendung eines gerasterten Strahls liegt jedoch darin, dass so eine räumlich begrenzte, linienförmige Anregung und konfokale Spaltendetektion, analog zu einem konfokalen Zeilen-Mikroskop, realisiert werden konnte.

Entwurf und Konstruktion des Geräts wurden in drei Phasen unterteilt:

1. Entwurf des Beleuchtungsstrahlengangs mittels eines optischen Design-Programms und Simulation der Punktabbildungsfunktion.
 2. Bau eines einfachen Prototyps zur Verifikation des Funktionsprinzips.
 3. Verfeinerung des Aufbaus, Verbesserung der Abbildungsleistung und teilweise Automatisierung von Strahljustage und Datenakquisition.
-

Im ersten Schritt wurde der Frage nachgegangen, welche Beleuchtungs- und Detektionsapertur für die Anwendung sinnvoll wären und welchen Einfluss optische Elemente wie Relais-Optik, Strahlaufweitung sowie Probenkammer und Lösungsmedium auf optische Aberrationen haben.

Die zentrale Aufgabenstellung des zweiten Schritts war es die optischen Elemente zu dem zuvor entworfenen Strahlengang zusammenzufügen und die gerasterte Beleuchtung mit dem *Rolling Shutter* der Kamera zu synchronisieren.

Im dritten Schritt wurde schließlich, basierend auf den Erkenntnissen, die mit dem ersten Prototyp gewonnen wurden, ein System konzipiert, bei dem die meisten mechanischen Arbeitsschritte bei der Bedienung des Mikroskops automatisiert wurden. Insbesondere die Kalibrierung des Mikroskops und die Kompensation des Defokus beim Bewegen der Probe erforderten eine hohe Präzision und Integration der einzelnen elektronischen Elemente. Die Steuerung wurde in LabView (National Instruments Corp.) implementiert, was die Bedienung über eine einzelne Benutzerschnittstelle ermöglichte.

3.1 Prinzip

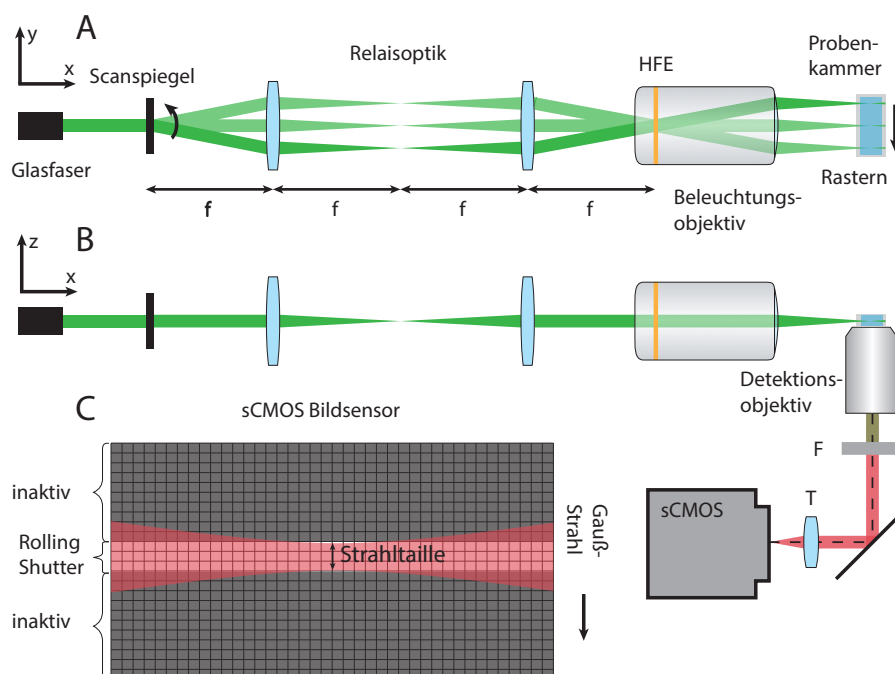


Abbildung 3.1: **A** Schemazeichnung des Aufbaus. Der Strahl wurde auf einen Scanspiegel gelenkt und durch diesen gerastert. Der Scanpunkt wurde durch die Relaisoptik in die HFE des Beleuchtungsobjektivs abgebildet. **B** Fluoreszenzlicht wurde durch das Detektionsobjektiv gesammelt. Durch den Fluoreszenzfilter F wurde das Anregungslicht eliminiert. Die Tubuslinse T erzeugte das Bild auf dem Detektor. **C** Der Strahl musste sich während des Rasterns exakt über der Mittelachse des aktiven Detektorbereichs befinden. Aus [BKK13].

Abbildung 3.1 **A** veranschaulicht das Funktionsprinzip der konfokalen LSFM. Der kollimierte Laser wurde aus einer Glasfaser auf einen Scanspiegel gelenkt. Das Kippen des Strahls wurde dann durch eine Relaisoptik in die HFE des Beleuchtungsobjektivs abgebildet. Da die HFE sich im Gehäuse des Objektivs befand, konnte der Scanner hier nicht direkt platziert werden. Im einfachsten Falle besteht ein solches optisches Relais aus zwei Sammellinsen in 4f-Konfiguration, siehe Kapitel. 2.2.

Die Probe befand sich in einer speziell angefertigten Glaskammer (Hellma GmbH & Co. KG), deren Boden die Dicke und Güte von Mikroskop-Deckgläsern besaß. Das Detektionsobjektiv sammelte das Fluoreszenzlicht und bildete dieses auf dem Detektor ab (3.1 **B**). Eine effektive Streulichtunterdrückung wurde gewährleistet, wenn die Breite des aktiven Detektors in der Größenordnung des Durchmessers des abgebildeten Strahls lag. Während der Bildaufnahme musste sich der Beleuchtungsstrahl immer exakt über dem aktiven Sensorbereich befinden (Abb. 3.1 **C**).

3.2 Beschreibung des experimentellen Aufbaus

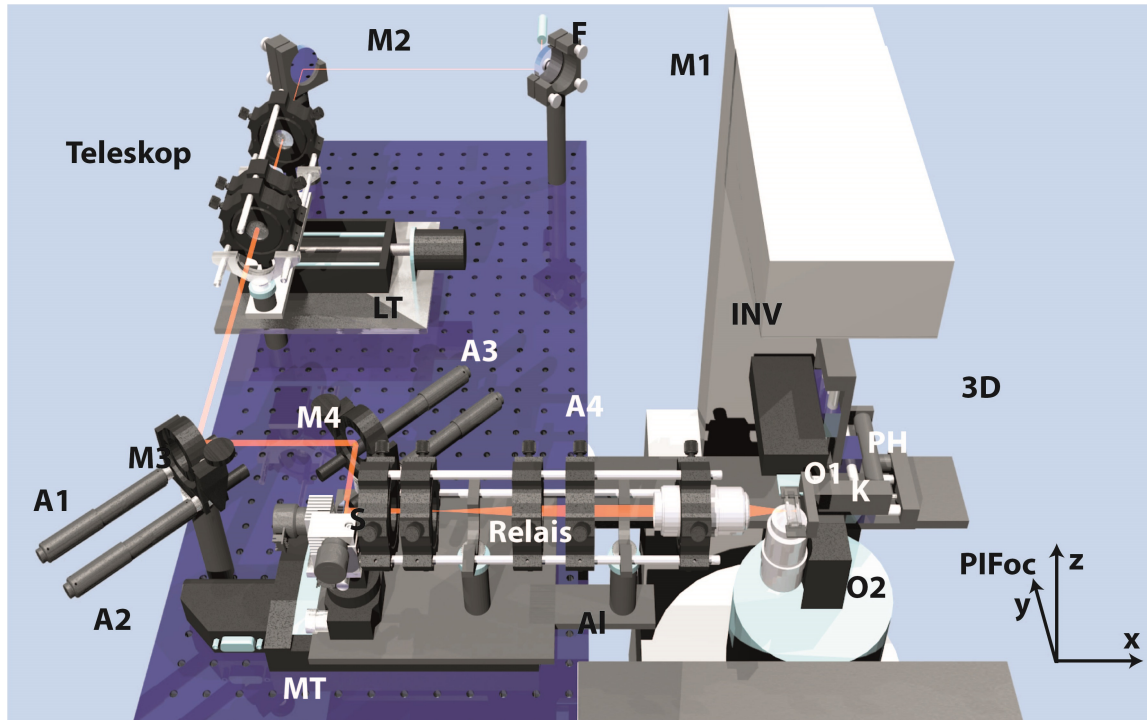


Abbildung 3.2: Computergrafik des Mikroskopaufbaus. Der Laserstrahl trat aus einer optischen Faser F aus und wurde über die Spiegel $M1$ und $M2$ in den Strahlaufweiter (**Teleskop**) geführt. Mit Hilfe des Lineartisches LT konnte dieses wahlweise aus dem Strahl gefahren werden. Die Spiegel $M3$ und $M4$ dienen zur Kalibrierung der Strahlposition in der Probenkammer. S ist der Galvospiegel. $O1$ und $O2$ bezeichnen jeweils das Beleuchtungs- und Detektionsobjektiv, PH den Probenhalter, K die Probenküvette und $3D$ die 3-Achsen Translationseinheit. **PIFOC** ist der Piezo-Objektivpositionierer und diente der Feinfokussierung. MT ist ein hochpräziser Stelltisch mit dem der Beleuchtungsfokus entlang der x -Achse bewegt wurde.

Abb. 3.2 zeigt ein dreidimensionales Computermodell des experimentellen Aufbaus. Der Beleuchtungsstrahlengang wurde auf einem erhöhten optischen Tisch montiert, so dass ein inverses Mikroskopstativ für die Detektion verwendet werden konnte. Der Beleuchtungsteil konnte im wesentlichen in drei Komponenten unterteilt werden: Ein Teleskop zur Aufweitung des Strahls, die motorisierten Justagespiegel $M3$ und $M4$ zur Feinkalibrierung der Beleuchtung und das Scan-Relais, bestehend aus Galvoscaner S (GVS002, Thorlabs Inc.), Relaisoptik und Beleuchtungsobjektiv $O1$. Der Strahl trat aus einem monomodalen-Glasfaserkabel (kineFlex, Point Source) aus und wurde über Umlenkspiegel $M1$ und $M2$ in das System geführt. Das Teleskop konnte mittels eines motorisierten Lineartisches (LT , Anfertigung der elektronischen und feinmechanischen Werkstatt, Institut für Physikalische Chemie, Univ. Bonn) in den Strahlengang und wieder aus diesem heraus bewegt werden, um wahlweise die Beleuchtungsapertur zu erhöhen oder zu verringern.

Die Spiegelhalter **M3** und **M4** (Feinmechanische Werkstatt) waren kardanisch aufgehängt. Für die Bewegung der Justagespiegel wurden Mikrometer-Aktoren **A1–A4** (Z806, Thorlabs, Inc.) verwendet. Diese erlaubten eine präzise Strahljustage. Der gesamte Stellweg der Aktoren betrug 5 mm. Die Positionsgenauigkeit der Aktoren betrug laut Hersteller 5 μm , unter Berücksichtigung des Umkehrspiels 15 μm . Bei der Rotation um die Achse A_1 betrug die Hebellänge 20 mm und um die Achse A_2 29 mm, siehe Abb. 3.3. Hieraus folgte ein maximaler Drehwinkel von ca. $\pm 0,24$ rad ($\approx 14^\circ$) bzw. $\pm 0,17$ rad ($\approx 9,8^\circ$) und eine Genauigkeit für das Kippen der Spiegel von 0,75 mrad ($\approx 0,043^\circ$) bzw. 0,52 mrad ($\approx 0,03^\circ$).

Die Scanspiegeleinheit bestand aus zwei zueinander orthogonalen Galvospiegeln g_x und g_y (Abb. 3.4). Kippen von g_x erzeugte die Rasterbewegung der Beleuchtung. Der Strahl verschob sich dadurch parallel entlang der y -Achse. Ein Spannungssignal zwischen +10 V und –10 V, das an den entsprechenden Eingang der Steuerungseinheit angelegt wurde, bestimmte den Kippwinkel. Der Konversionsfaktor betrug ein Grad pro Volt. Laut Herstellerangaben betrug die kleinste Schrittweite, sowie die Positions-Wiederholgenauigkeit, 15 μrad ($0,0008^\circ$). Der Abstand zwischen den Mittelpunkten der zwei Scanspiegel war in z -Richtung 10 mm.

Die Scaneinheit wurde bei dem Aufbau so positioniert, dass der Spiegel g_x in der Pupille P_0 des Relaisobjektivs stand (Abb. 2.2). Kippen von g_y führte zu einer Translation des Beleuchtungsstrahls in der x - z -Ebene. Diese Bewegung erfolgt allerdings nicht telezentrisch, da sich dieser Scanspiegel nicht in der Pupille des Beleuchtungsobjektivs befand. Dies bedeutet, dass der Strahl bei einer Auslenkung durch g_y nicht mehr parallel zur optischen Achse war sondern um die y -Achse kippte. Eine alternative Möglichkeit um den Strahl auch in der x - z -Ebene telezentrisch zu rastern ist zwei weiter auseinander liegende Scanspiegel mit einer zusätzlichen Relaisoptik dazwischen zu verwenden ([Paw10]). Denkbar wäre auch ein Scanspiegel, der um zwei Achsen gekippt werden könnte ([AK13]). Bei kleinen Auslenkungen ist dieser Fehler allerdings sehr gering, so dass der Spiegel g_y zum Korrigieren der Lage der beleuchteten Ebene verwendet werden konnte (Abchn. 5.3).

Die Abstände zwischen **M4**, der Scaneinheit, der Relaisoptik sowie zum Beleuchtungsobjek-

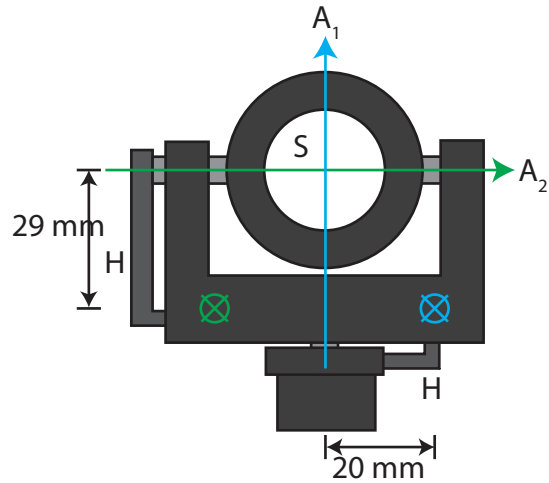


Abbildung 3.3: Skizze der kardanischen Aufhängung für die Justagespiegel. Ein runder Spiegel wird in S eingesetzt und kann um die beiden Achsen A_1 und A_2 gekippt werden. Die zu den Achsen gehörenden Aktoren greifen in die durch die Kreuze markierten Punkte (Farbe entsprechend den Drehachsen), senkrecht zur Abbildungsebene an. A_1 behält die räumliche Orientierung und A_2 wird um A_1 gedreht. Die Länge des Hebelarms H bestimmt den Kippwinkel.

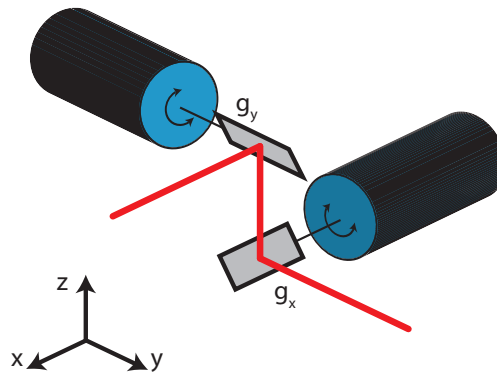


Abbildung 3.4: Anordnung der Scanspiegel des GVS002. Der untere Spiegel g_x diente dem Rastern der Beleuchtung und wurde um die x -Achse rotiert. Der Spiegel g_y wurde um die y -Achse gekippt. Die Mittelpunkte der beiden Spiegelflächen besaßen einen Abstand von 10 mm in z . Der Lichtstrahl ist im Bild durch die rote Linie dargestellt.

tiv mussten konstant gehalten werden. Jedoch bestand aus Gründen wie Defokussierung, chromatischen Fehlern und der beschränkten Länge des Beleuchtungsfokus die Notwendigkeit die Beleuchtung entlang der x -Achse zu verschieben. Hierzu wurde ein motorisierter, hochpräziser Lineartisch **MT** (M-405.CG, Physik Instrumente GmbH) verwendet (Abb. 3.2). Die erwähnten Komponenten wurden fix auf einer Aluminiumplatte und diese

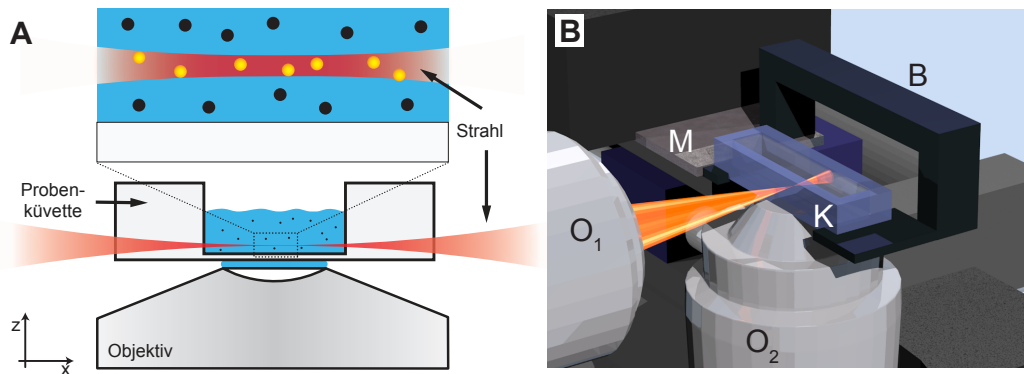


Abbildung 3.5: **A** Geometrie der Probenküvette, Seitenansicht. Der Strahl trat von links in die Probenküvette ein und passierte eine Glaswand von 2 mm Dicke. Aus [RVV⁺ 10]. **B** Detailansicht des Probenhalters und der Probenküvette. Die Küvette **K** wurde durch einen Metallbügel **B** über dem Detektionsobjektiv gehalten. Dieser war magnetisch über ein Metallplättchen **M** an der 3-Achsen-Positionierung befestigt.

wiederum auf dem Lineartisch montiert. Der Beleuchtungsfokus konnte so in x -Richtung mit einer hohen Präzision bewegt werden, da sich nur der Abstand zwischen **M3** und **M4** änderte. Der Lineartisch **MT** zeichnete sich neben einer hohen Schrittweitauflösung ($0,1 \mu\text{m}$) durch einen sehr geringen Neigungs- und Gierwinkel von $\pm 25 \mu\text{rad}$ (0.0013°) aus.

Dies ist der Winkel zwischen Strahl und optischer Beleuchtungsachse. Zu starkes Neigen oder Gieren hätte eine Verschiebung oder Verkipfung des Beleuchtungsstrahls zur Folge, der dann nicht mehr zum *Rolling Shutter* konjugiert wäre.

Die Probe wurde in einer Glasküvette **K** platziert (Abb. 3.2 und 3.5). Diese konnte mittels der Translationseinheit (drei Stellische M-122.2DD, Physik Instrumente GmbH) entlang der drei Raumrichtungen bewegt werden. Die kleinste Schrittweite betrug $0,2\ \mu\text{m}$ bei einem Umkehrspiel von $0,2\ \mu\text{m}$. Mit Hilfe einer piezoelektrischen Objektivhalterung (PIFOC PD 72Z1, Physikinstrumente GmbH) konnte das Beobachtungsobjektiv in z -Richtung bewegt werden. Diese wurde benötigt um Defokus beim Bewegen der Probe entlang der z -Achse zu kompensieren und um die Beleuchtungsebene automatisch mit hoher Präzision zu fokussieren.

3.3 Der Einfluß der Probenküvette

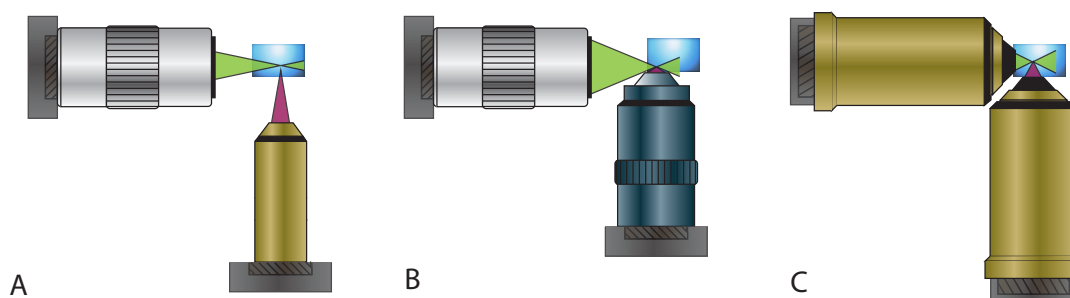


Abbildung 3.6: Das Mikroskop wurde in drei Konfigurationen betrieben. **A** Luftimmersions-Objektive für Beleuchtung (10x, NA 0,28, Nikon) und Detektion (10x, NA 0,3 sowie 20x, NA 0,5, Nikon). **B** Vergrößerung der Beleuchtungsapertur mittels Strahlaufler und Detektion durch ein NA 1,15, 40x Wasser Immersionsobjektiv. **C** Für Beleuchtung und Detektion wurde ein Tauchobjektiv verwendet (NA 0,8, 40x, Nikon). Die Probe war in einem Agaroseblock eingebettet. Eine Diskrepanz der Brechungsindizes trat hier weder bei der Beleuchtung, noch bei der Detektion auf. Hierdurch wurde Defokussierung beim Bewegen der Probe vermieden.

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, wurde eine Glasküvette aus N-BK7 Glas benutzt. Diese besaß eine seitliche Glaswand mit einer Dicke von 2 mm und einen Glasboden mit einer Dicke von $170\ \mu\text{m}$. Die Küvette wurde mit dem jeweiligen Probenmedium gefüllt und das zu untersuchende Objekt wurde hineingelegt.

Abb. 3.6 gibt eine schematische Darstellung der Beleuchtungs- und Detektionsgeometrie. Abb. 3.6 **A** zeigt die Belichtung mittels 10x-Luftimmersions-Objektiv ohne Strahlauflerung. Für die Detektion wurde hier auch ein Luftimmersions-Objektiv verwendet, wahlweise 10x NA 0,3 oder 20x NA 0,5. Der blaue Block steht stellvertretend für die Probenküvette. Bei Bewegung der Probe in x -Richtung verschob sich die Fokusposition des

Beleuchtungsstrahls aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes von Luft und Probenmedium. Dies konnte durch eine Verschiebung der Beleuchtungsoptik mit Hilfe des linearen Präzisionstisches (**MT** in Abb. 3.2) kompensiert werden.

Für Aufnahmen mit hoher numerischer Apertur wurde ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet, Nikon 40x, NA 1,15, Abb. 3.6 **B**. Der Beleuchtungsstrahl wurde dazu mit dem Teleskop aufgeweitet, um eine Lichtblat mit geringer Dicke zu erzeugen. Die Defokuskorrektur mittels des PIFOC bei Probenbewegung in z -Richtung erübrigte sich hier. Allerdings ergaben sich hier Probleme durch den großen Durchmesser des Objektivs. Wegen der hohen numerischen Beleuchtungsapertur und dem hierzu vergleichsweise geringen Arbeitsabstand des Objektivs von $600\ \mu\text{m}$, traf der Beleuchtungsstrahl leicht die obere Objektivkante.

Des Weiteren konnte sich die Position des Fokuspunktes auch bei Verschiebung der Probe in y -Richtung ändern, wenn die Glasoberfläche der Küvette nicht exakt orthogonal zur optischen Achse der Beleuchtung war. Insbesondere Letzteres war schwierig zu korrigieren, da durch das Einsetzen der Küvette in den Probenhalter schon Ungenauigkeiten entstanden, die jedes Mal aufs Neue hätten quantifiziert werden müssen.

Hier soll noch eine getestete Alternative erwähnt werden, die das Problem des Defokus vollständig umgeht. Dazu wurden Tauch-Objektive verwendet (Abb. 3.6 **C**). Das zu untersuchende Objekt wurde in einen Block aus Agarose eingebettet. Ein modifizierter Probenhalter hielt den Agaroseblock so, dass keine Glas- oder Luftschichten zwischen Objektiven und Agarose vorhanden waren, da die Objektive für die Verwendung ohne Deckglas konzipiert waren. Bei dieser Methode trat kein Defokus auf, weder bei Beleuchtung noch bei der Detektion, da der Brechungsindex überall dem von Wasser entsprach.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten wurden mit Objektiven gemäß der Abb. 3.6 **A** und **B** aufgenommen.

3.4 Defokus-Korrektur

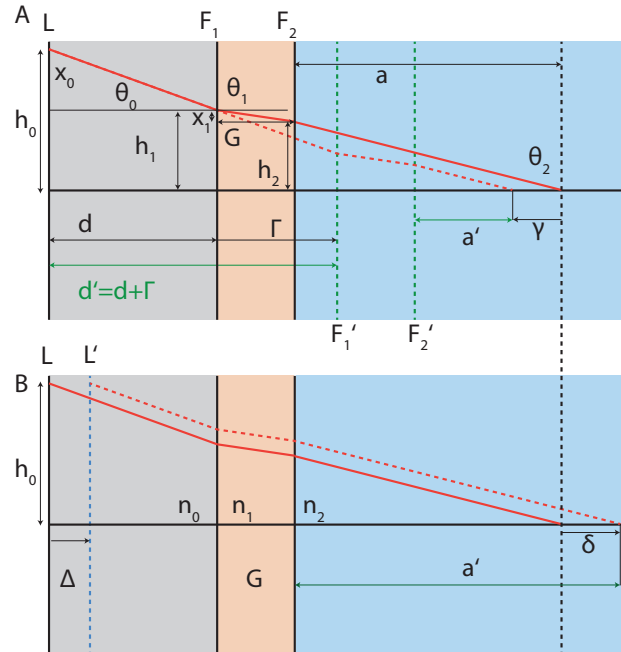


Abbildung 3.7: Paraxiales Modell zur Bestimmung der durch die Bewegung der Probenküvette erzeugten Fokusverschiebung. Eine Linse L mit Radius h_0 fokussiert einen Strahl (rot) durch Medien mit den Brechungsindizes $n_0 < n_2 < n_1$. Oben: Wird die mittlere Schicht (das Glas der Probenküvette), mit den Grenzflächen F_1 und F_2 und der konstanten Dicke G , um eine Strecke Γ nach rechts verschoben, wandert der Fokus um eine Strecke γ nach links (gestrichelte Linie). Unten: Wird die Linse um den Betrag Δ nach rechts bewegt, wandert der Fokus um den Betrag δ nach rechts.

L	Linse	x_i	$h_{i+1} - h_i$
h_i	Strahlhöhe bei Grenzfläche F_i	θ_i	Winkel zum Lot der Grenzfläche
d	Abstand Linse-Küvette	a	Abstand Küvette-Fokus
d'	Abstand nach Verschiebung	a'	Abstand nach Verschiebung
Γ	Verschiebung der Küvette	G	Dicke der Küvette
n_i	Brechungsindex	Δ	Verschiebung der Linse
γ	Defokus durch Γ	δ	Defokus durch Δ

Tabelle 3.1: Nomenklatur.

In Abschnitt 3.3 wurde der Einfluss der Probenküvette auf die Position des Fokuspunktes des Beleuchtungsobjektivs und der Fokusebene des Detektionsobjektivs beschrieben. Der dadurch erzeugte Defokus und die benötigte Korrektur werden in diesem Abschnitt hergeleitet.

Abbildung 3.7 veranschaulicht die Herleitung des Defokus und seiner Korrektur für eine paraxiale Linse mit Radius h_0 , die einen Lichtstrahl durch drei Grenzschichten (im Bild

farbig) mit unterschiedlichen Brechungsindizes n_0 , n_1 und n_2 fokussiert. Bei Verschiebung des Probenhalters um einen Betrag Γ verschiebt sich der Fokus um

$$\gamma = \Gamma \left(\frac{n_2}{n_0} - 1 \right). \quad (3.1)$$

Bei Verschiebung der Linse um Δ verschiebt sich der Fokus um

$$\delta = \Delta \frac{n_2}{n_0}. \quad (3.2)$$

Übertragen auf den in dieser Arbeit verwendeten Aufbau wäre n_0 der Brechungsindex des Immersionsmediums und n_2 der des Mediums in der Probenkammer. Um den Defokus γ durch Bewegen der Probenkammer um Γ auszugleichen, muss das entsprechende Objektiv um eine Strecke Δ bewegt werden, so dass $\delta = -\gamma$ gilt. Mit den Gleichungen (3.1) und (3.2) folgt für den Korrekturfaktor

$$\frac{\Delta}{\Gamma} = \frac{n_0}{n_2} - 1 \quad (3.3)$$

Für das Probenmedium Wasser ($n_2 = 1.33$) und das Immersionsmedium Luft ($n_0 = 1$) ergibt sich ein Korrekturfaktor von rund $-0.25 \mu\text{m}$ Verschiebung des Objektivs pro μm Verschiebung der Probe.

Dieser Zusammenhang soll mit Hilfe der in Abbildung 3.7 eingezeichneten Größen hergeleitet werden. Durch die schwarzen senkrechten Linien sind die Grenzschichten in ihrer Ausgangsposition dargestellt. Der Strahl, rot im Bild, trifft bei der Höhe h_1 auf die erste Oberfläche der Küvette. Der Winkel zum Lot der Grenzfläche ist θ_0 . Auf der dahinterliegenden Seite mit dem Brechungsindex n_1 ist der Winkel nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz bestimmt durch $\sin \theta_1 = \sin \theta_0 \frac{n_0}{n_1}$. Analog gilt dies für die nächste Oberfläche mit den Brechungsindizes n_1 und n_2 . Dahinter schneidet der Strahl die optische Achse im Abstand a . Es gilt

$$a = \frac{h_2}{\tan \theta_2} \quad \text{mit} \quad h_2 = h_1 - x_1 \quad (3.4)$$

$$\Rightarrow a = \frac{h_1 - x_1}{\tan \theta_2} \quad \text{mit} \quad h_1 = h_0 - x_0 = h_0 - d \tan \theta_0 \quad (3.5)$$

$$\Rightarrow a = \frac{h_0 - d \tan \theta_0 - x_1}{\tan \theta_2} \quad (3.6)$$

Nun wird die Probenküvette um den Betrag Γ nach rechts bewegt. Da G konstant ist, bleibt x_1 bei Verschiebung der Probenküvette unverändert. Die Verschiebung des Fokus um den

Betrag γ ist gleich der Differenz der Abstände von der Linse zum Fokus in beiden Fällen:

$$\gamma = d + G + a - d' - G - a' = d - d' + a - a' = -\Gamma + a - a' \quad (3.7)$$

Da sich nur d ändert, folgt nach Gleichung 3.6 für den neuen Abstand a'

$$a' = \frac{h_0 - d' \tan \theta_0 - x_1}{\tan \theta_2} \quad (3.8)$$

und somit für die Differenz

$$a - a' = (d' - d) \frac{\tan \theta_0}{\tan \theta_2} \quad (3.9)$$

$$\Rightarrow \gamma = -\Gamma + \Gamma \frac{\tan \theta_0}{\tan \theta_2} \approx -\Gamma + \Gamma \frac{\sin \theta_0}{\sin \theta_2} = -\Gamma + \Gamma \frac{\sin \theta_0 \sin \theta_1}{\sin \theta_1 \sin \theta_2} = \Gamma \frac{n_1 n_2}{n_0 n_1} - \Gamma \quad (3.10)$$

$$\Rightarrow \gamma = \Gamma \left(\frac{n_2}{n_0} - 1 \right) \quad (3.11)$$

Der Defokus durch Verschiebung des Objektivs wird analog bestimmt, siehe Abb. 3.7, unten. Die Abstände werden in beiden Fällen von der Ausgangsposition der Linse (schwarze Linie) gemessen, also $d = d'$. Somit gilt:

$$\delta = a' + G + d' - a - D - d = a' - a = \Delta \frac{n_2}{n_0} \quad (3.12)$$

3.5 CMOS Detektor und der Rolling Shutter

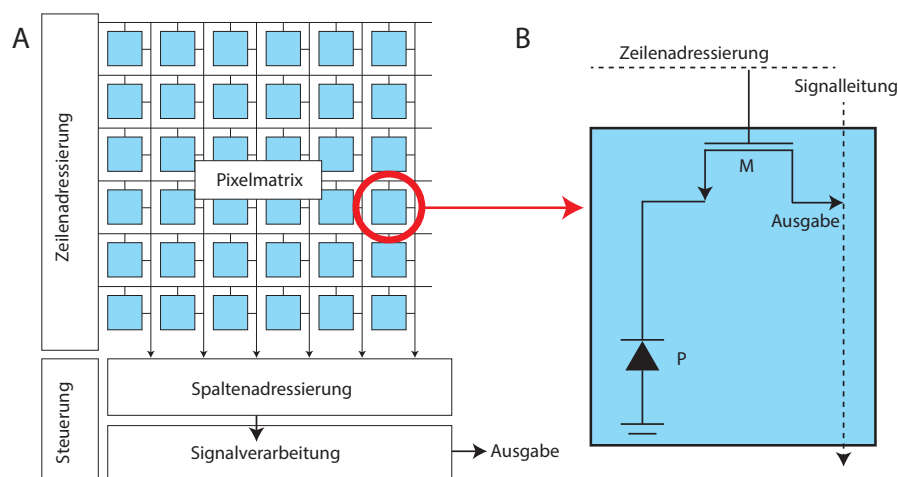


Abbildung 3.8: **A** Prinzipieller Aufbau eines CMOS Bilddetektors mit Sensormatrix und Peripherieeinheiten zur Signalauslese. **B** Grundlegendes Prinzip der Verschaltung eines Pixels. Die an der Photodiode *P* anliegende Spannung wird durch auftreffende Photonen reduziert. Durch Schalten des Transistors *M* kann diese Signalspannung ausgelesen werden. Modifiziert nach [BCFS06].

In dieser Arbeit wurden Kameras mit einem sog. 'Complementary Metal Oxide Semiconductor' (CMOS) Sensor verwendet. Hierbei handelt es sich um einen aktiven Pixelsensor, bei dem jeder Pixel eine eigene Verstärkereinheit zum Auslesen des Spannungssignals besitzt (Abb. 3.8 **A**). Zusätzlich können noch weitere Peripherieschaltungen wie Analog-Digitalwandler oder zeitliche Steuerung direkt im Pixel integriert werden ([SKB⁺13]). Ein CMOS Pixel besteht aus einer in Sperrrichtung geschalteten Photodiode an der zu Beginn der Messung eine definierte Ausgangsspannung angelegt wird (Abb. 3.8 **B**). Auftreffende Photonen erzeugen nun Elektronen-Loch-Paare, was zu einem Photostrom und somit zum Abfall der Sperrschichtspannung führt. Das Auslesen der Spannung erfolgt im einfachsten Falle über einen Feldeffekttransistor (MOSFET), der zur Adressierung der Photodiode dient.

Lange Zeit galten CMOS-Kameras aufgrund der geringeren Lichtempfindlichkeit im Vergleich zu Charge Coupled Device (CCD) Sensoren als unterlegen. Durch die sich im Detektor-Pixel befindliche Elektronik wird die photosensitive Fläche reduziert und die Sensitivität, das Produkt aus Füllfaktor und Quanteneffizienz, reduziert. CCD Sensoren haben einen Füllfaktor von nahezu 100 % [YC90], [ROY⁺04], wohingegen dieser bei CMOS Sensoren bei 30 % liegt. Durch Vergrößerung der Photodiode und Verwendung von Mikrolinsen zur Fokussierung des eintreffenden Lichts auf den photosensitiven Bereich können Füllfaktoren von über 90 % erreicht werden. Durch Verwendung von innovativen Halbleiterarchitekturen, können gar 100 % erreicht werden ([DMS97], [MDS98]).

Die meisten CMOS-Kameras werden im sog. *Rolling Shutter* Modus betrieben. Die Akti-

vierung und Belichtung der Sensoren erfolgt dabei ab der obersten Pixelzeile (Abb. 3.9 **A**). Nach Ablauf der Zeilenaktivierungszeit t_A wird die nächste Zeile aktiviert. Ist die voreingestellte Belichtungszeit von $N \times t_A$ vergangen, so wird die Belichtung der ersten Zeile gestoppt und die Spannung der Pixel ausgelesen. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich ein Band aus N aktiven Zeilen an der oberen Kante des Bildsensors (Abb. 3.9 **B**). Da der Aktivierungs- und Auslesevorgang wie oben beschrieben zeilenweise fortgeführt wird, bewegt sich dieser aktive Bereich effektiv von oben nach unten über den Detektor (Abb. 3.9 **C**). Die Zeit zwischen dem Aktivieren und Auslesen entspricht der Belichtungszeit. Es existieren auch CMOS Kameras mit einem Auslesemodus, bei dem alle Pixel synchron aktiv sind. Dieser Modus wird *Global Shutter* genannt.

Die Rauschquellen können in räumliche und zeitliche unterteilt werden. Zu dem räumlichen gehört das sog. *Fixed Pattern Noise* ([FBHG01]). Dieses wird unter anderem durch leicht voneinander abweichendes Verhalten der Ausleseelektronik auf jedem einzelnen Pixel erzeugt. Einen Überblick über die unterschiedlichen Arten von zeitlichem Rauschen bietet [HPC98].

In dieser Arbeit wurden zwei Kameramodelle verwendet, die Orca Flash 2.8 und Orca Flash 4.0 (Hamamatsu Photonics K.K.). Die technischen Eigenschaften sind Tabelle 3.2 zu entnehmen. Beide Kameras wurden im *Rolling Shutter* Modus betrieben. Bei der Version

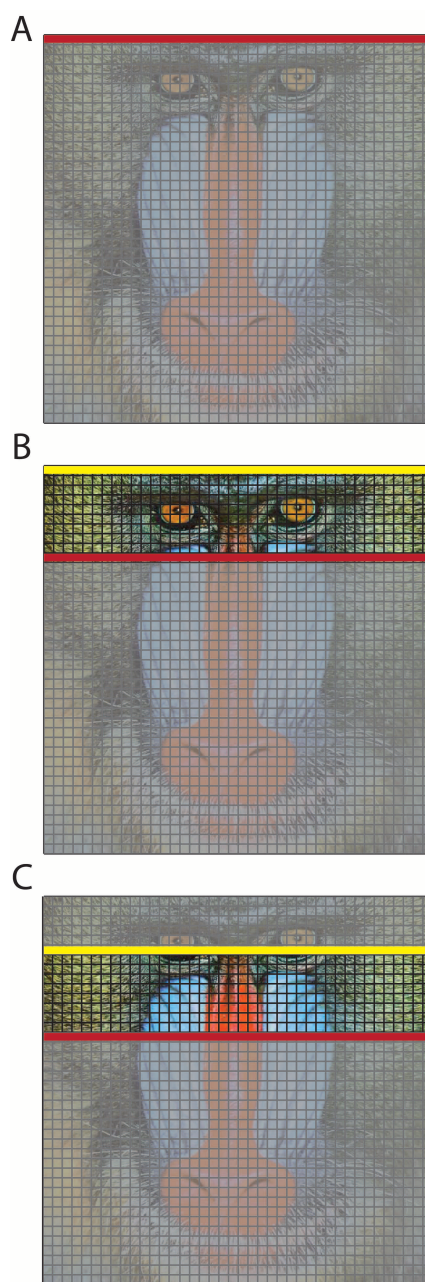


Abbildung 3.9: Funktionsweise des Rolling Shutters. **A** Die oberste Pixelzeile wird aktiviert (rot). **B** Nach Ablauf der Belichtungszeit wird die erste Zeile deaktiviert und ausgelesen (gelb), während die Initialisierung der weiter unten liegenden Zeilen weiterläuft. **C** Band aus aktiven Pixelzeilen, das den Chip entlangwandert.

Flash 4.0 bestand der Bildsensor aus zwei Teilen mit jeweils 2048×1024 Pixeln. In der Standardkonfiguration besaß jeder der beiden Detektorhälften einen eigenen Rolling Shutter. Diese begannen in der Mitte des Sensors und liefen zu den äußeren Kanten. Jedoch konnte die Kamera auch im sog. 'Light Sheet' Modus betrieben werden. Hierbei bewegte sich der Rolling Shutter ohne Unterbrechung von oben nach unten über den gesamten Sensorbereich.

Modell	Orca Flash 2.8	Orca Flash 4.0 V2
Anzahl Pixel	1920x1080	2048x2048
Pixelgröße	3,63 μm	6,5 μm
min. Belichtungszeit	15 μs	20 μs
QE(500 nm)	$\approx 66\%$	$\approx 66\%$
QE(600 nm)	$\approx 50\%$	$\approx 73\%$
QE(700 nm)	$\approx 30\%$	$\approx 66\%$

Tabelle 3.2: Hauptmerkmale der verwendeten Kameramodelle. Quelle: Hamamatsu.

3.6 Elektronik zur Steuerung des Mikroskops

Abb. 3.10 zeigt das elektronische Layout des experimentellen Aufbaus. Gesteuert wurde das Mikroskop über einen Computer mittels einer eigens hierfür in LabView programmierten Benutzeroberfläche. Die Kamera war auch in dieses System eingebunden und ermöglichte eine Rückkopplung zwischen dem System und den aufgenommenen Daten. Hierdurch konnte z.B. eine automatische Kalibrierung des Systems vorgenommen werden. Die Kommunikation erfolgte über eine *Camera Link*-Schnittstelle und erlaubte eine Übertragungsrate von über 800 GB pro Sekunde. Zur Erzeugung von Spannungssignalen wurde ein NI USB-6221 (National Instruments Corp.) Datenerfassungsgerät (engl. *data acquisition*, kurz DAQ) verwendet. Dieses verfügte über zwei Analogausgänge (16 bit, 833 kS/s), 16 Analogeingänge (16 bit, 250 kS/s) und 24 Digital-I/O-Kanäle. Über die beiden Analogeingänge wurden die Spannungen ausgegeben, die die Position der Galvospiegel in einem Bereich von $\pm 10^\circ$ einstellten. Die Analogeingänge konnten verwendet werden, um die Position auszulesen, die über eine Spannung an der Kontrolleinheit des Scanspiegels (C1 und C2) ausgegeben wurde. An den Digitalausgängen konnten zwei Spannungswerte ausgegeben werden, 0 V und 5 V, was jeweils einer logischen 0 oder 1 entsprach. Diese wurden benutzt, um die Belichtung über den Eingang für den Auslöser der Kamera zu starten, oder den Laser während des Rasterns einzuschalten.

Die Aktoren der Kalibrationsspiegel wurden über TDC001 Steuerungseinheiten (Thorlabs Inc.) angesprochen, die über USB angeschlossen waren. Die Position des PIFOC wurde über eine Steuerungseinheit E-662.LVPZT (Physikinstrumente GmbH) gesteuert und ausgelesen. Die Probe konnte bewegt und die Position ausgelesen werden, indem entsprechende

Befehle an die Steuerungseinheit (LaVision BioTec GmbH) über eine serielle Schnittstelle gesendet wurden. Die Steuerungsbefehle für den linearen Stelltisch wurden über die Steuerungseinheit C-863.11 von Physikinstrumente gesendet.

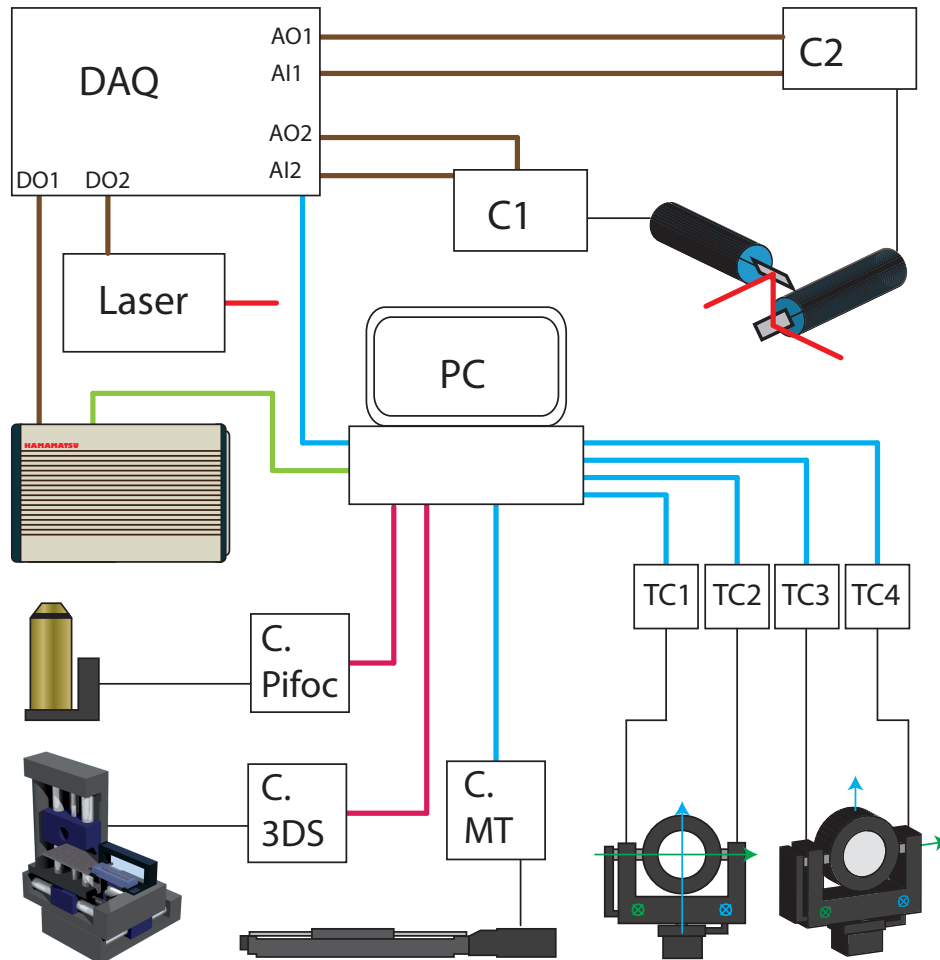


Abbildung 3.10: Elektronisches Layout des Mikroskopaufbaus. Die elektronischen Geräte wurden über einen Computer mittels einer in LabView programmierten Benutzeroberfläche gesteuert. Mit Hilfe einer DAQ wurden die Signalkurven für die Scanspiegel erzeugt. AI und AO stehen für die verwendeten analogen Eingangs- und Ausgangskanäle und DO für die digitalen Ausgabekanäle, die für das Auslösen der Kamera und das Einschalten des Beleuchtungslasers Verwendung fanden. C1 und C2 sind die Steuerungsplatinen für die Scanspiegel. C. (Controller) PIFOC, C. 3DS und C. MT sind die Steuerungseinheiten, die für den PIFOC, die Probenpositionierung und den motorisierten Stelltisch benutzt wurden. TC1 bis TC4 sind die Steuerungseinheiten der Aktoren für die Justagespiegel. Blau: USB Anschluss, Rot: Serielle Schnittstelle, Grün: Camera Link-Schnittstelle, Braun: Kabel an Schraubklemmen oder Pins, Schwarz: Sonstige.

3.7 Synchronisation zwischen Scanspiegel und Kamera

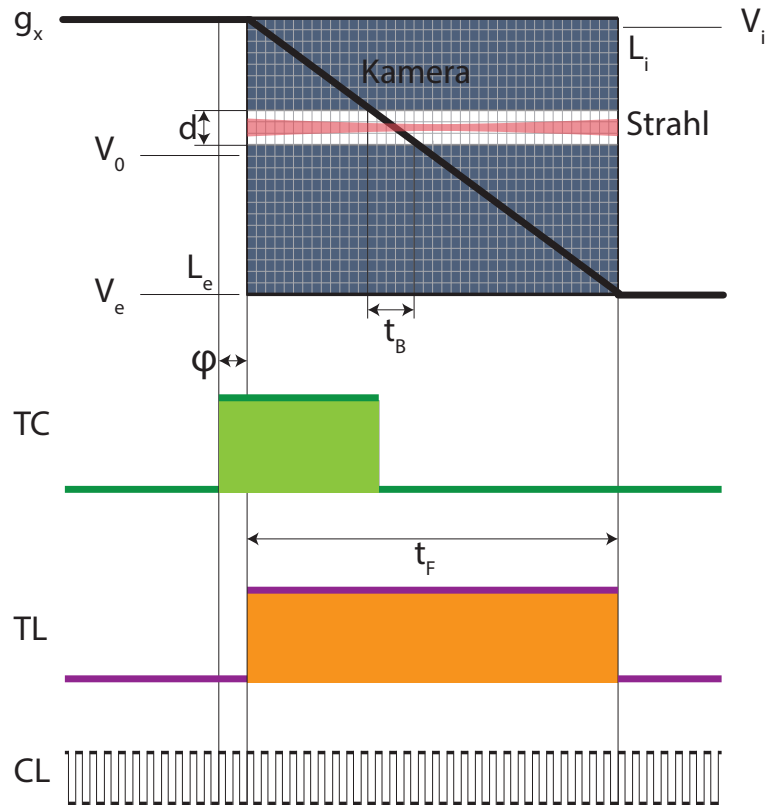


Abbildung 3.11: Zeitverlaufdiagramm für die Scanspiegelspannung g_x , den Trigger für die Kamera TC und den Trigger für den Laser TL. Als gemeinsamer Taktgeber CL wird der interne Zähler der DAQ verwendet. V_i und V_e sind die Anfangs- und Endspannungswerte der Spannungskurve, bei denen die Strahlposition im Bild jeweils der obersten und untersten Detektorzeile L_i und V_e entspricht. V_0 ist die Spannung, die der Mitte der Kamera entspricht (Offsetspannung), t_B ist die Belichtungszeit, t_F die Aufnahmezeit für ein Bild und d die Breite des Rolling Shutters. Durch das Verändern der Phase ϕ kann die Synchronität zwischen Kamera und Laser optimiert werden.

Um eine optimale Abbildungseffizienz zu erreichen, war es notwendig, dass das Bild des Beleuchtungsstrahls zu jedem Zeitpunkt während des Rasterns mit dem aktiven Bereich der Kamera überlappte. Diese Bedingung war insbesondere kritisch bei Breiten des *Rolling Shutter*s im Bereich von 20 Pixeln und weniger, was in etwa dem Strahldurchmesser entspricht. Die Belichtung der ersten Zeile musste genau dann beginnen, wenn die Hauptachse des Strahls sich über dieser befand. Dies bedeutete, dass das Auslösesignal, das die Belichtung der Kamera initiierte, und das Spannungssignal für den Scanspiegel mit einer zeitlichen Genauigkeit von weniger als $15 \mu\text{s}$ synchronisiert werden mussten. Dies entsprach der kleinsten möglichen Zeilenaktivierungszeit.

In Abb. 3.11 ist das zeitliche Schema der Signalerzeugung dargestellt. Die in dieser Arbeit

benutzte DAQ verfügte über die Möglichkeit die interne Elektronik auszunutzen, um mehreren Ausgabekanälen die gleiche Taktquelle und ein gemeinsames Startsignal zuzuordnen. In diesem Fall war dies der interne Zähler (CL). Die Taktrate entsprach hierbei der Zeilenzeit der Kamera. Die Anzahl der Spannungswerte in der analogen Spannungsrampe für den Scanspiegel g_x war gleich der Anzahl der Zeilen des aufgenommenen Bildausschnitts. War t_B die gewünschte Belichtungszeit und N die Anzahl der aktiven Zeilen des *Rolling Shutter*, so musste die Pixelzeit t_p (und die Samplingrate $1/t_p$) entsprechend der Formel $t_p = t_B/N$ gesetzt werden. War M die Anzahl der Zeilen des aufgenommenen Bildes, so war die Zeit t_F für die Aufnahme eines ganzen Bildes $t_F = (M - 1)t_p + t_B$. Dies ist die Dauer bis jede Zeile einmal aktiviert wurde plus der Belichtungszeit der letzten Zeile.

Vor Beginn der Datenerzeugung wurden die Spannungswerte in den Puffer der DAQ geladen. Dieser Prozess unterlag nicht der hohen zeitlichen Anforderung und konnte über ein USB Kabel erfolgen. Die Kamera wurde währenddessen mit den gewünschten Parametern, wie Belichtungszeit und Breite des Rolling Shutter, initialisiert. Wenn die Aufforderung an die DAQ für den Start der Signalerzeugung erfolgte, wurden die Steuerspannung für den Scanspiegel und der elektronische Auslöseimpuls für die Kamera gleichzeitig ausgegeben. Des Weiteren entstanden Zeitunterschiede durch die Elektronik von Kamera und Steuerung des Scanspiegels. Diese konnten durch Veränderung der Phase ϕ zwischen den Abtastpunkten von Scan- und Auslösesignal kompensiert werden.

3.8 Die Rolle der Kalibrationsspiegel bei der Strahlpositionierung

Mit den beiden Kalibrationsspiegeln M3 und M4 aus Abb. 3.2 wurde der Beleuchtungsstrahl kalibriert. Beide Spiegel konnten um jeweils zwei Achsen gekippt werden (Abb. 3.3). Der Schnittpunkt der Drehachsen lag auf dem Mittelpunkt der Spiegeloberfläche. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, welchen Effekt das Kippen der Kalibrationsspiegel auf die Lage des Beleuchtungsstrahls in der Probe hat. Analytisch könnte dies durch Transformationsmatrizen beschrieben werden. Dies führt aber aufgrund der hohen Zahl an Freiheitsgraden zu wenig übersichtlichen algebraischen Ausdrücken. Eine Alternative ist die direkte numerische Berechnung der resultierenden Vektoren.

Abb. 3.12 **A** und **B** zeigen eine Computergrafik mit zwei unterschiedlichen Ansichten der Spiegelgeometrie und der verwendeten Vektoren aus zwei unterschiedlichen Richtungen. Tab. 3.3 gibt eine Übersicht über die einzelnen Elemente und der in diesem Abschnitt verwendeten Nomenklatur. Die Abstände zwischen den Spiegeln sind auf 1 normiert und einheitslos.

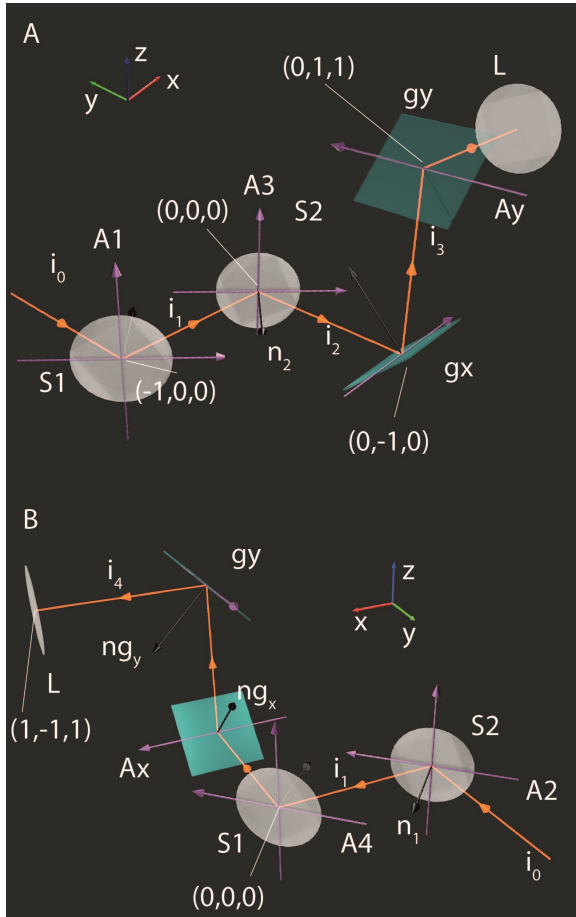
Die Stellung jedes Spiegels wird durch einen Normalvektor (in der Grafik schwarz) repräsentiert. Die einlaufenden und reflektierten Lichtstrahlen sind durch den orangen Pfad symbolisiert und die Drehachsen der einzelnen Spiegel durch die magenta Pfeile. S1 und S2 symbolisieren die Kalibrationsspiegel, gx und gy die Scanspiegel (vgl. auch Abb. 3.4). L ist eine paraxiale Scanlinse mit einer Brennweite von 2. Die Positionen der Mittelpunkte der Spiegel und der Linse sind jeweils daneben in Klammern angegeben. Befinden sich die Spiegel in ihrer Ausgangsposition, verläuft der Strahl zunächst in der x-y-Ebene, wird durch gx in die x-z-Ebene gelenkt und durch gy wieder in eine Ebene die koplanar zur x-y-Ebene ist. Der Scanspiegel gx befindet sich dabei in einem Abstand von 2 zur Scanlinse, weshalb deren Brennweite bei der späteren Analyse der Strahllage entsprechend gewählt werden muss.

Die gesamte Analyse kann dann durch Spiegelung des einfallenden Lichtstrahls und der Berechnung des Schnittpunkts des reflektierten Strahls mit der nächsten Spiegeloberfläche erfolgen.

Ein einlaufender Strahl \vec{i}_0 trifft auf eine Oberfläche mit Normalvektor \vec{n} und wird von dieser reflektiert. Für den reflektierten Strahl \vec{i}_1 gilt dann:

$$\vec{i}_1 = \vec{i}_0 - 2\langle \vec{i}_0, \vec{n} \rangle \vec{n} \quad (3.13)$$

Die eckigen Klammern bezeichnen das Skalarprodukt. Ist eine Ebene im Raum mit Normalenvektor \vec{n} und einem Punkt \vec{r}_0 auf dieser definiert durch $\langle (x_E + \vec{r}_0), \vec{n} \rangle = 0$, dann ist



S1	Kalibrationsspiegel 1
S2	Kalibrationsspiegel 2
gx	Scanspiegel x
gy	Scanspiegel y
\vec{A}_1	Drehachse von S1 um z-Achse
\vec{A}_2	Drehachse von S1 in x-y-Ebene
\vec{A}_3	Drehachse von S2 um z-Achse
\vec{A}_4	Drehachse von S2 in x-y-Ebene
\vec{A}_x	Drehachse von gx
\vec{A}_y	Drehachse von gy
ι	Drehwinkel um \vec{A}_1
κ	Drehwinkel um \vec{A}_2
ξ	Drehwinkel um \vec{A}_3
ψ	Drehwinkel um \vec{A}_4
γ	Drehwinkel um \vec{A}_x
δ	Drehwinkel um \vec{A}_y
\vec{n}_1	Normalenvektor von S1
\vec{n}_2	Normalenvektor von S2
$n\vec{g}_x$	Normalenvektor von gx
$n\vec{g}_y$	Normalenvektor von gy
\vec{i}_0	Vektor einlaufender Strahl
\vec{i}_i	Strahlvektor nach i Reflexionen
\vec{P}_i	Schnittpunkt Strahl $\vec{i}_{(i-1)}$ und Ebene der Nummer i.
L	Scanlinse

Abbildung 3.12: Abbildung der vereinfachten Spiegelgeometrie mit Richtungsvektoren der einfallenden und reflektierten Lichtstrahlen sowie der Spiegelnormalenvektoren. A und B zeigen jeweils zwei Ansichten der Spiegelgeometrie. Die Abstände sind auf 1 normiert und die Mittelpunktskoordinaten der Spiegeloberflächen und der Linse sind in Klammern angegeben.

Tabelle 3.3: Die in diesem Abschnitt verwendete Nomenklatur. Die Drehwinkel parametrisieren die rechtshändige Drehung der Spiegel um die jeweiligen Drehachsen sind der Übersicht halber in der linken Abbildung nicht eingezeichnet.

der Schnittpunkt \vec{P} mit einer Geraden $\vec{x}_G = \vec{v} + t\vec{w}$ gegeben durch

$$t = -\frac{\langle (\vec{v} + r\vec{r}_0, \vec{n}) \rangle}{\langle \vec{w}, \vec{n} \rangle}. \quad (3.14)$$

$$\Rightarrow \vec{P} = \vec{v} - \frac{\langle (\vec{v} - r\vec{r}_0, \vec{n}) \rangle}{\langle \vec{w}, \vec{n} \rangle} \vec{w}. \quad (3.15)$$

Dies erhält man durch Einsetzen von \vec{x}_G in \vec{x}_E .

Der Kalibrationsspiegel S1 befindet sich im Ursprung des hier verwendeten Koordinaten-

systems. Der einfallende Lichtstrahl wird beschrieben durch $\vec{i}_0 = \begin{pmatrix} 0 \\ -1 \\ 0 \end{pmatrix}$. Dieser trifft

nun auf den Normalvektor des Spiegels S1, der um die Winkel ι um die Achse $\vec{A}1$ und κ um die Achse $\vec{A}2$ gedreht werden kann. Die Achse $\vec{A}1$ ändert ihre räumliche Orientierung dabei nicht. Um den Vektor des reflektierten Strahls zu berechnen, wird S1 zunächst um ι gekippt:

$$n_{1a} = O(z, \iota) \cdot \vec{n}_1, \quad O(z, \iota) = \begin{pmatrix} \cos \iota & -\sin \iota & 0 \\ \sin \iota & \cos \iota & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}. \quad (3.16)$$

Analog wird auch die neue Orientierung der Achse $\vec{A}2$ berechnet:

$$\vec{A}_{1a} = O(z, \iota) \cdot \vec{A}_1. \quad (3.17)$$

Nun folgt die Drehung von n_{1a} um die neue Achse \vec{A}_{2a} um den Winkel κ

$$n_{1b} = \vec{A}_{1a} \langle \vec{A}_{1a}, n_{1b} \rangle + \cos \kappa \left(\vec{A}_{1a} \times n_{1a} \right) \times \vec{A}_{1a} + \sin \kappa \left(\vec{A}_{1a} \times n_{1a} \right). \quad (3.18)$$

Die Richtung des reflektierten Strahls \vec{i}_1 kann nun mit Glg. (3.13) ermittelt werden. Mit Hilfe von Glg. (3.15) wird dann der Schnittpunkt \vec{P}_2 zwischen \vec{i}_1 und der Ebene des Spiegels S2 berechnet. Analog verfährt man dann mit der Reflexion am Justagespiegel S2 und den beiden Scanspiegeln g_x und g_y . Das oben beschriebene Verfahren lässt sich leicht numerisch implementieren und erspart die komplizierte analytische Berechnung der Ausdrücke. Zuletzt wird eine paraxiale Linse bei der Position $x = 1, y = -1, z = 1$ mit der Brennweite $f=2$ platziert, sodass der Scanspiegel g_x in deren Fokus steht und eine telezentrische Konfiguration simuliert werden kann.

3.8.1 Berechnung der beleuchteten Scanebene

\vec{i}_4 sei der Richtungsvektor des vom Spiegel g_y reflektierten Strahls und \vec{P}_4 der Schnittpunkt von \vec{i}_4 und g_y . Um den Einfluss einer paraxialen Linse auf \vec{i}_4 zu berechnen, können paraxiale Strahl-Transfer Matrizen verwendet werden ([Mes08]). Hierbei wird der einlaufende Lichtstrahl durch einen Vektor $\vec{r} = \begin{pmatrix} r \\ \alpha \end{pmatrix}$ repräsentiert. r ist der Abstand des Punktes zur optischen Achse bei dem der Strahl die Linse passiert und α der Winkel zwischen Strahl und optischer Achse. Eine dünne Linse mit Brennweite f wird dann durch die Transformationsmatrix $L = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ -\frac{1}{f} & 1 \end{pmatrix}$ beschrieben. Für die numerische Implementierung wird zunächst der Schnittpunkt \vec{P}_5 zwischen Linsenebene und Strahl \vec{i}_4 berechnet und beide in

die x-y- und y-z-Ebene projiziert. Die projizierten Vektorkomponenten lauten dann in dieser Schreibweise:

$$\vec{i}_{4,xy} = \begin{pmatrix} P_{4,y} \\ \arctan \frac{i_{4,y}}{i_{4,x}} \end{pmatrix}, \quad (3.19)$$

$$\vec{i}_{4,xz} = \begin{pmatrix} P_{4,z} \\ \arctan \frac{i_{4,z}}{i_{4,x}} \end{pmatrix}, \quad (3.20)$$

die transformierten Strahlen hinter der Linse:

$$\vec{i}_{5,xy} = \begin{pmatrix} P_{4,y} \\ -P_{4,y}/2 + \arctan \frac{i_{4,y}}{i_{4,x}} \end{pmatrix}, \quad (3.21)$$

$$\vec{i}_{5,xz} = \begin{pmatrix} P_{4,z} \\ -P_{4,z}/2 + \arctan \frac{i_{4,z}}{i_{4,x}} \end{pmatrix}. \quad (3.22)$$

Im Koordinatensystem der Linse sind die Komponenten:

$$\vec{i}_5 = \begin{pmatrix} \cos \left(-(P_{5,z} - 1)/2 + \arctan \frac{i_{5,z}}{i_{5,x}} \right) \\ \sin \left(-(P_{5,y} + 1)/2 + \arctan \frac{i_{5,y}}{i_{5,x}} \right) \\ \cos \left(-(P_{5,z} - 1)/2 + \arctan \frac{i_{5,z}}{i_{5,x}} \right) \end{pmatrix}. \quad (3.23)$$

Abb. 3.13 zeigt die Auswirkung des Kippens der Justagespiegel auf die Lage des Beleuchtungsstrahls für das oben beschriebene Modellsystem. Der Ursprung des abgebildeten Koordinatensystems ist gleich der Fokusposition bei einem ideal positionierten Beleuchtungsstrahl. Die beiden oberen Abbildungen zeigen, dass ein Kippen um die Achsen A1 oder A3 eine Translation des Strahls senkrecht zur Detektionsebene bewirkt. Zudem kippt der Strahl auch leicht, da keiner der Justagespiegel konjugiert zur HFE der Beleuchtungslinse steht. Gleiches geschieht in der Detektionsebene bei kippen um die Achsen A2 und A3, mittlere Zeile. Die beiden unteren Abbildungen zeigen, dass durch synchrones Drehen um die Achsen A1 und A3 bzw. A2 und A4 der Strahl um den Fokuspunkt gedreht werden kann. Zwar unterscheiden sich die Abstände im realen Aufbau vom oben beschriebenen Fall, was zu anderen Amplituden bei Drehen und Verschieben des Strahls führt, jedoch können die qualitativen Resultate zur Alignierung des Beleuchtungsstrahls verwendet werden.

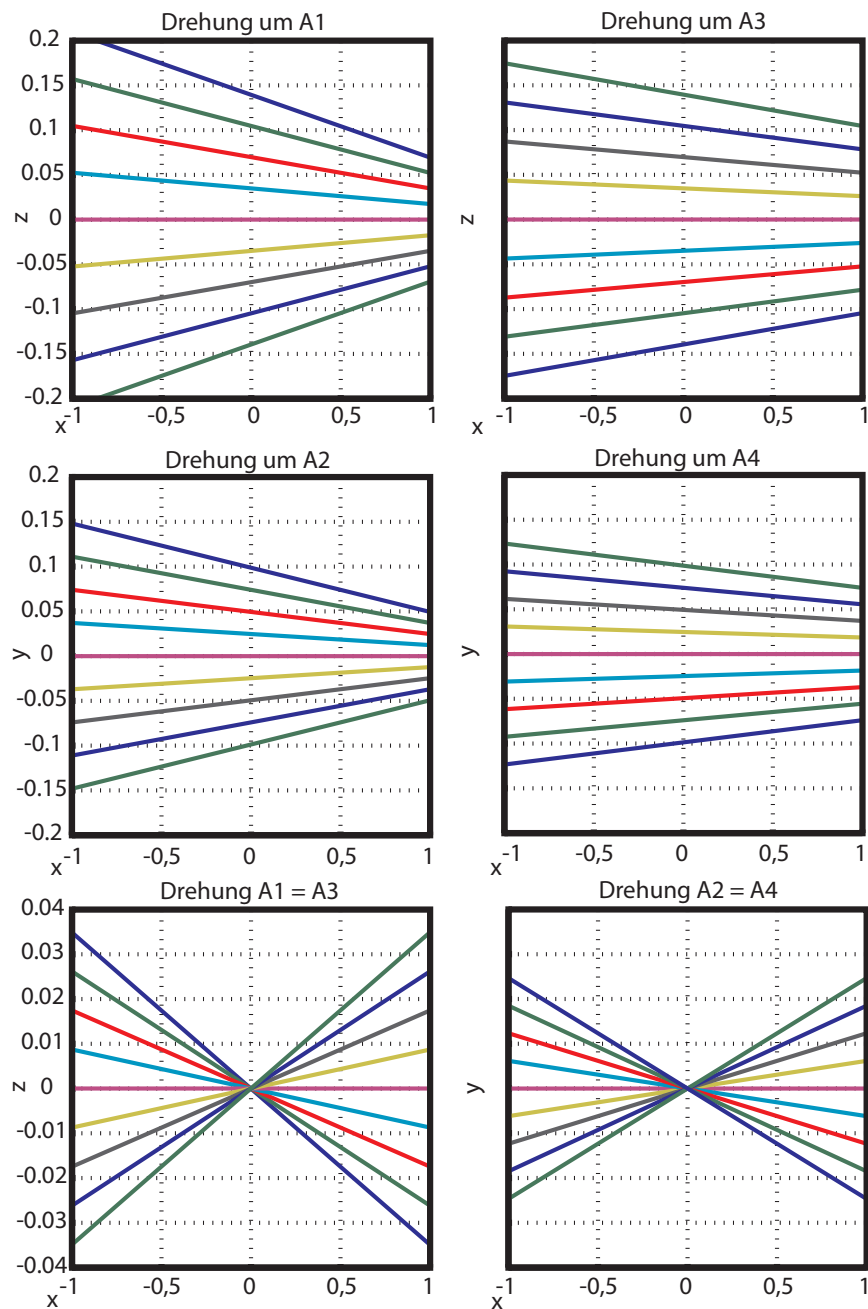


Abbildung 3.13: Auswirkung auf die Lage des Strahls bei Auslenkung der Justagespiegel um unterschiedliche Achsen. Der Ursprung des Koordinatensystems liegt im Fokus des Beleuchtungsstrahls. Oben: Drehen um die Achsen A1 und A3 führt zu Kippen und Translation des Strahls in der x - z -Ebene. Mitte: Drehen um die Achsen A2 und A4 führt zu Kippen und Translation des Strahls in der x - y -Ebene. Unten: Werden A1 und A3 bzw. A2 und A4 synchron um den gleichen Winkel gedreht, führt dies zu einer Rotation des Strahls in der entsprechenden Ebene um den Fokus. Die Spiegel wurden von $-\pi/90$ bis $\pi/90$ in Schritten von $\pi/360$ gedreht. Strahlen verlaufen von links nach rechts.

Kapitel 4

Numerische Optimierung und Analyse der Abbildungsleistung

Mit Hilfe des Modells der paraxialen Linsen konnten die Brennweiten und Abstände der benötigten Linsen auf einfache Weise abgeschätzt werden. Reale Linsen beeinflussen aber die Propagation des Lichts auf eine komplexe Weise. Die Krümmung der Linsenoberflächen ändern den Winkel mit dem Strahlen gebrochen werden. Die Dicke und unterschiedliche optische Eigenschaften der Gläser verändern die Fokusposition und machen die Brechkraft von der Wellenlänge abhängig. Bereits bei wenigen Linsen ist die Anzahl der Freiheitsgrade bereits so hoch, dass eine quantitative Analyse oder Optimierung auf numerische Methoden wie *Raytracing* (dt.: Strahlverfolgung) angewiesen ist.

In diesem Kapitel wird eine detaillierte Analyse der optischen Leistung des Beleuchtungsstrahlengangs präsentiert. Diese wurde mit Hilfe des Programms *Zemax* (Zemax, LLC, Redmond, WA, USA) erstellt. Für die Optimierung sollte das System möglichst kompakt gehalten werden. Dabei wurden achromatische Linsen in unterschiedlicher Weise kombiniert um Aberrationen zu minimieren. Im zweiten Teil wurde eine verfeinerte Analyse des Beleuchtungsfokus und der Punktabbildungsfunktion von LSFM mit konfokaler Zeilendetektion mittels numerischer Wellenpropagation durchgeführt.

4.1 Konzeption der Beleuchtung

Zur Beleuchtung sollte ein 10x–Luftobjektiv mit einem Arbeitsabstand von 33,5 mm und einer numerischen Apertur von 0,28 (Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japan) verwendet werden. Dieses wurde auch in [RVV⁺10] zum Generieren eines dünnen Lichtblatts benutzt. Es hat eine Brennweite von 20 mm und einen Aperturdurchmesser von 11,67 mm. Der Strahl besaß aus der Faser kommend einen $1/e^2$ –Durchmesser von 1,2 mm. Der maximale Strahldurch-

messer, für den die Scanspiegel spezifiziert sind, ist 5 mm. Um eine möglichst große numerische Apertur zu erreichen, konnte der Strahl durch ein Teleskop mit einer Vergrößerung von 4,2 aufgeweitet werden. Das Relaissystem besaß wiederum eine Vergrößerung von 1,8, um einen möglichst großen Teil der Objektivapertur zu nutzen.

4.2 Raytracing

4.2.1 Optimieren der Strahlaufweitung

Aufgrund des für den Aufbau zur Verfügung stehenden Platzes sollte die maximale Länge für die Strahlaufweitung 200 mm nicht überschreiten. Die erste Linse auf die der einlaufende Strahl traf, war ein Dublett mit einer Brennweite von -75 mm. Ein zweites Linsensystem kollimierte den Strahl mit vergrößertem Durchmesser. Es bestand aus einem negativen und einem positiven Linsendublett mit einer effektiven fokalen Länge von insgesamt 316 mm. Somit hatte das Teleskop eine Vergrößerung von 4,2. Die Verwendung von zwei Linsen zum Kollimieren ermöglichte die individuelle Einstellung der Brennweite und des Vergrößerungsfaktors. Zemax wurde verwendet um den optimalen Abstand zwischen den einzelnen Linsen zu bestimmen, damit der vergrößerte Strahl parallel war. Die Abstände zwischen den Linsen können Tab. 4.1 entnommen werden. Die Berechnungen mit Zemax ergaben, dass der Strahlradius von 0,6 mm auf 2,52 mm vergrößert wurde.

Hersteller	Bezeichnung	Effl.	Typ	Abstand [mm]
Edmund Optics	45422	-75 mm	Dublett	160,139
Edmund Optics	45422	-75 mm	Dublett	13,552
Edmund Optics	32325	$+75$ mm	Dublett	–

Tabelle 4.1: Für die Strahlaufweitung verwendete Linsen. Effl. ist die effektive Fokallänge. Der Abstand bezieht sich auf die Distanz in Luft zwischen zwei Linsen, auf Höhe der optischen Achse.

4.2.2 Optimieren des optischen Relais

Es wurde ein afokales Relaisobjektiv entworfen. Dieses versetzte den Punkt, um den der Galvospiegel kippt um den Beleuchtungsstrahl zu rastern, in die hintere fokale Ebene des Beleuchtungsobjektivs (Abb. 2.2). Zusätzlich wurde der Strahl aufgeweitet. Achromatische Linsen wurden so kombiniert, dass durch das Relais eingebrachte sphärische Aberration, Koma und Astigmatismus so klein wie möglich gehalten wurden. Diese waren ohne die Verwendung des Teleskops vernachlässigbar. Aus diesem Grund wurde die Optimierung mit Zemax nur für den Fall des aufgeweiteten Strahls durchgeführt. Da für das Beleuchtungsobjektiv keine optischen Daten vorlagen, wurde dieses durch eine paraxiale Linse ersetzt. Des Weiteren sollte die Gesamtlänge des Systems 300 mm nicht überschreiten. Der Abstand

zwischen dem Scanspiegel und der ersten Linse musste bauartbedingt mindestens 26 mm lang sein. Als Ausgangspunkt wurde ein Entwurf mit zwei achromatischen Linsen (#47-636, Effl. 45 mm und #49-769, Effl. 88,9 mm, Edmund Optics) verwendet (Abb. 4.1 **A**). Von diesem ausgehend, wurde die Brechkraft der jeweiligen Linsen auf jeweils zwei Linsen geteilt (Abb. 4.1 **B**). Dies führte zu einer deutlichen Abnahme von sphärischer Aberration, Koma und Astigmatismus und reduzierte deutlich die Größe des Beleuchtungsfokus. Zuletzt wurde die Brennweite und Position des rechten Linsenpaares variiert. Dabei stellte sich heraus, dass, wenn die optische Vergrößerung des Relais kleiner wurde, sich auch der Fokusbereich verkleinerte (Abb. 4.1 **C**). Im Vergleich zum vorigen Entwurf waren dann die Wellenfrontaberrationen kleiner, was zu einer besseren Fokussierung des Lichts führte, obwohl die Beleuchtungsapertur kleiner wurde. Grund sind geringere Aberrationen bei kleineren Strahldurchmessern. Erwähnenswert ist auch der Einfluß der 2 mm dicken Glaswand der Probenkuvette. So erzeugten die Linsen insgesamt einen positiven sphärischen Wellenfrontfehler. Dahingegen war der Strahl in der Probenkuvette fokussiert, was in einem negativen sphärischen Fehler resultierte. Dies konnte ausgenutzt werden um beide Einflüsse auszugleichen und somit eine Verbesserung der Fokussierung zu erreichen.

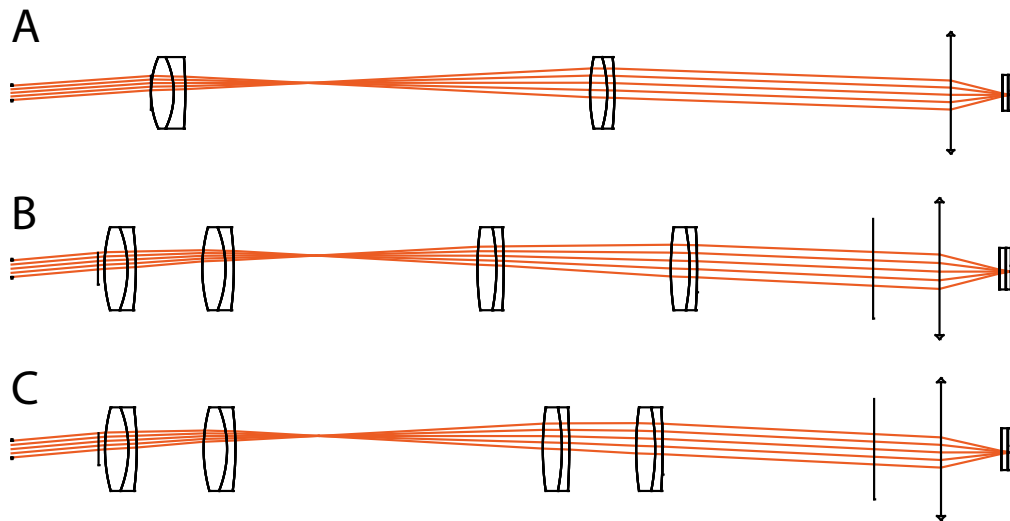


Abbildung 4.1: Skizzen des in Zemax untersuchten Relais-Systems. **A**: Einzelne Achromaten als Relaislinsen. **B**: Die Brechkraft wurde auf jeweils zwei Linsen verteilt, um sphärische Aberrationen, Astigmatismus und Koma zu minimieren. **C**: Anpassen der Brechkraft des zweiten Linsensystems, um die negative sphärische Aberration der Probenkammer auszugleichen. Die Gesamtlänge beträgt hier rund 300 mm. Der gezeigte Scanwinkel beträgt fünf Grad.

Der finale Entwurf bestand aus jeweils zwei Linsengruppen, L1 und L2, mit den jeweiligen Brennweiten von $f_1 = 45.46$ mm und $f_2 = 81.85$ mm bei $\lambda = 588$ nm, woraus sich eine

52 Kapitel 4 - Numerische Optimierung und Analyse der Abbildungsleistung

Vergrößerung von 1,8 ergab. Die genauen Positionen der einzelnen Linsen kann Tabelle 4.2 entnommen werden.

Abbildung 4.2 zeigt Punktdiagramme, die mit *Zemax* für die drei oben beschriebenen Entwürfe erzeugt wurden. Diese stellen die Schnittpunkte eines Strahlenbündels mit der Fokusebene des Beleuchtungsobjektivs dar. Das Strahlenbündel tritt dabei kollimiert von links in das System ein. Die einzelnen Teilstrahlen sind zunächst gleichförmig verteilt und besitzen denselben Abstand untereinander. Wird ein solches Strahlenbündel durch eine ideale Linse fokussiert, schneiden alle Strahlen die Fokusebene im Mittelpunkt. In diesem Falle hätte ein solches Diagramm nur im Zentrum einen Punkt. Bei Aberrationen schneiden die Teilstrahlen die Fokusebene aber an unterschiedlichen Punkten. Die Form der resultierenden Punktwolke gibt Aufschluss über die Fokusgröße und die Art der Aberrationen. Eine detaillierte Beschreibung von Punktdiagrammen und zu weiteren Methoden für den Entwurf optischer Systeme finden sich in [Gea02].

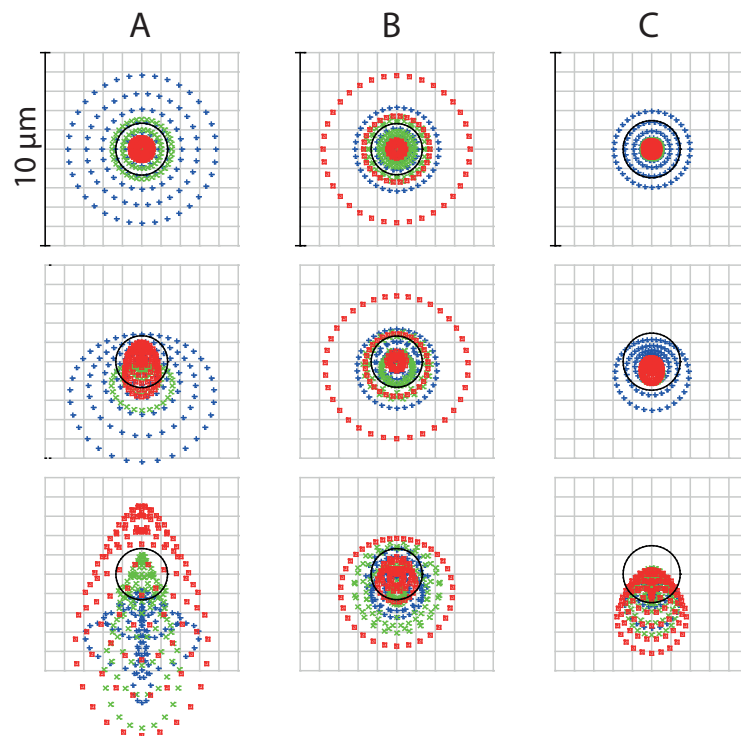


Abbildung 4.2: Punktdiagramme der unterschiedlichen Layouts für die Winkel der Stahlauslenkung von 0, 1 und 3 Grad, jeweils von oben nach unten. **A:** Einzelne Achromaten, **B:** Linsenpaare mit einer Gesamtvergrößerung von 2, **C:** Nach Reduktion der sphärischen Aberrationen. Skala rechts 10 µm, Kästchengröße 1 µm. Der durchgezogene Kreis stellt den Rayleighradius ohne Aberrationen dar. Die Wellenlängen entsprechen den jeweiligen Farben: Blau 488 nm, Grün 532 nm, Rot 640 nm. Die Fokusebene des Systems wurde so platziert, dass die Ausdehnung des Punktdiagramms für alle drei Wellenlängen minimal ist.

Die Farben rot, grün und blau im Diagramm stehen jeweils für die Wellenlängen 640 nm,

Element	Abstand	Beschreibung
Apertur Stop	27,93 mm	Ersetzt Scanspiegel
Edmund 32-325	20 mm	Achromat
Edmund 32-325	95,39 mm	Achromat
Edmund 32-494	20 mm	Achromat
Edmund 32-494	63,15 mm	Achromat
HFE	20 mm	Fokale Ebene Objektiv
Objektiv	18 mm	Paraxiale Linse
Glas N-BK7	2 mm	Probenküvette
Wasser	0,8 mm	Proben Medium

Tabelle 4.2: Abstände der optischen Elemente nach Optimierung in Zemax. Abstand bezieht sich hierbei auf die Entfernung zwischen der letzten Oberfläche des Elements auf der optischen Achse zum nächsten Element.

532 nm und 488 nm. Die Scanwinkel sind von oben nach unten 0° , 1° und 3° . Der schwarze, durchgezogene Kreis hat den Radius der Airyscheibe für den Fall, dass das System aberrationsfrei wäre. Durch sphärische Aberration war der tatsächliche Fokus, beim System mit einzelnen Linsen, allerdings deutlich verbreitert (Abb.4.2 **A**). Bei größerer Auslenkung des Scanspiegels wurde der Fokus zudem in Scanrichtung verzerrt, ein deutliches Zeichen für Koma und Astigmatismus. Die Bildfehler konnten durch Aufteilen der Brechkraft von jeweils einer Linse auf mehrere mit größerer Brennweite minimiert werden (Abb. 4.2 **B**). Weiteres Optimieren des optischen Systems verkleinerte den Fokus noch weiter (Abb. 4.2 **C**). Die Skala in den Diagrammen beträgt $10\ \mu\text{m}$ und ein Kästchen hat die Größe von $1\ \mu\text{m}$.

4.2.3 Axialer chromatischer Fehler

Das Diagramm in Abbildung 4.3 stellt die relative Position des Beleuchtungsfokus in Abhängigkeit der Wellenlänge dar. Die theoretische chromatische Aberration, die durch die Linsen des Relaisystems erzeugt wurde, war zwischen den Wellenlängen 640 nm und 488 nm am größten. Der Fokus zwischen diesen Wellenlängen war um etwa $12\ \mu\text{m}$ verschoben. Zwischen den Anregungswellenlängen 532 nm und 640 nm betrug die chromatische Fokusverschiebung etwa $3\ \mu\text{m}$. Die kleinste Rayleighlänge, die unter Verwendung der Strahlaufweitung gemessen wurde, betrug $14 \pm 3\ \mu\text{m}$ (Abschn. 5.2.2). Der konfokale Parameter, also das Zweifache der Rayleighlänge, der als Maß für die Breite des ausgeleuchteten Bildfeldes dient, liegt somit deutlich oberhalb der maximalen chromatischen Verschiebung.

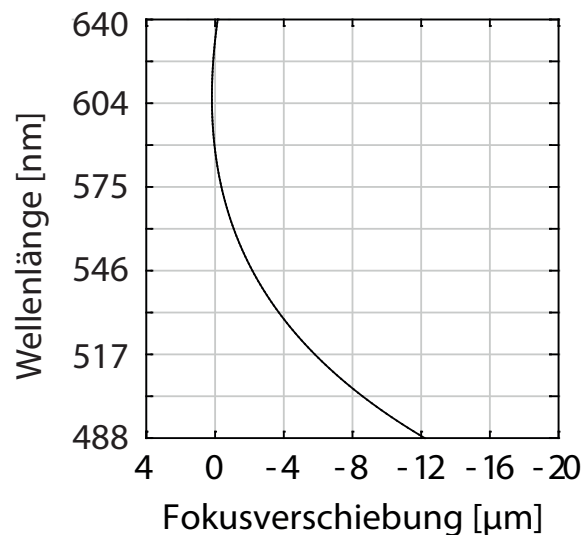


Abbildung 4.3: Axiale chromatische Verschiebung, die durch die Linsen des Relaisystems erzeugt wurde, für den Wellenlängenbereich von 488 nm bis 640 nm. Der chromatische Fehler bei Anregung mit 532 nm und 640 nm betrug etwa $3\ \mu\text{m}$. Allerdings betrug die Farbverschiebung zwischen 488 nm und 633 nm Anregungswellenlänge $12\ \mu\text{m}$.

4.3 Die Punktabbildungsfunktion des konfokalen LSMF

4.3.1 Ausdehnung des Beleuchtungsfokus und der Abbildungs-PSF

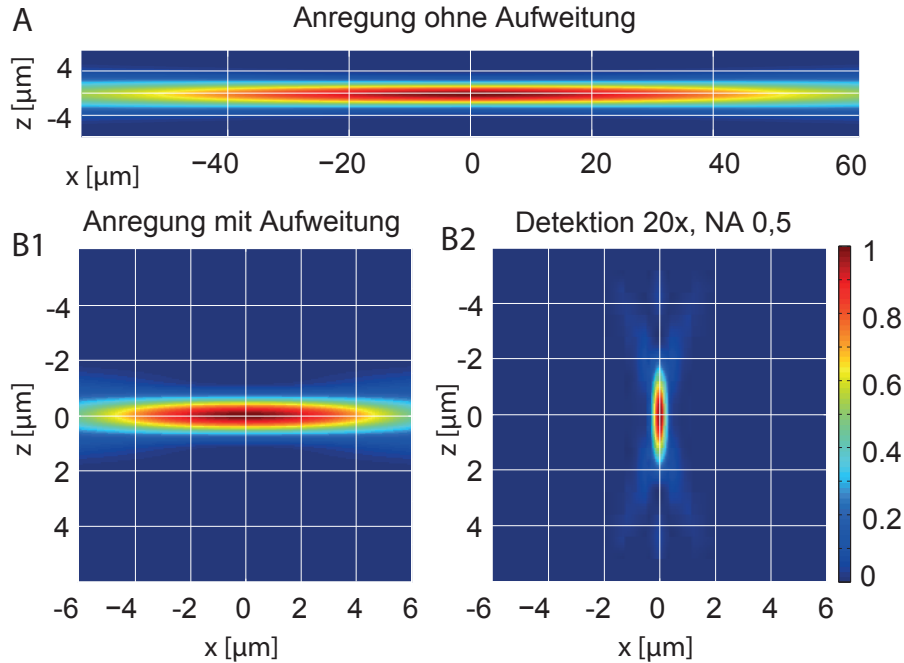


Abbildung 4.4: **A** Normierte Intensitätsverteilung des Anregungsstrahls ohne Strahlaufweitung in der x - z -Ebene. **B1** Normierte Intensitätsverteilung des Anregungsstrahls mit Strahlaufweitung. **B2** Vergleich mit der Punktabbildungsfunktion des 20x-Detektionsobjektivs mit NA 0,5. Die z -Ausdehnung der Anregung in **B1** ist kleiner als die z -Ausdehnung der PSF in **B2**. Dies führt zu einer effektiven Verkleinerung der PSF entlang dieser Achse.

Bei LSMF wird für Fluoreszenzanregung und Detektion jeweils ein Objektiv verwendet. Für jedes dieser Objektive kann eine PSF berechnet werden, PSF_B für das Anregungsobjektiv und PSF_D für das Detektionsobjektiv. PSF_B ist auch gleich der räumlichen Verteilung der Anregungsintensität. Die System-PSF (PSF_{sys}) beschreibt dann die aus PSF_B und PSF_D resultierende Abbildungsfunktion für das gesamte Mikroskop (Abschn.2.6).

Um der Frage nachzugehen, wie sich der konfokale Zeilendetektor auf die PSF_{sys} des LSMF auswirkt, wurde die Punktabbildungsfunktion numerisch berechnet. Hierzu wurden Bilder eines Punktobjekts simuliert, das schrittweise in z -Richtung durch den Fokus bewegt wurde. Die verwendeten Algorithmen zur numerischen Wellenpropagation stammen aus [Sch10]. Diese basierten auf der Fouriertransformation der Feldverteilung in der hinteren Fokalebene einer Linse (Abschn. 2.4). Die Funktionen zur Berechnung und Analyse der Punktabbildungsfunktion wurden in MATLAB programmiert.

Der erste Rechenschritt bestand darin die Intensitätsverteilung des Beleuchtungsstrahls zu berechnen. Hierzu wurde eine zweidimensionale Matrix generiert, mit einer 1 in einer

Region, die der Apertur der HFE entspricht und ansonsten Nullen. Diese wurde mit einer zweidimensionalen Gaußfunktion multipliziert. Deren $1/e^2$ -Radius entsprach der Strahlteile der elektrischen Feldverteilung des Anregungsstrahls in der hinteren fokalen Ebene des Beleuchtungsobjektivs. Durch eine zweidimensionale Fouriertransformation dieser Matrix konnte die Feldverteilung und daraus die Intensitätsverteilung im Anregungsfokus berechnet werden. Analog wurde die PSF des Detektionsobjektivs bestimmt. Hierbei wurde von einer konstanten Feldverteilung in der hinteren fokalen Ebene ausgegangen.

Die so berechneten Intensitätsverteilungen im Anregungsfokus sind in Abb. 4.4 **A** ohne und **B1** mit Strahlaufweitung in der x - z -Ebene dargestellt. Abb. 4.4 **B2** zeigt zum Vergleich die berechnete PSF eines Detektionsobjektivs mit 20-facher Vergrößerung, einer Brennweite von 20 mm und einer numerischen Apertur von 0,5. Dies entspricht dem Objektiv das für die Daten in Abschn. 6.3 verwendet wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit ist die Skala in den Unterabbildungen **B1** und **B2** gleich. In diesem Fall ist die z -Ausdehnung des Anregungsfokus kleiner als die z -Ausdehnung der Detektions-PSF, was zu einer Verbesserung der axialen Auflösung führt (Abschn. 2.6).

$w_{0,HFE}$	w_0	z_r
1.08 mm	2,95 μm	54,5 μm
4.45 mm	0,8 μm	4,8 μm

(a)

Objektiv	w_0	z_r
10x, NA 0.3	0,67 μm	7,3 μm
20x, NA 0.5	0,36 μm	2,16 μm
40x, NA 0.8	0,28 μm	1,27 μm
40x, NA 1.15	0,14 μm	0,33 μm

(b)

Tabelle 4.1: (a) Ausdehnung der Beleuchtungs-Intensitätsverteilung, gemessen durch nichtlineare Anpassung der Intensitätskurven für Gauß-Strahlen und die simulierten Daten. $w_{0,HFE}$ ist der $1/e^2$ -Radius der Beleuchtung, w_0 der laterale Radius im Fokus der Beleuchtung und z_r die Rayleighlänge des Beleuchtungsstrahls. (b) Ausdehnung der Detektions-Punktabbildungsfunktion. Die Kurvenanpassung erfolgte entlang der optischen Achse und entlang der Hauptachsen in der jeweiligen Fokusebene.

Eine Liste der simulierten Beleuchtungsaperturen und Detektionsobjektive findet sich in den Tabelle 4.2a und 4.2b. Tabelle 4.2a fasst die axialen und lateralen $1/e^2$ - Breiten für den Beleuchtungsstrahl zusammen. $w_{0,HFE}$ ist der $1/e^2$ -Radius der Intensitätsverteilung in der HFE des Beleuchtungsobjektivs, jeweils ohne und mit Strahlaufweitung (Abschn. 4.1). 4.2b listet die berechneten axialen und lateralen $1/e^2$ -Radien für die vier Detektionsobjektive auf, die im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurden. Die Halbwertsbreiten wurden durch nichtlineare Anpassung von Gaußfunktionen an die entsprechenden Intensitätskurven entlang der Hauptachsen ermittelt. Es wurden Gaußfunktionen für Anregung als auch Detektion angepasst, um diese besser miteinander vergleichen zu können. Um den Einfluß der Nebenmaxima der Airy-Scheibe der Detektions-PSFs zu minimieren, wurde die Gaußfunktion nur an das Hauptmaximum zwischen den ersten Minima angepasst.

4.3.2 Auswirkung des Schlitzdetektors auf die Punktabbildungsfunktion

Objektiv	$w_{0,HFE}$	w_0	w_z
10x, NA 0,3	1.08 mm	0,68 μm	2,53 μm
10x, NA 0,3	4.45 mm	0,66 μm	0,84 μm
20x, NA 0,5	1.08 mm	0,36 μm	1,80 μm
20x, NA 0,5	4.45 mm	0,36 μm	0,86 μm
40x, NA 0,8	4.45 mm	0,28 μm	0,72 μm
40x, NA 1,15	4.45 mm	0,14 μm	0,34 μm

Tabelle 4.2: Ausdehnung der Gesamt-Punktabbildungsfunktion für unterschiedliche Beleuchtungsaperturen und Detektionsobjektive mit konventioneller Detektion.

Die Auswirkung des Schlitzdetektors auf die Punktabbildungsfunktion wurde simuliert, indem ein virtuelles Teilchen in z -Richtung durch den Fokus bewegt und dabei abgebildet wurde. Die theoretischen Grundlagen zur Berechnung eines Bildes sind in Abschnitt 2.6 beschrieben.

Das Probenvolumen wurde dabei durch eine dreidimensionale Matrix $P(i,j,k)$ simuliert. Die Matrix-Indizes $i,j,k = 1 \dots N$ entsprachen den Gitterpunkten auf denen sich das Teilchen befinden konnte, wobei N die Zeilenzahl des simulierten Bildes war und i,j,k den in dieser Arbeit verwendeten Koordinaten x,y und z entsprachen. Der Abstand der Gitterpunkte entsprach der Pixelgröße des simulierten Bildes. Diese Matrix war überall Null und nur an der Position des Teilchens gleich Eins. In der Regel wurden Volumina simuliert mit $N = 128$ oder $N = 256$. $i = j = k = N/2 + 1$ ist die Position, bei der sich das Teilchen bei $x = y = z = 0$ befinden würde, also in der Mitte des Bildes und im Fokus.

Bei einem realen LSMF entsteht das Bild eines Fluorophors, indem dieses durch den gerasterten Beleuchtungsstrahl angeregt wird. Das Detektionsobjektiv bildet dann diesen fluoreszierenden Punkt auf den Detektor ab. Während des Rastervorgangs ist der Kamerachip aktiv und integriert das auftreffende Fluoreszenzlicht zu einem Bild.

Um das Bild des Teilchens zu simulieren, wurde der Raster- und Integrationsvorgang in einzelne Schritte aufgeteilt, zwischen denen sich der Beleuchtungsstrahl zeilenweise in dem simulierten Volumen in y -Richtung bewegt. $I_B(i,j,k)_l$ wäre die Beleuchtungsmatrix, bei der sich die optische Achse des Anregungsstrahls über der Detektorzeile mit dem Index l befindet. Für jede dieser Strahlpositionen $l = 1 \dots N$ wurde die oben beschriebene Matrix $P(i,j,k)$ mit der entsprechend dreidimensionalen Intensitätsverteilung $I_B(i,j,k)_l$ der Beleuchtung multipliziert. Die resultierende Matrix wurde daraufhin mit der dreidimensionalen Detektions-PSF $I_D(i,j,k)$ gefaltet und so die Bildmatrix $B(i,j,k)_l$ berechnet. Die Untermatrix $B(i,j,N/2 + 1)_l$ entsprach dem von der Kamera detektierten Bild, bei Fokussierung des Detektionsobjektiv auf die Beleuchtungsebene. Die Summe dieser für alle Strahlpositionen einzeln berechneten Bilder ergab dann das Bild des Teilchens bei konventioneller *Epi*-Detektion. Der Summe der einzelnen Bilder $\sum_{l=1}^N B(i,j,N/2 + 1)_l$ entspricht

der Integration des detektierten Signals während des Rastervorgangs.

Um konfokale Bilder mit einem Detektorschlitze der Breite $2d + 1$ ($d = 0 \dots N/2 - 1$) Pixel zu simulieren, wurden auf die einzelnen Untermatrizen $B(i, j, N/2 + 1)_l$ eine Schlitzmaske der Breite $2d + 1$ entlang der Zeile l angewendet. Diese wird repräsentiert durch eine Matrix $M(i, j)_l = 1$ für $j = l - d$ bis $j = l + d$ und ansonsten gleich Null. Dies setzt alle Einträge der Untermatrix $B(i, j, N/2 + 1)_l$ außerhalb der Schlitzmaske gleich Null und lässt die Werte innerhalb unverändert. Dies entspricht dem Fall, dass der aktive Bereich der Kamera auf $2d + 1$ Zeilen beschränkt ist. Die Summe der so modifizierten Matrizen $\sum_{l=1}^N B(i, j, N/2 + 1)_l \cdot M(i, j)_l$ entspricht dem integrierten, konfokalen Bild. Man beachte, dass die beiden Matrizen B und M in der Summe elementweise multipliziert werden.

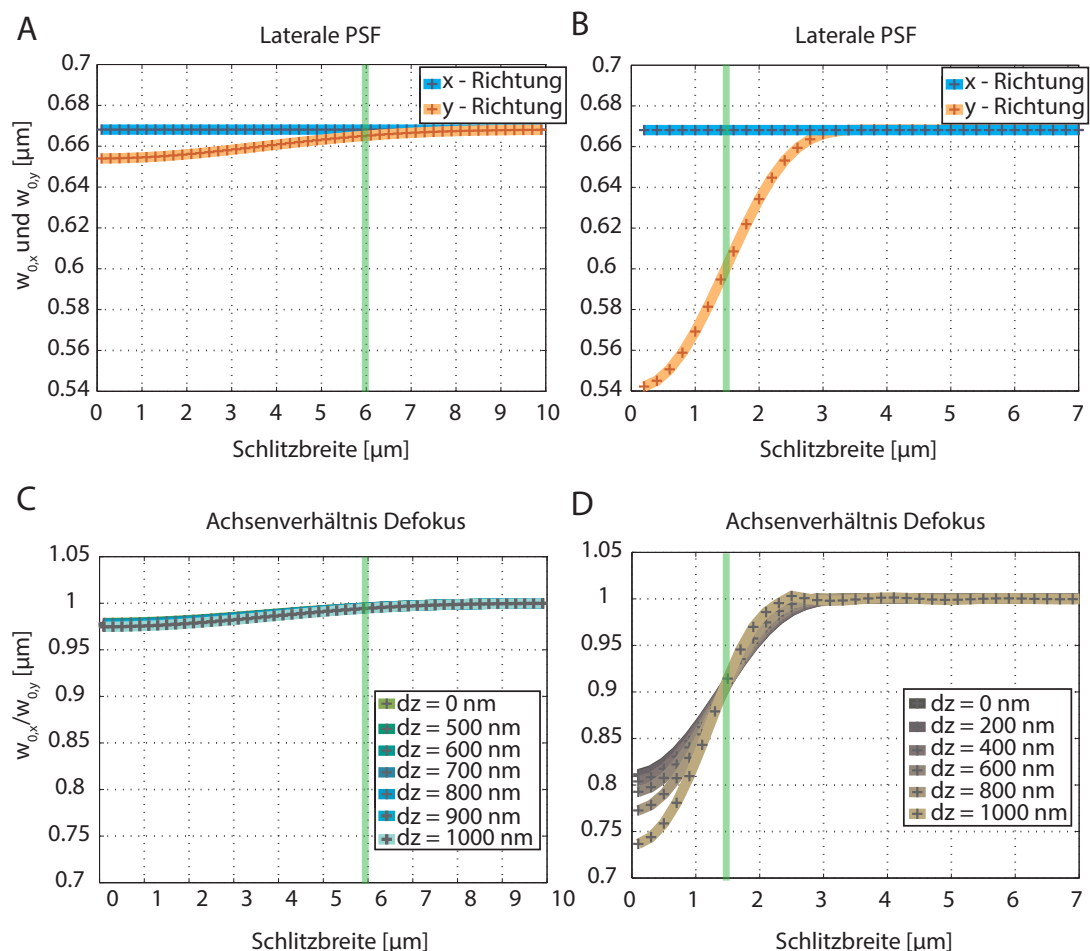


Abbildung 4.5: Auswirkung des Schlitzdetektors auf die Radien der Punktabbildungsfunktion $w_{0,x}$ und $w_{0,y}$ in x- und y-Richtung. Simuliertes Objektiv: $10\times$, $NA\ 0,3$. **A** Beleuchtung ohne Strahlauflösung, **B** mit Strahlauflösung. Darunter ist das Verhältnis von $w_{0,x}$ und $w_{0,y}$ aufgetragen, für den Fall, dass sich das abgebildete Teilchen in einem Abstand dz von der Detektions-Fokusebene befindet. In **C** ohne Strahlauflösung und **D** mit. Die senkrechte, grüne Linie markiert den $1/e^2$ -Durchmesser des Beleuchtungsstrahls.

Abbildung 4.5 zeigt die Ausdehnung der resultierenden PSF in der x - y -Ebene in Abhängigkeit der der Breite des Detektorschlitzes, wenn sich das Teilchen im Fokus befindet (**A** und **B**) und wenn sich das Teilchen in einer Entfernung dz von der fokalen Ebene des Detektionsobjektivs befindet (**C** und **D**). In **A** und **C** wird die Beleuchtung ohne Strahlaufweitung simuliert, in **B** und **D** mit Strahlaufweitung. Für die Detektion wurde ein Objektiv mit zehnfacher Vergrößerung und einer NA von 0,3 simuliert. Berechnet wurde zunächst die ge-

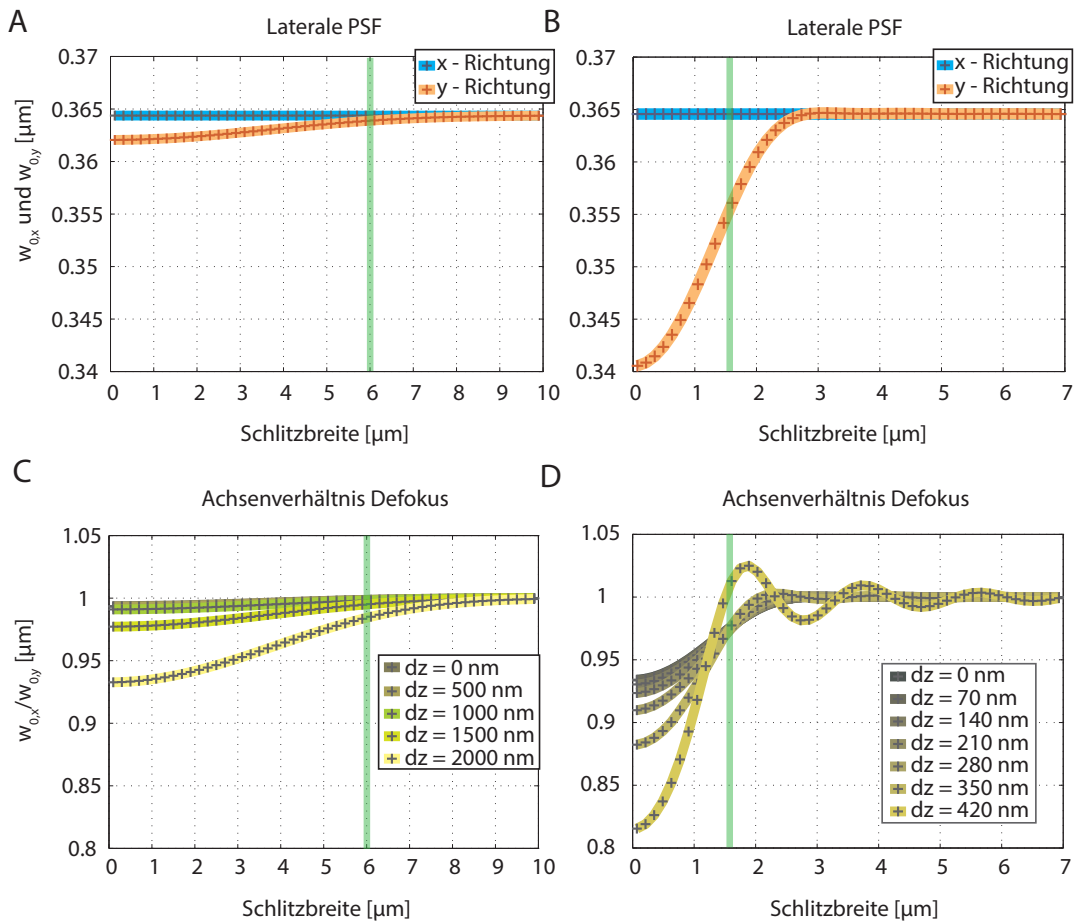


Abbildung 4.6: Auswirkung des Schlitzdetektors auf die Radien der Punktabbildungsfunktion $w_{0,x}$ und $w_{0,y}$ in x - und y -Richtung. Simuliertes Objektiv: $20\times$, NA 0,5. **A** Beleuchtung ohne Strahlaufweitung, **B** mit Strahlaufweitung. Darunter ist das Verhältnis von $w_{0,x}$ und $w_{0,y}$ aufgetragen, für den Fall, dass sich das abgebildete Teilchen in einem Abstand dz von der Detektions-Fokusebene befindet. In **C** ohne Strahlaufweitung und **D** mit. Die senkrechte, grüne Linie markiert den $1/e^2$ -Durchmesser des Beleuchtungsstrahls.

samte Punktabbildungsfunktion. Dann wurden die $1/e^2$ -Radien $w_{0,x}$ und $w_{0,y}$ entlang der Kardinalachsen gemessen. Auf der Abszisse sind die Breiten des Schlitzdetektors aufgetragen. In x -Richtung, also parallel zum Detektionsschlitz, blieb die Punktabbildungsfunktion unverändert. Orthogonal hierzu nahm sie jedoch mit kleiner werdendem Detektorschlitz ab. Es kam somit zu einer Asymmetrie der PSF in der Detektionsebene. Für den Fall in Abb. 4.5

A ohne Strahlaufweitung war diese Asymmetrie mit etwa zwei Prozent vernachlässigbar. Im Fall der Abb. 4.5 **B** der vergrößerten Beleuchtungsapertur trat diese mit $w_{0,x} = 0,66 \mu\text{m}$ und $w_{0,y} = 0,54 \mu\text{m}$ für eine gegen Null laufende Breite des Detektors jedoch deutlicher hervor. Die Abbildungseigenschaft in x gleicht somit der eines *Epi*-Mikroskops und in y ähnelt sie der eines konfokalen Mikroskops. Mit steigendem Abstand dz des Teilchens von der Fokusebene des Detektionsobjektivs (Abb. 4.5 **C**) stieg auch die Asymmetrie in x- und y-Richtung, gemessen durch das Verhältnis $w_{0,x}/w_{0,y}$. Dieser Effekt war auch im Falle der aufgeweiteten Beleuchtung (Abb. 4.5 **D**) deutlicher. Die Ausdehnung in y betrug bei $dz = 400 \text{ nm}$ nur etwa 80 % der Ausdehnung in x. In jedem Fall konvergierte $w_{0,y}$ mit größer werdendem Detektionsschlitz gegen $w_{0,x}$. Die Form der System-PSF konvergierte mit größer werdendem Schlitz zur System-PSF des konventionellen LSFM.

Ähnlich ist das Ergebnis bei der Simulation mit einem 20x-Detektionsobjektiv, das eine numerische Apertur von 0,5 besaß, Abb. 4.6 **A–D**. Der Effekt war hier bei minimaler Schlitzbreite etwas geringer als bei dem 10x-Detektionsobjektiv aus Abb. 4.5. So betrug hier $w_{0,x} = 0,365 \mu\text{m}$ und $w_{0,y} = 0,34 \mu\text{m}$. Die Asymmetrie stieg hier auch mit steigender Entfernung dz des Teilchens. Hier stieg die Asymmetrie $w_{0,x}/w_{0,y}$ bei Verwendung der größeren Beleuchtungsapertur **D** ähnlich wie in **C** und betrug bei $dz = 420 \mu\text{m}$ ebenfalls etwa 0.8.

Zu einem ähnlichen Ergebnis bezüglich der Konfokalität orthogonal zum Detektionsschlitz und der steigenden Asymmetrie mit zunehmendem Defokus gelangt man auch bei der Untersuchung der System-PSF eines konfokalen Zeilenscanning Mikroskops, wie es z.B. in [WKZ06] beschrieben wird.

4.4 Tiefendiskriminierung

Wie im vorigen Abschnitt wurde die Abbildung einer Ebene von Fluorophoren simuliert. Die Fluorophore wurden schrittweise aus dem Fokus bewegt und dabei abgebildet. Aus der mittleren Intensität des Bildes bei jedem Schritt konnte auf die Tiefendiskriminierung geschlossen werden. Die mittlere Intensität für jedes Bild wurde auf die mittlere Intensität des Bildes normiert, bei dem sich die Teilchenverteilung im Fokus des Detektionsobjektivs befand. Bei einem klassischen *Epi*-Mikroskop sollte diese Kurve konstant sein (man stelle sich einen Spiegel vor der durch den Fokus bewegt wird und das Anregungslicht zurückreflektiert). Durch eine Punkt- oder Schlitzblende kann ein konfokales Mikroskop einen großen Teil des Fluoreszenzlichts, das von außerhalb der fokalen Ebene kommt, unterdrücken. Diese Tiefendiskriminierung wird bei der Lichtscheibenmikroskopie durch die selektive Scheibenbeleuchtung erzeugt. Bei einem Anregungsstrahl mit einem Fokaldurchmesser unterhalb der axialen Auflösungsgrenze des Detektionsobjektivs sollte ein zusätzlicher Effekt durch konfokale Zeilendetektion nur sehr schwach sein. Dies wurde auch

durch die numerischen Simulationen bestätigt. So zeigte sich bei Simulationen mit 10x- und 20x- Detektionsobjektiv keine Verbesserung der Diskriminierungskurve, sowohl mit kleiner als auch großer Beleuchtungsapertur. Dies traf auch für die beiden 40x-Detektionsobjektive und großer Beleuchtungsapertur zu. Einzig für den Fall einer kleinen Beleuchtungsapertur und einer sehr hohen Detektionsapertur wie zB. $NA=1,15$ trat eine signifikante Verbesserung der Tiefendiskriminierung auf. Eine solche Kombination ist in der Praxis jedoch nicht sinnvoll. Allerdings könnte das Resultat für den Fall relevant sein, dass ein hochaperturiger Beleuchtungsstrahl durch Streuung in der Probe stark deformiert und verbreitert wird.

4.5 Beleuchtungshomogenität

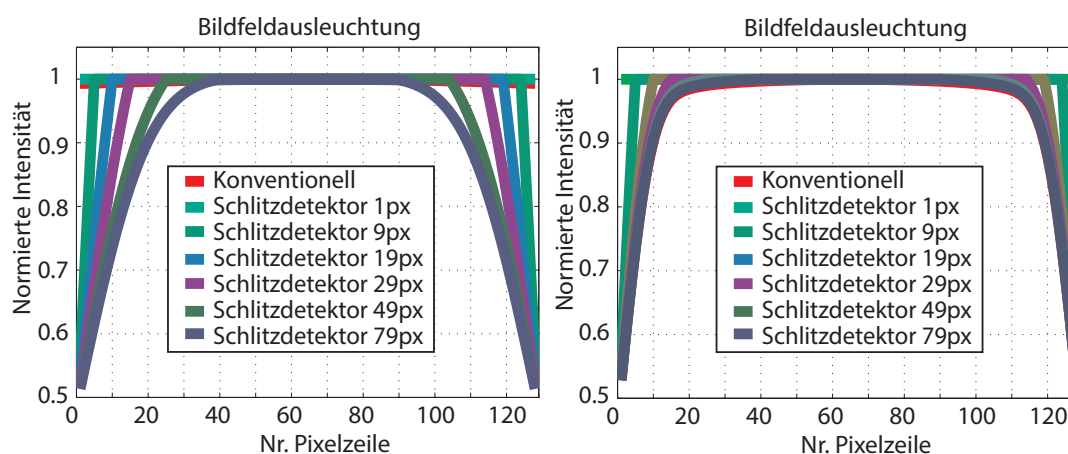


Abbildung 4.7: Auswirkung des Schlitzdetektors auf die Beleuchtungshomogenität. Eine Schicht von Fluorophoren in der Fokusebene wurde simuliert und mit unterschiedlichen Schlitzbreiten abgebildet. Objektiv: 20x, $NA\ 0,5$ Luft. **A** kleine Beleuchtungsapertur, **B** große Beleuchtungsapertur. Durch den Schlitzdetektor wird die Beleuchtungsintensitätskurve in der Mitte des Bildes flacher, fällt an den Rändern jedoch deutlich ab.

Die Abbildung einer gleichförmigen Fluoreszenzverteilung wird durch die Intensitätsverteilung des Beleuchtungsstrahls bestimmt. Wird ein in einer dünnen Schicht gleichförmig verteilter Fluoreszenzfarbstoff abgebildet, macht sich dies durch ein Abfallen der Intensität zu den seitlichen Bildrändern hin bemerkbar. In der vertikalen Bildrichtung ist das Bild jedoch deutlich homogener, da durch das Rastern des Strahls während der Bildaufnahme jeder Punkt mit einer ähnlichen Gesamtintensität beleuchtet wird. Während der Bildaufnahmedauer wird von der obersten und untersten Pixelzeile der kleinste Anteil der Intensität detektiert, und von den mittleren Zeilen der größte. Im klassischen Fall integriert jede Bildzeile die gesamte Intensität des über sie hinwegrasternden Strahls. Wenn die Bildaufnahme genau dann startet und endet, sobald die optische Achse des Beleuchtungsstrahls sich über den Pixelzeilen am Rand befindet, integrieren diese eine etwas geringere Gesamtintensität. Im konfokalen Fall wird immer der gleiche Bereich des Beleuchtungsstrahls durch

62 Kapitel 4 - Numerische Optimierung und Analyse der Abbildungsleistung

den Rolling Shutter ausgeschnitten und so ist die Intensitätsverteilung im Bild in senkrechter Richtung konstant. Eine Ausnahme bilden die Randregionen des Bildes, und zwar dann, wenn der *Rolling Shutter* sich gerade öffnet oder schließt. Hierzu wurden Bilder einer Schicht aus Fluorophoren bei unterschiedlichen Breiten des Detektionsschlitzes simuliert. Die das Probenvolumen repräsentierte Matrix war überall Null und in der mittleren Ebene überall 1. Abb. 4.7 zeigt die normierte Intensität in der zentralen Spalte dieser Bilder. Je schmaler der Detektionsschlitz wurde, desto flacher wurden die Intensitätskurven.

Kapitel 5

Charakterisierung des Mikroskops

Zur Charakterisierung der optischen und mechanischen Parameter sind einige grundlegende Messungen erforderlich. Diese werden in diesem Abschnitt präsentiert. Begonnen wird mit der Messung der Position der HFE des Beleuchtungsobjektivs. Darauf folgt die Messung des Strahlprofils und die Bestimmung der Genauigkeit der Strahlpositionierung. Zuletzt werden die praktischen Aspekte der Strahlkalibrierung und der Probenpositionierung untersucht.

5.1 Das Beleuchtungsobjektiv und die Lage der fokalen Ebenen

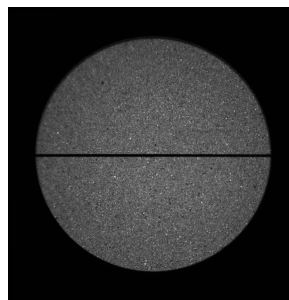


Abbildung 5.1: Bild des verwendeten Objekts. Der Durchmesser des opaken Kreises betrug 25.33 mm. Der schwarze Streifen in der Mitte diente als Anhaltspunkt zur Fokussierung.

Damit der Strahl im Bildraum telezentrisch ist, muss der durch das Relaisobjektiv abgebildete Scanpunkt in der HFE des Beleuchtungsobjektivs liegen (Abb. 2.2). Bedingt durch dessen großen Arbeitsabstand befindet sich diese innerhalb des Gehäuses. Deren Lage konnte mittels der Methode zur Brennweitenbestimmung nach Abbe ermittelt werden. Hierbei wurde ein Objekt definierter Größe durch das zu vermessende Linsensystem auf einen Schirm abgebildet. Danach wurde der Abbildungsmaßstab γ als Funktion des Bildabstan-

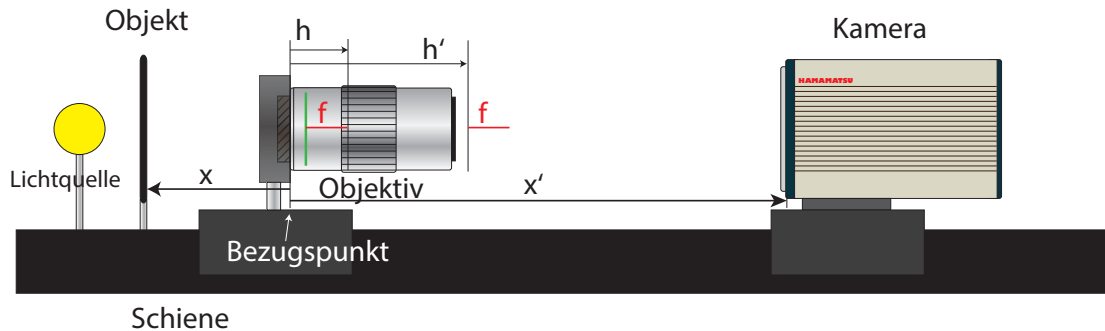


Abbildung 5.2: Schema des Messaufbaus zur Bestimmung der Lage der Hauptebenen des Beleuchtungsobjektivs. Ein Objekt wird von einer Lichtquelle beleuchtet. Das Objektiv bildete dieses auf den Chip der Kamera ab. Für unterschiedliche Abstände x wurde die Position der Kamera so eingestellt, dass eine scharfe Abbildung entstand. Danach wurde der zu x gehörende Abstand x' gemessen. Rot ist die Brennweite des Objektivs und grün die Position der HFE. Die oben eingezeichneten Positionen der Hauptebenen entsprechen in etwa deren Positionen im verwendeten Objektiv.

des x' bei unterschiedlichen Objektabständen x relativ zu einem beliebigen Bezugspunkt gemessen. Der Messaufbau bestand aus einer Platte mit einer runden, opaken Aussparung, die durch das Mitutoyo-Objektiv auf den Chip einer Orca Flash 2.8 abgebildet wurde (Abb. 5.2). Objekt, Objektiv und Kamera wurden beweglich auf einer Metallschiene montiert. Die Messung des Abbildungsmaßstabes erfolgte durch die Analyse des Bilddurchmessers in den aufgenommenen Bildern. Die Messung ergab, dass sich die hintere fokale Ebene relativ zum Bezugspunkt 5 mm innerhalb des Objektivs befand. Die Brennweite des verwendeten Objektivs beträgt 20 mm und der Arbeitsabstand 33,5 mm, was dazu führt, dass sich die Hauptebene h' vor dem Objektiv befindet.

Die Positionsangaben erfolgten relativ zur objektivseitigen Kante des Halters. Ist die Entfernung der gegenstandsseitigen Hauptebene zum Bezugspunkt h und die der bildseitigen h' , so erhält man aus der paraxialen, geometrische Optik die Gleichungen

$$x = f(1 + 1/\gamma) + h \quad (5.1a)$$

$$x' = f(1 + 1/\gamma) + h'. \quad (5.1b)$$

f ist die Brennweite des Objektivs und γ die Vergrößerung bei unterschiedlichen Wertepaaren x und x' . Misst man nun die Abbildungsvergrößerung für unterschiedliche Werte x und x' , kann man mittels linearer Regression aus obiger Gleichung die Positionen der Hauptebenen relativ zum Bezugspunkt berechnen. Die ermittelten Werte betragen

Da h der objektseitige Abstand der Hauptebene vom Bezugspunkt ist, aber bei dem verwendeten Objektiv rechts vom Bezugspunkt liegt, ist dieser Wert negativ. Des Weiteren stimmt die gemessene Brennweite mit der Herstellerangabe überein. Mit der Brennweite

h [mm]	h' [mm]	f [mm]
-25.15 ± 0.005	78.2 ± 0.2	19.9 ± 0.2

Tabelle 5.1: Ermittelte Werte für die Hauptebenen und die Brennweite.

von rund 20 mm befindet sich die hintere fokale Ebene in einem Abstand von etwa 5 mm innerhalb des Objektivs.

5.2 Detektion der Strahlposition und Kalibrierung des Mikroskops

5.2.1 Messung der Lage des Beleuchtungsstrahls und der Position des Anregungsfokus

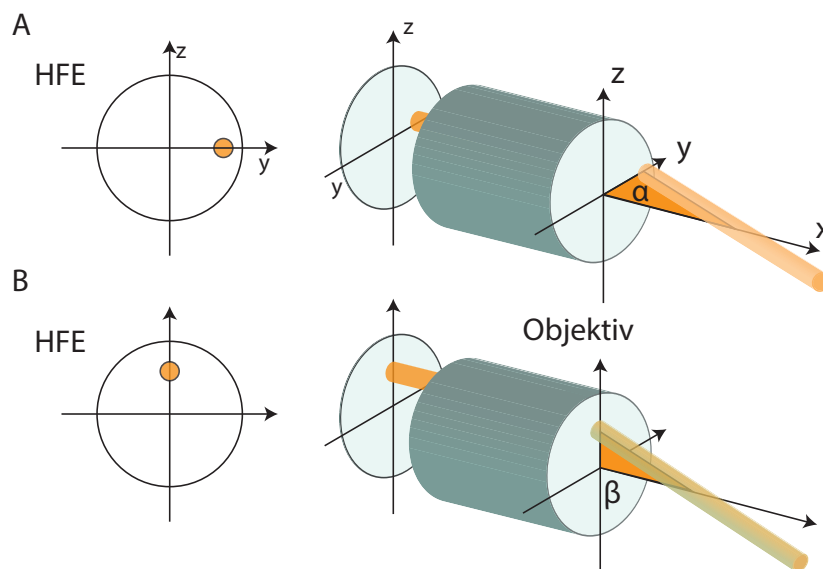


Abbildung 5.3: **A** Bei Verschiebung der Beleuchtung in der hinteren fokalen Ebene in x , wird der Strahl in der x - y -Ebene um den Winkel α gekippt. Dies ist direkt im Bild des Strahls sichtbar. **B** Bei Verschiebung entlang der z -Achse wird der Strahl in der x - z Ebene um den Winkel β gekippt. Dies kann indirekt durch Defokussierung des Bildes ermittelt werden.

Im idealen Fall liegt der Beleuchtungsstrahl bei der Ausgangsstellung des Scanspiegels so, dass sich der Fokus exakt in der Mitte des Bildes befindet. Die optische Achse verläuft parallel zu den Detektorzeilen und befindet sich innerhalb der Bildfokusebene. In der Realität ist der Laser, nach Einschalten des Gerätes, zur optischen Achse verschoben und gekippt. Der Grund hierfür ist, dass sich die Ausgangsposition des Lasers nicht exakt in der Mitte der HFE des Beleuchtungsobjektivs befindet. Abb. 5.3 **A** zeigt die HFE. Markiert durch

den orangen Kreis ist die Position des Lasers. Wird dieser hier parallel zur y -Achse verschoben, kippt der Strahl im Probenraum um den Winkel α im Fokus (Abb. 5.3 B). In gleicher Weise kippt der Strahl in der x - z -Ebene um den Winkel β , wenn er in der HFE in z -Richtung bewegt wird.

Eine Justage ist aufgrund der Freiheitsgrade und der nötigen Genauigkeit schwierig, weshalb zu diesem Zweck die durch Aktoren bewegten Justagespiegel **M3** und **M4** aus Abb. 3.2 verwendet wurden. Der Einfluss der Stellung dieser Spiegel auf die Lage des Anregungsstrahls im Probenraum wurde in Abschn 3.8 diskutiert.

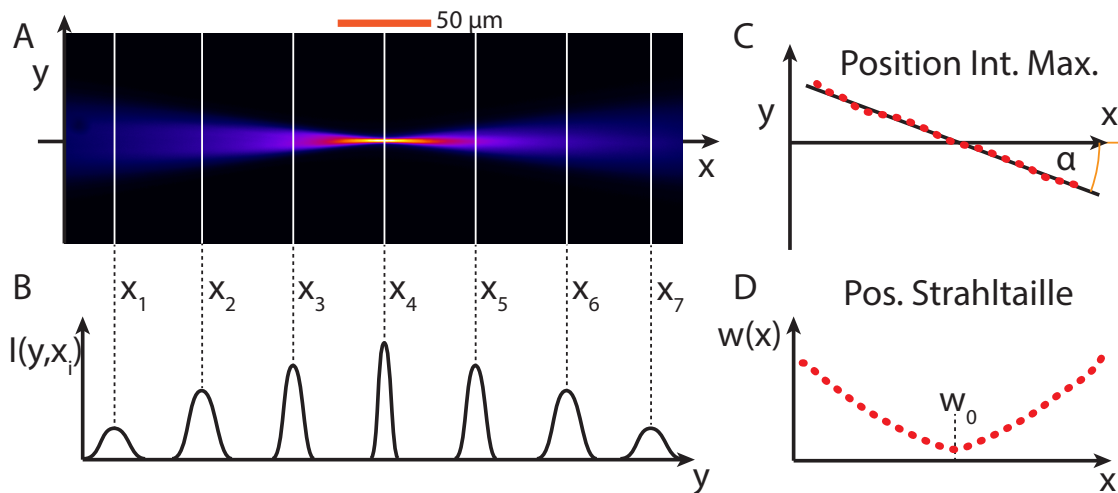


Abbildung 5.4: Schematische Veranschaulichung der Detektion des Strahls und seiner Lage. A Bild des Laserstrahls bei 40-facher Vergrößerung und mit Strahlaufweitung. B Spaltenweise wird das Strahlprofil entlang der y -Achse extrahiert und der Mittelpunkt der Intensitätskurve ermittelt. C Y -Positionen der Intensitätsmaxima in Abhängigkeit der Spaltenzahl, die mittels Gauß-Anpassung ermittelt wurden, rot. Hieraus lässt sich der Kippwinkel α relativ zur optischen Achse ermitteln. D Trägt man $w(x_0)$, den $1/e^2$ -Radius in Abhängigkeit von x , gegen x auf und ermittelt das Minimum, erhält man die x -Position der Strahltaille. Mit der linearen Regression aus C bekommt man die zugehörige y -Koordinate.

Während der Arbeit mit dem Mikroskop hat sich gezeigt, dass vor jeder Messung eine Feinkalibrierung durchgeführt werden musste. Ursache kann die Dejustage mechanischer Elemente durch Vibrationen sein, was in der Regel auf längeren Zeitskalen von Tagen vonstatten ging. Deutlicher wurde der Strahlversatz jedoch beim Wechseln unterschiedlicher Probenküvetten. So wurde für die Kalibrierung eine homogen fluoreszierende Lösung des Farbstoffes Alexa-Fluor 647 (Life Technologies Corp.) in PBS-Puffer (*Phosphate Buffered Saline*), die in eine Probenküvette pipettiert wurde, verwendet (vgl. Abb. 3.5). Hiermit konnte der Anregungsstrahl direkt abgebildet werden (Abb. 5.4 A). Die nach der Kalibrierung abzubildende Probe befand sich in einer zweiten Küvette, die nun in den Probenhalter eingesetzt wurde. Hier konnten bereits geringe Unterschiede der zwischen den Küvettenpositionen schon zum Kippen des Strahls relativ zur optischen Achse und zur Verschiebung des Beleuchtungsfokus in x und y führen. Bei entsprechend hoher Sorgfalt

beim Austauschen der Küvette mit der Kalibrationslösung durch die Küvette mit der Probe blieb die zuvor kalibrierte Position des Anregungsfokus im Bildfeld aber weitestgehend erhalten.

Der computergesteuerte Kalibrierungsprozess wurde in mehrere Schritte unterteilt (Abb. 5.4). Als erstes erfolgte manuell eine grobe Positionierung des Strahls in der Bildmitte, durch Abbilden mit Hilfe des gelösten Farbstoffes. Hierbei wurde auch eine Minimierung des Winkels β durch Variation der Winkel um die Achsen A1 und A3 aus Abb. 3.12 durchgeführt. Dazu wurde das Bild des Strahls manuell defokussiert und dabei beobachtet, ob der Strahl den Fokus gleichmäßig entlang der Strahlachse verlässt.

Dann wurde die Strahlposition und das Strahlprofil detektiert (Abb. 5.4 **A** und **B**). Dabei wurde entlang jeder Bildspalte mittels der Schwerpunktmethod die Position des Intensitätsmaximums ermittelt (BTTcom.JH2.vi, Algorithmus übernommen von J. H. Spille). Diese Methode ist im Vergleich zu einer nichtlinearen Kurvenregression in der Berechnung deutlich schneller, besitzt allerdings auch eine geringere Genauigkeit. Mit der so ermittelten groben Kenntnis der Lage der Strahlachse konnte entlang dieser ein schmaler Bildausschnitt gewählt werden. Hier wurde dann spaltenweise eine Gaußsche Verteilungsfunktion an das Strahlprofil angepasst.

Zur Messung des Winkels zwischen Strahl und optischer Achse, wurde eine lineare Regression an die Position der Intensitätsmaxima als Funktion der Pixelspalte durchgeführt (Abb. 5.4 **C**).

Die gemessene Strahlbreite als Funktion der Spalte wurde zunächst mit einem gleitenden Medianfilter der breite 10 Pixel geglättet, um durch fehlerhafte Funktionsanpassung entstandene Ausreißer zu eliminieren. Das Minimum dieser Kurve wurde als Position der Strahltaile verwendet (Abb. 5.4 **D**).

Der Winkel α wurde zunächst mit Hilfe der durch Aktoren betriebenen Kalibrationsspiegel durch Variation der Kippwinkel um die Achsen A2 und A4 aus Abb. 3.12 minimiert. Mit Hilfe des Scanspiegels g_x wurde daraufhin der Strahlfokus in die vertikale Bildmitte bewegt. Zuletzt wurde der Strahl in x-Richtung mit Hilfe des Mikrometer-Stelltisches **MT** (Abb. 3.2) zentriert. Für letzteres musste der Brechungsindex-Unterschied zwischen dem Immersionsmedium der Beleuchtung (hier Luft) und dem Probenmedium (BABB oder Wasser) berücksichtigt werden (Abschn. 3.4).

5.2.2 Gemessene Rayleighlänge und Fokusdicke des Beleuchtungsstrahls

Mit Hilfe der Kalibrationslösung wurde die Ausdehnung des Beleuchtungsfokus bestimmt. Die Strahlbreiten $w_0(z)$ wurden aufgetragen und die theoretische Funktion (2.5) hieran angepasst, um w_0 , die Rayleighlänge z_R sowie die axiale chromatische Verschiebung Δx_0 des Anregungsfokus zu messen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 ohne Aufweitung und in Tabelle 5.3 mit aufgeweiteter Beleuchtung zusammengefasst. Der gemessene Strahlradius

λ_{exc} [nm]	w_0 [μm]	z_r [μm]	Δx_0 [μm]
640	$3,2 \pm 0,3$	45 ± 6	0
532	$3,2 \pm 0,3$	49 ± 6	4 ± 5
488	$3,2 \pm 0,3$	51 ± 6	14 ± 5

Tabelle 5.2: Messungen der Strahlprofile ohne Strahlaufweitung. Die Positionen x_0 der Strahlteile sind relativ zur Position des roten Laserfokus angegeben.

λ_{exc} [nm]	w_0 [μm]	z_r [μm]	Δx_0 [μm]
640	$2,3 \pm 0,1$	$13,7 \pm 2,6$	0
532	$2,0 \pm 0,1$	$13 \pm 2,6$	4 ± 5
488	$2,2 \pm 0,3$	$13,7 \pm 2,6$	14 ± 5

Tabelle 5.3: Messungen der Strahlprofile mit Strahlaufweitung. Die Positionen x_0 der Strahlteile sind relativ zur Position des roten Laserfokus angegeben.

w_0 von rund $3 \mu\text{m}$ und die Rayleighlänge z_r von rund $50 \mu\text{m}$ in Tab. 5.2 stimmen mit den Ergebnissen der wellenoptischen Simulation aus Tab. 4.2b überein. Die Messung in Tab. 5.3 ergaben einen zweimal größeren Wert für w_0 und z_R als die wellenoptischen Simulationen aus 4.2b. Grund hierfür ist vorwiegend die sphärische Aberration aufgrund der größeren Beleuchtungs-Apertur.

Δx_0 ist der Abstand der Beleuchtungsfoki entlang der Beleuchtungsachse, zwischen den Wellenlängen 640 nm und 532 nm sowie zwischen den Wellenlängen 640 nm und 488 nm. Die gemessenen Werte von jeweils $4 \pm 5 \mu\text{m}$ und $14 \pm 5 \mu\text{m}$ entsprechen dem mittels Raytracing berechneten chromatischen Fehler von jeweils $2 \mu\text{m}$ und $12 \mu\text{m}$ zwischen diesen Wellenlängen (Abb. 4.3).

5.2.3 Berechnete Strahl-Positionierungsgenauigkeit

Im Idealfall herrscht zwischen dem Abstand d des Beleuchtungsstrahls zur optischen Achse und dem Auslenkungswinkel θ des Scanspiegels ein linearer Zusammenhang (Abb. 2.2).

Chromatische Fehler, Feldkrümmung und Verzeichnung lassen das System von diesem idealen Verhalten abweichen. Zusammen mit der Positionierungsgenauigkeit von Scanspiegeln und Schrittmotoren der mechanischen Komponenten wird dann die tatsächliche Strahlposition in einer optisch homogenen Probe bestimmt. Axiale und laterale chromatische Fehler können bei Aufnahmen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen problematisch werden, da die Fokuspositionen bei unterschiedlichen Wellenlängen voneinander abweichen können. Feldkrümmung oder auch Petzval-Krümmung lassen den Fokus beim Rastern auf einer kreisförmigen Trajektorie laufen, die durch den Petzvalradius parametrisiert wird. Bildfeldverzeichnung führt schließlich zu einem nicht mehr linearen Zusammenhang zwischen dem Winkel des Scanspiegels und der Auslenkung des Fokus (Abschn. 2.7). Zu den optischen Fehlern addieren sich die Ungenauigkeiten der mechanischen Bauteile.

Der Scanspiegel hat laut Hersteller eine Genauigkeit von $\delta\theta = 15 \mu\text{rad}$ ($0,0008^\circ$), hinter dem Relaissystem mit einer Vergrößerung von 1,8 liegt der Strahlauslenkungsfehler dann bei $\delta\theta = 8,3 \mu\text{rad}$. Um dies zu Verifizieren wurde die Spannung an der Scanspiegel-Steuerungseinheit ausgelesen, die die aktuelle Spiegelposition anzeigt. Hierzu wurde der Analogeingang AI1 in Abb. 3.10 verwendet. Dies geschah für Positionswerte zwischen +10 V und -10 V. Im Bereich von ± 2 V um den Ruhepunkt zeigte sich eine mittlere Abweichung der Position von 0,001 V von der Eingestellten. Der Konversionsfaktor von Spannung zu Spiegelwinkel betrug $1^\circ/1$ V.

Ist θ der Auslenkungswinkel in der HFE des Beleuchtungsobjektivs, so gilt für den Strahlabstand d von der optischen Achse und dessen Fehler Δd

$$d = f \tan \theta \quad \Delta d = f(\tan^2 \theta + 1)\Delta\theta \quad (5.2)$$

Bei einer Brennweite von $f = 20$ mm führt dies aufgrund der oben gemessenen Genauigkeit der Spiegel-Position zu einer Positionierungsfehler von $0,166 \mu\text{m}$. Zum Vergleich beträgt die Pixelgröße bei Detektion mit zehnfacher Vergrößerung $0,65 \mu\text{m}$ und bei 40-facher Vergrößerung $0,162 \mu\text{m}$. Die durch die Spiegelposition erzeugte Abweichung entspricht somit maximal der Größe eines Bildpixels und liegt deutlich unterhalb des gemessenen, minimalen $1/e^2$ -Strahlradius von $2,2 \mu\text{m}$ (Tab. 5.3).

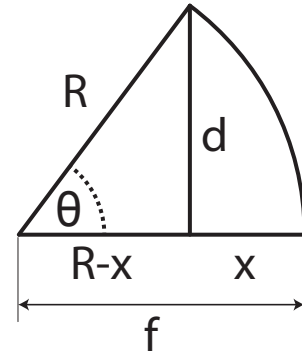


Abbildung 5.5: Skizze zur Berechnung der Fokusverschiebung bei einer Feldkrümmung mit Radius R .

Die Berechnung durch Zemax ergab weiterhin, dass die Petzval-Krümmung im Fokus des Beleuchtungssystems einen Radius von 34,4 mm aufweist. Die daraus resultierende Verschiebung des Fokus in Abhängigkeit des Spiegel-Auslenkungswinkels kann mit Hilfe von Abb. 5.5 berechnet werden und beträgt

$$x = R - \frac{R}{\sqrt{1 + \tan^2 \theta}}. \quad (5.3)$$

x ist für den oben genannten Radius gleich $20,9 \mu\text{m}$ bei einem Auslenkungswinkel von 2° . In dieser Größenordnung lag die Scanamplitude, wenn das 10x-Detektionsobjektiv verwendet wurde.

Die Raytracing-Analyse ergab, dass die zusätzliche f - θ -Verzeichnung durch das optische Relais bei einem Auslenkungswinkel von 2° bei etwa 0.05 % liegt. Dies bedeutet, dass die Abweichung von der Bedingung $d \propto \theta$ $0,05 \mu\text{m}$ pro $100 \mu\text{m}$ Strahlauslenkung d beträgt. Schließlich führt der axiale chromatische Fehler zu einer maximalen Fokusverschiebung von $12,4 \mu\text{m}$ zwischen 488 nm und ca. 640 nm, Abb. 4.3. Der chromatische Fokusdrift in y liegt bei $0,4 \mu\text{m}$ für eine Scanamplitude von 2° . Die hier getroffenen Überlegungen beziehen sich auf die durch das Scanrelais erzeugten Fehler unter der Annahme eines ideal Beleuchtungsobjektivs.

5.2.4 Gemessene Strahl-Positionierungsgenauigkeit und Linearität der Strahlbewegung

Die Zeile, bei der sich der Strahlfokus bei unterschiedlichen Scanspiegelspannungen befand, wurde gemessen. Eine lineare Regression dieser Daten zeigt die Verschiebung des Strahls pro Volt Spiegelspannung. Aus der Differenz der gemessenen Strahlpositionen und der linearen Kurve erhält man die Abweichung von der idealen Scankurve. Vor Beginn der Aufnahme wurde der Strahl zunächst so kalibriert, dass er über der mittleren Bildzeile lag. Daraufhin wurden 100 Strahlpositionen entlang des Scankurve aufgenommen. Die maximale Spiegelauslenkung betrug dabei 1,85 V und die Schrittweite 0.037 V. Dieser Vorgang wurde mit jedem der drei Anregungslaser durchgeführt.

Für $\lambda_{exc} = 640 \text{ nm}$ wurde die Scankurve zehn mal aufgenommen und die ermittelten Steigungen gemittelt, um systematische Abweichungen von der idealen Gerade und stochastische unterscheiden zu können. Für den roten Laser ergab die Messung eine Gerade mit der Steigung von $539,3 \pm 0,1 \text{ px/V}$ bzw. $1,85 \cdot 10^{-3} \text{ V/px}$. Ein Volt Spiegelspannung entspricht hierbei einem Spiegelwinkel von einem Grad.

Abbildung 5.6 zeigt die Überlagerung von zehn hintereinander aufgenommenen Scankurven. Das Rauschen der Kurven entspricht der Wiederholungsgenauigkeit bei der Strahlposition. Deutlich größer sind die systematischen Abweichungen in Form einer Oszillation mit einer Amplitude zwischen 2 und 3 Pixeln. Die Steigungen für $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$ betrug



Abbildung 5.6: Überlagerung der Differenz von Strahlposition und angepasster Regressionsgerade von zehn Scankurven. Auffällig ist eine Oszillation der Strahlposition mit einer Amplitude von ca. 2 bis 3 Pixeln ($1,3\ \mu\text{m}$ – $2\ \mu\text{m}$). $\lambda_{exc} = 640\ \text{nm}$, Pixelgröße $0,65\ \mu\text{m}$. Jede Farbe steht für jeweils eine Messung.

$538,7 \pm 0,1\ \text{px/V}$ und für $\lambda_{exc.} = 488\ \text{nm}$ $539,2 \pm 0,1\ \text{px/V}$. Die Strahlposition ist demnach nahezu unabhängig von der verwendeten Wellenlänge, was in Übereinstimmung mit dem geringen lateralen chromatisch Fehler der Beleuchtung ist (Abschn. 5.2.3).

5.3 Anpassen der Scanebene

Ist die Scanebene nicht flach oder ist sie relativ zur Detektionsebene gekippt, tritt Defokus an den äußeren Bildrändern auf (Abb. 5.7). Die Kompensation eines solchen Fehlers erfolgte mit Hilfe des Scanspiegels g_y (Abb. 3.4). g_x und g_y wurden hierzu synchron bewegt. Die Spannungskurve für g_y war hierbei ebenfalls linear. Steigung und Amplitude wurden vorher gemessen. Hierzu wurde der Strahl zunächst in der Bildmitte zentriert und fokussiert. Dann wurde der Scanspiegel g_x an 15 Positionen auf der Rasterkurve gesetzt. Durch Variation der Position g_y wurde der Strahl im Bild refokussiert. Somit konnte eine Kurve für die Positionen von g_y in Abhängigkeit der Positionen von g_x ermittelt werden. Die Anpassung einer Trendgeraden ergab einen Korrekturfaktor von $-0,042$ V für g_y pro V für g_x .

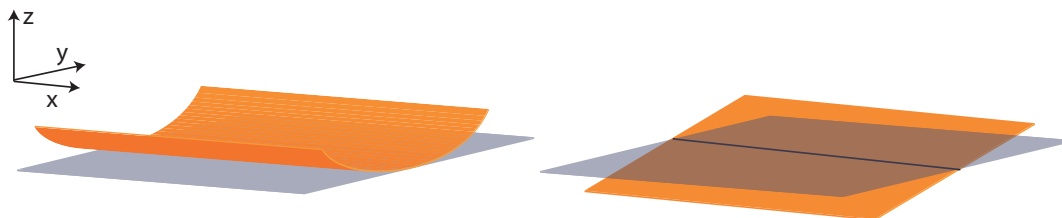


Abbildung 5.7: Mögliche Formen einer deformierten Scanebene relative zur Detektionsebene (grau). Links: Die Scanebene ist gekrümmt. Rechts: Die Scanebene ist relative zur Detektionsebene gekippt.

5.4 Optimierung der Synchronisation von Beleuchtung und Rolling Shutter

Die Synchronisation zwischen Beleuchtungsstrahl und Kamera konnte mit Hilfe der Kalibrationslösung überprüft und optimiert werden. Die Phase zwischen der Spannungskurve und dem Auslösesignal der Kamera konnte hierzu in Schritten von einzelnen Samplingpunkten verändert werden (Abschn. 3.7). Lag der Strahl nicht exakt über dem Rolling Shutter, führte dies insbesondere bei einem schmalen Detektorschlitz zu einem Intensitätsabfall im Bild. Um die optimale Phase zu bestimmen, wurden mehrere Bilder aufgenommen. Dabei wurde die Phase schrittweise verändert und die Intensität im Zentrum des Bildes gemessen. Bei der optimalen Synchronisation war die Intensität maximal (Abb. 5.8). Je nach Breite des Detektionsschlitzes, verwendeter Objektivvergrößerung und Pixelintegrationszeit mussten unterschiedliche Werte für den Signalversatz verwendet werden, die im Voraus bestimmt wurden. Die praktische Erfahrung hat zudem gezeigt, dass eine nachträgliche Überprüfung der Synchronität in der Probe möglich war.

Wurde die Breite des Detektors größer als der $1/e^2$ -Durchmesser des Strahlfokus eingestellt,

5.4 Optimierung der Synchronisation von Beleuchtung und Rolling Shutter 73

dann wurde die Phase zwischen den Signalen gleich der halben Zeilenbreite des Detektionschlitzes gesetzt.

Der dunkle Streifen in Abb. 5.8 entspricht der Position des Anregungsfokus während des Rasterns. Die dicke des Fokus liegt hier unterhalb der z -Ausdehnung der Detektions-PSF. Das Volumen in dem hier Fluoreszenz angeregt wird ist kleiner als in den links und rechts unmittelbar angrenzenden Bereichen, in denen der Strahl konvergiert oder divergiert. Somit befinden sich in der Bildmitte weniger angeregte Fluorophore innerhalb des Volumens der Detektions-PSF als in den angrenzenden Bereichen.

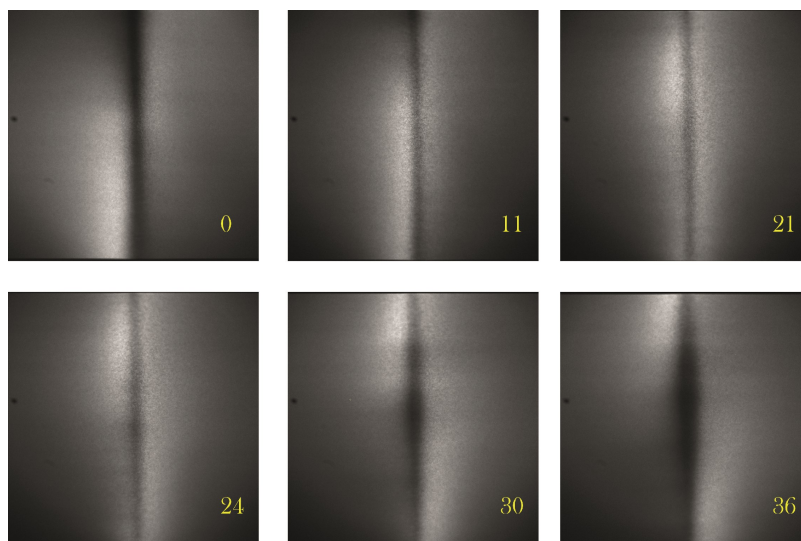


Abbildung 5.8: Um die Synchronisation zu optimieren, wurden Aufnahmen der Kalibrationslösung mit gescanntem Strahl gemacht. Variiert wurde die Phase zwischen dem Auslösesignal der Kamera und der Scankurve. Die Phase, bei der die Intensität im Zentrum des Bildes maximal war, wurde als optimal für die Synchronisation gewählt. Die Zahl unten rechts ist die Phasendifferenz der beiden Signale gemessen in Scankurven-Sampling-Punkten. Die beste Synchronisation liegt hier bei einer Differenz von 21 Sampling-Punkten.

5.5 Kompensation des Defokus während der Probenpositionierung

Bei Verwendung von Luftobjektiven wie dem Mitutoyo-Objektiv kommt es beim Bewegen der Probe aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes von Luft und Probenmedium zu Defokus. Führt man eine Translation der Probenkammer in x-Richtung aus, bewegt sich der Beleuchtungsfokus im Bild in die entgegengesetzte Richtung (Abschn. 3.4). Der theoretisch berechnete Korrekturfaktor wurde durch Messungen überprüft.

5.5.1 Quantifizierung des Beleuchtungs-Defokus

Der nicht aufgeweitete Strahl wurde in Kalibrationsmedium mit dem 10x Luftobjektiv abgebildet. Die Probenkammer wurde in Schritten von $100\ \mu\text{m}$ in x verschoben. Dabei wurde die Position der Strahltaile gemessen (Abschn. 5.2.1). Im zweiten Schritt wurde der Beleuchtungsstrahlengang mit Hilfe des Mikrometer-Stelltisches in Schritten von $100\ \mu\text{m}$ verschoben. Die Auswertung der Daten ergab, dass der Beleuchtungsarm um $-0,26\ \mu\text{m} \pm 0,03\ \mu\text{m}$ pro μm Probentranslation in x bewegt werden musste, um den Defokus zu korrigieren.

5.5.2 Quantifizierung des Detektions-Defokus

Die Probenkammer wurde 20 Mal in Schritten von $20\ \mu\text{m}$ entlang z verschoben. Das Bild des Strahls wurde dabei durch Variation des Abstandes zwischen Probenkammer und Detektionsobjektiv mit Hilfe des PIFOC refokussiert. Aus der Kurve der PIFOC-Position als Funktion der z-Position der Probenkammer wurde der Korrekturfaktor durch lineare Regression bestimmt. Die Messung ergab, dass der PIFOC um $-0,249\ \mu\text{m} \pm 0,001\ \mu\text{m}$ pro μm Probenverschiebung bewegt werden musste. Diese Kalibrationsmessung lieferte ein genaueres Ergebnis als die Quantifizierung des Beleuchtungs-Defokus, da die Fokussierung des Bildes des Gaußstrahls genauer war als die Messung der Position der Strahltaile.

5.5.3 Weitere Quellen für Defokus

Bei Aufnahmen ausgedehnter Proben, bei denen die Probenküvette um einen bis mehrere Millimeter in x oder y verschoben wurde, fiel auf, dass zusätzliche Unschärfeartefakte auftraten. Grund hierfür war, dass der Abstand zwischen Probenküvette und Objektiv bei der Probentranslation nicht konstant blieb. Abb. 5.9 zeigt die gemessene Strahltaile, während der Probenhalter in y-Richtung verschoben wurde. Die Position des Strahls war dabei konstant. Deutlich ist zu erkennen, dass nach etwa zwei Millimetern Probentranslation der Strahl sich signifikant aus dem Fokus herausbewegte, da nun w_0 größer wurde. Ein

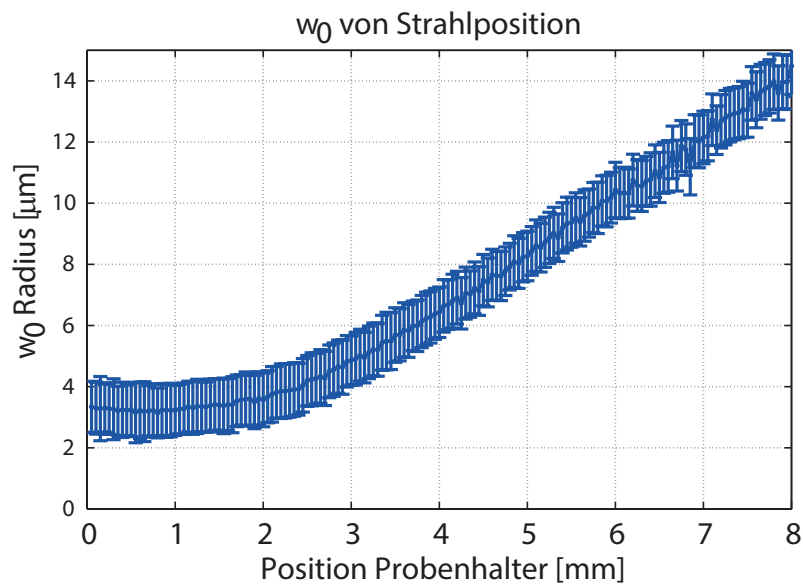


Abbildung 5.9: Messung des Strahlradius bei Verschiebung des Probenhalters in y um insgesamt 8 mm, in Schritten von $50 \mu\text{m}$. Die Strahldicke bleibt bei einer Verschiebung von 1 mm in etwa konstant, läuft dann aber aus dem Fokus. Grund hierfür ist vermutlich, dass sich der Abstand zwischen Probenkammer und Luftobjektiv verändert.

ähnlicher Effekt wurde für die Bewegung der Probe in x -Richtung beobachtet. Refokussierung mittels PIFOC ergab, dass die Entfernung zum Küvettenboden in der Größenordnung von etwa $25 \mu\text{m}$ pro mm Probentranslation zunahm.

5.6 Quantifizierung des konfokalen Effekts

5.6.1 Die Auswirkung des Spaltendetektors auf die Punktabbildungsfunktion

Um die Auswirkung des konfokalen Schlitzdetektors zu untersuchen wurden fluoreszenzmarkierte Polystyrenkugeln (TetraSpeck microspheres, Thermo Fisher Scientific Inc.) mit einem Durchmesser von $100\ \mu\text{m}$ zusammen mit nicht markierten Polystyrenkugeln (Polybead Microspheres, Polysciences, Inc.) mit $50\ \text{nm}$ Durchmesser in ein Agarosegel eingebettet und dreidimensional abgebildet. Die unmarkierten Kugeln dienten dazu, den Streukoeffizienten der Probe zu erhöhen.

Die Messung der PSF erfolgte mit MATLAB. Die einzelnen Mikrosphären wurden in den Bildern hierzu manuell ausgewählt und um sie herum eine dreidimensionale Matrix ausgeschnitten. Daraufhin erfolgte eine Anpassung einer dreidimensionalen Gaußfunktion an die Intensitätsverteilung entlang der Kardinalachsen. Die Intensitätskurven wurden zusätzlich grafisch dargestellt und Kurven mit doppelten Intensitätsmaxima, die von Teilchenaggregaten stammen, wurden verworfen, um die Analyse nicht zu verfälschen. Die Resultate der Messung sind in Abb. 5.10 dargestellt.

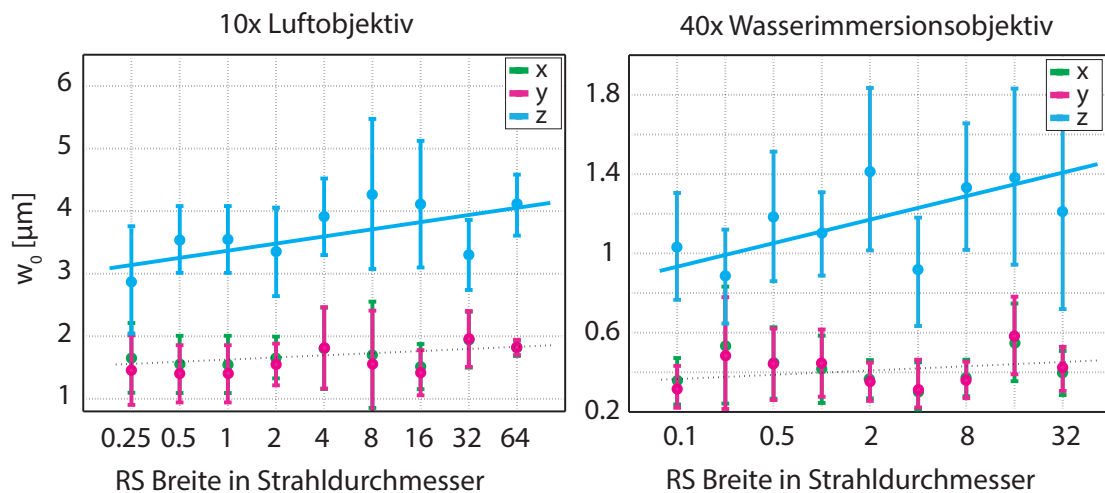


Abbildung 5.10: Messung des Auflösungsvermögens bei $\lambda_{exc.} = 633\ \text{nm}$ in Abhängigkeit des Rolling Shutters. Links 10x Objektiv, NA 0,3 (Luft), rechts 40x., NA 1,15 (Wasser), mit Strahlaufweitung.

Pro Datenpunkt wurden 20–30 Bilder von fluoreszierenden Mikrokugeln untersucht. Die Punkte zeigen die gemessenen Mittelwerte und die Fehlerbalken deren Standardabweichung. Die Aufnahmen fanden in einer Tiefe von etwa $500\ \mu\text{m}$ in der Probe statt. Gemessen wurden die $1/e^2$ -Radien entlang der drei Hauptachsen als Funktion der Schlitzdetektor-Breite. Die Breite des Detektors ist in Einheiten des theoretischen $1/e^2$ -Durchmessers des Beleuchtungsstrahls dargestellt. Im Fall des 10x-Objektivs blieben w_x und w_y unverändert bei etwa

1,8 μm und beim 40x-Objektiv bei etwa 0,4–0,5 μm . In z -Richtung deuten die Daten einen gewissen Abwärtstrend bei kleiner werdendem Rolling Shutter an. So verringert sich $w_{0,z}$ von 4 μm auf $w_{0,z} = 3 \mu\text{m}$ im Falle des 10x-Objektivs und von 1,3 μm auf $w_{0,z} = 1 \mu\text{m}$ im Falle des 40x-Objektivs.

Eine Asymmetrie in lateraler Richtung, wie sie in Abschn. 4.3.2 festgestellt wurde, ist auch bei sehr kleinen Detektorbreiten nicht zu erkennen. Grund hierfür ist vermutlich die relativ hohe Streulänge der Probe, die mittels Mie-Streutheorie berechnet werden kann. Für die Herstellung der Probe wurde 100 μl der Stammlösung der unmarkierten Polystyrenkugeln zu 200 μl Agaroselösung (1,2 % Agarose in PBS-Pufferlösung) gegeben. Nach Herstellerangaben ist die Teilchenkonzentration $3,64 \cdot 10^{14}$ Teilchen pro ml Stammlösung. Daraus folgt eine Teilchenkonzentration von 121 Teilchen pro μm^3 . Der Brechungsindex von Polystyren beträgt 1,59 und von Wasser 1,33. Mit diesen Daten wurde der Streukoeffizient der Probe berechnet (Mie Scattering Calculator, Scott Prahl, Oregon Medical Laser Center, Oregon Health and Science University) und beträgt $0,11 \text{ mm}^{-1}$. Somit ist die mittlere freie Weglänge in diesem Fall etwa 9 mm und vergleichsweise groß im Vergleich zur Abbildungstiefe von 500 μm und auch groß zu typischen Streulängen in biologischem Gewebe, die in der Größenordnung von 100 μm liegt ([BEJ⁺95]). Der Streukoeffizient könnte durch Verwendung von unmarkierten Teilchen mit einer höheren Konzentration erhöht werden oder durch Verwendung von größeren Partikeln. Letzteres würde jedoch auch die Streuasymmetrie aufgrund der Mie-Streuung erhöhen.

Auffallend sind die mit größer werdendem Detektorschlitz zunehmende Standardabweichung der Messungen. Dies ist vermutlich auf das zunehmende SRV und den schlechter werdenden Kontrast zurückzuführen (Abschn. 5.6.2).

5.6.2 Verbesserung von Kontrast und Signal zu Rausch Verhältnis

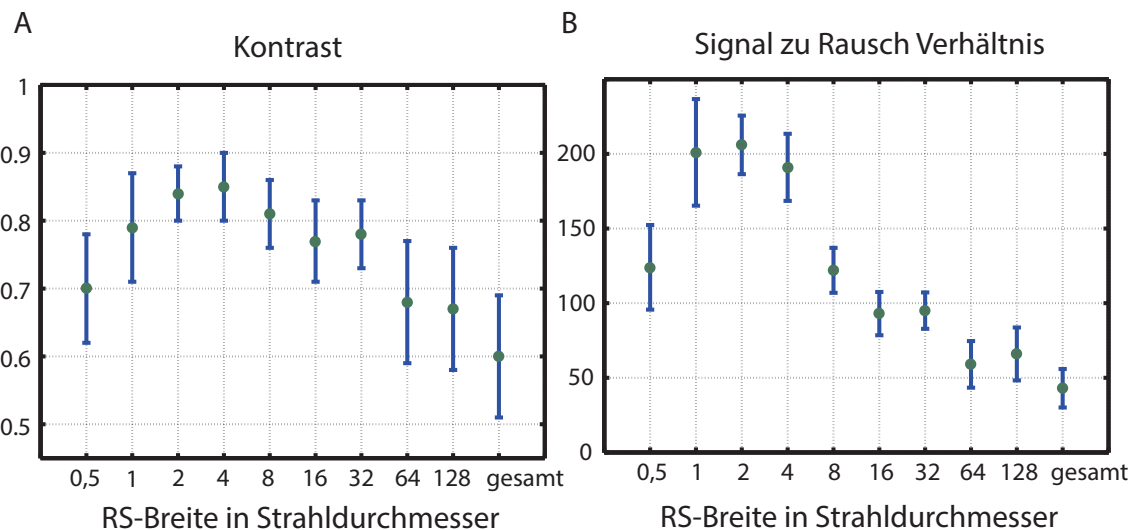


Abbildung 5.11: **A** Messung des Kontrastes mittels fluoreszierender Mikrokugeln bei unterschiedlichen Rolling Shutter Breiten. Links für das 10x Objektiv mit NA 0,3, rechts für das 40x Objektiv mit NA 1,15. Die Farben entsprechen den Anregungswellenlängen: Rot = 640 nm, grün = 532 nm, blau = 488 nm. Konv. steht für den konventionellen Fall bei vollständig aktivierter Kamera. **B** Ergebnis der Messung des SRV für unterschiedliche Breiten des Rolling Shutters. Bei kleiner werdenden Rolling Shutter Breiten nimmt das SRV zu. Es erreicht ein Maximum, wenn die Größe des Detektorschlitzes in etwa dem Durchmesser des Beleuchtungsstrahls entspricht.

Eine ähnliche Probe in Agarose immobilisierter rot fluoreszierender Polystyren-Mikrokugeln (Molecular Probes) mit einem Durchmesser von 200 nm wurde verwendet, um die Änderung von Kontrast und Signal zu Rausch Verhältnis (SRV) bei unterschiedlichen Breiten des Schlitzdetektors zu untersuchen. Um den Streukoeffizienten zu erhöhen, wurde Agarose direkt zu 1 ml der Stammlösung derselben unmarkierten Kugeln aus Abschn. 5.6.1 gegeben. Dieser betrug nun aufgrund der dreifach höheren Konzentration nichtmarkierter Teilchen $0,33 \text{ mm}^{-1}$ und die mittlere freie Weglänge somit 3 mm. Aufgenommen wurden z-Stapel mit einer Dicke in z von $50 \mu\text{m}$ und einer Schrittweite von $1 \mu\text{m}$. Der Kontrast wurde gemessen, indem aus jeweils einer abgebildeten Ebene in der Probe zwischen 10 und 20 Bilder von fluoreszierenden Teilchen manuell ausgewählt wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Teilchen in etwa gleich hell waren, um die Varianz der Ergebnisse durch unterschiedlich helle Partikel zu minimieren, da die Teilchen nicht monodispers waren und dazu neigten, Aggregate zu bilden. An die ausgewählten Bilder der Teilchen wurde eine zweidimensionale Gaußfunktion angepasst, um den Einfluss des Bildrauschens zu verkleinern, und der Kontrast nach Gleichung (2.29) berechnet. Dabei war I_{max} gleich der Summe aus Amplitude und Offset der angepassten Gaußfunktion und I_{min} gleich dem Offset. Das SRV wurde nach $I/\Delta I$ für jedes Teilchenbild berechnet. I war dabei die Amplitude der ange-

passten Gaußfunktion und ΔI die Standardabweichung der Intensität in einem Bildbereich ohne Fluoreszenzsignal. Die Daten wurden in einer Probentiefe von $500\ \mu\text{m}$ aufgenommen. Verwendet wurde ein 10x Luftimmersion-Objektiv ohne Strahlaufweitung. Die Anregungswellenlänge betrug $640\ \text{nm}$.

Um die Vergleichbarkeit der Daten mit unterschiedlichen Detektorbreiten zu gewährleisten, wurden die Belichtungszeiten bei einer Schlitzbreite kleiner als der Beleuchtungsstrahldurchmesser konstant gehalten. Dies führte zu einer längeren Rasterzeit, kompensierte jedoch die geringer werdende detektierte Intensität bei kleineren Schlitzbreiten.

War der Detektor gleich oder breiter als der Strahldurchmesser $2w_0$, so wurde die Belichtungszeit entsprechend erhöht. Verdoppelt sich zum Beispiel die Breite des Detektorschlitzes bei gleichbleibender Belichtungszeit, so verdoppelt sich auch die Geschwindigkeit des *Rolling Shutter*. Grund ist, dass ein *Rolling Shutter* mit einer Breite von N Zeilen auch N Zeilen während $t_{Bel.}$ überstreichen muss. Erhöht sich dessen Breite, erhöht sich auch die Zeilenzahl, die in dieser Zeit aktiviert und ausgelesen werden muss. Die aktive Region und somit der Strahl bewegen sich proportional zur Schlitzbreite schneller. Die Anpassung der Belichtungszeit gewährleistete, dass die Verweildauer der Strahlachse über jeder Pixelzeile auch bei breiteren Detektorschlitzen gleich blieb.

Abb. 5.11 **A** zeigt den Kontrast als Funktion der Breite des Detektionsschlitzes. Letzteres ist in Vielfachen des Strahldurchmessers $W_0 = 2w_0$ angegeben. Jeder Datenpunkt zeigt den über die unterschiedlichen Mikrokugeln gemittelten Wert und die Fehlerbalken dessen Standardabweichung. Mit *gesamt* wird der Fall bezeichnet, dass der gesamte Chip aktiv ist. Hier ist der Kontrast mit 0,6 am geringsten. Mit kleiner werdendem *Rolling Shutter* steigt der Kontrast und erreicht bei einer Breite von $2-4W_0$ einen maximalen Wert von etwa 0,85, also eine Verbesserung von fast 50 %. Die größeren Fehlerbalken bei größerem *Rolling Shutter* sind durch Zunahme des SRV zu erklären und sind ein weiteres Indiz für die schlechter werdende Bildqualität. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass die für die Analyse durchgeführte nichtlineare Kurvenanpassung weniger verlässliche Resultate lieferte.

Abb. 5.11 **B** zeigt das Ergebnis der Messung des Signal zu Rausch Verhältnisses (SRV) als Funktion von W_0 . Im konventionellen Fall betrug das SRV etwa 50 und steigt mit kleiner werdendem *Rolling Shutter* an. Es erreicht ein Maximum für W_0 zwischen 1 und 4 bei einem SRV von 200 Dies ist eine Verbesserung um das Vierfache.

Ein Grund hierfür ist der verbesserte Kontrast. Insbesondere wird jedoch die Zeit, in der ein Pixel aktiv ist aber kein spezifisches Fluoreszenzsignal detektiert, im konfokalen Modus signifikant verkürzt. Damit wird das Dunkelrauschen, das einen großen Anteil am Bildrauschen ausmacht, deutlich verringert.

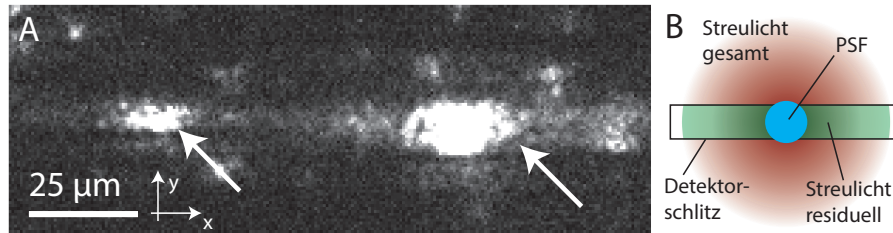


Abbildung 5.12: **A** Bilder von zwei fluoreszierenden Partikeln (Pfeile), vermutlich Aggregate von fluoreszierenden Mikrokugeln, aufgenommen mit einer Detektorschlitzbreite von 2 Pixeln und einer Belichtungszeit von 5 ms. Die Partikel erscheinen entlang der x -Richtung verschmiert. Dies ist auf Streulicht zurückzuführen, das parallel zum Schlitzdetektor einfällt. **B** veranschaulicht, wie dieser Effekt zustande kommt. Das gesamte Streulicht trifft auf den Detektor (rot) und überlagert das Bild des Teilchens, das durch die PSF bestimmt wird (blau). Der Schlitzdetektor (schwarzes Rechteck) filtert nun den Großteil des Streulichts heraus, so dass nur der grün markierte Bereich detektiert wird.

5.6.3 Residuelles Streulicht

Hier sei noch ein wichtiger Effekt erwähnt, der bei Verwendung eines besonders schmalen Detektionsschlitzes auftritt und zu einer in Beleuchtungsrichtung verzerrten Abbildung führen kann. Beispielhaft hierfür ist in Abb. 5.12 **A** ein vergrößerter Ausschnitt eines Bildes der Probe aus Abschn. 5.6.2 abgebildet. Das Bild wurde mit dem 10x, NA 0,3 Luftimmersionsobjektiv aufgenommen, wobei der Detektorschlitz mit einer Breite von 2 Pixeln sehr schmal eingestellt wurde. Zu sehen sind zwei besonders helle Teilchenaggregate (durch Pfeile markiert).

Die Bilder der Teilchen scheinen in x -Richtung verzerrt zu sein. Dies rührt vermutlich jedoch nicht von einer optischen Abberation des Systems, sondern von Streulicht, das sich parallel zum *Rolling Shutter* ausbreitet und deshalb detektiert wird. Abb. 5.12 **B** veranschaulicht das Zustandekommen dieses Effekts. Das ungestörte Bild eines punktförmigen Teilchens, welches durch ballistische Photonen erzeugt wird, ist in blau dargestellt und entspricht der PSF des Systems. Das auf den Detektor treffende Streulicht ist durch den roten Kreis dargestellt und würde zu einer kreisförmigen, isotropen Verwaschung der Abbildung führen. Durch den Detektionsschlitz wird ein Großteil des Streulichts blockiert. Ein restlicher Streulichtanteil, der sich in dem grün markierten Bereich befindet, wird nach wie vor detektiert und erzeugt die eindimensionale Verwaschung, die in **A** zu erkennen ist.

Kapitel 6

Biologische Anwendungen

Um die Vorteile der konfokalen Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskope gegenüber dem konventionellen LSM-Detektionsschema auch in der Anwendung zu demonstrieren, wurden drei unterschiedliche biologische Systeme untersucht. Das Erste ist ein Embryo-Mausgehirn, das durch Behandlung mit BABB (1:2 Benzyl Alkohol und Benzyl Benzoat) optisch homogenisiert wurde. Es wurde von Dr. Gabriela Oana Bodea, aus der Arbeitsgruppe von Dr. Sandra Blaess, Life & Brain Center, Universität Bonn, präpariert und uns zur Verfügung gestellt. Dieses biologische System wird in der Entwicklungsbiologie verwendet, um un-

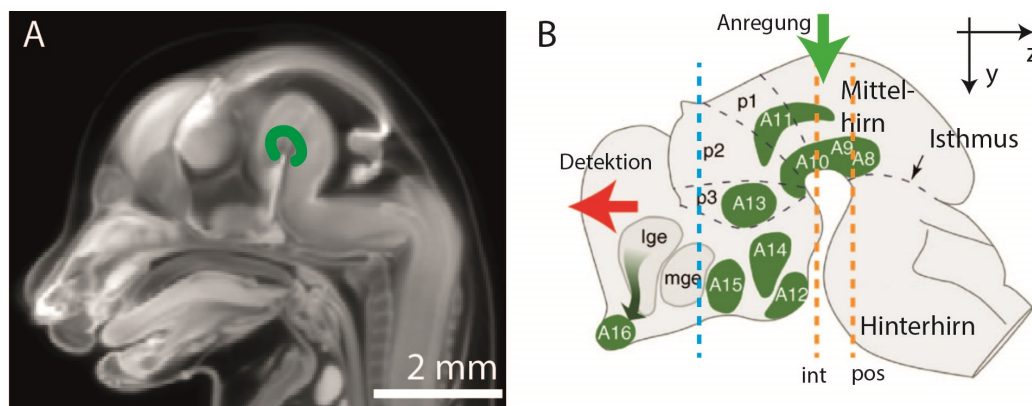


Abbildung 6.1: **A** Sagittale Mikro-CT Aufnahme des Kopfes eines Mausembryos im Embryonalstadium E 14.5. Das ventrale Mittelhirn mit dopaminergen Neuronen-Clustern ist in Grün markiert (modifiziert aus [WDW⁺ 12]). **B** Schematische Darstellung eines Mausembryo-Gehirns in sagittaler Ansicht. A1 - A16 bezeichnen Cluster dopaminergener Neuronen. Die in dieser Arbeit untersuchten Regionen sind A9 (Substantia Nigra, SN) und A10 (Area tegmentalis ventralis, ATV) ([BD07]). p1 - p 3 Prosomere 1-3. Der grüne Pfeil zeigt die Richtung aus der die Fluoreszenzanregung erfolgte, und der Rote die Richtung der Detektion. Um die Abbildungstiefe zu reduzieren wurde der Teil des Gehirns rostral von der gestrichelten Linie abgeschnitten. Die gestrichelte, orange Linie zeigt die in dieser Arbeit abgebildete Region.

ter anderem die Entwicklung von neuronalen Netzen zu untersuchen. Insbesondere ist die Entwicklung und Funktion von Netzwerken dopaminergener Neuronen von Interesse, die für

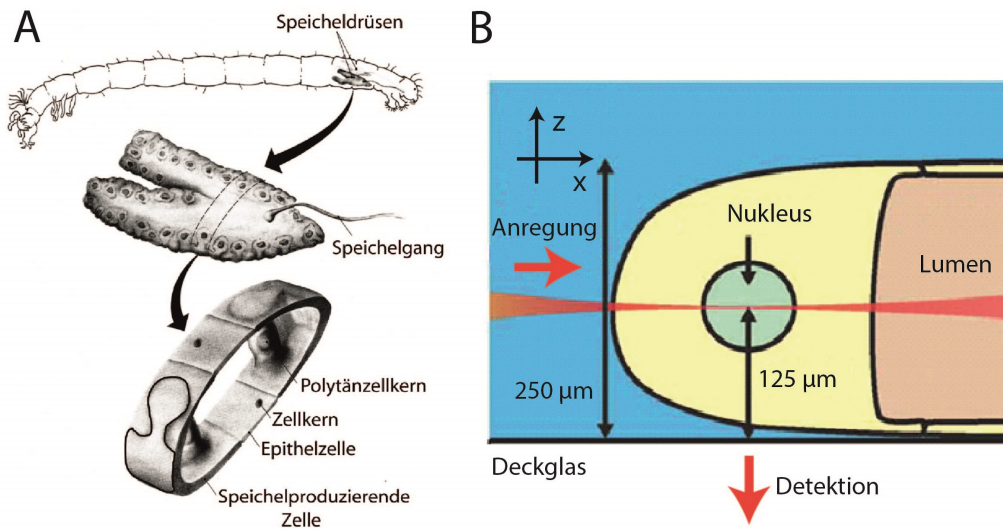


Abbildung 6.2: **A** Darstellung der *C. tentans* Larve und der Speicheldrüse. Eine Drüse besitzt etwa 10–20 Drüsenzellen. ([Wie94]), **B** Die Speicheldrüse wurde aus der Larve entnommen. Bei der Abbildung des Zellkerns blieb die Drüse intakt, so dass das Fluoreszenzlicht eine Strecke von rund 100 µm passieren musste ([RVV⁺10]).

Belohnungsverhalten und Kognition verantwortlich sind. Degeneration und Dysfunktion des dopaminergen Systems führen zu neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Schizophrenie und Morbus Alzheimer. Zur Veranschaulichung zeigt Abb. 6.1 **A** eine sagittale Mikro-CT Aufnahme eines Mausembryo-Kopfes am embryonischen Tag E14.5. In grün ist das ventrale Mittelhirn markiert, in dem sich die dopaminergen Neuronencluster der *Substantia Nigra* (SN) A9 und der *Area tegmentalis ventralis* (ATV) A10 befinden. Abb. 6.1 **B** zeigt einen schematischen, sagittalen Schnitt durch das Mausembryo-Gehirn. Die grünen Bereiche sind Regionen mit dopaminergen Neuronen. Diese Regionen wurden zuerst in [DF64] beschrieben und mit den Bezeichnungen A1 – A16 versehen.

Die zweite Probe war die Speicheldrüsenzelle von *Chironomus tentans* (dt. Zuckmücke), präpariert und zur Verfügung gestellt von Tim Kaminski. Im Larvenstadium besitzt diese eine Speicheldrüse mit einer Länge von 1,5 mm, einer Breite von 0,75 mm und einer Höhe von 0,15 mm. Die Drüse besteht aus 30–40 Zellen mit einem Durchmesser von bis zu 200 µm, die wiederum einen Zellkern mit einem Durchmesser von etwa 75 µm aufweisen ([Vei11]). Aufgrund Ihrer ausgedehnten Zellkerne sind diese Zellen ein prominentes Modellsystem zur Untersuchung der Dynamik von mRNA und eignen sich gut für die Fluoreszenzmikroskopie.

Die Polytäncchromosomen dieser Zellen bilden ein gut sichtbares Bandenmuster ([WG95]). Aus der Struktur des Bandenmusters kann auf den vorherrschenden Faltungszustand des DNA-Abschnitts geschlossen werden. So können optisch dichte Bereiche mit einer räumlich dichten Packung identifiziert werden in denen keine Transkription stattfindet. In anderen Bereichen liegt die DNA aufgefaltet vor. Diese sind die Orte mit aktiver Transkription.

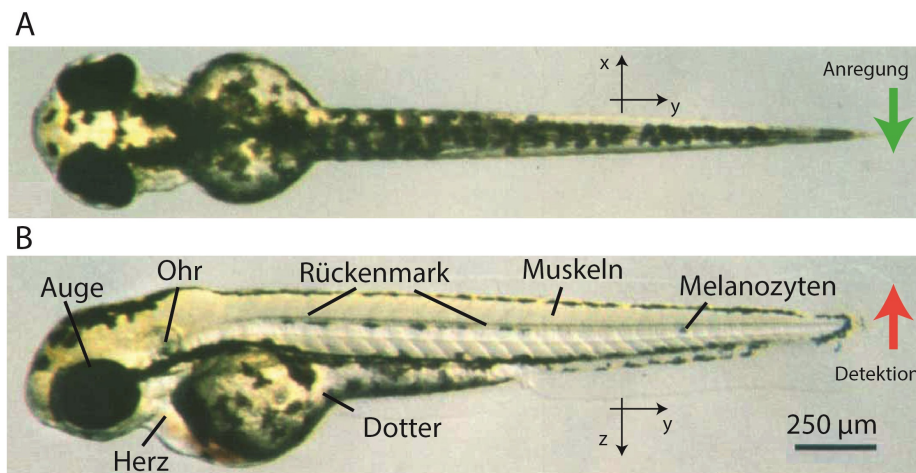


Abbildung 6.3: Durchlichtmikroskop-Aufnahme einer Zebrafischlarve zum Zeitpunkt 4dpf (engl. days post fertilization). **A** dorsal und **B** sagittal. In dieser Arbeit wurde der Bereich des Rückenmarkes abgebildet. Dazu wurde der Fisch in der Probenkammer auf dem Rücken positioniert. Die Fluoreszenzanregung erfolgte von der Seite (grüner Pfeil). Das Fluoreszenzlicht wurde aus dorsal detektiert. Modifiziert aus [KBK⁺95]

In der Speicheldrüsenzelle werden einige besonders große Proteine produziert, die ein Molekulargewicht von 1 bis 1,4MDa besitzen. Die aktiven Transkriptionsstellen der korrespondierenden Gene sind mit entsprechender Färbung besonders gut sichtbar und werden Balbiani Ringe genannt (kurz BR).

Als Dritte Probe wurden fixierte Zebraabärblingslarven (*Danio rerio*), im Laborjargon auch Zebrafisch genannt, untersucht (Abb. 6.3). Dieser ist ein in der Entwicklungsbiologie weit verbreiteter Vertebraten-Modellorganismus, da er sich mit einem Generationszyklus von 16 Wochen gut für genetische Studien eignet und die Embryonen sich komplett außerhalb des Mutterorganismus entwickeln. Zebrafischlarven sind zwischen 2 und 4 mm lang und aufgrund ihrer Transparenz für lichtmikroskopische Untersuchungen am lebenden Organismus besonders geeignet. Eine chemische Behandlung mit BABB oder ähnlich wirkender Substanzen zum Aufklaren der Probe, wie im Falle des Embryo-Mausgehirns, wäre bei lebenden Fischen natürlich nicht möglich. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Benjamin Odermatt am Anatomischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn sollte der Frage nachgegangen werden, ob und in welchem Maße ein Kontrastgewinn durch konfokale Zeilendetektion bei der Untersuchung der Myelinisierung von Axonen im Zentralnervensystem (ZNS) mit LSFM erzielt werden kann.

Myelin ist eine lipid- und proteinreiche Zellmembran und wächst ausgehend von den Oligodendrozyten, im Zentralnervensystem vorkommende Gliazellen, in Richtung der Axone. Dort bildet sie eine elektrisch isolierende Hülle um die Axone, deren Querschnitt mehrere konzentrische Lagen der Zellmembran aufweist. Dies ist die sog. Myelinscheide, welche eine schnelle Weiterleitung des Aktionspotentials im Axon ermöglicht (saltatorische Erregungs-

leitung). Wird diese Schutzhülle um die Nervenfasern beschädigt oder zerstört, kann es zu verschiedenen Erkrankungen kommen, wie zum Beispiel der Multiplen Sklerose aber auch vielen psychologischen Störungen.

Die untersuchte Probe wurde von Dr. Changsheng Liu, Anatomisches Institut, Universität Bonn, präpariert. Diese Probe wurde von der Seite beleuchtet, da der Fisch in dieser Richtung die geringste Ausdehnung besitzt, grüner Pfeil in Abb. 6.3 **A**. Die Detektion erfolgte dorsal, so dass sich möglichst wenig Muskelgewebe zwischen Rückgrat und Küvettenboden befand, angedeutet durch den roten Pfeil in Abb. 6.3 **B**.

6.1 Abbildung eines mit BABB behandelten Mausembryo–Gehirns

Die Ausdehnung eines Mausembryo–Gehirns liegt in der Größenordnung von Millimetern, weshalb es zu den klassischen Proben gehört, die mit Hilfe von LSFM untersucht werden ([DLS⁺07]). Für die Untersuchung wird das Gehirn in Paraformaldehyd (PFA) fixiert und kann mit BABB oder ähnlich wirkenden Substanzen optisch homogenisiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Aufnahmen des Bereiches des ventralen Mittelhirns eines solchen aufgeklärten Mausgehirns gemacht. Dies entspricht den Regionen A8, A9 und A10 in Abb. 6.1 **B**, in denen sich dopaminerge Neuronencluster befinden. Die Probe stammt von einer *ROSA^{loxP-STOP-loxP-EYFP}(R26^{EYFP})*–Maus ([SWL⁺01]). Diese wurde mittels *Genetic Induced Fate Mapping* (GIFM) so modifiziert, dass dopaminerge Neuronen, die aus Progenitorzellen (auch Vorläuferzellen genannt) in der Grundplatte des ventralen Mittelhirns entstanden, mit Hilfe des *R26^{EYFP}* Reporter–Allels fluoreszenzmarkiert wurden und kontinuierlich das fluoreszierende Protein EYFP produzierten. Diese Eigenschaft vererbten die Zellen an ihre Nachkommen weiter, so dass auch diese EYFP exprimierten. Mit GIFM können auf diese Weise selektiv nur die Vorläuferzellen von dopaminergen Neuronen modifiziert werden, die das Protein *Sonic hedgehog* (SHH) exprimieren ([BBK⁺11], [HZA⁺11], [JAR⁺09]). Die Aktivierung des EYFP–Reporterallels wird hierbei auch zeitlich mit Hilfe einer Cre–Rekombinase katalysierten Rekombination gesteuert. Zusammengefasst kann in einem bestimmten Entwicklungsstadium das EYFP–Reporterallel in SSH–exprimierenden Zellen aktiviert werden. Das Reporterallel wird an die Nachkommen dieser Zellen, die dopaminergen Neuronen, vererbt. Somit kann die Zellverteilung von dopaminergen Neuronen, die sich aus SHH exprimierenden Zellen in der medialen Grundplatte entwickelten, mittels EYFP–Expression direkt betrachtet werden. Für weitere Details zu GIFM sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen ([JZ06]). Genauere Details zur Probe und deren Präparation finden sich in [BSA⁺14]. Die verwendete Anregungswellenlänge für EYFP war 532 nm.

Weiterhin wurden Maus–Antikörper 1:500, AB152 oder MAB318, (Millipore) gegen Tyrosinhydroxylase (TH), einem limitierenden Enzym in der Dopaminsynthese, und donkey anti mouse IgG–Alexa 647 (1:100, Jackson ImmunoResearch) verwendet. Hierfür wurde eine Anregungswellenlänge von 640 nm benutzt.

Zunächst wurden z–Stapel in unterschiedlichen Bereichen der Probe aufgenommen. Da die Probe deutlich größer war als der gleichmäßig ausgeleuchtete Teil des Bildfeldes, wurde sie lateral in x und y verschoben, um ein dreidimensionales Mosaik–Bild zu erzeugen. Die Verschiebung in y war gleich der vertikalen Bildkantenlänge und in x gleich dem Zweifachen der Rayleigh–Länge. Das Mikroskop verfügte zum Zeitpunkt der Datennahme noch nicht über die Möglichkeit den Defokus bei Translation in x anzupassen. Der Defokus wurde deshalb erst nachträglich bei der Erstellung des Gesamtbildes korrigiert. Dazu wurden

entsprechende Regionen aus dem Bildstapel verschoben und ausgeschnitten.

Die Bildstapel wurden, beginnend am Deckglas bis in eine Tiefe von $600\ \mu\text{m}$ und in Schritten von $1\ \mu\text{m}$ aufgenommen.

Für die Detektion wurde das 10x–Luftobjektiv, NA 0,3, verwendet. Die Aufnahmen im konfokalen Modus erfolgten mit einer Detektorschlitzbreite von $9\ \mu\text{m}$, was dem zuvor in Kalibrationslösung gemessenen Strahldurchmesser entsprach. Für die Aufnahmen im konventionellen Modus wurde vor Beginn des Rasterns des Laserstrahls zunächst der gesamte Detektor aktiviert. Dies geschah, indem die Phase zwischen Kamerasignal und Rasterkurve auf 2048 Samplingpunkte gesetzt wurde.

Abb 6.4 zeigt einen Teil des Mausgehirns. Abgebildet wurden hier Probenbereiche, die in etwa den x–y–Ebenen an den Positionen der orangen, gestrichelten Linien *int* und *ant* in Abb. 6.1 **B** entsprechen.

Zu sehen sind mehrere Objektebenen, in der linken Spalte jeweils im konventionellen Modus aufgenommen und in der rechten Spalte im Konfokalen. *z* ist der Abstand der abgebildeten Objektebene zum Deckglasboden der Probenküvette. Gut zu erkennen sind große Ansammlungen von EYFP–exprimierenden Zellen (grün) in der Region der Grundplatte **A** im ventralen Mittelhirn. Daneben sieht man Zellansammlungen mit roter TH–Immunofluoreszenzfärbung im Bereich des *Aquaeductus mesencephali* **B**. Gut zu erkennen ist, dass der Kontrast in den Regionen **C–E** in den konfokalen Aufnahmen deutlich höher ist als in den Konventionellen. Letztere weisen hier ein höheres, diffuses Fluoreszenzsignal im grünen Kanal auf. Dieses rührt vermutlich von Streulicht her, dass durch den konfokalen Schlitzdetektor geblockt werden konnte, so dass nun auch rote, TH–markierte Zellen deutlicher zu erkennen sind.

Weiterhin wurde der Kontrast in Abhängigkeit der Abbildungstiefe quantifiziert, jeweils im konfokalen Modus mit schmalen Rolling Shutter und im konventionellen Modus bei komplett aktivem Chip. Hierzu wurde der Kontrast in unterschiedlichen Bereichen der Probe gemessen und pro Datenpunkt über jeweils 30 angrenzende Bilder entlang des Bildstapels gemittelt. Das Resultat ist in Abb. 6.5 zu sehen, wobei die Fehlerbalken gleich der Standardabweichung der gemittelten Messwerte sind. Bei geringer Abbildungstiefe unterhalb von $150\ \mu\text{m}$ ist der Kontrast im konventionellen Modus gleich dem im Konfokalen.

Bei tiefer liegenden Abbildungsebenen stieg jedoch der Anteil der gestreuten Photonen. Ab etwa $400\ \mu\text{m}$ Abbildungstiefe führte dies zu einer Verschlechterung des Kontrastes bei den konventionell aufgenommenen Bildern im Vergleich zu den Konfokalen.

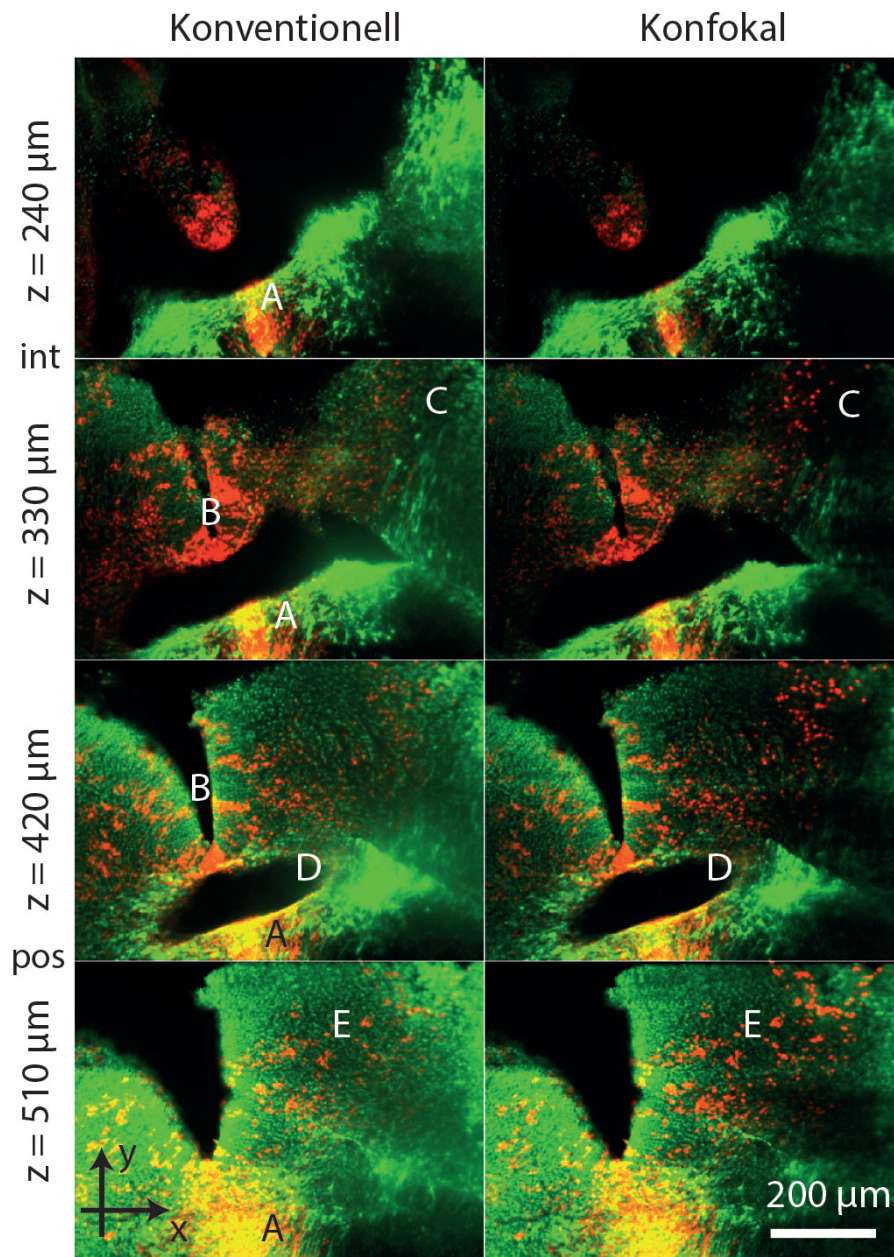


Abbildung 6.4: LSFM Aufnahmen des transparenten Mausgehirns bei unterschiedlichen Abständen z zwischen Deckglas und der abgebildeten Probenebene. Die ungefähren Positionen der gezeigten Gehirnschnitte sind mit *int* und *pos* oben im Bild und in Abb. 6.1 markiert. Der grüne Kanal zeigt EYFP und der rote TH. Die konfokalen Aufnahmen rechts erscheinen deutlich klarer als die Konventionellen. Gut zu erkennen ist die Grundplatte **A**, mit einer hohen Konzentration an EYFP. Dies deutet darauf hin, dass es der Entstehungsort dopaminergener Neuronen ist. Die Region **B** zeigt Zellcluster mit einer hohen TH-Aktivität, die aus der Dopaminsynthese herrührt. **C**, **D** und **E** markieren Regionen mit im Vergleich zu den konventionellen Aufnahmen deutlich verringertem unspezifischen Hintergrund und besserem Kontrast.

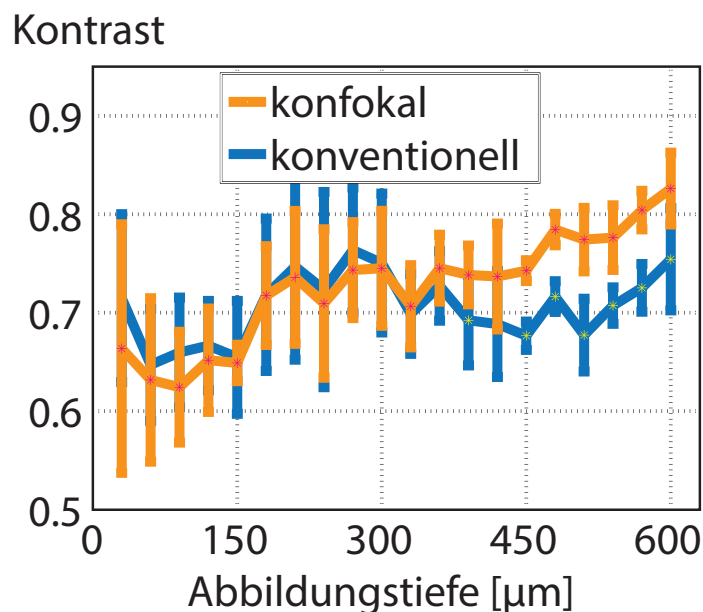


Abbildung 6.5: Messung des Kontrastes in einem mit BABB behandelten fixierten Mausgehirn. Beginnend am Deckglas bis in eine Tiefe von $600\ \mu\text{m}$ wurde der Kontrast schrittweise bestimmt. Jeder Datenpunkt steht hierbei für den gemittelten Kontrast eines $30\ \mu\text{m}$ dicken Volumens. Die orange Kurve zeigt das Ergebnis für die konfokale Methode und die blaue für die konventionelle Detektion bei vollständig aktiver Kamera.

Durch die Behandlung mit BABB wurde die Probe optisch homogenisiert und somit transparent. Hierdurch wurde der Streukoeffizient der Probe signifikant verringert und eine deutlich erhöhte Abbildungstiefe ermöglicht. Nahe am Deckglas erschien der Kontrast im konventionell aufgenommenen Bild etwas besser zu sein als im konfokalen Datensatz. Dies liegt daran, dass bei geringer Abbildungstiefe nur wenige Photonen gestreut werden. Durch die konfokale Detektion werden somit größtenteils ballistische Photonen blockiert, was den etwas schlechteren Kontrast erklären würde. Der stetige Anstieg der beiden Kontrastkurven mit zunehmender Tiefe ist dadurch zu erklären, dass hier Gehirnregionen wie die Grundplatte des ventralen Mittelhirns lagen, in der sich eine große Anzahl dopaminergere, EYFP-exprimierender Zellen befand. Dies verdeutlicht auch, dass bei einem Vergleich von komplexen Bildern der Kontrast unmittelbar von der Konzentration der Fluorophore und deren räumlichen Verteilung abhängt.

Ab einer Abbildungstiefe von etwa $300\ \mu\text{m}$ ändert sich jedoch die Situation. Der Kontrast der konfokalen Daten verbesserte sich nun gegenüber den Konventionellen. Grund hierfür war die mit einer höheren Weglänge nun gestiegene Wahrscheinlichkeit, dass Fluoreszenzphotonen gestreut wurden. Im konfokalen Bild wurde somit ein Großteil der gestreuten Photonen blockiert. Des Weiteren ist eine Fluktuation der Kontrastkurven zu sehen, die bei beiden sehr ähnlich ist. Dies ist auf eine Veränderung des Kontrastes der Strukturen in der Probe zurückzuführen.

6.2 Abbildung der Polytänchromosomen im Kern der *C. tentans* Speicheldrüsenzelle

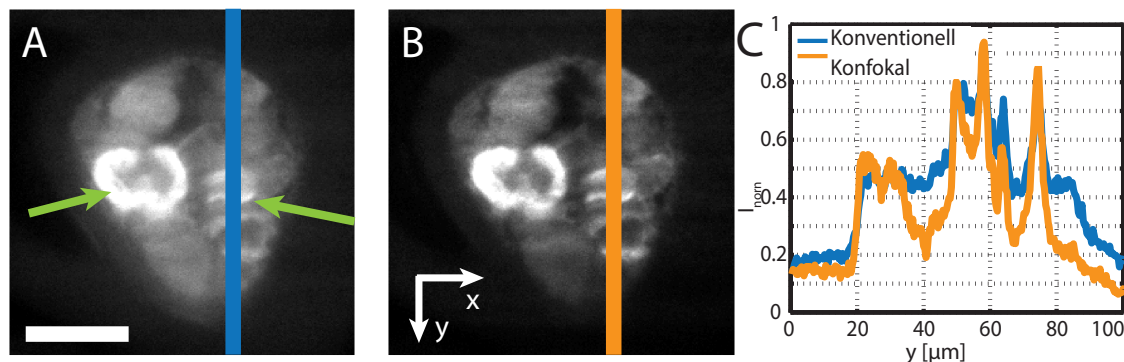


Abbildung 6.6: Polytänchromosomen aufgenommen mit dem 10x Objektiv, NA 0,3, Luft. Gut zu erkennen ist die hohe Konzentration an RNA-Polymerase II in den durch die Pfeile markierten Transkriptionsstellen. Besonders hell ist der Balbiani Ring. **A** aufgenommen im konventioneller Modus und **B** im Konfokalen. Die normierten Intensitätsplots in **C** demonstrieren die Kontrastverbesserung. Skala 30 µm. Hamamatsu Orca Flash 2.8. Abbildung modifiziert aus [BK12].

Verglichen wurde nun die Verbesserung des Kontrastes anhand der Abbildung der Polytänchromosomen der *C. tentans* Speicheldrüsenzelle. Aufgrund ihrer feinen Struktur bieten diese ein ideales Objekt zur Untersuchung des Kontrastes und des Auflösungsvermögens. Die Drüsenzellen wurden in 4% Formaldehydlösung fixiert. Die Transkriptionsstellen entlang der Polytänchromosomen wurden mit monoklonalen Mausantikörpern ARNA-3 CBL221 (Millipore) gegen RNA-Polymerase II als primärer und Alexa Fluor 647 markiertem goat anti-mouse IgG1 (Life Technologies Corp.) als sekundärer Antikörper markiert. Abb. 6.6 zeigt eine Aufnahme durch den Äquator des Zellkerns und die Transkriptionsstellen, die mit Pfeilen markiert sind.

In **A** ist die konventionelle Aufnahme zu sehen und in **B** die Konfokale. Die aktive Detektorbreite betrug im konfokalen Falle 25 Pixel. Dies entsprach dem vorher gemessenen Strahldurchmesser von 9 µm. In **C** ist die normierte Intensitätskurve entlang der in den Bildern markierten Spalten abgebildet. Die normierte Kurve zeigt $I_{norm}(y) = I(y)/(I_{max} + I_{min})$, so dass die Differenz zwischen einem lokalen Minimum und einem lokalen Maximum in der Kurve dem nach Glg. 2.29 definiertem Kontrast entspricht. Die lokale Verbesserung des Kontrastes betrug in diesem Falle etwa 30 %.

Bei der Orca Flash 2.8 war die Zeilenzeit nicht einstellbar, sondern fest auf 15 µs gesetzt. Um eine Schlitzbreite von 25 Pixeln zu erreichen, musste die Belichtungszeit somit auf 25-fache der Zeilenzeit, also 375 µs, gesetzt werden. Für die Aufnahmen mit Weitfelddetektion wurde die Belichtungszeit auf 21,6 ms gesetzt, was einem Rolling Shutter mit einer Breite von 1440 Zeilen (voller Kameradetektor) entsprach. Der Scan des Anregungsstrahls begann nach der Aktivierung der Hälfte der Zeilen. Dies bedeutet jedoch, dass sich das SRV im

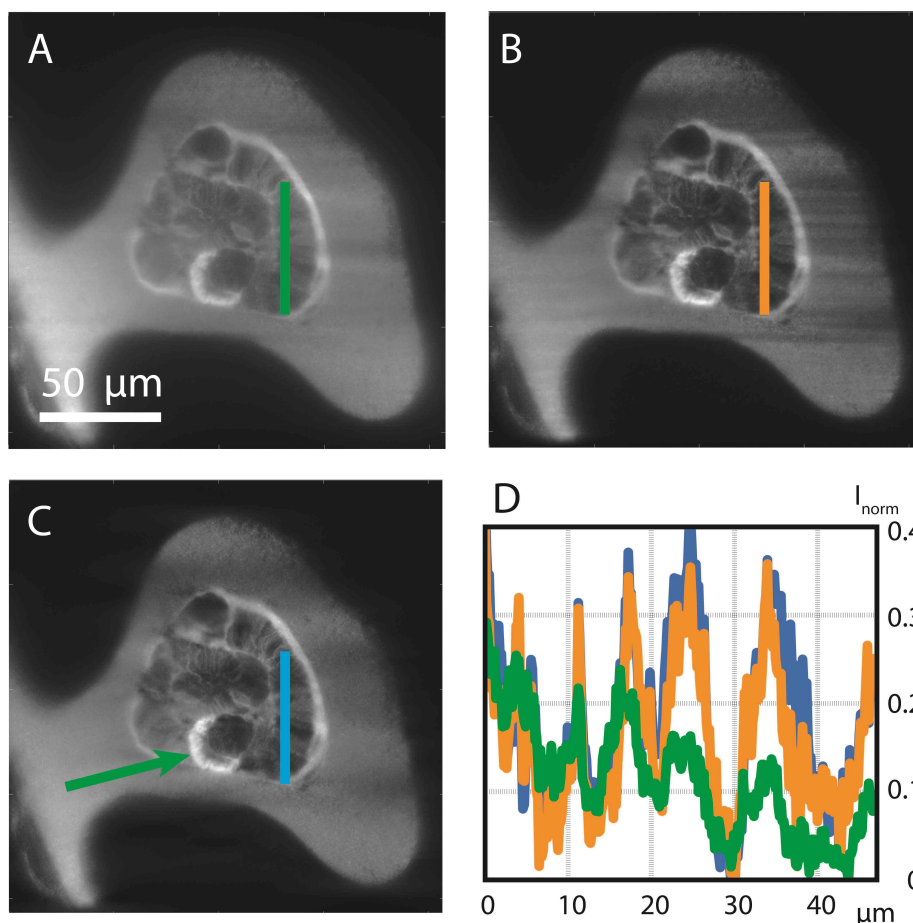


Abbildung 6.7: Polytäanchrosomen aufgenommen mit dem 40x, NA 1,15, Wasserimmersionsobjektiv und aufgeweitetem Beleuchtungsstrahl. **A** konventioneller Modus, **B** mit konfokalem Rolling Shutter. Der Kontrast im konfokalen Bild ist deutlich erhöht. Auffallend ist der deutlich geringere Hintergrund zwischen den einzelnen Chromosom-Banden. Das Entfernen des Streulichts im konfokalen Modus macht auch die Schatten und Streifenartefakte deutlicher sichtbar. Diese konnten in **C** mit einem entsprechenden Filter [MTMS09] reduziert werden, wobei hierdurch keine neuen Artefakte auftraten. Die normierten Intensitätsplots in **D** zeigen die Kontrastverbesserung im Original als auch in der gefilterten Version. Die Anregungswellenlänge betrug 532 nm. Bei Anregung mit 640 nm (hier nicht gezeigt) war nur die BR2.1-mRNA im Balbiani Ring (Pfeil) zu sehen. Kamera: Orca Flash 4.0.

konventionellen Fall durch die höhere Belichtungszeit erhöht. Vermutlich wird dies jedoch durch das nun auch höhere Dunkelrauschen, das in Abschn. 5.6.2 gemessen und diskutiert wurde, ausgeglichen.

Abb. 6.7 zeigt die Polytäanchrosomen entlang des Äquators des Zellkerns, die mit dem 40x, NA 1,15 Wasserimmersionsobjektiv aufgenommen wurden, **A** zeigt die konventionelle und **B** die konfokale Aufnahme. Die Breite des Schlitzdetektors bei der konfokalen Aufnahme betrug 31 Pixel, $\approx 1/e^2$ Strahldurchmesser von $2,8 \mu\text{m}$. Die Belichtungszeit im konfokalen Fall betrug 0,6 ms und 20 ms im Konventionellen. Hier wurde das Teleskop verwendet, um die Apertur des Beleuchtungsstrahl zu vergrößern. Bei der Probe wurde Mausantikörper

(1:100, Merck–Millipore) gegen RNAP–II als primärer und Goat–Anti Mouse IgG1 AF532 (Initrogen) als sekundärer Antikörper verwendet. Zusätzlich ist noch die BR2.1 mRNA mit einem AF647 markierten Oligonukleotid gefärbt.

Die normierten Intensitätswerte in **D** zeigen einen zum Teil mehr als doppelt so großen Kontrast zwischen den Banden der Chromosomen. Deutlicher treten in den konfokalen Daten nun allerdings auch die Schatten und Streifenartefakte hervor. Bei der konventionellen Aufnahmemethode werden diese allerdings durch das diffuse Signal des Streulichts nur kaschiert.

Das Eliminieren der Streifen durch Kippen des Beleuchtungsstrahls um die z –Achse während des Scans wie in [HS07] würde gegen die Bedingung, dass Beleuchtung und Detektion gleichermaßen räumlich eingeschränkt und entsprechend konjugiert zueinander sein müssen, verstoßen. Eine Alternative ist die Nachbearbeitung der Bilddaten mit passenden Filteralgorithmen. So konnten mit Hilfe eines Wavelet–Fourier–Filters ([MTMS09]) die Streifen deutlich reduziert werden, ohne zusätzliche Artefakte hinzuzufügen, Abb. 6.7 **C**.

6.3 Abbildung der Myelinisierung von Zebrafisch-Axonen durch Oligodendrozyten

Axone sind die Zellfortsätze der Neuronen, die elektrische Nervenimpulse (Aktionspotentiale) vom Zellkörper weg leiten. Sie sind von einer isolierenden Schicht aus Myelin umgeben, die um die Axone gewickelt ist. Stellen an denen die Myelinscheide unterbrochen ist, die sog. Ranvierschen Schnürringe, sind wichtig für die schnelle Saltatorische Erregungsleitung der Aktionspotentiale (Abb. 6.8 A).

Die Myelinschicht wird von Oligodendrozyten gebildet. Spezialisierte Membranfortsätze an den Oligodendrozyten wachsen in Richtung der Axone aus und bilden dort eine Myelinscheide, bei der die Oligodendrozyten-Zellmembran das Axon mehrmals konzentrisch umgibt. Die Axone haben einen axialen Durchmesser von etwa $1\ \mu\text{m}$.

Abb. 6.8 B zeigt zwei Oligodendrozyten (grüne Pfeile), aufgenommen mit einem konfokalen Zwei-Photonen-Mikroskop. Zu erkennen sind die zellulären Fortsätze (roter Pfeil), die aus dem Zellkörper um mehrere Axone wachsen. Der Zellkörper und die Myelinmembran sind mittels mbp:GFP Expressions-Plasmid markiert. Der verwendete Promotor ist von MBP (engl. *myelin basic protein*) welches ein Myelinspezifisches Protein ist und dort etwa 40% des Proteinanteils ausmacht. Die Myelinscheiden im Bild sind im Zentrum entlang ihrer Hauptachse dunkel. Hier liegt das Axon, welches nicht fluoreszenzmarkiert ist.

Die in diesem Fall zu untersuchende Mye-

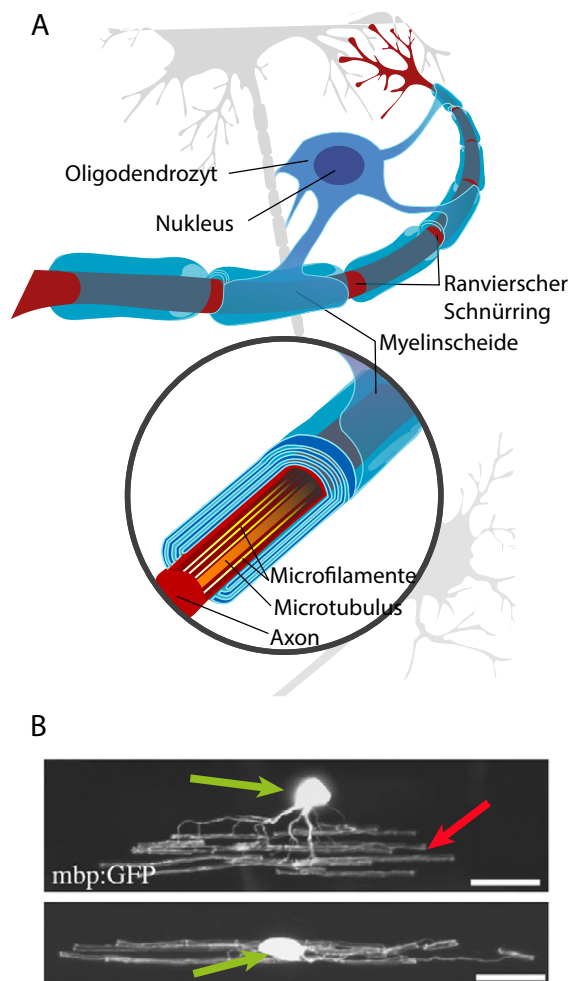


Abbildung 6.8: **A** Ein Axon (rot) ist von einer Myelinscheide umgeben. Diese wachsen aus Fortsätzen von Oligodendrozyten. Die freien Abschnitte zwischen den Myelinscheiden werden Ranviersche Schnürringe genannt und dienen der schnellen Übertragung des Aktionspotentials. Quelle: [Com10].

B Aufnahme eines Oligodendrozyten mittels konfokaler Zwei-Photonen-Mikroskopie, aus [ACL+ 11]. Fortsätze wachsen aus dem Zellkörper des Oligodendrozyten und myelinisieren mehrere Axone. Skala: $10\ \mu\text{m}$.

linisierung beginnt im *Rhombencephalon*, dem an das Rückenmark grenzenden Teil des Gehirns, und verläuft entlang der Wirbelsäule ([YM05], [BMAF10]). Diese liegt teilweise in einer Tiefe von über 100 μm im Zebrafisch. Die Notwendigkeit Strukturen in der Größenordnung von 1 μm und darunter in dieser Probentiefe abzubilden, bei der der Anteil des gestreuten Lichts einen signifikanten Bildhintergrund verursacht, ist somit eine herausfordernde Anwendung für Lichtscheibenmikroskopie mit konfokaler Detektion.

Probenpräparation

Zebrafische mit Mosaik–Expression von EGFP in Oligodendrozyten wurden durch Injektion von Plasmid–DNS (*pB I-SceI ClaudinK:EGFP*) erzeugt. Dieses wurde in das Zytoplasma der Fisch–Zygoten injiziert. Am folgenden Tag wurden die Fischembryos in 30 % Danieau Lösung, welche 0,2 nM Phenylthiourea (PTU) enthielt, transferiert, um die Synthese von Melanin zu unterbinden, so dass die Fische pigmentfrei waren. Des Weiteren wurde der lipophile Farbstoff DiD in das Rückenmark injiziert, um die Axonmembranen zu markieren. Zusätzlich wurden transient exprimierende Fischlarven verwendet, die durch Injektion von *pB I-SceI ClaudinK:EGFP* und *pB I-SceI ClaudinK:membrane tag RFPT* generiert wurden. *Membrane tag RFPT* markiert die Membran aus der die Myelinscheiden bestehen und reichert sich dort an.

Zum Abbilden der Fischlarven wurden diese an Tag 5 nach der Befruchtung (5 dpf) mit einer Überdosis Tricain (MS222) abgetötet, in PFA fixiert und am Rand der Probenküvette auf den Rücken gelegt, so dass das Rückenmark möglichst zum Deckglasboden hin ausgerichtet war. Daraufhin wurden die Fische in ein Agarosegel (Type IX-A, Ultra-low Gelling Temperature, Sigma-Aldrich Co.) mit einer Konzentration von 1,2 % in PBS eingebettet und in ihrer Lage stabilisiert.

6.3.1 Vergleich von konventioneller und konfokaler Detektion

Abb. 6.9 zeigt Maximumprojektionen von dreidimensionalen Aufnahmen eines Zebrafisches, vom Kopf bis zum Dottersack, mit 10x Vergrößerung. Die Beleuchtung erfolgte mit kleiner Apertur, in der Abbildung von oben kommend. Pro Abbildung wurde zunächst ein Volumen von 300 μm Dicke in z–Richtung in 150 Bildern mit einer Schrittweite von 2 μm abgebildet und davon die Maximumprojektion (Fiji) berechnet. Die resultierenden Bilder wurden daraufhin in gleichem Maße kontrastverstärkt.

Durch die große Abbildungstiefe ist im konventionell aufgenommenen Bild, Abb. 6.9 **A**, die Region im Kopf von einer diffusen Intensitätsverteilung verdeckt. Dieser Probenteil ist am dicksten und hat somit den größten Streulichtanteil. In Abb. 6.9 **B**, das mit einem konfokalen Schlitz von 20 μm Breite aufgenommen wurde, ist das Streulicht deutlich reduziert. Details wie das Muskelgewebe **1** und das optische Tectum **2** oberhalb der beiden Augen

sind nun deutlich zu erkennen. Die hellen Punkte, die sich am hinteren Teil des Kopfes und entlang der Wirbelsäule befinden, sind Zellkörper der eGFP markierten Oligodendrozyten.

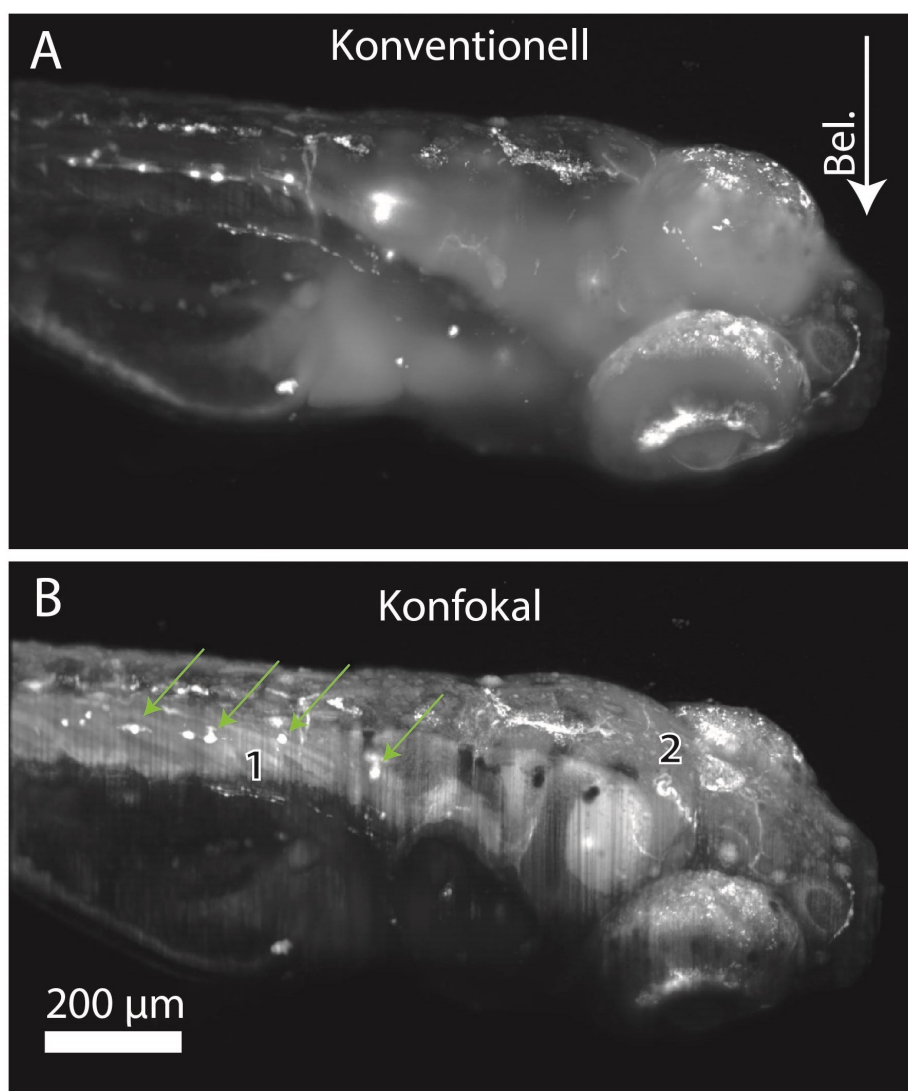


Abbildung 6.9: Maximumsprojektion durch einen z–Stapel aus 150 Bildern mit einer Dicke von insgesamt $300\ \mu\text{m}$. **A**: Detektorbreite 600 px, Belichtungszeit 800 ms, entspricht konventioneller Weitfelddetektion. **B**: Konfokale Aufnahme mit einer Detektorbreite von 20 ms. Insbesondere in zentralen Bereichen des Fisches wird ein großer Teil der Fluoreszenzphotonen gestreut. In der konventionell aufgenommenen Abbildung sind diese Bereiche durch ein unspezifisches, homogenes Fluoreszenzsignal verdeckt. Das konfokale Bild bietet dahingegen einen klaren Blick auf die Muskelfasern (1) und das optische Tectum (2). Die Pfeile markieren Oligodendrozyten.

Probe: ClaudinK:EGFP Mosaik Expression. Anregung: 488 nm, ohne Strahlaufweitung. Detektion: GFP–Filterwürfel, 10x NA 0,3, Luftobjektiv. Die verwendete Breite des Rolling Shutters bei den konventionellen Bildern betrug 600 Pixel und bei den Konfokalen 15 Pixel ($9,75\ \mu\text{m}$) .

6.3.2 Kontrast als Funktion der Abbildungstiefe

Wie in Abschn. 6.1 wurde hier nun auch der Abbildungs­kontrast bei unterschiedlichen Tiefen in der Probe gemessen. Da der Zebrafisch nicht mit BABB oder einer ähnlichen Substanz behandelt wurde, ist zu erwarten, dass der Streulichtanteil deutlich schneller mit zunehmender Abbildungstiefe ansteigt als im Fall des Mausgehirns.

Abb. 6.10 stellt den Bildkontrast als Funktion der Abbildungstiefe dar. Die Analyse erfolgte analog zu der in Abschnitt 6.1. Hierzu wurde ein dreidimensionaler Datensatz aufgenommen, der an der Unterseite des Fisches beginnt und bis in eine Probentiefe von $100\ \mu\text{m}$ reicht. Der Fisch berührte den Deckglasboden nicht, weshalb zunächst die Haut des Fischrückens fokussiert werden konnte und als Nullpunkt der Messung diente. Der Kontrast wurde im zentralen Bereich der Bilder zeilenweise gemessen und über jeweils zehn aufeinander folgende Bilder gemittelt. Die Bildregionen wurden des Weiteren auch so ausgewählt, dass sie möglichst kontrastreiche Teile der Probe enthielten. Der Kontrast wurde entlang der Zeilen gemessen, quer zu den Axonen bzw. Myelinscheiden, die senkrecht im Bild verliefen.

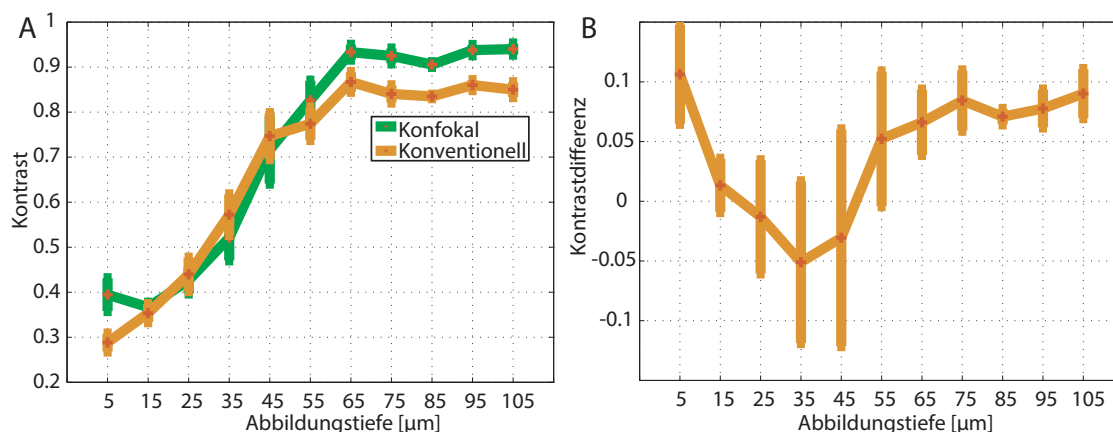


Abbildung 6.10: A: Kontrast als Funktion der Abbildungstiefe im Zebrafisch. Konfokale Aufnahme mit einer Schlitzbreite von 15 Pixeln. Konventionelle Aufnahme mit vollständig aktiviertem Detektor. Ab einer Abbildungstiefe von etwa $50\ \mu\text{m}$ nimmt der Bildkontrast der konfokalen Daten im Vergleich zur der konventionellen Aufnahme zu. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Messwerte. B: Differenz des Kontrastes zwischen konfokalen und konventionellen Daten. Verwendete Probe: Transgene Zebrafisch–Linie mit ClaudinK:EGFP. Anregung: 488 nm, mit Strahl­aufweitung. Detektion: GFP– Filterwürfel, 20x NA 0,5, Luft. Die Rolling Shutter Breite der konventionellen Bilder betrug 2048 Pixel (gesamter Sensor) und 15 Pixel ($4,875\ \mu\text{m}$) der Konfokalen.

Abb. 6.10 A: Nahe der Haut des Fisches ist der Kontrast bei konventionellen und konfokalen Bildern in etwa gleich. Da hier die Autofluoreszenz des Muskelgewebes dominiert, ist der Kontrast allgemein recht niedrig. Ab einer Abbildungstiefe von etwa $50\ \mu\text{m}$ verbessert sich der Kontrast der konfokalen Daten gegenüber den konventionellen Daten. Bei einer Abbildungstiefe von etwa $100\ \mu\text{m}$ ist der Kontrast im konfokalen Fall etwa 10 % besser gegenüber den konventionellen Daten. Abb. 6.10 B zeigt die Differenz zwischen den kon-

fokalen und dem konventionellen Daten. Dies verdeutlicht noch einmal die Zunahme des konfokalen Kontrastes gegenüber dem Konventionellen ab einer Abbildungstiefe von etwa 40 bis 50 μm .

Abb. 6.11 gibt eine Übersicht der an Zebrafischlarve aufgenommenen Daten. 6.11 **A** zeigt eine Übersichtsaufnahme an einem transgenen *ClaudinK:EGFP* Fisch. Die Beleuchtung erfolgte hier von links. In grün sieht man die Zellkörper der Oligodendrozyten entlang der Wirbelsäule (weiße Pfeile). In rot sind die Neuronen markiert. Das Bild zeigt eine Maximumprojektion eines Bildmosaiks, mit einer z -Ausdehnung von 400 μm . Dieses wurde aus vier Bildstapeln rekonstruiert, die nacheinander aufgenommen wurden. Zwischen den Aufnahmen wurde die Probe in y verschoben.

Abb. 6.11 **B** und **C** zeigen Detailaufnahmen, deren Bildfeld der dem weißen Rechteck in **A** entspricht. Hier handelt es sich jeweils um eine konventionelle (**B**) und eine konfokale (**C**) Aufnahme von Oligodendrozyten und Myelinscheiden im Rückenmark, bei einer Probentiefe von 50 μm . Die Bilder entstanden durch eine Maximumprojektion eines 10 μm dicken Subvolumens aus zehn Bildern.

Abb. 6.11 **D** zeigt auf $I_{norm} = I/(I_{max} + I_{min})$ normierte Intensitätskurven entlang der Linien in den Bildern. Der Kontrast im konfokalen Bild ist deutlich besser. Die Intensitätskurve zeigte mehrere Maxima in einem Abstand von etwa 1 bis 2 μm . Diese könnten von einzelnen Myelinscheiden stammen. Im konventionellen Bild sind diese deutlich schlechter voneinander zu unterscheiden.

Analog werden in Abb. 6.11 **E** bis **G** Daten verglichen, die im selben Fisch aber bei einer Tiefe von 100 μm aufgenommen wurden. Hier nimmt der Kontrast im Vergleich zu den Bildern **B** und **C** ab, ist im konfokalen Falle jedoch noch immer deutlich besser. Auch hier sind noch einzelne Myelinscheiden voneinander gut zu trennen, was bei den konventionellen Daten kaum mehr möglich ist.

Abb. 6.12 zeigt stereoskopische Bilder eines Ausschnitts der Wirbelsäule eines Zebrafisches. Es handelt sich hierbei um einen dreidimensionalen Datensatz, der im konfokalen Modus aufgenommen wurde. Jede Teilabbildung A bis D besteht aus einem Bild einer dreidimensionalen Rekonstruktion, gesehen aus unterschiedlichen Blickrichtungen. Die Bildpaare sind jeweils untereinander um zwei Grad gedreht.

Zu sehen sind drei Myelinscheiden in rot, die Nervenstränge (nicht sichtbar) umfassen. Um diese herum befinden sich wiederum die grünen Oligodendrozyten. Der mittlere Strang ist am nächsten zum Objektiv. Hier ist deutlich eine faserartige Struktur der Myelinscheiden zu erkennen.

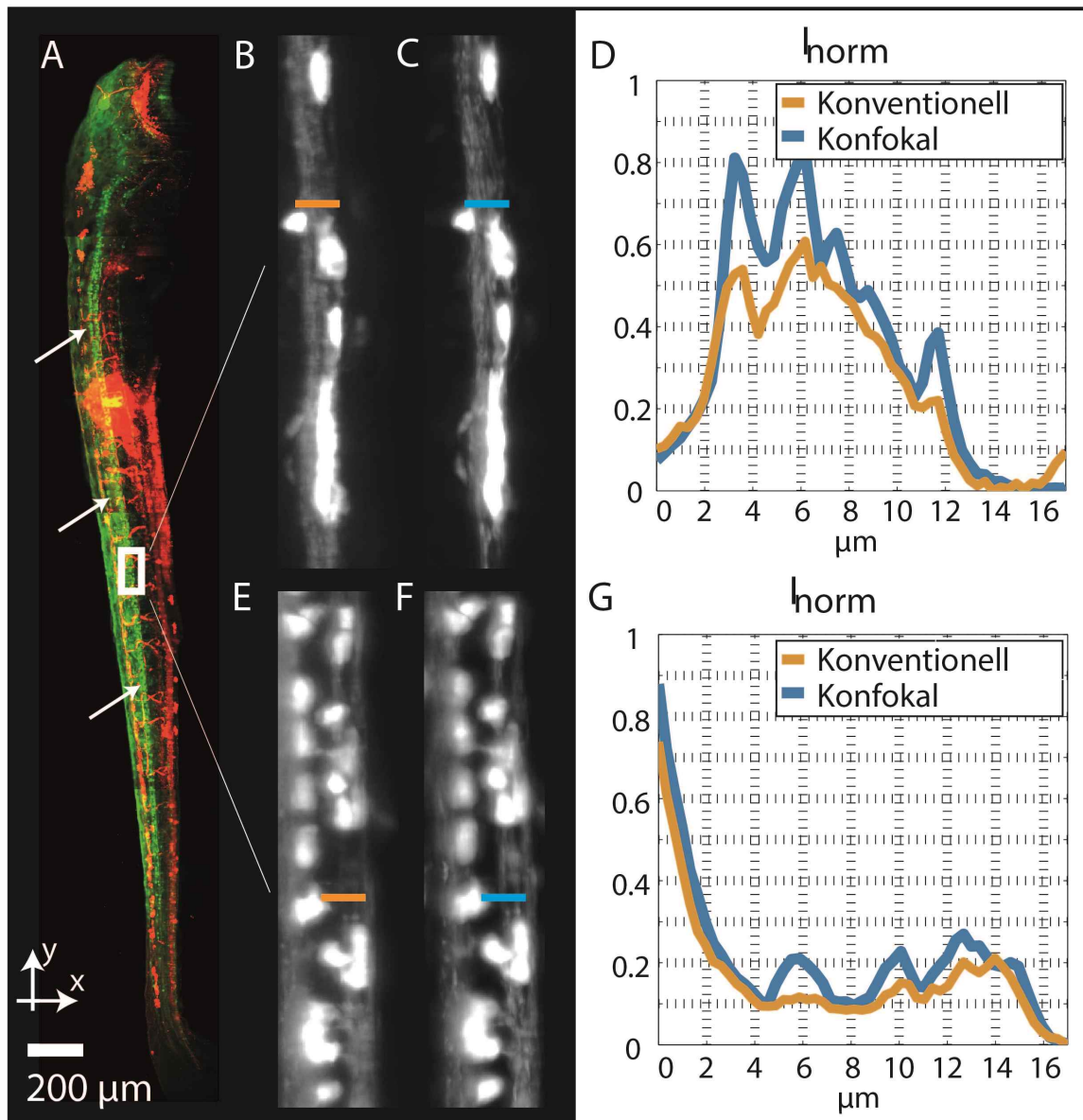


Abbildung 6.11: Beispiel für die am Zebrafisch aufgenommenen Bilder und Vergleich zwischen konventionellen und konfokalen Daten. A: Übersichtsaufnahme im konfokalen Modus, Schlitzbreite 10 Px. ($6,5 \mu\text{m}$). Maximumsprojektion eines $400 \mu\text{m}$ dicken Bildvolumens. In grün sind die Zellkörper der Oligodendrozyten als Punkte entlang der Wirbelsäule zu erkennen (weiße Pfeile). Rot sind die mit DiD markierten Axone. B und C: Oligodendrozyten und Myelinscheiden, jeweils im konventionellen und im konfokalen Modus aufgenommen, bei einer Probentiefe von $50 \mu\text{m}$. D: Normierte Intensitätskurven entlang der Linien in B und C. E, F und G: Analog zu den Abbildungen darüber, aber bei einer Probentiefe von $100 \mu\text{m}$. Beleuchtung von links.

Probe in A: Transgene ClaudinK:EGFP Linie und DiD Injektion. Anregung: 488 nm und 648 nm, ohne Strahlaufweitung. Detektion: Notch Filter für die Anregungswellenlängen, $10\times$ NA 0,3. Die Rolling Shutter Breite betrug 10 Pixel ($6,5 \mu\text{m}$), die Belichtungszeit 1 ms.

Probe in B–F: ClaudinK:EGFP. Anregung: 488 nm, mit Strahlaufweitung. Detektion: GFP-Filterwürfel, $20\times$ NA 0,5, Luft. Die Rolling Shutter Breite der konventionellen Bilder betrug 2048 Pixel (gesamter Sensor) und 15 Pixel ($4,875 \mu\text{m}$) der Konfokalen. Belichtungszeit 10 ms beim Konfokalen und 136,5 ms im konventionellen Bild.

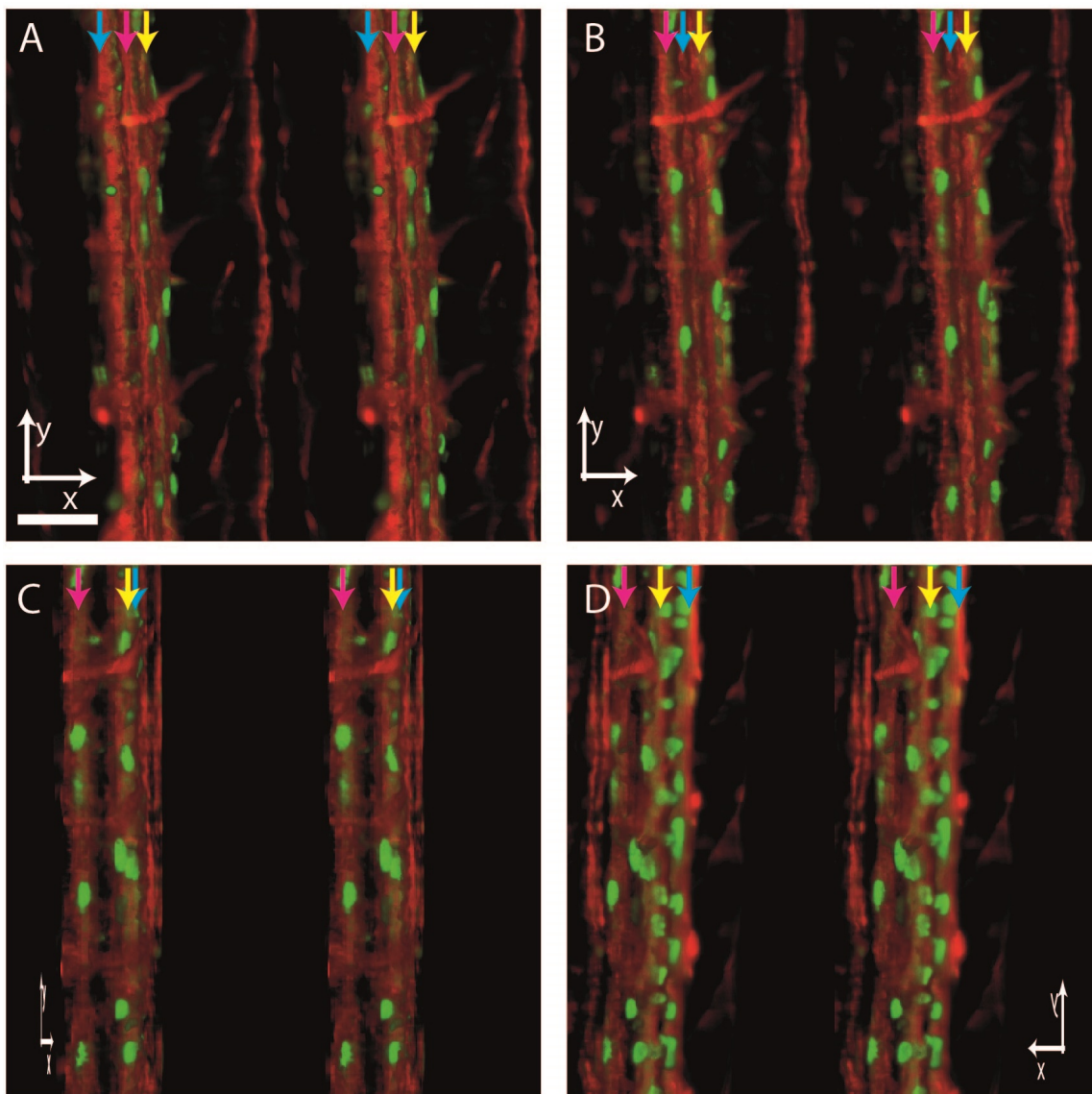


Abbildung 6.12: Dreidimensionale Abbildung eines Teils der Zebrafischwirbelsäule. Zu sehen sind die Zellkörper der Oligodendrozyten in grün. Rot gefärbt sind drei Myelinscheiden die entlang jeweils eines Axons in y -Richtung verlaufen. Diese sind durch die drei farbigen Pfeile markiert. Jedes Bildpaar ist ein stereoskopisches Bild, das aus einer 3D-Rekonstruktion erzeugte wurde. Die einzelnen Abbildungen eines Bildpaares sind jeweils zwei Grad um die y -Achse gedreht, um bei Betrachtung mittels Kreuzblick einen räumlichen Eindruck zu erzeugen. Zwischen den Stereobildpaaren wurde der Datensatz um die hier gezeigt y -Achse in Schritten von 40 Grad rotiert, um unterschiedliche Ansichten zu erlauben. Die Gesamtrotation beträgt bei den einzelnen Unterabbildungen demnach: **A**: 0 Grad, **B**: 40 Grad, **C**: 80 Grad und **D**: 120. Die drei Pfeile oben gehören jeweils fest zu einer Myelinscheide und dienen der leichteren Zuordnung der Axone zwischen den Bildern **A** bis **D**. Skala 50 μm .

Probe: ClaudinK:EGFP und ClaudinK:membrane tag RFPT. Anregung: 488 nm, 532 nm mit Strahl-aufweitung. Detektion: GFP-Filterwürfel und RFP-Filterwürfel, Obj. 20x NA 0,5, Luft. Die Rolling Shutter Breite der konventionellen Bilder betrug 2048 Pixel (gesamter Sensor) und 15 Pixel (4,875 μm) der Konfokalen.

Kapitel 7

Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein konfokales Fluoreszenzmikroskop mit gerasterter Linienbeleuchtung entwickelt, das die Vorteile eines Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskops und eines konfokalen Mikroskops in einem System vereint. Ein telezentrisch gerasterter Gaußscher Laserstrahl, in der Probe fokussiert und orthogonal zur Detektionsachse, diente zur Fluoreszenzanregung entlang einer Linie. Synchron hierzu wurde der *Rolling Shutter* einer CMOS Kamera genutzt, um das Bild konfokal zu detektieren.

Zum gleichen Resultat kann man auch gelangen, indem mehrere Bilder einer Probe aufgenommen werden zwischen denen der Beleuchtungsstrahl um jeweils eine Zeile bewegt wird. Auf jedes Bild wird daraufhin eine Schlitmmaske angewendet, die eine schmale Region um die beleuchteten Zeilen ausschneidet. Anschließend wird hieraus ein konfokales Bild generiert ([FR12]). Der offensichtliche Nachteil hierbei ist, dass die Kamera für die Belichtung jeder Zeile initialisiert werden muss, was die Aufnahmezeit verlängert. Eine Beschleunigung ist zwar möglich, indem der Strahl zwischen jedem Bild um seine gesamte Breite verschoben wird, erfordert dann aber auch eine Kompensation der inhomogenen Beleuchtung aufgrund des Gaußschen Strahlprofils.

Ein zweiter alternativer Ansatz verwendet zwei zusätzliche Scanspiegel und eine Schlitzbende zwischen Detektionsobjektiv und einer CCD-Kamera. Das Bild des gerasterten Strahls wird mit Hilfe des ersten Scanners auf eine statische Schlitzbende projiziert. Dahinter befindet sich ein zweiter Scanspiegel, der das räumlich gefilterte Bild wiederum auf den Detektor einer CCD-Kamera rastert. So wird die Aufnahmerate nunmehr durch die Geschwindigkeit der Scanspiegel und die Fluoreszenzfarbstoffe limitiert. Allerdings erhöht die zusätzliche Anzahl an optischen und mechanischen Elementen die Komplexität des Systems und kann zu Verlust von Fluoreszenzlicht führen.

Eine weitere Technik, die in jüngerer Zeit viel Aufmerksamkeit erfahren hat, ist die strukturierte Beleuchtung. Bei einem LSFM mit gerasterter Beleuchtung kann durch repetitives An- und Ausschalten des Lasers während des Scanprozesses eine sinusförmige Beleuchtung

realisiert werden. Dabei werden drei Bilder aufgenommen, zwischen denen die Phase des Beleuchtungsgitters um 120° verschoben wird. Aus diesen kann numerisch ein Bild mit geringerem Bildhintergrund und höherem Kontrast berechnet werden ([KSS⁺10]). Alternativ kann auch ein Bild mit verbessertem Kontrast aus zwei Aufnahmen erstellt werden. Dabei ist das erste Bild ein Konventionelles und das Zweite ein mit einem Intensitätsgitter Beleuchtetes ([MK10]). Der Grad der Bildverbesserung durch strukturierte Beleuchtung hängt allerdings davon ab, wie gut der Kontrast zwischen den hellen und dunklen Regionen des Intensitätsgitters ist. In stark streuenden Bereichen, tief in der Probe, verschlechtert sich der Kontrast eines solchen Intensitätsgitters. Somit könnte dies auch zu einer Verschlechterung des Kontrastes und Signal-zu-Rausch-Verhältnisses im rekonstruierten Bild führen. Im Vergleich zu den hier aufgelisteten Methoden der konfokalen Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie bietet der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz mehrere Vorteile. So entfällt die Notwendigkeit mehrerer Aufnahmeschritte, da die konfokale Diskriminierung von Licht von außerhalb des Fokus bzw. Streulicht schon bei der Aufnahme erfolgt. Das Risiko von Bewegungsartefakten, die z.B. durch mechanischen Drift des Probenhalters oder durch lebende Proben entstehen können, wird dadurch reduziert. Die numerische Nachbearbeitung durch die Prozessierung mehrerer konventioneller Datensätze zu einem Konfokalen entfällt. Insbesondere kann jeder LSFM-Aufbau mit gerasterter Beleuchtung mit dieser konfokalen Detektion erweitert werden, da keine zusätzlichen optischen oder mechanischen Elemente benötigt werden. Allein das geschickte Ausnutzen der Art und Weise mit der eine CMOS-Kamera ein Bild aufnimmt genügt für eine konfokale Detektion.

Durch die Möglichkeit die Zeilen-Aktivierungszeit der Kamera individuell einzustellen, kann die aktive Region des Detektors auf wenige Zeilen reduziert werden. Diese Region kann als konfokaler Schlitzdetektor aufgefasst werden, der sich in Scanrichtung entlang des Sensors bewegt.

Die Bildaufnahmezeit ist durch das Rastern des Beleuchtungsstrahls limitiert. Wird zum Beispiel ein statisches, zylindrisches Lichtblatt wie in Abb. 1.5 zur Beleuchtung benutzt und erfolgt die Detektion in *Epi*-Konfiguration, werden alle Pixel einer Kamera gleichzeitig belichtet. Die Zeit zwischen der Aufnahme von zwei Bildern ist dann gleich der Belichtungszeit plus etwaiger Verzögerungen durch die Ausleselektronik.

Hingegen wird bei LSFM mit gerastertem Gaußstrahl die Probe sequentiell beleuchtet. Die Geschwindigkeit mit der der Laser durch die Probe bewegt wird, sollte so eingestellt werden, dass der Strahl während der Belichtungszeit eine Strecke gleich seiner eigenen Breite überstreicht. Ist das vertikale Bildfeld um einen Faktor N größer als der Strahldurchmesser, dann ist die Bildaufnahmedauer gleich N multipliziert mit der Belichtungszeit. Dies gilt auch für konfokale Aufnahmen mit synchronisiertem *Rolling Shutter*. Der konfokale Aufnahmemodus hat somit seinen Preis in Form einer längeren Aufnahmezeit pro Bild.

Zur Veranschaulichung ein Vergleich: Eine typische CCD-Kamera mit einem Bildfeld von 500 Pixeln hat bei einer Belichtungszeit von 10 ms eine Aufnahmezeit von 100 Hz. Eine

typische in dieser Arbeit verwendete Breite des *Rolling Shutter* betrug 20 Pixel. Bei der gleichen Belichtungszeit pro Volumenelement in der Probe, das auf ein Pixel abgebildet wird, und gleichem Bildfeld läge die Bildaufnahmezeit dann bei 250 ms, was einer Rate von nur 4 Hz entspricht.

Mit dem entwickelten konfokalen LSFM konnte ein deutlicher Kontrast- und Auflösungsgewinn demonstriert werden, sowohl mit Phantomproben aus Agarose und fluoreszierenden Mikrokugeln, als auch in biologischem Gewebe. Am stärksten ist der konfokale Effekt orthogonal zum *Rolling Shutter*. Licht, das in dieser Richtung gestreut wird, trifft mit einer hohen Wahrscheinlichkeit den inaktiven Bereich des Detektors. Streulicht parallel zum Detektorschlitz wird nach wie vor detektiert. Bei einer langen Aufnahmezeit und sehr schmalen Rolling Shutter macht sich dies durch horizontale Streifen bemerkbar, die von hellen Bildbereichen ausgehen (Abschn. 5.6.3). Die Punktabbildungsfunktion kann dann parallel zur Beleuchtungsrichtung elongiert erscheinen.

7.1 Zusammenfassung der numerischen Ergebnisse

Das Mikroskop wurde mit dem optischen Design-Programm *Zemax* entworfen und optimiert. Für die Beleuchtung wurde ein Luftimmersionsobjektiv verwendet mit einer nominalen numerischen Apertur von 0,28, einer Vergrößerung von 10 und einer Brennweite von 20 mm. Eine gerasterte, telezentrische Beleuchtung wurde mit Hilfe eines optischen Relais und einem Galvospiegel realisiert. Dabei wurden achromatische Linsen so kombiniert, dass die Fokusgröße möglichst gering blieb. Die Vergrößerung des Relais betrug 1,8. Zusätzlich konnte noch ein Teleskop in den Strahl gefahren werden, so dass der Strahl um insgesamt einen Faktor von 7,56 aufgeweitet wurde. Der $1/e^2$ -Radius in der HFE des Beleuchtungsobjektivs betrug somit wahlweise 1,08 mm oder 4,54 mm.

Diese Daten konnten verwendet werden, um die dreidimensionale Intensitätsverteilung des Beleuchtungsfokus mittels paraxialer, numerischer Wellenpropagationsalgorithmen zu simulieren. Mit den gleichen Algorithmen wurden auch die Punktabbildungsfunktionen der drei in dieser Arbeit verwendeten Objektive simuliert. Letztlich konnte so die dreidimensionale System-PSF (PSF_{sys}) eines LSFM mit gerastertem Gaußstrahl und konfokaler Zeilendetektion bestimmt werden, die sich aus der Kombination der Intensitätsverteilung der Anregung, der Detektions-PSF und den Eigenschaften des Detektors ergibt. Hierzu wurde ein virtuelles, punktförmiges Teilchen in z -Richtung durch den Detektionsfokus bewegt und für jede Position des Teilchens dessen Bild numerisch simuliert (Abschn. 4.3.1). Im konventionellen Aufnahmemodus blieb die PSF_{sys} in x - und y -Richtung, im Vergleich zur PSF des jeweiligen Detektionsobjektivs, unverändert. In axialer Richtung war die PSF_{sys} kleiner als die PSF des Detektionsobjektivs, was an der orthogonalen Beleuchtung lag. Bei kleiner werdendem *Rolling Shutter* wurde eine Verkleinerung der PSF_{sys} orthogonal

zum Detektionsschlitz, also in y -Richtung, festgestellt. Für das 10x-Objektiv mit NA 0,3 und aufgeweitetem Strahl betrug $w_{0,y}$, der Radius der PSF_{sys} in y -Richtung, etwa 80 % von $w_{0,x}$, bei dem 20x-Objektiv mit NA 0,5 und Strahlaufweitung etwa 93 % (Abschn. 4.3.2). Mit kleiner werdender Beleuchtungs-Apertur und größer werdender Detektions-Apertur nahm diese PSF_{sys} -Asymmetrie ab.

Des Weiteren wurde auch eine Zunahme der Asymmetrie mit zunehmendem Abstand von der Fokusebene beobachtet. Dieses Verhalten der PSF_{sys} findet man auch bei konfokalen Zeilen- Scanning- Mikroskopen, die nur ein Objektiv für Anregung als auch Detektion verwenden, siehe z.B. [WKZ06]. Aufgrund des schnell abfallenden Gaußprofils des gerasterten Strahls und des schmalen Schlitzdetektors wird durch den Detektor bei der Aufnahme in y -Richtung weniger Licht integriert als in x , wodurch die PSF in dieser Richtung verkleinert wird.

In einigen Bildern, die mit besonders schmalen Detektorschlitz aufgenommen wurden, fiel eine Verzerrung in x -Richtung auf, die deutlich höher war als die durch die Simulationen Ermittelte (Abschn. 5.6.3). Dies ist auf Streulicht zurückzuführen, das sich parallel zum Detektionsschlitz ausbreitet und somit detektiert wird.

Neben der mathematischen Modellierung eines Bildes mit Hilfe der $PSF_{sys}(x,y)$ wäre es denkbar das residuelle Streulicht durch einen zweiten Faltungskern $K(x,y)$ darzustellen. Das Gesamtbild $B(x,y)$ würde somit durch die Summe aus zwei Faltungen mit der Fluoreszenzverteilung $C(x,y)$ entstehen:

$$\begin{aligned} B(x,y) &= PSF_{sys}(x,y) \otimes C(x,y) + K(x,y) \otimes C(x,y) \\ &= (PSF_{sys}(x,y) + K(x,y)) \otimes C(x,y). \end{aligned} \quad (7.1)$$

Der Term $(PSF_{sys}(x,y) + K(x,y))$ kann somit als neue PSF aufgefasst werden, die das residuelle Streulicht mitberücksichtigt. $K(x,y)$ könnte zum Beispiel durch einen gaußschen Filterkern, der in x -Richtung operiert, modelliert werden (vgl. Abb. 5.12). Im tatsächlichen, biologischen Experiment ist dieser Term jedoch unbekannt, kann aber mit Hilfe von *Blind Deconvolution* geschätzt werden. *Blind Deconvolution* ist eine Dekonvolution bei der eine optimale PSF vom Bild ausgehend, unter Verwendung der *Maximum-Likelihood*-Methode, iterativ geschätzt wird. Die theoretische Form der PSF_{sys} würde dabei als Ausgangspunkt dienen.

Durch zusätzliche Randbedingungen könnte die Zuverlässigkeit mit der die PSF geschätzt wird erhöht werden. Diese können eingeführt werden, indem mehrere dreidimensionale Aufnahmen der Probe aus unterschiedlichen Richtungen, wie in [KGS⁺12], aufgenommen und zu einem Datensatz zusammengefügt werden. Hierzu würden sich insbesondere die Registrierungsmethode aus [PSST10] in Verbindung mit dem Dekonvolutionsalgorithmus aus [PAS⁺13] eignen.

7.2 Vergleich von konventionellen und konfokalen Daten

Sowohl in einer Phantomprobe aus fluoreszierenden Mikrokugeln, als auch in biologischem Gewebe konnte ein deutlicher Anstieg des Kontrastes und eine Verbesserung der axialen Auflösung durch die konfokale Zeilendetektion nachgewiesen werden. Hier sind zwei Faktoren zu unterscheiden: Der Erste ist die Aufweitung des Anregungsstrahls mit zunehmendem Abstand des Anregungsfokus von der Glaswand der Probenküvette (Anregungstiefe). Hierdurch wird die effektive, axiale Auflösung eines LSM reduziert. Der zweite Faktor ist die Streuung von Fluoreszenzlicht auf dessen Weg durch die Probe in Richtung Detektionsobjektiv. Dieser nimmt zu mit steigendem Abstand der abgebildeten Objektebene vom Deckglas (Abbildungstiefe).

Dieser Effekt war bei einer geringen Abbildungstiefe in der Probe klein, erhöhte sich aber mit zunehmendem Abstand des untersuchten Bereichs vom Deckglas. Die Auswirkung des Schlitzdetektors auf die PSF in der Bildebene war gering. Eine etwaige Asymmetrie war zu klein um sie im Rahmen der Messfehler zu beobachten. Bei besonders hell fluoreszierenden Objekten konnte jedoch eine Abbildungsverzerrung in x-Richtung beobachtet werden, wie bereits in Abschn. 7.1 diskutiert wurde.

In z-Richtung konnte eine Verkleinerung des $1/e^2$ -Radius der Punktabbildungsfunktion um ca. 25% nachgewiesen werden. In den numerischen Simulationen war dieser Effekt bei den verwendeten Beleuchtungskonfigurationen und Detektionsobjektiven nicht nachweisbar. Vermutlich wurde jedoch der Beleuchtungsstrahl durch Streuung verbreitert, so dass seine laterale Ausdehnung effektiv in der Größenordnung der axialen Ausdehnung der Abbildungs-PSF lag. Die Diskriminierung des Lichtes von außerhalb des Fokus durch die orthogonale Beleuchtung alleine verliert damit an Effizienz, kann jedoch durch den konfokalen Schlitz wieder verringert werden.

Das SRV erreichte ein Maximum, wenn die Breite des konfokalen Schlitzes etwa gleich der Breite des Anregungsstrahls war. Dies ist die optimale Breite des konfokalen Schlitzes. Ein ähnliches Resultat erhält man bei konfokalen Scanning-Mikroskopen, wo die optimale Größe der Blende gleich der Größe der Beleuchtungs-Airyscheibe ist, [WC87].

Besonders deutlich zeigte sich die Verbesserung des Kontrastes in den biologischen Proben. Wie stark der Kontrast verbessert werden kann hängt dabei von der Tiefe des Abgebildeten Bereichs in der Probe und der Streulänge der Probe ab. So konnte im geklarten Mausgehirn eine Verbesserung des Kontrastes bei der konfokalen Aufnahme ab einer Abbildungstiefe von etwa $300\ \mu\text{m}$ um durchschnittlich etwa 10% gegenüber der konventionellen Aufnahme gemessen werden. In gleichem Maße wurde der Kontrast beim nicht chemisch behandelten Zebrafisch ab einer Tiefe von etwa $50\ \mu\text{m}$ besser. Das Abbilden von Polytänchromosomen bei einer Tiefe von $100\ \mu\text{m}$ zeigte, dass der Kontrast lokal sogar um das Zweifache des Kontrastes bei *Epi*-Detektion verbessert werden konnte.

7.3 Ausblick

Die Stärke von LSFM mit konfokaler Zeilendetektion liegt darin, dass gestreutes Licht eliminiert wird und so der Kontrast und daraus resultierend auch die effektive Auflösung der Abbildung verbessert werden können. Bei geringen Abbildungstiefen ist der Kontrast mit der konfokalen Methode gleich dem der Konventionellen. Hier ist der Streulichtanteil eher gering und durch einen zu schmalen konfokalen Schlitz wird ein Teil der ballistischen Photonen herausgefiltert. Auch ist zu beachten, dass der Beleuchtungsstrahl genau konjugiert zum Schlitzdetektor sein muss, da ansonsten ballistische Fluoreszenzphotonen auf inaktive Bereiche des Detektors treffen. Ab welcher Abbildungstiefe eine konfokale Detektion sinnvoll ist, hängt von den mittleren freien Weglänge der Photonen in der Probe ab. Zwar kann die MFW durch chemisches Aufklaren erhöht werden, dies ist aber bei Proben, die lebend untersucht werden sollen, nicht möglich.

Eine vielversprechende Anwendung dieser Methode hat sich durch die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Odermatt eröffnet. So würde die Abbildung von Strukturen wie der Myelinscheiden in der Größenordnung von $1\ \mu\text{m}$ und darunter in lebenden Zebrafischen von konfokaler LSFM stark profitieren.

Ein möglicher zukünftiger Entwicklungsschritt wäre auch die Verwendung von Zweiphotonen-Anregung im Beleuchtungsteil. So könnte die Linie entlang des Anregungsfokus weiter verkleinert werden, da durch gestreutes Licht keine Fluoreszenz angeregt wird und die konfokale Abbildung räumlich begrenzte Detektion als auch räumlich begrenzte Anregung voraussetzt. Das emittierte Fluoreszenzlicht läge nach wie vor im visuellen Bereich und unterläge den gleichen Streuprozessen wie das in dieser Arbeit. Somit kann davon ausgegangen werden, dass gestreutes Fluoreszenzlicht auch bei LSFM mit Zweiphotonen-Anregung einen zusätzlichen Hintergrund schafft, der durch konfokale Zeilendetektion eliminiert würde. Eine schonende in vivo Untersuchung der Myelindynamik im Rückenmark von Zebrafischen sollte mittels gescannter, konfokaler Zweiphotonen-LSFM somit sehr gut möglich sein.

In Verbindung mit einer Rotation der Probe, so dass diese von unterschiedlichen Richtungen dreidimensional aufgenommen wird, sowie mit zusätzlichen Detektionsstrahlengängen zur effizienteren Nutzung des Fluoreszenzlichts, würde die Aufnahme von dreidimensionalen Datensätzen mit isotroper Auflösung und hohem Kontrast auch aus tief liegenden Probenbereichen ermöglicht.

Literaturverzeichnis

- [ACL⁺11] Rafael G Almeida, Tim Czopka, David A Lyons, et al. Individual axons regulate the myelinating potential of single oligodendrocytes in vivo. *Development*, 138(20):4443–4450, 2011.
- [AK13] Misha B Ahrens and Philipp J Keller. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nature methods*, 2013.
- [Alb05] Lawrence E Albertelli. Wide-field extended-depth doubly telecentric catadioptric optical system for digital imaging, December 27 2005. US Patent 6,980,249.
- [Ald03] Javier Alda. Laser and gaussian beam propagation and transformation. *Encyclopedia of Optical Engineering*, pages 999–1013, 2003.
- [Arr99] Simon R Arridge. Optical tomography in medical imaging. *Inverse problems*, 15(2):R41, 1999.
- [BAR65] RICHARD BARAKAT. Rayleigh wavefront criterion. *J. Opt. Soc. Am.*, 55(5):572–573, May 1965.
- [BBK⁺11] Sandra Blaess, Gabriela O Bodea, Anna Kabanova, Soline Chanet, Emilie Mugniery, Amin Derouiche, Daniel Stephen, Alexandra L Joyner, et al. Temporal-spatial changes in sonic hedgehog expression and signaling reveal different potentials of ventral mesencephalic progenitors to populate distinct ventral midbrain nuclei. *Neural Dev*, 6:29, 2011.
- [BCFS06] M Bigas, Enric Cabruja, Josep Forest, and Joaquim Salvi. Review of cmos image sensors. *Microelectronics journal*, 37(5):433–451, 2006.
- [BD07] Anders Björklund and Stephen B Dunnett. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in neurosciences*, 30(5):194–202, 2007.
- [BEJ⁺95] Bertrand Beauvoit, Sydney M Evans, Timothy W Jenkins, Elizabeth E Miller, and Britton Chance. Correlation between the light scattering and the
-

- mitochondrial content of normal tissues and transplantable rodent tumors. *Analytical biochemistry*, 226(1):167–174, 1995.
- [BK12] Eugen Baumgart and Ulrich Kubitscheck. Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection. *Optics express*, 20(19):21805–21814, 2012.
- [BKK13] Eugen Baumgart, Tim P Kaminski, and Ulrich Kubitscheck. Scanned fluorescence light sheet microscopy with confocal detection. *Imaging and Microscopy*, 1:18–21, 2013.
- [BMAF10] Clare E Buckley, Anita Marguerie, Wendy K Alderton, and Robin JM Franklin. Temporal dynamics of myelination in the zebrafish spinal cord. *Glia*, 58(7):802–812, 2010.
- [BOCY94] DA Boas, MA O’leary, B Chance, and AG Yodh. Scattering of diffuse photon density waves by spherical inhomogeneities within turbid media: analytic solution and applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(11):4887–4891, 1994.
- [BOCY97] D. A. Boas, M. A. O’Leary, B. Chance, and A. G. Yodh. Detection and characterization of optical inhomogeneities with diffuse photon density waves: a signal-to-noise analysis. *Appl. Opt.*, 36(1):75–92, Jan 1997.
- [BSA⁺14] Gabriela Oana Bodea, Jan-Hendrik Spille, Philipp Abe, Aycan Senturk Andersson, Amparo Acker-Palmer, Ralf Stumm, Ulrich Kubitscheck, and Sandra Blaess. Reelin and *excl12* regulate distinct migratory behaviors during the development of the dopaminergic system. *Development*, 141(3):661–673, 2014.
- [BW80] Max Born and Emil Wolf. *Principles of Optics*. Cambridge University Press, Cambridge, sixth edition edition, 1980.
- [Com10] Wikimedia Commons. Neuron with oligodendrocyte and myelin sheath. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Neuron_with_oligodendrocyte_and_myelin_sheath.svg, 2010. Author grants anyone the right to use this work for any purpose, without any conditions, unless such conditions are required by law.
- [DDV⁺07] E Dusch, T Dorval, N Vincent, M Wachsmuth, and A Genovesio. Three-dimensional point spread function model for line-scanning confocal microscope with high-aperture objective. *Journal of microscopy*, 228(2):132–138, 2007.
- [DEM88] J Durnin, JH Eberly, and JJ Miceli. Comparison of *bessel* and gaussian beams. *Optics letters*, 13(2):79–80, 1988.
-

- [DF64] Annica Dahlström and Kjell Fuxe. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. i. demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, pages SUPPL–232, 1964.
- [DFN07] Jurek W Dobrucki, Dorota Feret, and Anna Noatynska. Scattering of exciting light by live cells in fluorescence confocal imaging: phototoxic effects and relevance for frap studies. *Biophysical journal*, 93(5):1778–1786, 2007.
- [DLS⁺07] Hans-Ulrich Dodt, Ulrich Leischner, Anja Schierloh, Nina Jährling, Christoph Peter Mauch, Katrin Deininger, Jan Michael Deussing, Matthias Eder, Walter Zieglgänsberger, and Klaus Becker. Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature methods*, 4(4):331–336, 2007.
- [DMS97] Bart Dierickx, Guy Meynants, and Danny Scheffer. Near 100% fill factor standard cmos active pixels. In *proc. 1997 CCD & AIS workshop P*, volume 1. Citeseer, 1997.
- [ES06] Christoph J Engelbrecht and Ernst H Stelzer. Resolution enhancement in a light-sheet-based microscope (spim). *Optics letters*, 31(10):1477–1479, 2006.
- [FBHG01] Boyd A Fowler, Janusz Balicki, Dana How, and Michael Godfrey. Low-fpn high-gain capacitive transimpedance amplifier for low-noise cmos image sensors. In *Photonics West 2001-Electronic Imaging*, pages 68–77. International Society for Optics and Photonics, 2001.
- [FGA⁺13] Florian O Fahrbach, Vasily Gurchenkov, Kevin Alessandri, Pierre Nassoy, and Alexander Rohrbach. Self-reconstructing sectioned bessel beams offer submicron optical sectioning for large fields of view in light-sheet microscopy. *Optics express*, 21(9):11425–11440, 2013.
- [FR12] Florian O Fahrbach and Alexander Rohrbach. Propagation stability of self-reconstructing bessel beams enables contrast-enhanced imaging in thick media. *Nature Communications*, 3:632, 2012.
- [FSR10] Florian O Fahrbach, Philipp Simon, and Alexander Rohrbach. Microscopy with self-reconstructing beams. *Nature Photonics*, 4(11):780–785, 2010.
- [Fus06] K.S.E.I.L. Fuse. F-theta lens, January 25 2006. EP Patent 1,081,525.
- [Gea02] Joseph M Geary. *Introduction to lens design: with practical ZEMAX examples*. Willmann-Bell Richmond, 2002.
-

- [Goo08] J. W. Goodman. *Introduction to Fourier Optics*. McGraw Hill, San Francisco, 1908.
- [Goo04] Douglas S Goodman. General principles of geometrical optics. *Handbook of Optics*, 2, 2004.
- [Gus00] Mats GL Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy*, 198(2):82–87, 2000.
- [HBP83] RF Hess, A Bradley, and L Piotrowski. Contrast-coding in amblyopia i. differences in the neural basis of human amblyopia. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 217(1208):309–330, 1983.
- [HD05] Fritjof Helmchen and Winfried Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature methods*, 2(12):932–940, 2005.
- [Hec01] Eugene Hecht. *Optics*. Addison Wesley, fourth edition, 2001.
- [HPC98] HPComponentsGroup. Noise sources in cmos image sensors. 1998.
- [HS07] Jan Huisken and Didier YR Stainier. Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mspim). *Optics letters*, 32(17):2608–2610, 2007.
- [HS09] Jan Huisken and Didier Y. R. Stainier. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development*, 136(12):1963–1975, 2009.
- [HSDB⁺04] Jan Huisken, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst HK Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686):1007–1009, 2004.
- [HZA⁺11] Lindsay Hayes, Zhiwei Zhang, Paul Albert, Mark Zervas, and Sohyun Ahn. Timing of sonic hedgehog and gli1 expression segregates midbrain dopamine neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 519(15):3001–3018, 2011.
- [JAR⁺09] Milan Joksimovic, Angela Anderegg, Anil Roy, Laura Campochiaro, Beth Yun, Raja Kittappa, Ronald McKay, and Rajeshwar Awatramani. Spatiotemporally separable shh domains in the midbrain define distinct dopaminergic progenitor pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45):19185–19190, 2009.
- [JZ06] Alexandra L Joyner and Mark Zervas. Genetic inducible fate mapping in mouse: establishing genetic lineages and defining genetic neuroanatomy in the nervous system. *Developmental dynamics*, 235(9):2376–2385, 2006.
-

- [KBK⁺95] Charles B Kimmel, William W Ballard, Seth R Kimmel, Bonnie Ullmann, and Thomas F Schilling. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3):253–310, 1995.
- [KGS⁺12] Uros Krzic, Stefan Gunther, Timothy E Saunders, Sebastian J Streichan, and Lars Hufnagel. Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging. *Nature methods*, 9(7):730–733, 2012.
- [KJ09] Rudolf Kingslake and R Barry Johnson. *Lens design fundamentals*. academic press, 2009.
- [KSS⁺10] Philipp J Keller, Annette D Schmidt, Anthony Santella, Khaled Khairy, Zhirong Bao, Joachim Wittbrodt, and Ernst HK Stelzer. Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy. *Nature methods*, 7(8):637–642, 2010.
- [KSWS08] Philipp J Keller, Annette D Schmidt, Joachim Wittbrodt, and Ernst HK Stelzer. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *science*, 322(5904):1065–1069, 2008.
- [KWK01] Haim Kedar, Edward Perry Wallerstein, and Kerry J Koller. Doubly telecentric lens and imaging system for multiwell plates, August 7 2001. US Patent 6,271,972.
- [Lai10] Milton Laikin. *Lens design*. CRC Press, 2010.
- [LM63] W. Lukosz and M. Marchand. Optischen abbildung unter ueberschreitung der beugungsbedingten auflösungsgrenze. *Optica Acta: International Journal of Optics*, 10(3):241–255, 1963.
- [MDS98] Guy Meynants, Bart Dierickx, and Danny Scheffer. Cmos active pixel image sensor with ccd performance. In *SYBEN-Broadband European Networks and Electronic Image Capture and Publishing*, pages 68–76. International Society for Optics and Photonics, 1998.
- [Mer11] Jerome Mertz. Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nature methods*, 8(10):811–819, 2011.
- [Mes08] Dieter Meschede. *Optics, light and lasers*. Wiley. com, 2008.
- [Mic95] Albert Abraham Michelson. *Studies in optics*. Courier Dover Publications, 1995.
- [Min61] Marvin Minsky. Microscopy apparatus, December 1961.
-

-
- [MK10] Jerome Mertz and Jinhyun Kim. Scanning light-sheet microscopy in the whole mouse brain with hilo background rejection. *Journal of biomedical optics*, 15(1):016027–016027, 2010.
- [MM04] Daniel Malacara and Zacarias Malacara. *Handbook of Optical Design*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, second edition edition, 2004.
- [MTMS09] Beat Münch, Pavel Trtik, Federica Marone, and Marco Stampanoni. Stripe and ring artifact removal with combined wavelet–fourier filtering. *Optics express*, 17(10):8567–8591, 2009.
- [Nie07] Markolf H Niemz. *Laser-tissue interactions: fundamentals and applications*. Springer, 2007.
- [NJW97] MAA Neil, R Juskaitis, and T Wilson. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Optics letters*, 22(24):1905–1907, 1997.
- [NTZ10] VASILIS NTZIACHRISTOS. Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat Meth*, 55(7):603–614, August 2010.
- [PAS⁺13] Stephan Preibisch, Fernando Amat, Evangelia Stamataki, Mihail Sarov, Eugene Myers, and Pavel Tomancak. Efficient bayesian multi-view deconvolution. *arXiv preprint arXiv:1308.0730*, 2013.
- [Paw10] James Pawley. *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer, 2010.
- [Pel90] Eli Peli. Contrast in complex images. *JOSA A*, 7(10):2032–2040, 1990.
- [PGM⁺11] Thomas A Planchon, Liang Gao, Daniel E Milkie, Michael W Davidson, James A Galbraith, Catherine G Galbraith, and Eric Betzig. Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using bessel beam plane illumination. *Nature methods*, 8(5):417–423, 2011.
- [PSRV87] M Pavel, George Sperling, Thomas Riedl, and August Vanderbeek. Limits of visual communication: the effect of signal-to-noise ratio tin the intelligibility of american sign language. *JOSA A*, 4(12):2355–2365, 1987.
- [PSST10] Stephan Preibisch, Stephan Saalfeld, Johannes Schindelin, and Pavel Tomancak. Software for bead-based registration of selective plane illumination microscopy data. *Nature methods*, 7(6):418–419, 2010.
-

-
- [ROY⁺04] Robert K. Reich, Daniel M. O'Mara, Douglas J. Young, Andrew H. Loomis, Dennis D. Rathman, David M. Craig, Scott A. Watson, Michael D. Ulibarri, and Bernard B. Kosicki. High-fill-factor burst-frame-rate charge-coupled device, 2004.
- [RS84] GS Rubin and K Siegel. Recognition of low-pass filtered faces and letters. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. Suppl*, 25:71, 1984.
- [RSKK11] Jörg G Ritter, Jan-Hendrik Spille, Tim Kaminski, and Ulrich Kubitscheck. A cylindrical zoom lens unit for adjustable optical sectioning in light sheet microscopy. *Biomedical optics express*, 2(1):185–193, 2011.
- [RVS⁺08] J Ritter, Roman Veith, Jan-Peter Siebrasse, Ulrich Kubitscheck, et al. High-contrast single-particle tracking by selective focal plane illumination microscopy. *Optics express*, 16(10):7142–7152, 2008.
- [RVV⁺10] Jörg Gerhard Ritter, Roman Veith, Andreas Veenendaal, Jan Peter Siebrasse, and Ulrich Kubitscheck. Light sheet microscopy for single molecule tracking in living tissue. *PLoS One*, 5(7):e11639, 2010.
- [San11] Peter A Santi. Light sheet fluorescence microscopy a review. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(2):129–138, 2011.
- [SAP⁺02] James Sharpe, Ulf Ahlgren, Paul Perry, Bill Hill, Allyson Ross, Jacob Hecksher-Sørensen, Richard Baldock, and Duncan Davidson. Optical projection tomography as a tool for 3d microscopy and gene expression studies. *Science*, 296(5567):541–545, 2002.
- [SBS⁺12] L Silvestri, A Bria, L Sacconi, G Iannello, and FS Pavone. Confocal light sheet microscopy: micron-scale neuroanatomy of the entire mouse brain. *Optics express*, 20(18):20582–20598, 2012.
- [Sch97] John C Schotland. Continuous-wave diffusion imaging. *JOSA A*, 14(1):275–279, 1997.
- [Sch10] Jason D. Schmidt. *Numerical Simulation of Optical Wave Propagation With Examples in MATLAB*. SPIE Press, 2010.
- [Sel83] Sidney A Self. Focusing of spherical gaussian beams. *Applied Optics*, 22(5):658–661, 1983.
- [SKB⁺13] Anand Pratap Singh, Jan Wolfgang Krieger, Jan Buchholz, Edoardo Charbon, Jörg Langowski, and Thorsten Wohland. The performance of 2d array detectors for light sheet based fluorescence correlation spectroscopy. *Opt. Express*, 21(7):8652–8668, Apr 2013.
-

-
- [SL94] Ernst HK Stelzer and Steffen Lindek. Fundamental reduction of the observation volume in far-field light microscopy by detection orthogonal to the illumination axis: confocal theta microscopy. *Optics Communications*, 111(5):536–547, 1994.
- [SM88] CJR Sheppard and XQ Mao. Confocal microscopes with slit apertures. *Journal of Modern Optics*, 35(7):1169–1185, 1988.
- [Spa16] Carroll Mason Sparrow. On spectroscopic resolving power. *The Astrophysical Journal*, 44:76, 1916.
- [Spi11] H.K.A. Spiecker. Method and arrangement for microscopy,, October 2011.
- [Ste04] E.G. Steward. *Fourier Optics: An Introduction*. Dover Books on Physics Series. Dover Publications, 2004.
- [Str95] K Strehl. Aplanatische und fehlerhafte abbildung im fernrohr. *Zeitschrift für Instrumentenkunde*, 15:362–370, 1895.
- [SWL⁺01] Shankar Srinivas, Tomoko Watanabe, Chyuan-Sheng Lin, Chris M William, Yasuto Tanabe, Thomas M Jessell, and Frank Costantini. Cre reporter strains produced by targeted insertion of eyfp and ecfp into the rosa26 locus. *BMC developmental biology*, 1(1):4, 2001.
- [SZ03] H Siedentopf and R Zsigmondy. Ueber sichtbarmachung und groessenbestimmung ultramikroskopischer teilchen, mit besonderer anwendung auf goldru-binglaesern. *Annalen der Physik*, 10:1–39, 1903.
- [TORO⁺12] Maja Temerinac-Ott, Olaf Ronneberger, Peter Ochs, Wolfgang Driever, Thomas Brox, and Hans Burkhardt. Multiview deblurring for 3-d images from light-sheet-based fluorescence microscopy. *Image Processing, IEEE Transactions on*, 21(4):1863–1873, 2012.
- [TSK⁺11] Thai V Truong, Willy Supatto, David S Koos, John M Choi, and Scott E Fraser. Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy. *Nature methods*, 8(9):757–760, 2011.
- [VBS93] AH Voie, DH Burns, and FA Spelman. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *Journal of microscopy*, 170(3):229–236, 1993.
- [Vei11] Roman Veith. *Mobilität endogener mRNA im chromatinfreien Nukleoplasma der Speicheldrüsenzellkerne von Chironomus tentans*. PhD thesis, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 5 2011.
-

-
- [WC87] Tony Wilson and AR Carlini. Size of the detector in confocal imaging systems. *Optics letters*, 12(4):227–229, 1987.
- [WC88] T Wilson and AR Carlini. Three-dimensional imaging in confocal imaging systems with finite sized detectors. *Journal of Microscopy*, 149(1):51–66, 1988.
- [WDW⁺12] Michael D Wong, Adrienne E Dorr, Johnathon R Walls, Jason P Lerch, and R Mark Henkelman. A novel 3d mouse embryo atlas based on micro-ct. *Development*, 139(17):3248–3256, 2012.
- [Wes85] Gerald Westheimer. The oscilloscopic view: retinal illuminance and contrast of point and line targets. *Vision research*, 25(8):1097–1103, 1985.
- [Wet04] William B Wetherell. Afocal systems. *Handbook of Optics*, 2, 2004.
- [WG95] R Wehner and W Gehring. Zoologie. 23. neu bearbeitete auflage, 1995.
- [Wie94] Lars Wieslander. The balbiani ring multigene family: coding repetitive sequences and evolution of a tissue-specific cell function. *Progress in nucleic acid research and molecular biology (USA)*, 1994.
- [Wil80] T Wilson. Imaging properties and applications of scanning optical microscopes. *Applied physics*, 22(2):119–128, 1980.
- [Wil90] T Wilson. The role of detector geometry in confocal imaging. *Journal of Microscopy*, 158(2):133–144, 1990.
- [WKZ06] Ralf Wolleschensky, Michael Kempe, and Bernhard Zimmermann. High-speed confocal fluorescence imaging with a novel line scanning microscope. *Journal of biomedical optics*, 11(6):064011–064011, 2006.
- [WS84] T. Wilson and C. Sheppard. *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy*. Academic Press INC. (London) LTD, 1984.
- [WWK10] Xi Wang, Thorsten Wohland, and Vladimir Korzh. Developing i_i in vivo i_i biophysics by fishing for single molecules. *Developmental biology*, 347(1):1–8, 2010.
- [YC90] W Yang and A Chiang. A full fill-factor ccd imager with integrated signal processors. In *Solid-State Circuits Conference, 1990. Digest of Technical Papers. 37th ISSCC., 1990 IEEE International*, pages 218–219. IEEE, 1990.
- [YM05] Mika Yoshida and Wendy B Macklin. Oligodendrocyte development and myelination in gfp-transgenic zebrafish. *Journal of neuroscience research*, 81(1):1–8, 2005.
-

Abkürzungsverzeichnis

Φ	Brechkraft
2P	Zweiphotonen-Mikroskopie
AS	Afokales System
ATV	<i>Area tegmentalis ventralis</i>
BABB	1:2 Benzylalkohol und Benzyl- benzoat
BR	Balbani Ring
CCD	<i>Charged coupled device</i>
CMOS	<i>Complementary metal-oxide-semiconductor</i>
Effl.	Effektive Fokusslänge
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>
f	Brennweite
g_x	Scanspiegel zum Rastern des Strahl
g_y	Scanspiegel zum defokussieren des Strahls
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GIFM	<i>Genetic induced fate mapping</i>
HFE	Hintere fokale Ebene
LSFM	Lichtscheiben Fluoreszenzmikroskopie
MFT	Mittlere freie Transportlänge
MFW	Mittlere freie Weglänge
MP	Multiphotonen-Mikroskopie
MTF	Mudulationstransferfunktion
n	Brechungsindex
NA	Numerische Apertur
OTF	Optische Transferfunktion
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PSF	Punktspreizfunktion oder Punktabbildungsfunktion
PSF_B	PSF des Beleuchtungsobjektivs

PSF_D	PSF des Detektionsobjektivs
PSF_{sys}	Gesamt-PSF für das Mikroskop
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
sCMOS	scientific CMOS
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SIM	Strukturierte Beleuchtung
SN	<i>Substancie nigra</i>
SPIM	<i>Selective plane illumination microscopy</i>
SRV	Signal zu Rausch Verhältnis
TH	Tyrosinhydroxylase
w_0	$1/e^2$ -Radius
W_0	$1/e^2$ -Durchmesse
z_r	Rayleighlänge

Abbildungsverzeichnis

1.1	Zusammenhang zwischen Kontrast und Auflösungsvermögen.	3
1.2	Streuung von Licht in biologischem Gewebe.	4
1.3	Auflösungsvermögen und Abbildungstiefe bei unterschiedlichen Methoden der Fluoreszenzmikroskopie.	5
1.4	Prinzip des konfokalen Mikroskops.	6
1.5	Prinzip von LSM.	8
1.6	Vergleich von Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie und einem konfokalen Scanning-Mikroskop.	9
1.7	Prinzip der gescannten Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie.	10
2.1	Prinzip eines afokalen Systems.	14
2.2	Prinzip eines afokalen optischen Relais.	15
2.3	Fokussierung von Gaußstrahlen	16
2.4	Das Huygenssche Prinzip.	18
2.5	Prinzip des Scanning Mikroskops.	21
3.1	Schemazeichnung des Aufbaus, der in dieser Arbeit verwendet wurde. . . .	29
3.2	Computergrafik des Mikroskopaufbaus.	30
3.3	Skizze der kardanischen Aufhängung für die Justagespiegel.	31
3.4	Anordnung der Scanspiegel.	32
3.5	Geometrie der Probenküvette.	32
3.6	Kombinationen von unterschiedlichen Objektiven zur Anregung und Detektion.	33
3.7	Herleitung der Defokus-Korrektur.	35
3.8	Prinzip eines CMOS-Detektors.	38

3.9	Funktionsweise des Rolling Shutters.	39
3.10	Elektronisches Layout des Mikroskopaufbaus.	41
3.11	Zeitverlaufdiagramm für die Scanspiegelspannung, den Trigger für die Kamera und den Trigger für den Laser.	42
3.12	Spiegelgeometrie zur Steuerung der Strahlage.	45
3.13	Auswirkung auf die Lage des Strahls bei Auslenkung der Justagespiegel um unterschiedliche Achsen.	48
4.1	Skizzen des in Zemax untersuchten Relais-Systems.	51
4.2	Punkt diagramme der unterschiedlichen optischen Layouts.	52
4.3	Axiale chromatische Verschiebung.	54
4.4	Simulierte PSFs für Anregung und Detektion.	55
4.5	Auswirkung des Schlitzdetektors auf die Radien der Punktabbildungsfunktion, bei Detektions-NA von 0,3.	58
4.6	Auswirkung des Schlitzdetektors auf die Radien der Punktabbildungsfunktion, bei Detektions-NA von 0,5.	59
4.7	Auswirkung des Schlitzdetektors auf die Beleuchtungshomogenität.	61
5.1	Bild des zur Messung der Hauptebenen des Beleuchtungsobjektivs verwendeten Objekts.	63
5.2	Schema des Messaufbaus zur Bestimmung der Lage der Hauptebenen des Beleuchtungsobjektivs.	64
5.3	Auswirkung der Strahlposition in der HFE auf dessen Lage im Fokus.	65
5.4	Veranschaulichung der Detektion des Strahls und seiner Lage.	66
5.5	Skizze zur Berechnung der Fokusverschiebung bei einer Feldkrümmung mit Radius R.	69
5.6	Gemessene Genauigkeit der Strahlpositionierung.	71
5.7	Mögliche Formen einer deformierten Scanebene relative zur Detektionsebene.	72
5.8	Synchronisation zwischen Kamera und <i>Rolling Shutter</i>	73
5.9	Messung des Strahlradius bei Verschiebung des Probenhalters in y.	75
5.10	Messung des Auflösungsvermögens in Abhängigkeit des Rolling Shutters.	76
5.11	Messung von Kontrast und SRV bei unterschiedlichen Breiten des <i>Rolling Shutter</i>	78

5.12	Beispiel für residuelles Streulicht.	80
6.1	Sagittale Mikro-CT Aufnahme des Kopfes eines Mausembryos im Embryonalstadium.	81
6.2	Darstellung der <i>C. tentans</i> Larve und der Speicheldrüse.	82
6.3	Durchlichtmikroskop-Aufnahme einer Zebrafischlarve.	83
6.4	LSFM Aufnahmen des transparenten Mausgehirns bei unterschiedlichen Abbildungstiefen.	87
6.5	Messung des Kontrastes in einem mit BABB behandelten fixierten Mausgehirn.	88
6.6	Polytänschromosomen aufgenommen mit dem 10x Objektiv.	89
6.7	Polytänschromosomen aufgenommen mit dem 40x, NA 1,15, Wasserimmersionsobjektiv.	90
6.8	Myelinisierung von Zebrafisch-Axonen durch Oligodendorzyten.	92
6.9	Demonstration der Kontrastverbesserung Anhand eines Zebrafisches.	94
6.10	Kontrast als Funktion der Abbildungstiefe im Zebrafisch.	95
6.11	Beispiel für die am Zebrafisch aufgenommenen Bilder und Vergleich zwischen konventionellen und konfokalen Daten.	97
6.12	Dreidimensionale Abbildung eines Teils der Zebrafischwirbelsäule.	98

Tabellenverzeichnis

3.1	Herleitung der Defokus-Korrektur.	35
3.2	Hauptmerkmale der verwendeten Kameramodelle.	40
3.3	Spiegelgeometrie zur Steuerung der Strahlage: Nomenklatur.	45
4.1	Für die Strahlaufweitung verwendete Linsen.	50
4.2	Für das optische Relais verwendete Linsen.	53
4.1	Ausdehnung der simulierten PSFs für Beleuchtung und Detektion.	56
4.2	Ausdehnung der Gesamt-Punktabbildungsfunktion für unterschiedliche Beleuchtungsaperturen und Detektionsobjektive mit konventioneller Detektion.	57
5.1	Ermittelte Werte für die Hauptebenen und die Brennweite.	65
5.2	Messungen der Strahlprofile ohne Strahlaufweitung.	68
5.3	Messungen der Strahlprofile mit Strahlaufweitung.	68

Danksagung

Viele Personen haben mich während meiner Promotionszeit unterstützt und standen mir mit Rat und Tat zur Seite. Bedanken möchte ich mich vor allem bei:

Prof. Dr. U. Kubitscheck für die Möglichkeit an einem spannenden und fordernden Thema arbeiten zu dürfen, ebenso für seine stets offene Tür und die Möglichkeit im Laufe meiner Promotion an vielen hochkarätigen Tagungen im In- und Ausland teilnehmen zu dürfen.

Prof. Dr. R. Merkel für die freundliche Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen.

Herr H.-P. Königshoven und den Mitarbeitern der Feinmechanischen Werkstatt des Instituts für Physikalische Chemie für Entwurf und Bau essentieller Bauteile des Mikroskops, wodurch die Realisierung eines solchen Projektes erst möglich wurde.

Herr R. Paulig aus der Elektronikwerkstatt des Instituts für Physikalische Chemie für die freundliche und kompetente Beratung bei Fragen bezüglich der Elektronik.

Herrn W. Wendler für die Unterstützung bei der Planung des Mikroskops.

Meinen Bürokollegen Tim Kaminski und Jan-Hendrik Spille für die freundliche Zusammenarbeit und fachlich anregende Diskussionen. Insbesondere möchte ich Tim für die Bereitstellung der *C. tentans* Speicheldrüse danken sowie für die Hilfe bei der Formatierung in L^AT_EX.

Herr Dr. W. Gräwe von Hamamatsu KK dafür, dass uns die sCMOS Kameras der Orca Flash Reihe zur Verfügung gestellt wurden. Insbesondere möchte ich mich für die freundliche und schnelle Antwort bei Fragen und Anregungen und die ausgezeichnete Kooperation bedanken.

Herr. H. Herrmann von Hamamatsu KK für seine Zeit und Geduld mich bei Fragen bezüglich der Kamerasoftware und deren Einbindung in LabView zu beraten.

Herr Dr. Spiecker und Herr Dr. Schütte von LaVision BioTec für die Anregung zu dieser Arbeit.

Prof. Dr. Benjamin Odermatt und Dr. Changsheng Liu für die sehr freundliche Zusammenarbeit, das Korrekturlesen und für die Versorgung mit Zebrafisch-Larven, die sich als ideale Probe für das konfokale L^SFM herausstellten.

Meinem guten Freund Alexander Hullmann möchte ich für anregende Diskussionen insbesondere bezüglich mathematischer und numerischer Fragen danken.

Eymen Alyaz und Roman Veith danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe *Biophysikalische Chemie* für die freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Meiner Mutter, meinem Vater und meiner Schwester möchte ich für die fortwährende Unterstützung während der ganzen Jahre meines Studiums und meiner Dissertation danken, denn das wertvollste im Leben ist die Familie.

Und ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Sarah bedanken, der diese Arbeit gewidmet ist. Danke für die Unterstützung, die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit, für die Geduld und stellvertretend für alles Andere einfach dafür, dass es sie gibt.
