

Entwicklung eines Airystrahl-Lichtscheibenmikroskops in Verbindung mit einer Deep Learning-basierten Bildoptimierung

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anne Stockhausen
aus Bergisch Gladbach

Bonn, September 2023

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: 05.12.23
Erscheinungsjahr: 2024

Zusammenfassung

Für die Erforschung und das Verständnis komplexer Strukturen im Gehirn ist die Erfassung sowohl kleinster Details als auch ganzer Hirnareale notwendig. Die Umsetzung dieser Kombination von hoher Auflösung und großem Sichtfeld ist bei herkömmlichen Mikroskopaufbauten eine Herausforderung. Selbst in einem Lichtscheibenmikroskop, welches durch Anregung einer einzelnen Schicht kontrastreiche Mikroskopiebilder erzeugen kann, besteht aufgrund der Divergenz des anregenden Gaußstrahls ein Kompromiss zwischen Lichtblattstärke und nutzbarem Sichtfeld.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Airystrahl-Lichtscheibenmikroskop entworfen und aufgebaut. Die Verwendung des Airystrahls ermöglicht durch die geringe Strahldivergenz eine Vergrößerung des Sichtfelds um den Faktor neun und damit eine Verkürzung der Messzeit. Im Aufbau wird der Airystrahl durch einen Lichtmodulator erzeugt, auf welchen das charakteristische Phasenmuster projiziert wird. Zur Aufnahme biologischer Proben und für einen effektiven Aufnahmeprozess wurde sowohl die Möglichkeit zur volumetrischen Messung als auch eine simultane Aufnahme von zwei Farbkanälen im Aufbau umgesetzt.

Der Airystrahl bietet den Vorteil einer gleichmäßigen Ausleuchtung über ein großes Feld, gleichzeitig weist das Strahlprofil Seitenmaxima auf, die den Bildkontrast durch Anregung von Regionen außerhalb der Fokusebene beeinträchtigen. Dieser Effekt kann durch die Anwendung eines Dekonvolutionsalgorithmus in der Nachbearbeitung der Bilder minimiert werden. Eine traditionelle Dekonvolution kann in der Regel nur unter Kenntnis physikalischer Bildgebungseigenschaften, speziell der Punktspreizfunktion (PSF), durchgeführt werden. Diese ist allerdings sowohl theoretisch als auch experimentell aufwendig zu ermitteln. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine auf Deep Learning basierende Dekonvolution entwickelt, welche keine Information über die PSF erfordert.

Die Architektur der Deep Learning Dekonvolution ist auf der Grundlage eines sogenannten Pix2Pix GANs aufgebaut. Zum Training des Algorithmus werden Bilder verwendet, welche mit Gaußstrahlanregung und zusätzlicher Vergrößerung im Mikroskop aufgenommen wurden. Sie weisen in einem kleinen Sichtfeld eine gute Auflösung und einen guten Bildkontrast auf, allerdings ist die Erzeugung dieser Trainingsdaten vergleichsweise zeitaufwendig.

Um die Leistung der Deep Learning Dekonvolution zu untersuchen, wurde diese sowohl auf simulierte Daten als auch auf Bilder biologischer Proben angewendet. Hierfür wurden Bilder von Maushirnschnitten aufgenommen und analysiert. Mit Hilfe des entwickelten Algorithmus ist es möglich, die Qualität der Airystrahl-beleuchteten Bilder deutlich zu verbessern. Im Vergleich zur traditionellen Richardson-Lucy Dekonvolution konnten sowohl verbesserte Ergebnisse als auch eine Verkürzung der Mess- und Verarbeitungszeit verifiziert und quantifiziert werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation	9
2	Theorie	13
2.1	Fluoreszenzmikroskopie	13
2.1.1	Lichtscheibenmikroskopie	14
2.1.2	Räumlicher Lichtmodulator	15
2.2	Deep Learning	15
2.2.1	Definitionen und Funktionen	15
2.2.2	Aufbau neuronaler Netze	16
2.2.3	Convolutional Neural Network	18
2.2.4	Generative Adversarial Network	19
3	Simulation	21
3.1	Simulation des Airystrahls	21
3.2	Phasenmuster	22
3.2.1	Erzeugung	22
3.2.2	Parameterbestimmung	24
3.2.3	Korrekturen des Phasenmusters	26
3.3	Simulation des Gaußstrahls	28
3.4	Punktspreizfunktion	30
3.4.1	Optische Auflösung	30
3.4.2	Kameraauflösung	32
3.5	Dekonvolution	35
3.5.1	Optische Transferfunktion	35
3.5.2	Richardson-Lucy Dekonvolution	36
4	Charakterisierung des Mikroskops	39
4.1	Aufbau	39
4.1.1	Beleuchtung	40
4.1.2	Probenkammer	42
4.1.3	Detektion	44
4.1.4	Elektronische Komponenten	45
4.1.5	Software und SLM	46
4.2	Optische Eigenschaften	50
4.2.1	Strahlprofile	50
4.2.2	Auflösung	53
4.2.3	Kontrast	54
4.2.4	Einfluss verschiedener Wellenlängen	56

4.2.5	Bildaufnahmerate	58
5	Deep Learning Algorithmus	61
5.1	Motivation und Prinzip	61
5.1.1	Pix2Pix GAN	62
5.1.2	Voraussetzungen in Tensorflow und Keras	63
5.2	Aufbau	63
5.2.1	Übergeordnete Architektur	63
5.2.2	Generator	65
5.2.3	Diskriminator	68
5.2.4	Verlustfunktionen und Trainingsprozess	68
5.2.5	Graphische Benutzeroberfläche	70
5.3	Simulierte Ergebnisse	71
5.3.1	Vorbereitung	71
5.3.2	Training	72
5.3.3	Auswertung	72
6	Biologische Anwendung	75
6.1	Datenaufnahme	75
6.1.1	Probenpräparation	75
6.1.2	Mikroskopaufnahme	77
6.2	Training und finale GAN Anwendung	78
6.2.1	Datenvorbereitung und Trainingsprozess	78
6.2.2	Vergleich zur Richardson-Lucy Dekonvolution	80
6.3	Ergebnisse und Auswertung	81
6.3.1	Evaluation der Deep Learning Dekonvolution	82
6.3.2	Verarbeitungsgeschwindigkeit	86
6.4	Spezialfälle	88
6.4.1	Anwendung auf andere Strukturen	89
6.4.2	Anwendung auf weitere Bildgebungsmodalitäten	90
7	Diskussion	93
7.1	Simulation	93
7.2	Mikroskopie	95
7.3	Deep Learning Dekonvolution	97
7.4	Fazit	99
A	Anhang	101
A1	Liste der verwendeten Bauteile und Geräte	101
A2	Technische Details für das Deep Learning Programm	103
A2.1	PC und Programmierumgebung	103
A2.2	Python Module	103

Kapitel 1

Einleitung und Motivation

Die Erforschung von Strukturen und Prozessen im Mikrometerbereich fasziniert die Menschen seit vielen Jahrhunderten. So wurde das erste zusammengesetzte Mikroskop aus mehreren Linsen im 16. Jahrhundert gebaut [1]. Die Entwicklung von immer besseren und komplexeren Mikroskopen führte so zu vielen Erkenntnissen im Bereich der Chemie, Biologie und Physik. In der Neurobiologie bildet besonders die Fluoreszenzmikroskopie eine der wichtigsten und grundlegendsten Techniken zur gezielten Abbildung von Gewebe und Strukturen [2]. Insbesondere die Kombination von Optik und Informatik bietet dabei ein großes Potential zur Verbesserung von Auflösung und Bildqualität. [3, 4, 5]

Eine Herausforderung in der Bildgebung ist die Abbildung großer, ausgedehnter Proben in möglichst kurzer Zeit und mit hoher Auflösung. Während schnelle Methoden wie die Weitfeldmikroskopie meist keinen hohen Bildkontrast erreichen, führen hochauflösende Mikroskopietechniken zu langen Aufnahmezeiten. Beide Vorzüge werden hingegen in der Lichtscheibenmikroskopie kombiniert [6]. Damit ist die Erzeugung dreidimensionaler Bilder in guter Auflösung und hohem Bildkontrast in Echtzeit möglich. In einem Lichtscheibenmikroskop sind Anregungs- und Detektionsstrahlengang entkoppelt. Im Anregungsstrahlengang wird aus dem Strahl ein dünnes Lichtblatt erzeugt, welches mit der fokalen Ebene des Detektionsobjektivs überlagert ist. Die Detektion ist senkrecht zur Beleuchtung angeordnet. Durch die Anregung einer einzelnen Schicht wird ein optischer Schnitt erzeugt und das Fluoreszenzsignal von Regionen außerhalb des Fokus deutlich minimiert. Gleichzeitig wird das gesamte Sichtfeld in einem Bild beleuchtet und aufgenommen, was zu einer hohen Bildaufnahmefrequenz führt. [7, 8]

Als Anregungsstrahlprofil wird typischerweise ein Gaußstrahl verwendet. Zur Erzeugung des Lichtblattes wird dieser dann transversal bewegt, sodass über die Belichtungszeit integriert, ein Lichtblatt entsteht [9]. Prinzipiell soll der Strahl einen möglichst geringen Durchmesser aufweisen, da die Lichtblattdicke die Dicke des optischen Schnittes bestimmt und somit den Kontrast des resultierenden Bildes beeinflusst. Der Gaußstrahl besitzt allerdings die Eigenschaft der Divergenz. Der Radius des Strahls vergrößert sich mit zunehmendem Abstand zur Strahltaille. Durch die Aufweitung des Strahls nimmt die Intensität entlang der optischen Achse ab. Je schmaler die Strahltaille, desto stärker ist dieser Effekt (s. Abb. 1.1). Ein stark divergierender Strahl führt also zu einer inhomogenen Beleuchtung und zusätzlich außerhalb der Strahltaille zur Fluoreszenzanregung abseits der Fokusebene. Für den Gaußstrahl muss also ein Kompromiss gefunden werden: Der Strahl sollte so schmal sein, dass ein dünnes Lichtblatt und dementsprechend

ein Bild mit hohem Kontrast entsteht, gleichzeitig sollte der Durchmesser so gewählt werden, dass eine gleichmäßige Beleuchtung über ein großes Sichtfeld erzielt wird.

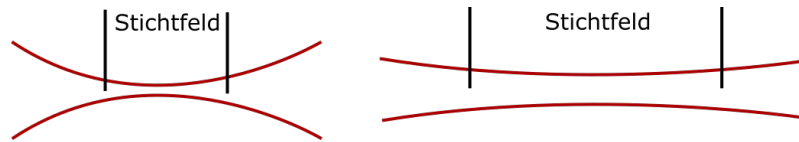


Abbildung 1.1: Ein Gaußstrahl mit einer kleinen Strahltaile divergiert nach einer kurzen Distanz und kann daher nur in einem kleinen Sichtfeld verwendet werden. Die Strahltaile skaliert mit der Länge des Strahls.

Als Alternative zum Gaußstrahl kann der propagationsinvariante Airystrahl zur Anregung verwendet werden [10]. Im Vergleich zum Gaußstrahl weist dieses Strahlprofil eine sehr geringe Divergenz auf, sodass ein vergrößertes Sichtfeld in Kombination mit einem dünnen Lichtblatt realisiert werden kann. Um einen Airystrahl zu erzeugen, kann das charakteristische Phasenprofil verwendet werden. Der Airystrahl wird mit Hilfe der raumabhängigen Phasenverzögerung aus dem Gaußstrahl generiert. Die Verwendung des Airystrahls und die damit verbundene Sichtfeldvergrößerung im Mikroskop hat unterschiedliche Einflüsse auf die Abbildungseigenschaften: Die technische Realisierung des großen Sichtfeldes durch eine geringere Gesamtvergrößerung führt zu einer vergrößerten Objektpixelgröße [11]. Durch die resultierende geringere Abtastrate verschlechtert sich die Auflösung. Zusätzlich entstehen durch das Airystrahlprofil Seitenmaxima, die den Kontrast des Bildes verschlechtern.

Um neben dem großen Sichtfeld und der damit verbundenen hohen Aufnahmegeschwindigkeit auch eine gute Bildqualität zu erhalten, kann eine Dekonvolution („Entfaltung“) durchgeführt werden, welche Auflösung und Kontrast der Bilder verbessert [12]. Es existieren zahlreiche Ansätze zur Verbesserung des ursprünglichen Signals. Die Methoden unterscheiden sich dabei in ihren mathematischen Ansätzen, ihrer Komplexität und der benötigten Rechenleistung. [13, 14, 15]

Für eine klassische numerische Dekonvolution ist die Kenntnis der Punktspreizfunktion (PSF) des abbildenden Systems erforderlich. Diese kann entweder gemessen oder theoretisch bestimmt werden. Die PSF variiert je nach der genauen Justierung des Mikroskops und wird durch optische Aberrationen beeinflusst, sodass nur eine Annäherung an die reale Mikroskop-PSF möglich ist. Außerdem enthält auch eine gemessene PSF nicht notwendigerweise alle Informationen über Bildverschlechterungen, da Faktoren wie Kontrast und Rauschen stark von den abgebildeten Strukturen und der Qualität der Fluoreszenzmarkierung abhängig sind [16]. Ziel war es daher, eine Methode zu finden, mit der die Bildqualität verbessert werden kann, ohne dass die PSF bekannt sein muss.

Zu diesem Zweck wurden Blind-Dekonvolutionsalgorithmen entwickelt, die nicht nur darauf abzielen, das ursprüngliche Signal wiederherzustellen, sondern auch die entsprechende PSF zu bestimmen [17]. Allerdings benötigen auch diese mathematisch komplexen Algorithmen eine erste Abschätzung der PSF, von der ausgehend in einem iterativen Prozess Ursprungsbild und finale PSF rekonstruiert werden. Hierbei ist eine Konvergenz gegen die reale PSF und somit auch gegen das tatsächliche Signal nicht garantiert, sodass diese Methoden oft nicht zuverlässig angewendet werden können [18].

Deep Learning eröffnet eine Lösung für dieses Problem. Auf künstlicher Intelligenz basierende Analyseverfahren wurden insbesondere in den letzten Jahren in verschiedenen Anwendungsbereichen der Mikroskopie wie Segmentierung, Klassifikation oder auch Bildverbesserung eingesetzt [19, 20, 21]. Deep Learning bietet ein großes Potential, da diese Algorithmen in der Lage sind, komplexe Muster in Daten zu erkennen und so Informationen aus den Bildern zu extrahieren. Zusätzlich kann die Anwendung von Deep Learning trainierten Modellen schneller als herkömmliche Verfahren sein. Besonders in der Bildverarbeitung sind meist sehr rechenaufwendige Schritte notwendig, welche durch Deep Learning beschleunigt und automatisiert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Deep Learning-basierte Dekonvolution zur Kontrastverbesserung der mit dem Airystrahl-Lichtscheibenmikroskop aufgenommenen Bilder entwickelt. Weder für das Training noch für die Anwendung dieser Dekonvolution ist die Angabe der PSF oder anderer physikalischer Bildgebungsbedingungen notwendig. Zur Aufnahme geeigneter Trainingsdaten wurden Bilder mit Gaußstrahlbeleuchtung aufgenommen, was zwar sehr zeitaufwändig ist, allerdings beinhalten die Bilder einen höheren Kontrast sowie eine kleinere Objektpixelgröße, was bei diesen Bildern zu einer besseren Auflösung führt. Diese Trainingsbilder werden verwendet, um ein generatives adversariales Netzwerk (GAN) zu trainieren. Dafür werden die Airystrahl-beleuchteten Bilder in einem ersten Schritt bikubisch hochskaliert und anschließend mit dem GAN verbessert. Neben der erreichten Kontrastverbesserung zeigt sich eine um den Faktor 20 verringerte Verarbeitungszeit im Vergleich zur traditionellen Richardson-Lucy Dekonvolution [22, 23].

In dieser Arbeit wird die Anwendung eines Airystrahls in einem Lichtscheibenmikroskop zunächst simuliert. Dafür wird besonders die Generierung des Strahls mit Hilfe des Phasenmusters betrachtet, um die Auswirkungen der Parameter auf den entstehenden Airystrahl zu verdeutlichen. Zusätzlich wird die Mikroskop-PSF untersucht, um den Einfluss von Strahlprofil und Vergrößerung auf die Auflösung zu analysieren.

Zunächst wird der Aufbau des Airystrahl-Lichtscheibenmikroskops inklusive Beleuchtung, Detektion und Steuerungssoftware im Detail beschrieben. Zur Analyse der optischen Eigenschaften wurden Strahlprofile, Auflösung und Kontrast gemessen und jeweils für Gauß- bzw. Airystrahlbeleuchtung verglichen.

Im dritten Teil dieser Arbeit wird der Deep Learning Algorithmus genauer erläutert. Dabei wird die Architektur des GANs sowie der Trainingsprozess präsentiert, um einen genauen Einblick in den Ablauf der Deep Learning Dekonvolution zu geben. Sie wird mit simulierten Daten getestet und im finalen Teil wird die biologische Anwendung von Mikroskop und Dekonvolution für drei Maushirnprouben demonstriert. Probenpräparation, Training und Anwendung der Deep Learning Dekonvolution werden beschrieben und schließlich die Ergebnisse bezüglich der erzielten Kontrastverbesserung, der Verarbeitungszeit und weiterer Anwendungsmöglichkeiten erläutert.

Kapitel 2

Theorie

In diesem Kapitel werden einige theoretische Grundlagen im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie beschrieben. Dabei wird insbesondere auf die Funktionsweise der Lichtscheibenmikroskopie eingegangen. Zusätzlich wird Deep Learning als Teilbereich des maschinellen Lernens vorgestellt und wichtige Bestandteile neuronaler Netzwerke erläutert.

2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Um ein vergrößertes Bild eines Objektes zu erhalten, werden im einfachsten Fall nur zwei Linsen benötigt. Dadurch wird eine typische Vergrößerung von bis zu einem Faktor 100 erreicht [24]. Moderne Lichtmikroskope bestehen hingegen aus einer Vielzahl von optischen Elementen, mit denen Abbildungsfehler reduziert und die Auflösung von Details im Bild verbessert werden [25].

Eine spezielle Form der Lichtmikroskopie ist die Fluoreszenzmikroskopie, bei der durch spezifische Fluoreszenzmarkierung bestimmte Strukturen gezielt sichtbar gemacht werden können. Dazu werden Fluorophore in einer Probe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, wodurch Photonen einer höheren Wellenlänge emittiert werden. Das emittierte Licht wird detektiert, sodass Bilder mit hellen Strukturen auf dunklem Hintergrund entstehen, die als sehr kontrastreich wahrgenommen werden [26].

Die einfachste Version eines Fluoreszenzmikroskops ist ein Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskop. Licht eines Lasers oder einer Lampe wird von einem dichroitischen Spiegel reflektiert und durch ein Objektiv auf eine Probe geleitet, welche dadurch zum Leuchten angeregt wird. Das Fluoreszenzlicht passiert das Objektiv und den dichroitischen Spiegel und wird von einer Kamera detektiert. Durch diesen Aufbau wird die komplette Probe beleuchtet, allerdings wird nur das Fluoreszenzlicht aus der fokalen Ebene des Objektivs scharf auf der Kamera abgebildet. Licht von außerhalb der Fokusebene führt zu einem diffusen Hintergrundleuchten, welches den Kontrast des Bildes verschlechtert. [27]

Bei einem konfokalen Mikroskop wird dieser Effekt vermieden, indem zusätzliche Lochblenden in den Strahlengang eingefügt werden, welche die Detektion von Licht von außerhalb der Fokusebene unterdrücken. Das führt zu einem deutlich geringeren Hintergrundsignal und einer verbesserten Auflösung. Um trotzdem Bilder der kompletten Probe zu erhalten, muss der Laserstrahl über die Probe gerastert werden oder alternativ die Probe durch den Laserstrahl bewegt werden. Die gesamte Probe kann also nicht in einer Aufnahme abgebildet werden, wodurch diese Methode zeitaufwändiger ist. [27]

2.1.1 Lichtscheibenmikroskopie

Jan Husiken et al. entwickelten 2004 die Methode der Lichtscheibenmikroskopie, welche sowohl Probenaufnahmen mit hohem Kontrast als auch mit hoher Aufnahmezeit liefern kann [7]. Dafür werden Anregungs- und Detektionsstrahlengang entkoppelt. Der Anregungslaser wird zu einem dünnen Lichtblatt geformt, welches so positioniert ist, dass es in der fokalen Ebene des Detektionsobjektivs liegt. So wird die komplette fokale Ebene beleuchtet und kann mit einer Kamera aufgenommen werden (s. Abb. 2.1). Der Bereich ober- und unterhalb dieser Ebene bleibt unbeleuchtet, wodurch der Signalanteil von außerhalb der fokalen Ebene minimiert wird und die Mikroskopiebilder einen hohen Kontrast aufweisen. Lichtscheibenmikroskopie ist sehr schonend für empfindliche biologische Proben, da nur der Bereich beleuchtet wird, der auch in diesem Moment scharf abgebildet wird. [28]

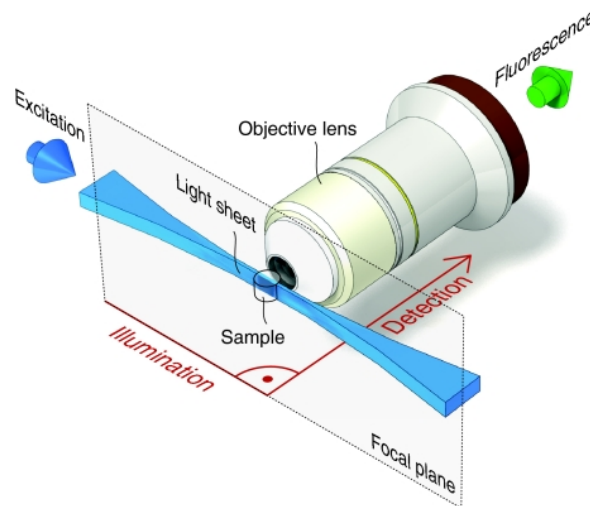


Abbildung 2.1: Prinzip der Lichtscheibenmikroskopie: In einem Lichtscheibenmikroskop liegen Anregungs- und Beleuchtungsrichtung orthogonal zueinander. Die Probe wird durch ein dünnes Lichtblatt angeregt, welches mit der fokalen Ebene des Detektorobjektivs überlagert ist, wodurch die Anregung außerhalb der fokalen Ebene minimiert wird. Entnommen aus [29]

Es gibt zwei Möglichkeiten, um das Lichtblatt zu formen: Entweder kann eine zylindrische Linse verwendet werden, welche den Laserstrahl nur in einer Richtung fokussiert. Alternativ kann der Laser schnell entlang der Blattebene bewegt bzw. gescannt werden, wodurch über die Belichtungsdauer der Kamera gemittelt ein sogenanntes virtuelles Lichtblatt entsteht. Dazu wird meist ein elektronisch beweglicher Spiegel verwendet, welcher den Strahl entsprechend bewegt. Diese Methode ist etwas langsamer, da das Lichtblatt während der Aufnahme erzeugt wird, allerdings ist die Intensität über das Lichtblatt weitgehend konstant. [30]

Um 3D Aufnahmen einer Probe zu ermöglichen, wird die Probe entlang der Detektionsrichtung durch das Lichtblatt bewegt. Dadurch wird eine andere Ebene beleuchtet und abgebildet. Aus dem resultierenden Bildstapel können in jeder Dimension Informationen über die räumliche Struktur der Proben gewonnen werden. [6]

2.1.2 Räumlicher Lichtmodulator

In dieser Arbeit wird ein Lichtmodulator (engl. *Spatial Light Modulator*, SLM) zur Erzeugung eines Airystrahls verwendet. Unter Lichtmodulatoren versteht man sowohl adaptive Geräte wie digitale oder verformbare Spiegel oder, wie in dieser Arbeit verwendet, Flüssigkristalllichtmodulatoren [31]. Die Funktionsweise ist in Abbildung 2.2 dargestellt und wird im Folgenden kurz erläutert.

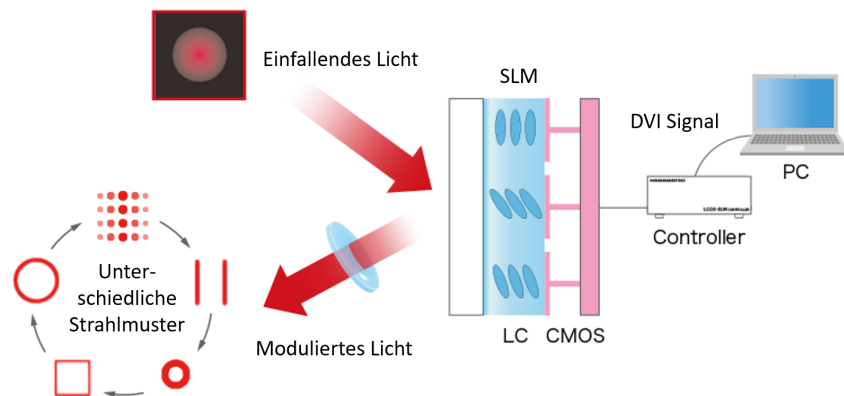


Abbildung 2.2: Funktionsweise eines SLMs: Der optische Weg des einfallenden Lichts wird durch Doppelbrechung verzögert. Dazu wird die Orientierung von Flüssigkristallen (engl. *liquid crystal*, LC) pixelweise über eine Spannung moduliert, sodass sich die Phasenverteilung des reflektierten Lichtstrahls entsprechend verändert. Modifiziert nach [32]

Der einfallende Laserstrahl besitzt typischerweise eine gaußförmige Intensitätsverteilung und sollte linear polarisiert sein. Auf der aktiven Fläche des SLMs befinden sich separat ansteuerbare Pixel aus Flüssigkristallen. Beim Auftreffen auf den SLM durchläuft der Lichtstrahl eine Schicht dieser Kristalle, welche doppelbrechende Eigenschaften besitzen. Durch ein anliegendes elektrisches Feld kann die Ausrichtung der Kristalle in jedem Pixel variiert werden, wodurch es zu einer Veränderung des Brechungsindex kommt und dementsprechend der optische Weg des Lichtes verlängert wird. Auf der Rückseite des Chips wird das Licht reflektiert. So kann die Phase pixelweise um bis zu 2π moduliert werden. [33]

Der Einsatz von SLMs im Strahlengang des Mikroskops basiert auf der Fourieroptik: Der SLM wird konjugiert zur hinteren fokalen Ebene des Beleuchtungsobjektivs positioniert. Wird dort durch den SLM die Phase beeinflusst, ändert sich die Intensitätsverteilung des Strahls entsprechend einer Fouriertransformation in der vorderen fokalen Ebene, welche der Objektebene entspricht. [31]

2.2 Deep Learning

2.2.1 Definitionen und Funktionen

Deep Learning ist ein Teilbereich des maschinellen Lernens, welches wiederum einen Teilbereich der künstlichen Intelligenz bildet. Künstliche Intelligenz im Allgemeinen umfasst viele Ansätze, die nicht mit einem Lernmechanismus, sondern mit kodifizierten Regeln arbeiten. Diese expliziten Regeln stoßen bei komplexen, ungenau definierten Problemen an ihre Grenzen, sodass der Ansatz des maschinellen Lernens entstand.

Die Grundidee des maschinellen Lernens basiert auf der Frage, ob Computer selbstständig lernen können, eine bestimmte Aufgabe zu lösen, ohne dass eine spezielle Vorgehensweise gegeben ist. Dabei erhält der Computer lediglich die entsprechenden Daten und bildet auf Basis dieser Daten seinen Lösungsweg. Dementsprechend wird also ein System, welches mit maschinellem Lernen arbeitet, nicht explizit programmiert, sondern trainiert. Deep Learning ist dabei eine spezielle Art des Lernens, wobei in den entsprechenden Modellen mehrere einzelne Schichten, sogenannte *Layers*, verwendet werden, welche die Daten in die entsprechende Zieldarstellung transformieren. Die Kombination dieser Schichten mit verschiedenen Funktionen und Verknüpfungen nennt sich neuronales Netz (engl. *neural network*). [34]

2.2.2 Aufbau neuronaler Netze

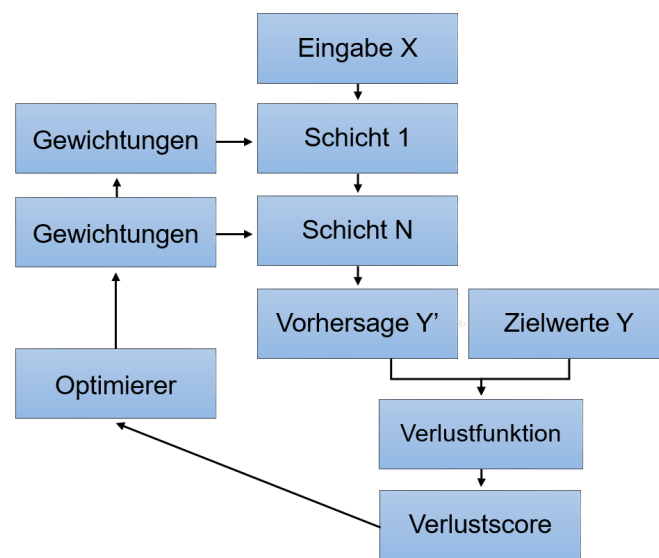
Im Folgenden werden verschiedene wichtige Begriffe des maschinellen Lernens eingeführt. Die einzelnen Komponenten eines neuronalen Netzes sind in 2.3 (a) abgebildet. Das Ziel eines Deep Learning Algorithmus ist es, ein trainiertes Modell zu erstellen, welches aus Daten, wie beispielsweise Bildern, lernen kann und diese auf definierte Weise umwandelt. Dabei bestimmen Gewichtungen, was mit den Eingabedaten in den einzelnen Schichten passiert, die Schichten werden also durch die Gewichtungen parametrisiert. Während des Trainingsprozesses werden die Gewichtungen immer wieder angepasst, bis die Transformation der Daten in die entsprechende Zieldarstellung erfolgt ist. Ein Verlustscore wird über eine Verlustfunktion bestimmt, um ein Maß zu erhalten, ob die durchgeführte Transformation zum richtigen Ziel führt. Diese Funktion vergleicht die tatsächlichen Zielwerte mit dem in diesem Trainingsschritt erzielten Ergebnis. Über den Verlustscore kann Feedback an die Gewichtungen gegeben werden. Diese werden daraufhin über einen sogenannten *Optimierer* angepasst. [34]

Um den Trainingsprozess und die Funktionen der einzelnen Bausteine genauer zu verstehen, betrachten wir ein anschauliches neuronales Netz als Beispiel: Ein klassifizierendes *Multilayer Perceptron* (MLP) [37]. Eine vereinfachte Darstellung ist in Abb. 2.3 (b) abgebildet. In diesem Fall soll aus Bildern bestimmt werden, ob diese eine Katze oder einen Hund zeigen. Da solche Darstellungen sehr unterschiedliche Gestalten haben können, ist das in einem Standardalgorithmus schwer zu programmieren. Um ein neuronales Netz für diese Aufgabe zu trainieren, braucht es sehr viele Beispielsbilder, zu welchen die passende Ausgabe (in diesem Fall ‚Katze‘ bzw. ‚Hund‘) zugeordnet ist.

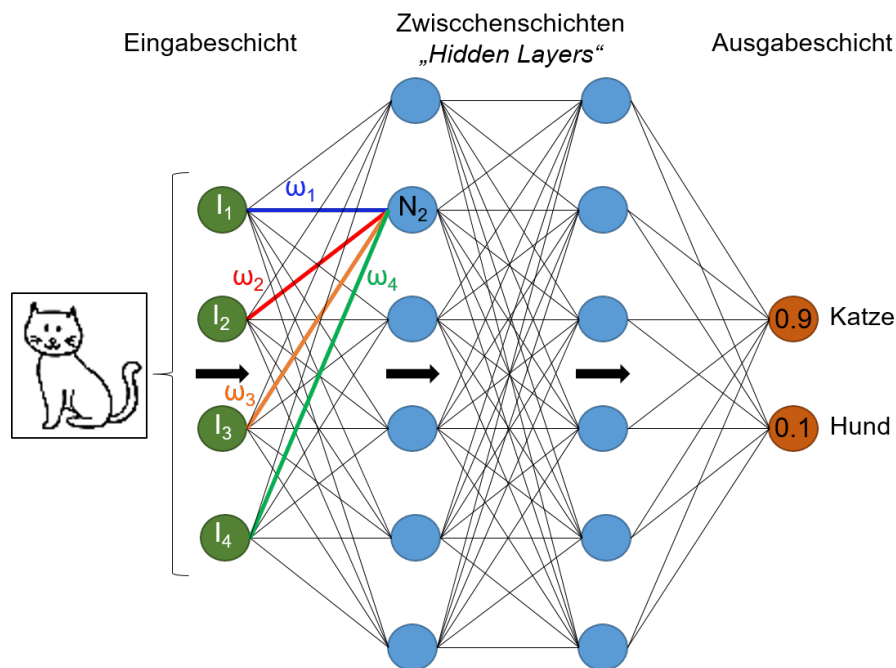
Die Pixelwerte eines Bildes bilden die erste Schicht des neuronalen Netzes. Darauf folgen sogenannte *Hidden Layers*, welche aus einzelnen Knoten, sogenannten Neuronen, bestehen, die untereinander verknüpft sind. Jeder dieser Verknüpfungen ist eine Gewichtung zugeordnet, welche steuert, wie stark sich der Wert eines Neurons, die *Aktivierung*, auf die Neuronen der nächsten Schicht auswirkt. Das Eingangssignal jedes Knotens wird also durch die gewichtete Summe der vorherigen Knoten festgelegt. Zusätzlich wird darauf eine Aktivierungsfunktion angewendet. Diese kann zum Beispiel die Sigmoid Funktion σ sein, welche Werte auf den Bereich $[0,1]$ abbildet und somit geeignet ist, um Wahrscheinlichkeiten anzugeben. So ergibt sich der Wert eines Knotens N aus den Werten I der Neuronen der vorherigen Schicht (vgl. Abb 2.3 (b)):

$$N_2 = \sigma(w_1 I_1 + w_2 I_2 + w_3 I_3 + w_4 I_4 - b)$$

Dabei gibt b einen Offset für die Aktivierung des Neurons an und w die einzelnen Gewichtungen. Mit diesen Parametern werden die Werte der Knoten für jede Schicht bestimmt.



(a)



(b)

Abbildung 2.3: (a) Aufbau und Bestandteile eines neuronalen Netzes: Um von den Ursprungsdaten (X) auf die Zielrepräsentation der Daten zu kommen, durchlaufen die Daten mehrere Schichten, wobei während des Trainings die Gewichtungen der einzelnen Schritte so angepasst werden, dass das gewünschte Ergebnis erreicht wird. Um zu lernen, ob die durchgeführte Transformation zum richtigen Ergebnis führt, wird eine Verlustfunktion gegeben, welche die Vorhersage Y' mit den Zielwerten Y vergleicht. Die Gewichtungen werden auf Basis des Verlustes aktualisiert und zwar um einen Faktor, der durch den Optimierer festgelegt wird. Selbsterstellt nach [35] (b) Ein einfaches Beispiel für ein neuronales Netz: Als Eingangswerte werden die Pixelwerte des zu klassifizierenden Bildes verwendet. In den darauf folgenden Schichten werden diese Werte über Gewichtungen parametrisiert, bis in der letzten Schicht eine Ausgabe in Form einer Wahrscheinlichkeit angegeben ist. Selbsterstellt nach [36]

[38]

Die letzte Schicht bildet die Ausgabe, welche die Wahrscheinlichkeit für jede verfügbare Kategorie angibt. Um zu bestimmen, ob diese Vorhersage dem gewünschten Ergebnis entspricht, wird die Verlustfunktion V berechnet, welche zum Beispiel die mittlere quadrierte Abweichung von Vorhersage Y' und Zielwert Y sein kann [36]:

$$V = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Y_i - Y'_i)^2$$

Hierbei gibt n die Anzahl der möglichen Ausgangswerte an, wobei im betrachteten Beispiel $n = 2$ wäre. Das Ziel des Netzwerkes ist es, die Gewichtungen und Offsets so zu modifizieren, dass der Verlust minimiert wird. Dafür verwendet man eine Optimierungsfunktion. Diese bestimmt, wie stark und in welche Richtung die Gewichtungen für einen möglichst effektiven Lernprozess angepasst werden. Das einfachste Beispiel für einen Optimierer ist der Gradientenabstieg. Im Minimum einer Funktion ist die Steigung Null, was auch für die Verlustfunktion gilt. Wenn die Gewichtungen so angepasst werden, dass der Gradient kleiner wird, dann nähert sich der Verlust dem Minimum. Da bei dieser Methode der Gradient für den gesamten Datensatz und alle Parameter in einer Aktualisierung berechnet wird, ist die Berechnung sehr langsam und braucht viel Rechenleistung [39]. Daher wurden deutlich effektivere Methoden entwickelt, unter anderem der *Adam-Optimierer*, welcher in Kapitel 5.2.4 näher beschrieben wird.

Am Anfang des Trainings sind die Gewichtungen meist zufällig, wodurch die durchgeführte Transformation weit entfernt vom gewünschten Ergebnis und daher der Verlustscore sehr hoch ist. Mit jedem Trainingsschritt und jedem erhaltenen Beispiel werden die Gewichtungen modifiziert und damit der Verlust minimiert. Die Ausgabe verbessert sich, sodass nach vielen Durchläufen mit unterschiedlichen Beispielen ein trainiertes Netzwerk die Transformation in die gewünschte Zieldarstellung (in unserem Beispiel die Klassifizierung in ‚Hund‘/‚Katze‘) zuverlässig durchführen kann und über das neuronale Netz eine Beziehung zwischen Ein- und Ausgabe modelliert werden kann. [38]

2.2.3 Convolutional Neural Network

Ein *Convolutional Neural Network* (dt. faltendes neuronales Netz, CNN) ist eine spezielle Netzwerkstruktur, bei dem die einzelnen Schichten durch eine Faltung bestimmt werden. Diese Struktur eignet sich besonders für Bildbearbeitungsaufgaben. Da in einem MLP ein Neuron mit allen Neuronen der vorherigen und nächsten Schicht verbunden sind (*Fully Connected Layer*), ergeben sich bei Bildern mit vielen Pixeln schnell eine hohe Anzahl von Gewichtungen, was zu einem sehr dichten Netz führt, welches nicht effektiv trainiert werden kann. Typische Probleme sind Überanpassung oder fehlende Translationsinvarianz. [40]

Das Eingabebild in einem CNN wird Abschnitt für Abschnitt mit einem Faltungskernel gefaltet. Dieses ist eine kleinere 2D Matrix, mit welcher für den jeweiligen Bildabschnitt das innere Produkt bestimmt wird (s. Abb. 2.4). Durch die Anwendung verschiedener Filter entstehen sogenannte *Feature Maps*, welche unterschiedliche Merkmale des Bildes extrahieren. [41]

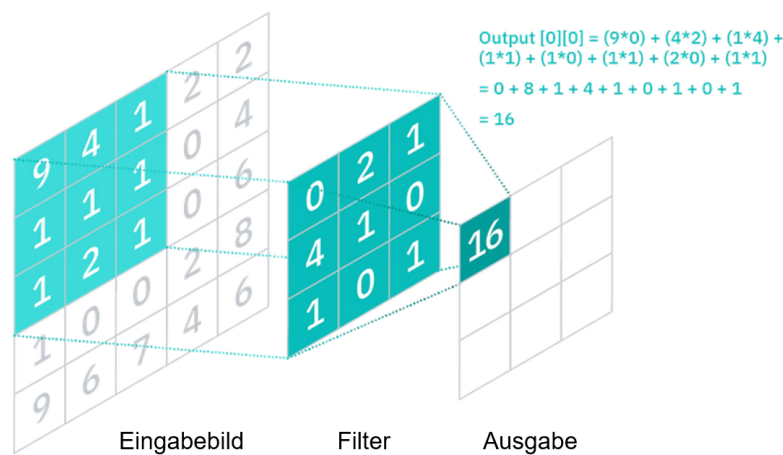


Abbildung 2.4: Faltungsschicht: Das Eingangsbild wird abschnittsweise mit einem Filterkernel gefaltet. Dadurch entstehen Feature Maps, welche einzelne Bestandteile des Bildes charakterisieren. [42]

Auf eine Faltungsschicht folgt meist eine *Pooling*-Operation, welche die Dimension der *Feature Maps* reduziert. Dafür wird zum Beispiel aus jedem 2×2 Pixel Bereich nur der Maximalwert übernommen. Durch dieses Herunterskalieren wird zum einen eine Überanpassung verhindert und die Komplexität des Netzwerks limitiert. Außerdem decken dadurch folgende Faltungsschichten größere Bereiche des Ursprungsbildes ab, wodurch größere Bestandteile des Bildes erlernt werden können.

Durch Faltungsschichten wird also nicht, wie bei *Fully Connected Layern*, das gesamte Bild erfasst, sondern lokale Muster, aus welchen das Bild zusammengesetzt ist, erlernt. Diese erlernten Muster sind translationsinvariant und außerdem folgen sie einer hierarchischen Reihenfolge, es werden also erst die Form von Kanten, Ecken oder kleineren Bildinhalten erlernt und in folgenden Schichten zunehmend komplexe, abstrakte Gebilde. Diese Form des Lernens ist effizient und ähnelt sehr der menschlichen Weise der visuellen Interpretation. [35]

2.2.4 Generative Adversarial Network

Bisher wurden als Netzwerkstrukturen nur sogenannte diskriminierende bzw. unterscheidende Netzwerke genannt, welche beispielsweise ein Bild nach dessen Inhalt klassifizieren. In dieser Arbeit sollen allerdings verbesserte Bilder generiert werden, welche die Realität wiedergeben, also plausibel sind. Dafür wird ein generierendes Netzwerk benötigt.

Eine sehr erfolgreiche Deep Learning Struktur dafür ist ein *Generative Adversarial Network* (GAN). Diese Struktur wurde 2014 von Ian Goodfellow entwickelt und besteht aus zwei einzelnen Netzwerken: Einem generativen Netzwerk, welches plausible Daten erzeugt, und einem unterscheidenden Netzwerk, welches diese Daten in die Kategorien ‚echt‘ und ‚falsch‘, also künstlich erzeugt, klassifiziert [43].

Das Funktionsprinzip kann man sich als ein Zwei-Spieler-Verfahren vorstellen, in welchem beide Netzwerke im Wettbewerb miteinander stehen und gemeinsam trainiert werden. Die Grundidee ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Am Anfang des Trainingsprozesses erstellt der Generator zufällig Daten (in diesem Fall Bilder), welche nicht annähernd dem gewünschten Ergebnis gleichen. Der Diskriminator erhält sowohl diese generierten Bilder, als auch echte Bilder, welche er zu unterscheiden versucht. Der Diskriminator gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit er ein erhaltenes Bild für echt hält. Basierend auf dieser

Wahrscheinlichkeit wird der Generator aktualisiert. Das generative Netzwerk versucht also, die Bilder so zu erstellen, dass der Diskriminator diese für realistisch befindet. Im Laufe des Trainings optimiert der Generator die Erzeugung dieser Bilder, während der Diskriminator besser darin wird, die Bilder von echten Trainingsdaten zu unterscheiden. Das ideale Ziel des Trainingsprozesses ist es, dass der Generator Bilder liefert, welche von realen Trainingsbildern nicht zu unterscheiden sind, sodass der Diskriminator den Unterschied nicht mehr erkennt und somit eine Wahrscheinlichkeit von 50% für ‚echt‘ beziehungsweise ‚falsch‘ ausgibt. [44],[43]

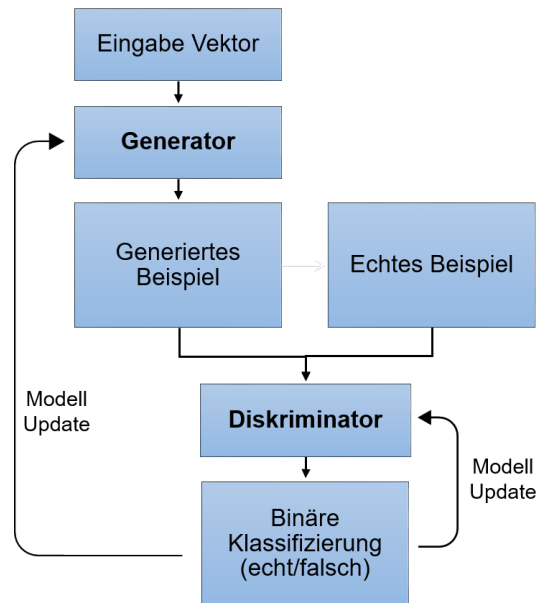


Abbildung 2.5: Aufbau eines GANs: Das generierende Modell erzeugt aus gegebenen Eingaben Beispiele, welche vom unterscheidenden Netzwerk in die Kategorien ‚echt‘/ ‚falsch‘ klassifiziert werden. Dadurch wird Feedback an den Generator gegeben. Im Laufe des Trainings wird der Generator besser in der Datenerzeugung und der Diskriminator besser im Unterscheiden der erhaltenen Daten. Selbsterstellt nach [44]

Kapitel 3

Simulation

Zur Planung und Charakterisierung des Airystrahl-Lichtscheibenmikroskops wurden verschiedene Komponenten und optische Parameter in einer Python-basierten Simulation untersucht. In diesem Kapitel wird das Airystrahlprofil samt der resultierenden PSF betrachtet und die Erzeugung des Airystrahls mittels Phasenmuster erläutert. Als Vorbereitung für die Auswertung der Deep Learning-basierten Bildbearbeitung in Kapitel 6.3 wird außerdem das Prinzip einer Richardson-Lucy Dekonvolution veranschaulicht.

3.1 Simulation des Airystrahls

Im Folgenden wird der Verlauf des Airystrahls und seine Charakteristiken analysiert. Dafür wird die dreidimensionale Intensitätsverteilung beschrieben, wie sie in [45] hergeleitet wird. Das Profil des Airystrahls ergibt sich als eine Lösung der paraxialen Wellengleichung mit φ als die Einhüllende des elektrischen Feldes:

$$i \frac{\partial \varphi}{\partial \xi} + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \varphi}{\partial s^2} = 0 \quad (3.1)$$

$s = y/y_0$ beschreibt hier eine dimensionslose Koordinate, wobei y_0 eine beliebige Skalierung ist. $\xi = x/ky_0^2$ gibt die normalisierte Ausbreitungsrichtung an mit $k = 2\pi n/\lambda_0$ als Wellenzahl. Hier und im Folgenden bezeichnet x immer die Ausbreitungsrichtung, entsprechend der Geometrie im Mikroskopaufbau. Aus Gleichung 3.1 ergibt sich die nicht-dispersive Lösung:

$$\varphi(s, \xi) = Ai \left[s - \left(\frac{\xi}{2} \right)^2 \right] \exp \left(i s \frac{\xi}{2} - \frac{i \xi^3}{12} \right) \quad (3.2)$$

Hier bezeichnet Ai die Airyfunktion [46]. Das Ergebnis ist ein gekrümmter Strahl mit Nebenmaxima, dessen Intensität und Profil entlang des Strahls konstant bleibt. Diese Lösung beschreibt daher den Fall unendlicher Energie, welcher in Realität nicht möglich ist. Es wird daher eine exponentielle Aperturfunktion der Form

$$\varphi(s, 0) = Ai(s) \exp(\alpha s) \quad (3.3)$$

eingefügt, um einen physikalisch realen Strahl zu beschreiben. Dabei ist α ein Zerfallsfaktor, der die räumliche Begrenzung des Airystrahls gewährleistet. Daraus ergibt sich:

$$\varphi(s, \xi) = Ai \left[s - \left(\frac{\xi}{2} \right)^2 + i \alpha \xi \right] \exp \left(\alpha s - \frac{\alpha \xi^2}{2} - \frac{i \xi^3}{12} + i \alpha^2 \frac{\xi}{2} + i s \frac{\xi}{2} \right)$$

Die dreidimensionale Beschreibung der Intensität I lässt sich mit $t = z/y_0$ bestimmen:

$$I(s, t, \xi) = |\varphi(s, \xi) \cdot \varphi(t, \xi)|^2 \quad (3.4)$$

Anhand dieser Gleichung wird die Intensitätsverteilung des Airystrahls simuliert. Das Ergebnis dieser Simulation ist eine dreidimensionale Matrix, welche mit der Bildanalyse-Software *Imaris* (Bitplane - Oxford Instruments, Zürich, Schweiz) als perspektivische Sicht dargestellt werden kann. In Abbildung 3.1 sind unterschiedliche Ansichten auf den Airystrahl dargestellt, wobei (a) die Blickrichtung genau in Ausbreitungsrichtung abbildet, während (b) und (c) eine schräge Sicht aus den Strahl zeigen. Der Strahl liegt in 45° Richtung im Raum gekippt und weist eine Krümmung entlang dieser gekippten Achse auf. Außerdem sind die Nebenmaxima sichtbar, welche orthogonal zueinander stehen. Das ist auch in Abbildung 3.1 (d) zu erkennen, welche einen Querschnitt des Strahls im Mittelpunkt abbildet.

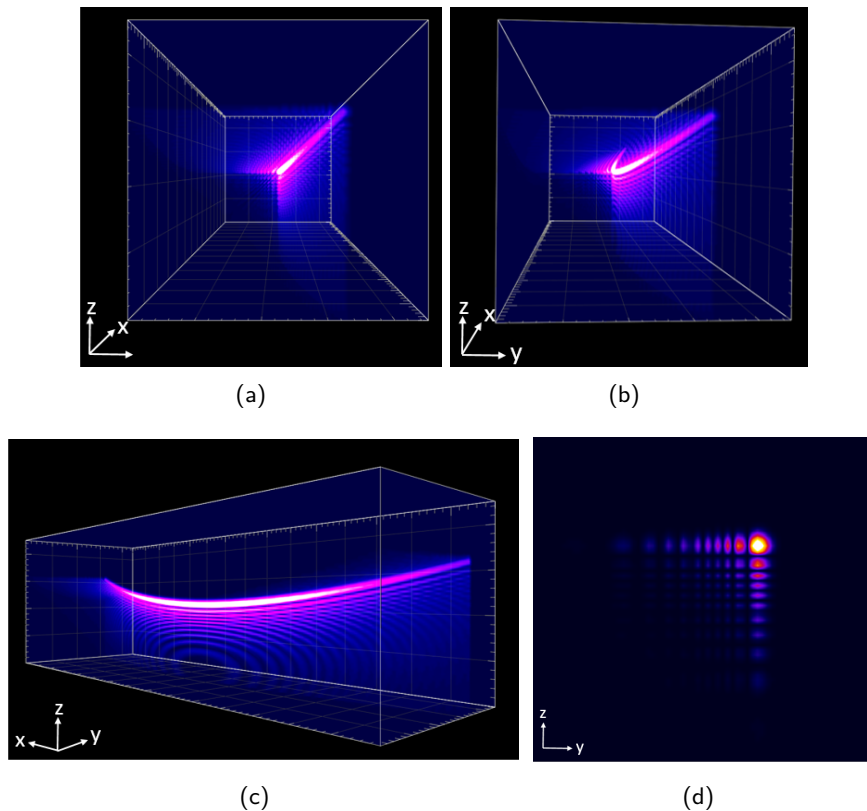


Abbildung 3.1: (a) Perspektivische Sicht des Airystrahls in Strahlrichtung. (b,c) Seitenansicht des Airystrahls: Der Strahl ist gekrümmt und zeigt eine Kippung um 45° gegenüber der horizontalen / vertikalen Ebene. (d) Das Querschnittsprofil durch das Zentrum des Airystrahls zeigt die Nebenmaxima des Strahls. [47]

3.2 Phasenmuster

3.2.1 Erzeugung

Im Mikroskopaufbau wird der Airystrahl mit Hilfe eines SLMs erzeugt. Dazu wird ein Phasenmuster auf den Lichtmodulator projiziert, wodurch die Phase des Lichtstrahls

ortsabhängig variiert wird. Wie in Abbildung 3.2 dargestellt, wird die resultierende Intensität durch das Beleuchtungsobjektiv fouriertransformiert. In der vorderen fokalen Ebene entsteht in der Probenkammer dann der Airystrahl.

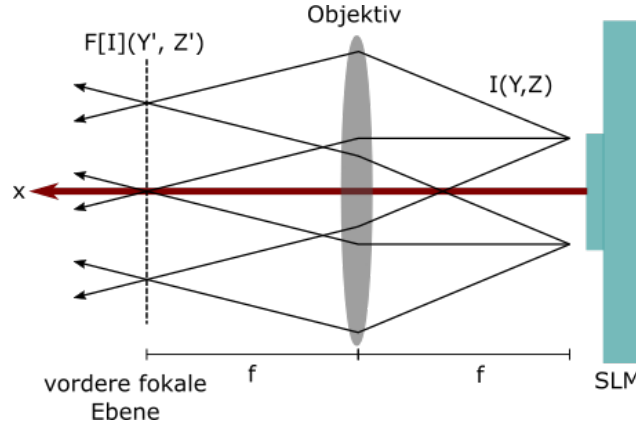


Abbildung 3.2: Um den Airystrahl zu erzeugen, wird ein Phasenmuster auf den SLM projiziert, wodurch die Phase des Strahls ortsabhängig verändert wird. Durch das Beleuchtungsobjektiv wird die Intensitätsverteilung fouriertransformiert. Der Airystrahl entsteht durch Fouriertransformation in der Probenkammer in der vorderen fokalen Ebene des Objektivs. Adaptiert von [48].

Die Erzeugung dieses Phasenmusters und die sich daraus ergebenden Dimensionen des Airystrahls werden im Folgenden erläutert. Aus Gleichung 3.3 kann über eine Fouriertransformation das Fourierspektrum im Frequenzraum bestimmt werden [45]:

$$\Phi_0(k) = \exp(-\alpha k^2) \exp\left(\frac{i}{3}(k^2 - 3\alpha^2 k - i\alpha^3)\right) \quad (3.5)$$

$$\Phi_0(k_y, k_z) = \Phi_0(k_x) \cdot \Phi_0(k_z) \quad (3.6)$$

Hier gibt k die räumliche Frequenz an. Das Ergebnis von 3.6 ist eine komplexe Zahl. Um das Phasenmuster des Airystrahls zu bestimmen, wird das Argument von Φ_0 berechnet, also der Winkel zwischen der positiven Achse und dem Vektor der Zahl in der gaußschen Zahlenebene:

$$\phi(k_y, k_z) = \arg \Phi_0 = \arctan 2(Re, Im)$$

Anschaulicher als die räumliche Frequenz ist allerdings eine Betrachtung von räumlichen Dimensionen, sowohl für den SLM als auch für die Probenebene. Dafür lohnt sich eine Betrachtung der Koordinatentransformation durch die Fouriertransformation.

Als Ausgang wird dafür der SLM betrachtet. Dessen aktiver Bereich hat eine Größe von $Y \times Z = 15,9 \text{ mm} \times 12,8 \text{ mm}$ mit $N_{\text{Pix}} = 1272 \times 1024$ Pixeln. Zur Vereinfachung wird in der Simulation ein quadratischer Bereich von $15,9 \text{ mm}$ angenommen. Für das finale angewendete Phasenmuster wird das entsprechende Bild des Phasenmusters zentriert auf $Y \times Z$ zugeschnitten. Nach der Fouriertransformation, im Aufbau realisiert durch das Beleuchtungsobjektiv, ergibt sich eine räumliche Frequenz mit der Einheit $1/\text{mm}$ von:

$$k_{X,Y} = \frac{2\pi \cdot N_{\text{Pix}}}{Y} = \frac{2\pi \cdot 1272}{15,9 \text{ mm}}$$

Daraus kann mit Hilfe der Brennweite des Objektivs von $f = 20$ mm und der Wellenlänge von $\lambda_n = \lambda_0/n = 488/1,33$ nm die räumliche Ausdehnung des Airystrahls, welcher mit dem Phasenmuster generiert wird, bestimmt werden [49]:

$$X' = Y' = \lambda_n f \cdot M \cdot k_{X,Y} = 2207,66 \mu\text{m} \quad (3.7)$$

In diese Gleichung fließt zusätzlich der Vergrößerungsfaktor $M = 0.45$ ein. Dieser gibt an, wie stark das Linsensystem den Airystrahl vor der Transformation durch das Objektiv verkleinert.

In Abbildung 3.3 sind sowohl Fourierspektrum, Phasenmuster und der resultierende Airystrahl in den entsprechenden Dimensionen abgebildet. Fourierspektrum und Phasenmuster haben dabei die Größe des aktiven Bereichs des SLMs. Die Dimension des resultierenden Airystrahls in 3.3 (c) ergibt sich aus Gleichung 3.7, wobei nur ein kleinerer Ausschnitt zur besseren Sichtbarkeit des Strahls abgebildet ist.

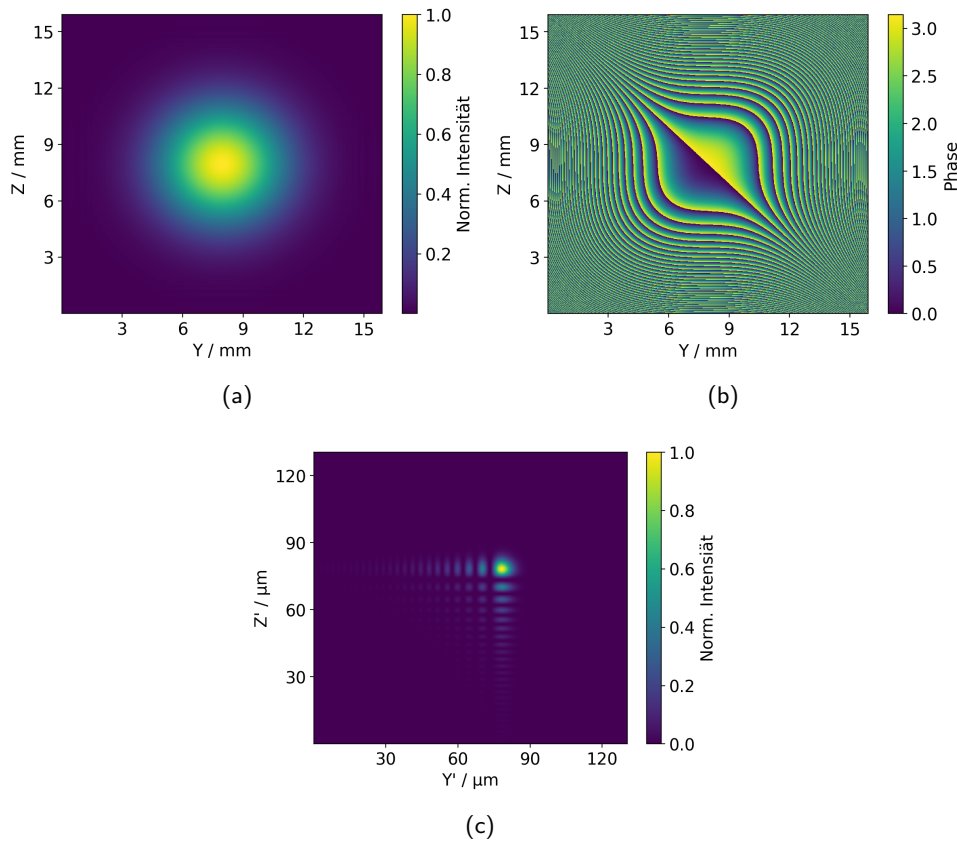


Abbildung 3.3: (a) Fourierspektrum des Airystrahls umgerechnet auf die reale Dimension des SLMs. (b) Phasenmuster des Airystrahls. (c) Querschnitt des Strahls, wie er in der vorderen fokalen Ebene des Objektivs entsteht.

3.2.2 Parameterbestimmung

Neben optischen Parametern wie Wellenlänge und Vergrößerung beeinflussen die beiden Parameter y_0 und α das Erscheinungsbild der Airystrahls. In den bisherigen Betrachtun-

gen wurden diese Parameter wie folgt festgelegt:

$$y_0 = 0,8$$

$$\alpha = 0,08$$

Wie sich Strahl und Phasenmuster abhängig von y_0 verändern, ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Für kleinere Werte von y_0 ist das Phasenmuster vergrößert sichtbar. Der Airystrahl verhält sich antiproportional dazu und ist verkleinert. Für große Werte ist das Phasenmuster sehr klein und der Airystrahl vergrößert. Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, ist y_0 ein Skalierungsfaktor von Muster und Airystrahl. Diese Parameter wurden so gewählt, dass das charakteristische Phasenmuster klein genug ist, um komplett im Bild enthalten zu sein, aber auch groß genug, dass kleine Details des Musters von den Pixeln des SLMs aufgelöst werden können.

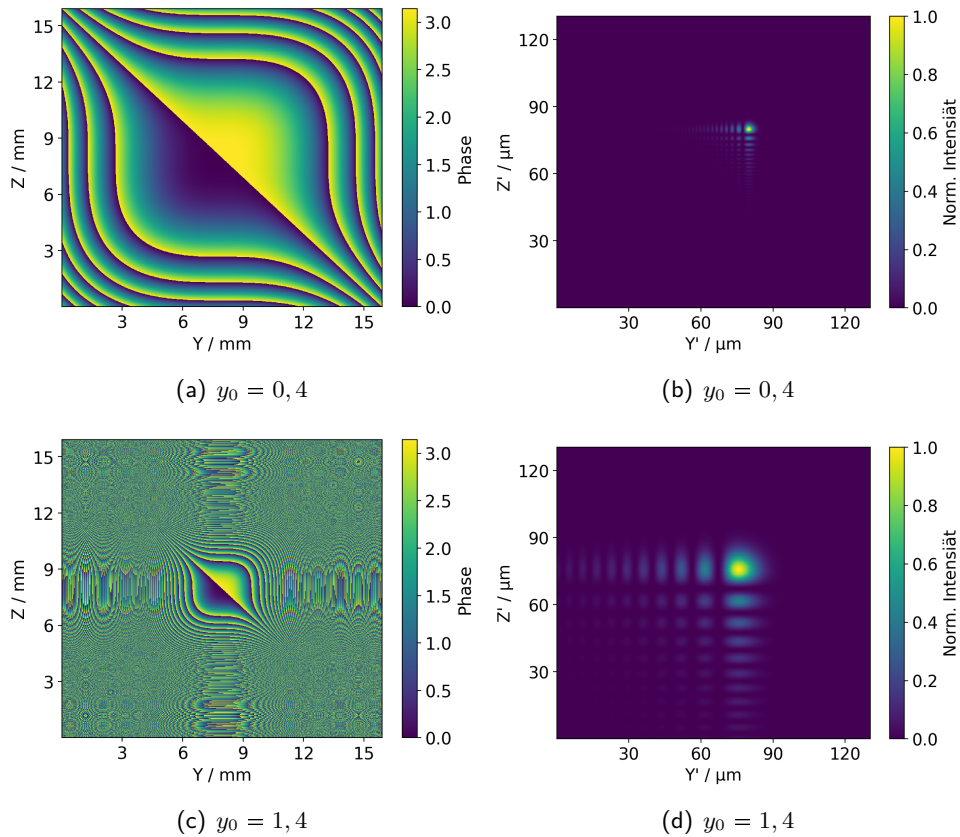


Abbildung 3.4: Einfluss von y_0 auf Phasenmuster und Airystrahl: Der Faktor y_0 ist ein Skalierungsfaktor. Für kleine Werte von y_0 ist das Phasenmuster vergrößert (a), der Airystrahl ist dafür sehr klein (b). Für hohe Werte von y_0 ist das Phasenmuster verkleinert (c). Der Airystrahl verhält sich umgekehrt dazu und wirkt dementsprechend vergrößert (d).

Der Parameter α begrenzt den Strahl auf eine endliche Apertur. Der Einfluss ist am deutlichsten bei der Betrachtung des Fourierpektrums des Strahls zu erkennen (s. Abb. 3.5). Für hohe Werte von α (z. B. $\alpha = 0,25$) fällt das Fourierpektrum nach außen hin schnell ab. Im Frequenzbereich betrachtet werden also hohe Frequenzen unterdrückt, sodass

diese im entsprechenden Phasenmuster nicht vollständig moduliert werden. Dementsprechend hat der Airystrahl stärkere ‚Gaußstrahl-Charakteristiken‘. Die Ausprägung der Nebenmaxima ist schwächer und der Strahl ist kürzer. Für kleinere Werte von α (z. B. $\alpha = 0,01$) gleicht der Airystrahl dem idealen Airystrahl wie in Gleichung 3.2 beschrieben. Das Phasenmuster müsste aber in seinen Dimensionen sehr groß sein, um einen solchen Strahl zu erzeugen. Im Mikroskopaufbau ist die Größe des SLM-Bereichs eine natürliche Grenze für die Ausdehnung des Phasenmusters. Der Parameter α wurde daher so gewählt, dass der entstehende Strahl realistisch bezüglich seines Intensitätsverlaufs und seiner Nebenmaxima simuliert wird.

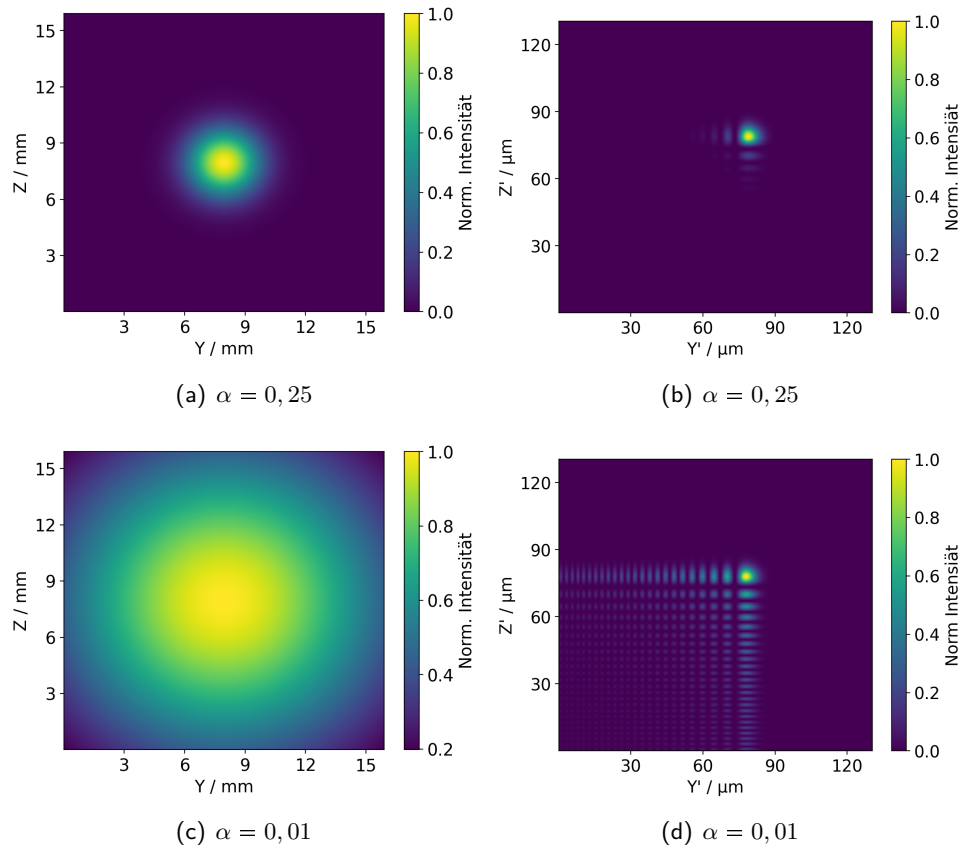


Abbildung 3.5: Einfluss von α auf Fourierspektrum und Airystrahl: Für große Werte von α fällt das Fourierspektrum nach außen hin stark ab (a). Dadurch wird die Modulation der hohen Frequenzen unterdrückt. Der Airystrahl zeigt schwächere Nebenmaxima und hat somit eine stärkere ‚Gaußstrahl-Charakteristik‘ (b). Umgekehrt ist es für sehr geringe Werte von α . Das Fourierspektrum ist gleichmäßiger (c) und der Airystrahl ähnelt der idealen Version mit unendlicher Energie (d).

3.2.3 Korrekturen des Phasenmusters

Um das Phasenmuster, welches durch die Simulation erstellt wird, auf den SLM zu projizieren, wird dieses zuerst auf die passende Pixelanzahl von 1272×1024 zugeschnitten. Auf das Muster wird außerdem noch eine Wellenfrontkorrektur angewendet. Das ist eine zusätzliche Phasenverteilung, welche Unebenheiten bzw. eine leichte Krümmung des SLM-Chips ausgleicht. Diese Korrektur-Phasenmuster sind wellenlängenabhängig und

wurden vom Hersteller experimentell mittels eines Michelson-Interferometers gemessen und dem Benutzer in Form von Phasenbildern zur Verfügung gestellt (s. Abb. 3.6 (b)). Das korrigierte Airy-Phasenmuster ergibt sich aus der Summe von Korrektur und dem originalen Airy-Muster. Das Ergebnis für $\lambda = 488 \text{ nm}$ ist in Abbildung 3.6 (c) dargestellt.

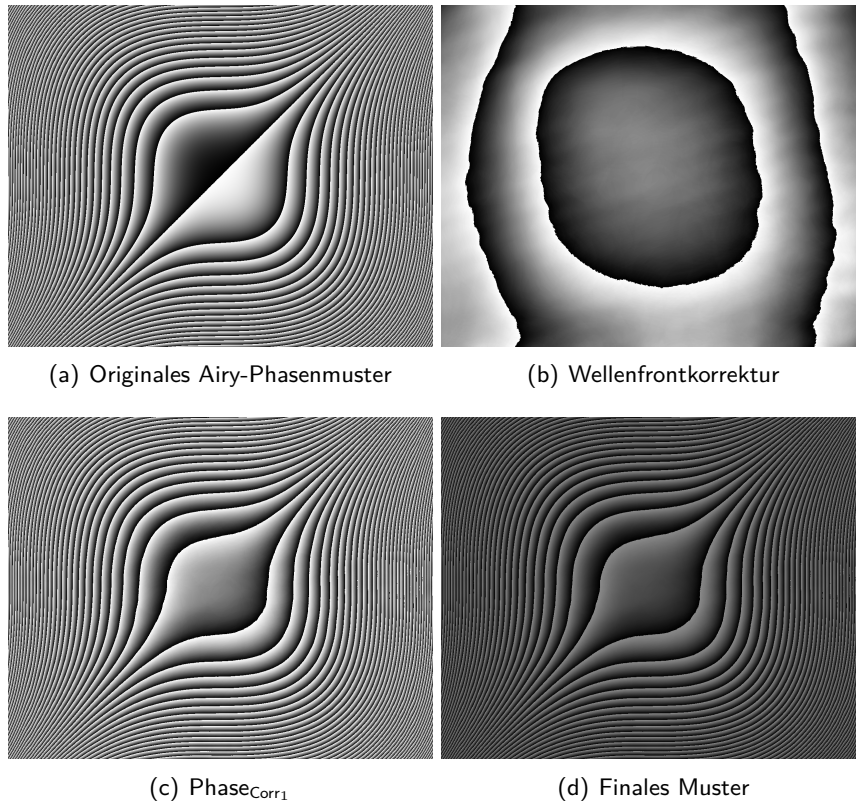


Abbildung 3.6: Zur Projektion des Phasenmusters auf den SLM muss das Muster angepasst werden. Dafür wird das originale Phasenmuster zur Korrektur der Ebenheit addiert und zusätzlich der Maximalwert des Musters an die Transfer Charakteristik des SLMs angepasst. Das finale Muster wird an den SLM weitergegeben.

Die Helligkeit eines Pixels im Phasenmuster bestimmt die Phasenverschiebung, welche das Licht an diesem Punkt erfährt. Dafür besitzt der SLM eine ‚Transfer Charakteristik‘, welche angibt, wie stark die Phasendrehung für welche Pixelintensität ist. Allgemein werden die Bilder mit dem Phasenmuster im *bmp*-Format in 8 bit an den SLM weitergegeben. Der Pixelwert für eine Modulation von 2π beträgt allerdings nicht 256, sondern ist entsprechend der Wellenlänge geringer. Für die Wellenlänge von 488 nm beträgt das Signal für eine 2π Modulation 139. Insgesamt wird also folgende Korrektur am originalen Phasenmuster des Airystrahls durchgeführt [50]:

$$\begin{aligned}
 \text{Phase}_{\text{Corr}_1} &= \text{Airy-Phasenmuster} + \text{Wellenfrontkorrektur} \\
 \text{Phase}_{\text{Corr}_2} &= \text{mod}(\text{Phase}_{\text{Corr}_1}, 256) \\
 \text{Finales Muster} &= \text{Phase}_{\text{Corr}_2} \times 139/255
 \end{aligned}$$

Das angepasste finale Phasenmuster ist in Abbildung 3.6 (d) dargestellt.

3.3 Simulation des Gaußstrahls

Neben dem Airystrahl ist im Mikroskop auch eine Gaußstrahlbeleuchtung implementiert. Diese dient zum einen dazu, optische Eigenschaften des Lichtscheibenmikroskops im Vergleich zum Airystrahl besser charakterisieren zu können. Zum anderen wird der Gaußstrahl verwendet, um Daten für das Training der Deep Learning Dekonvolution zu erhalten.

Ein Gaußstrahl hat eine gaußförmige Intensitätsverteilung [51]:

$$I(r, x) = I_0 \left(\frac{w_0}{w(x)} \right)^2 \exp^{-\frac{2r^2}{w(x)^2}} \quad (3.8)$$

Auch hier gibt x wieder die Propagationsrichtung des Strahls an und $r = \sqrt{y^2 + z^2}$. Der Strahlradius $w(x)$ ist definiert über die Distanz zur Achse, bei welcher die Intensität auf $1/e^2$ abgefallen ist:

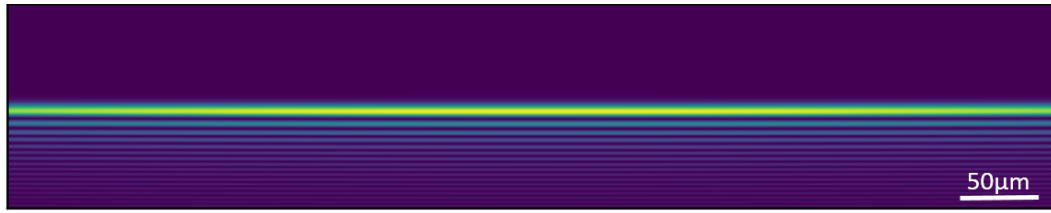
$$w(x) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{x}{x_R} \right)^2}$$

Dabei ist w_0 der minimale Radius an der Strahltaile. Die Rayleighlänge x_R gibt an, nach welcher Distanz sich der Radius des Strahls um den Faktor $\sqrt{2}$ vergrößert hat:

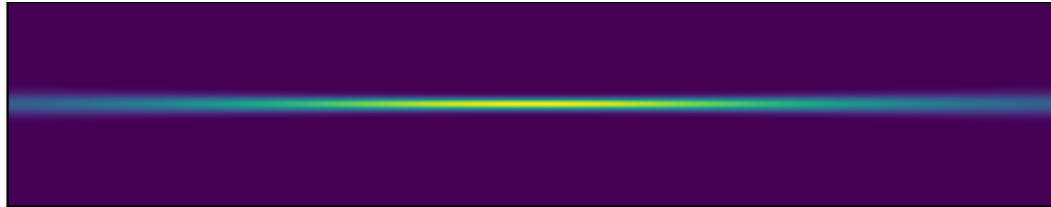
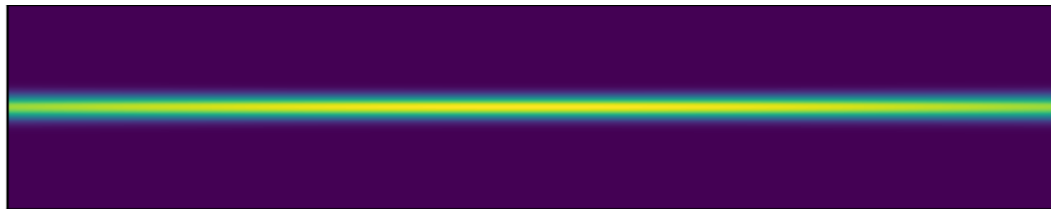
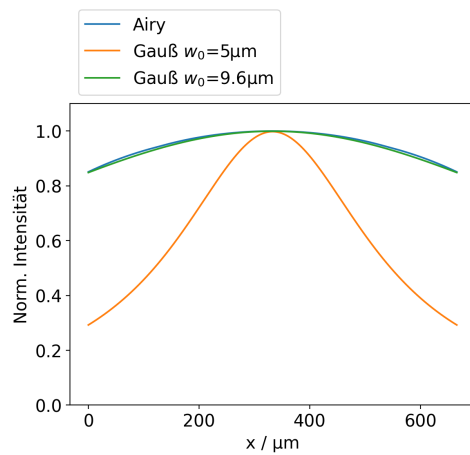
$$x_R = \frac{\pi \cdot w_0^2}{\lambda_n}. \quad (3.9)$$

Der Gaußstrahl ist im Gegensatz zum Airystrahl gerade und besitzt keine Nebenmaxima. Dafür weist der Gaußstrahl eine stärkere Divergenz auf, sodass die Intensität außerhalb der Strahltaile schnell abfällt. Wie in Gleichung 3.9 erkennbar ist, skaliert dabei die Länge des Strahls mit dem Strahlradius. Je größer der Radius des Gaußstrahls ist, desto länger bleibt die Intensität entlang des Strahls konstant, während ein Strahl mit kleinem Radius verhältnismäßig ‚kurz‘ ist. Diese Eigenschaft führt im Mikroskop zu einem Kompromiss. Zum einen ergibt ein dünnes Lichtblatt, welches über einen Anregungsstrahl mit geringem Strahlradius erzeugt wird, einen hohen Bildkontrast. Andererseits möchte man eine gleichmäßige Ausleuchtung über einen großen Bereich haben, was nur einem Strahl mit großer Rayleighlänge und somit großem Radius möglich ist. Diese Konfiguration führt aber zu einem verringertem Kontrast.

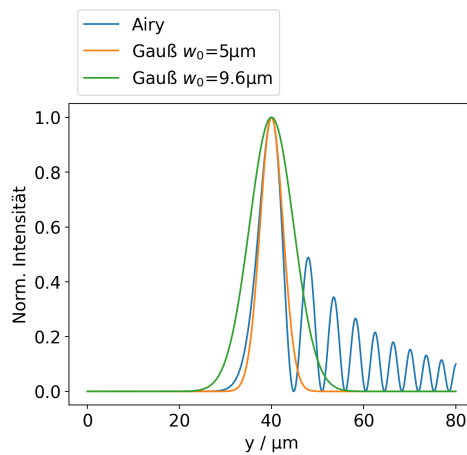
Im Folgenden wird der Airystrahl mit zwei Gaußstrahlen verglichen: Ein dünner Strahl mit einem Radius von $5 \mu\text{m}$, welcher den gleichen Durchmesser wie das Hauptmaximum des Airystrahls zeigt, sowie ein dickerer Strahl mit einem Radius von $9,7 \mu\text{m}$, welcher in Propagationsrichtung den gleichen Intensitätsverlauf wie der Airystrahl aufweist. Die simulierten Strahlprofile sind in Abbildung 3.7 mit ihren jeweiligen axialen und lateralen Profilen dargestellt. Strahlen mit diesen Dimensionen und Parametern werden im Mikroskop erzeugt. Ein genauer Vergleich erfolgt in Kapitel 4.2.1.



(a) Airystrahl

(b) Gaußstrahl, $w_0 = 5 \mu\text{m}$ (c) Gaußstrahl, $w_0 = 9,6 \mu\text{m}$ 

(d)



(e)

Abbildung 3.7: Simulierter Vergleich von Airy- und Gaußstrahlen: (a-c) Intensitätsprofile, (d) Intensitätsverlauf in Propagationsrichtung x . Der Airystrahl (blau) zeigt eine weitestgehend gleichförmige Intensität, ähnlich wie der Gaußstrahl mit großer Strahltaile (blau). Die Intensität des Gaußstrahls mit kleiner Strahltaile (orange) hingegen fällt zu den Rändern hin deutlich ab. (e) Intensitätsverlauf in Querrichtung (y): Das Hauptmaximum des Airystrahls besitzt die gleiche Breite wie der schmale Gaußstrahl in seiner Strahltaile.

3.4 Punktspreizfunktion

Die optische Abbildung im Mikroskop wird durch die begrenzte Apertur der optischen Elemente, durch Beugung und durch die Kamera beeinflusst, sodass ein punktförmiges Objekt verbreitert bzw. ‚verschmiert‘ erscheint. Ein wichtiger Faktor zur Beschreibung der Auflösung ist die Punktspreizfunktion (engl. *Point Spread Function*, PSF), welche im Folgenden simuliert wird, um einen theoretischen Wert für die erreichbare Auflösung zu erhalten.

3.4.1 Optische Auflösung

Zu Beginn wird die optische Auflösung bestimmt, welche sich aus der Anregungs-PSF durch den Lichtstrahl und der Detektions-PSF des Objektivs ergibt. Für eine analytische Darstellung der Detektions-PSF wird der skalare Ansatz von Wolf & Born betrachtet. Dieser wird häufig als Standardansatz für die Beschreibung der PSF herangezogen. Er ergibt sich aus der paraxialen Theorie, wird aber auch für hohe Aperturen als qualitative Näherung verwendet, wobei zu beachten ist, dass Faktoren wie die Polarisierung des Lichts oder Brechungsindexvariationen vernachlässigt werden [52, 53].

Eine detaillierte Herleitung der Lichtfeldverteilung im Bereich des Fokus des abbildenden Objektivs findet sich in [54]. Zur Simulation einer dreidimensionalen PSF werden dimensionslose Koordinaten u und v eingeführt:

$$u = \frac{2\pi}{\lambda_n} \left(\frac{a}{f} \right)^2 z$$

$$v = \frac{2\pi}{\lambda_n} \left(\frac{a}{f} \right) \sqrt{x^2 + y^2}$$

Dabei beschreibt a den Aperturradius und f die Brennweite des Detektionsobjektivs. λ_n gibt die Emissionswellenlänge an. Der Faktor a/f kann in der Kleinwinkelnäherung durch NA/n ersetzt werden, wobei NA die numerische Apertur des Objektivs angibt. Im Nahbereich des Fokus kann die PSF beschrieben werden durch:

$$PSF_{\text{Det}}(u, v) = \left(\frac{2}{u} \right)^2 [U_1^2(u, v) + U_2^2(u, v)] I_0 \quad (3.10)$$

Dabei ist I_0 die Intensität bei $u = v = 0$. U_1 und U_2 sind die Lommelfunktionen, welche mit Hilfe der Besselfunktion n -ter Ordnung J_n folgendermaßen definiert sind:

$$U_n(u, v) = \sum_{s=0}^{\infty} (-1)^s \left(\frac{u}{v} \right)^{n+2s} J_{n+2s}(v)$$

In der fokalen Ebene bei $u = 0$ und entlang der optischen Achse, also $v = 0$, vereinfacht sich Gleichung 3.10 zu:

$$PSF(0, v) = I_0 \cdot \left[\frac{2J_1(v)}{v} \right]^2$$

$$I(u, 0) = I_0 \cdot \left(\frac{\sin u/4}{u/4} \right)^2$$

In Abbildung 3.8 ist die Detektions-PSF sowie der Intensitätsverlauf entlang der Achsen abgebildet.

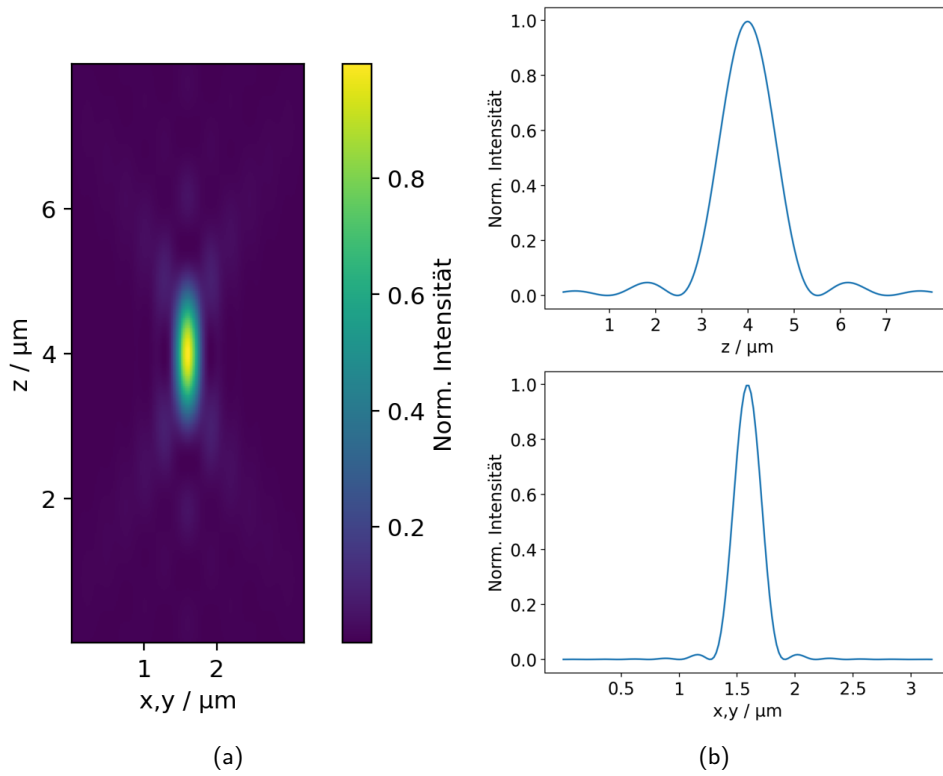


Abbildung 3.8: (a) Detektions-PSF. (b) Intensitätsverlauf entlang der Achsen.

In Kombination mit der Beleuchtungs-PSF, welche sich aus der Intensitätsverteilung I_{Anr} des Lichtblatts ergibt, erhält man die gesamte optische PSF des Mikroskops [55]:

$$\text{PSF}_{\text{ges}} = I_{\text{Anr}} \cdot \text{PSF}_{\text{Det}}$$

Die Anregungsintensität wurde in den Gleichungen 3.4 und 3.8 für Airy- bzw. Gaußstrahl gegeben. Aus der Halbwertsbreite (FWHM) der PSF lässt sich ein Maß für die Auflösung des Mikroskops bestimmen. In Abbildung 3.9 ist die axiale PSF (z -Richtung) für die Anregungs-, Detektions- und Gesamt-PSF berechnet. Man kann erkennen, dass die Gesamt-PSF sich kaum von der Detektions-PSF unterscheidet. Das gilt sowohl für den Airystrahl als auch für die Gaußstrahlen. Für alle Anregungsstrahlprofile ist die Anregungs-PSF breiter als die Detektions-PSF. Es wird also die komplette Dicke (z) der fokalen Ebene beleuchtet, wodurch der Einfluss der Beleuchtung auf die Gesamt-PSF sehr gering ist:

$$\text{PSF}_{\text{ges, axial}} \approx \text{PSF}_{\text{Det, axial}}$$

Erst, wenn ein Strahl schmaler als die fokale Ebene der Detektion ist, ändert sich die Gesamt-PSF entsprechend der Beleuchtungsintensitätsverteilung. An dieser Stelle ist wichtig zu erwähnen, dass sich zwar die Auflösung, welche über die PSF beschrieben wird, für Airy- und Gaußstrahlbeleuchtung nicht ändert, die Bildqualität aber trotzdem von der Beleuchtung abhängt. Angeregtes Fluoreszenzsignal, welches von außerhalb des Fokus detektiert wird, führt zu einem höheren Hintergrundsignal und folglich zu einem schlechteren Kontrast.

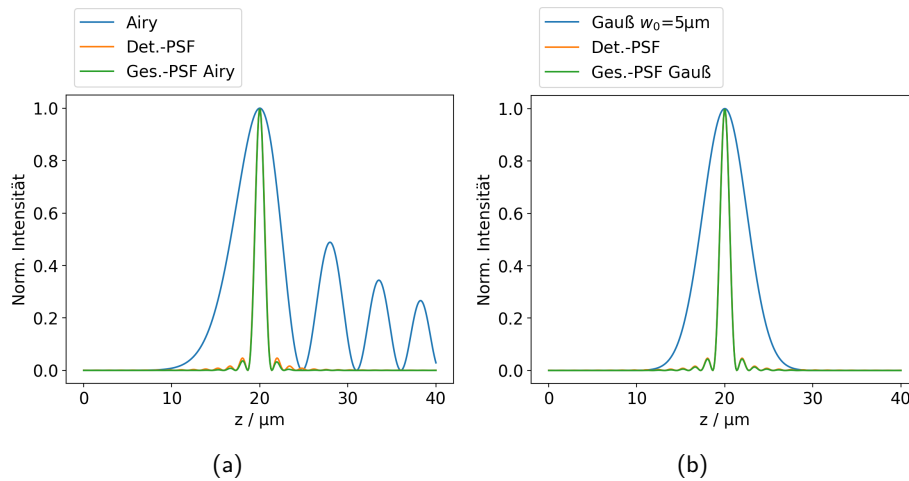


Abbildung 3.9: Vergleich von axialer Gesamt-PSF mit Detektions-PSF und Anregungsprofil für Airystrahl (a) und Gaußstrahl (b). Das Anregungsprofil ist jeweils deutlich breiter als die Detektions-PSF, wodurch die Gesamt-PSF kaum durch die Anregung beeinflusst wird.

Für die laterale PSF (x -, y -Richtung) gilt das Gleiche wie für die axiale PSF. Da durch das Lichtblatt der komplette Bereich in lateraler Richtung beleuchtet wird, gilt hier:

$$\text{PSF}_{\text{ges, lateral}} = \text{PSF}_{\text{Det., lateral}}$$

Die Halbwertsbreite der axialen und lateralen PSF als Wert für das Auflösungsvermögen führt mit den optischen Parametern des Mikroskops ($\text{NA} = 1,0$, $\lambda_n = 515 \text{ nm}/1,33$) zu folgenden Ergebnissen:

$$\text{FWHM}_{\text{ges, lateral}} = 263 \text{ nm} \quad (3.11)$$

$$\text{FWHM}_{\text{ges, axial}} = 1,2 \mu\text{m} \quad (3.12)$$

3.4.2 Kameraauflösung

Neben dem Einfluss des Detektionsobjektivs spielt auch die Kamera eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der Auflösung. Die oben angegebenen Werte für die Auflösung können nur erreicht werden, wenn das Signal auch mit einer entsprechenden Genauigkeit aufgenommen wird. Durch die Pixelgröße der Kamera wird das kontinuierliche Signal nur in diskreten Stufen detektiert. Die verwendete Kamera besitzt eine Pixelgröße von $P_c \times P_c = 6,5 \mu\text{m} \times 6,5 \mu\text{m}$. Durch die Vergrößerung im Mikroskop wird auf einen Kamerapixel ein kleiner Bereich der Objektebene abgebildet. Die Dimension (bzw. die Kantenlänge) dieses Bereichs wird im Folgenden als Objektpixelgröße bezeichnet. Je nach verwendeter Vergrößerung des Mikroskops M beträgt diese:

$$P_{\text{Obj}}(M = 40) = \frac{P_c}{M} = 162,5 \text{ nm}$$

$$P_{\text{Obj}}(M = 20) = 325 \text{ nm}$$

Um die gesamte Information, welche vom Detektionspfad an die Kamera weitergegeben wird, aufzunehmen, sollte die effektive Kamera-Objektpixelgröße entsprechend dem

Nyquist-Theorem maximal

$$P_{\text{Obj,max}} = 0,5 \cdot \frac{\lambda_0}{2 \cdot \text{NA}}$$

betragen [56]. Für eine Wellenlänge von $\lambda_0 = 515 \text{ nm}$ und einer numerischen Apertur von $\text{NA} = 1,0$ ergibt sich eine maximale Pixelgröße von $P_{\text{eff,max}} = 129 \text{ nm}$. Weder für eine Vergrößerung von $M = 40$ noch für $M = 20$ wird das Nyquist-Theorem erfüllt. Die Pixel sind also zu groß, um die errechnete optische laterale Auflösung aus Gleichung 3.11 zu erreichen.

Wie sich die Kamerapixel auf die gemessene Auflösung auswirken, wird in Python simuliert. Das PSF Signal, welches vorher als kontinuierliche Funktion berechnet wurde, wird nun für eine bestimmte Breite, welche der Pixelbreite entspricht, aufsummiert. Dieser Vorgang ist äquivalent zur Funktionsweise der Kamera: Alle Photonen, welche im Bereich eines Pixels während der Belichtungszeit auf die Kamera treffen, werden summiert. Diese Summe wird in ein Signal umgewandelt, welches im Bild einer Helligkeit entspricht. An die Stufenverteilung der PSF wird eine Gaußfunktion angepasst, um in der Simulation die entsprechende Halbwertsbreite zu erhalten.

Die sich ergebende Halbwertsbreite hängt allerdings auch davon ab, wo genau die diskreten Stufen platziert werden. Es werden also bei der Berechnung zwei Fälle unterschieden: Einmal liegt das Maximum der PSF in der Mitte eines Pixels und einmal genau zwischen zwei Pixeln. Die unterschiedlichen Fälle sind in Abbildung 3.10 für die verwendeten Vergrößerungen und Pixelgrößen dargestellt. Diese Werte werden gemittelt, um einen finalen Wert für das gemessene Auflösungsvermögen zu erhalten:

$$\begin{aligned} FWHM_{\text{Kam, lateral}, M=40} &= \frac{263 \text{ nm} + 283 \text{ nm}}{2} = 273 \text{ nm} \\ FWHM_{\text{Kam, lateral}, M=20} &= \frac{442 \text{ nm} + 342 \text{ nm}}{2} = 392 \text{ nm} \end{aligned}$$

Dass sich die Pixelgröße auf die laterale Auflösung auswirkt, ist sehr anschaulich. Die Pixelgröße hat allerdings auch einen Einfluss auf die axiale Auflösung. Die Abtastrate hängt hier auf den ersten Blick nur von der Schrittweite in z -Richtung ab, welche frei wählbar und unabhängig von der Mikroskopvergrößerung M ist. Die Schrittweite kann daher klein genug gesetzt werden, um das Signal mit seiner optischen Auflösung (s. Gl. 3.12) genau zu erfassen. Im Folgenden wird gezeigt, dass die Pixelgröße auch die axiale Auflösung beeinflusst. Dafür wird das Signal, welches durch die Summierung in Pixel in x, y -Richtung unterteilt wird, immer nach einer bestimmten Schrittweite $\Delta z = 0,3 \mu\text{m}$ betrachtet. Hier wird also im Gegensatz zur lateralen Richtung das Signal nicht aufsummiert. Die Position des PSF-Maximums im Vergleich zu den betrachteten Schnitten beeinflusst die Breite des Signals wenig. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Durch die Anpassung einer Gaußfunktion ergeben sich folgende gemessene Auflösungsvermögen:

$$\begin{aligned} FWHM_{\text{Kam, axial}, M=40} &= \frac{1,25 \mu\text{m} + 1,20 \mu\text{m}}{2} = 1,23 \mu\text{m} \\ FWHM_{\text{Kam, axial}, M=20} &= 1,57 \mu\text{m} \end{aligned}$$

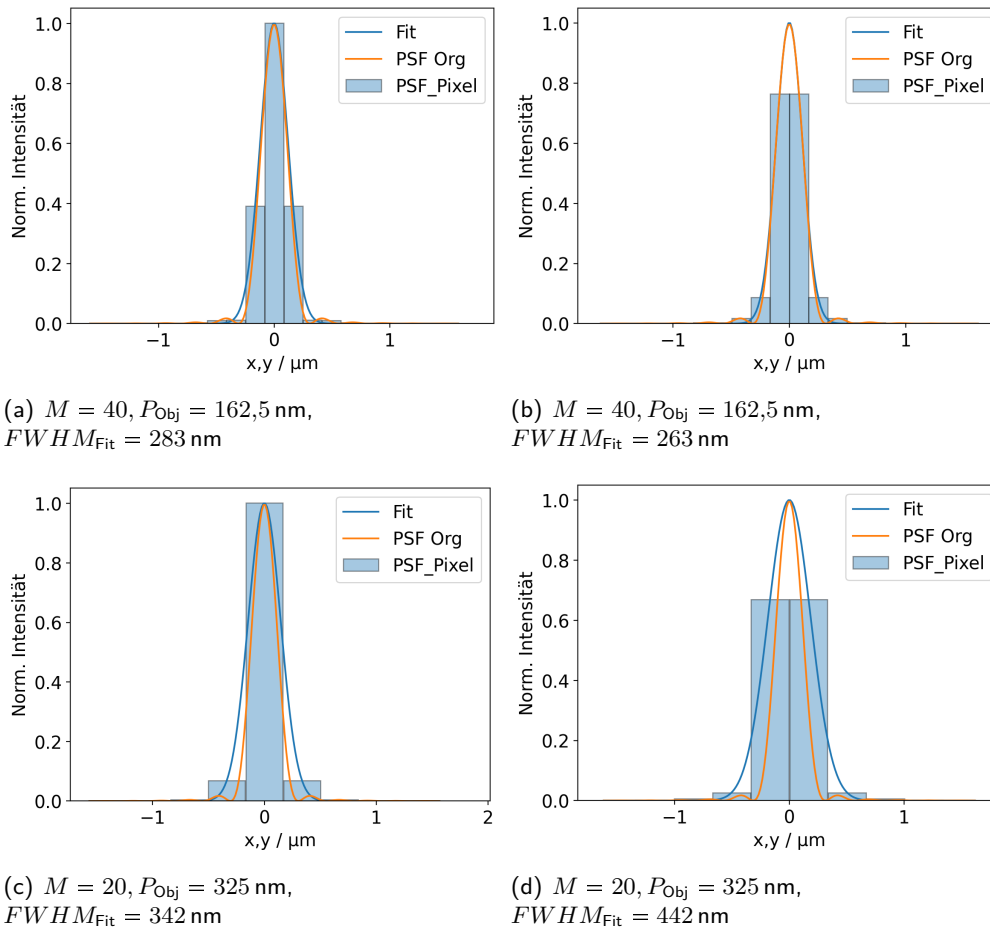


Abbildung 3.10: Das Signal kann durch die Pixelgröße der Kamera nur in diskreten Schritten erfasst werden. Um die tatsächliche Kameraauflösung zu bestimmen, wird daher die kontinuierliche PSF für die entsprechende Pixelbreite aufsummiert. Je nachdem wie der Pixel im Bezug auf das Maximum der PSF liegt, ergeben sich unterschiedliche Verteilungen. An die Verteilung wird eine Gaußfunktion angepasst. (a) und (c) zeigen den Fall, dass das Maximum der PSF genau im Zentrum eines Pixels liegt, während (b) und (d) den Fall zeigen, dass das Maximum der PSF genau zwischen zwei Pixeln liegt.

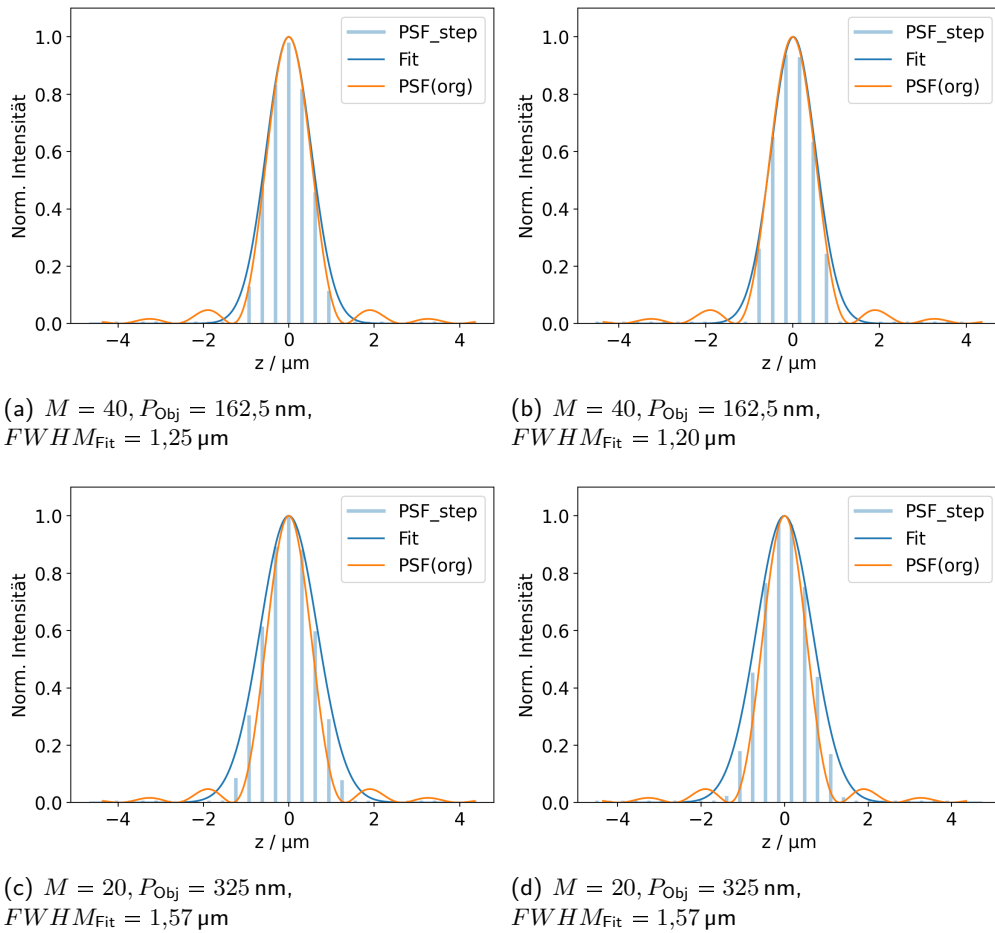


Abbildung 3.11: Die gemessene axiale Auflösung hängt, genau wie die laterale Auflösung, von der effektiven Größe der Kamerapixel ab. Unterschiedliche Vergrößerungen führen dementsprechend zu einer veränderten axialen Auflösung. Die gemessene Auflösung hängt davon ab, wie die Schichten im Bezug auf die PSF verteilt liegen. (a) und (c) zeigen, dass die zentrale Schicht durch das Zentrum der PSF geht, im Falle von (b) und (d) liegt das Maximum der PSF genau zwischen zwei Schichten.

3.5 Dekonvolution

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Deep Learning Programm für eine Dekonvolution entwickelt. Mit dieser Dekonvolution soll der Einfluss der Nebenmaxima des Airystrahls auf die Bildqualität minimiert werden. Wie sich eine Dekonvolution auf ein Bild auswirkt, soll im Folgenden anhand eines Beispiels näher erläutert werden. Als Dekonvolutions-Methode wird hier eine Richardson-Lucy Dekonvolution [57], [23] verwendet, welche im späteren Teil der Arbeit als Standardmethode zum Vergleich mit der Deep Learning Dekonvolution herangezogen wird.

3.5.1 Optische Transferfunktion

Wie sich eine Dekonvolution auf die Bildqualität auswirkt, lässt sich am einfachsten anhand der optischen Transferfunktion (engl. *Optical Transfer Function* OTF) verstehen.

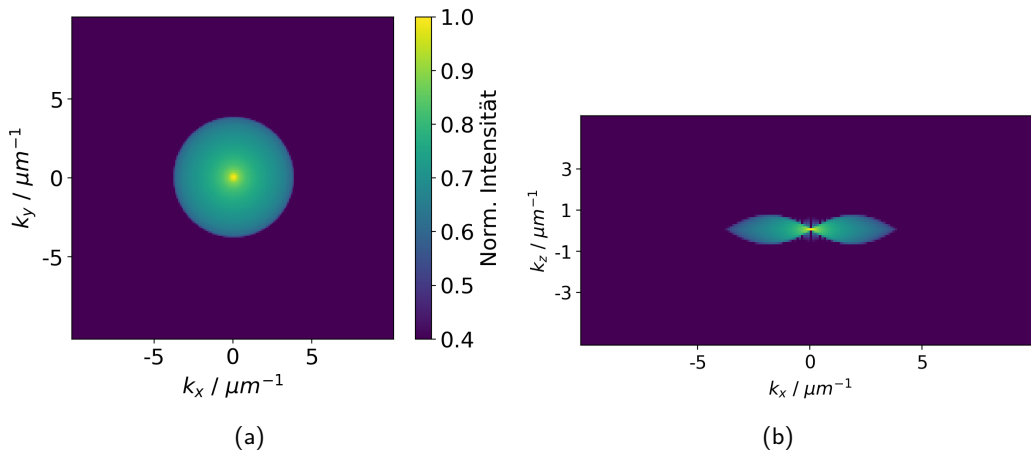


Abbildung 3.12: Die optische Transferfunktion ergibt sich aus der Fouriertransformierten der PSF. Sie zeigt, welche räumlichen Frequenzen in einem Bild enthalten sind. (a) zeigt die OTF im Frequenzraum in x, y -Richtung, (b) in x, z -Richtung.

Diese beschreibt die PSF im Fourierraum und gibt an, welche räumlichen Frequenzen in einem Bild enthalten sind.

$$\text{OTF}(k_x, k_y, k_z) = \mathcal{F}(\text{PSF}(x, y, z))$$

Die OTF, welche aus der in Abbildung 3.8 dargestellten PSF bestimmt werden kann, ist in Abbildung 3.12 zu sehen. Man kann erkennen, dass für niedrige Frequenzen $k_{x,y}$ das Signal gut übertragen wird, während für hohe räumliche Frequenzen das Signal komplett unterdrückt wird. Im Mikroskop passiert dies durch die begrenzte Apertur der abbildenden Optik. Im Bild werden dadurch Kanten, welche durch hohe räumliche Frequenzen dargestellt werden, unscharf. Je größer und gleichmäßiger die OTF ist, desto schärfer ist das resultierende Bild.

3.5.2 Richardson-Lucy Dekonvolution

Die Richardson-Lucy Dekonvolution ist ein iterativer Algorithmus, um die Frequenzanteile des Bildes, welche durch eine bekannte PSF unterdrückt wurden, neu zu gewichten und somit das Bild zu verbessern. Dafür nimmt man an, dass sich das Bild aus der Summe vieler einzelner Punktquellen zusammensetzt. Die Intensität des unscharfen Bildes wird also über eine Summe einer Übergangsmatrix p , welche auf die Pixel des Ursprungsbildes wirken, gebildet [58]:

$$d_i = \sum_j p_{i,j} u_j \quad (3.13)$$

Zur Vereinfachung wird hier ein eindimensionales Bild angenommen. Hierbei gibt d_i die Intensität des unscharfen Bildes bei Pixel i an, u_j die Intensität des Ursprungsbildes an Pixel j und die Übergangsmatrix $p_{i,j}$ beschreibt, wie viel Licht von Pixel j in Pixel i detektiert wird. In einem verschiebungsinvarianten System kann die Übertragungsfunktion p einfach durch den räumlichen Versatz zwischen dem Quellpixel j und dem Beobachtungspixel i ausgedrückt werden.

$$p_{i,j} = P(i - j)$$

P ist in diesem Fall die PSF und Gleichung 3.13 entspricht einer Faltungsoperation. Um nun das Originalbild zu u_j zu bestimmen, kann mit der Iterationszahl t folgende iterative Formel angewendet werden [58], [59]:

$$\hat{u}_j^{(t+1)} = \hat{u}_j^{(t)} \sum_i \frac{d_i}{c_i} p_{i,j} \quad (3.14)$$

mit

$$c_i = \sum_j p_{i,j} \hat{u}_j^{(t)}.$$

Für mehrdimensionale Bilder kann Gleichung 3.14 mit der PSF P folgendermaßen umgeschrieben werden [14]:

$$\hat{u}_j^{(t+1)} = \hat{u}_j^{(t)} \cdot \left(\frac{d}{\hat{u}^{(t)} \otimes P} \otimes P^* \right)$$

Dabei ist $\otimes$ eine Faltung und P^* die transponierte PSF.

Wie sich die Richardson-Lucy Dekonvolution auf ein Bild und die entsprechende PSF auswirkt, wird im Folgenden anhand eines Beispielbildes demonstriert. Dieses Bild wird durch Faltung mit einer beliebigen PSF in ein unscharfes Bild umgewandelt (s. Abb 3.13 (a,c)). In den entsprechenden OTF-Abbildungen (Abb 3.13 (b,d)) ist zu erkennen, dass die OTF des Bildes durch die Faltung mit der PSF räumlich begrenzt ist und zu den Seiten hin abfällt, wodurch das Bild unscharf wird. Durch eine Dekonvolution werden nun die Frequenzanteile neu gewichtet, sodass die OTF eine gleichmäßigere Verteilung aufweist. Das resultierende Bild ist deutlich schärfer.

Hierbei ist wichtig zu betonen, dass eine Dekonvolution Frequenzanteile, welche komplett unterdrückt sind, nicht wiederherstellen kann. Diese Informationen sind im Bild nicht mehr enthalten. Es findet also eine Umverteilung der Frequenzen, welche ungleich Null sind, statt.

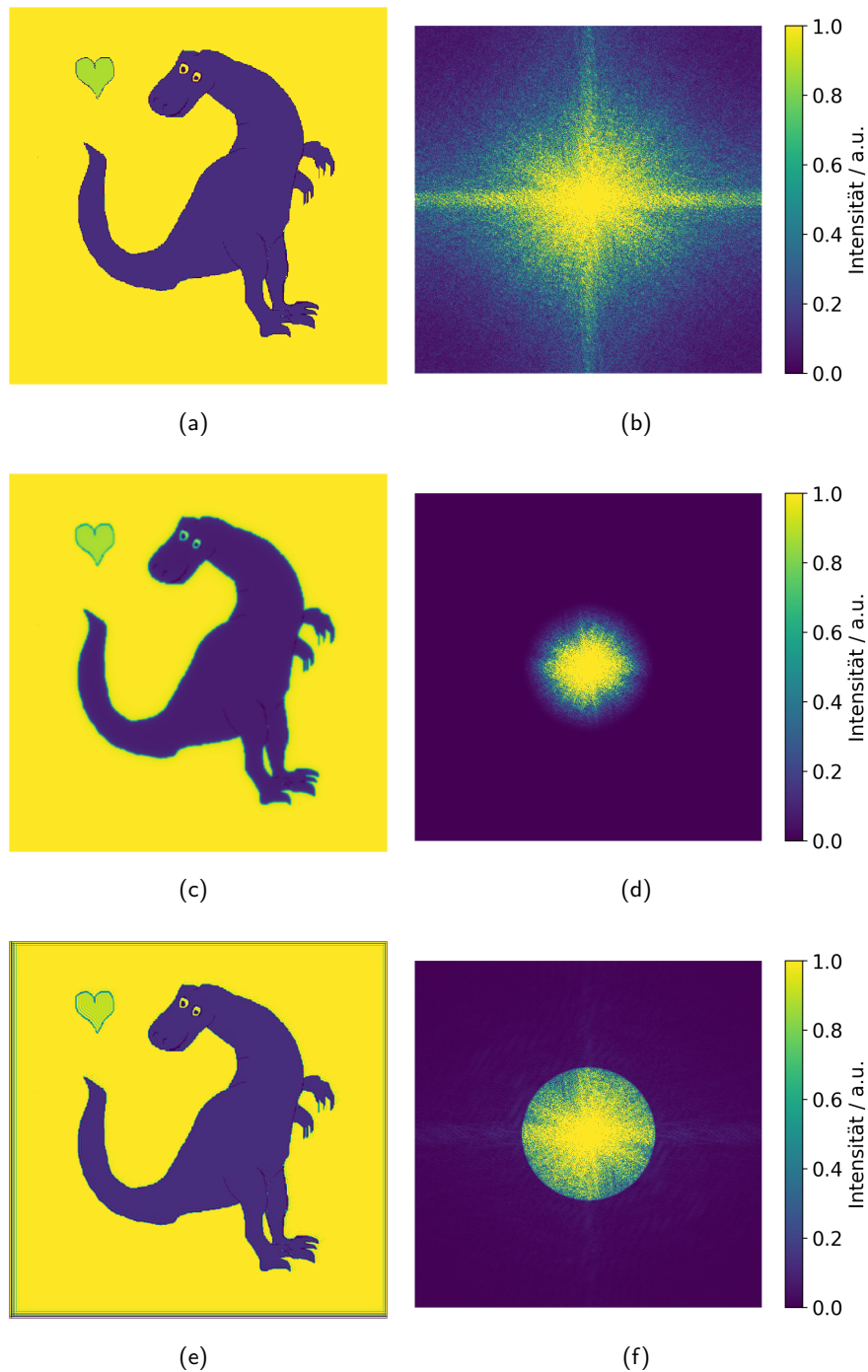


Abbildung 3.13: Beispiel einer Dekonvolution: Ein Beispielbild (a) wird mit einer beliebigen PSF (b) gefaltet. Das Ergebnis ist ein unschärferes Bild (c). Die entsprechende OTF fällt nach außen hin ab und ist räumlich begrenzt (d). Das dekonvolutierte Bild ist schärfer, zeigt aber auch leichte Artefakte an den Rändern (e). Die entsprechende OTF weist eine gleichmäßigere Verteilung im Vergleich zu (d) auf (f).

Kapitel 4

Charakterisierung des Mikroskops

In Rahmen dieser Arbeit wurde ein Airystrahl-Lichtscheibenmikroskop konzipiert und aufgebaut. Im Folgenden wird zuerst der Aufbau mit den einzelnen Bestandteilen und deren Funktionsweisen beschrieben sowie die Ansteuerungssoftware des Mikroskops. Anschließend werden die optischen Eigenschaften wie die Messung der Strahlprofile, der Auflösung und des Kontrastes erläutert.

Das Mikroskop wurde zur Messung großer Proben, wie beispielsweise der Abbildung von Maushirnschnitten, entwickelt. Diese Proben sollen in hoher Auflösung in 3D abgebildet werden, um sowohl Strukturen großer Dimension als auch kleinste Verbindungen und Details sichtbar zu machen. Daraus ergeben sich bestimmte Anforderungen, welche in der Planung und im Aufbau des Mikroskops berücksichtigt werden.

Zum einen sollte das Mikroskop eine hohe Bildrate und ein großes Sichtfeld aufweisen. Dadurch wird eine möglichst schnelle Aufnahme eines möglichst großen Bereichs ermöglicht. Zur technischen Umsetzung werden Kameras mit hoher Aufnahmezeitrate eingesetzt und für einen großen Bildausschnitt wird eine 20-fache Vergrößerung im Detektionsobjektiv gewählt. Dadurch entsteht ein Sichtfeld von $(660 \times 660) \mu\text{m}^2$. Die Proben besitzen allerdings eine Größe von ca. $(6 \times 6 \times 0,6) \text{mm}^3$. Es ist also notwendig, die Probe stückweise abzubilden, was wiederum eine automatische Verschiebung der Probe sowie die entsprechende Ansteuerung in der Software voraussetzt. Zusätzlich erfordern die Proben, welche aus einem Hydrogel bestehen, eine Lagerung in Flüssigkeit, wofür eine spezielle Probenkammer konzipiert wurde.

Zur Unterscheidung verschiedener Strukturen werden in den Proben Fluorophore verwendet, welche mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden. Um auch hier eine schnelle Aufnahme zu ermöglichen, wurde eine simultane Aufnahme von zwei Farbkanälen gleichzeitig umgesetzt, was spezielle Anforderungen an die Beleuchtung mit dem Airystrahl und die Detektion stellt.

4.1 Aufbau

Im folgenden Abschnitt wird der Aufbau des Airystrahl-Lichtscheibenmikroskops genau beschrieben und die Funktionsweise der einzelnen Bestandteile erläutert. Eine Liste der verwendeten Bauteile und Geräte findet sich in Anhang A1. Das Mikroskop wurde auf Basis eines bestehenden Lichtscheibenmikroskops entwickelt, welches von Dr. Jana Heyssel im Rahmen ihrer Promotion geplant und aufgebaut wurde [60].

4.1.1 Beleuchtung

Der Beleuchtungspfad des Mikroskops besteht aus einer Gaußstrahl- und einer Airystrahlbeleuchtung. Durch diese Kombination können die Strahlprofile, die optischen Eigenschaften sowie die entsprechenden Aufnahmen direkt verglichen werden. Zusätzlich werden die Bilder, welche mit Gaußstrahlanregung aufgenommen werden, später als Daten für das Training der Deep Learning Dekonvolution verwendet. Dafür ist es sinnvoll, die Umstellung von einer Beleuchtung auf die andere so einfach wie möglich umzusetzen. Da genau der gleiche Bereich einer Probe mit beiden Methoden aufgenommen werden muss, soll ein Umbau von optischen Bauteilen oder eine Neujustage des Anregungsstrahls vermieden werden.

Eine Übersicht über den kompletten Beleuchtungsstrahlengang ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Zur Anregung werden Laser der Wellenlängen 408 nm, 488 nm, 561 nm und 638 nm verwendet. Ausgehend von der Laserbox werden die Strahlen in eine Monomodenfaser gekoppelt und über die Faser zum Aufbau geleitet. Der kollimierte Strahl trifft auf eine $\lambda/2$ -Wellenplatte und anschließend auf einen Polarisationsstrahlteiler. Mit der Wellenplatte kann die Polarisationsrichtung des Strahls gedreht werden. Durch den Strahlteiler wird dann das senkrecht polarisierte Licht reflektiert, während der waagrecht polarisierte Anteil des Strahls transmittiert wird. Auf diese Weise kann bestimmt werden, in welchem Anregungsstrahlengang wie viel Licht ankommt. Für spätere Messungen wird die Polarisationsrichtung des Strahls so eingestellt, dass in der Probenkammer jeweils 50 % der Gesamtintensität ankommen. Am Anfang wird dafür ein leicht größerer Anteil für die Airystrahlanregung verwendet, da sich hier mehr optische Elemente befinden, welche jeweils einen geringen Teil der Intensität absorbieren.

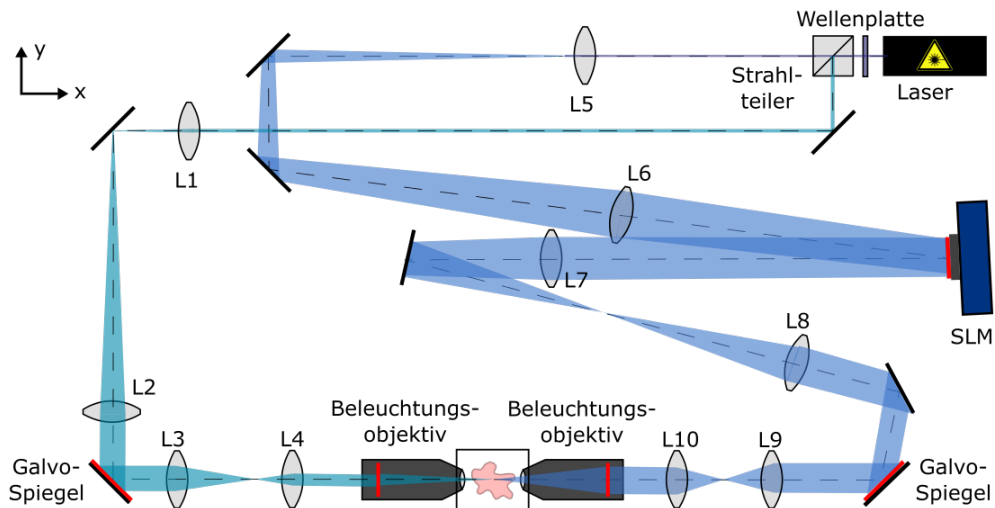


Abbildung 4.1: Beleuchtungsstrahlengang: Im Aufbau werden Gauß- und Airystrahlbeleuchtung kombiniert. Der hellblau dargestellte Strahlengang zeigt den Weg des Gaußstrahls, während der dunkelblau abgebildete Weg den Verlauf des Airystrahls zeigt, welcher mit Hilfe des SLMs erzeugt wird. Die beiden Strahlen treffen dann von gegenüberliegenden Seiten auf die Probenkammer. Zueinander konjugierte Ebenen sind rot markiert. [47]

Um Linsen und Spiegel auf eine Achse zu justieren, wird im Aufbau ein *Cage-System* verwendet. Hierbei werden die Halterungen von Linsen und Spiegeln über waagerechte Stangen verbunden. Zur Justierung des Abstandes der Bauteile können diese dann entlang der Stangen geschoben werden, ohne dass sich die laterale Position ändert.

Gaußstrahlanregung Ein Laserstrahl hat üblicherweise bereits eine gaußförmige Intensitätsverteilung. Der Strahl, welcher vom Strahlteiler reflektiert wird, wird für die Gaußstrahlanregung nur über mehrere optische Elemente zur Probenkammer geleitet. Zuerst trifft der Strahl auf Spiegel und ein vergrößerndes bzw. verkleinerndes Linsenpaar ($f_{L1} = 150 \text{ mm}$, $f_{L2} = 300 \text{ mm}$ bzw. 150 mm). Da zwei Gaußstrahlen mit unterschiedlichen Strahlradien untersucht werden, werden Linsen mit verschiedenen Brennweiten für L2 verwendet. Anschließend wird der Strahl von zwei Galvo-Spiegeln reflektiert. Diese Spiegel können durch einen Galvanometerantrieb gekippt werden. Durch einen angelegten Strom wird über eine Spule in einem Magnetfeld eine Rotationsbewegung des Spiegels erzeugt. Durch diese Bewegung wird der Strahl entlang der y -Richtung gescannt, sodass in der Probenkammer das Lichtblatt entsteht. Dafür muss die Bewegung des Lichtstrahls schnell genug sein, um während der Belichtungszeit das komplette Sichtfeld zu beleuchten.

Für den Gaußstrahl wird ein 2-achsiger Galvo-Spiegel verwendet. Für jeden Spiegel lassen sich separat ein Offset sowie eine Amplitude einstellen. Durch Kombination von zwei Spiegeln kann die Höhe des Strahls in z -Richtung über den z -Offset in der Ansteuerungssoftware variiert werden. Die Amplitude für diesen Strahl ist Null, da der Strahl nur in y -Richtung gescannt wird. Die Position und Auslenkung des Strahls in y -Richtung wird durch den y -Offset bzw. die y -Amplitude bestimmt. Durch diese flexible Justagemöglichkeit des Gaußstrahls kann der Strahl auf die gleiche Höhe wie der Airystrahl gelegt werden (s. Abb. 4.2). Dadurch ist sichergestellt, dass von beiden Strahlen der gleiche Bereich beleuchtet wird und der Fokus auf der gleichen z -Position liegt.

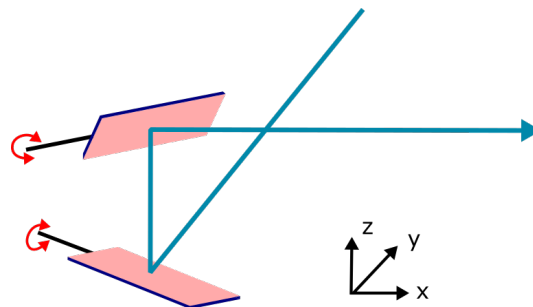


Abbildung 4.2: Perspektivische Sicht auf die Galvo-Spiegel: Das einfallende Licht trifft auf den unteren Spiegel. Mit diesem Spiegel wird der Strahl in die y -Richtung translatiert und gescannt und in z -Richtung (senkrecht) reflektiert. Mit dem zweiten Spiegel kann die Höhe des Strahls angepasst werden.

Anschließend durchläuft der Strahl zwei weitere Linsen ($f_{L3} = 75 \text{ mm}$, $f_{L4} = 50 \text{ mm}$), sodass der Strahl insgesamt um einen Faktor 1,33 bzw. 0,67 vergrößert bzw. verkleinert wird. Die Vergrößerung vor dem Durchgang durch das Beleuchtungsobjektiv führt zu einer Fokussierung des Strahls in der Probenkammer. Zusätzlich zur Vergrößerung sorgen die Linsen L3 und L4 dafür, dass der Strahl in der Probenkammer nicht gekippt ist, wie es direkt nach dem Galvo-Spiegel der Fall ist, sondern parallel zur optischen Achse verschoben wird. Das ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Der kollimierte Strahl, welcher L3

vom Galvo-Spiegel aus erreicht, wird erst fokussiert und verläuft nach L4 wieder parallel. Der Abstand von L4 und Beleuchtungsobjektiv sollte so gewählt werden, dass der Fokus von L4 in die hintere fokale Ebene (HFE) des Beleuchtungsobjektivs fällt. In diesem Fall erhält man einen fokussierten Strahl im Abstand des Arbeitsabstandes vor dem Objektiv.

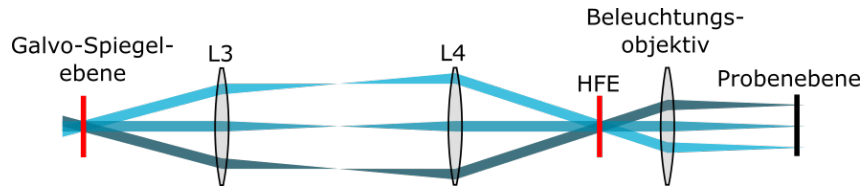


Abbildung 4.3: Strahlengang des Gaußstrahls zwischen Galvo-Spiegel und Probenebene: Der kollimierte Strahl, welcher durch den Galvo-Spiegel abgelenkt wird, wird durch L3 erst fokussiert und trifft nach einer zweiten Linse, L4, parallel auf das Beleuchtungsobjektiv. In der Probenebene entsteht ein fokussierter Strahl, welcher abhängig von der Galvo-Spiegel Position parallel verschoben ist.

Airystrahlanregung Das auf den SLM einfallende Licht sollte parallel zur Ausrichtung der Flüssigkristalle polarisiert sein, um die entsprechende Phasendrehung für die Airystrahlerzeugung zu realisieren. Daher wird hier das vom Strahlteiler transmittierte Licht verwendet, welches bereits die richtige Polarisationsrichtung aufweist. Der transmittierte Strahl wird durch zwei Linsen ($f_{L5} = 30 \text{ mm}$, $f_{L6} = 500 \text{ mm}$) um den Faktor 16,6 vergrößert. Dadurch wird der aktive Bereich des SLMs, auf welchen das Phasenmuster projiziert wird, komplett beleuchtet. Der SLM ist konjugiert zur hinteren fokalen Ebene des Beleuchtungsobjektivs positioniert, sodass in der vorderen fokalen Ebene in der Probenkammer der Airystrahl entstehen kann.

Durch die auf den SLM folgenden Linsen ($f_{L7} = 250 \text{ mm}$, $f_{L8} = 150 \text{ mm}$, $f_{L9} = 100 \text{ mm}$, $f_{L10} = 75 \text{ mm}$) wird der Strahl insgesamt um einen Faktor 0,45 verkleinert. Das ist notwendig, da die hintere Apertur des Beleuchtungsobjektivs kleiner ist als die aktive Fläche des SLMs. Der Strahl wird also optisch verkleinert, um trotzdem den gesamten Strahl in die Probenkammer zu projizieren. Zwischen L8 und L9 wird der Strahl von einem Galvo-Spiegel reflektiert. Hier wird nur ein einachsiger Spiegel verwendet, da dieser mit einer größeren Fläche (10 mm Durchmesser) verfügbar war und somit besser geeignet ist, das größere Strahlprofil des Airystrahls zu reflektieren. Nach den Linsen L9 und L10 erreicht der Strahl das Beleuchtungsobjektiv, wo das Strahlprofil final fouriertransformiert wird, sodass der Airystrahl vor dem Objektiv in der Probenkammer entsteht.

Bei der Anregung mit der UV-Wellenlänge von $\lambda_{Ex} = 405 \text{ nm}$ muss beachtet werden, dass sich die Fokusposition in der Probenkammer merklich verschiebt. Es werden zwar nur achromatische Linsen in den Anregungsstrahlengängen verwendet, allerdings entsteht auch hier bei kleinen Wellenlängen eine Verschiebung (s. Abb. 4.4). Um das auszugleichen, lassen sich die axialen Positionen der Linsen L3 und L9 anpassen. Auf diese Weise kann die Strahltaile in der Probenkammer leicht entlang der x -Achse in das Zentrum des Sichtfeldes verschoben werden.

4.1.2 Probenkammer

Die Probenkammer des Mikroskops soll vor allem gute Bedingungen für die Messung der Probe bieten, aber gleichzeitig einen möglichst kleinen Einfluss auf den optischen Strahl-

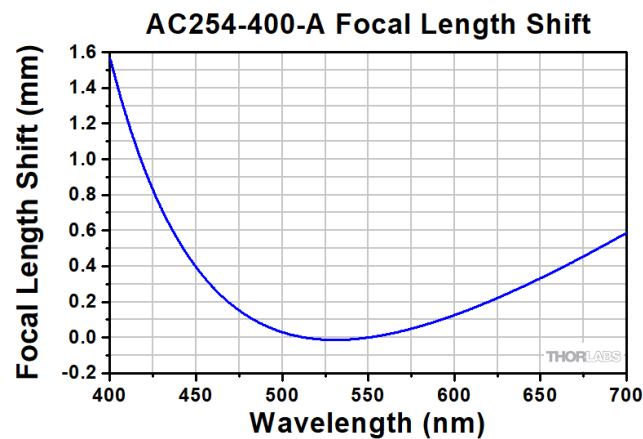


Abbildung 4.4: Fokuspunktverschiebung für achromatische Linsen: Für eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{Ex} = 405$ nm verschiebt sich der Fokuspunkt deutlich. Daher muss für eine Messung mit dieser Wellenlänge die Linsenposition und die Position des Detektionsobjektivs auf die veränderte Brennweite angepasst werden. [61]

lengang haben. Die Kammer wurde in der Mechanikwerkstatt des Clausius-Institut für Physikalische und Theoretische Chemie hergestellt. Sie besteht aus schwarzem Kunststoff und kann mit Wasser oder anderen Flüssigkeiten befüllt werden (s. Abb. 4.5 (a)). Die vordere Glasfront der Beleuchtungsobjektive ist dabei in direktem Kontakt mit der Flüssigkeit. Auf diese Weise wird Streuung und Absorption an zusätzlichen Glasflächen vermieden. Die Beleuchtungsobjektive sind keine Tauchobjektive und damit nicht gesichert wasserdicht. Leider gibt es keinen Hersteller, welcher Tauchobjektive mit einem Arbeitsabstand von über 25 mm anbietet, welcher nötig wäre, da die Proben von der Seite beleuchtet werden und sich auf einem Deckglas mit einer Breite von 25 mm befinden. Um die Objektive trotzdem vor der Flüssigkeit zu schützen, wurde die Kammer und die Objektivbefestigung so konzipiert, dass die Objektive mit etwas Druck gegen einen Dichtungsring, welcher auf der Glasfläche des Objektivs aufliegt, gepresst werden. Das Wasser berührt auf diese Weise nur die Glasfront und kommt nicht mit dem Rest des Objektivs in Berührung. Der Druck gegen den Dichtungsring wird durch vier Federn gehalten, welche die Probenkammer mit dem Objektiv verbinden. Durch den gleichmäßigen Zug von allen Seiten wird außerdem sichergestellt, dass das Objektiv in Bezug auf die Probenkammer gerade ausgerichtet ist. Die Breite der Probenkammer ergibt sich aus dem Abstand der Objektive. Da der Fokus von beiden Beleuchtungsarmen übereinander liegen soll, ergibt sich der Abstand aus dem Arbeitsabstand $w_D = 34$ mm der Objektive und dem Brechungsindex n : $A_{Obj} = 2 \cdot n \cdot w_D = 2 \cdot 1,33 \cdot 34 \text{ mm} = 90,44 \text{ mm}$. Die Objektive in der Kammer haben also einen Abstand von $A = 90,44 \text{ mm}$ zueinander.

Mit dem Mikroskop sollen Proben, welche aus einem Hydrogel bestehen, gemessen werden. Zur Messung wird die Probe durch die Verwendung von Poly-L-Lysin (0,1 % (w/v) in Wasser) auf einem Deckglas fixiert. Poly-L-Lysin ist ein synthetisches Polyamid, welches über freie Aminogruppen verfügt. Es wird auf das Deckglas aufgetragen und nach wenigen Minuten wird der ungebundene Überstand entfernt. Die Probe ist nun durch eine elektrostatische Bindung zu den Polymeren auf dem Deckglas befestigt. Das Deckglas wird auf einen Probenhalter geschraubt. Dieser wurde von Dr. Jana Heysel [60] konzipiert und ist in Abbildung 4.5 (b) gezeigt. Er besteht, wie die Probenkammer, aus schwarzem



Abbildung 4.5: (a) Seitliche Ansicht der Probenkammer: Die Kammer wurde so konstruiert, dass die vordere Glasfront der Objektive im direkten Kontakt mit der Flüssigkeit in der Probenkammer ist. (b) Foto des Probenhalters: Die Probe wird auf einem Deckglas befestigt, welches über zwei Klemmen auf dem Probenhalter fixiert wird. Der Probenhalter haftet mit Magneten an den Motoren.

Kunststoff und im vorderen Teil kann ein Deckglas der Größe $(25 \times 25 \times 0,17) \text{ mm}^3$ mit Metallklammern befestigt werden. Wenn die Schrauben an den Klammern angezogen werden, drücken diese leicht auf das Deckglas, sodass es in der vorgesehenen Mulde fixiert ist. Fugen an den Seiten und eine Aussparung unterhalb des Deckglases sorgen dafür, dass die Strahlen von beiden Seiten die Probe ungehindert erreichen können. Der Probenhalter wird mit dem unteren Bereich in die Flüssigkeit in der Probenkammer getaucht. Mit den Magneten am oberen Teil des Halters wird er an Linearverstellern befestigt. Mit diesen kann die Probe in x -, y - und z -Richtung bewegt werden. Die kleinste Schrittweite der Linearversteller beträgt 50 nm , sodass die Probe sehr genau positioniert werden kann. Sie wird während einer Messung sowohl in z -Richtung bewegt, um dreidimensionale Aufnahmen zu erhalten, aber auch in x, y -Richtung, um eine große Probe Stück für Stück aufzunehmen.

4.1.3 Detektion

Das Fluoreszenzsignal wird orthogonal zur Beleuchtung detektiert. In Abbildung 4.6 ist der optische Weg mit den unterschiedlichen Bestandteilen dargestellt. Das Detektionsobjektiv ist ein Tauchobjektiv mit einer großen numerischen Apertur von $1,0$ und einem großen Arbeitsabstand von 2 mm . Durch die hohe numerische Apertur kann eine gute optische Auflösung erreicht werden und durch den großen Arbeitsabstand kann auch eine ausgedehnte Probe in z -Richtung komplett vermessen werden, ohne dass das Objektiv die Probe oder die Gelschicht über der Probe berührt. Das Objektiv besitzt in Kombination mit der eingebauten Tubuslinse eine Vergrößerung von $M = 20$ und ist an einem Fokusblock befestigt. Dieser ermöglicht eine Verschiebung des Objektivs entlang der z -Achse. Dadurch kann der Fokus so eingestellt werden, dass der vom Lichtblatt ausgeleuchtete Bereich scharf abgebildet wird. Eine Einstellung erfolgt manuell über ein Drehrad, sodass sowohl eine Grob- als auch eine Feineinstellung des Fokus vorgenommen werden kann.

Hinter dem Objektiv ist ein Vergrößerungswechsler eingebaut. Dieser ermöglicht eine zusätzliche zweifache Vergrößerung, sodass insgesamt eine Vergrößerung von $M = 40$

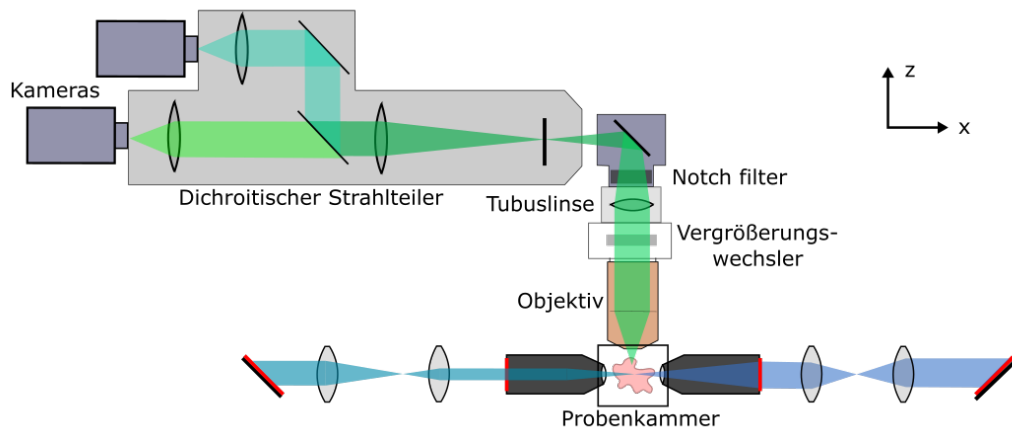


Abbildung 4.6: Detektionsstrahlengang: Das Fluoreszenzsignal wird vom einem $20\times$ Objektiv detektiert. Mit dem Vergrößerungswechsler kann eine zusätzliche $2\times$ Vergrößerung eingestellt werden. Nach Tubuslinse, Filter und Spiegel wird der Strahl durch einen dichroitischen Strahlteiler wellenlängenabhängig transmittiert bzw. reflektiert und von den Kameras detektiert. [47]

erreicht werden kann. Der Wechsel der Vergrößerung erfolgt über einen Revolver, welcher für die Vergrößerung zusätzliche Linsen enthält. Direkt auf dem Vergrößerungswechsler sitzt die Tubuslinse mit einer Brennweite von $f = 180\text{ mm}$. Objektiv, Vergrößerungswechsler und Tubuslinse sind von Olympus. Hier ist es wichtig, dass alle optischen Bauteile vom gleichen Hersteller sind, da die Hersteller unterschiedliche Korrekturen zur Minimierung optischer Fehler, wie beispielsweise Aberrationen, integrieren. Diese Korrekturen müssen für alle Bauteile gleich sein, da sich sonst starke optische Abweichungen ergeben.

Direkt hinter der Tubuslinse wird durch einen *Notch*-Filter das Anregungslicht, welches durch Streuung in den Detektionspfad gelangt, herausgefiltert. Das Fluoreszenzlicht wird nachfolgend über einen 90° -Spiegel in horizontale Richtung abgelenkt. Darauf folgt der sogenannte Hamamatsu Gemini, welcher mehrere optische Elemente enthält und die simultanen Aufnahme zweier Farbkanäle ermöglicht. An einem dichroitischen Spiegel wird der Strahl entsprechend der Wellenlänge geteilt. Wellenlängen $< 555\text{ nm}$ werden reflektiert, während höhere Wellenlängen transmittiert werden. Durch zusätzliche Filter kann die Bandbreite des detektierten Lichts begrenzt werden. Durch eine weitere Linse wird das Fluoreszenzsignal jeweils auf eine sCMOS-Kamera fokussiert und dort detektiert.

4.1.4 Elektronische Komponenten

Für den Betrieb des Mikroskops ist ein Zusammenspiel der verschiedenen elektronischen Komponenten erforderlich. Die Laser, das Datenerfassungsgerät (engl. *Data acquisition*, DAQ) zur Erzeugung aller Triggersignale, der SLM und der Controller zur Ansteuerung der Linearversteller werden von einem Hauptcomputer (PC1) angesteuert. Die Linearversteller können zusätzlich über einen manuellen Controller bewegt werden, welcher über USB auf den Controller zugreift. Somit kann die Position der Probe grob eingestellt werden. Über den DAQ werden sowohl die beiden Kameras und Laser über ein digitales Signal, als auch die Galvo-Spiegel über ein analoges Signal geschaltet. Zur Ansteuerung

der zweiten Kamera wird ein zweiter Computer verwendet. Die beiden Kameras sind zusätzlich jeweils über ein CameraLink Kabel mit dem Computer verbunden, wobei die Datenübertragung mittels PCI-Karte erfolgt. Die Computer sind mit einem Netzwerkkabel verbunden und kommunizieren über ein *Transmission Control Protocol* (TCP).

4.1.5 Software und SLM

Für die Steuerung des Mikroskops wird eine Software verwendet, die in der Programmierungsumgebung LabView geschrieben ist. LabView ist ein grafisches Programmiersystem basierend auf der Programmiersprache G, entwickelt von National Instruments. LabView Programme bestehen aus einem Frontpanel, welches als Benutzerschnittsstelle dient, und einem Blockdiagramm, welches die einzelnen Elemente des graphischen Programmcodes enthält. Die Verwendung von LabView vereinfacht die Ansteuerung der unterschiedlichen Bauteile erheblich. Von den Herstellern elektronischer Geräte werden dafür Unterprogramme zur Verfügung gestellt, welche den Zugriff auf die elektronischen Schnittstellen ermöglichen. Im Folgenden werden einige wichtige Bestandteile des Ansteuerungsprogramms erläutert. Eine genaue Beschreibung findet sich auch in der Dissertation von Dr. Jana Heysel [60].

Trigger Ein zentraler Teil des LabView Programms ist die Ausgabe der Trigger für Kamera, Laser und Galvo-Spiegel. Diese müssen synchron interagieren. Sobald die Belichtungszeit t_{exp} der Kamera beginnt, bewegt der Galvo-Spiegel den Laser über das Sichtfeld, um das virtuelle Lichtblatt zu erzeugen. Der Laser ist auch nur während der Belichtungszeit an, da sonst die Probe stärker gebleicht wird. Die Triggersignale werden durch unterschiedliche Signallaufzeiten und Ansprechzeiten der einzelnen Geräte beeinflusst, wodurch diese nicht zeitgleich, sondern leicht versetzt zueinander starten. Die unterschiedlichen Signalformen und -zeiten sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

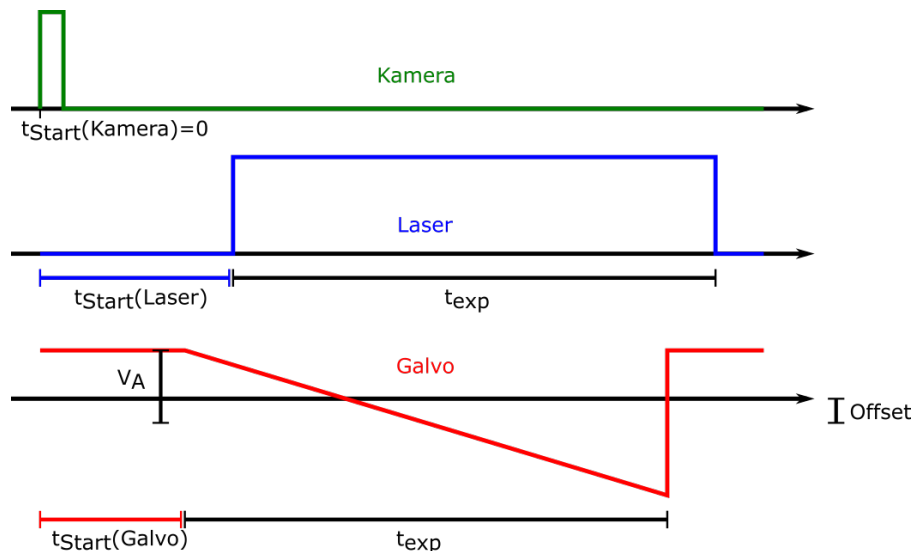


Abbildung 4.7: Triggersignale von Kamera, Laser und Galvo-Spiegel: Durch die unterschiedlichen Ansprechzeiten der Geräte starten alle Triggersignale leicht zeitversetzt. Kamera und Laser werden durch ein digitales Rechtecksignal erzeugt. Die Auslenkung des Galvo-Spiegels wird durch ein analoges Sägezahnsignal bestimmt. Selbsterstellt, basierend auf [60].

Die Kameras werden durch ein digitales Signal gesteuert. Die Aufnahme startet bei der steigenden Flanke eines Rechtecksignals. Dieser Trigger dient lediglich als Startsignal, daher ist die Signaldauer irrelevant. Diese sollte nur deutlich kürzer als die Belichtungszeit sein, daher wird diese auf 0,5 % der Belichtungszeit festgelegt. Die Ansprechzeit der Kamera ist im Vergleich zu Laser und Galvo-Spiegel am längsten. Das Startsignal für die Kamera beginnt daher am frühesten ($t_{\text{Start}}(\text{Kamera}) = 0$).

Die Laser werden ebenfalls durch ein digitales Signal getriggert. Das Stufensignal wird durch die Zeit bestimmt, die die Laser eingeschaltet sind, was der Belichtungszeit entspricht. Am Ende der Belichtungszeit schaltet sich der Laser entsprechend dem Signal wieder aus. Für jeden der vier Laser wird ein eigenes Triggersignal erzeugt, wodurch jeder Laser einzeln im Programm angesteuert werden kann. Die Laser besitzen eine sehr kurze Ansprechzeit. Um trotzdem gleichzeitig mit dem Start der Kamera zu agieren, entspricht die Verzögerungszeit der internen Signalverzögerung der Kameras, welche empirisch bestimmt wurde.

Die Galvo-Spiegel werden mit einem bzw. zwei analogen Signalen gesteuert. Der zweiachsige Galvo-Spiegel erhält zwei separate Signale, wodurch beide Spiegel einzeln gesteuert werden. Durch das Signal wird eine Spannung erzeugt, welche die Spiegel entsprechend auslenkt. Der Ruhepunkt des Spiegels wird über einen Offset definiert. Dieser wird während der Justage des Mikroskops so eingestellt, dass sich Airy- bzw. Gaußstrahl in der Mitte des Sichtfeldes befinden. Für den z-Spiegel wird der Offset so gewählt, dass der Gaußstrahl auf gleicher Höhe wie der Airystrahl positioniert ist. Dieser Spiegel wird auch während der Aufnahme nicht bewegt. Zur y -Ablenkung der Strahlen wird ein Sägezahnsignal mit einer Amplitude V_A erzeugt. Der Spiegel bewegt sich dann entsprechend dem jeweiligen Spannungswert. Zu Beginn der Aufnahme wird der Spiegel so ausgelenkt, dass sich der Strahl am oberen Rand des Bildfeldes befindet. Während der Belichtungszeit bewegt er sich zum unteren Rand und springt nach der Belichtungszeit wieder zurück. Die Galvo-Spiegel reagieren schneller als die Kamera, aber langsamer als die Laser. Die Verzögerungszeit liegt also dazwischen:

$$t_{\text{Start}}(\text{Kamera}) < t_{\text{Start}}(\text{Galvo}) < t_{\text{Start}}(\text{Laser})$$

Neben den Verzögerungen vor den Triggersignalen ist es wichtig, dass alle Signale die gleiche Gesamtlaufzeit haben. Nur dann startet der neue Zyklus zur gleichen Zeit. Die Gesamtlaufzeit t_{Ges} wird durch das Signal mit der größten Startzeitverzögerung ($t_{\text{Start}}(\text{Laser})$) und dessen Laufzeit (t_{exp} bestimmt). An jedes Signal muss also ein Nullsignal mit einer entsprechenden Endlänge t_{end} angehängt werden, sodass für alle Triggersignale gilt:

$$t_{\text{Start}} + t_{\text{Signal}} + t_{\text{End}} = t_{\text{Ges}} = t_{\text{Start}}(\text{Laser}) + t_{\text{exp}}$$

Echtzeitansicht Um einen Einblick in eine Probe zu erhalten und spezielle Regionen mit interessanten Strukturen zu finden, wurde eine Echtzeitansicht in das Labview Programm integriert. Damit ist es außerdem möglich, den Strahlengang zu justieren und die verschiedenen Einstellungen für eine Aufnahme anzupassen.

Die Echtzeitansicht greift dabei auf verschiedene Parameter zu. Dazu gehören die Belichtungszeit, Offset und Amplitude der Galvo-Spiegel sowie die Verzögerungszeiten von Laser, Kamera und Galvo-Spiegel. Zusätzlich ist es möglich, sich die Motorposition der Linearversteller parallel anzeigen zu lassen. Auf diese Weise kann der Benutzer direkt

beobachten, wie stark die Probe mit der manuellen Steuerung bewegt wird, und sicherstellen, dass die Motoren die Probe nicht zu hoch fahren und diese damit möglicherweise gegen das Detektionsobjektiv gefahren wird. Sobald die Echtzeitansicht gestartet wird, werden Kamera und Galvo-Spiegel initialisiert. Für die Airystrahlbeleuchtung wird das Phasenmuster auf den SLM projiziert. Anschließend startet eine Schleife, welche die entsprechenden Trigger erstellt. So werden Bilder aufgenommen, solange, bis der Benutzer die Echtzeitansicht stoppt. Die Bilder werden parallel in Echtzeit über einen Intensitätsgraphen im Programm angezeigt. Auch während Bilder aufgenommen und angezeigt werden, können die Parameter verändert werden, um den Einfluss auf das aktuelle Bild direkt zu beobachten.

Aufnahme Eine weitere wichtige Funktion des LabView Programms ist die Option zur automatisierten Bildaufnahme. Ein Großteil dieses Programmteils funktioniert analog zur Echtzeitansicht. Zum einen werden wieder die unterschiedlichen Verzögerungszeiten sowie Belichtungszeit, Offsets und Amplituden der Galvo-Spiegel abgefragt. Da die Abbildung der Proben im Allgemeinen einen volumetrische Aufnahme erfordert, können Bildstapel automatisch aufgenommen werden. Zwischen den einzelnen Bildern wird die Probe jeweils um eine Schrittgröße Δz mit den Linearverstellern bewegt. Die Schrittgröße kann in der Benutzeroberfläche eingestellt werden. Die Bilder werden von den Kameras im von Hamamatsu entwickelten Bilddateiformat *dcimg* aufgenommen. Ist die Aufnahme aller Bilder eines Stapels abgeschlossen, wird der Bildstapel in eine *tiff*-Datei umgewandelt und anschließend abgespeichert. Im *tiff*-Format können die Bildstapel dann mit ImageJ oder Python weiterverwendet werden. Die Bilder werden in der Regel mit einer Farbtiefe von 16 bit aufgenommen. Im Programm gibt es alternativ die Möglichkeit, die Bilder bei der Umwandlung in das *tiff*-Format auf 8 bit zu reduzieren und somit die Datenmenge zu minimieren.

Die verwendeten Proben sind in ihrer Ausdehnung deutlich größer als das Sichtfeld im Mikroskops. Die Region, welche relevante Informationen und Strukturen enthält (engl. *Region of Interest*, ROI) kann daher stückweise aufgenommen werden. Dafür beinhaltet die Bildaufnahme die Option zur kachelweisen Aufnahme: Nach der Aufnahme eines Bildstapels wird die Probe um eine gewisse Distanz Δy bzw. Δx verschoben. Diese Distanz entspricht typischerweise ca. 90 % des Sichtfeldes, also für den Airystrahl $\Delta x = \Delta y = 600 \mu\text{m}$. So überlappen die Bildstapel zu ca. 10 %, was in späteren Schritten zur Verknüpfung der Bildstapel genutzt werden kann.

Der Bereich der Bildaufnahme kann vom Benutzer festgelegt werden und die Motoren werden dann automatisch durch das LabView Programm so bewegt, dass der festgelegte Bereich in den Daten enthalten ist. Die Probe wird dafür zuerst an eine Ecke des ROI gefahren. Die Motorposition wird als Pos 1(x, y, z) gespeichert. Anschließend wird die Probe zur gegenüberliegenden Ecke gefahren und die Motorposition als Pos 2(x, y, z) gesetzt. Die Aufnahme startet dann bei der Anfangsposition Pos 1. Anhand der Schrittweite Δz bestimmt das Programm nun, wie viele Bilder in z -Richtung aufgenommen werden:

$$N_z = \frac{z_{\text{Pos 2}} - z_{\text{Pos 1}}}{\Delta z} + 1 \quad (4.1)$$

Nach der Aufnahme und Speicherung des Bildstapels wird der Motor auf seine Anfangsposition, also um die Distanz $z_{\text{Pos 2}} - z_{\text{Pos 1}}$, zurückgefahren. Anschließend bewegt sich der Motor bzw. die Probe um die Distanz Δx in x -Richtung. An dieser Position

wird wieder ein Bildstapel aufgenommen. Die Anzahl der Bildstapel wird äquivalent zu Gleichung 4.1 ebenfalls automatisch für die x -Richtung bestimmt. Die Aufnahme der Bildstapel wird so lange wiederholt, bis die gesamte Strecke $x_{\text{Pos } 2} - x_{\text{Pos } 1}$ zurückgelegt wurde und an jeder Position ein Bildstapel aufgenommen wurde. Nun fährt die Probe wieder zur Anfangsposition und wird anschließend um die Distanz Δy bewegt. Für die nächste Reihe werden alle Bildstapel aufgenommen. Auf diese Weise werden nun die Daten Reihe für Reihe aufgenommen, bis final die gesamte ROI erfasst wurde.

Zusätzlich beinhaltet das LabView Programm die Möglichkeit, Bilder zu mitteln. Das ist sinnvoll, wenn das Signal im Vergleich zum Hintergrundrauschen sehr schwach ist. Dafür werden an einer Position mehrere Bilder aufgenommen. Diese Bilder werden vor dem Speichern gemittelt. Da das Hintergrundrauschen mit jedem Bild variiert, das Signal aber in etwa gleich bleibt, beinhalten die gemittelten Bilder ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Aufnahme mit zwei Kameras Mit Hilfe des Strahlteilers im Detektionspfad des Mikroskops können parallel zwei Farbkanäle aufgenommen werden. Im Strahlteiler wird das Fluoreszenzsignal abhängig von der Wellenlänge auf Kamera 1 oder Kamera 2 umgelenkt. Die Kameras sind jeweils mit einem Computer verbunden. Diese müssen untereinander kommunizieren, um eine automatische Bildaufnahme zu ermöglichen. Die Computer sind über ein Netzkabel verbunden und können mit Hilfe der IP-Adressen Informationen austauschen. Dafür wird ein *Transmission Control Protocol* implementiert, welches definiert, auf welche Weise Daten ausgetauscht werden.

PC1 wird als Hauptcomputer verwendet. Hier ist LabView installiert und alle Funktionen werden von diesem Computer aus gesteuert. Auf PC2 befindet sich eine in LabView programmierte Anwendung, welche als ausführbare Datei wenige spezielle Funktionen zur Steuerung der Kamera beinhaltet. Von hier aus kann ebenfalls eine Echtzeitanzeige gestartet werden, alle Bildaufnahmeparameter werden allerdings am Hauptcomputer eingestellt und an PC2 zur Steuerung übermittelt.

Zum Starten einer Aufnahme wartet PC2 auf eine definierte Zeichenfolge von PC1. Der Inhalt dieser Zeichenfolge gibt vor, welche Programmooption konkret umgesetzt wird. Zusätzlich werden auch die unterschiedlichen Parameter, wie beispielsweise Belichtungs- und Verzögerungszeiten, an PC2 weitergegeben, damit diese auch für die zweite Kamera umgesetzt werden. Nach Erhalten des Startsignals startet PC2 die Aufnahme mit Kamera 2. Die Bilder werden im *tiff*-Format gespeichert. Nachdem das Speichern des Bildstapels beendet ist, wird eine Zeichenfolge an PC1 übermittelt, dass die Aufnahme beendet ist. Erst danach startet PC1 den Vorgang zur Aufnahme des nächsten Bildstapels.

SLM Der SLM kann wie ein zusätzlicher Bildschirm über einen Controller angesteuert werden. Der Computer ist über ein DVI Kabel mit dem Controller des SLMs verbunden. Um sicherzustellen, dass das korrekte Phasenmuster auf den SLM projiziert wird, wird die Anzeige auf dem SLM mit einem Bildschirm dupliziert. Auf dem Bildschirm wird so jederzeit angezeigt, welches Phasenmuster verwendet wird.

Der SLM wird ebenfalls vom LabView Programm aus angesteuert. In der Benutzeroberfläche kann der Dateipfad des Phasenmusters eingegeben werden. Vor der Aufnahme der Bilder wird das entsprechende Phasenmuster dann auf dem Bildschirm angezeigt und automatisch auf den SLM projiziert. Zur Realisation eines Gitter-Lichtscheibenmikroskops

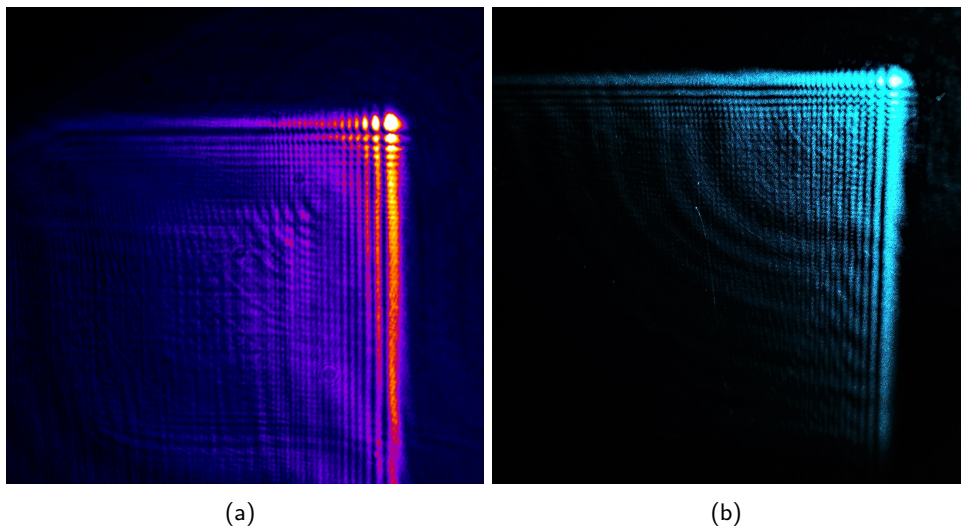


Abbildung 4.8: Querschnittsprofile des Airystrahls: (a): Aufgenommen durch Spiegelung des Strahls in den Detektionspfad des Mikroskops (b) Fotografiert nach Airystrahlerzeugung mittels SLM: Der Strahl wurde mit Spiegeln auf eine entfernte Fläche projiziert und das Profil dort fotografiert. Diese Abbildungen dienen der quantitativen Betrachtung des Airystrahlprofils und enthalten daher keine Skalierung.

mit strukturierter Beleuchtung, welches im Rahmen der Masterarbeit von Laura Weber gebaut wurde, beinhaltet das LabView Programm außerdem die Möglichkeit, das Muster zwischen der Aufnahme einzelner Bildern zu wechseln [62].

4.2 Optische Eigenschaften

Im folgenden Abschnitt wird näher auf die Bestimmung der optischen Eigenschaften des Mikroskops eingegangen. Der Einfluss von Gauß- bzw. Airystrahl auf Auflösung und Kontrast wird beschrieben und die Ergebnisse werden im Vergleich zu den simulierten Eigenschaften aus Kapitel 3 betrachtet.

4.2.1 Strahlprofil

Zuerst betrachten wir das Querschnittsprofil des Airystrahls in y, z -Richtung. Durch die z -Orientierung der Detektion kann normalerweise nur in x, y Ebene betrachtet werden. Um trotzdem eine Sicht auf das Querschnittsprofil zu erhalten, wird unterhalb des Detektionsobjektivs ein in 45° orientierter Spiegel positioniert. Dieser spiegelt das Anregungslicht in den Detektionspfad, wo es dann von der Kamera aufgenommen wird. Die Position des Spiegels ist dabei nur sehr grob justierbar. Diese Methode bietet daher keine quantitative Auswertung des Profils. Zum Vergleich wurde der Strahl nach der Erzeugung durch den SLM auf eine weiter entfernte Fläche reflektiert und das Profil fotografiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Das typische Profil des Airystrahls mit Nebenmaxima in orthogonaler Orientierung ist zu erkennen.

Zur Analyse der Strahlprofile in Propagationsrichtung wird in die Probenkammer eine Fluoresceinlösung gegeben. Dieser Farbstoff, gelöst in destilliertem Wasser, wird mit einer

Wellenlänge von $\lambda_{Ex} = 488 \text{ nm}$ angeregt. Das entsprechende detektierte Fluoreszenzsignal liegt bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Em} = 517 \text{ nm}$. Da der Farbstoff in der gesamten Probenkammer verteilt ist, wird die Abbildung der Strahlprofile durch das Signal von außerhalb der Fokusebene beeinflusst, sodass die Profile verbreitert wirken. Durch diesen Effekt entsprechen die Profile nicht genau den simulierten Strahlen aus Abbildung 3.7. Trotzdem kann ein Einblick in die Intensitätsverteilung der Strahlen gewonnen werden.

Der Airystrahl wurde für die Parameter

$$\begin{aligned} y_0 &= 0,8 \\ \alpha &= 0,08 \end{aligned}$$

erzeugt (s. Kap. 3.1). Das Phasenmuster beinhaltet Grauwert- und Wellenfrontkorrektur, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Zum Vergleich werden außerdem zwei Gaußstrahlen untersucht. Diese haben unterschiedliche Strahlradien und somit auch unterschiedliche Rayleighlängen. Die Strahlprofile in Fluorescein sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Zusätzlich sind die Intensitätsprofile entlang der Propagationsrichtung x und senkrecht in Querrichtung y abgebildet.

Zur Vermessung der Gaußstrahlen wird die Knife Edge Methode verwendet. Da die Intensitätsprofile im Fluorescein durch das Hintergrundsignal optisch verbreitert wirken, kann die Strahltaile nicht direkt anhand der Bilder der Strahlen in Fluorescein vermessen werden. Für die Knife Edge Methode wird eine Klinge schrittweise in den Strahl gefahren und die Intensität mit einer Photodiode gemessen. Die Intensitäten werden gegen die Klingenpositionen aufgetragen und durch Anpassung einer Gaußschen Fehlerfunktion ergibt sich der Strahlradius. Diese Messung wird für beide Gaußstrahlen durchgeführt.

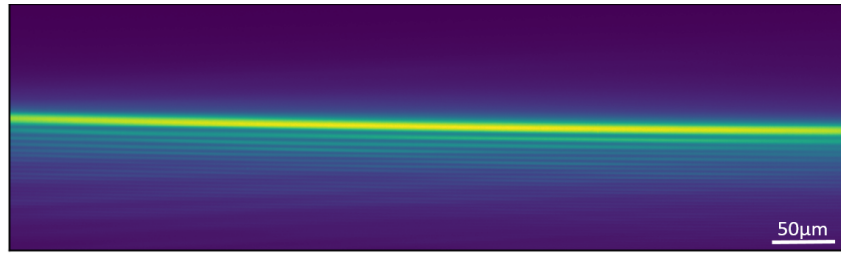
Im Mikroskop entstehen die Gaußstrahlen mit unterschiedlichen Eigenschaften durch unterschiedliche Brennweiten der Linse L2. Für den ersten Strahl ist $f_{L2} = 300 \text{ mm}$. Durch die Kombination mit den weiteren Linsen im Strahlengang wird der Laserstrahl vor dem Objektiv stark vergrößert und dementsprechend in der Probenebene stärker fokussiert. Dieser Strahl besitzt an seiner Strahltaile einen Strahlradius von

$$w_0 = (5,0 \pm 0,1) \mu\text{m}$$

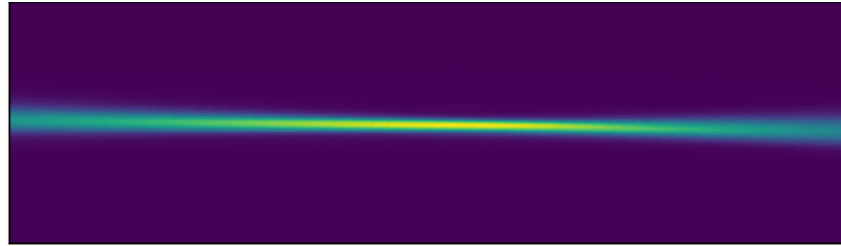
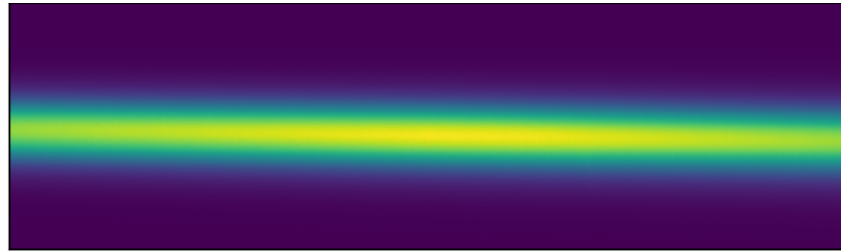
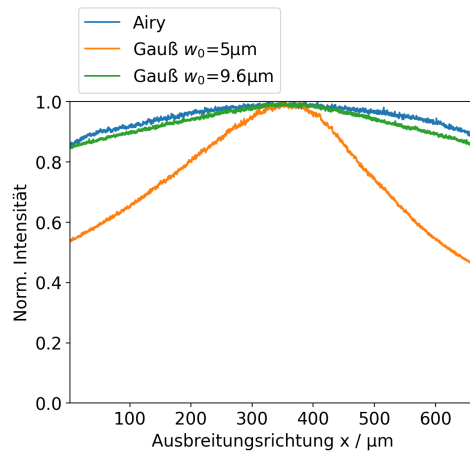
Mit seiner schmalen Strahltaile weist dieser Gaußstrahl den gleichen Durchmesser wie der Airystrahl auf. Gleichzeitig ist der Gaußstrahl deutlich kürzer, sodass die Intensität zu den Rändern stark abfällt (s. Abb. 4.9(b)). Für den zweiten Gaußstrahl wird der Laser vor dem Objektiv fokussiert. Dafür wird für L2 eine Linse mit der Brennweite $f_{L2} = 150 \text{ mm}$ verwendet. In der Probenebene entsteht ein breiter Strahl mit

$$w_0 = (9,6 \pm 0,2) \mu\text{m}$$

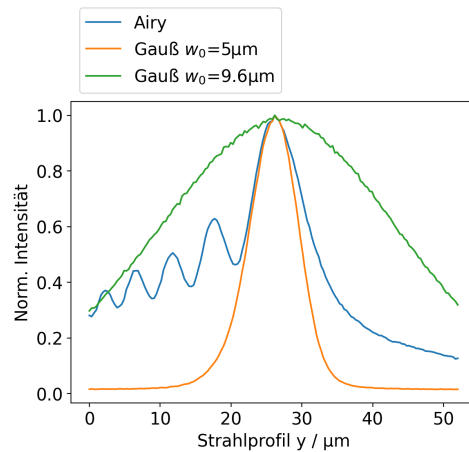
Dieser Gaußstrahl hat eine große Rayleighlänge und somit hat er die gleiche axiale Intensitätsverteilung wie der Airystrahl. Sein Durchmesser ist dafür deutlich breiter als das Hauptmaximum des Airystrahls (s. Abb. 4.9 (c)). Allgemein ergibt sich für axiale und laterale Intensitätsprofile der drei Strahlen ein ähnliches Bild wie in der Simulation (s. Abb. 3.7).



(a) Airystrahl

(b) Gaußstrahl, $w_0 = 5 \mu\text{m}$ (c) Gaußstrahl, $w_0 = 9,6 \mu\text{m}$ 

(d)



(e)

Abbildung 4.9: Vergleich von Airy- und Gaußstrahlen: (a-c): Intensitätsprofile, (d): Intensitätsverlauf in Propagationsrichtung x . Der Airystrahl (blau) zeigt eine weitestgehend gleichförmige Intensität, ähnlich wie der Gaußstrahl mit dicker Strahltaile (grün). Die Intensität des Gaußstrahls mit kleiner Strahltaile (orange) hingegen fällt zu den Rändern hin deutlich ab. (e): Intensitätsverlauf in Querrichtung (y): Das Hauptmaximum des Airystrahls besitzt den gleichen Durchmesser wie die Strahltaile des schmalen Gaußstrahls ($w_0 = 5 \mu\text{m}$).

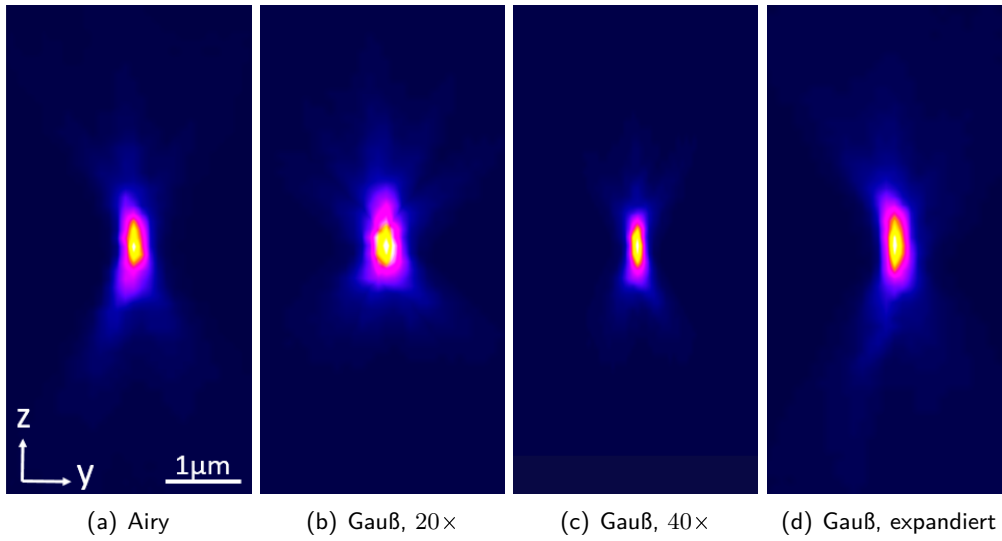


Abbildung 4.10: Gemittelte Intensitätsverteilungen der Mikropartikel für unterschiedliche Anregungsstrahlprofile (erstellt mit *Imaris*). Aus der Halbwertsbreite der Intensitätsverteilung kann das Auflösungsvermögen des Mikroskops ermittelt werden.

4.2.2 Auflösung

Um die Auflösung zu bestimmen, werden fluoreszierende Mikropartikel verwendet. Diese haben einen Durchmesser von $\varnothing_B = 200 \text{ nm}$ und sind somit quasi punktförmig. Die Mikropartikel werden in einem 1 %-igen Agarosegel immobilisiert. Der Brechungsindex des Agarosegels von $n = 1,333$ ähnelt dem Brechungsindex von Wasser [63]. Daher kann angenommen werden, dass keine starke Streuung an der Grenzfläche auftritt. Die Mikropartikel werden mit einer Wellenlänge von $\lambda_{Ex} = 505 \text{ nm}$ angeregt und fluoreszieren mit $\lambda_{Em} = 515 \text{ nm}$. Zur Bestimmung der Auflösung wird ein Bildstapel mit einer Schrittweite von $\Delta z = 300 \text{ nm}$ aufgenommen und ausgewertet.

Um einen verlässlichen Wert für die Auflösung zu erhalten, wurde ein Programm geschrieben, welches die Auflösung automatisch für viele Profile mittelt. Dafür werden die hellsten Maxima der Partikel lokalisiert und um diese ein Bereich von $60 \times 60 \times 60$ Pixeln ausgeschnitten. Das wird für insgesamt 100 Partikel durchgeführt. Zur Bestimmung der Auflösung wird jeweils das Intensitätsprofil entlang der x - bzw. z -Achse ermittelt und anhand einer angepassten Gaußfunktion wird die Halbwertsbreite $FWHM_B$ (engl. *Full width at half maximum*) bestimmt. Um die Auflösung zu erhalten, muss der Wert zusätzlich um die Partikelgröße $\varnothing_B$ korrigiert werden [64]:

$$FWHM = \sqrt{FWHM_B^2 - \varnothing_B^2}$$

Die Messung wird für die drei Strahlen durchgeführt, wobei für den Gaußstrahl mit kleiner Strahltaile auch Bilder mit der zusätzlichen $2\times$ Vergrößerung aufgenommen werden, um den Einfluss der Vergrößerung M auf die Auflösung zu bestimmen. Aus den herausgestellten Bereichen wird zusätzlich ein gemitteltes 3D Intensitätsprofil der Mikropartikel berechnet. Das x, z -Profil der gemittelten Intensitätsverteilungen ist in Abbildung 4.10 gezeigt.

Für die Auflösungen ergeben sich die Werte in Tabelle 4.1. Dabei handelt es sich um die Mittelwerte der Halbwertebreiten der angepassten Gaußfunktionen. Die Auflösung

ist für eine Vergrößerung von $20\times$ für alle Anregungsprofile sowohl für die axiale als auch die laterale Richtung recht ähnlich. Für eine Vergrößerung von $40\times$ ergibt sich eine bessere Auflösung. Diese Werte spiegeln das bereits simulierte Verhalten wider: Die Auflösung wird maßgeblich durch die Objektpixelgröße und damit durch die Vergrößerung bestimmt. Da der Anregungsstrahl für alle Fälle breiter als die fokale Ebene ist, ist die optische Auflösung gleich. Lediglich die Kameraauflösung wird durch die Vergrößerung beeinflusst.

	M	Axiale Auflösung / μm		Laterale Auflösung/ μm	
		Messung	Simulation	Messung	Simulation
Airy	20	$1,8 \pm 0,2$	1,6	$0,52 \pm 0,02$	0,39
Gauß $w_0 = 5,0 \mu\text{m}$	20	$1,9 \pm 0,1$	1,6	$0,48 \pm 0,02$	0,39
Gauß $w_0 = 5,0 \mu\text{m}$	40	$1,4 \pm 0,2$	1,2	$0,38 \pm 0,02$	0,27
Gauß $w_0 = 9,6 \mu\text{m}$	20	$1,9 \pm 0,3$	1,6	$0,50 \pm 0,05$	0,39

Tabelle 4.1: Gemessene axiale und laterale Auflösung der unterschiedlichen Strahlprofile im Vergleich zu den simulierten Werten unter Berücksichtigung der Pixelgrößen.

Im Vergleich zwischen Messung und Simulation zeigen sich Abweichungen: Die experimentell bestimmten Auflösungen sind für alle Fälle leicht schlechter. Das kann mehrere Gründe haben: An der Oberfläche zwischen Gel und Wasser können durch den minimalen Brechungsindexunterschied Aberrationen entstehen. Das kann besonders das axiale Beugungsmuster verändern [65]. Zusätzlich können durch die Kombination von vielen optischen Elementen weitere Quellen für optische Abbildungsfehler auftreten. Um im Detektionsobjektiv eine hohe NA in Kombination mit einem großen Arbeitsabstand zu realisieren, werden viele einzelne optische Elemente kombiniert [66]. So können auch in hochqualitativen Optiken Abbildungsfehler und Abweichungen von den gegebenen Parametern wie NA und Vergrößerung entstehen. Gleichzeitig beeinflussen minimale Temperaturvariationen oder Positionsungenauigkeiten der Optiken die gemessene Auflösung. Trotz dieser Faktoren können auch mit den experimentell bestimmten Werten kleine Strukturen in den Proben abgebildet und aufgelöst werden.

4.2.3 Kontrast

Neben der Auflösung ist der Bildkontrast ein wichtiger Faktor für die Qualität eines Bildes. Die Auflösung wird maßgeblich durch optische Parameter wie numerische Apertur und durch Kameraparameter wie die Pixelgröße bestimmt. Der Kontrast wird zusätzlich stark durch das Profil des anregenden Strahls beeinflusst. Durch die Nebenmaxima des Airystrahls werden Regionen außerhalb der fokalen Ebene angeregt. Das entstehende Fluoreszenzlicht führt im Bild zu einer Verminderung des Kontrastes und somit zu einer schlechteren Bildqualität.

Um den Kontrast zu messen und zu vergleichen, werden wie zur Bestimmung der Auflösung Bildstapel mit Mikropartikeln gemessen. Hierfür wird allerdings eine zehnfach höhere Konzentration von 1 : 5.000 verwendet. In dieser Messung werden keine einzelnen Partikel analysiert, sondern der Kontrast im ganzen Bild betrachtet. Durch die hohe Konzentration tragen viele Mikropartikel zum Signal bei, auch solche, die nicht direkt in der fokalen Ebene liegen [67]. Werden diese angeregt, beeinflusst das Fluoreszenzlicht den Bildkontrast. In Abbildung 4.11 ist eine Maximum-Intensitätsprojektion der Bildstapel für die Messung von Auflösung und Kontrast im Vergleich zu sehen. Die Messung des

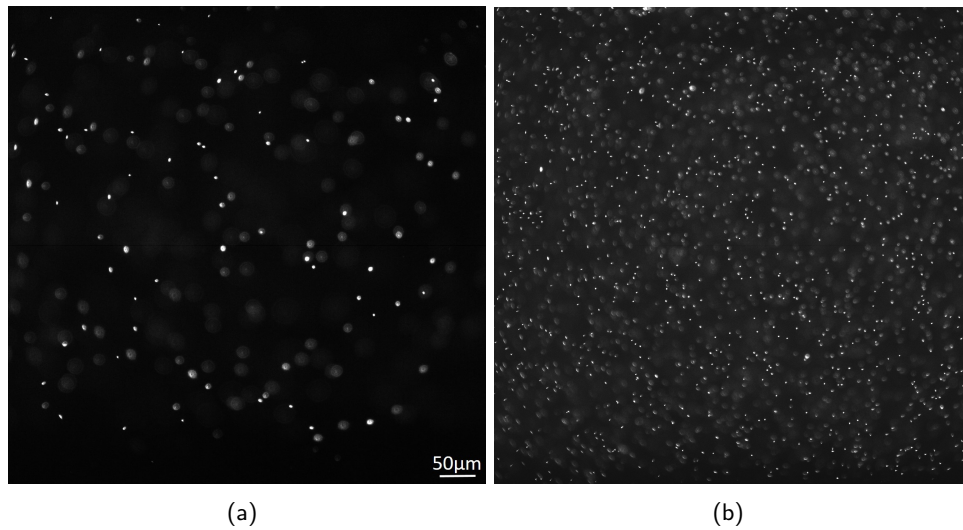


Abbildung 4.11: Maximum-Intensitätsprojektion der aufgenommenen Bildstapel. (a) Für die Bestimmung der Auflösung wird eine deutlich niedrigere Konzentration gewählt, um das Signal von einzelnen Partikeln auswerten zu können. (b) Durch eine hohe Partikelkonzentration entsteht Fluoreszenzsignal außerhalb der fokalen Ebene, welches den Kontrast beeinflusst.

Kontrastes wird maßgeblich durch die Anregungsintensität des Strahls beeinflusst. Die Mikropartikel werden mit einer eingestellten Intensität von 10 mW gemessen. Bei der Messung wurde beachtet, dass vom Airy- und Gaußanregungsstrahlengang jeweils die gleiche Intensität die Probenkammer erreicht. Dafür wird die Wellenplatte am Anfang so eingestellt, dass ca. 2/3 der Intensität in den Airystrahl-Pfad gelangen. Dieser Aufbau beinhaltet mehr optische Elemente, welche das Licht teilweise streuen oder absorbieren, daher wird hier eine höhere Anfangsintensität eingestellt.

Der Kontrast wird mit der Weber-Kontrast Formel analysiert [68]:

$$C = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{min}} \quad (4.2)$$

Hierbei gibt I_{max} die hellste Intensität einer leuchtenden Struktur an und I_{min} die Hintergrundintensität, also die Intensität der dunkelsten Pixel. Diese Definition eignet sich besonders gut für Bilder mit kleinen hellen Strukturen auf großem gleichmäßigen Hintergrund, wie es hier für die hellen Partikel in schwarzer Umgebung der Fall ist.

Um einen verlässlichen Wert für den Kontrast zu erhalten, wird wieder eine automatische Auswertung in Python implementiert. Diese sucht in einem Bildstapel automatisch die $N = 100$ hellsten und dunkelsten Pixel. Hierbei werden Pixel, welche einen Intensitätswert von null haben, ausgelassen, da es sich hier auch um nicht funktionierende bzw. "tote" Pixel handeln kann, also Pixel, an denen das Signal nicht aufgenommen wurde. Über diese Intensitätswerte wird dann gemittelt und daraus der Kontrast bestimmt. Der Fehlerwert ergibt sich durch Fehlerfortpflanzung aus der Standardabweichung des Mittelwerts der Intensitäten [69].

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Es wird deutlich, dass durch die Anregung mit dem schmalen Gaußstrahl der höchste Kontrast erzielt wird. Mit dem Airystrahl hingegen ist der Kontrast schlechter. Die Nebenmaxima des Airystrahls führen zu einem Hintergrundsignal und somit zu einem niedrigeren Kontrastwert. Noch stärker

ist dieser Effekt für den breiteren Gaußstrahl. Eine hohe Intensität nahe des Fokus führt zu einer deutlichen Kontrastverschlechterung.

	M	Weberkontrast
Airy	20	168 ± 2
Gauß $w_0 = 5,0 \mu\text{m}$	20	409 ± 5
Gauß $w_0 = 5,0 \mu\text{m}$	40	246 ± 3
Gauß $w_0 = 9,6 \mu\text{m}$	20	40 ± 1

Tabelle 4.2: Gemessener Kontrast für unterschiedlichen Strahlprofile und Vergrößerungen M .

4.2.4 Einfluss verschiedener Wellenlängen

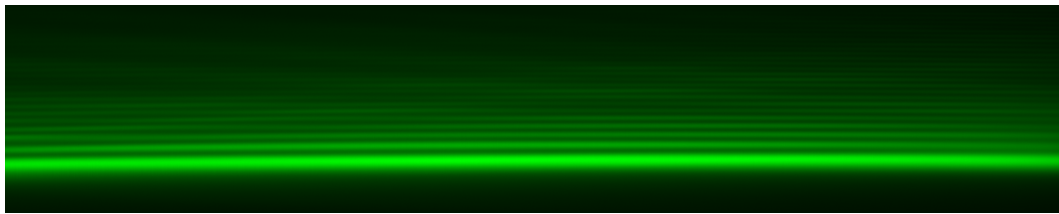
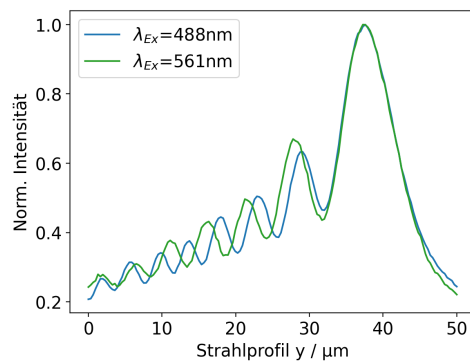
Um bei der Probenaufnahme Zeit zu sparen, können mit dem Mikroskop zwei Farbkanäle gleichzeitig aufgenommen werden. Dafür wird ein dichroitischer Strahlteiler im Hamamatsu Gemini verwendet. Je nach Wellenlänge wird das Fluoreszenzsignal dann zu einer der beiden Kameras geleitet. Die Trennung liegt bei der Wellenlänge $\lambda_{Em} = 555 \text{ nm}$. Höhere Wellenlängen werden reflektiert, niedrigere transmittiert. Da im Aufbau nur achromatische Linsen verbaut wurden, stimmen Brennweiten und Fokuspunkte für die unterschiedlichen Wellenlängen in etwa überein. Nur für die UV-Anregung mit 405 nm verschiebt sich die Strahltaillenposition in x - und z -Richtung merklich. Daher wird bei der Aufnahme der UV-Kanal immer separat aufgenommen. Für die Aufnahme werden zwei Linsenpositionen leicht angepasst, wodurch sich die Strahltaille in x -Richtung verschiebt. Durch eine Positionsanpassung des Detektionsobjektivs wird neu fokussiert. Fluorophore, welche mit dem blauen Laser ($\lambda_{Ex} = 488 \text{ nm}$) bzw. dem grünen ($\lambda_{Ex} = 561 \text{ nm}$) Laser angeregt werden, können in einem Messdurchlauf aufgenommen werden.

Der SLM beinhaltet als einziges Bauteil einen stärkeren wellenlängenabhängigen Faktor: Bei gleichem Phasenmuster ändern sich die Dimensionen des entstehenden Airystrahls. Um den Unterschied sichtbar zu machen, wird zusätzlich zum Fluorescein der Farbstoff Alexa Fluor 546, welcher sich mit $\lambda_{Ex} = 561 \text{ nm}$ anregen lässt, in die Probenkammer hinzugefügt. Das Strahlprofil für $\lambda_{Ex} = 488 \text{ nm}$ und $\lambda_{Ex} = 561 \text{ nm}$ ist in Abbildung 4.12 (a,b) dargestellt. Zur intuitiven Unterscheidung wurden die Strahlprofile entsprechend der verwendeten Anregungswellenlänge eingefärbt. Die Strahlprofile zeigen einen sehr ähnlichen Intensitätsverlauf. Der Abstand der Nebenmaxima ist für die grüne Anregung mit $\lambda_{Ex} = 561 \text{ nm}$ leicht erhöht (s. Abb. 4.12 (c,d), Tabelle 4.3).

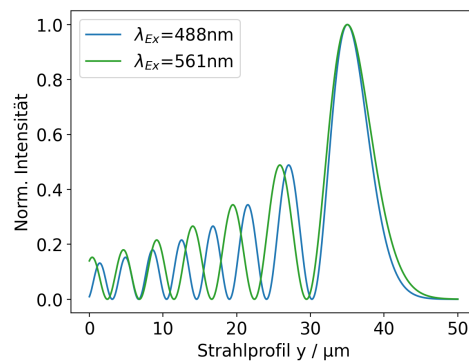
	Messung	Simulation
$\lambda_{Ex} = 488 \text{ nm}$	$(8,5 \pm 0,3) \mu\text{m}$	$8,61 \mu\text{m}$
$\lambda_{Ex} = 561 \text{ nm}$	$(9,4 \pm 0,3) \mu\text{m}$	$9,35 \mu\text{m}$

Tabelle 4.3: Abstand zwischen Hauptmaximum und erstem Nebenmaximum des Airystrahls für unterschiedliche Wellenlängen.

Die Wellenfrontkorrektur ist wellenlängenabhängig muss dementsprechend an die Anregungswellenlänge angepasst werden. Wenn allerdings zwei Farbkanäle gleichzeitig aufgenommen werden, ist eine Anpassung an eine spezifische Wellenlänge nicht möglich. Daher wird untersucht, wie stark sich eine Korrektur für eine abweichende Wellenlänge auf den Airystrahl auswirkt.

(a) $\lambda_{Ex} = 488 \text{ nm}$ (b) $\lambda_{Ex} = 561 \text{ nm}$ 

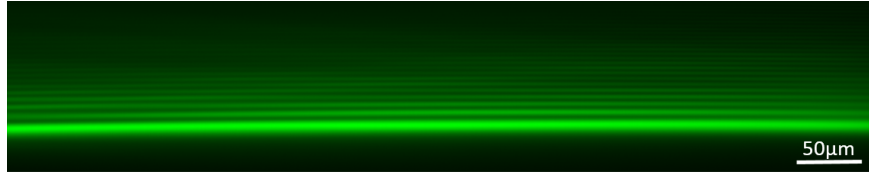
(c)



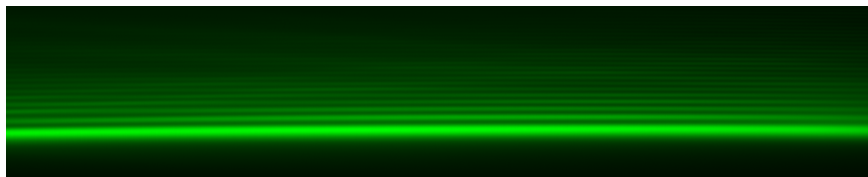
(d)

Abbildung 4.12: (a,b) Airystrahl für unterschiedliche Anregungswellenlängen gemessen in Fluorescein / Alexa Fluor 546: Bei gleichem Phasenmuster ändert sich das Intensitätsprofil des Airystrahls leicht. Für größere Wellenlängen steigt der Abstand der Nebenmaxima. Das zeigen auch die Strahlprofile entlang der y -Richtung für die gemessenen Airystrahlen (c) und den simulierten Fall (d).

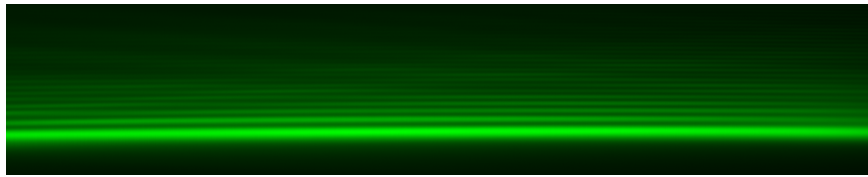
Der Farbstoff in der Probenkammer wird wieder mit $\lambda_{Ex} = 561 \text{ nm}$ angeregt und es werden Phasenmuster mit unterschiedlichen Wellenfrontkorrekturen angewendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Man kann erkennen, dass sich das Strahlprofil kaum ändert. Im Folgenden wurde eine Korrektur für die Wellenlänge $\lambda_{Corr} = 520 \text{ nm}$ eingestellt, welche somit zwischen den tatsächlichen Anregungswellenlängen liegt, um den Fehler durch die nicht perfekt passende Korrektur zu minimieren.



(a) $\lambda_{Corr} = 488 \text{ nm}$



(b) $\lambda_{Corr} = 520 \text{ nm}$



(c) $\lambda_{Corr} = 560 \text{ nm}$

Abbildung 4.13: Airystrahl mit $\lambda_{Ex} = 561 \text{ nm}$ für unterschiedliche Wellenfrontkorrekturen: Das Intensitätsprofil des Airystrahls ändert sich auch bei leicht unterschiedlichen Wellenfrontkorrekturen nur wenig. Für Messungen wird eine Korrektur für die Wellenlänge von $\lambda_{Corr} = 520 \text{ nm}$ verwendet, welche nah an den Anregungswellenlängen $\lambda_{Ex} = 561 \text{ nm} / \lambda_{Ex} = 488 \text{ nm}$ liegt.

4.2.5 Bildaufnahmerate

Um mit dem Mikroskop große Probenbereiche in möglichst kurzer Zeit aufzunehmen, sollte die Bildaufnahmerate möglichst hoch sein. Wie diese von den unterschiedlichen Komponenten beeinflusst wird, soll im Folgenden kurz erläutert werden. Die Bildrate wird dabei unter anderem von der Belichtungszeit beeinflusst. Diese sollte nicht zu groß gewählt werden, da dies zum einen zu einer geringeren Aufnahmegeschwindigkeit führt und zusätzlich zu einem stärkeren Ausbleichen der Probe. Eine zu kurze Belichtungszeit hingegen führt zu einem schwächeren Signal. Für die Aufnahmen wird die Belichtungszeit auf $t_{exp} = 30 \text{ ms}$ gesetzt. Die maximale Übertragungsrate der Bilder beläuft sich für den Fall eines externen Triggers, wie es hier der Fall ist, auf 90 Bildern pro Sekunde. Kamera, Laser und Galvo-Spiegel werden über das LabView Programm getriggert (s. Kap. 4.1.5). Die Triggersignale beinhalten Verzögerungszeiten, welche vor jeder Aufnahme abgewartet werden müssen und so die Aufnahmerate ebenfalls verringern. Die größte Verzögerungszeit liegt bei 30 ms.

Die Bewegung der Probe beeinflusst ebenfalls die Bildaufnahmezeit. Zwischen jedem Bild wird der Probenhalter um eine gewisse Schrittweite verschoben. Die Ansteuerung und Verschiebung benötigt ca. 17 ms für eine Schrittweite von $0,5\text{ }\mu\text{m}$. Zwischen den Bildstapeln wird die Probe zusätzlich noch in x, y -Richtung verschoben, was wegen der längeren Strecke etwas mehr Zeit beansprucht (ca. 25 ms).

Der SLM benötigt eine kurze Zeit, um das Phasenmuster intern aufzubauen. Die Anstiegszeit dafür beläuft sich auf 5 ms [70]. Da dies nicht vor jedem Bild geschieht, sondern nur am Anfang einer Aufnahme, beeinflusst das zwar nicht die Bildaufnahmezeit, sondern nur die Gesamtzeit für eine Probenaufnahme. Durch diese unterschiedlichen Prozesse ergibt sich eine finale Bildaufnahmezeit von ca. 10 Hz.

Kapitel 5

Deep Learning Algorithmus

In diesem Kapitel wird die Deep Learning Dekonvolution vorgestellt. Diese wurde entwickelt, um eine Dekonvolution ohne Kenntnis über die PSF des Mikroskops durchzuführen. So wird die Qualität von Daten, welche mit dem Airystrahl-Lichtscheibenmikroskop aufgenommen werden, verbessert. Während es im ersten Teil zunächst um das Prinzip des Algorithmus und die technische Umsetzung geht, wird im zweiten Teil der genaue Aufbau des Programms samt der einzelnen Netzwerke und des Trainingsprozesses näher erläutert. Zusätzlich wird die Deep Learning Dekonvolution auf simulierte Daten angewendet, um den Algorithmus zu testen.

5.1 Motivation und Prinzip

Die Nebenmaxima des Airystrahls führen im Lichtscheibenmikroskop zu einer Beleuchtung der Bereiche außerhalb der fokalen Ebene. Die aufgenommenen Daten weisen daher einen geringeren Kontrast auf, wie in Abschnitt 4.2.3 gezeigt. Zusätzlich besitzen die Bilder eine große Objektpixelgröße. Der Airystrahl beleuchtet ein großes Sichtfeld, welches nur mit einer geringen Vergrößerung von $M = 20$ in einem Bild aufgenommen werden kann. So können große Probenvolumina zwar sehr schnell aufgenommen werden, allerdings führt die große Objektpixelgröße zu einer schlechteren Auflösung (s. Abschnitt 3.4.2). Um trotzdem eine hohe Bildqualität zu erhalten, wurde eine Deep Learning-basierte Dekonvolution entwickelt, die neben der Kontrastverbesserung auch das Ergebnis der Hochskalierung verbessert, welche zum Ausgleich der großen Pixel durchgeführt wird.

Für Standard-Dekonvolutionsmethoden ist es notwendig, die PSF zu kennen. Diese kann theoretisch durch eine PSF-Modellierung bestimmt werden. Eine exakte Modellierung einer PSF ist jedoch eine große Herausforderung [71]. Im vorherigen Kapitel wurde zur PSF-Simulation ein einfaches Modell von Wolf & Born verwendet [54], welches zwar einen Wert für die Auflösung liefert, aber viele Vereinfachungen über die Abbildungseigenschaften beinhaltet. Auch gute PSF Modelle gelten nur für perfekte Linsen und gut definierte optische Pfade, welche in der Praxis schwer zu realisieren sind. Unregelmäßigkeiten in den Optiken sowie Aberrationen verringern die Genauigkeit der theoretischen Vorhersage. Eine Messung der PSF unter gleichen Bedingungen wie die Probenmessung bietet die Möglichkeit, die optische Abbildung genauer zu charakterisieren. Allerdings wird auch hier die genaue PSF durch die Strukturen in den jeweiligen Proben beeinflusst. Eine genaue Vorhersage der Veränderung der PSF beim Durchgang des Lichts durch ein heterogenes Medium ist im Allgemeinen nicht möglich [72].

Eine Methode einer Dekonvolution ohne die Angabe der PSF bieten Blind-Dekonvolutionsalgorithmen [17]. Allerdings sind diese Methoden rechnerisch sehr kompliziert und aufwändig und außerdem muss auch hier meist eine erste Schätzung für die PSF angegeben werden. In iterativen Schritten wird dann sowohl die PSF als auch das dekonvolutierte Bild bestimmt. Ein großes Problem dieser Methoden ist die Konvergenz. Es ist nicht sichergestellt, dass das Ergebnis der wahren PSF und der tatsächlich zugrunde liegenden Struktur entspricht [18]. Zusätzlich sind diese Methoden rechenintensiv und rauschanfällig [73].

Deep Learning bietet die Möglichkeit, eine Dekonvolution komplett ohne die PSF oder andere Bildgebungsparameter durchzuführen. Dafür werden Trainingsdaten benötigt, welche die entsprechenden Zieleigenschaften aufweisen. Diese werden mit Hilfe der Gaußstrahlbeleuchtung aufgenommen. Es eignet sich der schmale Gaußstrahl mit $w_0 = 5 \mu\text{m}$. In Kombination mit einer hohen Vergrößerung von $M = 40$ wird somit eine hohe Auflösung und ein hoher Kontrast erzielt. Die Aufnahme dieser Daten ist zwar zeitaufwändig, muss aber im Idealfall nur für einen Satz Trainingsdaten durchgeführt werden. Ein trainiertes Deep Learning Modell kann dann einfach auf die Airystrahl Daten angewendet werden.

5.1.1 Pix2Pix GAN

Als Netzwerkarchitektur für die Deep Learning Dekonvolution eignet sich ein GAN (s. Kapitel 2.2.4), da dieses besonders leistungsstark bei der Generierung hochdimensionaler Daten wie beispielsweise Bildern ist. Die Trainingsstruktur eines GANs führt mit einer nicht allzu großen Menge an Trainingsdaten im Größenordnungsbereich von 1000 Bildern zu realistischen Vorhersagen [74],[75].

Bild-zu-Bild-Übersetzungen erfordern auf Grund der komplexen Ausgabe oft sehr spezielle Modelle und Verlustfunktionen. Das Pix2Pix GAN, welches 2017 von Phillip Isola et al. entwickelt wurde, eignet sich für eine Vielzahl von Bilderzeugungsaufgaben und ist somit sehr allgemein anwendbar [76]. Sowohl die Eingangsvariable als auch das finale Ergebnis ist dabei ein Bild und das Netzwerk lernt die Zuordnung von Eingangsbild zu Ausgangsbild. So kann ein beliebiges Bild von der Ausgangsdomäne in eine Zieldomäne gebracht werden. In unserem Fall ist die Ausgangsdomäne die mit dem Airystrahl erzeugten Bilder mit niedrigem Kontrast. Die Zieldomäne ist ein aufbereitetes Bild mit erhöhtem Kontrast und einer höheren Pixelzahl, welches allerdings ansonsten den gleichen Inhalt zeigt.

Ein Pix2Pix GAN basiert auf einem bedingten GAN (engl. *conditional GAN*, cGAN), welches eine Erweiterung der GAN-Architektur bildet, bei der Generator und Diskriminator von einer zusätzlichen Information, in diesem Fall dem Bildinhalt des Eingangsbildes, abhängig sind [77]. Zur Erzeugung eines Bildes, basierend auf einem gegebenen Bild, wird ein Generatormodell angewendet. Dieses wird so trainiert, dass es das Diskriminatormodell täuscht, sodass das Bild für echt gehalten wird. Gleichzeitig soll der Unterschied zwischen generiertem Bild und Zielbild so gering wie möglich gehalten werden. Daher muss das Pix2Pix GAN auf Bilddatensätze trainiert werden, die aus Eingabebildern (vor der Übersetzung) und Ausgabe- oder Zielbildern (nach der Übersetzung) bestehen. Diese Bilder müssen die gleichen Bildinhalte aufweisen, um ein erfolgreiches Training zu gewährleisten [44].

5.1.2 Voraussetzungen in Tensorflow und Keras

Für diese Arbeit wurde ein von Jason Brownlee implementiertes Pix2Pix GAN angepasst und angewendet [44]. Diese Implementierung ist für Keras adaptiert, was eine Open Source Deep Learning Bibliothek für Python ist [78]. Keras dient als nutzerfreundliche Schnittstelle zu Tensorflow, welches als Rahmen für die Erstellung und Anwendung von neuronalen Netzen angewendet wird.

Die Spezifikationen des verwendeten PCs sowie die im Programm integrierten Python Bibliotheken und Pakete sind mit der jeweils verwendeten Version im Anhang A2 aufgelistet. Im Allgemeinen braucht das Training eines neuronalen Netzes eine hohe Rechenkapazität. Vor allem weil die Deep Learning Dekonvolution große Bildstapel verarbeiten soll, würde selbst mit einer sehr guten CPU (engl. *central processing unit*) die Prozessierung der Daten extrem lange dauern. Graphikprozessoren (engl. *graphical processing unit*, GPU) hingegen sind für parallele Berechnungen ausgelegt, sodass große, mehrdimensionale Datensätze kontinuierlich parallel bearbeitet werden, was das Training und die Anwendung neuronaler Netze deutlich beschleunigt. Es wird die von Nvidia entwickelte Programmierschnittstelle CUDA verwendet, um den Zugriff auf die GPU zu ermöglichen [79].

5.2 Aufbau

Die Umsetzung der Deep Learning Dekonvolution besteht aus einzelnen Schritten, welche im Folgenden genauer erläutert werden. Dafür wird zuerst die Architektur und die Funktionsweise der gesamten Software beschrieben und anschließend die einzelnen Bestandteile und Abläufe innerhalb des Pix2Pix GANs erklärt. Diese beruhen hauptsächlich auf der Implementierung von J. Brownlee aus [44].

5.2.1 Übergeordnete Architektur

Ein Überblick über die Prozessierung der Daten ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Hierbei wird die Vorgehensweise der Deep Learning Dekonvolution für einen besseren Einblick vereinfacht abgebildet. Allgemein werden die Ausgangsbilder zuerst hochskaliert und anschließend von zwei einzelnen neuronalen Netzwerken verarbeitet. Auf diese Schritte wird im Folgenden im Detail eingegangen, während der genaue Trainingsprozess in Abschnitt 5.2.4 erläutert wird.

Bikubisches Hochskalieren Die Bilder, welche im Lichtscheibenmikroskop mit der Airystrahlbeleuchtung aufgenommen werden, besitzen durch die geringe Vergrößerung eine hohe Objektpixelgröße von 325 nm, sodass die Bilder eine geringe Auflösung haben. Um die gleiche Pixelgröße wie die Gaußstrahl-Daten zu erreichen und somit die Auflösung zu verbessern, wird zuerst eine bikubische Hochskalierung durchgeführt. Das ist eine Interpolationsmethode, welche die kubische Interpolation, also die Anpassung auf ein Polynom dritten Grades, auf den zweidimensionalen Raum erweitert. Dabei werden, im Gegensatz zur bilinearen Interpolation, nicht nur die direkten Nachbarpixel einbezogen, sondern insgesamt 16 der umliegenden Pixel [80].

Diese Methode ist ein Standardverfahren zur Hochskalierung von Bildern. Sie beinhaltet keinen KI Prozess und kann daher die zusätzliche Information, welche durch die Hochskalierung generiert wird, nur abschätzen. Als Ergebnis dieses Prozesses erhält man die hochskalierten Airystrahlbilder, welche zwar nun eine kleinere Objektpixelgröße von

162,5 nm haben, aber weiterhin einen geringen Kontrast und eine geringe Auflösung aufweisen.

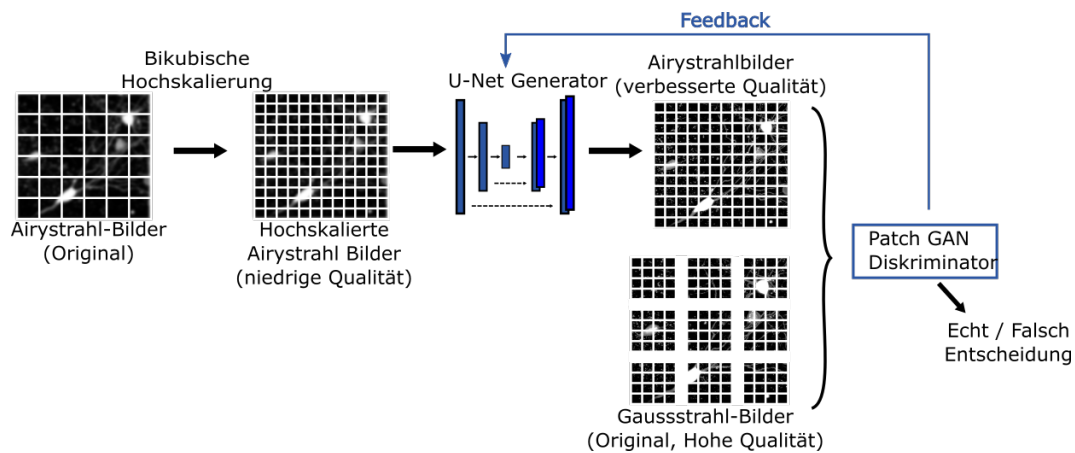


Abbildung 5.1: Übersicht zur Architektur der Deep Learning Dekonvolution: Die Bilder, welche mit der Airystrahlbeleuchtung aufgenommen werden, besitzen eine große Objektpixelgröße. Die Bilder werden bikubisch hochskaliert, sodass sie anschließend eine kleinere Pixelgröße haben. Um das Ergebnis der Hochskalierung zu verbessern und den Kontrast zu erhöhen, werden durch ein neuronales Netz Bilder mit höherer Qualität generiert. Die Ausgabe des Generators wird, zusammen mit den Gauß-beleuchteten Trainingsdaten, durch ein unterscheidendes neuronales Netz (Diskriminator) untersucht. Dieses kontrolliert die verbesserten Bilder, sodass durch den Trainingsprozess die Airystrahlbilder durch den Generator realistisch verbessert werden. [47]

Deep Learning Prozess Nach der Hochskalierung werden die Daten mit einem neuronalen Netz verarbeitet. Mit Hilfe des Deep Learning Prozesses werden in einem Schritt zwei Eigenschaften des Bildes bearbeitet: Zum einen wird das Ergebnis des Hochskalierens verbessert. Mit Hilfe von Trainingsdaten wird die Genauigkeit der durch die Hochskalierung dazugewonnenen Information durch einen Deep Learning-Prozess erhöht. Zusätzlich wird der Kontrast der Bilder verbessert.

Die Bilder werden zunächst durch ein generierendes neuronales Netz verarbeitet. Dieses Netz versucht die Qualität der Daten zu verbessern. Das Ergebnis ist eine Vorhersage, wie die entsprechenden Daten in hoher Qualität (Auflösung/Kontrast) aussehen. Die Ausgabe des Generators wird dann zusammen mit den Trainingsdaten an den Diskriminator weitergegeben. Die Trainingsdaten werden mit Gaußstrahlbeleuchtung und hoher Vergrößerung aufgenommen, sodass sie sowohl eine gute Auflösung als auch einen hohen Bildkontrast beinhalten. Der Diskriminator ist ein neuronales Netz, dessen Ziel es ist, zu unterscheiden, ob ein Bild künstlich durch den Generator erzeugt wurde oder ein 'echtes' Bild ist, welches direkt in hoher Qualität aufgenommen wurde. Entsprechend dieser Entscheidung werden die Parameter des Generators angepasst. Der Diskriminator dient also als Kontrolle der Arbeit des Generators. Am Anfang des Trainingsprozesses entsprechen die generierten Daten, welche durch den Generator verbessert wurden, nicht der Realität und zeigen deutliche Unterschiede zu den Trainingsdaten. Im Laufe des Trainings wird der Generator besser in seinen Vorhersagen. Gleichzeitig verbessert aber auch der Diskriminator seine Einordnungen. Am Ende des Trainingsprozesses entsprechen die generierten Bildern realistischen Vorhersagen eines hochqualitativen Bildes.

Verarbeitung dreidimensionaler Daten Die Anwendung eines Pix2Pix GANs ist auf zweidimensionale Bilder beschränkt. Die erhaltenen Mikroskopiebilder sind allerdings Bildstapel, sodass die Verarbeitung von dreidimensionalen Daten notwendig ist. Um trotzdem jede Dimension der Bildstapel zu dekonvolvieren, werden die Stapel zuerst in yz-Richtung transponiert. Auf diese Orientierung wird die Deep Learning Dekonvolution trainiert und angewendet. Anschließend werden die Stapel zurück in die xy-Orientierung transponiert. Für diese Richtung wird ebenfalls trainiert, sodass zwei separate Modelle entstehen, welche für die finale Transformation nacheinander angewendet werden. Der Vorgang ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Auf diese Weise kann das bestehende funktionierende Pix2Pix GAN für dreidimensionale Daten eingesetzt werden.

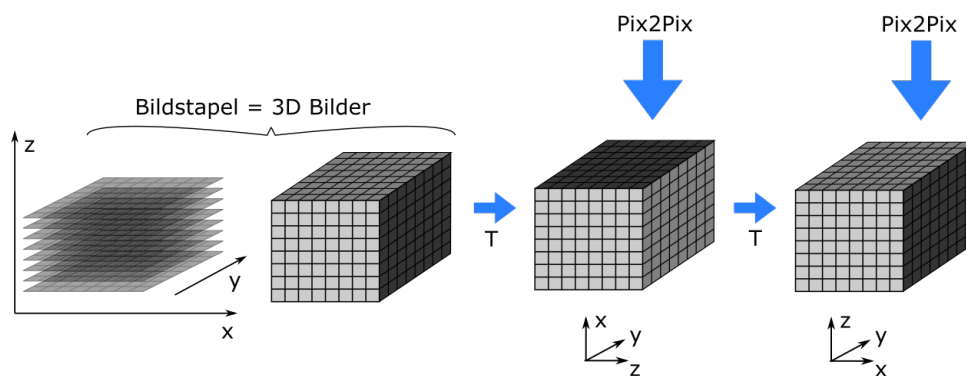


Abbildung 5.2: Vorgehensweise zur Bearbeitung dreidimensionaler Daten: Im Mikroskop werden Bildstapel aufgenommen, welche als dreidimensionale Bilder in den Algorithmus eingelesen werden. Die Bilder werden zunächst so transponiert (T), dass die yz-Richtung durch das Pix2Pix GAN verbessert wird. Die unterschiedlichen Grautöne in der Abbildung zeigen die Orientierung der Bildstapel bezüglich der Pix2Pix Anwendung. Anschließend werden die Bilder zurück transponiert, sodass in einem zweiten Schritt die Bilder in xy-Orientierung verarbeitet werden.

5.2.2 Generator

Das Generatormodell dient als Teil des GANs dazu, die Bilder, welche mit Airystrahlbeleuchtung im Mikroskop erzeugt wurden, zu verbessern. Dafür wird ein sogenanntes U-Net Generator Modell verwendet. Als Eingabe erhält das Netzwerk die bikubisch hochskalierten Airystrahlbilder. Es wird also nicht, wie bei vielen GANs, eine zufällige Pixelverteilung als Eingabe verwendet.

Ein U-Net Generator basiert auf einem *Encoder-Decoder* Modell. Dabei werden die Bilder in einem Kodierungsprozess herunterskaliert, was in einer Engpassschicht resultiert. In dieser ist das Bild in einer kompakten Repräsentation. Anschließend werden die Daten wieder hochskaliert, bis ein Bild in der gewünschten Größe erstellt wird. Bei einem U-Net Modell sind zusätzliche Verbindungen (*Skip Connections*) zwischen den Schichten gleicher Dimension integriert (s. Abb. 5.3). Diese stellen für einen zusätzlichen Informationsfluss eine Verbindung zwischen den Kodier- und dem Dekodierteil des Netzwerkes her. Dadurch können Informationen zu der entsprechenden Schicht weitergegeben werden, welche ansonsten möglicherweise durch den Engpass wegfallen würden. Auf diese Weise ist es möglich, die Grundstruktur des Bildes, also den Bildinhalt, zu erhalten.

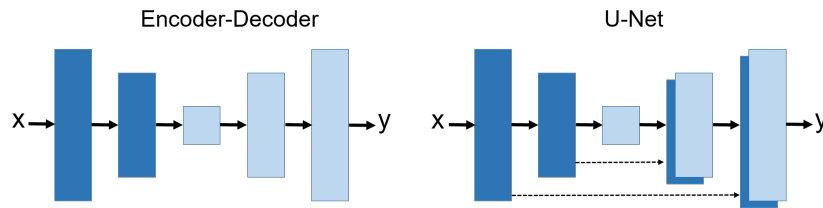


Abbildung 5.3: Vergleich eines *Encoder-Decoder* Generators und des U-Net Modells. Bei einem U-Net werden Informationen über den Engpass hinaus an eine Schicht gleicher Dimension weitergegeben. [44]

Im Programm beginnt der Generator mit der Definition des Kodierungsblocks. In diesem werden zuerst alle Gewichtungen zufällig gesetzt und er beinhaltet drei wichtige Schritte:

1. Faltungsschicht Die Faltungsoperation wurde in Kapitel 2.2.3 eingeführt. Dabei wird das Eingangsbild mit einem Kernel gefaltet. Das Kernel hat dabei eine Dimension von 4×4 Pixeln und einem *Stride* von 2. Dieser gibt eine Schrittweite an, also wie viele Pixel das Kernel nach jeder Faltungsoperation überspringt, wenn es über das Eingabebild bewegt wird. Eine größere Schrittweite führt zu einer Verkleinerung der Ausgabebildgröße, während eine kleinere Schrittweite zu einer Erhöhung der Bildgröße führt. Bei einer Schrittweite von 2 können, bei einer sinnvollen Rechenzeit, alle feinen Details des Bildes erlernt werden.

2. Batch-Normierung Die *Batch*-Normierungsschicht dient vor allem dazu, die Abhängigkeit des Modells von den Eingabedaten zu verringern und Überanpassung zu vermeiden [81]. Das Ziel ist es, die Aktivierungswerte zu normieren, indem sie in jeder Schicht auf einen Standardnormalverteilungsbereich gesetzt werden. Dabei wird die Ausgabe der vorherigen Schicht x_i folgendermaßen normiert:

$$\hat{x}_i = \frac{x_i - \mu_B}{\sqrt{\sigma_B^2 + \epsilon}}$$

wobei μ_B der Mittelwert und σ_B die Standardabweichung der bearbeiteten Daten ist. ϵ ist eine beliebige kleine Konstante zur numerischen Stabilität. Die gegebene Normalisierung wird, mit den trainierbaren Parametern γ und β , zur weiteren Skalierung bzw. Verschiebung angewendet:

$$y_i = \gamma \hat{x}_i + \beta$$

Dadurch wird das Ergebnis y_i standardisiert, sodass das finale Modell unabhängig vom Inhalt der Eingabebilder ist [82].

3. ReLu Aktivierung Anschließend durchlaufen die Daten die Aktivierungsfunktion. Aktivierungsfunktionen werden verwendet, um nicht-lineare Beziehungen zwischen den Eingaben und den Ausgaben zu ermöglichen. Das führt zu einer höheren Komplexität der Ausgabe. Die Aktivierungsfunktion nimmt die gewichtete Summe aller Eingaben eines Pixels und transformiert sie in einen bestimmten Ausgabewert. Sie bestimmt also, ob und wie stark die unterschiedlichen Kernels und Gewichtungen der vorherigen Schichten

tatsächlich auf die Daten angewendet werden. In Kapitel 2.2.2 wurde die Aktivierungsfunktion als σ eingeführt. Die ReLu Aktivierung [83] oder auch gleichgerichtete Linear-einheit ist eine spezielle Aktivierungsfunktion. Sie ist mit der Steigung α folgendermaßen definiert:

$$\sigma_{\text{ReLu}}(x) = \begin{cases} x & \text{wenn } x \geq 0 \\ \alpha x & \text{sonst} \end{cases} \quad (5.1)$$

Die ReLu Aktivierung ist dabei im Vergleich zu anderen Aktivierungsfunktionen wenig rechenaufwändig. Sie bewirkt eine gute Konvergenz in Richtung des Minimums der Verlustfunktion und führt so zu einem effektiven Training. [84]

Der im Programm darauf folgende Dekodierungsblock besteht aus ähnlichen Bestandteilen wie der Kodierungsblock. Die Faltungsschicht wird hier allerdings durch eine transponierte Faltungsschicht ersetzt, durch welche die Eingabedaten wieder hochskaliert werden. Prinzipiell funktioniert diese wie eine Faltungsschicht, wobei allerdings die Dimension des Bildes durch ein entsprechendes Kernel vergrößert wird. Nach der *Batch*-Normierung wird eine *Dropout*-Schicht eingefügt. Diese sorgt dafür, dass zufällig ausgewählte Neuronen in den Schichten ausgelassen werden und somit eine veränderte Netzstruktur entsteht. Das ist eine wichtige Methode, um ein verallgemeinerndes Modell zu trainieren und somit Überanpassung zu vermeiden. Auf die *Dropout*-Schicht folgt eine strengere ReLu Aktivierung folgender Form [84]:

$$\sigma_{\text{ReLu}}(x) = \begin{cases} x & \text{wenn } x \geq 0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

Zur Implementierung der *Skip Connections* wird zusätzlich eine Schicht zur Verkettung mit der jeweiligen Kodierungsschicht hinzugefügt.

Das Generatormodell setzt sich dann aus jeweils acht hintereinander gereihten Kodierungs- bzw. Dekodierungsblöcken zusammen, wie in Abbildung 5.4 dargestellt. Die Dimensionen des Bildes werden dabei von 2048×2048 Pixeln auf 8×8 Pixel herunterskaliert und anschließend auf die ursprüngliche Größe hochskaliert. Innerhalb des Modells entstehen so insgesamt 470 Millionen trainierbare Parameter, sodass nach Durchlaufen dieses Prozesses aus dem Bild mit niedrigem Kontrast und niedriger Auflösung eine verbesserte Version generiert wird.

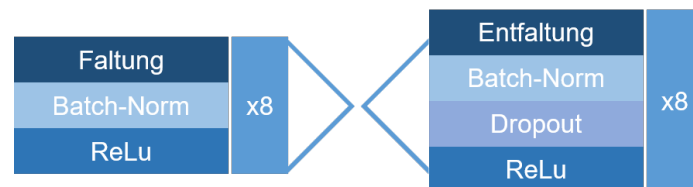


Abbildung 5.4: Zusammensetzung des Generator-Netzwerks: Die Daten werden mit einer Kombination von Faltungs-BatchNorm-ReLU Schichten bis zu einem Engpass herunterskaliert und anschließend mit einer Kombination von Schichten wieder hochskaliert. Die Blöcke werden jeweils achtmal wiederholt.

5.2.3 Diskriminator

Der Diskriminator versucht, die generierten Bilder von den Trainingsdaten zu unterscheiden. Er erhält als Eingabe die vom Generator verarbeiteten Airystrahlbilder. Anhand der vom Gaußstrahl beleuchteten Trainingsdaten wird das Modell so trainiert, dass es die generierten bzw. verbesserten Bilder von den Bildern mit intrinsisch guter Qualität unterscheiden kann. Zur Definition, welche Bilder aus welcher Quelle stammen, werden sie mit einem Label versehen. Das Label "0" kennzeichnet die generierten Bilder, das Label "1" die Gaußstrahlbilder. Der Diskriminator ist ein klassifizierendes neuronales Netz. Die Ausgabe wird in Form einer Wahrscheinlichkeit gegeben, ob ein erhaltenes Bild aus der Zieldomäne stammt, also ob es ein Gaußstrahlbild ist.

Das Diskriminatormodell ist als sogenanntes *Patch*-GAN implementiert [76]. Dabei wird nicht in einem Schritt das gesamte Bild analysiert, sondern einzelne Ausschnitte (engl. *Patches*), welche als echt oder gefälscht eingeordnet werden. Es basiert ebenfalls auf Faltungsschichten, wobei der Durchschnitt aller Ergebnisse der einzelnen *Patches* die endgültige Ausgabe ergibt.

Die Definition des Diskriminators beginnt im Programm mit der zufälligen Initialisierung der Gewichtungen. Nach der Definition der Eingangsbildgrößen erfolgen fünf Durchläufe der Faltungs-BatchNorm-ReLU Schichten, wie sie schon für die Kodierung im Generator verwendet werden. Dabei wird wieder die in Gleichung 5.1 gegebene Definition der ReLU-Aktivierung mit $\alpha = 0.2$ verwendet. Beim Durchlaufen der Schichten werden die Bilder bis zu einer Größe von 128×128 Pixeln herunterskaliert. Über das herunterskalierte Ausgangsbild wird gemittelt und final die Sigmoidfunktion als eine zusätzliche Aktivierung angewendet. Diese bildet die Eingabe auf einen Bereich von 0 bis 1 ab, sodass die finale Ausgabe eine Wahrscheinlichkeit angibt, mit welcher das gegebene Bild aus der Zieldomäne stammt. Die Sigmoid-Aktivierung ist folgendermaßen definiert [84]:

$$R(x) = \frac{1}{1 + \exp^{-x}}$$

5.2.4 Verlustfunktionen und Trainingsprozess

Zum Verständnis des Trainingsprozesses ist der Ablauf in Abbildung 5.5 dargestellt. Zur Vorbereitung wird dabei aus dem gesamten Trainingsdatensatz zufällig ein Gauß- und das zugehörige Airystrahlbild ausgewählt. Außerdem wird mit dem Generator eine verbesserte Version des Airystrahlbildes erzeugt. Während das Gaußstrahlbild als Trainingsbild mit hoher Qualität mit einem Label von "1" versehen wird, erhält das generierte Bild ein Label von "0".

Der Diskriminator wird in einem ersten Schritt unabhängig von den restlichen Bestandteilen des GANs trainiert. Er erhält dafür sowohl die Trainingsdaten, als auch die durch den Generator verbesserten Airystrahlbilder mit den entsprechenden Labels und lernt, diese zu unterscheiden. Zur Kompilierung des Modells wird dabei ein Optimierer implementiert, welcher die Gewichtungen und Parameter des Modells anpasst. Der eingesetzte *Adam-Optimierer* [85] verwendet das sogenannte erste und zweite Momentum m_t und v_t . Dieses berechnet sich iterativ aus den Parametern β_1 und β_2 , dem im vorherigen Schritt $t - 1$ berechneten Momentum und dem Gradienten der Verlustfunktion ∇V in

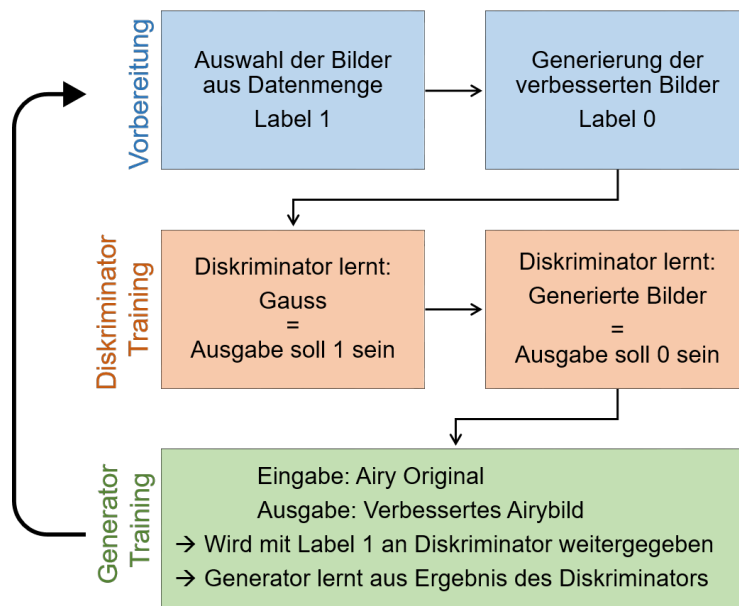


Abbildung 5.5: Trainingsablauf

Bezug auf die Gewichtungen θ_{t-1} [86]:

$$m_t = \beta_1 \cdot m_{t-1} + (1 - \beta_1) \cdot \nabla V(\theta_{t-1})$$

$$v_t = \beta_2 \cdot v_{t-1} + (1 - \beta_2) \cdot \nabla V(\theta_{t-1})^2$$

Die Gewichtungen werden dann mit m_t und v_t und der Lernrate α angepasst:

$$\theta_t = \theta_{t-1} - \alpha \cdot \frac{m_t}{\sqrt{v_t + \epsilon}}$$

ϵ ist wieder eine beliebig kleine Konstante zur numerischen Stabilität. Für den Diskriminator wird eine eher kleine Lernrate von $\alpha = 0,0002$ verwendet und die Momentumparameter werden auf $\beta_1 = 0,5$ und $\beta_2 = 0,999$ festgelegt.

Für die Kompilierung des Modells muss also eine Verlustfunktion gegeben werden, durch welche bestimmt wird, wie stark der Diskriminator vom gewünschten Ergebnis abweicht. Dazu wird der sogenannte *Adversarial Loss* verwendet. Dieser basiert auf der binären Kreuzentropie und wird durch die Vorhersage des Diskriminators y_{pred} und das tatsächliche Label der Bilder ($y_{\text{true}} = 0$ oder $= 1$) bestimmt [87]:

$$V_{\text{adv}} = y_{\text{true}} \cdot \log(y_{\text{pred}}) + (1 - y_{\text{true}}) \cdot \log(1 - y_{\text{pred}})$$

Während des Trainings gibt diese Funktion also vor, wie stark das Modell vom gewünschten Ergebnis abweicht. Die Gewichtungen im Netzwerk werden daraufhin in die durch den Adam-Optimierer vorgegebenen Werte und Richtungen angepasst, sodass die Verlustfunktion minimiert wird.

Während der Diskriminator einzeln trainiert wird, wird der Generator auf Basis des Ergebnisses des Diskriminators angepasst. Dafür wird ein zusätzlicher Baustein im Programm definiert, welcher die beiden Modelle verbindet, sodass die Ausgabe des Generators an den Diskriminator weitergegeben wird. Der Diskriminator gibt dann aus, ob er das Bild

für echt oder falsch hält. Die Gewichtungen und Kernels des Generators werden dann so angepasst, dass der Diskriminator das generierte Bild für echt hält. In diesem Zusammenhang wird der Diskriminator als ‚nicht trainierbar‘ eingestellt, um nur noch als Bewertungsinstrument für den Generator zu fungieren.

Um den Generator zu optimieren, werden zwei Verlustfunktionen kombiniert. Zum einen wird wieder der *Adversarial Loss* verwendet, welcher durch das Ergebnis des Diskriminators bestimmt wird. Der Generator soll zwar ein Bild generieren, welches vom Diskriminator als echt eingestuft wird, gleichzeitig soll der Bildinhalt der Generatorausgabe möglichst ähnlich zum Trainingsbild sein. Es soll weiterhin den gleichen Bildinhalt haben und die gleichen Strukturen zeigen. Dafür wird zusätzlich die *L1* Verlustfunktion verwendet, welche die Differenz der Bildintensitäten minimiert, um das ausgegebene Bild direkt mit dem Trainingsbild zu vergleichen [87]:

$$L1 = |I_{\text{true}} - I_{\text{pred}}|$$

Beide Verlustfunktionen werden miteinander addiert, wobei diese über den Hyperparameter λ gewichtet werden können:

$$V_{\text{total}} = V_{\text{adv}} + \lambda \cdot L1$$

In der Deep Learning Dekonvolution wird $\lambda = 300$ gesetzt.

Dieser Prozess wird sehr oft wiederholt. Dafür wird eine Epochen-Anzahl E vorgegeben. Die Anzahl der Trainingsiterationen I_T ergibt sich dann aus der Epochenanzahl und der Anzahl der Bilder N , für welche trainiert werden soll:

$$I_T = E \cdot N$$

5.2.5 Graphische Benutzeroberfläche

Zur Vereinfachung der Anwendung wurde zusätzlich eine graphische Benutzeroberfläche (engl. *Graphical User Interface*, GUI) mit Hilfe des Moduls *tkinter* implementiert. Die Benutzeroberfläche ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Das GUI beinhaltet alle notwendigen Schritte, um die Deep Learning Dekonvolution zu trainieren und anzuwenden. Als Voraussetzung werden ein Gauß-beleuchteter und ein Airy-beleuchteter Bildstapel benötigt, welche den gleichen Bildinhalt zeigen. Der Bildstapel, welcher mit dem Airystrahl aufgenommen wurde, sollte dabei Bilder mit 1024×1024 Pixeln beinhalten. Name und Speicherort des Bildstapels wird für die bikubische Hochskalierung eingegeben. Diese kann dann direkt in dem GUI durchgeführt werden, sodass der gegebene Airy-Bildstapel auf 2048×2048 Bilder hochskaliert wird.

Im nächsten Schritt kann dann das Pix2Pix GAN trainiert werden. Dafür wird der Name des hochskalierten Airy-Bildstapels sowie der entsprechende Bildstapel mit Gauß-beleuchteten Bildern angegeben. Das finale Modell wird dann im *h5*-Format gespeichert, sodass zur Anwendung auf alle Gewichtungen und Parameter zugegriffen werden kann. Im unteren Teil kann die Anzahl der Trainingsiterationen für die Anwendung in y, z -Richtung (Step 1) und x, y -Richtung (Step 2) angegeben werden. Der Trainingsprozess ist so implementiert, dass das Training des Modells und die dafür notwendige Transponierung der Daten automatisch durchgeführt wird. Im Laufe des Trainings erstellt das Programm unterschiedliche Dateien zur Zwischenspeicherung. In der Benutzeroberfläche

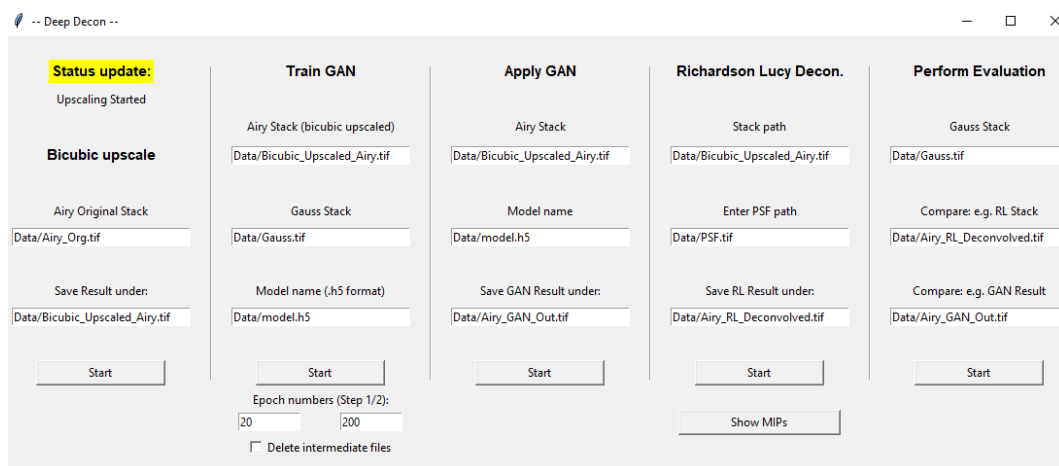


Abbildung 5.6: Graphische Benutzeroberfläche: Das GUI beinhaltet alle notwendigen Bestandteile des Deep Learning Algorithmus, inklusive der bikubischen Hochskalierung, der Möglichkeit zum Training und Anwendung der Deep Learning Dekonvolution sowie der Richardson-Lucy Dekonvolution und der Auswertung zum Vergleich der Performance.

des GUIs kann dann entschieden werden, ob diese Dateien erhalten oder nach Beendigung des Trainings gelöscht werden sollen. Nach dem Training wird das Modell auf weitere Bildstapel angewendet. Dafür wird dann auf die *h5*-Datei zugegriffen. Zum Vergleich kann auch eine Richardson-Lucy Dekonvolution sowie die Auswertung der resultierenden Bildstapel hinsichtlich unterschiedlicher Parameter durchgeführt werden (siehe dazu Kapitel 5.3.3).

5.3 Simulierte Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob der Algorithmus funktioniert und die Bilder auf die gewünschte Weise verbessert werden, wird ein Durchlauf mit simulierten Daten durchgeführt. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die Deep Learning Dekonvolution keine Artefakte in die Bilder integriert.

5.3.1 Vorbereitung

Die Bilder, welche für die Simulation verwendet werden, sollen ähnlich zu den Bildern sein, für welche die Deep Learning Dekonvolution in dieser Arbeit angewendet wird. Daher werden drei Bildstapel (B1, B2, B3') verwendet, welche mit der Vorgängerversion des Lichtscheibenmikroskops aufgenommen werden [60]. Diese werden als *Ground truth* betrachtet, wobei zwei der Bildstapel als Trainingsdaten verwendet werden (B1, B2), sodass mit 1900 Bildern trainiert wird. B3 wird zum Testen des resultierenden Modells verwendet, also um zu überprüfen, ob das entstandene Modell für diese Daten gute Ergebnisse liefert. Es ist wichtig, dass für diese Validierung Bilder verwendet werden, welche nicht Teil der Trainingsdaten sind. Nur so kann sichergestellt werden, dass das Netzwerk nicht die Bildinhalte, sondern die gewollte Transformation lernt. In Abbildung 5.7 sind Maximum-Intensitätsprojektionen der Bildstapel dargestellt.

Um eine unschärfere Version der Bilder zu erstellen, wird auf diese Bildstapel eine PSF

angewendet. Diese wird anhand von Gleichung 3.10 mit folgenden Parametern simuliert:

$$\begin{aligned}\lambda_0 &= 515 \text{ nm} \\ \text{NA} &= 1,0 \\ n &= 1,33\end{aligned}$$

Diese Faltung wird mit den drei Testbildstapeln durchgeführt. Zusätzlich werden die Bildstapel um einen Faktor zwei herunterskaliert. Auf diese Weise wird die geringere Vergrößerung simuliert, welche im Mikroskop für den Airystrahl verwendet wird. In Abbildung 5.8 (b,c) ist ein Vergleich eines kleineren Ausschnittes von B3 zwischen Originalbild und der mit der PSF gefalteten, herunterskalierten Version zu sehen.

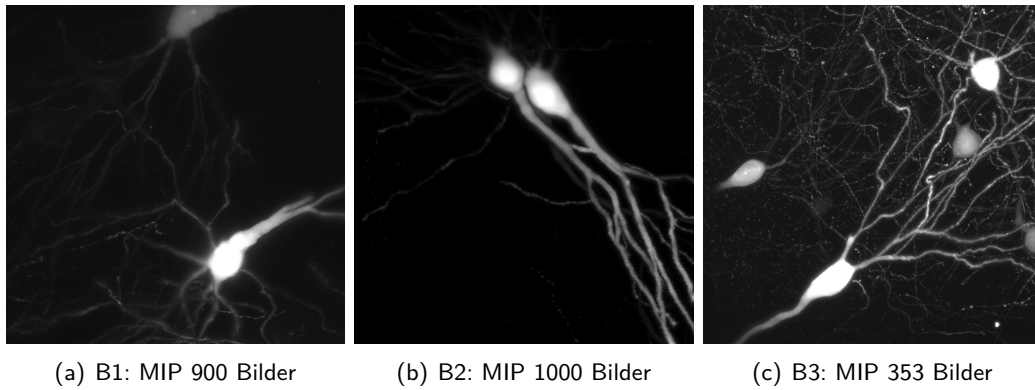


Abbildung 5.7: Maximum-Intensitätsprojektion (MIP) zum Testen der Deep Learning Dekonvolution. (a) und (b) werden als Trainingsdaten verwendet, (c) zum finalen Test des trainierten Modells.

5.3.2 Training

Zum Training wird das GUI verwendet. In einem ersten Schritt werden die Bildstapel bikubisch hochskaliert. Anschließend wird anhand von B1 und B2 das Training des Pix2Pix GANs durchgeführt. Als Epochenanzahl wird für Schritt1 für das Training in yz -Richtung $E = 20$ eingestellt, für Schritt2 wird $E = 200$ gesetzt. Im Rahmen der Testphasen hat sich herausgestellt, dass für den ersten Schritt wenige Trainingsiterationen für eine starke Verbesserung genügen, während im zweiten Schritt für ein gutes Ergebnis deutlich mehr Iterationen notwendig sind. Das resultierende Modell wird anschließend auf B3 angewendet. Zusätzlich wird zum Vergleich eine Richardson-Lucy Dekonvolution durchgeführt, um die Ergebnisse der Deep Learning Dekonvolution mit einer Standard-Methode zu vergleichen.

5.3.3 Auswertung

Zur Quantifizierung der Leistung der Deep Learning Dekonvolution werden unterschiedliche Metriken verwendet. Zuerst wird die Abweichung zwischen der Ausgabe des Pix2Pix GANs und dem Originalbildstapel bestimmt. Dafür wird der *Mean Squared Error* (MSE) verwendet, welcher folgendermaßen definiert ist [88]:

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (I_{\text{pred},i} - I_{\text{true},i})^2$$

$I_{\text{pred},i}$ gibt den Intensitätswert im Pixel i des Ausgabebildstapels an, während $I_{\text{true},i}$ die Intensität im Originalbildstapel ist. Hierbei beschreibt n die Gesamtzahl aller Pixel, welche sich aus Länge und Breite der Bilder sowie Anzahl N der Bilder im Bildstapel bestimmt. Somit ist

$$n = 2048 \cdot 2048 \cdot 353$$

Zusätzlich zur direkten Abweichung der Bilder wird die strukturelle Ähnlichkeit der Bilder ausgewertet. Damit kann bestimmt werden, ob die Deep Learning Dekonvolution auch den Bildinhalt des Originals generiert. Dafür wird die SSIM Metrik herangezogen (engl. *structural similarity index measure*). Die SSIM-Metrik basiert auf der Idee, dass die Ähnlichkeit zwischen zwei Bildern nicht nur von den einzelnen Pixeldifferenzen abhängt, sondern auch von der Struktur und dem Kontext der Bildinhalte. Diese Metrik bezieht Zusammenhänge zwischen benachbarten Pixeln mit ein, welche wichtige Informationen über die Struktur der Bilder liefern. Es werden daher drei Hauptkomponenten betrachtet, um die Ähnlichkeit zu bewerten: Helligkeit, Kontrast und Struktur. Die Berechnung erfolgt durch die Aufteilung des Bildes in kleinere Bereiche. Helligkeit und der Kontrast jedes Bereichs werden berechnet und verglichen, um eine globale Helligkeits- und Kontrastvergleichsmessung zu erhalten. Die Strukturkomponente wird durch die Berechnung der Kovarianzmatrix ermittelt. Die endgültige SSIM-Metrik ergibt sich aus der Kombination der drei Komponenten und wird als Wert zwischen 0 und 1 ausgegeben, wobei 1 eine perfekte Übereinstimmung bedeutet. Die SSIM-Metrik ist eine nützliche Methode zur Bewertung der Bildqualität und wird daher häufig zur Evaluierung von Bildverarbeitungsalgorithmen verwendet. [89]

Als dritte Komponente der Auswertung wird der Weber-Kontrast der Bildstapel nach Formel 4.2 bestimmt. Das ist wichtig, um bei den experimentellen Daten zu überprüfen, ob die gewünschte Kontrastverbesserung durch das Netzwerk erreicht wurde. Der Vergleich der MIPs ist in Abbildung 5.8 dargestellt. Man kann im Vergleich sehen, dass sowohl durch Richardson-Lucy Dekonvolution als auch durch die Deep Learning Dekonvolution die Bilder visuell schärfer und klarer wirken. Das Intensitätsprofil in Abbildung 5.8(f) zeigt, dass sich das Profil durch die Faltung mit der PSF verbreitert. Dieser Effekt kann durch die Dekonvolution rückgängig gemacht werden. Gleichzeitig gehen aber durch die Faltung Details des Bildes verloren. Das ist in den leichten Intensitätseinbrüchen des Originalprofils sichtbar. Diese können durch Dekonvolution nicht rekonstruiert werden.

Es ist zu erwarten, dass die Richardson-Lucy Dekonvolution für den simulierten Fall besser als für experimentelle Daten funktioniert, da die PSF, mit welcher die Daten behandelt wurden, genau bekannt ist. Im Mikroskop hingegen sind die Einflüsse auf das Bild nicht zwingend bekannt, sodass eine Dekonvolution mit einer im Mikroskop gemessenen PSF nicht perfekt funktioniert.

Die evaluierten Bildqualitätsmetriken in Tabelle 5.1 quantifizieren die Unterschiede. Die Deep Learning Dekonvolution zeigt den geringsten MSE Wert, die Pixeldifferenzen zum Originalbild verkleinern sich folglich. Die strukturelle Ähnlichkeit bleibt auf einem ähnlichen Level, da diese aber sehr nahe an dem Idealwert von 1 liegt, sind diese Werte nicht sehr aussagekräftig. Auffällig ist aber, dass durch die Richardson-Lucy Dekonvolution die strukturelle Ähnlichkeit sinkt. Das ist ein Hinweis auf eventuelle Artefakte, welche durch diese Methode in die Bilder integriert werden. Die Kontrastverbesserung ist eben-

falls für die Deep Learning Dekonvolution maximal. Sie übertrifft also die Ergebnisse der traditionellen Dekonvolutionsmethode deutlich.

	Original	Unschärf	RL	DLD
MSE	0	$0,94 \pm 0,04$	$1.76 \pm 0,04$	$0,76 \pm 0,03$
SSIM	1	$0,989 \pm 0,008$	$0.976 \pm 0,008$	$0,989 \pm 0,008$
Kontrast	80 ± 2	28 ± 1	33 ± 2	47 ± 1

Tabelle 5.1: Evaluation der Ergebnisse der Deep Learning Dekonvolution (DLD) im Vergleich zur Richardson-Lucy Dekonvolution (RL) für simulierte Daten.

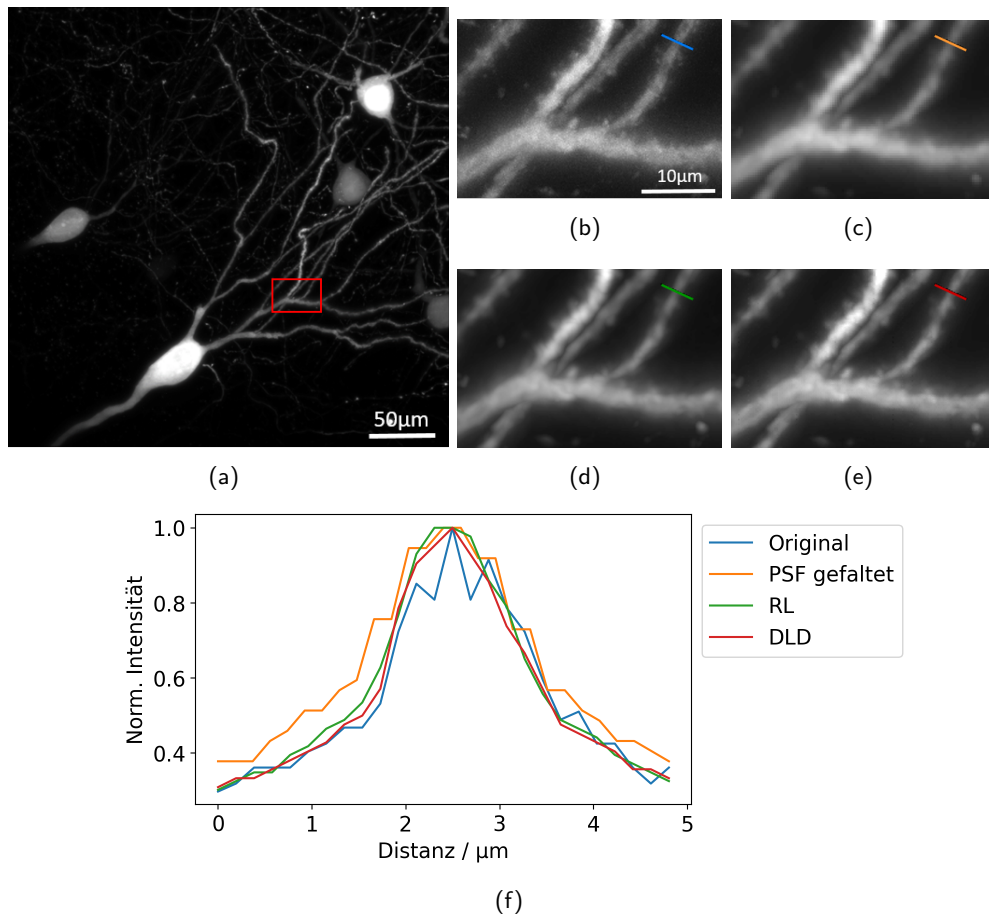


Abbildung 5.8: (a) MIP der Deep Learning dekonvolutierten Version von B3. (b) Zoom in der Originaldaten vor der Faltung. (c) Ergebnis nach der Faltung. (d) Ergebnis der Richardson-Lucy Dekonvolution. (e) Ergebnis der Deep Learning Dekonvolution. (f) Intensitätsprofil des Dendrits, welcher in (a-d) markiert ist. Man kann erkennen, dass sich das Profil durch die Faltung mit der PSF verbreitert, gleichzeitig gehen Informationen über Details verloren. Durch beide Methoden der Dekonvolution wird die Breite des Profils reduziert.

Kapitel 6

Biologische Anwendung

Die Deep Learning Dekonvolution wird abschließend auf experimentelle Daten angewendet. Dazu werden vor allem Gehirnproben von Mäusen untersucht. Die Abbildung dieser großen Proben in 3D stellt eine Herausforderung dar, insbesondere hinsichtlich der Aufnahme- und Nachbearbeitungszeiten. Hierfür ist das Airystrahl-Lichtscheibenmikroskop besonders geeignet und führt zu einer Beschleunigung und Vereinfachung des Aufnahmeprozesses. Durch das große Sichtfeld kann ein großer Probenbereich in einem Bild abgebildet werden. Zusätzlich können zwei Farbkanäle gleichzeitig aufgenommen werden. Für die Erfassung der großen Volumina werden die Proben kachelweise abgebildet und anschließend mit Hilfe des Programms *ImarisStitcher* (Bitplane - Oxford Instruments, Zürich, Schweiz) zusammengefügt.

Im Folgenden werden die Details der Datenaufnahme, das Training der Deep Learning Dekonvolution sowie die detaillierte Auswertung der Ergebnisse für verschiedene Fälle näher beschrieben, um die Anwendungsmöglichkeit des Mikroskops sowie der Deep Learning Dekonvolution zu demonstrieren.

6.1 Datenaufnahme

Mit dem Lichtscheibenmikroskop wurden insgesamt drei Maushirn-Proben aufgenommen, welche im Folgenden mit MB1, MB2 und MB3 benannt werden. Dabei wurde mit einem Teil der Daten von MB1 das Training durchgeführt und das entstandene Modell auf die restlichen Daten angewendet.

6.1.1 Probenpräparation

MB1 wurde von Irina Kim, AK Schwarz am Institute of Experimental Epileptology and Cognition Research der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Die Fluoreszenzmarkierung von MB2 wurde von Dr. Jens Tillmann aus dem AK Schwarz am Institute of Experimental Epileptology and Cognition Research der Universität Bonn durchgeführt und die anschließende Verarbeitung der Proben inklusive der Antikörperfärbung und Expansion wurde von Juan Eduardo Rodriguez-Gatica des AK Kubitscheck im Clausius Institut der Universität Bonn übernommen. Die Probenpräparation wird im Folgenden kurz zusammengefasst. Weitere Details können [47] entnommen werden.

MB1 war ein Sagittalschnitt der HDB-Gehirnregion mit 1 mm Dicke und EGFP-exprimierenden Neuronen. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 (H3570,

Invitrogen) gefärbt. MB2 enthielt Tetbow-markierte Neuronen, die sich in der CA3-Region des Hippocampus befinden. Die Tetbow-Färbung resultiert in einer stochastischen Mehrfarben-Markierung im neuronalen Gewebe, wodurch einzelne Neuronen unterschieden werden können [90]. Die Tetbow-Plasmide wurden im Hippocampus der Maus nach rAAV-vermitteltem Gentransfer exprimiert. In der weiteren Präparation wurde eine 200 µm dicke Schicht expandiert und die Zellkerne ebenfalls mit Hoechst 33342 eingefärbt.

Probenexpansion Zur Expansion der Proben wurde das Protokoll von [91] adaptiert. Die Schritte zur Vorbereitung der Expansion sind in 6.1 dargestellt. Zunächst wird die markierte Probe in einer Lösung mit einem Linker (2 mM Methylacrylsäure-NHS) für 24 Stunden inkubiert. Dieses Verbindungsmolekül koppelt an die fluoreszierenden Proteine in der Probe. Nach dreimaligem Waschen in PBS werden die Proben über Nacht in einer Monomerlösung (8,6 % Natriumacrylat, 2,5 % Acrylamid, 0,15 % N,N'-Methylenbisacrylamid und 11,7 % NaCl in 1× PBS) bei 4 °C inkubiert. Um die Probe im anschließenden Schritt zu gelieren, wird 4-Hydroxy-TEMPO (0,01 %), TEMED (0,2 %) und Ammoniumpersulfat (0,2 %) hinzugegeben. Dadurch polymerisieren die Monomere und verknüpfen sich mit den Linkern. Nach dem Auftragen der Gelierlösung werden die Proben dafür in die Gelierkammer überführt, wo sie 3 Stunden bei 37 Grad Celsius inkubiert werden.

Nach der Gelbildung werden die Proben bei 37 Grad Celsius im Verdauungspuffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton-X100, 0,8 M Guanidin-HCl, 16 U/mL Proteinase K; pH 8.0) inkubiert, bis die Probe vollständig transparent ist. Im Laufe des Prozesses werden durch das Enzym Proteinase K die Peptidbindungen der Proteine der Probe zertrennt. Für den vollständigen Verdau werden bei einer Probendicke von 200 µm ca. 16 Stunden benötigt. Abschließend wird die Probe dreimal mit PBS gewaschen. Durch die Lagerung in PBS dehnt sich die Probe um einen Faktor 1,5 aus.

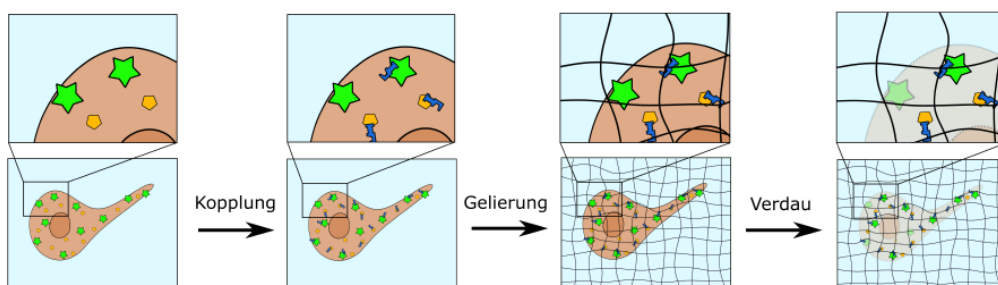


Abbildung 6.1: Zur Präparation der Proben werden im ersten Schritt Linker (blau) eingefügt, welche sich an die fluoreszierenden Proteine (grün) der Probe koppeln. Zur Gelierung wird eine Monomerlösung hinzugegeben. Mit einer Gelierungslösung verknüpfen sich die Linker mit den entstehenden Polymerketten. Durch ein Enzym werden die Peptidbindungen der Proteine zertrennt. Die Probe ist anschließend optisch homogenisiert. Entnommen aus [60], modifiziert nach einer Zeichnung von Dr. Jan Ruand.

Immunchemie Durch den Erhalt der auto-fluoreszierenden Proteinstrukturen während des Expansionsverfahrens ist es möglich, die EGFP-exprimierenden Zellen nach dem Probenverdau mittels Antikörperfärbung zu markieren. Dadurch wird das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich erhöht. Um eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers

zu verhindern, wird die Probe zunächst mit Blockpuffer (1x PBS, 5 % normales Ziegen Serum, 0,3 % TritonX-100, 0,02 % Natriumazid) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zwei Tage lang in Blockpuffer mit dem primären Antikörper (Huhn Anti-GFP; 1:500 in Puffer; Abcam, ab13970) bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird die Probe bei Raumtemperatur dreimal 30 Minuten lang in Blockpuffer gewaschen und dann zwei Tage lang mit dem sekundären Antikörper (Ziegen-Anti-Huhn mit Alexa Fluor 488, 1:400 in Blockpuffer, Thermo Scientific, A-11039) bei 4°C inkubiert. Zuletzt erfolgt die Zellkernfärbung mit Hoechst 33342.

6.1.2 Mikroskopaufnahme

Zur Fixierung der Probe auf dem Deckglas wird Poly-L-Lysin verwendet. So wird verhindert, dass sich die Probe während der Bildaufnahme bewegt. Das Deckglas wird auf den Probenhalter geschraubt und dieser wird mit Hilfe der Magnete an den Motoren zur Probenbewegung so befestigt, dass die Probe in die Flüssigkeit in der Kammer getaucht ist. Während der Probenaufnahme ist die Probenkammer mit PBS gefüllt.

Die Proben werden mit unterschiedlichen Wellenlängen λ_i angeregt, welche möglichst nahe an der maximalen Anregungswellenlänge λ_{Ex} der Fluorophore liegen. Die jeweiligen Wellenlängen samt der zugehörigen maximalen Emissionswellenlängen λ_{Em} sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. In MB2 werden die Hoechst-gefärbten Zellkerne mit einer Wellenlänge von $\lambda_i = 405$ nm angeregt, die grün fluoreszierenden Zellen, die mit einem Antikörper gegen GFP markiert sind, werden mit $\lambda_i = 488$ nm angeregt. MB2 enthält Hoechst-gefärbte Zellkerne und viral markierte mTurquoise-, tdTomato- und YFP-gefärbte Neuronen.

In Tabelle 6.1 sind die in der Probenkammer gemessenen Laser-Leistungen angegeben. Die am Computer eingestellten Leistungen sind dabei circa um einen Faktor vier höher, da durch die Faser und diverse optische Elemente sowie die Aufteilung in die zwei Beleuchtungsstrahlengänge für Gauß- und Airystrahl jeweils nur ein Anteil der Intensität die Probenkammer erreicht. Die Leistung sollte für die Aufnahmen so gewählt werden, dass ein ausreichend hohes Fluoreszenzsignal erzielt wird, aber der gleiche Probenbereich zur Akquirierung von Trainingsdaten auch zweimal abgebildet werden kann, ohne dass die Farbstoffe gebleicht werden.

In der Detektion werden zusätzlich zum *Notch*-Fliter, welcher das gestreute Anregungslicht herausfiltert, weitere Emissionsfilter verwendet, um nur den passenden spektralen Bereich abzubilden. Die Filtereinstellungen sind ebenfalls in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Dabei gibt die erste Zahl die jeweilige Transmissionswellenlänge an, die zweite gibt die Bandbreite des Filters in Nanometern an.

MB2 und MB3 werden jeweils unter zusätzlicher Verwendung der zweiten Kamera aufgenommen. Dabei werden im ersten Aufnahmedurchgang YFP und tdTomato angeregt und abgebildet. Durch den dichroischen Spiegel im Gemini wird das Emissionslicht von tdTomato transmittiert und zur ersten Kamera durchgelassen, das YFP-Signal wird reflektiert und zur zweiten Kamera weitergeleitet. Die entsprechenden Filter befinden sich hinter dem dichroischen Spiegel. Im zweiten Messvorgang wird die Fluoreszenz der Fluorophore aufgenommen, welche mit der UV-Wellenlänge von $\lambda_i = 405$ nm angeregt werden (mTurquoise, Hoechst). Da sich für diese Wellenlänge die Fokusposition in x - und z -Richtung verschiebt, werden dafür Linsen im Anregungsstrahlengang (L3 bzw. L9) leicht verschoben. Dadurch rückt die Strahltaile des Anregungsstrahls wieder in die Mitte des Sichtfeldes. Außerdem wird mit dem Drehrad am Detektionsobjektiv nachfo-

	λ_{Ex}/nm	λ_i/nm	λ_{Em}/nm	Filter	Leistung
GFP	488	488	507	510/80	4 mW
YFP	513	488	530	525/39	4 mW
tdTomato	554	561	581	605/55	4,5 mW
mTurquoise	434	405	474	463/65	1 mW
Hoechst	352	405	454	463/65	1 mW

Tabelle 6.1: Zusammenfassung der maximalen Anregungswellenlänge des Fluorophors, der verwendete Anregungswellenlänge im Mikroskop und der Emissionswellenlängen der abgebildeten Fluorophore sowie der verwendeten Filter und Laserleistungen. Informationen von [92], [93]

kussiert, sodass die fokale Ebene wieder mit dem Lichtblatt überlagert und das Signal scharf abgebildet wird.

Zur Aufnahme wird im Labview-Programm eine Schrittweite von 500 nm gewählt, sodass das Nyquist-Theorem für die z -Richtung erfüllt ist. Mehrere Bildstapel werden mosaikartig aufgenommen, um einen großen Bereich abzubilden. Dafür wird die Translations-schrittweite der Probe in x - bzw. y -Richtung auf 600 μm für den Airystrahl und 200 μm für den Gaußstrahl gesetzt. So erhält man jeweils eine Überschneidung von 10 % der homogen beleuchteten Bereiche. Durch diese Überlappung ist es möglich, die einzelnen Bildstapel nach der Aufnahme zusammenzufügen. Für die Proben wird eine Belichtungszeit von 30 ms festgelegt. In Kombination mit Signallaufzeiten und Verzögerungszeiten ergibt sich eine Gesamtbildrate von 10 Hz.

In MB1 werden für den Airystrahl 2×3 Kachel-Stapel mit jeweils 922 Bildern für beide Kanäle aufgenommen. Um Trainingsdaten zu erhalten, wird diese Probe auch mit dem Gauß-Strahl bei 40-facher Vergrößerung abgebildet. Für den Gaußstrahl werden 6×9 Kachelstapel mit je 922 Bildern pro Farbkanal aufgenommen. Insgesamt ergibt dies ein Datenvolumen von etwa 1 TB.

Für MB2 werden mit dem Airystrahl 6×5 Kachel-Stapel mit jeweils 689 Bildern aufgenommen, was ein Datenvolumen von etwa 500 GB ergibt. Hier wird ein kleinerer Bereich mit Hilfe des Gaußstrahls aufgenommen, insgesamt 4 Stapel. Für MB3 werden 7×11 Bildstapel pro Farbkanal mit jeweils 1000 Bildern aufgenommen, was in einer Datenmenge von knapp 2 TB resultiert.

6.2 Training und finale GAN Anwendung

6.2.1 Datenvorbereitung und Trainingsprozess

Im ersten Schritt der Datenbearbeitung werden die Bildstapel, welche mit dem Airystrahl aufgenommen wurden, bikubisch hochskaliert. Das kann mit dem GUI oder in einem separaten Python-Programm durchgeführt werden. Alle Bildstapel eines Ordners werden automatisch eingelesen, hochskaliert und abgespeichert. Die resultierenden Bilder haben eine Größe von 4096×4096 Pixeln.

Im nächsten Schritt werden die Bilder der einzelnen Farbkanäle zusammengefügt. Dafür wurde ein Python-Programm geschrieben, welches die Bildstapel in RGB-Stapel umwandelt. Das wurde sowohl für die mit dem Airystrahl aufgenommenen Daten als auch für die Gauß-beleuchteten Daten durchgeführt. Für den Fall von MB1, wo nur zwei Kanäle

aufgenommen wurden, bleibt der rote Kanal der Bildstapel frei. Anschließend werden die einzelnen Bildstapel zusammengefügt. Dafür müssen die Bilder, welche im *tiff*-Format aufgenommen wurden, zuerst in das *Imaris*-Format *ims* umgewandelt werden. Mit Hilfe der Software *ImarisStitcher* werden die Bilder dann automatisch zusammengefügt. Dafür wird die Größe des überlappenden Bereichs eingestellt und die Software korrigiert automatisch die Position der Bildstapel zueinander. Zur weiteren Verarbeitung wird der resultierende Gesamtbildstapel in das *tiff*-Format umgewandelt.

Für den Trainingsprozess werden anschließend aus den Gesamtbildstapeln der Airystrahl-beleuchteten Bilder einzelne Bereiche einer Größe von 2048×2048 Pixeln geschnitten. Diese Bereiche werden zufällig ausgewählt. Als Kriterium nur gesetzt, dass ein vergleichsweise hohes Signal vorhanden ist, um ein erfolgreiches Training zu gewährleisten. Dabei werden jeweils zwei Bildstapel der beiden Farbkanäle von MB1 verwendet. Die Maximum-Intensitätprojektionen der ausgewählten Bereiche sind in Abbildung 6.2 dargestellt.

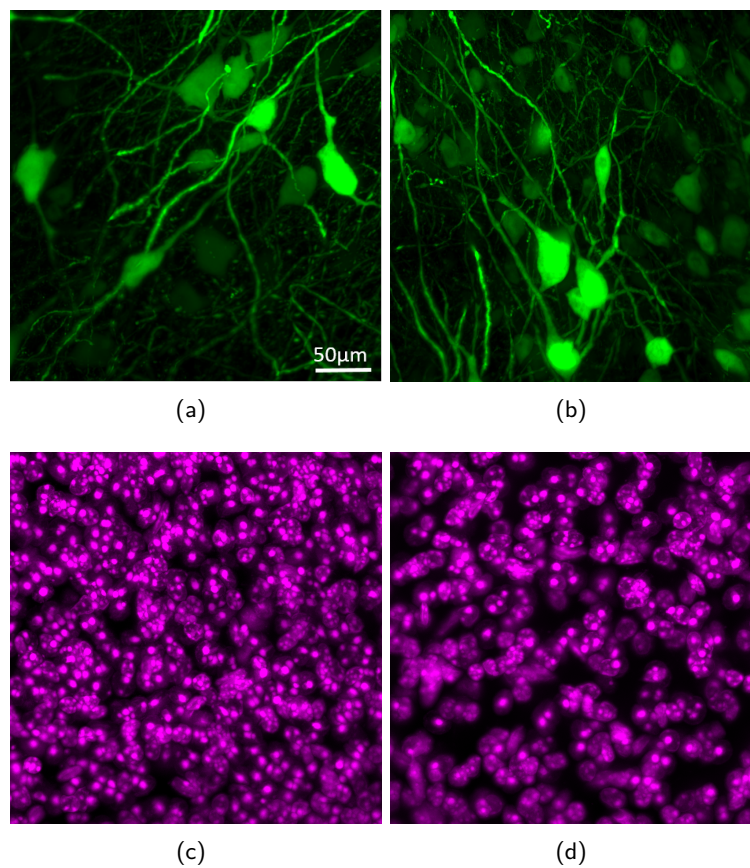


Abbildung 6.2: MIP der verwendeten Bildstapel von MB1 (Airystrahlbeleuchtung) zum Training der Deep Learning Dekonvolution. In (a) und (b) sind die mit Antikörperfärbung gegen GFP markierten Zellkörper und deren Zellfortsätze (Dendriten) zu sehen. (c) und (d) zeigt die Zellkerne, welche mit Hoechst gefärbt wurden.

Das Gleiche wird mit den Gaußstrahl-beleuchteten Daten durchgeführt. Bereits beim manuellen Ausschneiden der Bereiche wird darauf geachtet, möglichst genau den gleichen Bildbereich auszuwählen. Um sicherzustellen, dass die Bildstapel den gleichen Bildinhalt

ohne Verschiebung zueinander zeigen, wird im nächsten Schritt eine Registrierung basierend auf der Kreuzkorrelation zwischen den einzelnen Stapeln durchgeführt, welche die Airystrahl-beleuchteten Bildstapel leicht translatiert. Das Ergebnis einer solchen Registrierung ist beispielhaft für einen Zellkern in Abbildung 6.3 dargestellt.

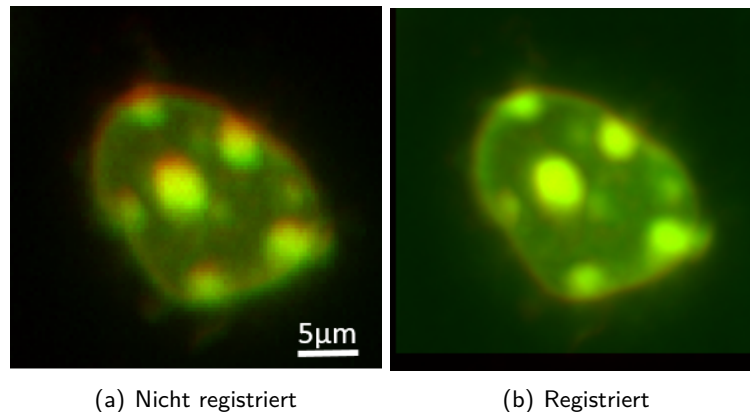


Abbildung 6.3: Durch die Registrierung werden leicht zueinander verschobene Bilder übereinander gelegt. Roter Farbkanal: Gaußstrahlbeleuchtung, Grüner Farbkanal: Airystrahlbeleuchtung

Mit den vorbereiteten Daten wird nun der Trainingsprozess gestartet. Dafür werden die Bildstapel gemeinsam eingelesen. Für den ersten Schritt des Trainings werden die Stapel in yz -Richtung transponiert. Anschließend wird das Pix2Pix GAN für diese Ausrichtung trainiert. Hierbei wird eine Epochenanzahl von $E = 20$ verwendet. Im zweiten Schritt werden die Daten in ihre ursprüngliche Orientierung transponiert und das Training für die xy -Richtung durchgeführt. Dabei wird eine Epochenanzahl von $E = 150$ gewählt. Die Anzahl der notwendigen Iterationen hängt dabei von der Qualität und Anzahl der Trainingsdaten ab. Dabei ist das Ziel, dass ein Gleichgewicht zwischen der Performance des Generators und des Diskriminators gefunden wird. Eine zu niedrig gewählte Epochenanzahl führt zu einem unvollständigen Training, eine zu hoch gewählte Epochenanzahl kann zu Überanpassung führen. Die Dauer des Trainings hängt von der Anzahl der Trainingsdaten und der Anzahl der Epochen ab. Für den hier beschriebenen Fall dauerte das Training in etwa zwei Tage. Nach dem Training wird das resultierende Modell im *h5*-Format gespeichert, sodass es auf die weiteren Daten angewendet werden kann.

6.2.2 Vergleich zur Richardson-Lucy Dekonvolution

Um für die experimentellen Daten den Vergleich mit einer analytischen Entfaltungsmethode zu ermitteln, werden die Bilder mit einer Richardson-Lucy Dekonvolution verarbeitet. Dafür werden Bildstapel von Tetraspecks aufgenommen, mit welchen die PSF für unterschiedliche Wellenlängen experimentell bestimmt werden kann. Bei dieser Messung wird ähnlich wie bei der Bestimmung der Auflösung (s. Kap. 4.2.2) vorgegangen. Die Tetraspecks mit einem Durchmesser von $\varnothing_B = 200$ nm werden in 1 %-iger Agarose immobilisiert. Sie besitzen Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen von $\lambda_{Ex/Em} = 360/430$ nm (blau), $\lambda_{Ex/Em} = 505/515$ nm (grün) und $\lambda_{Ex/Em} = 660/680$ nm (rot). Die Anregungsmaxima entsprechen in etwa den für die Messung der Proben verwendeten Wellenlängen, sodass die PSF für unterschiedliche Wellenlängen experimentell ermittelt werden kann.

Die Schrittweite wird auf $\Delta z = 500 \text{ nm}$ festgelegt, sodass diese der Schrittweite der Bildaufnahme entspricht. Aus dem aufgenommenen Stapel werden mit dem Python-Programm, welches auch zur Simulation der Auflösung verwendet wurde, 100 Profile verteilt über das gesamte Sichtfeld herausgestellt. Über die erhaltenen Ausschnitte wird gemittelt, sodass man ein dreidimensionales gemittelttes Profil der Mikropartikel erhält. Die Richardson-Lucy Dekonvolution wird, wie auch die Deep Learning Dekonvolution, auf die hochskalierten Bilder angewendet.

Die Verarbeitung dreidimensionaler Bilder mit Hilfe der Richardson-Lucy Dekonvolution ist verhältnismäßig rechenintensiv, da jede Iteration die Berechnung von zwei Faltungen umfasst, für welche jeweils eine mehrdimensionale Fouriertransformation durchgeführt werden muss. Die Verarbeitung eines einzelnen Bildstapels kann je nach Anzahl der Iterationen mehr als 24 Stunden dauern. Aus diesem Grund wird auf die Python Bibliothek RedLionfish zugegriffen, welche die Berechnung der Richardson-Lucy Dekonvolution durch die Nutzung von GPU-Ressourcen beschleunigt [94]. Auf diese Weise werden die beiden Dekonvolutionsmethoden auf der GPU durchgeführt, sodass auch die Verarbeitungsgeschwindigkeiten unter gleichen Bedingungen verglichen werden können (s. Abschnitt 6.3.2).

6.3 Ergebnisse und Auswertung

Im Folgenden soll die Leistung der Deep Learning Dekonvolution anhand verschiedener Fälle untersucht werden. Dabei werden die unterschiedlichen Proben MB1, MB2 und MB3 jeweils mit der Deep Learning Dekonvolution als auch mit der traditionellen Richardson-Lucy Dekonvolution verarbeitet. Zusätzlich werden die Ergebnisse mit den originalen, unverarbeiteten Airystrahl-Daten sowie mit den Gaußstrahl-beleuchteten Bildern verglichen. Diese dienen im Laufe der Evaluation als *Ground truth*, da sie ohne weitere Nachbearbeitungsschritte direkt mit hoher Auflösung aufgenommen werden. Die Gaußstrahl-Daten werden auch im Laufe des Trainings als Referenzbilder verwendet und bilden daher das Optimum, welches mit der Deep Learning Dekonvolution erreicht werden kann.

Die Evaluation beinhaltet, wie schon in den vorherigen Kapiteln ausgeführt, mehrere Bildevaluierungsmetriken, welche sich auf unterschiedliche Aspekte der Bildverbesserung fokussieren. Der *Mean Squared Error* (MSE) dient als direkter Vergleich zu den Gauß-beleuchteten Bildern. Dieser Wert gibt die Differenz der jeweiligen Pixel zwischen untersuchten Daten und Referenzdaten an und ist dementsprechend im Idealfall 0. Je geringer der Wert ist, desto ähnlicher ist das Bild dem Referenzbild. Der *Structural Similarity Index Measure* (SSIM) vergleicht die strukturelle Ähnlichkeit der Bilder. Damit wird sichergestellt, dass durch die Dekonvolution nicht nur eine Ähnlichkeit zum Gaußstrahlbild erreicht wird, sondern auch, dass die Struktur des Bildes erhalten und realistisch bleibt. Während dieser Wert für strukturell unterschiedliche Bilder bei 0 liegt, gibt er bei struktureller Gleichheit einen Wert von 1. Zur weiteren Bildevaluierung wird der Weberkontrast bestimmt, um zu untersuchen, wie groß die durch die verschiedenen Methoden erreichte Kontrastverbesserung ist.

6.3.1 Evaluation der Deep Learning Dekonvolution

Im ersten Schritt werden nun weitere Bereiche von MB1 analysiert. Das Modell, welches das Ergebnis des generativen Netzwerks des GANs ist, wird auf Bildstapel unterschiedlicher Bereiche von MB1 angewendet. Dabei wurde explizit darauf geachtet, dass sich diese Bereiche nicht mit den Trainingsdaten überschneiden. Eine Maximum-Intensitätsprojektion dieses Bereichs ist in Abbildung 6.4 dargestellt. In den kleineren Bildausschnitten wird die Verbesserung durch die Deep Learning Dekonvolution deutlich. Für beide Farbkanäle wirken die Bilder im Vergleich zu den unverarbeiteten Airystrahl-daten in Abb. 6.4 (c,g) klarer, schärfer und kontrastreicher. Auch durch die Richardson-Lucy Dekonvolution werden die Bilder sichtbar verbessert, allerdings besonders für den Hoechst-Farbkanal (violett) weniger deutlich. Für den GFP-Kanal wurde ein Intensitätsprofil eines Dendriten bestimmt. Hier zeigt sich, dass durch die Dekonvolution die Breite des Dendriten verringert wird, was auf eine Verbesserung der Auflösung hindeutet.

In einem zweiten Bereich von MB1 (s. Abb. 6.5) zeigt der GFP-Farbkanal deutlich die Verbesserung durch die Deep Learning Dekonvolution. Auch hier ist in einem Intensitätsprofil ersichtlich, dass die Breite des Dendriten durch die Dekonvolution verringert werden konnte. Zusätzlich wird deutlich, dass im Vergleich zum Intensitätsprofil der Airy-beleuchteten Daten (orange Linie in 6.5 (d)) durch die Hochskalierung in Kombination mit der Deep Learning Dekonvolution eine geringere Pixelgröße und daher auch gleichmäßigeres Profil sichtbar wird.

In Tabelle 6.2 sind die ausgewerteten Metriken zusammengefasst. Es zeigt sich, dass durch die Deep Learning Dekonvolution sowohl ein geringerer MSE-Wert als auch ein höherer SSIM-Wert erreicht wird. Insgesamt konnte also eine geringe Abweichung zu den in hoher Qualität aufgenommenen Gauß-Daten kombiniert mit einer guten strukturellen Ähnlichkeit erreicht werden. In beiden Fällen zeigt die Deep Learning Dekonvolution ein besseres Ergebnis als die Richardson-Lucy Dekonvolution. Bezüglich des bestimmten Weber-Kontrastes können beide Methoden einen hohen Kontrast in den Bildern rekonstruieren.

	Gauß	Airy	RL	DLD
MSE	0	60 ± 8	109 ± 17	21 ± 3
SSIM	1	$0,64 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,03$
Kontrast	94 ± 8	39 ± 2	90 ± 7	97 ± 6

Tabelle 6.2: Evaluation der Ergebnisse der Deep Learning Dekonvolution (DLD) im Vergleich zu den unverarbeiteten Daten und der Richardson-Lucy Dekonvolution (RL) für MB1.

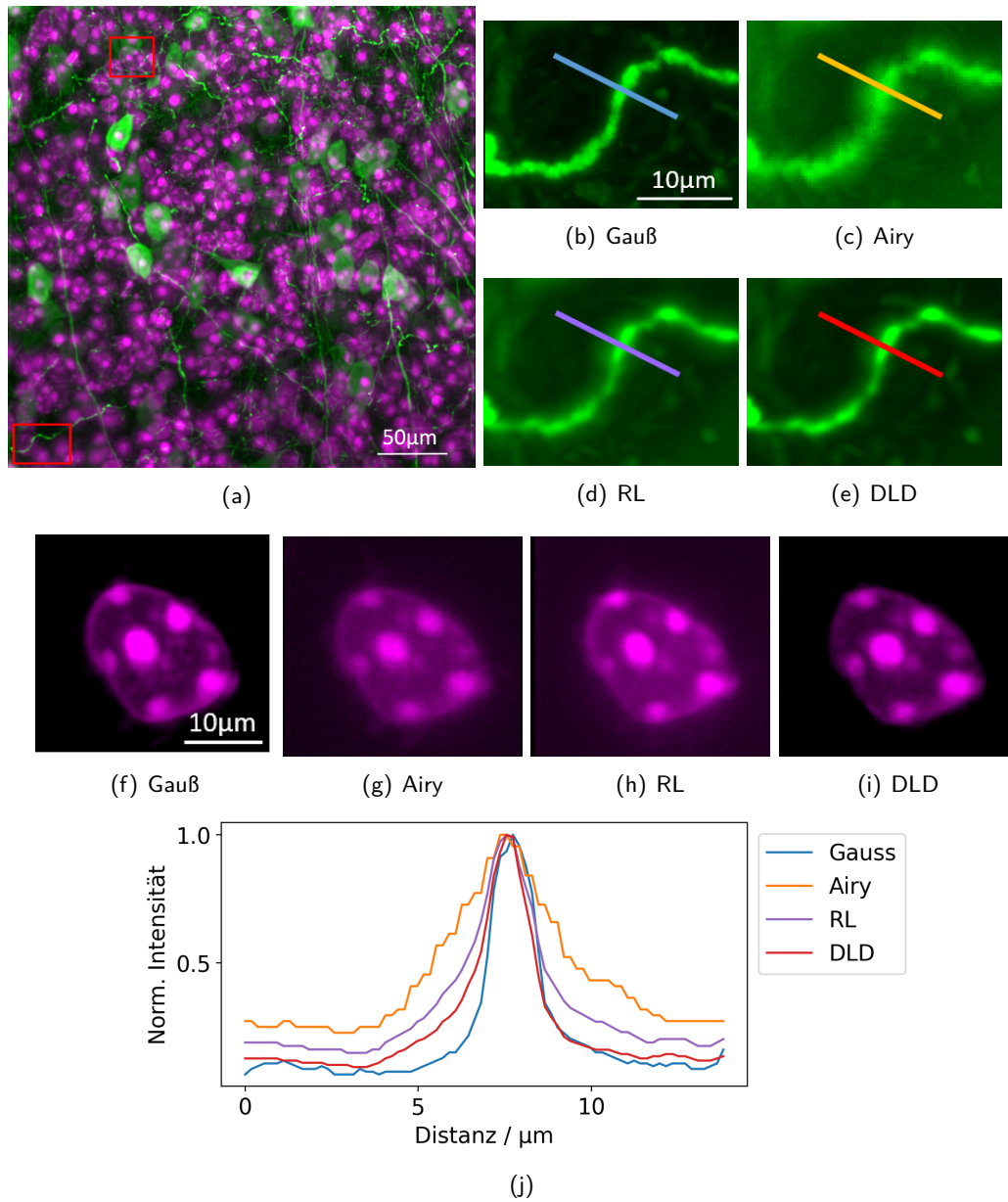


Abbildung 6.4: Maximum-Intensitätsprojektionen entlang der z-Richtung für MB1. (a) Übersicht der mit der Deep Learning Dekonvolution (DLD) bearbeiteten Bilder, welche mit dem Airystrahl aufgenommen wurden. Violett: Hoechst, Grün: Antikörper gegen GFP. Zum Vergleich sind außerdem kleinere Ausschnitte der markierten Bereiche von Gauß-beleuchteten Daten, der original Airy-beleuchteten Daten und der mit der Richardson-Lucy Dekonvolution (RL) verarbeiteten Bilder gezeigt. (b-e) zeigt einen Dendriten, welcher mit dem Antikörper gegen GFP gefärbt wurde, (f-i) zeigt einen Hoechst gefärbten Zellkern. Das Intensitätsprofil (j) zeigt, dass durch die Dekonvolution die Breite des Dendriten verringert werden konnte, was auf eine Verbesserung der Auflösung hindeutet. Diese Verbesserung ist für die Deep Learning Dekonvolution stärker als für die Richardson-Lucy Dekonvolution. Die evaluierten Bildmetriken zu diesen Abbildungen sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst. [47]

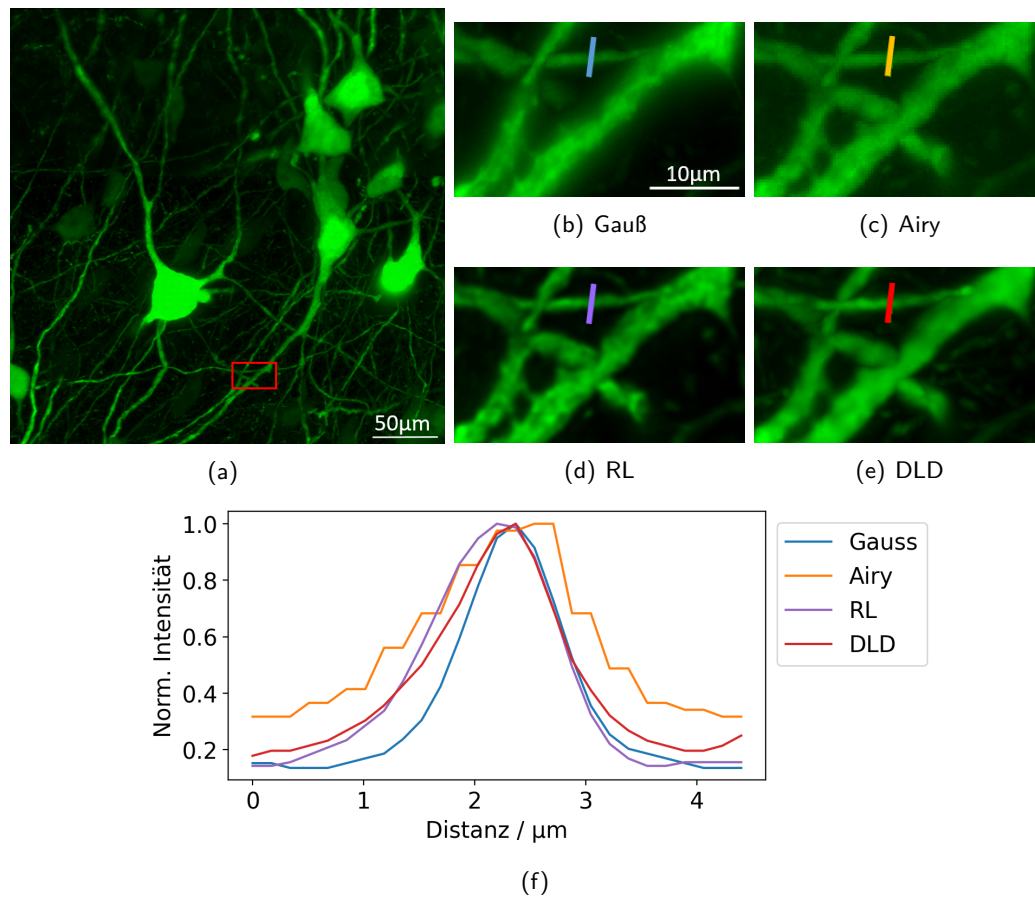


Abbildung 6.5: MIPs eines zweiten Bereichs von MB1: (a) zeigt eine Übersicht der mit der Deep Learning Dekonvolution bearbeiteten Bilder, welche mit dem Airystrahl aufgenommen wurden. Zum Vergleich sind außerdem kleinere Ausschnitte der Gaußstrahl-beleuchteten Daten (b), der original Airystrahl-beleuchteten Daten (c) und der mit der Richardson-Lucy Dekonvolution verarbeiteten Bilder (d) gezeigt. (e) zeigt den Ausschnitt für die Deep Learning Dekonvolution. Das Intensitätsprofil zeigt, dass die Breite des Dendriten durch die Dekonvolution verringert wird und sich der Breite im Gauß-beleuchteten Fall annähert (f).

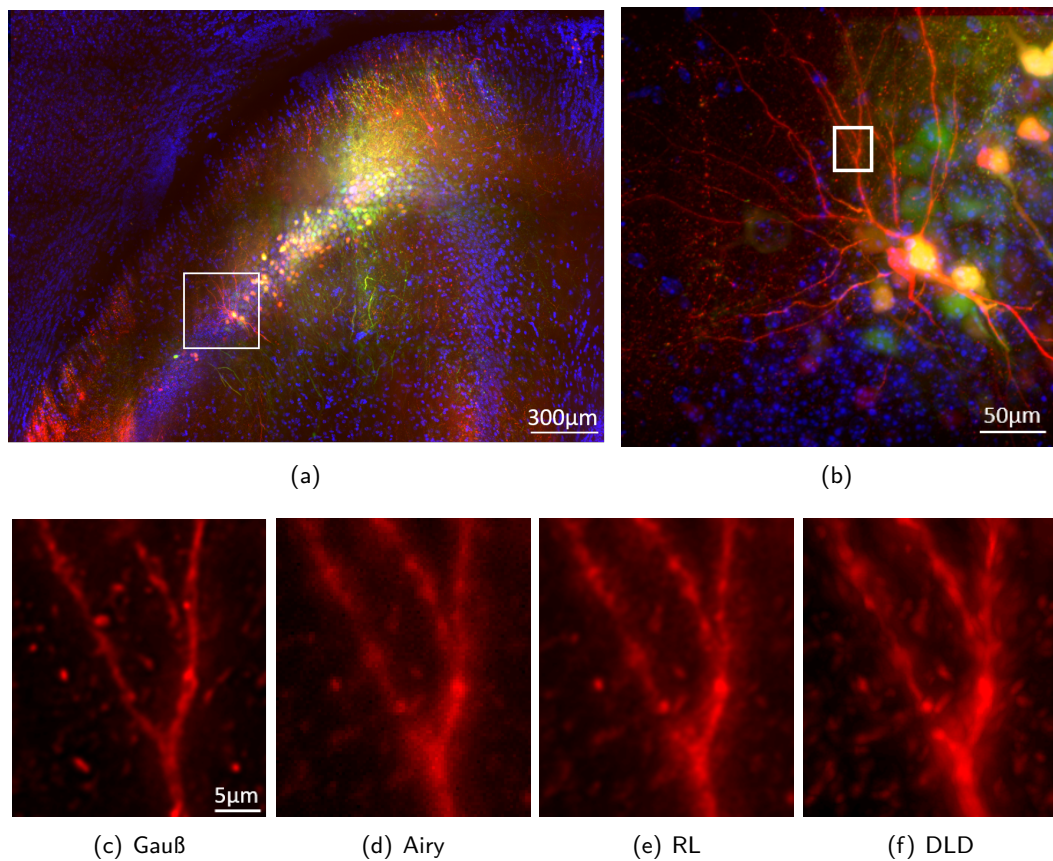


Abbildung 6.6: (a,b) MB2 zeigt einen großen Bereich des Hippocampus in drei Farbkänen. Die Probe beinhaltet Tetbow-Markierung in mTurquoise (blau), tdTomato (rot) und YFP (grün). Zusätzlich sind die Zellkerne mit Hoechst (blau) gefärbt. (c-f) Die vergrößerten Ausschnitte zeigen wieder die Verbesserung der Bilder durch die Deep Learning Dekonvolution im Vergleich zu den unverarbeiteten Bildern und der Richardson-Lucy Dekonvolution. Die evaluierten Metriken sind in Tabelle 6.3 zusammengefasst. [47]

Im nächsten Schritt wird das trainierte Modell auf die Daten von MB2 und MB3 angewandt. Somit wird untersucht, welches Ergebnis die Deep Learning Dekonvolution für unterschiedliche Proben liefert. In Abbildung 6.6 ist eine Maximum-Intensitätsprojektion eines großen Bereichs von MB2 für alle Farbkäne abgebildet. Diese Bilder wurden mit dem Airystrahl aufgenommen und mit der Deep Learning Dekonvolution verarbeitet. Der Unterschied zwischen den Aufnahme- und Dekonvolutionsmethoden ist in den Bildausschnitten (c-f) zu sehen, die evaluierten Metriken sind in Tabelle 6.3 gegeben. Die Werte zeigen, dass MSE und SSIM im Vergleich zu den Airy-Rohdaten verbessert werden. Im Vergleich zur Richardson-Lucy Dekonvolution zeigt sich eine geringere Abweichung, allerdings auch ein leicht niedrigerer SSIM. Allgemein wird im Vergleich zu MB1 ein größerer struktureller Unterschied zu den Gauß-Daten gemessen, welcher sich im SSIM-Wert zeigt. Dieser Unterschied spiegelt sich allerdings schon in den Airy-Rohdaten wider. Die aufgenommenen Bilder mit Airystrahl- und Gaußstrahlbeleuchtung sind nicht ganz gleich, was sich in Abbildung 6.6 bestätigt, wo sich kleine Unterschiede in den Strukturen zeigen. Das kann unterschiedliche Gründe haben: Zum einen ist die Tetbow-Markierung stärker von Photobleichung betroffen als die Antikörper-Färbung. Dadurch

	Gauß	Airy	RL	DLD
MSE	0	50 ± 5	49 ± 5	30 ± 1
SSIM	1	0.54 ± 0.10	0.73 ± 0.2	0.69 ± 0.07
Kontrast	88 ± 4	15 ± 1	67 ± 9	69 ± 8

Tabelle 6.3: Evaluation der Ergebnisse der Deep Learning Dekonvolution (DLD) im Vergleich zu den unverarbeiteten Daten und der Richardson-Lucy Dekonvolution (RL) für MB2.

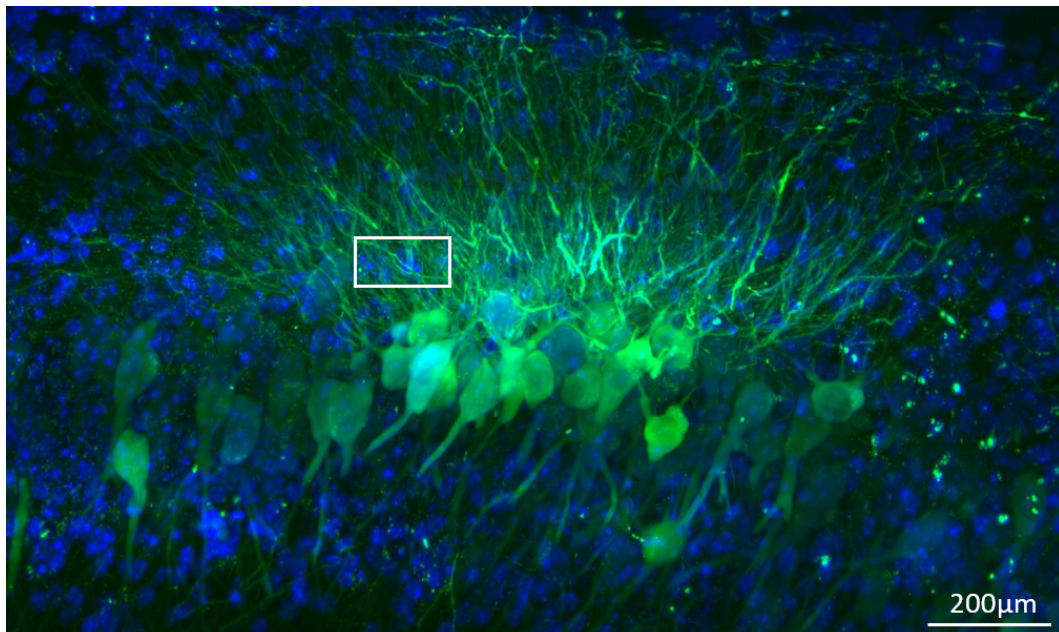
wurden bei der Aufnahme mit dem Airystrahl, welche als erstes durchgeführt wurde, bestimmte Bereiche gebleicht. Außerdem ist die Probe nicht komplett starr. Die Probe ist in ein empfindliches Gel eingebettet. Durch die Probenbewegung während der Messung wird eine leichte Kraft auf das Gel ausgeübt, wodurch sich die Strukturen verschieben können. Beide Faktoren bilden Schwierigkeiten für die Aufnahme von Trainingsdaten. Eine weitere Diskussion dazu findet sich in Kapitel 7.

Auf eine weitere Maushirnprobe, MB3, wird die Deep Learning Dekonvolution angewendet. Diese wurde ebenfalls mit der Tetbow-Methode markiert und beinhaltet viele dicht aneinander liegende Neuronen. Da die Probe durch die Aufnahme mit dem Airystrahl stark gebleicht wurde, wurde auf eine Aufnahme mit dem Gaußstrahl verzichtet. Daher kann hier eine Analyse nur qualitativ erfolgen. Zusätzlich enthielt der tdTomato-Farbkanal wenig bis kein Signal und wurde daher in der Darstellung weggelassen. Abbildung 6.7 zeigt einen großen Probenbereich und in den vergrößerten Bildausschnitten wird die Kontrastverbesserung durch die Deep Learning Dekonvolution sichtbar. Die zahlreichen dicht aneinander liegenden Dendriten sind deutlich klarer zu unterscheiden.

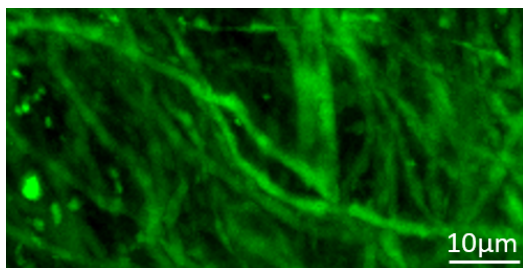
6.3.2 Verarbeitungsgeschwindigkeit

Die Verarbeitungsgeschwindigkeit spielt bei der Wahl der Aufnahme- und Dekonvolutionsmethode eine wichtige Rolle, da sich diese auf die Leistung und Effizienz der Methode auswirkt. Mit dem Airystrahl kann zwar durch die Vergrößerung des Sichtfeldes eine beschleunigte Messzeit erreicht werden, allerdings beeinflussen Nachbearbeitungsschritte die Dauer der gesamten Datenaufnahme. Besonders bei großen Datensätzen und begrenzter Rechenleistung bieten Methoden mit schnellen Verarbeitungsgeschwindigkeiten ein großes Potential für Benutzerfreundlichkeit und die praktische Umsetzung von Messungen.

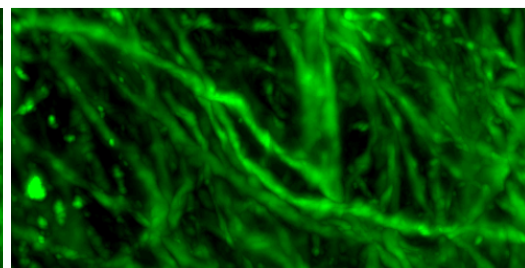
Im Folgenden werden drei Fälle unterschieden. Zum einen wird die Aufnahmezeit für die Gaußstrahl-beleuchteten Daten gegeben. Diese weisen ohne weitere Nachbearbeitung eine sehr hohe Qualität auf. Daher ergibt sich die gegebene Zeit aus der Messdauer für ein bestimmtes Aufnahmevolumen. Für die Airy-beleuchteten Daten werden jeweils zwei Zeiten gegeben. Die Aufnahmezeit der Rohdaten ergibt sich aus der Messdauer. Hier muss die Zeit zur Datenverarbeitung zusätzlich mit einbezogen werden. Für die Richardson-Lucy Dekonvolution bzw. die Deep Learning Dekonvolution wird die Zeit als kombinierte Dauer der Aufnahme und der Anwendung der jeweiligen Dekonvolutionsmethode gegeben. Die Werte für ein Aufnahmevolumen von $(600 \mu\text{m})^3$ sind in Abbildung 6.8 als Balkendiagramm gegeben. Dabei wird wieder eine Schrittweite von $\Delta z = 500 \text{ nm}$ angenommen, was somit eine Anzahl von 1200 Bilder ergibt.



(a)



(b) Airy



(c) DLD

Abbildung 6.7: MIPs von MB3: (a) MB3 ist ebenfalls eine Tetbow markierte Probe mit zwei Farbkanälen (Der tdTomato-Farbkanal zeigte nur minimales Signal und wurde daher zur übersichtlicheren Darstellung weggelassen), auf welche die Deep Learning Dekonvolution angewendet wird. Auch für diese Probe konnte die Deep Learning Dekonvolution eine Verbesserung der Originaldaten (b) bewirken, sodass die Dendriten deutlicher zu unterscheiden sind und das Bild insgesamt kontrastreicher wirkt (c).

Es wird deutlich, dass die Verarbeitungsgeschwindigkeit der Airystrahlbilder mit der Deep Learning Dekonvolution ca. um einen Faktor drei schneller ist als die Gaußstrahl-Aufnahme. Noch deutlicher ist der Unterschied zur Richardson-Lucy Dekonvolution. Hier übertrifft die Deep Learning Dekonvolution die Standardmethode um einen Faktor von 20. Dementsprechend ist die Abbildung und Verarbeitung eines Volumens von $(6 \times 6 \times 1) \text{ mm}^3$ in weniger als 17 Stunden möglich, während die Abbildung mit Gauß-Beleuchtung ohne Nachbearbeitungsschritte für diesen Fall ca. zwei Tage benötigt. Die Richardson-Lucy Dekonvolution würde insgesamt fast 14 Tage benötigen.

Die angegebenen Zeiten gelten jeweils ohne Einbeziehung des Trainings der Deep Learning Dekonvolution. Die Trainingsdauer hängt dabei von vielen Faktoren wie der Datenmenge und der Anzahl der Trainingsiterationen ab. Das Training des Modells, welches für die in dieser Arbeit vorgestellten Daten verwendet wurde, hat ca. zwei Tage gedauert. Die Anwendung der Dekonvolution wird allerdings durch die Trainingsdauer nicht beeinflusst, da das Training idealerweise nur einmal durchgeführt werden muss und das entstehende Modell dann auf alle weiteren Daten angewendet wird.

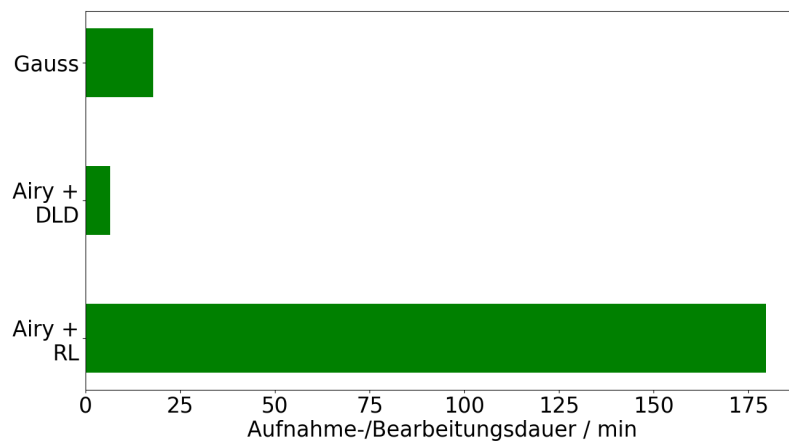


Abbildung 6.8: Vergleich der Methoden: Die angegebene Zeit beinhaltet die Dauer für Aufnahme und gegebenenfalls Dekonvolution der Probe für einen Probenbereich von $(600 \mu\text{m})^3$. Es wird deutlich, dass die Deep Learning Dekonvolution deutlich schneller als die Richardson-Lucy Dekonvolution ist. Gleichzeitig ist Aufnahme und Deep Learning Dekonvolution aber auch schneller als die reine Aufnahmezeit mit dem Gaußstrahl.

6.4 Spezialfälle

Ein gut trainiertes neuronales Netz hat die Eigenschaft der Generalisierung, das heißt es ist in der Lage, eine große Variation von Daten erfolgreich zu verarbeiten. Es ist jedoch eine große Bandbreite an Trainingsdaten erforderlich, um eine solche Generalisierungsfähigkeit zu erreichen. Die Analyse der Deep Learning Dekonvolution beschränkte sich bisher ausschließlich auf Daten von Gehirnproben von Mäusen. Es stellt sich nun die Frage, inwieweit dieses Modell auf andere Strukturen angewendet werden kann. Daher wird im Folgenden untersucht, ob das trainierte Modell und die Deep Learning Dekonvolution im Allgemeinen auch für weitere Arten von Methoden und Strukturen effektiv übertragbar ist, um so den Anwendungsbereich der Deep Learning Dekonvolution zu erweitern.

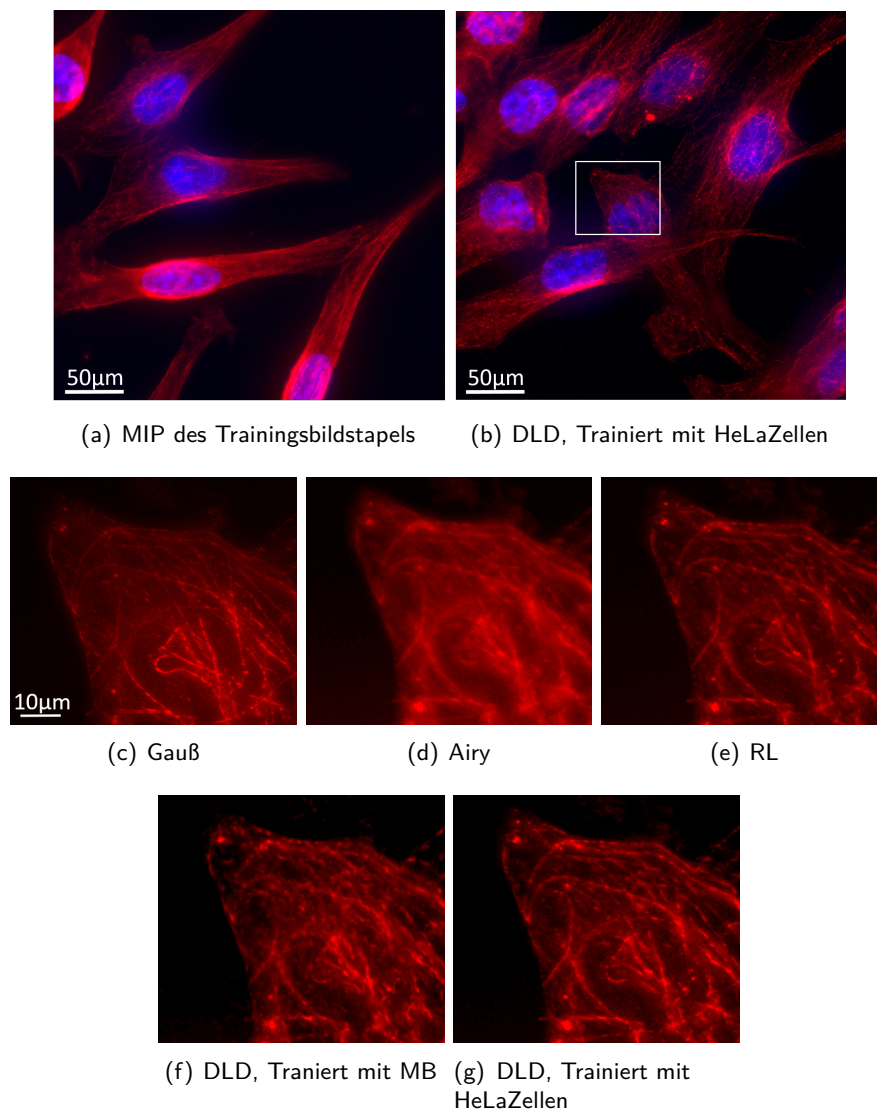


Abbildung 6.9: (a,b) Deep Learning Dekonvolution angewendet auf HeLa Zellen (MIPs). (c) zeigt die Gaußstrahl-beleuchteten Bilder zum Vergleich. Auf die Airystrahl-beleuchteten Daten (d) wurde die Richardson-Lucy Dekonvolution (e) und ein mit Mausehirnproben trainiertes Modell (f) angewendet. Zum Vergleich wurde ein Modell spezifisch mit HeLa-Zellbildern trainiert und auf die gezeigten Daten angewendet (g). Beide Modelle verbessern die Bildqualität, allerdings liefert das spezifisch trainierte Modell ein besseres Ergebnis.

6.4.1 Anwendung auf andere Strukturen

Im ersten Fall werden Daten von fixierten HeLa Zellen untersucht. Die Probe wurde von Rohan Bhatia (AK Kubitscheck, Clausius Institut der Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Alle Details zur Probenpräparation finden sich in [95]. Die Tubuline der Zellen sind mittels Antikörperfärbung mit Atto647N gefärbt und die Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Anschließend wurde die Probe ähnlich wie in Abschnitt 6.1.1 beschrieben expandiert (das entsprechende Protokoll findet sich in [96]). Es wurden jeweils 20 Bildstapel mit Gaußbeleuchtung und 12 Bildstapel mit Airybeleuchtung mit den

Anregungswellenlängen $\lambda_{Ex} = 638 \text{ nm}$ und $\lambda_{Ex} = 405 \text{ nm}$ aufgenommen. Die weitere Datenverarbeitung wurde äquivalent zu Abschnitt 6.2.1 durchgeführt.

Auf die Airystrahl-beleuchteten Bilder der HeLa Zellen wird zum einen das mit den Maushirn-Proben trainierte Modell angewendet. Zum Vergleich wurde ein Modell mit einem Bildstapel trainiert, welcher in Abbildung 6.9(a) dargestellt ist. Dieser wurde innerhalb der gleichen Probe aufgenommen und das entsprechende Modell wurde somit spezifisch für HeLa Zellen trainiert. In Tabelle 6.4 sind die Evaluierungsmetriken zusammen gefasst. Es wird deutlich, dass auch das mit Maushirnschnitten trainierte Modell gute Ergebnisse liefert. Sowohl die strukturelle Ähnlichkeit als auch der Kontrast konnten gesteigert werden. Dies zeigt sich auch in den Bildern in Abbildung 6.9. Die Ergebnisse können allerdings durch die Anwendung des spezifisch trainierten Modells deutlich verbessert werden. Dieses Ergebnis ist zu erwarten, da das spezialisierte Modell bereits Daten kennt, welche ähnlich zu den analysierten Bildern sind. Um ein adäquat generalisierendes Modell zu erhalten, wäre daher ein Trainingsdatensatz erforderlich, der eine Vielzahl unterschiedlicher Proben und Strukturen umfasst. Eine weitere Diskussion hierzu findet sich in Kapitel 7.

	Gauß	Airy	RL	DLD MB Training	DLD Zellen Training
MSE	0	175 ± 8	133 ± 10	142 ± 7	67 ± 3
SSIM	1	$0,32 \pm 0,4$	$0,33 \pm 0,2$	$0,43 \pm 0,2$	$0,75 \pm 0,4$
Kontrast	53 ± 7	14 ± 1	31 ± 2	43 ± 1	44 ± 3

Tabelle 6.4: Evaluation der Ergebnisse der Richardson-Lucy Dekonvolution (RL) und der Deep Learning Dekonvolution (DLD) für Modelle mit unterschiedlichen Trainingsdaten.

6.4.2 Anwendung auf weitere Bildgebungsmodalitäten

Als zweiten Spezialfall wird untersucht, inwiefern sich die Deep Learning Dekonvolution auf weitere Bildgebungsmodalitäten anwenden lässt. Der bisher analysierte Fall eines Lichtscheibenmikroskops mit Airy- und Gaußbeleuchtung ist nur eine Möglichkeit, wo eine Deep Learning-basierte Dekonvolution zur Verbesserung der Daten beitragen kann. Im Folgenden werden Daten untersucht, welche nur mit Gaußbeleuchtung, dafür aber mit unterschiedlichen Objektiven aufgenommen wurden. Die Deep Learning Dekonvolution wird nach erfolgreichem Training auf Daten angewendet, welche mit einem Objektiv mit niedriger numerischer Apertur aufgenommen wurden.

Dafür werden Bilder von synthetisierten hirnähnlichen Nervenzellen, sogenannten Hirnorganoiden ausgewertet. Die Daten wurden von Juan Eduardo Rodriguez-Gatica aufgenommen und zur Verfügung gestellt. Weitere Informationen zur Aufnahme sowie Details zur Probenpräparation finden sich in [91].

Die Proben beinhalten eine Antikörper-Färbung gegen ZO1 sowie eine Hoechst-Zellkernfärbung und wurden mit einem klassischen Lichtscheibenmikroskop mit Gaußstrahlbeleuchtung aufgenommen. Für unterschiedliche Sichtfelder und Auflösungen wurden unterschiedliche Objektive verwendet. Die hochaufgelösten Daten wurden mit einer Vergrößerung von $M = 37,5$ und einer numerischen Apertur von $NA = 1,1$ aufgenommen. Die Pixelgröße beträgt somit $173 \times 173 \text{ nm}^2$, die Schrittgröße wurde auf $\Delta z = 300 \text{ nm}$ gesetzt. Diese Daten mit hoher Auflösung wurden als Referenzdaten für das Training

der Deep Learning Dekonvolution verwendet. Die niedriger aufgelösten Daten, auf welche die Deep Learning Dekonvolution angewendet wird, wurden mit einem Objektiv mit $M = 10$, $NA = 0,3$ aufgenommen, woraus eine Pixelgröße von $650 \times 650 \text{ nm}^2$ resultiert. Die Schrittweite wurde hier auf $\Delta z = 800 \text{ nm}$ gesetzt.

Da hier nicht nur in lateraler sondern auch in axialer Richtung unterschiedliche Pixel bzw. Voxelgrößen vorliegen, wird das bikubische hochskalieren in 3D durchgeführt. In x/y -Richtung wird dabei ein Skalierungsfaktor von 3,7 angewendet, in z -Richtung ein Faktor von 2,6. Die weitere Verarbeitung wurde äquivalent zu Abschnitt 6.2.1 durchgeführt. Da keine Messungen von Mikropartikeln vorlagen, wurde die Richardson-Lucy Dekonvolution mit einer simulierten PSF anhand der optischen Parameter numerische Apertur, Wellenlänge und Brechungsindex mit dem Wolf & Born Modell simuliert. Das Ergebnis ist in Abbildung 6.10 dargestellt und in Tabelle 6.5 zusammengefasst.

Wie schon bei den Maushirnproben zeigt sich hier der Vorteil der Deep Learning Dekonvolution. Die Abweichung zu den hochaufgelösten Daten konnte verringert und die strukturelle Ähnlichkeit und der Kontrast erhöht werden. Auch im Vergleich zur Richardson-Lucy Dekonvolution ergibt sich mit der Deep Learning Dekonvolution eine Verbesserung. Dieser Unterschied ist auch in den Bildern in Abbildung 6.10 sichtbar: Die Deep Learning Dekonvolution erreicht, wie auch die Richardson-Lucy Dekonvolution, einen verbesserten Bildkontrast und eine klar erkennbare Struktur des Organoids.

	$M = 37,5, NA = 1,1$	$M = 10, NA = 0,3$	RL	DLD
MSE	0	$11,5 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,8$	$2,5 \pm 0,3$
SSIM	1	$0,78 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,03$	$0,97 \pm 0,06$
Kontrast	97 ± 3	32 ± 2	74 ± 4	90 ± 4

Tabelle 6.5: Evaluation der Ergebnisse der Deep Learning Dekonvolution (DLD) für Aufnahmen eines Gauß-Lichtscheibenmikroskops mit unterschiedlichen Objektiven und Vergrößerungen.

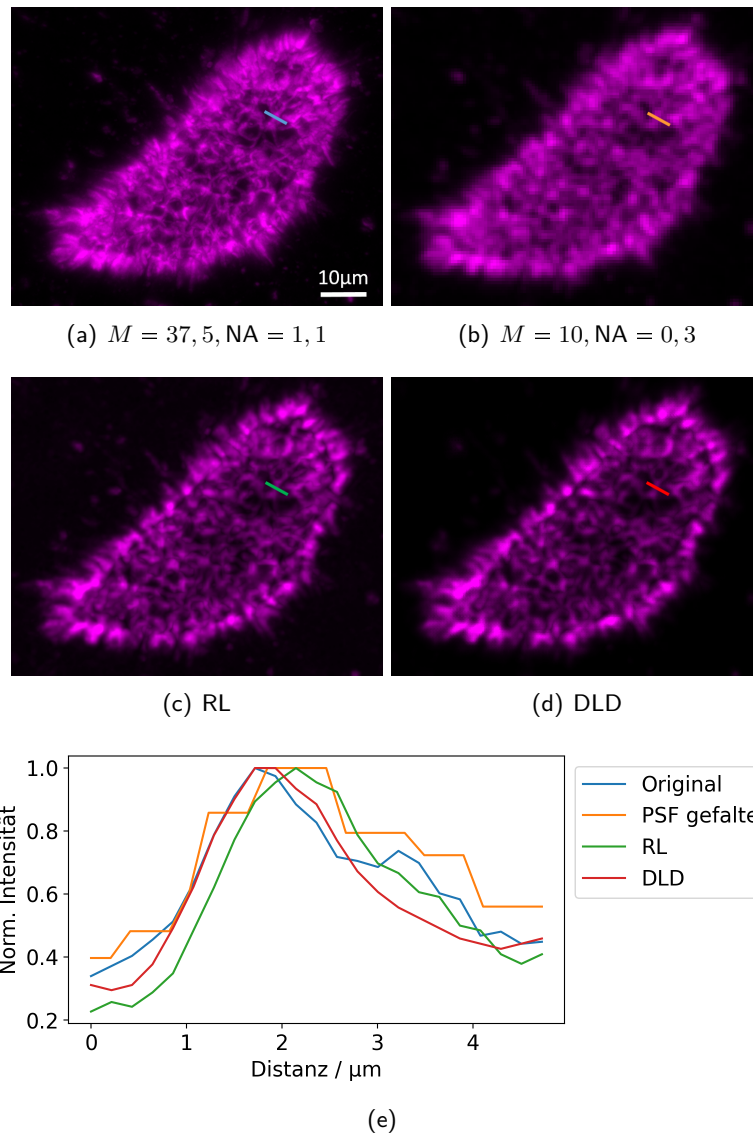


Abbildung 6.10: (a,b) Aufnahmen eines Hirnorganoids (MIPs, Antikörperfärbung gegen ZO1) mit unterschiedlichen Objektiven und Vergrößerungsfaktoren. Sowohl die Richardson-Lucy Dekonvolution (c) als auch die Deep Learning Dekonvolution (d) zeigen eine Verbesserung der Bildqualität gegenüber den Daten, welche mit geringer Vergrößerung und NA aufgenommen wurden.

Kapitel 7

Diskussion

In der Mikroskopie ist es eine Herausforderung, große Proben abzubilden und gleichzeitig eine hohe räumliche Auflösung zu erreichen. Von besonderem Interesse ist gegenwärtig die Visualisierung von Nervenverbindungen und -strukturen in Gehirnen mit der Auflösung von neuronalen Dendriten. Die langen Bildgebungszeiten, die für diese größeren Probenvolumina erforderlich sind, führen jedoch zu Verzögerungen im Arbeitsablauf und können auch zu verzerrten oder verschlechterten Ergebnissen führen, insbesondere bei empfindlichen Proben. In dieser Arbeit wurde die Bildqualität von Mikroskopiebildern sowie die Bildgebungsgeschwindigkeit durch die Kombination von Airystrahl-Lichtscheibenmikroskopie und Deep Learning Dekonvolution erhöht.

Durch die Verwendung eines Airystrahls zur Anregung im Lichtscheibenmikroskop, welcher im Gegensatz zum Gaußstrahl eine geringe Divergenz aufweist, wird zwar ein großes Sichtfeld ermöglicht, jedoch entstehen auch Einschränkungen hinsichtlich Bildkontrast und Auflösung aufgrund der Nebenmaxima und der geringeren Gesamtvergrößerung im Mikroskop. Klassischerweise wird hier eine Dekonvolution zur Verbesserung von Bilddaten durchgeführt. Diese erfordert in der Regel Kenntnisse über die PSF des abbildenden Systems. Mit Hilfe von Deep Learning wurde eine Dekonvolutionsmethode entwickelt, die keine Informationen über die PSF oder andere Bildgebungseigenschaften erfordert. Diese Verbindung der Methoden bietet eine ideale Möglichkeit, die für die Verarbeitung von Airystrahl-beleuchteten Bildern notwendige Dekonvolution zu vereinfachen und zu verbessern.

Der Fokus dieser Arbeit wurde auf die Simulation des Strahlprofils sowie der erreichbaren Auflösung, den Aufbau und die Charakterisierung des Mikroskops sowie die Implementierung und Evaluation der Deep Learning Dekonvolution gelegt. Dieses Kapitel fasst die erzielten Ergebnisse und Erkenntnisse zusammen. Es wird untersucht, welche Ziele mit den beschriebenen Methoden erreicht wurden, wie sie sich in den Kontext der aktuellen Forschung einfügen und welche Anwendungsbereiche die Ergebnisse bieten. Darüber hinaus werden Grenzen und mögliche Weiterentwicklungen diskutiert, um einen Ausblick auf zukünftige Forschungspotentiale zu geben.

7.1 Simulation

Im ersten Teil der Simulation wurde das Strahlprofil des Airystrahls simuliert, um die Geometrie und die Parameter zur Erzeugung des Strahls zu verstehen. Mit Hilfe dieses

Programms wurde das Phasenmuster generiert, welches für die Erzeugung des Airystrahls verwendet wird. Für eine realistische Simulation fließen dabei optische Parameter wie numerische Apertur, Wellenlänge und Strahlvergrößerungsfaktor mit ein. Mit Hilfe des entstehenden dreidimensionalen Intensitätsprofils konnte so ein Eindruck über die Lage des Strahls im Raum gewonnen und die Bedingungen für den Strahl im Mikroskop ausgetestet werden.

Die Orientierung des Airystrahls wurde so gewählt, dass die Nebenmaxima genau parallel und senkrecht zur fokalen Ebene orientiert sind. Bei einer starken Krümmung des Strahls läuft dieser dabei schräg durch die Fokusebene. Die Strahlparameter wurden allerdings so angepasst, dass die Krümmung sehr gering ist und der Strahl innerhalb der Fokusebene bleibt. Das entstehende Lichtblatt ist auf diese Weise flach genug, um die Ebene gleichmäßig zu beleuchten. Alternativ ist es möglich, den Strahl so zu drehen, dass die Nebenmaxima im 45° Winkel zur Fokusebene ausgerichtet sind [97, 98]. Die Krümmung des Strahls liegt dann parallel zur Ebene, was sinnvoll ist, wenn ein sehr dünner Strahl verwendet werden soll, welcher eine starke Krümmung aufweist. Allerdings resultiert aus dieser Strahlorientierung eine stärkere Außer-Fokus Anregung durch die Nebenmaxima, was den Bildkontrast zusätzlich beeinflusst.

Im zweiten Teil der Simulation wurde die Auflösung des Mikroskops bestimmt. Dafür wurde im ersten Schritt die PSF Simulation von Wolf & Born verwendet [54]. Dieses Modell gilt als Referenzmodell für Öffnungswinkel bis ca. 60° und für eine ideale Mikroskop-Konstruktion unter konstantem Brechungsindex und ist somit hier eine Näherung [52, 99]. Unter Berücksichtigung verschiedener Ansätze und physikalischer Bedingungen wurden weitere Modelle für eine exakte PSF-Simulation entwickelt. Die Methode nach Gibson & Lanni berücksichtigt einen variierenden Brechungsindex zwischen den Abbildungsschichten und kann daher unsymmetrische PSFs berechnen. Die Methode wird allerdings besonders für hohe numerische Aperturen ungenau [53]. Die Richards & Wolf Methode gilt als Generalisierung der Wolf & Born Methode, ist allerdings vergleichsweise sehr rechenaufwendig [100]. Alle Methoden haben gemeinsam, dass nicht alle Aberrationen, besonders die unbekannter Quelle, berücksichtigt werden und daher die experimentell gemessene PSF meist deutlich von den theoretischen Modellen abweicht [52, 101]. Daher wurde für die Richardson-Lucy Dekonvolution die PSF experimentell bestimmt, was zu genaueren Ergebnissen führt.

Neben der optischen Auflösung muss auch die Kameraauflösung in die Betrachtung mit einbezogen werden. Diese wird maßgeblich durch die Pixelgröße der Kamera und die Mikroskopvergrößerung beeinflusst. Die Objektpixelgröße und somit die räumliche Abtastrate sind zu groß, um die theoretisch erreichbare Auflösung zu realisieren [56]. Dadurch wird sowohl die laterale als auch die axiale Auflösung verringert. Auch die Simulation der Kameraauflösung ist eine Abschätzung, da Faktoren wie Signal-zu-Rausch-Verhältnis und Quanteneffizienz die messbare Auflösung beeinflussen [102, 103].

Darüber hinaus wurde die Richardson-Lucy Dekonvolution eingeführt. Diese bildet die wichtigste Vergleichsmethode zur Auswertung der Deep Learning Dekonvolution. Neben der Richardson-Lucy Dekonvolution existieren zahlreiche weitere Ansätze mit unterschiedlichen Schwerpunkten und Anforderungen an die Rechenleistung. Eine gute Übersicht über unterschiedliche Dekonvolutionsmethoden kann in [15] gefunden werden. Die Richardson-Lucy Dekonvolution zählt dabei zu den statistisch-iterativen Verfahren mit der Annahme Poisson-verteilten Rauschens. Diese Methode ist zwar komplexer und re-

chenintensiver als andere lineare und nichtlineare Methoden. Sie liefert dafür Ergebnisse mit einem geringen Artefakt-Anteil und benötigt wenige Regularisierungsparameter [15, 104].

7.2 Mikroskopie

Das aufgebaute Lichtscheibenmikroskop umfasst zwei Anregungsstrahlengänge. Die Gaußstrahlanregung wurde zur Aufnahme von Trainingsdaten für die Deep Learning Dekonvolution verwendet. Da hierfür der gleiche Bereich einer Probe mit Gauß- und Airystrahlbeleuchtung aufgenommen werden muss, wurde der Wechsel zwischen den Modi so einfach wie möglich gestaltet. Lediglich die Ansteuerung der Galvo-Spiegel muss auf den entsprechenden Scanspiegel umgestellt werden. Der Wechsel geschieht also, ohne dass optische Elemente neu positioniert werden oder eine neue Strahljustage durchgeführt werden muss. Durch den Erhalt des Gaußstrahls können außerdem beide Anregungsmethoden direkt und unter gleichen Bedingungen verglichen werden.

Der Aufbau bietet in seiner Form eine Reihe von Vorteilen, welche die Abbildung großer Proben vereinfacht: Die simultane Aufnahme zweier Farbkanäle erfolgt mit zwei Kameras und einem Strahlteiler im Detektionspfad. Die Probe kann lateral und axial bewegt werden, sodass eine Mosaikaufnahme ermöglicht wird, und mit Hilfe der LabView Software lassen sich alle Bildgebungsparameter wie Belichtungszeit, Schrittweite und abzubildender Bereich einstellen und variieren. Die Erzeugung des Airystrahls mit dem SLM ist im Gegensatz zur Erzeugung mittels Phasenplatte [105] deutlich flexibler und so kann die Phase und das entstehende Strahlprofil an Wellenlänge und Sichtfeld angepasst werden. Zusätzlich ist die Justage des Mikroskops sehr stabil, sodass Proben über einen längeren Zeitraum gemessen werden können.

Es gibt weitere Möglichkeiten, den Aufbau des Mikroskops zu erweitern oder den Bildgebungsprozess zu automatisieren. Zur Erleichterung der Bedienung könnten ein Autofokus [106] und ein Filtrerrad zum automatischen Filterwechsel implementiert werden. Eine Vergrößerung des Sichtfeldes ohne Einschränkung der Mikroskopvergrößerung wäre durch die Verwendung eines größeren Kamerasensors möglich. Alternativ zum Vergrößerungswechsler könnten unterschiedliche Vergrößerungen durch einen drehbaren Objektivreolwer und ein anderes Objektiv realisiert werden. Es ist jedoch zu beachten, dass der Platz im Aufbau begrenzt ist.

Zur Beobachtung des Strahlprofils wurde die Probenkammer mit einer Fluorescein-Lösung befüllt. Auf diese Weise lässt sich zwar das Profil direkt betrachten, allerdings wirkt es durch die Beleuchtung außerhalb der fokalen Ebene verbreitert. Um den Strahlradius des Gaußstrahls zu bestimmen, wurde daher die Knife-Edge Methode verwendet. Es wurden Strahlradien von $(5,0 \pm 0,1) \mu\text{m}$ und $(9,7 \pm 0,2) \mu\text{m}$ gemessen, wobei der Strahl mit dem kleinen Strahlradius ein Sichtfeld von nur $(220 \mu\text{m})^2$ homogen beleuchten kann. Um für den Airystrahl einen quantitativen Vergleich zur Simulation zu erhalten, wurde der Abstand zwischen Hauptmaximum und dem ersten Nebenmaximum des Strahls verglichen. Hier ergab sich eine gute Übereinstimmung mit der Simulation. Mit dem erzeugten Airystrahl ist es möglich, ein großes Sichtfeld von $(660 \mu\text{m})^2$ gleichmäßig zu beleuchten.

Die Auflösung des Mikroskops wurde mit fluoreszenten Mikropartikeln für Gauß- und

Airystrahlbeleuchtung gemessen und dabei die unterschiedlichen Vergrößerungen von $M = 40$ und $M = 20$ verwendet. Die Auswertung erfolgte automatisch mit Hilfe eines Python-Programms, welches über mehrere Profile mittelt, um einen zuverlässigen Wert für die Auflösung zu erhalten. Die erhaltenen Ergebnisse für die Auflösung ergeben jeweils leicht erhöhte Werte im Vergleich zur Simulation. Diese Abweichung zur Simulation war zu erwarten, da zum einen der unterschiedliche Brechungsindex von Agarose und Wasser vernachlässigt wurde, was besonders in axialer Richtung zu einer Abweichung führt [107, 108]. Zum anderen treten im Strahlengang Aberrationen auf, welche zu einer Verbreiterung der PSF führen. Besonders zum Rand des Sichtfeldes sind diese relevant [109]. Eine Möglichkeit, um den Einfluss räumlich variierender PSFs auf die Bildqualität zu minimieren sind ortsabhängige Dekonvolutionen, welche zwar Abbildungsfehler genauer korrigieren, aber sehr komplex sind und exakte PSF Messungen unter definierten Bedingungen benötigen [12, 110].

Die erreichten Auflösungswerte ermöglichen die Abbildung kleiner neuronaler Strukturen, es gibt allerdings zusätzlich unterschiedliche Möglichkeiten, die Auflösung des Mikroskops zu verbessern. Um die Kameraauflösung zu erhöhen, ist es möglich, eine Kamera mit geringerer Pixelgröße zu verwenden. Hier ist allerdings zu beachten, dass sich die Photonenkapazität und somit der Dynamikbereich bei kleineren Pixeln reduziert [111]. Um die optische Auflösung zu verbessern, kann ein Objektiv mit höherer numerischer Apertur verwendet werden, was allerdings meist mit einer höheren Gesamtvergrößerung und somit mit einem kleineren Sichtfeld verbunden ist. Alternativ kann der Durchmesser des Anregungsstrahls verringert werden. Eine deutliche Verbesserung der axialen Auflösung ist allerdings hier auch nur zu erreichen, wenn der Strahl schmäler als die Höhe der fokalen Ebene ist, also kleiner als $1\ \mu\text{m}$. Das würde eine Rayleighlänge von nur $8\ \mu\text{m}$ ergeben, wodurch der homogen beleuchtete Bereich wiederum deutlich verringert wird. Um diesen Kompromiss zu umgehen, wurden in den vergangenen Jahren neben dem Airystrahl auch Besselstrahlen zur Sichtfeldvergrößerung eingesetzt [112]. Allerdings sind diese weniger propagationsinvariant als der Airystrahl und weisen stärkere Nebenmaxima auf [10]. Zusätzlich wurden Methoden entwickelt, Gaußstrahlen mit geringer Rayleighlänge nutzen zu können. Dafür können zwei entgegengesetzte Gaußstrahlen verwendet oder der Strahl axial translatiert werden [113]. In Kombination mit einer konfokalen Detektion kann so auch mit einem Gaußstrahl mit geringer Rayleighlänge ein großes Feld gleichmäßig beleuchtet werden [114].

Der Kontrast wurde ebenfalls mit Bildstapeln fluoreszenter Mikropartikel bestimmt. Dabei wurde eine erhöhte Konzentration verwendet, sodass Signal von außerhalb der fokalen Ebene zum Gesamtsignal beiträgt, so wie es bei einer biologischen Probe der Fall ist. Der beste Kontrast ergibt sich, wie zu erwarten, mit dem Gaußstrahl mit kleinem Radius, während der breitere Gaußstrahl durch die hohe Intensität außerhalb der fokalen Ebene zu einem sehr niedrigen Kontrast führt. Auch durch die Nebenmaxima des Airystrahls wird der Kontrast beeinträchtigt, was eine Dekonvolution sinnvoll und notwendig macht. Alternativ kann zur Verminderung des Einflusses der Nebenmaxima der Airystrahl für eine Zwei-Photonen-Anregung verwendet werden [97]. Dabei hängt die Anregung vom Quadrat der Lichtintensität ab, sodass die Nebenmaxima weniger zum Fluoreszenzsignal beitragen. Allerdings wird für Zwei-Photonen-Mikroskopie ein teurer gepulster Laser verwendet und teilweise werden spezielle Fluorophore benötigt, was wiederum zu anderen Limitierungen führt.

In dieser Arbeit wurde als Maß für den Kontrast die Definition nach Weber verwen-

det. Diese bietet den Vorteil, dass sie schnell und einfach zu berechnen ist und sich besonders bei einer klaren Unterscheidung von Signal und Hintergrund eignet, wie es bei Fluoreszenzmikroskopiebildern der Fall ist. Außerdem spiegelt der Weber-Kontrast, im Gegensatz zur ebenfalls häufig verwendeten Definition von Michaelson, die wahrgenommene Kontrastempfindlichkeit gut wider, sodass dieser als gutes Maß für die visuell erfasste Qualität der Bilder dient [115, 116].

7.3 Deep Learning Dekonvolution

Die Deep Learning Dekonvolution wurde basierend auf einem Pix2Pix GAN konzipiert mit dem Ziel, eine Dekonvolution dreidimensionaler Daten, aufgenommen mit dem Airystrahl-Lichtscheibenmikroskop, ohne Kenntnis der PSF durchzuführen. Die Aufnahmen mit Gaußstrahlbeleuchtung dienten dabei sowohl als Trainingsdaten als auch als Referenzbilder für die Evaluation der Dekonvolution.

Es wurden insgesamt drei Proben von Mausgehirnen aufgenommen und analysiert. Die Bilder, welche mit Airystrahlbeleuchtung aufgenommen wurden, wurden im ersten Schritt bikubisch hochskaliert. Auch für die Hochskalierung existieren effektive Deep Learning Ansätze [11], da aber die Daten im Anschluss durch das Pix2Pix GAN optimiert werden, würde ein Hochskalieren mittels Deep Learning zu zusätzlichem Aufwand führen.

Alle Bildstapel wurden anschließend zusammengefügt. Für eine weitere Automatisierung und Vereinheitlichung der Bildverarbeitung könnte dieser Schritt in Zukunft auch in Python bzw. in die graphische Benutzeroberfläche implementiert werden, so dass in der Verarbeitung nur noch lizenzfreie Software zum Einsatz käme.

Für die Trainingsdaten wurden anschließend passende Bereiche beider Farbkanäle herausgestellt und eine Registrierung zur Überlagerung von Gauß- und Airystrahl Daten durchgeführt. Diese Registrierung beinhaltet lediglich eine Translation zwischen den Bildstapeln, keine Rotation, welche zwar eine noch genauere Überlagerung ermöglichen würde, allerdings wäre dieser Prozess rechen- und zeitaufwändiger.

Die Verwendung eines Pix2Pix GANs zur Dekonvolution bietet unterschiedliche Vorteile für die Bild-zu-Bild Übersetzung: Diese Struktur ist vergleichsweise einfach zu trainieren, denn sie erfordert keine komplexe Anpassung von Hyperparametern, besonders hohe Rechenleistung oder eine komplizierte Architektur. Ein Pix2Pix GAN ist allgemein sehr flexibel, wodurch auch die Aufwertung des Hochskalierens mit der Dekonvolution verbunden werden kann, und es besitzt eine gute Generalisierungsfähigkeit, sodass auch mit begrenzten Datensätzen effektiv trainiert werden kann [76, 117].

Das Training des GANs wird in zwei Schritten für unterschiedliche Orientierungen der Daten durchgeführt, sodass alle Informationen der drei Bilddimensionen in den Trainingsprozess mit einbezogen werden. Alternativ ist es möglich, direkt mit 3D Daten zu arbeiten, wie es für Vox2Vox Netzwerke durchgeführt wird. Diese werden bisher hauptsächlich für die Segmentierung von MRT-Aufnahmen von Gehirntumoren angewendet [118]. Die Verarbeitung von 3D Matrizen führt allerdings durch einen hohen Bedarf an Rechenressourcen und Speicherplatz so zu einem deutlich längeren Trainingsprozess. Zusätzlich ist es besonders komplex, Artefakt-freie und konsistente Volumen zu generieren, sodass die Ergebnisse weniger zuverlässig sind.

Zur Auswertung der Performance wurden zwei Bildqualitätsmetriken analysiert: Mit dem

MSE wurde die direkte Abweichung zu den Gauß-Daten betrachtet, mit dem SSIM die strukturelle Ähnlichkeit verglichen. Zusätzlich wurde jeweils der Weber-Kontrast bestimmt, um die Kontrastverbesserung zu verifizieren. Für verschiedene Fälle konnte gezeigt werden, dass die Deep Learning Dekonvolution zu einer Kontrastverbesserung führt und auch im Vergleich zur Richardson-Lucy Dekonvolution den Unterschied zu den hochaufgelösten Bildern verringern und die strukturelle Ähnlichkeit verbessern konnte. Diese Verbesserung konnte sowohl für den simulierten Fall als auch für die gemessenen Maushirnproben gezeigt werden. Zusätzlich wurden Intensitätsprofile von Dendriten untersucht. Die Breite dieser Profile wurde durch die Anwendung der Deep Learning Dekonvolution verringert, was auf eine Auflösungsverbesserung hindeutet.

Zusätzlich wurden zwei Spezialfälle untersucht. Zum einen wurde analysiert, welche Ergebnisse die Deep Learning Dekonvolution für andere Strukturen liefert. Dafür wurden HeLa Zellen abgebildet und die Ergebnisse für unterschiedliche Trainingsszenarien ausgewertet. Für ein optimales Training sollten die Strukturen den Trainingsdaten ähnlich sein, allerdings verbesserte auch das mit Maushirn-Bildern trainierte Modell den Kontrast und das Ergebnis der Richardson-Lucy Dekonvolution konnte für beide Modelle übertroffen werden.

Für den zweiten Spezialfall wurden Daten eines anderen Mikroskops analysiert. Die Bilder wurden jeweils mit Gaußstrahlbeleuchtung mit unterschiedlichen Objektiven aufgenommen. Für diese Daten ist es notwendig ein neues Modell zu trainieren, da das vorher verwendete Modell wurde nur spezifisch für die Airy-Gaußstrahlkombination trainiert wurde. Ein neu trainiertes Modell bringt eine deutliche Qualitätsverbesserung der Daten, welche mit niedriger numerischer Apertur aufgenommen wurden. Dementsprechend ist es möglich, die Deep Learning Dekonvolution mit diversen Bildgebungsmodalitäten zu trainieren und anzuwenden. Hierfür könnten beispielsweise Daten aus hochauflösenden Verfahren wie *Structural Illumination Microscopy* (SIM) oder konfokaler Mikroskopie verwendet werden, um ein Modell zur Verbesserung von Weitfeldmikroskopiedaten zu trainieren.

Die Analyse der Verarbeitungsgeschwindigkeit ist besonders für die Messung hochauflösender Bilder bei großen Probenvolumina entscheidend. Der Airystrahl wird für eine Sichtfeldvergrößerung im Mikroskop eingesetzt, was zu einer geringeren Bildaufnahmezeit pro Volumen führt. Die Nachbearbeitung durch Dekonvolution benötigt aber, abhängig von Datenmenge und Methode, zusätzliche Zeit. Die Kombination aus Airystrahlbeleuchtung und Deep Learning Dekonvolution ist der Richardson-Lucy-Dekonvolution deutlich überlegen. Auch im Vergleich zur Abbildung mit Gaußstrahlbeleuchtung ist die Kombination aus Airy-Beleuchtung und Deep Learning Dekonvolution um den Faktor drei schneller.

Das Training der Modelle benötigte jeweils 2-3 Tage, was aber im Idealfall nur einmal durchgeführt werden muss. Das trainierte Modell kann dann auf alle weiteren Daten angewendet werden. Hier ist zu betonen, dass Eigenschaften der Grafikkarte wie Taktrate und Speicherbandbreite die Geschwindigkeit der Prozesse beeinflussen. Es ist also eine gute Hardware notwendig, um das Training entsprechend schnell durchführen zu können.

Deep Learning hat in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie gebracht. Auch im Bereich der Dekonvolution existieren einige Ansätze diese zu vereinfachen und optimieren. Die meisten Methoden konzentrieren sich dabei auf die Verbesserung von PSF Abschätzungen, beispielsweise um die Bestimmung

räumlich variierender PSFs zu optimieren. Die ermittelte PSF wird dann für die Durchführung einer konventionellen Dekonvolution verwendet [19, 119, 120]. Im Bereich der Blind-Dekonvolution wird versucht die PSF aus bereits konvolvierten Bildern mit Hilfe von neuronalen Netzen zu bestimmen [121, 122]. All diese Ansätze haben gemeinsam, dass physikalische Bildgebungsparameter oder synthetisch generierte PSF-Modelle in die Algorithmen mit einfließen [104, 123]. Die in dieser Arbeit entwickelte Dekonvolution hingegen ist rein Bilddaten-basiert, sodass weder die PSF, noch Abbildungsbedingungen des Systems bekannt sein müssen. Gleichzeitig wird eine vergleichsweise geringe Menge an Trainingsdaten benötigt und die Verarbeitung von 3D-Bilddaten wurde realisiert.

Neben den bereits getesteten und analysierten Anwendungen bietet die Deep Learning Dekonvolution verschiedene Chancen zur Weiterentwicklung und Verbesserung. Diese sowie einige Grenzen des Algorithmus werden im Folgenden erläutert.

Auch wenn mit Deep Learning oft menschliche Leistung und klassische prinzipienbasierte Algorithmen übertroffen werden, gibt es immer noch Herausforderungen und Einschränkungen. Eine mögliche, häufig problematische Fehlfunktion beim Training neuronaler Netze ist die Überanpassung. Dabei lernt das Netzwerk nicht die vorgesehene Transformation, sondern lernt, wie genau die Trainingsdaten aussehen und kann nicht auf ungesehene Daten verallgemeinern [19]. Durch eine Anpassung der Netzparameter und architektonische Merkmale wie *Dropout* wurde dieser Fall für die Deep Learning Dekonvolution zwar minimiert, trotzdem ist das trainierte Modell bisher auf eine kleine Menge von Strukturen beschränkt.

Wünschenswert wäre ein generalisiertes Modell, welches sich auf eine große Variation von Daten unterschiedlicher Proben und Bildgebungsbedingungen anwenden lässt. Für ein solches Modell müsste eine große Menge an repräsentativen Trainingsdaten produziert werden, um die gesamte Bandbreite der potentiellen Variationen abzudecken. Mikroskopiedaten weisen eine hohe Varianz an experimentellen Faktoren auf, die eine vollständige und standardisierte Datenerhebung erschwert. Hier bietet sich zum einen die sogenannte Datenerweiterung an [124]. Bei dieser Methode werden Trainingsdaten künstlich erzeugt, sodass diese zu einer größeren Trainingsdatenmenge beitragen können. Zusätzlich kann Transfer Learning angewendet werden. Dafür wird ein existierendes, bereits trainiertes Modell mit neuen Trainingsdaten weiterentwickelt und verfeinert [125].

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Reproduzierbarkeit und Verfügbarkeit der entwickelten Modelle. Deep Learning Algorithmen und die dazugehörigen Programme sind in ihrer Struktur sehr komplex. Zur vereinfachten Anwendung wurde in dieser Arbeit eine graphische Benutzeroberfläche implementiert und auf GitHub zur freien Verfügbarkeit hochgeladen [126]. Trotzdem ist die Anwendung weder intuitiv noch systemübergreifend. Projekte zur Demokratisierung von Bildverbesserungs- und Deep Learning Modellen wie BioImage Model Zoo [127] oder DeconLab2 [14] setzen sich zum Ziel, eine benutzerfreundliche Schnittstelle zur Analyse von Daten zu schaffen. Die Aufbereitung der Deep Learning Dekonvolution für die Anwendung auf dieser Art von Plattform ist ein wichtiges Ziel zur Verbesserung der Nutzung und Zugänglichkeit in der Zukunft.

7.4 Fazit

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Airystrahl-Lichtscheibenmikroskops, welches in Verbindung mit einer Deep Learning Dekonvolution zur schnelleren und vereinfachten Aufnahme großer Proben mit hoher Auflösung beiträgt. Die Strahl- und Ab-

bildungseigenschaften wurden simuliert und in einem Lichtscheibenmikroskop mit kombinierter Gauß- und Airystrahlbeleuchtung umgesetzt. Der Airystrahl bietet eine Lösung für den Kompromiss zwischen optischer Schnittdicke und Sichtfeld.

Die mit Airystrahlbeleuchtung aufgenommenen Bilder wurden mittels der Deep Learning Dekonvolution auf Basis eines Pix2Pix GANs verbessert. Dazu waren keine Kenntnisse über die PSF oder sonstige physikalische Bildgebungsparameter notwendig. Sowohl die Qualitätsverbesserung im Vergleich zur klassischen Richardson-Lucy Dekonvolution als auch die verringerte Mess- und Verarbeitungszeit konnten charakterisiert und verifiziert werden.

Die Deep Learning Dekonvolution ist vielseitig einsetzbar, beispielsweise auf weitere Bildgebungsmodalitäten, und bietet somit ein großes Potential zur Weiterentwicklung, Generalisierung und Anwendung an der Schnittstelle von bildgebenden Verfahren und Bildverarbeitung. Diese Arbeit leistet somit einen wichtigen Beitrag zur Aufnahme großer Volumina in kurzer Zeit und hoher Auflösung.

Anhang

A1 Liste der verwendeten Bauteile und Geräte

1. Laser, 408 nm/120 mW, 488 nm/120 mW, 561 nm/100 mW, 638 nm/180 mW: Cobolt, Stockholm, Schweden
2. Lasercombiner: C-Flex, Cobolt, Stockholm, Schweden
3. Monomodefaser und Faserkoppler: kineFLEX, Qiotiq Photonics Ltd., South-Hampton, UK
4. Wellenplatte: RSP-1T in Rotationshalterung, Irvine, Kalifornien, USA
5. Strahlteiler: CCM1- WPBS254/M, Thorlabs, Newton, New Jersey, USA
6. Linsen (alle): Achromaten, 1 Zoll, Thorlabs, Newton, New Jersey, USA
7. Spiegel (alle): BB1-E02, Thorlabs, Newton, New Jersey, USA
8. Spatial Light Modulator: LCOS X13138-01, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan
9. Galvo-Spiegel einzeln: GVS211, Diameter: 10 mm, Thorlabs, Newton, New Jersey, USA
10. Galvo-Spiegel doppelt: GV202, Thorlabs, Newton, New Jersey, USA
11. Beleuchtungsobjektiv: M Plan Apo 10 $\times$ /NA0,28, Mitutoyo, Kawasaki, Japan
12. Motoren für Probenbewegung: M-112.1DG, Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland
13. Controller: C-884.4DC, Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland
14. Detektionsobjektiv: XLUMPLFLN20XW, 20 $\times$ NA1,0, WD= 2 mm, Olympus K.K., Tokio, Japan
15. Fokusblock: FB201, Prior Scientific Instruments, Cambridge, Vereinigtes Königreich
16. Tubus Linse: SWTLU-C, $f = 180$ mm, Olympus K.K., Tokio, Japan
17. Vergrößerungswechsler: U-CA, Olympus K.K., Tokio, Japan
18. Notchfilter: QuadLine Rejection Band, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland

19. 90 Grad Spiegel: CCM1-E02/M, Thorlabs, Newton, New Jersey, USA
20. Strahlteiler: W-VIEW Gemini-2C, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan
21. Kameras: ORCA-Flash 4.0 V3, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan
22. PCI Karte: Frame Grabber CameraLink, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan
23. DAQ: USB-6343, National Instruments, Austin, Texas, USA

A2 Technische Details für das Deep Learning Programm

A2.1 PC und Programmierungsumgebung

1. GPU: Nvidia Quadro RTX 5000
2. CPU: Intel(R) Xeon(R) Gold 6252 CPU @2,10 GHz, 35,75 MB Cache
3. RAM: 1 TB
4. Anaconda Navigator 2.3.2 (Anaconda. Inc)
5. Visual Studio Code: 1.58.2
6. Python: 3.9.6 64-bit

A2.2 Python Module

1. Tensorflow: 2.5.0
2. Pillow: 8.3.1
3. Scikit-image: 0.18.2
4. Scikit-learn: 0.24.2
5. Numpy: 1.20.3
6. TiffFile: 2021.7.30
7. Opencv: 4.5.3.56
8. Keras: 2.4.3
9. Scipy: 1.6.2
10. Matplotlib: 3.4.2
11. Cuda-toolkit: 11.3.1
12. Tkinter: 8.6
13. OS: 3.9
14. Shutil: 3.11
15. Keras: 2.4.3

Literatur

1. Rochow, T. G. & Tucker, P. A. in *Introduction to Microscopy by Means of Light, Electrons, X Rays, or Acoustics* (Hrsg. Rochow, T. G. & Tucker, P. A.) 1–21 (Springer US, Boston, MA, 1994).
2. Corsetti, S., Gunn-Moore, F. & Dholakia, K.
Light sheet fluorescence microscopy for neuroscience. *Journal of Neuroscience Methods. Methods and Models in Alzheimer's Disease Research* **319**, 16–27 (2019).
3. Werner, C., Sauer, M. & Geis, C. Super-resolving Microscopy in Neuroscience. *Chemical Reviews* **121**, 11971–12015 (2021).
4. Valli, J., Garcia-Burgos, A., Rooney, L. M., Vale de Melo e Oliveira, B., Duncan, R. R. & Rickman, C. Seeing beyond the limit: A guide to choosing the right super-resolution microscopy technique. *Journal of Biological Chemistry* **297**, 100791 (2021).
5. Prakash, K., Diederich, B., Heintzmann, R. & Schermelleh, L.
Super-resolution microscopy: a brief history and new avenues. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **380**. Publisher: Royal Society, 20210110 (2022).
6. Power, R. M. & Huiskens, J.
A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging. *Nature Methods* **14**, 360–373 (2017).
7. Huiskens, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J. & Stelzer, E. H. K.
Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. *Science* **305**. Publisher: American Association for the Advancement of Science, 1007–1009 (2004).
8. Keller, P. J. & Stelzer, E. H. Quantitative in vivo imaging of entire embryos with Digital Scanned Laser Light Sheet Fluorescence Microscopy. *Current Opinion in Neurobiology* **18**, 624–632 (2008).
9. Keller, P. J., Schmidt, A. D., Wittbrodt, J. & Stelzer, E. H. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *science* **322**, 1065–1069 (2008).
10. Vettenburg, T., Dalgarno, H. I. C., Nytk, J., Coll-Lladó, C., Ferrier, D. E. K., Čížmár, T., Gunn-Moore, F. J. & Dholakia, K.
Light-sheet microscopy using an Airy beam. *Nature Methods* **11**, 541–544 (2014).

11. Corsetti, S., Wijesinghe, P., Poulton, P. B., Sakata, S., Vyas, K., Simon Herrington, C., Nytk, J., Gasparoli, F. & Dholakia, K. Widefield light sheet microscopy using an Airy beam combined with deep-learning super-resolution. *OSA Continuum* **3**, 1068 (2020).
12. Qin, S. Image reconstruction for large FOV Airy beam light-sheet microscopy by a 3D deconvolution approach. *Optics Letters* **45**, 2804 (2020).
13. McNally, J. G., Karpova, T., Cooper, J. & Conchello, J. A. Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy. *Methods (San Diego, Calif.)* **19**, 373–385 (1999).
14. Sage, D., Donati, L., Soulez, F., Fortun, D., Schmit, G., Seitz, A., Guet, R., Vonesch, C. & Unser, M. DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods. Image Processing for Biologists* **115**, 28–41 (2017).
15. Sarder, P. & Nehorai, A. Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images. *IEEE Signal Processing Magazine* **23**, 32–45 (2006).
16. Stelzer, Ernst. Contrast, resolution, pixelation, dynamic range and signal-to-noise ratio: fundamental limits to resolution in fluorescence light microscopy. *Journal of Microscopy* **189**, 15–24 (1998).
17. Satish, P., Srikantaswamy, M. & Ramaswamy, N. K. A Comprehensive Review of Blind Deconvolution Techniques for Image Deblurring. *Traitement du Signal* **37**, 527–539 (2020).
18. Hatzinakos, D. in *Control and Dynamic Systems* (Hrsg. Leondes, C. T.) 279–331 (Academic Press, Cambridge, MA, USA, 1995).
19. Belthangady, C. & Royer, L. A. Applications, promises, and pitfalls of deep learning for fluorescence image reconstruction. *Nature Methods* **16**, 1215–1225 (2019).
20. Liu, Z., Jin, L., Chen, J., Fang, Q., Ablameyko, S., Yin, Z. & Xu, Y. A survey on applications of deep learning in microscopy image analysis. *Computers in Biology and Medicine* **134**, 104523 (2021).
21. Wang, H., Rivenson, Y., Jin, Y., Wei, Z., Gao, R., Günaydin, H., Bentolila, L. A., Kural, C. & Ozcan, A. Deep learning enables cross-modality super-resolution in fluorescence microscopy. *Nature Methods* **16**, 103–110 (2019).
22. Richardson, W. H. Bayesian-based iterative method of image restoration. *JoSA* **62**, 55–59 (1972).
23. Lucy, L. B. An iterative technique for the rectification of observed distributions. *The astronomical journal* **79**, 745 (1974).
24. Kubitscheck, U. *Fluorescence Microscopy* 2. Edition (Hrsg. Kubitscheck, U.) 25–30 (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Deutschland, 2017).
25. Murphy, D. B. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging* 2–4 (Wiley-Liss, Inc, New York, USA, 2001).

26. W.Dobrucki, J. & Kubitscheck, U. *Fluorescence Microscopy* 2. Edition (Hrsg. Kubitscheck, U.) 86–90 (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Deutschland, 2017).
27. Cox, G. *Optical Imaging Techniques in Cell Biology* 35–82 (Taylor & Francis, Oxfordshire, UK, 2006).
28. Shah, G., Weber, M. & Huiskens, J. *Light Sheet Microscopy* 2. Edition (Hrsg. Kubitscheck, U.) 243–244 (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Deutschland, 2017).
29. Huiskens, J. & Stainier, D. Y. R. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development (Cambridge, England)* **136**, 1963–1975 (2009).
30. Olarte, O. E., Andilla, J., Gualda, E. J. & Loza-Alvarez, P. Light-sheet microscopy: a tutorial. *Advances in Optics and Photonics* **10**, 111 (2018).
31. Maurer, C., Jesacher, A., Bernet, S. & Ritsch-Marte, M. What spatial light modulators can do for optical microscopy. *Laser & Photonics Reviews* **5**, 81–101 (2011).
32. *Principle | LCOS-SLM (optical phase modulator)*
<https://www.hamamatsu.com/eu/en/product/optical-components/lcos-slm/principle.html>. Datum: 11.11.22.
33. Rosales-Guzmán, C. & Forbes, A. How to Shape Light with Spatial Light Modulators. *How to Shape Light with Spatial Light Modulators* **SL30**. Publisher: SPIE, 1–59 (2017).
34. Chollet, F. *Deep learning with Python* 3–13 (Manning Publications Co., Shelter Island, NY, USA, 2018).
35. Chollet, F. *Deep Learning mit Python und Keras: Das Praxis-Handbuch vom Entwickler der Keras-Bibliothek* 19–80 (MITP-Verlags GmbH & Co. KG, Frechen, Deutschland, 2018).
36. Liang, J. *An Introduction to Deep Learning*
<https://towardsdatascience.com/an-introduction-to-deep-learning-af63448c122c>. Datum: 18.11.22.
37. Murtagh, F. Multilayer perceptrons for classification and regression. *Neurocomputing* **2**, 183–197 (1991).
38. Sanderson, G. *Neural networks*
<https://www.3blue1brown.com/topics/neural-networks>. Datum: 17.11.22.
39. Amari, S.-i. Backpropagation and stochastic gradient descent method. *Neurocomputing* **5**, 185–196 (1993).
40. Murphy, J. *An overview of convolutional neural network architectures for deep learning* Techn. Ber. (Microway Inc, Fall, Plymouth, USA, 2016), 1–22.
41. Lecun, Y., Bottou, L., Bengio, Y. & Haffner, P. Gradient-based learning applied to document recognition. *Proceedings of the IEEE* **86**. Conference Name: Proceedings of the IEEE, 2278–2324 (1998).

42. *Convolutional Neural Networks*
<https://www.ibm.com/cloud/learn/convolutional-neural-networks>.
 Datum: 01.12.22.
43. Goodfellow, I., Pouget-Abadie, J., Mirza, M., Xu, B., Warde-Farley, D., Ozair, S., Courville, A. & Bengio, Y. *Generative Adversarial Nets* in *Advances in Neural Information Processing Systems* **27** (Curran Associates, Inc., 2014), 2672–2680.
44. Brownlee, J. *Generative adversarial networks with python: deep learning generative models for image synthesis and image translation* (Machine Learning Mastery, 2019).
45. Hu, Y., Siviloglou, G. A., Zhang, P., Efremidis, N. K., Christodoulides, D. N. & Chen, Z. in *Nonlinear photonics and novel optical phenomena* 1–46 (Springer, Berlin, Deutschland, 2012).
46. Abramowitz, M. & Stegun, I. A. in *Handbook of Mathematical Functions with Formulas, Graphs, and Mathematical Tables* 446–447 (U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1964).
47. Stockhausen, A., Rodriguez-Gatica, J. E., Schweihoff, J., Schwarz, M. K. & Kubitscheck, U.
 Airy beam light sheet microscopy boosted by deep learning deconvolution.
Optics Express **31**. Publisher: Optica Publishing Group, 10918–10935 (2023).
48. Hecht, E. in *Optik* 3. Auflage, 765–767 (Oldenbourg, München, Deutschland, 2001).
49. Goodman, J. W. & Sutton, P. Introduction to Fourier optics.
Quantum and Semiclassical Optics-Journal of the European Optical Society Part B **8**, 1095–1096 (1996).
50. *Final Inspection sheet, X13138-01* Techn. Ber.
 (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Japan, 2019).
51. Linden, S. *Optik- und Wellenmechanik* Techn. Ber.
 (Physikalisches Institut, Universität Bonn, 2014).
52. Juškaitis, R. in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (Hrsg. Pawley, J. B.) 239–250 (Springer US, Boston, MA, USA, 2006).
53. Kirshner, H., Aguet, F., Sage, D. & Unser, M. 3-D PSF fitting for fluorescence microscopy: implementation and localization application.
Journal of Microscopy **249**, 13–25 (2013).
54. Born, M. & Wolf, E. *Principles of optics: Electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light* 7th edition, 486–491 (Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2003).
55. Ritter, J. G., Veith, R., Siebrasse, J.-P. & Kubitscheck, U. High-contrast single-particle tracking by selective focal plane illumination microscopy.
Optics Express **16**. Publisher: Optica Publishing Group, 7142–7152 (2008).
56. Biggs, D. S. 3D Deconvolution Microscopy.
Current Protocols in Cytometry **52**, 12.19.1–12.19.20 (2010).
57. Richardson, W. H. Bayesian-based iterative method of image restoration.
JoSA **62**, 55–59 (1972).

58. Mohapatra, B. R., Mishra, A. & Rout, S. K.
A comprehensive review on image restoration techniques.
International Journal of research in advent technology **2**, 101–105 (2014).
59. Shepp, L. A. & Vardi, Y.
Maximum likelihood reconstruction for emission tomography.
IEEE transactions on medical imaging **1**, 113–122 (1982).
60. Heysel, J.
Abbildung und farbttonbasierte Analyse ausgedehnter neuronaler Strukturen
Diss. (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2021).
61. *Focal Shift vs. Wavelength*
https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=2696.
Datum: 09.01.23.
62. Weber, L. *Structured Illumination for Resolution Enhancement in Lattice Light-Sheet Microscopy*
(Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2020).
63. Jain, A., Yang, A. H. J. & Erickson, D. Gel-based optical waveguides with live cell encapsulation and integrated microfluidics.
Optics Letters **37**. Publisher: Optica Publishing Group, 1472–1474 (2012).
64. Stockhausen, A., Bürgers, J., Rodriguez-Gatica, J. E., Schweihoff, J., Merkel, R., Prigge, J. M., Schwarz, M. K. & Kubitscheck, U.
Hard-wired lattice light-sheet microscopy for imaging of expanded samples.
Optics Express **28**, 15587 (2020).
65. Mascheroni, L., Scherer, K. M., Manton, J. D., Ward, E., Dibben, O. & Kaminski, C. F. Combining sample expansion and light sheet microscopy for the volumetric imaging of virus-infected cells with super-resolution.
Biomedical Optics Express **11**, 5032–5044 (2020).
66. Zhang, Y. & Gross, H.
Systematic design of microscope objectives. Part I: System review and analysis.
Advanced Optical Technologies **8**. Publisher: De Gruyter, 313–347 (2019).
67. Baumgart, E. & Kubitscheck, U.
Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection.
Optics Express **20**, 21805 (2012).
68. Pelli, D. G. & Bex, P. Measuring contrast sensitivity. *Vision Research. Testing Vision: From Laboratory Psychophysical Tests to Clinical Evaluation* **90**, 10–14 (2013).
69. Gurland, J. & Tripathi, R. C.
A Simple Approximation for Unbiased Estimation of the Standard Deviation.
The American Statistician **25**, 30–32 (1971).
70. *LCOS-SLM Software Operation Manual* Techn. Ber.
(Hamamatsu Photonics K.K., 2016).
71. Griffa, A., Garin, N. & Sage, D. Comparison of deconvolution software in 3D microscopy: A user point of view—Part 1.
GIT Imaging & Microscopy **12**, 43–45 (2010).
72. Sibarita, J.-B. in *Microscopy Techniques* (Hrsg. Rietdorf, J.) 201–243
(Springer Berlin/Heidelberg, Berlin, Deutschland, 2005).

73. Krishnan, D., Tay, T. & Fergus, R.
Blind deconvolution using a normalized sparsity measure in *CVPR 2011*
CVPR 2011. ISSN: 1063-6919 (Colorado Springs, CO, USA, 2011), 233–240.
74. Schmidt-Colberg, M. Generative Adversarial Networks (GAN): Eine Übersicht und Beispiele zum Thema GAN. *Institute for Applied AI, HdM, Stuttgart* (2021).
75. Durgadevi, M. u. a. *Generative Adversarial Network (GAN): a general review on different variants of GAN and applications* in *2021 6th International Conference on Communication and Electronics Systems (ICCES)* (2021), 1–8.
76. Isola, P., Zhu, J.-Y., Zhou, T. & Efros, A. A.
Image-To-Image Translation With Conditional Adversarial Networks
in *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (Computer Vision Foundation, 2017), 1125–1134.
77. Mirza, M. & Osindero, S. *Conditional Generative Adversarial Nets* 2014.
arXiv: 1411.1784[cs,stat].
78. Chollet, F. *Keras* <https://github.com/fchollet/keras>. 2015.
79. NVIDIA, Vingelmann, P. & Fitzek, F. H. *CUDA, release: 10.2.89*
<https://developer.nvidia.com/cuda-toolkit>. 2020.
80. Parsania, P. & Virparia, P.
Computational Time Complexity of Image Interpolation Algorithms.
International Journal of Computer Sciences and Engineering **6**, 491–496 (2018).
81. Ioffe, S. & Szegedy, C. *Batch Normalization: Accelerating Deep Network Training by Reducing Internal Covariate Shift*
in *Proceedings of the 32nd International Conference on Machine Learning*
International Conference on Machine Learning. ISSN: 1938-7228 (PMLR, 2015), 448–456.
82. Bjorck, J., Gomes, C., Selman, B. & Weinberger, K. Q.
Understanding Batch Normalization 2018. arXiv: 1806.02375[cs,stat].
83. Maas, A. L., Hannun, A. Y., Ng, A. Y. u. a.
Rectifier nonlinearities improve neural network acoustic models in *Proc. icml* **30** (2013), 3.
84. Rasamoelina, A. D., Adjailia, F. & Sincak, P.
A Review of Activation Function for Artificial Neural Network
in *2020 IEEE 18th World Symposium on Applied Machine Intelligence and Informatics (SAMI)* 2020 IEEE 18th World Symposium on Applied Machine Intelligence and Informatics (SAMI) (IEEE, Herlany, Slovakia, 2020), 281–286.
85. Kingma, D. P. & Ba, J. *Adam: A Method for Stochastic Optimization* 2017.
arXiv: 1412.6980[cs].
86. Alabdullatef, L. *Complete Guide to Adam Optimization*
<https://towardsdatascience.com/complete-guide-to-adam-optimization-1e5f29532c3d>. Datum: 23.02.23.
87. Wang, Q., Ma, Y., Zhao, K. & Tian, Y.
A Comprehensive Survey of Loss Functions in Machine Learning.
Annals of Data Science **9**, 187–212 (2022).

88. Sadykova, D. & James, A. P. *Quality assessment metrics for edge detection and edge-aware filtering: A tutorial review in 2017 International Conference on Advances in Computing, Communications and Informatics ICACCI* (Udupi, India, 2017), 2366–2369.
89. Wang, Z., Bovik, A. C., Sheikh, H. R. & Simoncelli, E. P. Image quality assessment: from error visibility to structural similarity. *IEEE transactions on image processing: a publication of the IEEE Signal Processing Society* **13**, 600–612 (2004).
90. Sakaguchi, R., Leiwe, M. N. & Imai, T. Bright multicolor labeling of neuronal circuits with fluorescent proteins and chemical tags. *eLife* **7** (Hrsg. Helmstaedter, M. & Marder, E.) Publisher: eLife Sciences Publications, Ltd, e40350 (2018).
91. Rodriguez-Gatica, J. E., Iefremova, V., Sokhranyaeva, L., Yeung, S. W. C. A., Breitzkreuz, Y., Brüstle, O., Schwarz, M. K. & Kubitscheck, U. Imaging three-dimensional brain organoid architecture from meso- to nanoscale across development. *Development* **149**, dev200439 (2022).
92. Lambert, T. J. FPbase: a community-editable fluorescent protein database. *Nature Methods* **16**. Number: 4 Publisher: Nature Publishing Group, 277–278 (2019).
93. Bioquest, A. *Fluorescence Spectrum Viewer* <https://www.aatbio.com/fluorescence-excitation-emission-spectrum-graph-viewer>. Datum: 07.03.23.
94. Perdigo, L. *RedLionfish (RL) deconvolution* <https://github.com/rosalindfranklininstitute/RedLionfish>. Datum: 28.03.23.
95. Siebrasse, J.-P. *Practical Course of the Master Modul MCh WP11, Fluorescence Microscopy* 2016. Versuchsbeschreibung.
96. Bhatia, R. *Expansion Microscopy for adhering cells* 2021. Chemisches Protokoll.
97. Hosny, N. A., Seyforth, J. A., Spickermann, G., Mitchell, T. J., Almada, P., Chesters, R., Mitchell, S. J., Chennell, G., Vernon, A. C., Cho, K., Srivastava, D. P., Forster, R. & Vettenburg, T. A planar Airy beam light-sheet for two-photon microscopy. *Biomedical Optics Express* **11**, 3927 (2020).
98. Remacha, E., Friedrich, L., Vermot, J. & Fahrbach, F. O. How to define and optimize axial resolution in light-sheet microscopy: a simulation-based approach. *Biomedical Optics Express* **11**, 8 (2020).
99. Samuylov, D. K., Purwar, P., Székely, G. & Paul, G. Modeling Point Spread Function in Fluorescence Microscopy With a Sparse Gaussian Mixture: Tradeoff Between Accuracy and Efficiency. *IEEE Transactions on Image Processing* **28**. Conference Name: IEEE Transactions on Image Processing, 3688–3702 (2019).

100. Richards, B. & Wolf, E. Electromagnetic diffraction in optical systems, II. Structure of the image field in an aplanatic system. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **253**, 358–379 (1959).
101. Weber, L. *Modelling dynamic single-molecule microscopy experiments for AI-based automation* 2023.
Poster presented at Focus on Microscopy Conference, Porto, Portugal.
102. Chen, T., Catrysse, P. B., Gamal, A. E. & Wandell, B. A.
How small should pixel size be? in *Sensors and Camera Systems for Scientific, Industrial, and Digital Photography Applications* **3965** (SPIE, 2000), 451–459.
103. Hinsch, J. in *Methods in Cell Biology* (Hrsg. Sluder, G. & Wolf, D. E.) 147–152 (Academic Press, Cambridge, MA, USA, 1998).
104. Makarkin, M. & Bratashov, D. State-of-the-Art Approaches for Image Deconvolution Problems, including Modern Deep Learning Architectures. *Micromachines* **12**. Number: 12 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 1558 (2021).
105. Cao, R., Yang, Y., Wang, J., Bu, J., Wang, M. & Yuan, X.-C.
Microfabricated continuous cubic phase plate induced Airy beams for optical manipulation with high power efficiency. *Applied Physics Letters* **99**, 261106 (2011).
106. Harder, A., Nagarajan, B., Odermatt, B. & Kubitscheck, U. Automatic detector synchronization for long-term imaging using confocal light-sheet microscopy. *Microscopy Research and Technique* **86**, 125–136 (2023).
107. Fujiwara, E., Cabral, T. D., Sato, M., Oku, H. & Cordeiro, C. M. B.
Agarose-based structured optical fibre. *Scientific Reports* **10**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 7035 (2020).
108. Schrader, M., Bahlmann, K., Giese, G. & Hell, S. W.
4Pi-Confocal Imaging in Fixed Biological Specimens. *Biophysical Journal* **75**, 1659–1668 (1998).
109. Zheng, G., Ou, X., Horstmeyer, R. & Yang, C. Characterization of spatially varying aberrations for wide field-of-view microscopy. *Optics Express* **21**. Publisher: Optica Publishing Group, 15131–15143 (2013).
110. Toader, B., Boulanger, J., Korolev, Y., Lenz, M. O., Manton, J., Schönlieb, C.-B. & Mureşan, L. Image Reconstruction in Light-Sheet Microscopy: Spatially Varying Deconvolution and Mixed Noise. *Journal of Mathematical Imaging and Vision* **64**, 968–992 (2022).
111. Farrell, J., Xiao, F. & Kavusi, S.
Resolution and light sensitivity tradeoff with pixel size in Digital Photography II Digital Photography II. **6069** (SPIE, 2006), 211–218.
112. Planchon, T. A., Gao, L., Milkie, D. E., Davidson, M. W., Galbraith, J. A., Galbraith, C. G. & Betzig, E. Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination. *Nature Methods* **8**. Number: 5 Publisher: Nature Publishing Group, 417–423 (2011).

113. Krzic, U., Gunther, S., Saunders, T. E., Streichan, S. J. & Hufnagel, L. Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging. *Nature Methods* **9**. Number: 7 Publisher: Nature Publishing Group, 730–733 (2012).
114. Dean, K. M., Roudot, P., Welf, E. S., Danuser, G. & Fiolka, R. Deconvolution-free Subcellular Imaging with Axially Swept Light Sheet Microscopy. *Biophysical Journal* **108**, 2807–2815 (2015).
115. Bach, M., Hoffmann, M. B., Jägle, H., Heinrich, S. P., Schiefer, U. & Wesemann, W. Kontrastsehen – Definitionen, Umrechnungen und Äquivalenztabelle. *Der Ophthalmologe* **4**, 341–347 (2016).
116. Richman, J., Spaeth, G. L. & Wirostko, B. Contrast sensitivity basics and a critique of currently available tests. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* **39**, 1100–1106 (2013).
117. Iqbal, A., Sharif, M., Yasmin, M., Raza, M. & Aftab, S. Generative adversarial networks and its applications in the biomedical image segmentation: a comprehensive survey. *International Journal of Multimedia Information Retrieval* **11**, 333–368 (2022).
118. Cirillo, M. D., Abramian, D. & Eklund, A. *Vox2Vox: 3D-GAN for Brain Tumour Segmentation* in *Brainlesion: Glioma, Multiple Sclerosis, Stroke and Traumatic Brain Injuries* (Hrsg. Crimi, A. & Bakas, S.) (Springer International Publishing, Cham, 2021), 274–284.
119. Weigert, M., Royer, L., Jug, F. & Myers, G. *Isotropic reconstruction of 3D fluorescence microscopy images using convolutional neural networks* in *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention* (Hrsg. Descoteaux, M., Maier-Hein, L., Franz, A., Jannin, P., Collins, D. L. & Duchesne, S.) (Springer, Cham, Schweiz, 2017), 126–134.
120. Guo, M., Li, Y., Su, Y., Lambert, T., Nogare, D. D., Moyle, M. W., Duncan, L. H., Ikegami, R., Santella, A., Rey-Suarez, I., Green, D., Beiriger, A., Chen, J., Vishwasrao, H., Ganesan, S., Prince, V., Waters, J. C., Annunziata, C. M., Hafner, M., Mohler, W. A., Chitnis, A. B., Upadhyaya, A., Usdin, T. B., Bao, Z., Colón-Ramos, D., La Riviere, P., Liu, H., Wu, Y. & Shroff, H. Rapid image deconvolution and multiview fusion for optical microscopy. *Nature Biotechnology* **38**, 1337–1346 (2020).
121. Kenig, T., Kam, Z. & Feuer, A. Blind Image Deconvolution Using Machine Learning for Three-Dimensional Microscopy. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* **32**, 2191–2204 (2010).
122. Shajkofci, A. & Liebling, M. *Semi-Blind Spatially-Variant Deconvolution in Optical Microscopy with Local Point Spread Function Estimation by Use of Convolutional Neural Networks* in *2018 25th IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*

- 2018 25th IEEE International Conference on Image Processing (ICIP).
ISSN: 2381-8549 (2018), 3818–3822.
123. Wijesinghe, P., Corsetti, S., Chow, D. J. X., Sakata, S., Dunning, K. R. & Dholakia, K. Experimentally unsupervised deconvolution for light-sheet microscopy with propagation-invariant beams. *Light: Science & Applications* **11**. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group, 319 (2022).
124. Shorten, C. & Khoshgoftaar, T. M.
A survey on Image Data Augmentation for Deep Learning.
Journal of Big Data **6**, 60 (2019).
125. Weiss, K., Khoshgoftaar, T. M. & Wang, D. A survey of transfer learning.
Journal of Big Data **3**, 9 (2016).
126. Stockhausen, A. *Deep-decon* <https://github.com/An-464/Deep-decon>.
Datum: 07.05.23.
127. Ouyang, W., Beuttenmueller, F., Gómez-de-Mariscal, E., Pape, C., Burke, T., Garcia-López-de-Haro, C., Russell, C., Moya-Sans, L., de-la-Torre-Gutiérrez, C., Schmidt, D., Kutra, D., Novikov, M., Weigert, M., Schmidt, U., Bankhead, P., Jacquemet, G., Sage, D., Henriques, R., Muñoz-Barrutia, A., Lundberg, E., Jug, F. & Kreshuk, A. *Biolmage Model Zoo: A Community-Driven Resource for Accessible Deep Learning in Biolmage Analysis* bioRxiv 2022.06.07.495102. 2022.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Sichtfeld und Strahltaille des Gaußstrahls	10
2.1	Prinzip der Lichtscheibenmikroskopie	14
2.2	Funktionsweise eines Lichtmodulators	15
2.3	Aufbau und Bestandteile eines neuronalen Netzes am Beispiel eines MLPs	17
2.4	Faltungsschicht	19
2.5	Aufbau eines GANs	20
3.1	Perspektivische Sicht des Airystrahls	22
3.2	Prinzip der Airystrahlerzeugung	23
3.3	Fourierspektrum und Phasenmuster des Airystrahls	24
3.4	Einfluss von y_0 auf Phasenmuster und Strahl	25
3.5	Einfluss von α auf Fourierspektrum und Strahl	26
3.6	Korrekturen des Phasenmusters	27
3.7	Simulation und Vergleich von Airy- und Gaußstrahlen	29
3.8	Detektions-PSF	31
3.9	Vergleich von axialer Gesamt-PSF mit Detektions-PSF und Anregungsprofil	32
3.10	Bestimmung der realen gemessenen lateralen Auflösung für eine diskrete Pixelbreite	34
3.11	Bestimmung der realen gemessenen axialen Auflösung für eine diskrete Schrittweite	35
3.12	Optische Transferfunktion	36
3.13	Beispiel einer Dekonvolution	38
4.1	Beleuchtungsstrahlengang	40
4.2	Perspektivische Sicht auf die Galvo-Spiegel	41
4.3	Strahlengang des Gaußstrahls zwischen Galvo-Spiegel und Probenebene	42
4.4	Fokuspunktverschiebung für achromatische Linsen	43
4.5	Probenkammer und Probenhalter	44
4.6	Detektionsstrahlengang	45
4.7	Triggersignale von Kamera, Laser und Galvo-Spiegel	46
4.8	Querschnittsprofile des Airystrahls	50
4.9	Simulation und Vergleich von Airy- und Gaußstrahlen	52
4.10	Gemittelte Intensitätsverteilungen der Mikropartikel für unterschiedliche Anregungsstrahlprofile	53
4.11	Abbildung der Mikropartikel für Auflösung und Kontrast	55
4.12	Airystrahl und Intensitätsprofile für unterschiedliche Anregungswellenlängen	57
4.13	Airystrahl mit $\lambda_{Ex} = 561 \text{ nm}$ für unterschiedliche Wellenfrontkorrekturen	58

5.1	Übersicht zur Architektur der Deep Learning Dekonvolution	64
5.2	Verarbeitung dreidimensionaler Daten	65
5.3	Vergleich eines <i>Encoder-Decoder</i> Generators und des U-Net Modells . .	66
5.4	Zusammensetzung des Generator-Netzwerks	67
5.5	Trainingsablauf	69
5.6	Graphische Benutzeroberfläche	71
5.7	Maximum-Intensitätsprojektion (MIP) zum Testen der Deep Learning Dekonvolution.	72
5.8	Vergleich der Ergebnisse von RL-Dekonvolution und Deep Learning Dekonvolution	74
6.1	Schematische Abbildung der Vorbereitung der Probenexpansion	76
6.2	MIP der verwendeten Bildstapel von MB1 (Airystrahlbeleuchtung) zum Training der Deep Learning Dekonvolution.	79
6.3	Registrierung	80
6.4	Maximum-Intensitätsprojektionen entlang der z-Richtung für MB1 . . .	83
6.5	MIPs eines weiteren Bereich von MB1	84
6.6	MIP von MB2 in drei Farben	85
6.7	MIPs von MB3	87
6.8	Vergleich der Aufnahme- und Verarbeitungsdauer der Methoden	88
6.9	Deep Learning Dekonvolution angewendet auf HeLa Zellen	89
6.10	Aufnahmen eines Hirnorganoids mit unterschiedlichen Objektiven und Vergrößerungsfaktoren.	92

Tabellenverzeichnis

4.1	Gemessene axiale und laterale Auflösung der unterschiedlichen Strahlprofile im Vergleich zu den simulierten Werten unter Berücksichtigung der Pixelgrößen.	54
4.2	Gemessener Kontrast für unterschiedlichen Strahlprofile und Vergrößerungen M	56
4.3	Abstand zwischen Hauptmaximum und erstem Nebenmaximum des Airystrahls für unterschiedliche Wellenlängen.	56
5.1	Evaluation der Ergebnisse der Deep Learning Dekonvolution (DLD) im Vergleich zur Richardson-Lucy Dekonvolution (RL) für simulierte Daten.	74
6.1	Zusammenfassung der maximalen Anregungswellenlänge des Fluorophors, der verwendete Anregungswellenlänge im Mikroskop und der Emissionswellenlängen der abgebildeten Fluorophore sowie der verwendeten Filter und Laserleistungen. Informationen von [92], [93]	78
6.2	Evaluation der Ergebnisse der Deep Learning Dekonvolution (DLD) im Vergleich zu den unverarbeiteten Daten und der Richardson-Lucy Dekonvolution (RL) für MB1.	82
6.3	Evaluation der Ergebnisse der Deep Learning Dekonvolution (DLD) im Vergleich zu den unverarbeiteten Daten und der Richardson-Lucy Dekonvolution (RL) für MB2.	86
6.4	Evaluation der Ergebnisse der Richardson-Lucy Dekonvolution (RL) und der Deep Learning Dekonvolution (DLD) für Modelle mit unterschiedlichen Trainingsdaten.	90
6.5	Evaluation der Ergebnisse der Deep Learning Dekonvolution (DLD) für Aufnahmen eines Gauß-Lichtscheibenmikroskops mit unterschiedlichen Objektiven und Vergrößerungen.	91

Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben. Die Fertigstellung dieser Doktorarbeit wäre ohne die vielfältige Hilfe und Ermutigung zahlreicher Personen nicht möglich gewesen.

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck für seine Anleitung und Unterstützung. Die vielen Anregungen und Diskussionen haben maßgeblich zur Ausrichtung dieser Arbeit beigetragen und mir immer wieder geholfen den nächsten Schritt anzugehen.

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich auch den weiteren Mitgliedern meiner Prüfungskommission Prof. Dr. Rudolf Merkel, Prof. Dr. Thomas Bredow und Prof. Dr. Ulrike Endesfelder aussprechen.

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit war die Untersuchung biologischer Proben, was ohne die Hilfe von Dr. Martin K. Schwarz, Dr. Jens Tillmann, Juan Eduardo Rodriguez-Gatica und Rohan Bhatia nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die Bereitstellung und Präparation der Proben.

Ich danke außerdem Daniel Poetes aus der Feinmechanik Werkstatt des Clausius Instituts für seine technische Beratung und die präzise Fertigung vieler mechanischer Komponenten des Mikroskops.

Die Zeit meiner Doktorarbeit war zu einem großen Teil durch die wunderbare Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe geprägt. Ich danke meinen (ehemaligen) Kolleg*innen, für wertvolle Diskussionen, moralische Unterstützung und viele gemeinsame Mittagspausen. Ein besonderer Dank geht dabei an Laura Weber, Jan Ruland und Jana Heysel, die mich mit ihrer Freundschaft und Beratung in allen Lebenslagen unterstützt haben.

Ich danke Herbi Dreiner nicht nur für die unglaublich wertvolle Zeit bei der Physikshow der Uni Bonn, sondern auch für die Teepausen voller guter Gespräche und Ratschläge. Ein großer Dank geht an meine Familie. An meine Eltern Uwe und Angela Stockhausen und meine Schwester Marie Schäfer. Ich bin sehr glücklich eine Familie zu haben, auf die ich zählen kann und die immer an mich glaubt. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich Denis Michel danken: Für jede Unterhaltung, jede willkommene Ablenkung und jeden aufbauenden Moment, wenn die Dinge mal nicht wie geplant liefen. Du hast mir immer wieder Mut gemacht und mir gezeigt, was ich alles schaffen kann. Danke dafür!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht habe. Ich habe keine früheren Promotionsversuche unternommen und die Dissertation ist in gleicher oder ähnlicher Form bei keiner anderen Prüfungsbehörde im In- oder Ausland eingereicht worden. Ich habe keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsstellen, für die Anfertigung der eingereichten Dissertation und/oder die Möglichkeit zur Promotion in Anspruch genommen.

Bonn,

Anne Stockhausen