

Optimierung und Charakterisierung eines hochauflösenden Lichtscheibenmikroskops für geklärte Proben

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

vorgelegt von

Florian Schloen

aus Hamburg

Bonn, Oktober 2019

Diese Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

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

Tag der Promotion: 29.01.2020

Erscheinungsjahr: 2020

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1	Einleitung	1
1.1	Prinzip der Lichtscheibenmikroskopie	1
1.2	Motivation und Aufgabenstellung	3
1.3	Entwicklung der Lichtscheibenmikroskopie	4
1.4	Ultramikroskopie	7
1.5	Klärung von biologischen Proben	9
1.6	Sphärische Aberrationen in der Mikroskopie	11
1.7	Die Aberrationsfunktion	12
1.8	Abhängigkeit der Punktspreizfunktion von sphärischen Aberrationen . .	15
1.9	Laterale und axiale Auflösung	17
1.10	Fokusstabilisierung in der Mikroskopie	18
2	Aufbau des Mikroskops	23
2.1	Anforderungen an das Mikroskop	23
2.2	Grundlegender Aufbau des Mikroskops	25
2.2.1	Beleuchtungseinheit	25
2.2.2	Detektionseinheit	27
2.3	Verwendete Komponenten	28
2.3.1	Komponenten der Beleuchtungseinheit	28
2.3.2	Komponenten für die Detektionseinheit	31
2.3.3	Probenhalterung	33
2.4	Ansteuerung und Software	34
2.4.1	Computer und Software	34
2.4.2	Ansteuerung der einzelnen Komponenten	35
2.5	Fokusstabilisierung	36
3	Theoretische Berechnungen	41
3.1	Analytische Berechnungen	41
3.1.1	Gauß-Strahlen	41
3.1.2	Fokussierung von Gauß-Strahlen	42
3.1.3	Abschätzung des Tailenradius der Lichtscheibe	43

3.2	Einfluss der Galvanometer	44
3.2.1	Galvanometer für die Lichtblatterzeugung	44
3.2.2	Galvanometer für die Schwenkung des Lichtblattes	45
3.3	Berechnungen mit <i>Zemax</i>	46
3.3.1	Auslenkung des Beleuchtungsstrahls	47
3.3.2	Vergleich mit analytischen Berechnungen	49
3.4	Einfluss von sphärischen Aberrationen auf die PSF	50
3.4.1	Analytische Berechnungen	50
3.4.2	Einfluss von sphärischen Aberrationen auf die laterale PSF	52
3.4.3	Einfluss von sphärischen Aberrationen auf die axiale PSF	54
3.4.4	Sphärische Aberrationen bei der Beleuchtung	57
4	Charakterisierung des Mikroskops	59
4.1	Charakterisierung des Beleuchtungsstrahls	59
4.1.1	Einfluss der Blende auf die Strahltaile	59
4.1.2	Auslenkung des Beleuchtungsstrahls	61
4.1.3	Schwenkung des Beleuchtungsstrahls	62
4.1.4	Charakterisierung des Beleuchtungsstrahls für verschiedene Wellenlängen	63
4.2	Herstellung eines Phantoms aus Epoxidharz	64
4.3	Messung der PSF	65
4.3.1	Das Nyquist-Theorem	65
4.3.2	Einfluss der Bildpunktgröße auf die gemessene Halbwertsbreite	66
4.4	Messungen am Phantom	70
4.4.1	Messung der lateralen Halbwertsbreite mit unterschiedlichen Detektionsobjektiven	70
4.4.2	Messung der axialen Halbwertsbreite mit unterschiedlichen Detektionsobjektiven	72
4.4.3	Einfluss der gewählten Objektivs auf die Bildqualität bei verschiedenen Probertiefen	73
4.4.4	Axiale Halbwertsbreite in Abhängigkeit von der y-Position	75
4.5	Messungen mit unterschiedlichen Objektiven an einem geklärten Maushirn	76
4.6	Charakterisierung der Fokusstabilisierung	78
4.6.1	Vergleich verschiedener Fokusfunktionen	78
4.6.2	Unterschiedliche Schrittweiten	81
4.6.3	Vergleich mit und ohne Fokusstabilisierung	86
4.6.4	Unterschiedliche Defokussierungen des Detektionsobjektivs	89
5	Ultramikroskopie von ganzen Maushirnen	91
5.1	Zusammenfügen einzelner Bildstapel	91
5.2	Intensitätskorrektur	92
5.3	Zwei-Farben-Abbildung eines Maushirn-Transplantats	93

5.4	Fokusstabilisierung	99
6	Diskussion	101
6.1	Allgemeines über das entwickelte Lichtscheibenmikroskop	101
6.2	Auflösung des Mikroskops	103
6.3	Fokusstabilisierung	103
6.4	Thermische Einflüsse	104
6.4.1	Thermische Einflüsse auf das Mikroskop	104
6.4.2	Thermische Einflüsse auf die optischen Eigenschaften der Klärlösung	104
6.5	Art der Beleuchtung	105
6.6	Einfluss der Probe auf die Bildqualität	108
6.7	Mögliche Verwendung von adaptiven Optiken	109
6.8	Vergleich mit dem Heidelberger Lichtscheibenmikroskop	109
6.9	Abschließende Zusammenfassung und Ausblick	111
6.9.1	Abschließende Zusammenfassung	111
6.9.2	Ausblick	112
A	Anhang	115
A.1	Materialliste	115
A.2	Verschiedene Fokusfunktionen	118
A.3	Zemax	122
A.3.1	Linsendaten-Editor für die Simulation des Beleuchtungsstrahls	122
A.3.2	Linsendaten-Editor für die Simulation von sphärischen Aberrationen	122
	Literaturverzeichnis	133
	Bildverzeichnis	137
	Tabellenverzeichnis	139
	Danksagung	143

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Lichtscheibenmikroskop für die Messung von großen Proben entwickelt. Bei der Lichtscheibenmikroskopie wird nur eine dünne Schicht in der Probe beleuchtet. Diese selektive Beleuchtung erlaubt eine geringe Belastung der Probe, während der Aufnahme, durch das Beleuchtungslicht. Die Lichtscheibenmikroskopie ist prädestiniert für Messungen von großen Proben, da eine ganze Ebene auf einmal beleuchtet wird. Große Proben, wie z. B. ganze Maushirne, können in wenigen Stunden mikroskopiert werden. Außerdem führt diese Beleuchtungsart zu einer guten axialen Auflösung.

Die Lichtscheibenmikroskopie erlaubt in Kombination mit ausgefeilten Klärtechniken die optische Bildgebung von ganzen Maushirnen. Durch das Klären der Maushirne ist es möglich, mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen, neuronale Verbindungen in einem ganzen Maushirn sichtbar zu machen. In vielen neurologischen Fragestellungen spielen Verknüpfungen innerhalb eines Gehirns eine Rolle. Durch die Erzeugung von optischen Schnitten ist ein mechanisches Zerschneiden des Gehirns in einzelne Scheiben für viele Fragestellungen nicht mehr notwendig.

Hierbei ist es wichtig, dass das Mikroskop zuverlässig und stabil läuft. Auch soll auf die Benutzerfreundlichkeit geachtet werden. Es wird in dieser Arbeit ausführlich auf den generellen Aufbau des Mikroskops und die verwendeten Komponenten eingegangen. Die Proben befinden sich in einer organischen Lösung mit einem hohen Brechungsindex. Abbildungsfehler können bei optischen Aufbauten einen maßgeblichen Effekt auf die Abbildungsqualität haben. Deshalb wird in der Dissertation auf sphärische Aberrationen genauer eingegangen und erläutert, wie diese für eine einfache Grenzfläche berechnet werden können. Diese Art von Aberrationen können einen maßgeblichen Effekt auf das Auflösungsvermögen eines Mikroskops haben.

Wie bei anderen optischen Mikroskopiertechniken kann es zu einer Defokussierung und damit zu einer Verschlechterung der Bildqualität kommen. Um die auftretende Defokussierung zu korrigieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Fokusstabilisierung entwickelt. Diese dient dazu, dass eine stabile Messung über einen langen Zeitraum möglich ist. Die Fokusstabilisierung wurde unter verschiedenen Bedingungen getestet und charakterisiert.

Mit der Software *Zemax* wurden die optischen Eigenschaften des Mikroskops simuliert und mit analytischen Berechnungen verglichen.

Wie jeder optische Aufbau muss auch dieser zunächst gründlich charakterisiert werden.

Für die Charakterisierung wurde ein Phantom aus Epoxidharz und fluoreszierenden Mikropartikeln entwickelt. Mit diesem Phantom ist es möglich, die Auflösung des Mikroskops zu bestimmen.

Schließlich wird auf die Messung von ganzen Maushirnen eingegangen. Hierzu wurde ein Gehirn mit einem Transplantat aus neuronalen Stammzellen (It-NES Zellen) verwendet. Es wurde ein Transplantationsgehirn gewählt, da Transplantationsgehirne einen erheblichen Anteil der Proben darstellen, die mit dem Mikroskop untersucht werden. Die Behandlung mit humanen Stammzellen könnte Patienten mit neurologischen Erkrankungen, wie der Parkinson-Krankheit oder der Huntington-Krankheit, helfen.

Am Ende der Dissertation werden noch einzelne Aspekte diskutiert. Es wird darauf eingegangen, welche Beleuchtungsarten es neben einem Gauß-Strahl noch gibt, bzw. ob die Bildqualität durch adaptive Optik weiter verbessert werden kann.

1 Einleitung

1.1 Prinzip der Lichtscheibenmikroskopie

Die Lichtscheibenmikroskopie ist eine fluoreszenzmikroskopische Methode [1], bei der Beleuchtungs- und Detektionspfad voneinander getrennt sind. Das Detektionsobjektiv steht orthogonal zum Beleuchtungsobjektiv und das erzeugte Lichtblatt befindet sich im Fokus des Detektionsobjektivs [2]. Das Prinzip der Lichtscheibenmikroskopie wird in Abbildung 1.1 dargestellt. Das Lichtblatt kann durch eine Zylinderlinse oder durch das Scannen eines fokussierten Laserstrahls erzeugt werden [3]. In Abbildung 1.2 wird die Erzeugung einer Lichtscheibe mit einem gescannten Strahl gezeigt. Durch das Scannen des Laserstrahls entsteht im zeitlichen Mittel ein dünnes Lichtblatt.

Durch diese Beleuchtungstechnik wird die axiale Auflösung im Vergleich zu herkömmlichen Mikroskopen verbessert, da nur eine dünne Schicht in der Probe beleuchtet wird [1]. Es ist jedoch zu beachten, dass die kleinste mögliche Breite des Lichtblattes durch Beugung limitiert ist. Das heißt, die kleinste mögliche Breite der Lichtscheibe wird durch die Punktspreizfunktion des Beleuchtungsobjektivs bestimmt.

Die laterale Auflösung wird durch die numerische Apertur NA des Detektionsobjektivs bestimmt, wobei diese durch den halben Öffnungswinkel α des Detektionsobjektivs und den Brechungsindex η gegeben ist:

$$NA = \eta \sin(\alpha) \quad (1.1)$$

Das Hintergrundsignal wird durch die selektive Beleuchtung stark reduziert. Des Weiteren werden durch die dünne Lichtscheibe die Phototoxizität und das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe stark reduziert [4]. Somit ist die Lichtscheibenmikroskopie optimal für die Untersuchung von lebendigen Organismen geeignet [5]. Außerdem erlaubt die Lichtscheibenmikroskopie, große Proben in einer kurzen Zeit aufzunehmen, da eine ganze Ebene auf einmal aufgenommen werden kann und nicht im Vergleich zur Konfokalmikroskopie punktweise abgerastert wird [6]. Somit können große Proben, wie z. B. ganze Mausorgane oder sogar ganze Mäuse in wenigen Stunden mikroskopiert werden [7]. Auch erlaubt der prinzipiell einfache Aufbau eines Lichtscheibenmikroskops den selbstständigen Aufbau solcher Mikroskope, welche im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren kostengünstig [6] sind. Durch die Trennung von Beleuchtungspfad und Detektionspfad können kommerzielle Mikroskope für die Detektion verwendet wer-

den [8].

Für die Erzeugung eines z-Bildstapels kann die Probe mit einem Linearversteller in z-Richtung bewegt werden oder das Lichtblatt kann durch einen Galvanometer-Scanner in z-Richtung bewegt werden [9]. Die zweite Variante erlaubt eine schnellere Messung eines Bildstapels, da sich im Allgemeinen Galvanometer schneller bewegen können als Linearversteller.

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Varianten der Lichtscheibenmikroskopie entwickelt. Darauf wird in Abschnitt 1.3 näher eingegangen.

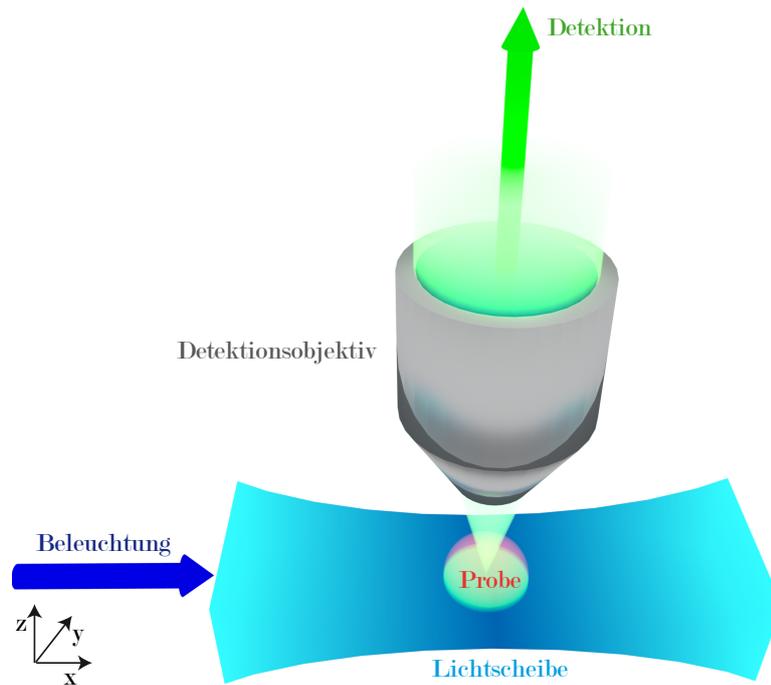


Abbildung 1.1: Prinzip der Lichtscheibenmikroskopie: Eine Probe (rote Scheibe) wird mit einer dünnen fokussierten Lichtscheibe beleuchtet. Nur eine dünne Schicht in der Probe wird beleuchtet (hellgrüner Kreis). Die Lichtscheibe befindet sich im Fokus des Detektionsobjektivs und das Fluoreszenzlicht (in grün dargestellt) wird vom Detektionsobjektiv gesammelt. Der Strahl wird in z-Richtung fokussiert. Das Lichtblatt propagiert in x-Richtung.

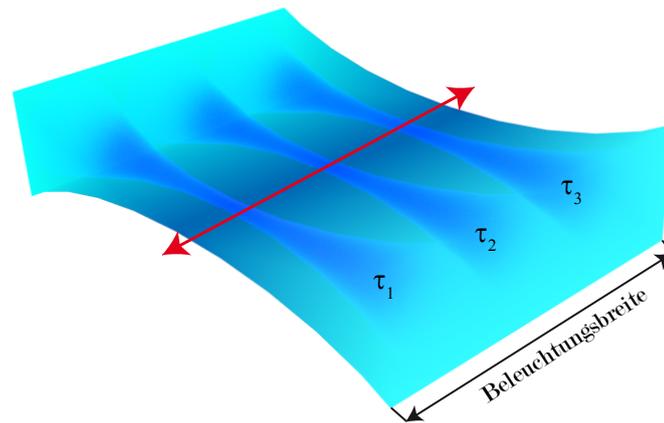


Abbildung 1.2: Durch das schnelle Scannen eines fokussierten Laserstrahls kommt es im zeitlichen Mittel zu einer Lichtscheibe. Es sind drei Positionen des gescannten Laserstrahls bei unterschiedlichen Zeiten (τ_1 , τ_2 und τ_3) abgebildet. Die Beleuchtungsbreite ist die Breite des Lichtblattes in y-Richtung.

1.2 Motivation und Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Lichtscheibenmikroskop für die Untersuchung von Proben mit der Ausdehnung von mehreren mm^3 entwickelt und aufgebaut werden. Somit ist es möglich, Entwicklungen unter anderem in ganzen Mausgehirnen sichtbar zu machen und diese auszuwerten. Das Mikroskop bedarf verschiedener Anregungswellenlängen, da z. B. verschiedene Zellen unterschiedlich fluoreszenzmarkiert sind. Für die Aufnahme sollten verschiedene Objektive mit unterschiedlichen Vergrößerungen zur Verfügung stehen. Auf Grund der großen Probentiefe der verwendeten Proben benötigen die Objektive einen Arbeitsabstand von mindestens 5 mm. Die Probe und die organische Lösung, in der sich die Probe befindet, besitzen einen Brechungsindex von 1,56. In dieser Arbeit wird untersucht, welchen Einfluss der hohe Brechungsindex, bei der Verwendung von Luftobjektiven, auf die Abbildungsqualität hat und ob eine Anschaffung von speziellen Eintauchobjektiven eine Verbesserung der Abbildungsqualität verspricht. Hierzu wurde die theoretische Punktspreizfunktion von einem Luftobjektiv, mit einem Brechungsindex der Probe und der Flüssigkeit, in der sich die Probe befindet, von 1,56, berechnet.

Das Mikroskop und die dazugehörige Software sollten derart beschaffen sein, dass eine einfache Handhabung möglich ist. Es soll möglich sein, das Mikroskop nach einer Einweisung selbständig benutzen zu können.

Ein wichtiger Punkt ist die Charakterisierung des Mikroskops. Für die Bestimmung der lateralen und axialen Auflösung ist die Abbildung von fluoreszierenden Partikeln notwendig. Aus diesem Grund wurde ein Phantom aus Epoxidharz mit eingebetteten fluoreszierenden Partikeln hergestellt.

Bei Aufnahmen von großen Proben kann es manchmal zu einer leichten Defokussierung der Probe kommen, weswegen eine automatische Fokusstabilisierung entwickelt und

implementiert wurde. Diese entwickelte Fokusstabilisierung wurde an mehreren Proben getestet.

Dank des entwickelten Lichtscheibenmikroskops können neuronale Verbindungen innerhalb eines ganzen Gehirns visualisiert werden [10]. Im Kapitel 5 wird ein Anwendungsbeispiel für dieses entwickelte Mikroskop erläutert. Hierbei wurde ein Transplantat aus neuronalen Stammzellen (It-NES Zellen) in ein Mausgehirn transplantiert. Dank dem entwickelten Mikroskop können Verschaltungen zwischen Stammzellen und Mausneuronen sichtbar gemacht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten in Zukunft bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen helfen [11–13].

1.3 Entwicklung der Lichtscheibenmikroskopie

In diesem Abschnitt wird auf die historische Entwicklung der Lichtscheibenmikroskopie eingegangen und es werden wichtige Entwicklungen der letzten Jahre behandelt. Es sei angemerkt, dass es in den letzten Jahren eine Vielzahl von neuen Entwicklungen gab und es den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, alle Entwicklungen zu behandeln. Die Entwicklung der Ultramikroskopie, eine Unterart der Lichtscheibenmikroskopie, wird gesondert in Abschnitt 1.4 behandelt.

Die grundlegende Idee der Lichtscheibenmikroskopie ist die Beleuchtung der Probe mit einem dünnen Lichtblatt. Henry Siedentopf und Richard Zsigmondy entwickelten 1902 ein vereinfachtes Lichtscheibenmikroskop zur Sichtbarmachung und zur Größenbestimmung kleiner Goldkolloide in Goldrubingläsern [14]. Das Lichtblatt wurde mit Hilfe eines optischen Spalts erzeugt. Durch die orthogonale Anordnung von Beleuchtung und Detektion wurde das Streulicht der Teilchen nicht vom verwendeten Sonnenlicht überstrahlt. Aufgrund dieser neuen Beleuchtungstechnik wurde der Kontrast der Bilder stark erhöht. Das Lichtblatt erlaubte außerdem die Beleuchtung eines kleinen Probenvolumens, so dass nur eine überschaubare Anzahl von Teilchen zu einem Zeitpunkt beleuchtet wurde. Mit dieser Technik konnten Teilchen mit einer Ausdehnung unterhalb der beugungsbegrenzten Auflösung detektiert werden. Diese Technik konnte auch auf Suspensionen mit Kolloiden angewendet werden [14]. Siedentopf und Zsigmondy nannten diese Entwicklung Ultramikroskopie, da Teilchen ferner der Auflösungsbegrenzung nachgewiesen werden können (lat. *ultra*, zu Deutsch jenseits). Zsigmondy wurde 1925 für seine Forschung an Kolloiden der Nobelpreis für Chemie verliehen [15].

1993 wurde von Voie et al. das erste Lichtscheibenmikroskop mit einem Laser als Lichtquelle entwickelt [2]. Das Lichtblatt wurde mit Hilfe einer Zylinderlinse erzeugt. Mit diesem Mikroskop war es möglich, die komplizierte dreidimensionale Struktur der Hörschnecke eines Meerschweinchens zu untersuchen. Die Untersuchung dieser Struktur ist mit histologischen Schnitten nicht möglich. Die Hörschnecke wurde mit Hilfe einer Lösung aus Wintergrünöl und Benzoesäurebenzylester transparent gemacht und später mit Rhodaminisothiocyanat (RITC) eingefärbt. Diese Technik wurde in der Publika-

tion von Voie et al. als „orthogonal-plane fluorescence optical sectioning“ oder kurz „OPFOS“ bezeichnet. Das Mikroskop hatte eine laterale Auflösung von 10 μm und eine axiale Auflösung von 26 μm bei einer Bildgröße von 1,5 mm [2].

Der Arbeitsgruppe von Ernst H. K. Stelzer gelang es 2004, mittels Lichtscheibenmikroskopie biologische Vorgänge zeitlich aufzulösen [5]. In dieser Publikation wurde zum ersten Mal der Begriff „selective plane illumination microscopy (SPIM)“ verwendet. Die Lichtscheibenmikroskopie erlaubte die Untersuchung von dreidimensionalem Wachstum in einer Umgebung aus Agarose. In der besagten Publikation wurde die Embryogenese des Medaka-Embryos und der Taufliiegenart *Drosophila melanogaster* über einen längeren Zeitraum untersucht. Um die Bildqualität von stark streuenden Proben zu verbessern, kann die Probe nach jedem aufgenommenen Bildstapel um einen bestimmten Winkel gedreht werden. Diese einzelnen Bildstapel können zu einem Bildstapel zusammengefügt werden [5]. Diese Multi-Ansichten-Aufnahme zeichnet sich durch einen höheren Kontrast und eine bessere axiale Auflösung gegenüber einer Einzel-Ansicht-Aufnahme aus [16]. Alternativ kann die Probe mit mehreren Lichtblättern von verschiedenen Richtungen beleuchtet werden [16]. Seit dieser Publikation ist die Lichtscheibenmikroskopie ein wichtiger Bestandteil der biologischen Forschung [17].

Eine Alternative zu einer Zylinderlinse ist ein fokussierter Laserstrahl, welcher schnell hoch- und runtergescannt wird [3]. Durch diese Technik kommt es zu einer homogene- ren Beleuchtung der Probe. Außerdem kann für jedes Detektionsobjektiv der passende Scanbereich gewählt werden. Das erste Lichtscheibenmikroskop mit einem gescannten Strahl wurde von Keller et al. entwickelt und „digital scanned laser light sheet fluorescence microscopy (DSLM)“ benannt [3]. Durch diese neue Erzeugung einer Lichtscheibe ist es möglich, andere Strahlprofile als Gauß-Strahlen zu verwenden. Selbstheilende Bessel-Strahlen können eine Alternative zu Gauß-Strahlen darstellen [18]. Selbstheilend bedeutet, dass nach einer Störung der Strahl wieder seine ursprüngliche Form annimmt [19]. Der Nachteil ist jedoch das Ringsystem um den Hauptstrahl. Im Gegensatz zu Gauß-Strahlen besitzen Bessel-Strahlen neben einem zentralen Hauptmaxima noch viele konzentrische Nebenmaxima, die auch zur Anregung beitragen. Bessel-Strahlen können deswegen im Vergleich zu Gauß-Strahlen höhere Photoschädigungen bei lebenden Proben verursachen [20], beziehungsweise es kommt zu einer stärkeren Bleichung der Probe [21].

Durch eine Synchronisation zwischen der Kamera und dem gescannten Beleuchtungsstrahl war es möglich, ein konfokales Lichtscheibenmikroskop zu entwickeln [22]. Somit ist es möglich, einen Großteil des Streulichts herauszufiltern. Auch für Bessel-Strahlen zeigt die konfokale Lichtscheibenmikroskopie einen großen Vorteil. Mit der konfokalen Detektion ist es möglich, das Licht außerhalb der Schärfenebene, welches vom Ringsystem kommt, herauszufiltern. Somit sind durch die kleinere Divergenz von Bessel-Strahlen, im Vergleich zu Gauß-Strahlen, sehr dünne optische Schnitte über einen großen Bereich möglich [23].

Es ist auch möglich, mit einer strukturierten Beleuchtung das Licht außerhalb der Schärfenebene herauszufiltern. Hierzu besitzt die Intensität des Lichtblattes entlang der

Scanrichtung meist ein sinusförmiges Muster. Es müssen mindestens 3 Bilder mit unterschiedlichen Phasen pro Ebene aufgenommen werden [24]. Bei den drei Aufnahmen besitzen die Intensitätsmodulationen die Phasen 0° , 120° und 240° . Das resultierende Bild I_{res} wird nach folgender Gleichung berechnet [25]:

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

Bei Bessel-Strahlen ist der Hauptstrahl durch das Beleuchtungsmuster stärker betroffen als die Nebenringe. Diese unterschiedliche Betroffenheit zwischen Hauptmaxima und Nebenringen kann ausgenutzt werden, um den Fluoreszenzanteil von den Nebenringen herauszufiltern [24, 26]. Auch bei einer Beleuchtung mit einem Gauß-Strahl kann durch eine strukturierte Beleuchtung die Bildqualität verbessert werden. Die erste Implementierung einer strukturierten Beleuchtung in einem Lichtscheibenmikroskop mit einem Gauß-Strahl wurde von Keller et al. verwirklicht [25].

Eine andere Art selbstheilender und wenig divergenter Strahlen sind sogenannte Airy-Strahlen [27]. Wie Bessel-Strahlen besitzen auch Airy-Strahlen Nebenmaxima. Jedoch ist das transversale Strahlprofil asymmetrisch und der Strahlverlauf ist gekrümmt. Anders als bei Bessel-Strahlen können die Nebenringe, dank des asymmetrischen transversalen Strahlprofils, mit Hilfe einer Entfaltung, herausgefiltert werden [28].

Die Lichtscheibenmikroskopie kann auch mit einer nichtlinearen Zweiphotonenanregung kombiniert werden [29]. Mit dieser Technik kann die Eindringtiefe der Lichtscheibe im Vergleich zu einer Einzelphotonenanregung vergrößert werden, da bei vielen biologischen Proben die Eindringtiefe höherer Wellenlängen größer ist [29, 30]. Die Anregung außerhalb der Schärfeebene wird durch die quadratische Abhängigkeit der Anregung deutlich reduziert. Bei der Verwendung von Zwei-Photonen-Bessel-Strahlen kommt es durch die nichtlineare Anregung zu einer drastischen Verringerung der Anregung durch die Nebenringe [31].

Von Kumar et al. wurde das sogenannte diSPIM-Mikroskop entwickelt [32, 33]. Bei diesem Mikroskop wird durch zwei identische Beleuchtungspfade jeweils ein Lichtblatt erzeugt. Dabei kreuzen sich die beiden Lichtscheiben orthogonal zueinander. Die beiden verwendeten Objektive dienen zum einen als Beleuchtungsobjektiv und zum anderen als Detektionsobjektiv. Durch einen dichromatischen Spiegel sind Beleuchtungspfad und Detektionspfad voneinander getrennt. Da die Auflösung bei einem Lichtscheibenmikroskop im Allgemeinen nicht isotrop ist, sondern axial deutlich schlechter ist als lateral, kann eine isotrope Auflösung erreicht werden, wenn zwei Lichtscheiben sich orthogonal kreuzen. Durch einen Entfaltungsalgorithmus kann aus beiden Bildstapeln ein Bildstapel mit einer isotropen Auflösung gewonnen werden. Es konnte eine isotrope Auflösung von 330 nm erreicht werden. Diese Methode ist besonders bei kleinen, transparenten Proben mit einem Volumen bis zu $80 \times 80 \times 50 \mu\text{m}^3$ effektiv [34]. Für größere Proben wurde 2015 von Chhetri et al. ein Lichtscheibenmikroskop mit 4 Lichtblättern und 4 Kameras entwickelt [34], um eine isotrope Auflösung für Proben mit einer großen Ausdehnung, wie z. B. bei Zebrafischen, zu erreichen. Dieses Mikroskop wurde von den

Entwicklern IsoView-Mikroskop benannt. Das IsoView-Mikroskop erlaubt die Messung von 400-fach größeren Proben im Vergleich zum diSPIM-Mikroskop.

Viele Proben können erst durch eine chemische Behandlung untersucht werden, da diese ansonsten zu intransparent sind. Durch Klärmethoden können ganze Organe transparent gemacht werden [35]. In Kombination mit der Lichtscheibenmikroskopie können somit ganze Maushirne untersucht werden [7]. Die Klärung von biologischen Proben wird in Abschnitt 1.5 ausführlicher behandelt.

Damit möglichst viele Arbeitsgruppen in den Genuss der Lichtscheibenmikroskopie kommen, wurde das Projekt „OpenSPIM“ ins Leben gerufen [36]. Die kompletten Baupläne und die Ansteuerungssoftware für ein Lichtscheibenmikroskop sind für jedermann frei zugänglich. Das erste kommerzielle Lichtscheibenmikroskop wurde von der Firma Zeiss mit dem Lightsheet Z.1 2012 auf den Markt gebracht [37]. Die Lichtscheibenmikroskopie wurde 2014 von der Fachzeitschrift „Nature Methods“ zur Methode des Jahres gewählt [4]. Dies zeigt das große Potential der Lichtscheibenmikroskopie in der biologischen Forschung. Die Abbildung 1.3 zeigt die Anzahl der Suchergebnisse, welche beim Suchbegriff „light sheet microscopy“ in Google Scholar angezeigt werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Bedeutung der Lichtscheibenmikroskopie in den letzten Jahren stetig zugenommen hat.

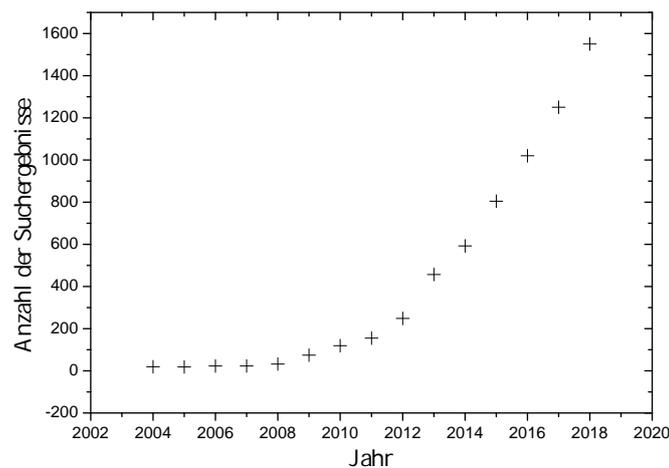


Abbildung 1.3: Die Abbildung zeigt den stetigen Anstieg an Publikationen mit dem Suchbegriff „light sheet microscopy“ bei Google Scholar. Ab 2010 nahmen die Publikationen mit Bezug zur Lichtscheibenmikroskopie schlagartig zu. Durch die Anführungszeichen im Suchbegriff werden nur Publikationen berücksichtigt, welche die genannten Wörter in dieser Reihenfolge beinhalten.

1.4 Ultramikroskopie

Das im Rahmen dieser Dissertation entwickelte Lichtscheibenmikroskop kann zur Unterart der Ultramikroskope gezählt werden. Der Begriff Ultramikroskop wurde speziell von der Arbeitsgruppe von Ulrich Dodt geprägt [7] und ist nicht zu verwechseln mit

dem Ultramikroskop von Siedentopf und Zsigmondy, welches im vorherigen Abschnitt besprochen wurde.

Bei der Ultramikroskopie werden Objektive mit einer geringen Vergrößerung und einer kleinen numerischen Apertur verwendet [38]. Durch die geringe Vergrößerung können große Proben mit einer lateralen Auflösung im Mikrometerbereich aufgenommen werden. Da die axiale Auflösung maßgeblich von der Dicke des Lichtblattes abhängt, kann mit Objektiven mit einer geringen numerischen Apertur eine befriedigende axiale Auflösung erreicht werden [38]. Außerdem ist zu beachten, dass die Empfindlichkeit gegenüber Inhomogenitäten in der Probe mit steigender numerischer Apertur zunimmt.

Die verwendeten Detektionsobjektive weisen häufig bezüglich der niedrigen Vergrößerung eine hohe numerische Apertur auf. Durch diese Eigenheit der Objektive wird oft das Nyquist-Kriterium verletzt [39]. In Unterabschnitt 4.3.1 wird näher auf das Nyquist-Kriterium eingegangen.

Des Weiteren können die verwendeten Klärmedien die Dichtungen von Objektiven angreifen. Seit 2016 gibt es spezielle kommerzielle Objektive für die Ultramikroskopie an geklärten Proben [40]. Außerdem müssen diese Objektive wegen der Probengröße einen großen Arbeitsabstand besitzen.

Die Kombination von geklärten Gehirnen und Ultramikroskopie erlaubt die dreidimensionale Darstellung von neuronalen Strukturen eines ganzen Gehirns [10]. Es ist somit möglich, neuronale Verbindungen im ganzen Gehirn zu bestimmen. Mit der Benutzung von zwei gegengerichteten Lichtscheiben können beide Gehirnhälften mit gleicher Qualität abgebildet werden, ohne die Probe drehen zu müssen [7].

Für die Lichtblatterzeugung beim ersten Ultramikroskop wurde eine Zylinderlinse verwendet [7]. Zylinderlinsen haben den Nachteil, eine gaußförmige Intensitätsverteilung der Lichtscheibe zu erzeugen, wenn wie in den meisten Fällen, ein aufgeweiteter Gauß-Strahl die Zylinderlinse trifft [3]. Mit der Verwendung von Powell-Linsen [41] können zweidimensionale Lichtblätter mit einer homogenen Intensität erzeugt werden [42]. Powell-Linsen (auch Liniengeneratorlinsen) erzeugen im Gegensatz zu normalen Zylinderlinsen ein Lichtblatt mit einer gleichmäßigen Intensitätsverteilung.

Ein Problem bei der Messung von geklärten Proben stellt die Autofluoreszenz des Gewebes dar. Diese Autofluoreszenz kann die Messung von z. B. fluoreszenzmarkierten Neuronen oder Axonen erschweren, da deren Fluoreszenzanteil von der Autofluoreszenz überlagert wird. Durch die Erzeugung von optischen Schnitten wird die Autofluoreszenz drastisch reduziert.

Beim Klärvorgang von Maushirnen kann es zu Deformationen kommen [43] und anatomische Grenzen sind nicht mehr sichtbar [10]. Dies kann eine präzise Lokalisierung von z. B. fluoreszenzmarkierten Neuronen im Gehirn behindern. Bei vielen Fragestellungen ist aber eine genaue Lokalisierung der verschiedenen Gehirnareale notwendig. Durch die Überlagerung mit Daten von einer Magnetresonanztomographie kann die jeweilige Gehirnregion genau bestimmt werden [10].

1.5 Klärung von biologischen Proben

Viele biologische Proben in der Ultramikroskopie müssen erst einmal für die verwendete Wellenlänge transparent gemacht werden [35]. Dabei ist zu beachten, dass z. B. Markierungen mit fluoreszierenden Farbstoffen nicht zerstört werden.

Biologische Proben bestehen aus verschiedenen Komponenten, welche jeweils einen unterschiedlichen Brechungsindex besitzen [44]. Dieser Mix von Komponenten mit unterschiedlichen Brechungsindizes führt zu einer dramatischen Abnahme der Transparenz. Der Brechungsindex von Wasser beträgt 1,33, Fibrillen und Lipidmembranen besitzen jedoch einen Brechungsindex von 1,39-1,47 [45]. Alle Klärmethoden verfolgen die Idee, den Brechungsindex einer Probe zu homogenisieren. Dabei können einzelne Komponenten entfernt, getauscht oder modifiziert werden [35].

Das erste Klärverfahren von Gewebe wurde von Werner Spalteholz im Jahr 1911 entwickelt [46]. Werner Spalteholzs Interesse galt der Untersuchung von Arterien im Herzen. Dabei bemerkte er, dass eine Klärung des Muskelgewebes sehr hilfreich für seine Arbeit wäre. Aus früheren Forschungen war ihm bekannt, dass Muskelgewebe durch Dehydration mit Alkohol, gefolgt von einer Behandlung mit Xylol und einer Lagerung in Kanadabalsam, transparent wird [46]. Jedoch waren die Ergebnisse für ganze Herzen ungenügend. Spalteholz fand heraus, dass Gewebe maximal transparent wird, wenn kein Licht an der Gewebeoberfläche reflektiert wird. Dies ist der Fall, wenn das Medium und das behandelte Gewebe den gleichen Brechungsindex besitzen. Spalteholz entwickelte eine Klärmethode, die auf Wintergrünöl und Benzoesäurebenzylester (BB) basiert, um eine optimale Transparenz von Muskelgewebe zu erreichen. Nachteilig ist die Schrumpfung der Probe nach dieser Behandlung.

Aus diesem Protokoll entwickelten sich weitere Protokolle, welche zwei Schritte enthielten: (1) Dehydrierung mit Auflösen von Lipiden und (2) weitere Auflösung von Lipiden mit einer Angleichung des Brechungsindex in einer Klärlösung [35].

2008 wurde von Becker et al. ein neues Klärprotokoll veröffentlicht [38]. Das Klärmedium besteht aus einem Teil Benzylalkohol (BA) und aus zwei Teilen Benzoesäurebenzylester (BB). Nach beiden Komponenten wird dieses Protokoll BABB-Protokoll genannt. Es erzielt eine exzellente Klärung von Maushirnen und Fruchtfliegen [7]. Auch bei diesem Protokoll kommt es zu einem Schrumpfen der Probe. Ein weiterer Nachteil dieser Klärmethode ist die Instabilität von fluoreszierenden Proteinen wie z. B. GFP. Bei der Dehydrierung selbst wird ein Großteil des GFP zerstört [47] und die verbleibende Fluoreszenz wird in wenigen Wochen zusätzlich drastisch reduziert.

Dieses Problem kann jedoch durch eine Stabilisierung des pH-Wertes behoben werden [47]. Durch die Verwendung von 1-Propanol oder tert-Butanol kann der Verlust während des Dehydrierungsschrittes verringert werden. Durch das Hinzufügen von Triethylamin kann der pH-Wert der BABB-Klärlösung auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt werden. Diese Methode wird als FluoClearBABB-Methode bezeichnet. Mit dieser Methode können Mausgehirne für mehrere Jahre gelagert werden, ohne dass die

Fluoreszenz drastisch reduziert wird. Dieses Protokoll ist auch für die Klärung von ganzen Rattenhirnen geeignet [48], wobei durch die stärkere Myelinisierung und Größe der Gehirne im Vergleich zu Maushirnen eine Klärung erschwert wird. Für stark myelinhaltige Proben (z. B. das zentrale Nervensystem) wurde das 3DISCO-Protokoll entwickelt [49].

Im Laufe der letzten Jahre wurden mehrere weitere Klärmethoden entwickelt. In dieser Dissertation wurden nur Proben, welche mit dem FluoClearBABB-Protokoll behandelt worden sind, untersucht. Welche Methode am besten geeignet ist, hängt von der jeweiligen Probe ab [50]. Auch unterscheiden sich die einzelnen Klärmethoden in Bezug auf die Aufwendigkeit/Kosten und Dauer der Klärung [35].

Die FluoClearBABB-Methode zeichnet sich durch eine relativ geringe Dauer des Klärvorgangs aus, selbst bei ganzen Rattengehirnen sind nur 8 Tage notwendig [48]. Jedoch sind nicht alle Kunststoffe resistent gegenüber der BABB-Lösung, so dass spezielle Objektive verwendet werden müssen. Ein anderer Nachteil kann das Schrumpfen der Probe sein. Jedoch kann dieses auch ein Vorteil bei der Untersuchung von großen Proben, wie z. B. bei kompletten erwachsenen Mäusen, darstellen (uDISCO-Protokoll) [51]. Mit diesem Protokoll kann die Probengröße bis zu 65% verkleinert werden. Durch die Dehydrierung werden die Proben hart und somit können auch lange Proben (z. B. die Wirbelsäule einer Maus) untersucht werden [51].

Für das Klären von ganzen Maushirnen gibt es außer der Verwendung von organischen Lösungsmitteln noch zwei weitere Ansätze.

Der erste Ansatz zielt auf die Entfernung von Lipiden und die Homogenisierung des Brechungsindex in der Probe durch eine hydrophile Lösung ab [35]. Durch die hydrophile Eigenschaft der Lösung bleiben die fluoreszierenden Proteine erhalten [52]. Die Klärlösung besteht häufig aus Harnstoff und einem Waschmittel (z. B. Triton X-100). Die beiden bekanntesten Protokolle dieser Art sind das CUBIC-Protokoll [52] und das Scale-Protokoll [53]. Jedoch sind diese Protokolle sehr zeitintensiv. Für ein ganzes Rattengehirn werden mit dem CUBIC-Protokoll 21 Tage benötigt [48]. Durch das richtige Verhältnis der einzelnen Komponenten bleibt die Originalgröße des Gewebes erhalten [53].

Der zweite Ansatz ist das Einbetten in einem Hydrogel. Bei diesem Ansatz werden die Proteine in einer Probe mit einem Hydrogel verbunden. Beim CLARITY-Protokoll besteht das Hydrogel aus Acrylamid, Bisacrylamid und Formaldehyd [54]. Durch passive Diffusion verlassen die nicht mit dem Hydrogel gebundenen Lipide das Gewebe (PACT) bzw. der Vorgang wird durch eine Elektrophorese (ACT) beschleunigt. Die meisten Proteine und Nukleinsäuren ändern sich durch die Verlinkung mit dem Hydrogel nicht. Für die Klärung mit einer Abwandlung vom passiven CLARITY-Protokoll werden für ein ganzes Rattengehirn 4-8 Wochen benötigt [48]. Beim CLARITY-Protokoll kommt es zu einer Expansion der Probe [35].

1.6 Sphärische Aberrationen in der Mikroskopie

Auf Grund der Tatsache, dass die BABB-Lösung einen hohen Brechungsindex von 1,56 aufweist, ist es notwendig, sich mit sphärischen Aberrationen zu beschäftigen [55]. Sphärische Aberrationen treten bei einem Übergang zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes (η_1 und η_2) auf [56]. Das Snelliussche Brechungsgesetz beschreibt die Beziehung zwischen dem Einfallswinkel α_1 und dem Winkel des gebrochenen Strahls α_2 :

$$\eta_1 \sin(\alpha_1) = \eta_2 \sin(\alpha_2) \quad (1.3)$$

Die Winkel beziehen sich auf das Lot. Durch die Nichtlinearität dieser Funktion kommt es zu sphärischen Aberrationen. Je größer der Einfallswinkel α_1 ist, desto mehr spielt diese Nichtlinearität eine Rolle. Bei einem fokussierten Strahlenbündel ist die Stärke der Winkeländerung des Strahls an der Grenzfläche abhängig von der Entfernung zum Lot. Bei einem kleinen Einfallswinkel kann die Beziehung zwischen beiden Winkeln als linear angenommen werden. Dies ist auch der Grund, weswegen sphärische Aberrationen erst bei einer bestimmten numerischen Apertur stark zunehmen. Die Abbildung 1.4 zeigt die Brechung an der Grenzfläche zwischen Luft und der Klärlösung.

Durch die Brechung kommt es zu einer Verschiebung des Brennpunktes um $\Delta d = \text{AFP} - \text{NFP}$, wobei AFP die aktuelle Fokusposition ist und NFP die nominale Fokusposition beschreibt. Die Beziehung zwischen AFP und NFP lautet:

$$\text{AFP} = \frac{\eta_2}{\eta_1} \text{NFP} \quad (1.4)$$

Um die Verschiebung Δd zu kompensieren, muss das Objektiv um die Strecke γ bewegt werden:

$$\gamma \approx \left(1 - \frac{\eta_1}{\eta_2}\right) \Delta d \quad (1.5)$$

Eine genaue Herleitung findet sich in der Dissertation von Eugen Baumgart [57]. Wie in der Gleichung erkenntlich, handelt es sich um eine Näherung. Bei der Herleitung wurde die Näherung $\frac{\tan(\alpha_1)}{\tan(\alpha_2)} \approx \frac{\sin(\alpha_1)}{\sin(\alpha_2)}$ verwendet [57]. Diese Änderung der Lage des Brennpunktes spielt bei der Beleuchtung der Probe eine große Rolle und wird im Abschnitt 2.1 aufgegriffen.

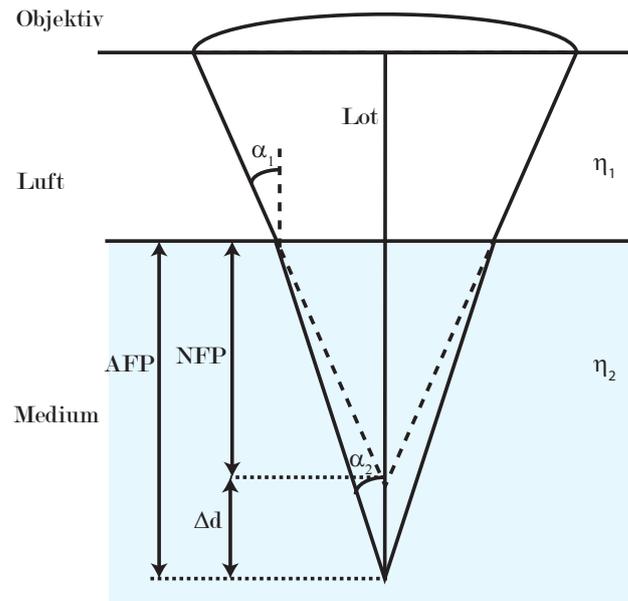


Abbildung 1.4: Durch die Änderung des Brechungsindex an der Grenzfläche zwischen Luft und dem Medium kommt es nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz zu einer Änderung des Winkels zwischen dem Lot und dem Strahl. Durch diese Veränderung ändert sich die Brennpunktposition des Objektivs. Die durchgezogene Linie zeigt den Strahlverlauf bei unterschiedlichen Brechungsindizes ($\eta_1 < \eta_2$). Die gestrichelte Linie stellt den Strahlverlauf bei einem gleichbleibenden Brechungsindex dar. NFP ist der Abstand zwischen Grenzfläche und Brennpunkt, wenn der Strahl nicht gebrochen wird. AFP ist die neue Entfernung zwischen Brennpunkt und Grenzfläche, wenn der Strahl gebrochen wird.

Durch diese nichtlineare Winkeländerung an der Grenzfläche treffen sich nicht alle Strahlen in einem Punkt. Es kommt somit zu einer Verwischung des Brennpunktes.

1.7 Die Aberrationsfunktion

Aberrationen können durch eine Aberrationsfunktion $\Psi(p, \text{NFP})$ beschrieben werden. Ziel ist es, eine Aberrationsfunktion $\Psi(p, \text{NFP})$ zu finden, welche nur von NFP und p abhängig ist [58], wobei p eine normalisierte Koordinate ist, die Werte von 0 bis 1 annehmen kann. Hierzu betrachten wir die Abbildung 1.5. In dieser Abbildung sind zwei Strahlen, die aus dem selben Punkt P kommen, dargestellt. Der Strahl a zeigt den Verlauf ohne eine Änderung des Brechungsindexes und Strahl b zeigt den Verlauf bei einer Änderung des Brechungsindexes. Beide Strahlen besitzen dieselbe numerische Apertur $NA = \eta_2 \sin(\theta_n)$. Nach der Grenzfläche verlaufen beide Strahlen parallel zueinander. Die Aberrationsfunktion $\Psi(p, \text{NFP})$ entspricht der Differenz der optischen Weglängen der Strecken l_1 und l_2 . Für die Ausbreitung in einem Medium mit dem Brechungsindex η innerhalb einer Strecke l gilt für die optische Weglänge L :

$$L = \eta l \quad (1.6)$$

Die optische Weglänge L ist die Streckenlänge, für die Licht im Vakuum die gleiche Zeit benötigt, wie in einem Medium mit dem Brechungsindex η . Das bedeutet, Strecken mit gleicher optischer Weglänge verfügen dementsprechend über die gleiche Anzahl an Wellenlängen und dieselbe Phaseänderung [59]. Nach dem Fermatschen Prinzip nimmt Licht stets den Weg mit der geringsten optischen Weglänge [59].

Berechnet man die Differenz der optischen Weglängen $\eta_1 l_1$ und $\eta_2 l_2$, so erhält man den Gangunterschied zwischen einem System mit Grenzfläche ($\eta_1 \neq \eta_2$) und einem ohne Grenzfläche ($\eta_1 = \eta_2$).

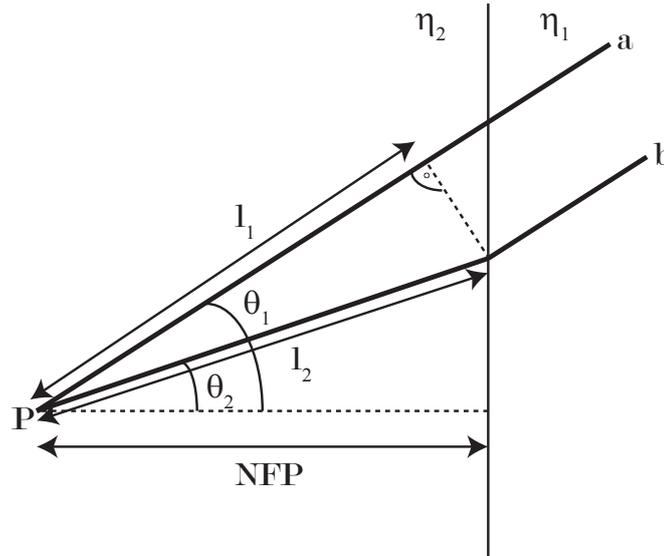


Abbildung 1.5: Strahl a zeigt den Verlauf ohne eine Änderung des Brechungsindex. Strahl b zeigt den Verlauf bei einer Änderung des Brechungsindex. Beide Strahlen starten von Punkt P und haben die gleiche NA. Anders als in der Publikation [58] beschrieben, gilt für diese Zeichnung $\eta_2 > \eta_1$. Nach [58].

Die Aberrationsfunktion $\Psi(p, \text{NFP})$ ist die Differenz zwischen beiden optischen Weglängen $\eta_1 l_1$ und $\eta_2 l_2$ [58]:

$$\Psi(p, \text{NFP}) = \eta_2 l_2 - \eta_1 l_1 \quad (1.7)$$

Für die Strecken l_1 und l_2 ergeben sich nach geometrischen Überlegungen folgende Zusammenhänge:

$$l_2 = \frac{\text{NFP}}{\cos(\theta_2)} \quad \text{und} \quad l_1 = l_2 \cos(\theta_1 - \theta_2) \quad (1.8)$$

Unter Berücksichtigung des Additionstheorems $\cos(x + y) = \cos(x)\cos(y) - \sin(x)\sin(y)$, der Beziehung $\sin^2(x) + \cos^2(x) = 1$ und des Snelliusschen Brechungsgesetzes $\eta_1 \sin(\theta_1) = \eta_2 \sin(\theta_2)$ ergibt sich für $\Psi(p, \text{NFP})$ [58]:

$$\Psi(p, \text{NFP}) = \text{NFP} (\eta_2 \cos(\theta_2) - \eta_1 \cos(\theta_1)) \quad (1.9)$$

Nun wird der normalisierte Radius $p = \frac{\sin(\theta_1)}{\sin(\alpha_1)}$ eingeführt, wobei α_1 der maximal mögliche Winkel ist, welcher durch die NA des Objektivs gegeben ist. Die Funktion

$\Psi(p, \text{NFP})$ kann jetzt als Funktion von NFP und p beschrieben werden [56]:

$$\Psi(p, \text{NFP}) = \text{NFP} \eta_1 \sin(\alpha_1) \left[\sqrt{\csc(\alpha_2)^2 - p^2} - \sqrt{\csc(\alpha_1) - p^2} \right] \quad (1.10)$$

Die Funktion $\csc(x) = \frac{1}{\sin(x)}$ ist die Kosekansfunktion und es wurde die Beziehung $\cos(x)^2 = 1 - \sin(x)^2$ verwendet. Die Beziehung zwischen α_1 und α_2 ist durch das Snelliussche Brechungsgesetz gegeben:

$$\eta_1 \sin(\alpha_1) = \eta_2 \sin(\alpha_2) \quad (1.11)$$

Die Aberrationsfunktion $\Psi(p, \text{NFP})$ kann als Summe aus Zernike-Polynomen $Z_n^m(p, \phi)$ dargestellt werden [60]. Diese Summe konvergiert schnell, so dass nur die ersten Terme berechnet werden müssen [56].

Zernike-Polynome sind orthogonal zueinander und werden mit einem hochgestellten und einem tiefgestellten Index beschrieben. Die tiefgestellte Zahl n entspricht dem höchsten Grad des Polynoms. Die hochgestellte Zahl m gibt die azimutale Ordnung an [61]. m ist stets gleich oder kleiner als n . $Z_n^m(p, \phi)$ ist eine Funktion der normalisierten radialen Länge p und dem azimutalen Winkel ϕ . Da das Problem nicht vom azimutalen Winkel abhängt, fallen alle Terme mit $m \neq 0$ weg [58]. Mit einer Linearkombination, bestehend aus Zernike-Polynomen können, Wellenfrontaberrationen beschrieben werden, wobei jedes einzelne Polynom einen optischen Abbildungsfehler beschreibt. Je höher die Ordnung der Polynome ist, desto komplexer ist der beschriebene Bildfehler. Die Darstellung von $\Psi(p, \text{NFP})$ mit den Zernike-Polynomen lautet [56]:

$$\Psi(p, \text{NFP}) = \text{NFP} \eta_1 \sin(\alpha_1) \left[\sum_{\substack{n=0 \\ n \text{ gerade}}}^{\infty} A_{n,0} Z_n^0(p) \right] \quad (1.12)$$

Die Zernike-Polynome mit $m = 0$ können durch folgende Funktion berechnet werden:

$$Z_n^0(p) = \sqrt{n+1} \sum_{\substack{s=0 \\ n \text{ gerade}}}^{n/2} \frac{(-1)^s (n-s)!}{s!(n/2-s)!^2} p^{n-2s} \quad (1.13)$$

Für die ersten vier geraden Zernike-Polynome mit $m = 0$ ergeben sich folgende Terme [56]:

n	$Z_n^0(p)$	Beschreibung
0	1	Konstante
2	$\sqrt{3}(2p^2 - 1)$	Defokussierung
4	$\sqrt{5}(6p^4 - 6p^2 + 1)$	Sphärische Aberration erster Ordnung
6	$\sqrt{7}(20p^6 - 30p^4 + 12p^2 - 1)$	Sphärische Aberration zweiter Ordnung

Tabelle 1.1: In der Tabelle sind die ersten vier geraden Zernike-Polynome mit $m = 0$ aufgelistet.

Das erste Polynom ist eine Konstante und verursacht keine Bildfehler. Der zweite Term beschreibt die Defokussierung. Dieser Abbildungsfehler kann durch eine einfache Fokussierung behoben werden. Die nachfolgenden Terme beschreiben verschiedene Ordnungen von sphärischen Aberrationen. Es zeigt sich, dass es ausreicht nur die 1. und 2. sphärische Ordnung zu betrachten (siehe Unterabschnitt 3.4.1). Diese Bildfehler können nicht einfach reduziert werden. Durch eine geschickte Auswahl von verschiedenen Linsen können die sphärischen Aberrationen jedoch kompensiert werden. Der Vorfaktor $A_{n,0}$ kann durch folgende Formel analytisch berechnet werden [58]:

$$A_{n,0} = B_n(\alpha_1) - B_n(\alpha_2) \quad (1.14)$$

Wobei für $B_n(\alpha)$ gilt:

$$B_n(\alpha) = \left[1 - \left(\frac{n-1}{n+3} \right) \tan^4 \left(\frac{\alpha}{2} \right) \right] \frac{\tan^{n-1} \left(\frac{\alpha}{2} \right)}{2(n-1)\sqrt{n+1}} \quad (1.15)$$

In Abbildung 1.6 sind die ersten vier geraden Zernike-Polynome mit $m = 0$ abgebildet.

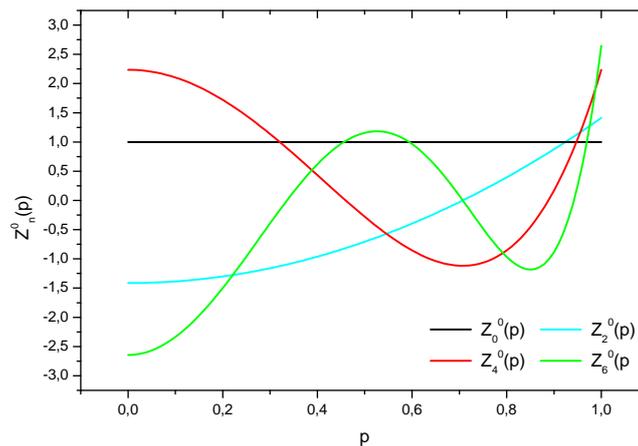


Abbildung 1.6: Die Abbildung zeigt die ersten vier geraden Zernike-Polynome mit $m = 0$. Die Formeln für die einzelnen Polynome können der Tabelle 1.1 entnommen werden.

1.8 Abhängigkeit der Punktstreiffunktion von sphärischen Aberrationen

Die Punktstreiffunktion (PSF) beschreibt, wie eine punktförmige Lichtquelle von einem optischen System abgebildet wird [59]. Eine mikroskopische Aufnahme ist immer eine Faltung zwischen der Objektfunktion und der Punktstreiffunktion. Im Idealfall ist die Ausdehnung der Punktstreiffunktion nur durch die Beugungseigenschaft des Lichts bestimmt. Jedoch können Aberrationen die Punktstreiffunktion in alle Raumrichtungen verbreitern. Es kommt zu einer Verschlechterung der Aufnahmequalität des

Mikroskops. Für ein Objektiv mit der numerischen Apertur $NA = \eta \sin(\alpha)$ kann die Abbildungspunktspreizfunktion $I_{Abb.}(v, u, \text{NFP})$ analytisch berechnet werden [56]:

$$I_{Abb.}(v, u, \text{NFP}) = \left| \int_0^1 P(p, \text{NFP}) \exp\left(i \frac{up^2}{2}\right) J_0(pv) p dp \right|^2 \quad (1.16)$$

v ist die laterale optische Einheit:

$$v = \frac{2\pi\eta r}{\lambda} \sin(\alpha) \quad (1.17)$$

u ist die axiale optische Einheit:

$$u = \frac{8\pi\eta z}{\lambda} \sin\left(\frac{\alpha}{2}\right)^2 \quad (1.18)$$

r und z sind die radiale bzw. axiale Entfernung zum Koordinatenursprung. $J_0(x)$ ist die Bessel-Funktion erster Art, 0. Ordnung. $P(p, \text{NFP})$ ist die Pupillenfunktion und berücksichtigt mögliche Aberrationen. Der Zusammenhang zwischen der Pupillenfunktion $P(p, \text{NFP})$ und der Aberrationsfunktion $\Psi(p, \text{NFP})$ lautet [56]:

$$P(p, \text{NFP}) = \exp\left[i \frac{2\pi}{\lambda} \Psi(p, \text{NFP})\right] \quad (1.19)$$

Für eine aberrationsfreie Abbildung ist $P(p, \text{NFP})$ gleich 1. Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass es im Falle einer planaren Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes möglich ist, einen analytischen Ausdruck für die Aberrationsfunktion zu finden. Somit ist eine Abschätzung über die Auswirkung von sphärischen Aberrationen auf die Punktspreizfunktion möglich.

In der lateralen Ebene mit $z = 0$ kann die zweidimensionale aberrationsfreie Detektionspunktspreizfunktion $I_{Abb.}(v, 0)$ wie folgt beschrieben werden [62]:

$$I_{Abb.}(v, 0) = \left(\frac{2J_1(v)}{v}\right)^2 \quad (1.20)$$

$J_1(x)$ ist die Bessel-Funktion erster Art, 1. Ordnung.

Für die axiale Richtung mit $r = 0$ kann $I_{Abb.}(0, u)$ durch folgenden Ausdruck beschrieben werden [62]:

$$I_{Abb.}(0, u) = \left(\frac{\sin(u/4)}{(u/4)}\right)^2 \quad (1.21)$$

Die totale Punktspreizfunktion I_{total} ist das Produkt aus der Abbildungspunktspreizfunktion $I_{Abb.}$ und der Beleuchtungspunktspreizfunktion $I_{Bel.}$ [55]. Für ein Lichtscheibenmikroskop mit einem gaußförmigen Strahlprofil ist die Beleuchtungspunktspreizfunktion gegeben durch [62]:

$$I_{Bel.} = \exp\left(-\frac{2z^2}{w_0^2}\right) \quad (1.22)$$

Wobei bei w_0^2 die Intensität des Strahls um e^2 abgesunken ist. Somit ergibt sich für die totale Punktspreizfunktion I_{total} folgende Formel:

$$I_{total} = I_{Abb.} \exp\left(-\frac{2z^2}{w_0^2}\right) \quad (1.23)$$

1.9 Laterale und axiale Auflösung

In diesem Abschnitt wird die Auflösung von selbstleuchtenden Objekten betrachtet. Die laterale Auflösung eines Lichtscheibenmikroskops wird durch die numerische Apertur NA bestimmt. Die laterale Punktspreizfunktion besitzt ein Hauptmaximum mit mehreren konzentrischen Ringen. Das Rayleigh-Kriterium definiert die laterale Auflösung als den Abstand zwischen dem Hauptmaximum und dem ersten Minimum [59]. Zwei selbstleuchtende Punkte müssen also diesen Abstand zueinander haben, um getrennt aufgelöst zu werden. Die Abbildung 1.7 verdeutlicht das Rayleigh-Kriterium. Die laterale Auflösung unter dem Rayleigh-Kriterium kann folgendermaßen berechnet werden [63]:

$$d_{\text{Rayleigh}} = \frac{0,61\lambda}{NA} \quad (1.24)$$

Experimentell ist es einfacher, die Halbwertsbreite einer lateralen Punktspreizfunktion zu messen. Die Halbwertsbreite für einen selbstleuchtenden Punkt ergibt sich durch folgende Gleichung:

$$d_{\text{FWHM,xy}} = \frac{0,51\lambda}{NA} \quad (1.25)$$

Die Beziehung d_{Rayleigh} und $d_{\text{FWHM,xy}}$ ist mit guter Näherung:

$$d_{\text{Rayleigh}} = 1,2 d_{\text{FWHM,xy}} \quad (1.26)$$

Im Abschnitt 4.3.1 wird auf den Einfluss der Bildpunktgröße des Bildsensors auf die laterale Auflösung eingegangen.

Die axiale Auflösung eines Lichtscheibenmikroskops ist zum einen von der numerischen Apertur des Detektionsobjektivs und zum anderen vom Tailenradius ω des Lichtblattes abhängig [55]. Für eine Punktquelle ergibt sich bei einer homogenen Beleuchtung eine axiale Halbwertsbreite von [63]:

$$d_{\text{FWHM,z}} = \frac{0,88\lambda}{\eta - \sqrt{\eta^2 - NA^2}} \quad (1.27)$$

Wobei η der Brechungsindex des Mediums ist, in der sich die Punktquelle befindet. Durch die Beleuchtung mit einem dünnen Lichtblatt kann die axiale Halbwertsbreite der totalen axialen Punktspreizfunktion verringert werden.

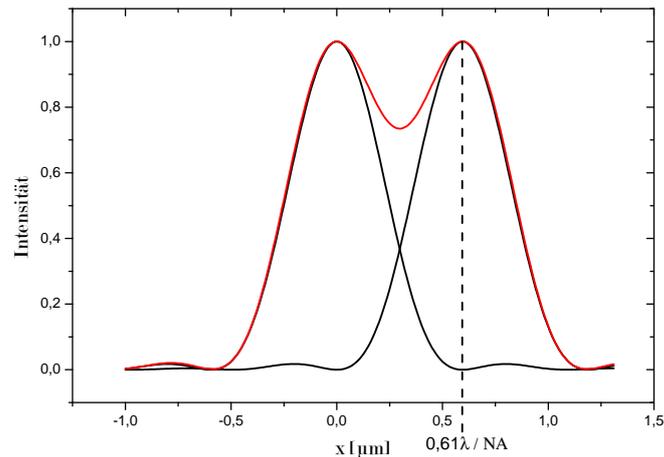


Abbildung 1.7: Veranschaulichung des Rayleigh-Kriteriums für die laterale Auflösung d_{Rayleigh} eines Mikroskops. Die rote Kurve ist die Summe von zwei Helligkeitsverteilungen zweier benachbarter Punkte, die nach diesem Kriterium aufgelöst werden können. Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Position des ersten Minimums der linken lateralen Punktspreizfunktion.

1.10 Fokusstabilisierung in der Mikroskopie

Für die Qualität der Bildaufnahme ist entscheidend, ob sich das Zentrum des Lichtblattes im Fokus des Detektionsobjektivs befindet. Gerade bei Messungen über einen längeren Zeitraum kann es zu einem Verlust der Bildqualität durch Defokussierung z. B. durch thermischen Drift kommen. Die Schärfentiefe d_{ST} ist die axiale Ausdehnung, in der die Probe scharf abgebildet wird. Diese ist abhängig von der NA des Detektionsobjektivs, dem Brechungsindex des Mediums η , der Wellenlänge λ , der Vergrößerung M und schließlich der Breite e einer Zelle des Bildsensors [64]:

$$d_{ST} = \frac{\lambda\eta}{NA^2} + \frac{\eta}{M \cdot NA} e \quad (1.28)$$

Der erste Term beschreibt die beugungsbedingte Schärfentiefe bei einem Detektor mit einer infinitesimal kleinen Zellengröße. Der zweite Term beschreibt den Einfluss der Zellenbreite des Sensors. Je größer die Zellenbreite e , desto unempfindlicher ist die Änderung der Bildschärfe gegenüber einer Defokussierung.

Bei Messungen mit einem Deckglas oder wenn sich die Probe auf einem Objektträger befindet, kann die Glasgrenzschicht für die Fokusstabilisierung ausgenutzt werden [65]. Ein Infrarotstrahl, welcher durch das Detektionsobjektiv transmittiert wird, wird von der planaren Grenzfläche reflektiert. Ein Detektor misst die Position des reflektierten Strahls. Kommt es zu einer Änderung des Abstandes zwischen Grenzfläche und Objektiv, ändert sich auch die Position des reflektierten Strahls. Bei einer Änderung der Strahlposition wird die Objektivposition geändert, bis der Strahl wieder auf die alte Position trifft. Diese Methode ist jedoch nicht praktikabel, wenn die gemessene Ebene in der Probe sich dauernd ändert, bzw. wenn überhaupt keine geeignete Grenzfläche

vorhanden ist [66]. Bei der Lichtscheibenmikroskopie ist dies häufig der Fall. Hier bietet sich die Verwendung der Kontrastmethode an. Dabei werden Bilder mit unterschiedlichen Abständen zwischen Detektionsobjektiv und Probe [67] aufgenommen. Dieser gewonnene Bildstapel wird daraufhin ausgewertet. Durch den Vergleich zwischen mehreren Aufnahmen ist es möglich, die beste Fokusposition zu bestimmen. Auch ist es möglich, diese Methode mit dem Fibonacci-Suchalgorithmus [68, 69] zu verbinden, um die Anzahl der benötigten Bilder zu verringern. Bei diesem Algorithmus wird versucht, mit möglichst wenigen Aufnahmen die beste Fokusposition zu bestimmen. Für diese Methode wurden verschiedene Fokusfunktionen, um die Bildqualität zu bestimmen, entwickelt. Am Ende dieses Abschnittes werden die bekanntesten Fokusfunktionen erläutert. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass mehrere Bilder aufgenommen werden müssen, dieses kann bei lichtempfindlichen Proben zu Problemen führen, da es zu einer längeren Beleuchtung der Probe führt. Da mehrere Aufnahmen benötigt werden, ist diese Methode relativ langsam.

Royer et al. benutzten die Kontrastmethode bei der Untersuchung von Zebrafischlarven über einen längeren Zeitraum mittels Lichtscheibenmikroskopie [70, 71]. Mit der entwickelten Software wurden bis zu 10 Freiheitsgrade mit jeweils zwei Beleuchtungspfaden und Detektionspfaden (z. B. Neigungswinkel des Lichtblattes) optimiert, um eine Probe in einer zylinderförmigen Küvette mit hoher Qualität abzubilden. Bei der Publikation von Royer et al. werden für die automatische Fokussierung jedoch mehrere Aufnahmen benötigt. Für die Kontrastmethode gibt es mehrere Fokusfunktionen, die verwendet werden können, um die beste Position des Detektionsobjektivs zu finden. Eine Fokusfunktion sollte folgende drei Punkte befolgen [69]:

1. Die Fokusfunktion sollte möglichst schnell berechenbar sein, um eine schnelle Fokussierung zu erreichen.
2. Der Wert der Fokusfunktion sollte in Abhängigkeit der Fokussierung monoton wachsen bzw. fallen und die Lage des Maximums sollte eindeutig sein.
3. Die Fokusfunktion sollte robust gegenüber zusätzlichem Rauschen sein.

Royer et al. teilten die Fokusfunktionen in vier Klassen ein [72]. Es sei angemerkt, dass sich die Einteilung der Fokusfunktionen in Klassen innerhalb verschiedener Publikationen von unterschiedlichen Autoren unterscheidet [73, 74].

Bei der ersten Klasse wird der Gradient zwischen den Bildpunkten betrachtet. Die zweite Klasse benutzt Korrelationen zwischen benachbarten Bildpunkten. Die dritte Art verwendet einen statistischen Ansatz über die Gesamtheit der Bildpunkte. Die letzte behandelte Klasse verwendet eine spektrale Untersuchung der Aufnahmen. $f(x, y)$ beschreibt die Grauwerte in einem Bild mit der Größe von $M \times N$ Bildpunkten.

Gradient:

Bei der ersten Klasse wird der Gradient zwischen jeweils zwei Bildpunkten betrachtet. Hierzu wird die Differenz zwischen benachbarten oder weiter voneinander liegenden Bildpunkten betrachtet oder es wird eine Kantendetektion (z. B. Sobel-Filter oder Laplace-Filter) verwendet. Nachteilig ist, dass der Gradient sehr sensitiv gegenüber Rauschen ist [70]. Um diese Empfindlichkeit zu verringern, kann zunächst ein Tiefpassfilter verwendet werden [75].

Bezeichnung der Fokusfunktion	Formel
Brenner [76]	$\sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-3} (f(x, y+2) - f(x, y))^2$
Squared Gradient	$\sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-2} (f(x, y+1) - f(x, y))^2$
Tenengrad [69]	$\sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-1} (S_x(x, y) + S_y(x, y))$

Tabelle 1.2: In der Tabelle sind drei Beispiele für Fokusfunktionen, welche auf Bildung eines Gradienten beruhen, aufgelistet. S_x und S_y sind die Bilder nach der Faltung mit den Sobel-Operatoren.

Korrelation:

Ein anderer Ansatz ist die Berechnung von Korrelationen zwischen den einzelnen Bildpunktswerten. Der Vorteil dieser Methode ist ihre Robustheit gegenüber Rauschen. Das Rauschen wird bei der Bildung der Korrelation herausgemittelt [77]. Die beiden bekanntesten Funktionen sind die von Vollath entwickelten $F4$ - und $F5$ -Funktionen (siehe Tabelle 1.3) [78]. Bei diesem Ansatz wird angenommen, dass die Korrelation zwischen benachbarten Bildpunkten weniger stark ist, wenn sich die Probe im Fokus befindet. Korrelative Fokusfunktionen scheinen sich besonders für kontrastarme Proben zu eignen [79].

Bezeichnung der Fokusfunktion	Formel
$F4$	$\sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-3} (f(x, y) f(x, y+1) - f(x, y+2))$
$F5$	$\sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-2} (f(x, y) f(x, y+1)) - MN\mu^2$

Tabelle 1.3: In der Tabelle sind zwei Fokusfunktionen aufgelistet, welche Korrelationen zwischen benachbarten Bildpunkten untersuchen. μ ist der Intensitätsmittelwert.

Statistischer Ansatz:

Ein weiterer Ansatz ist eine statistische Bildanalyse. Hierzu wird eine statistische Größe berechnet (z. B. Mittelwert oder Varianz). Diese zeichnet sich häufig durch schnelle Berechenbarkeit aus.

Bezeichnung der Fokusfunktion	Formel
Intensitätsmittelwert	$\frac{1}{NM} \sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-1} (f(x, y))$
Maximale Intensität	$Max(f(x, y))$
Varianz	$\frac{1}{NM} \sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-1} (f(x, y) - \mu)^2$

Tabelle 1.4: In der Tabelle sind drei Fokusfunktionen aufgelistet, welche sich auf statistische Größen beziehen. μ ist der Mittelwert der Bildpunkte.

Spektraler Ansatz:

Der letzte genannte Ansatz ist die spektrale Untersuchung der Bilder. Dabei wird bei den Aufnahmen eine Transformation durchgeführt. Beispiele solcher Transformationen sind: Diskrete Fourier-Transformation (DFT), Diskrete Kosinus-Transformation (DCT) [80] oder die Diskrete Wavelet-Transformation (DWT). Für die transformierten Bilder können verschiedene Entropien berechnet werden, z. B. die Shannon-Entropie oder die Bayes-Entropie. Bei einem unscharfen Bild besitzt das transformierte Bild einen großen Anteil von kleinen Frequenzen und bei einem scharfen Bild besitzt das transformierte Bild eher ein gleichmäßiges Spektrum über alle möglichen Frequenzen [80] und besitzt somit eine größere Entropie. Je fokussierter das Bild ist, desto größer ist die Entropie des transformierten Bildes. Ein großer Nachteil ist die Rechenzeit, welche für die Transformationen benötigt wird.

2 Aufbau des Mikroskops

2.1 Anforderungen an das Mikroskop

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Lichtscheibenmikroskop gebaut, welches mehreren Anforderungen gerecht werden soll. Es dient zur Untersuchung von Maushirnen, die nach dem FluoClearBABB-Protokoll geklärt wurden. Als Ansatz wurde das Lichtscheibenmikroskop, welches von Schwarz et al. entwickelt wurde [47], gewählt. Jedoch wurden diverse Komponenten geändert. In Abschnitt 6.8 werden die Unterschiede ausführlich diskutiert.

Geklärte Maushirne besitzen eine typische Ausdehnung von $7 \times 13 \times 5 \text{ mm}^3$. Eine totale optische Vergrößerung von 4x bei einer numerischen Apertur von 0,3 erscheint für die Messung eines kompletten Gehirns als vernünftig [47]. Es ist zu beachten, dass bei einer hohen Vergrößerung die Datenmenge drastisch zunimmt, da mehr Bilder aufgenommen werden müssen. Für Teilausschnitte ist jedoch eine hohe Auflösung wünschenswert, deshalb muss ein schnelles Wechseln des Beleuchtungsobjektivs möglich sein.

Um eine gleichmäßige Beleuchtung entlang der Scanrichtung zu erreichen, wird die Lichtscheibe durch einen gescannten fokussierten Laserstrahl erzeugt. Durch diese Bauweise kann die Beleuchtungsbreite in Scanrichtung über einen großen Bereich eingestellt werden und für jedes verwendete Detektionsobjektiv kann somit die passende Beleuchtungsbreite gewählt werden. Das Mikroskop wurde für eine maximale Beleuchtungsbreite von 13,312 mm bei einer Vergrößerung von 1x ausgelegt.

Durch Streuungen in der Probe kann es zur Bildung von Streifenartefakten kommen. Die Probe ist zwar geklärt, jedoch ist diese nicht vollständig transparent und es sind immer noch Streuzentren vorhanden. Durch eine Schwenkung des Lichtblattes während der Bildaufnahme können Streifenartefakte deutlich reduziert werden [47,81]. Die Reduktion von Streifenartefakten durch eine Schwenkung des Lichtblattes wird in Abbildung 2.1 verdeutlicht. Es ist auch möglich, Streifenartefakte durch eine spätere Bildbearbeitung zu entfernen [82,83]. Die verwendeten Algorithmen beruhen häufig auf der Verwendung von Fourier-Transformationen. Jedoch würde diese zusätzliche Bildbearbeitung einen größeren Zeit- und Arbeitsaufwand bedeuten.

Wegen der imperfekten Transparenz des Gehirns ist es nicht möglich, beide Gehirnhälften mit einer Beleuchtungsseite aufzunehmen, ohne die Probe zu drehen. Deshalb wurde eine beidseitige Beleuchtung installiert. Für Messungen in der Gehirnmittte ist

es möglich, jeweils ein Bild von jeder Seite aufzunehmen. Das resultierende Bild kann durch Mittelung der beiden Bilder entstehen oder der höhere Intensitätswert von beiden Aufnahmen wird verwendet.

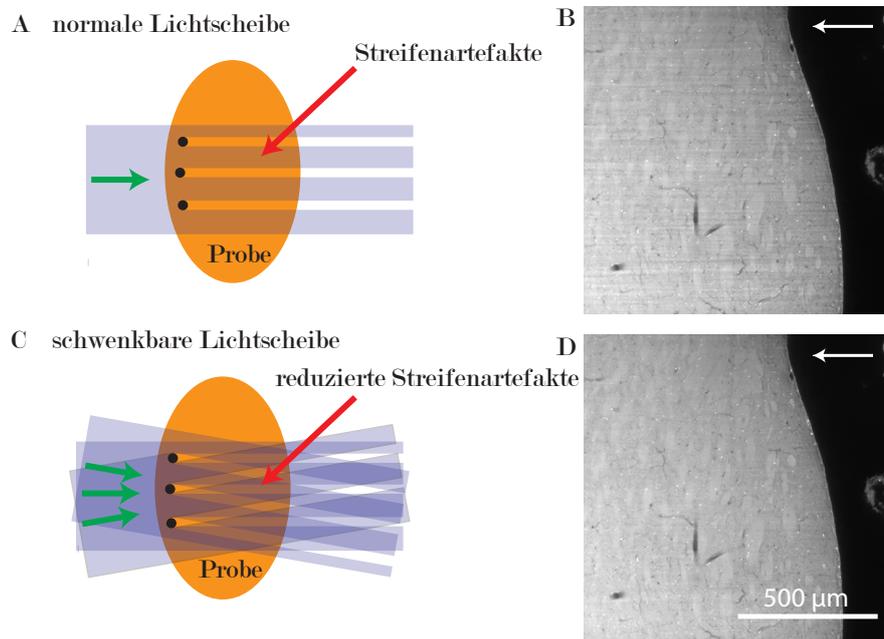


Abbildung 2.1: **A** Durch Streuung an Streuzentren (schwarze Punkte) in der Probe können Streifenartefakte entstehen. **C** Durch Schwenken der Lichtscheibe während der Aufnahme können Streifenartefakte nach den Streuzentren reduziert werden. **B** Aufnahme von einem geklärten Maushirn ohne Schwenkung der Lichtscheibe. **D** Aufnahme vom selben Bereich mit Schwenkung der Lichtscheibe. Der weiße Pfeil gibt die Beleuchtungsrichtung an.

Durch die Größe der Probe ist es notwendig, mehrere Bildstapel aufzunehmen, die nach der Messung zusammengefügt werden. Deshalb muss während der Messung die Probenposition geändert werden. Durch die Bewegung der Küvette in der x-Richtung kommt es wegen der unterschiedlichen Brechungsindizes von Luft und der BABB-Lösung zur Änderung der Strahltaillenposition (Abbildung 2.2). Aus diesem Grund muss eine Verschiebung der Strahltaille während der Messung möglich sein. Diese Verschiebung kann durch eine Verschiebung des Beleuchtungsobjektivs erreicht werden. Wird die Küvette in x-Richtung um $\Delta x_{\text{Küvette}}$ bewegt, so muss die Position des Beleuchtungsobjektivs um Δx_{BO} geändert werden [57]:

$$\Delta x_{\text{BO}} = \left(1 - \frac{1}{\eta_{\text{BABB}}}\right) \Delta x_{\text{Küvette}} \quad (2.1)$$

Die verwendeten Detektionsobjektive dürfen nicht empfindlich gegenüber der BABB-Lösung sein. Deshalb wurden spezielle Eintauchobjektive für das Mikroskop verwendet.

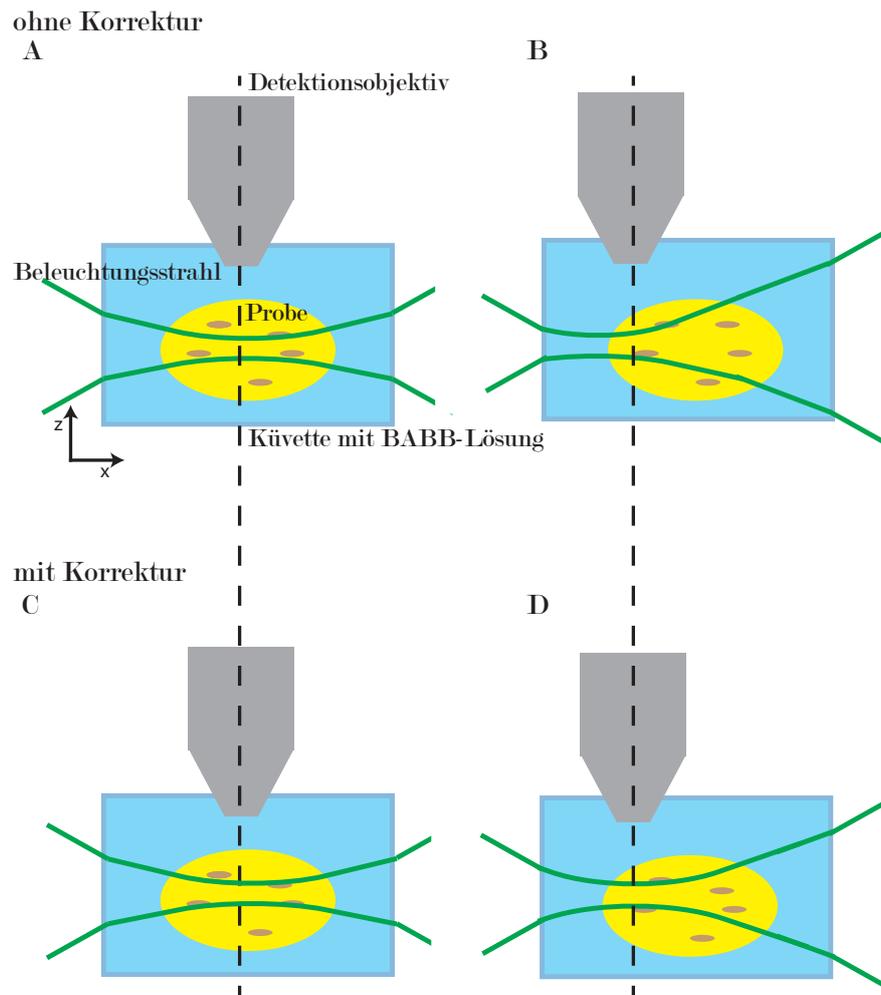


Abbildung 2.2: Korrektur der Beleuchtung: Durch die unterschiedlichen Brechungsindizes der BABB-Lösung und Luft kommt es zu einer Verschiebung der Strahlteile bei einer Bewegung der Küvette in x-Richtung. **A** und **B** Die Strahlteile und das Detektionsobjektiv liegen bei einer Bewegung der Küvette in x-Richtung nicht mehr auf einer Linie. **C** und **D** Durch die Bewegung des Beleuchtungsobjektivs kann diese Verschiebung kompensiert werden.

2.2 Grundlegender Aufbau des Mikroskops

2.2.1 Beleuchtungseinheit

Die Abbildung 2.3 zeigt eine Aufsicht der Beleuchtungseinheit. Der Laserstrahl wird aus einer Einzelmodenfaser emittiert. Durch diese Einkopplung mit einer Faser erreicht man eine genaue Überlagerung von mehreren Lasern und eine klar definierte TEM_{00} -Mode als transversale Ausgangsmode. Der Strahldurchmesser wird mit einem Strahlaufweiter um den Faktor 20 vergrößert. Dies hat den Vorteil, dass mit einer motorisierten Iris der Strahltaillenradius für die Beleuchtung eingestellt werden kann.

Um die Möglichkeit der beidseitigen Beleuchtung zu realisieren, wird der Strahl mit

einem Strahlteiler in zwei Strahlen mit gleicher Intensität geteilt. Beide Strahlen durchlaufen einen optischen Chopper, welcher mit der Kamera synchronisiert ist. Der Chopper kann mit einem Schrittmotor auf drei Positionen gefahren werden. Bei beiden äußeren Positionen wird die Probe durchgehend nur von einer Seite beleuchtet. Befindet sich der optische Chopper in der mittleren Position, können Aufnahmen von beiden Beleuchtungsseiten gemacht werden. Die Zeichnung 2.4 verdeutlicht die drei möglichen Positionen des optischen Choppers.

Das erste Galvanometer (Galvanometer 1) ist für die Erzeugung der Lichtscheibe notwendig. Das Galvanometer befindet sich im hinteren Brennpunkt der Linse 1.

Das Galvanometer nach der ersten Linse (Galvanometer 2) ist für die Schwenkung des Lichtblattes notwendig. Dieses Galvanometer befindet sich im hinteren Brennpunkt der Linse 2. Hinter Linse 2 befindet sich das Beleuchtungsobjektiv. Beim Beleuchtungsobjektiv handelt es sich um ein Luftobjektiv mit einem großen Arbeitsabstand. Alle Galvanometer und Linsen befinden sich auf einem motorisierten Linearversteller, um die x-Position der Strahltaile ändern zu können.

Die Probe befindet sich in einer Küvette aus Quarzglas. Die linke Seite zeigt den Einfluss des ersten Galvanometers. Die rechte Seite zeigt den Einfluss des zweiten Galvanometers. Die Abbildung 2.6 im Unterabschnitt 2.3.1 zeigt eine 3D-Ansicht der Beleuchtungseinheit.

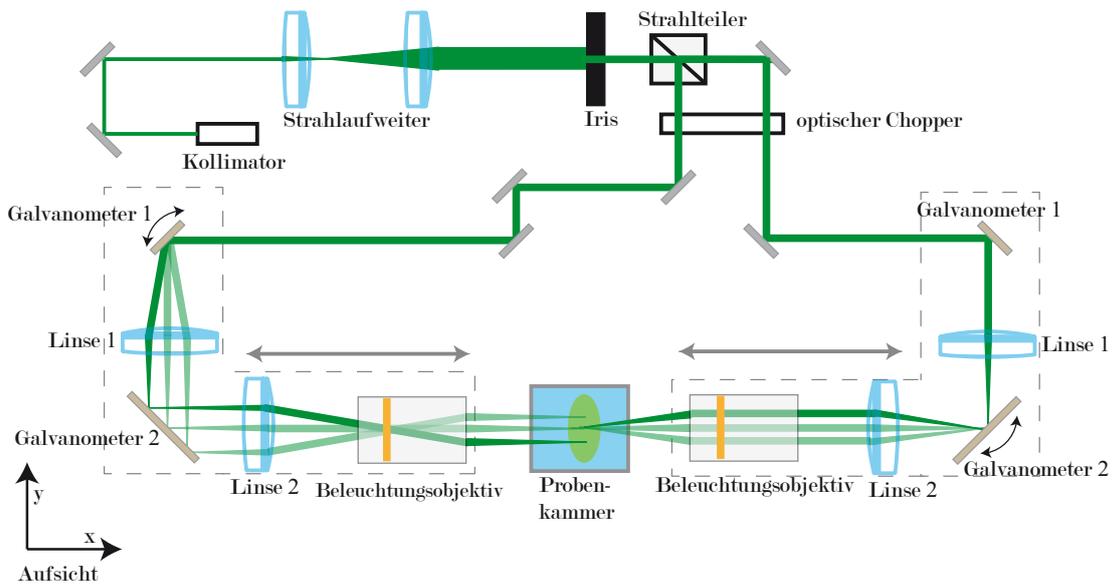


Abbildung 2.3: Aufsicht des Strahlengangs: Der kollimierte Strahl wird mit einem Strahlaufler aufgeweitet. Mit der Iris kann der gewünschte Strahldurchmesser ausgewählt werden. Die linke Seite zeigt die Auswirkung des Galvanometers 1. Die Galvanometer 1 sind für die Erzeugung der Lichtblätter zuständig. Die rechte Seite zeigt die Auswirkung des Galvanometers 2. Die Bewegung der Galvanometer 2 erzeugen ein Schwenken der jeweiligen Lichtscheibe.

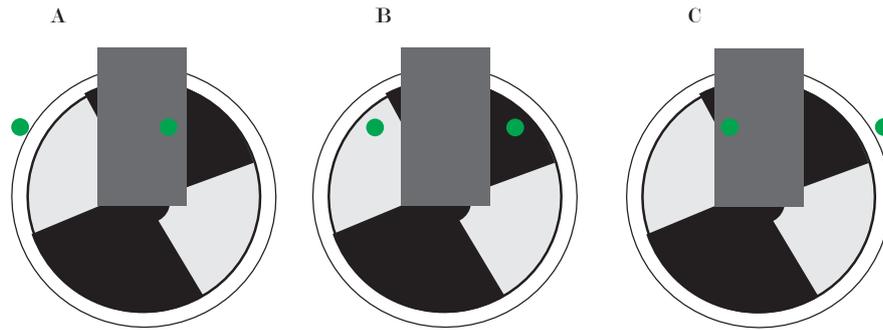


Abbildung 2.4: Die Zeichnung zeigt die drei möglichen Positionen des optischen Choppers. Bei **A** wird der rechte Strahl blockiert und der linke Strahl wird vom Chopper nicht beeinträchtigt. **C** zeigt den umgekehrten Fall. Bei **B** werden beide Strahlen zu unterschiedlichen Zeitpunkten blockiert.

2.2.2 Detektionseinheit

Das emittierte Fluoreszenzlicht wird von einem Objektiv gesammelt. Mit Hilfe eines Linearverstellers kann das Objektiv in z-Richtung bewegt werden. Alle verwendeten Objektive sind unendlich korrigiert. Zwischen Detektionsobjektiv und Tubuslinse befindet sich der Emissionsfilter, der nur das Fluoreszenzlicht transmittiert. Die Filter können während einer Messung automatisch gewechselt werden. Somit sind Messungen mit mehreren Farbkanälen möglich. Hinter dem Filter befindet sich eine Tubuslinse, die ein Bild auf den sCMOS-Bildsensor der Kamera projiziert. Abbildung 2.5 zeigt die Seitenansicht der Detektionseinheit. Die Abbildung 2.7 im Unterabschnitt 2.3.2 zeigt eine 3D-Ansicht der Detektionseinheit.

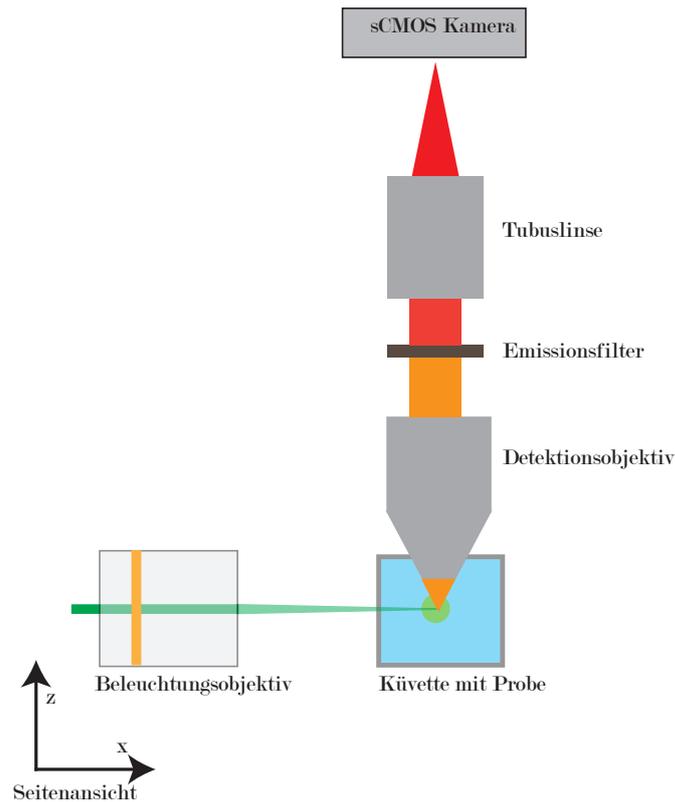


Abbildung 2.5: Seitenansicht der Detektionseinheit: Das Lichtblatt befindet sich im Fokus des Detektionsobjektivs. Durch einen Emissionsfilter wird nur das Fluoreszenzlicht transmittiert. Die Tubuslinse projiziert ein reelles Bild auf den Bildsensor.

2.3 Verwendete Komponenten

2.3.1 Komponenten der Beleuchtungseinheit

Das Mikroskop wurde auf einen optischen Tisch (M-VIS3648-PG2-325A, Newport) mit einer Luftdämpfung aufgebaut (siehe Abbildung 2.6).

Für die Beleuchtung steht eine Laserbox (LightHub Compact Laser Combiner, Omicron) mit 3 Lasern mit unterschiedlichen Wellenlängen (488 nm, 561 nm und 633 nm) zur Verfügung. Die Laser mit einer Anregung von 488 nm (LuxXplus 488-100, Omicron) und 633 nm (LuxXplus 633-100, Omicron) sind reine Diodenlaser. Für die Anregung bei 561 nm wird ein diodengepumpter Festkörperlaser verwendet (DPSS 561-100, Coherent). Alle Laser können mit einem analogen oder digitalen Signal angesteuert werden. Die beiden Diodenlaser können jeweils mit einer Frequenz von 250 MHz angesteuert werden. Der DPSS-Laser kann mit 50 kHz moduliert werden. Die 50 kHz reichen für diese Anwendung komplett aus. Die Laserstrahlen werden in der Box in eine zwei Meter lange polarisationserhaltende Einmodenfaser eingekoppelt. Am anderen Ende der Faser befindet sich ein Kollimator. Die drei Laserstrahlen besitzen hinter dem Kollima-

tor folgende Eigenschaften:

Laser	Wellenlänge [nm]	Strahldurchmesser ($1/e^2$) [mm]	M^2	Divergenz [mrad]
LuxXplus 488-100	488	0,68	1,09	1,16
LuxXplus 633-100	633	0,69	1,06	1,12
DPSS 561-100	561	0,7	1,06	1,20

Tabelle 2.1: In der Tabelle sind die für die drei vorhandenen Laser wichtigsten physikalischen Größen eingetragen. Die Werte wurden vor der Auslieferung vom Hersteller gemessen.

M^2 ist die Beugungsmaßzahl und ist der Quotient vom Divergenzwinkel eines realen Lasers φ_{real} und dem Divergenzwinkel eines idealen Gauß-Strahls $\varphi_{\text{Gauß}}$ mit dem gleichen Durchmesser an der Strahltaile [84].

$$M^2 = \frac{\varphi_{\text{real}}}{\varphi_{\text{Gauß}}} \quad (2.2)$$

Der Kollimator ist an einer justierbaren Halterung (Polaris-K1T1, Thorlabs) befestigt. Alle Laser besitzen eine maximale Ausgangsleistung von 100 mW. Nach dem Auskoppeln der Laserstrahlung aus der Faser sind noch ca. 70 % der Leistung vorhanden. Dieser Wert ist typisch für Einzelmodenfasern.

Für die Umlenkung der Laserstrahlen wurden ein Zoll breite Spiegel (BB1-E02, Thorlabs) verwendet. Für alle Spiegel wurden Spiegelhalter mit einer geringen thermischen Drift (Polaris-K1F2, Thorlabs) verwendet. Die Spiegelhalter stehen auf einem massiven, ein Zoll breiten, Aluminiumsockel (RS150/M, Thorlabs) mit dem passenden Sockelhalter (RSHT4/M, Thorlabs). Die Sockelhalter wurden mit Klemmgabeln (PF175, Thorlabs) am optischen Tisch befestigt.

Für die Strahlaufweitung wurde ein Galileo-Strahlaufweiter (GBE20-A, Thorlabs) mit einer festen Aufweitung von 20x und einer niedrigen chromatischen Aberration verwendet.

Mit einer motorisierten Iris (IBM 65-D0-35-HiDS, Owis) kann der passende Strahldurchmesser eingestellt werden. Die Iris besitzt eine maximale Apertur von 35 mm. Die motorisierte Iris wird mit einer 1-Achsen Positioniersteuerung für DC-Servomotoren (PS 10-DC, Owis) angesteuert. Für die Iris wurden der gleiche Sockel und der Sockelhalter wie bei den Spiegeln verwendet.

Für die Strahlteilung wird ein nichtpolarisierender 50:50 Strahlteiler (CCM5-BS016/M, Thorlabs) verwendet. Mit einem optischen Chopper (MC2000B-EC, Thorlabs) kann die Beleuchtungsseite für die Aufnahme bestimmt werden. Der Chopper kann durch einen Servomotor an drei Positionen gefahren werden (siehe Unterabschnitt 2.2.1). Die passende Elektronik wurde von der Elektronikwerkstatt am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Bonn entworfen und angefertigt. Es ist auch möglich, anstatt eines optischen Choppers eine Pockels-Zelle in Kombination mit einem polarisationsabhängigen Strahlteiler zu verwenden [85]. Jedoch muss dann auf die Po-

larisation der einzelnen verwendeten Laser geachtet werden.

Durch die Spiegel ist es möglich, den Strahl nochmal zu justieren, bevor dieser auf den ersten Galvanometerspiegel trifft. Das erste Galvanometer wird mit einer Frequenz von 270 Hz betrieben. Wegen der hohen Frequenz wird ein Galvanometer anstatt eines Piezokippspiegels verwendet. Piezokippspiegel können nicht so schnell ihre Richtung ändern wie Galvanometer. Ein Nachteil von Galvanometern ist die thermische Drift bei Änderung der Raumtemperatur. Die Spiegelapertur des ersten Galvanometers beträgt 7 mm. Linse 1 ist ein Achromat (AC254-100-A, Thorlabs) mit einer Brennweite von 100 mm. Der Spiegel des zweiten Galvanometers (dynAXIS L, Scanlab) besitzt eine Apertur von 20 mm. Dieser schwingt mit einer Frequenz von 40 Hz. Anders als das schnelle kleine Galvanometer besitzt dieser eine Heizung, um die thermische Drift zu reduzieren. Die Ansteuerung aller Galvanometer erfolgt mit einem multifunktionalen USB-Datenerfassungsgerät (USB-6353, National Instruments). Die Halterungen der Galvanometer wurden von der Feinmechanikwerkstatt des Instituts für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Bonn gebaut.

Hinter dem zweiten Galvanometer befindet sich ein weiterer Achromat (AC508-080-A, Thorlabs) mit einer Brennweite von 80 mm. Als Beleuchtungsobjektiv wird ein Luftobjektiv (Planapo 2.0x, Leica) mit einer Brennweite von 50 mm und einem Arbeitsabstand von 39 mm verwendet. Dieses Objektiv wurde von Leica speziell für die Mikroskope Leica Z6 APO und Leica Z16 APO entwickelt. Es zeichnet sich durch einen großen Arbeitsabstand und eine große Ausgangspupille aus. Auf Grund der Aggressivität der BABB-Lösung gegenüber Kunststoffen wurden keine Tauchobjektive für die Beleuchtung in Betracht gezogen. Der große Arbeitsabstand ist wegen der Küvettenbreite von 50 mm notwendig. Die große Ausgangspupille ist wegen der maximalen gewünschten Beleuchtungsbreite von 13,312 mm notwendig. Alle Objektive und Linsen stehen auf einem Aluminiumsockel (RS150/M, Thorlabs) mit einem passenden Sockelhalter (UPH150/M, Thorlabs).

Wegen der unterschiedlichen Brechungsindizes von Luft und BABB-Lösung kommt es bei der Bewegung der Küvette in x-Richtung zu einer Positionsänderung der Strahltaile (siehe Abschnitt 2.1). Um diese Änderung zu kompensieren, kann die Beleuchtungseinheit, bestehend aus Galvanometer und Linsen, in x-Richtung bewegt werden. Hierzu befindet sich die Beleuchtungseinheit auf einer einzelnen 10 mm dicken Aluminiumplatte, welche an einem motorisierten Linearversteller (LTM 80-100-HSM, Owis) fixiert ist. Die beiden Linearversteller werden jeweils mit einer 1-Achsen Positioniersteuerung für 2-Phasen-Schrittmotoren (PS 10-32-SM, Owis) angesteuert.

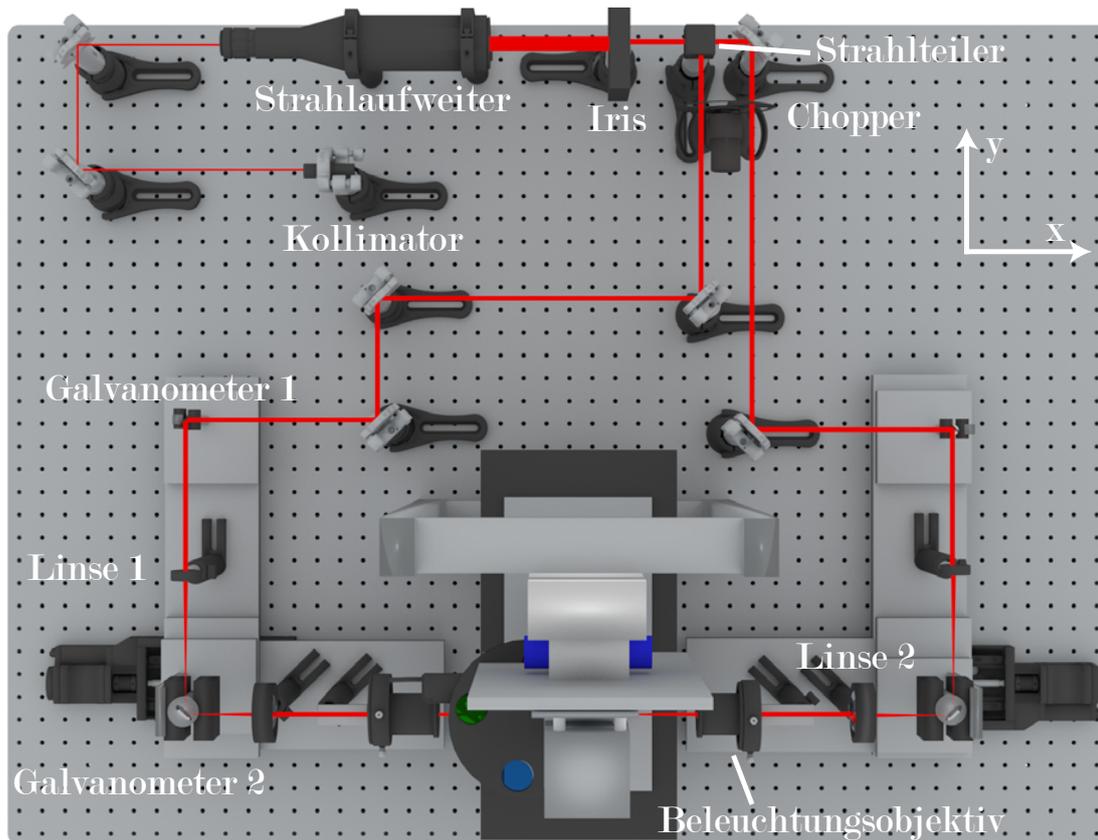


Abbildung 2.6: Aufsicht auf das Mikroskop. Es sind der Strahlengang (rote Linie) und die einzelnen Komponenten, welche in Unterabschnitt 2.3.1 beschrieben werden, zu erkennen.

2.3.2 Komponenten für die Detektionseinheit

Alle Komponenten der Detektionseinheit sind fest auf einer einzelnen 10 mm dicken Aluminiumplatte befestigt (siehe Abbildung 2.7). Diese Platte ist wiederum an einem mechanischen Grob-Feintrieb (Stativsäule für die Discovery und Axio Zoom Mikroskope, Zeiss) befestigt. Der Grob-Feintrieb ist in einen Aluminiumrahmen eingefasst. Dieser Rahmen ist fest mit dem optischen Tisch verschraubt. Durch den Grob-Feintrieb können verschiedene Objektive mit sehr unterschiedlichen Abmessungen und Arbeitsabständen verwendet werden. Für das Mikroskop stehen insgesamt drei Luftobjektive von Leica und zwei für organische Flüssigkeiten optimierte Eintauchobjektive von LaVision BioTec zur Verfügung. Die Objektive von Leica wurden für die Mikroskopmodelle Leica Z6 APO und Leica Z16 APO entwickelt. Die Vergrößerungszahl im Objektivnamen bezieht sich auf das vorgesehene Mikroskop. Deshalb weicht die tatsächliche Vergrößerung bei einer verwendeten Tubuslinse von 200 mm von der angegebenen Vergrößerung ab. Die Daten der Detektionsobjektive sind der Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Objektivbezeichnung	NA	Vergößerung*	Arbeitsabstand [mm]
LaVision LVMI-Fluor 4x	0,3	4,44	5,6
LaVision 12x NA 0,53 MI PLAN	0,53	12	10
Leica Planapo 1x	0,1	2x	97
Leica Planapo 2x	0,234	4x	39
Leica Planapo 5x	0,5	10x	19,8

Tabelle 2.2: Daten der Detektionsobjektive. *Die Vergrößerung bezieht sich auf eine Tubuslinse mit einer Brennweite von 200 mm.

Die Objektive können mit einem motorisierten Linearversteller (M-112.12S, Physikalische Instrumente) auf einer Strecke von 25 mm verschoben werden. Der Versteller besitzt eine Selbsthemmung von 10 N, somit kann das Objektiv im Falle eines Stromausfalles nicht auf die Probe heruntersacken. Der Linearversteller wird mit einem 1-Achsen-Kontrollgerät für Schrittmotoren (C-663.11, Physikalische Instrumente) angesteuert.

Ein Makroobjektiv (AF Micro-Nikkor 200 mm 1:4D IF-ED, Nikon) dient als Tubuslinse und zeichnet sich durch geringe Bildfehler bei niedrigen Vergrößerungen aus. Makroobjektive sind ganz normale Objektive für Spiegelreflexkameras. Sie sind im Vergleich zu Tubuslinsen für rein wissenschaftliche Anwendungen relativ preiswert. Durch eine Rotationseinheit (PRM1/MZ8E, Thorlabs) kann der Emissionsfilter gewechselt werden. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm steht ein Bandfilter (525/39 BrightLine HC, Semrock) zur Verfügung. Für die Anregung mit einer Wellenlänge von 561 nm steht ein Multibandpassfilter (ZET 488/561m, Chroma) zur Verfügung. Für eine Anregungswellenlänge von 633 nm wird ein Multinotchfilter (ZT405/488/561/640rpc, Chroma) verwendet. Es hat sich herausgestellt, dass für die 488 nm Anregung ein Bandfilter im Vergleich zu einem Notchfilter einen höheren Kontrast bietet, da der Autofluoreszenzanteil einen höheren langwelligeren Anteil besitzt als die Fluoreszenz des EGFP-Proteins, welches für Markierungen von Zellen verwendet wurde.

Als Detektor wurde eine sCMOS-Kamera verwendet (Orca Flash 4.0 v2, Hamamatsu). Der quadratische sCMOS-Bildsensor besitzt eine Kantenlänge von 13,312 mm mit einer Zellengröße von 6,5 μm . Der Bildsensor zeigt seine maximale Quantenausbeute von bis zu 82 % bei einer Wellenlänge von 560 nm. Der Bildsensor wird durch ein Peltierelement gekühlt. Die Wärme des Peltierelements wird wiederum von einem eingebauten Lüfter abgeführt.

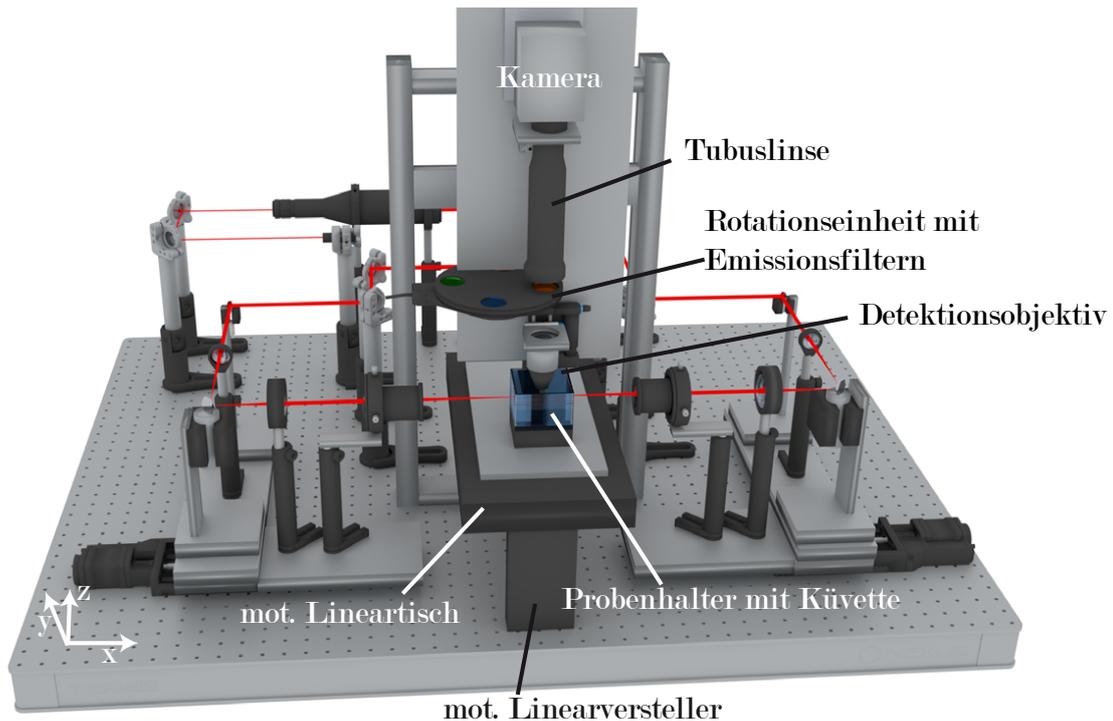


Abbildung 2.7: Seitenansicht der Detektionseinheit. Die rote Linie verdeutlicht den Verlauf des Laserstrahls.

2.3.3 Probenhalterung

Die Probe befindet sich in einer Quarzglasküvette (Groß-Küvette 704-033-50-10, Hellma) in einer BABB-Lösung. Das geklärte Gehirn wird auf zwei Fliegenadeln (Insect Pins 0,15 mm, Fine Science Tools) aufgespießt. Das stumpfe Ende befindet sich in einem Silikonquader. Dieser Quader besteht aus einem Zweikomponentenkleber (RTV 615-kit, Momentive). Mit einem speziellen, gegenüber der BABB-Lösung resistenten Kleber (FixoGum, Marabu), kann dieser Quader am Glasboden befestigt werden.

Die Küvette befindet sich auf einem motorisierten Lineartisch (MS-2000 Flat Top XY, ASI), welcher jeweils einen Linearversteller in x- und y-Richtung besitzt. Dieser Tisch ist auf zwei motorisierte Linearversteller (LS-25, ASI) montiert. Diese beiden Linearversteller können den Lineartisch nach oben und unten fahren. Somit kann die Probe in alle Raumrichtungen bewegt werden. Der Probentisch und die z-Linearversteller werden mit einem einzigen Kontrollgerät (MS-2000-WK, ASI) angesteuert.

Neben der Küvette befindet sich ein Aluminiumblock mit einem eingelassenen Spiegel (BB1-E02, Thorlabs) auf jeder Beleuchtungsseite. Durch die Verwendung eines Papierblattes mit einem kleinen Loch nach dem ersten Galvanometer kann überprüft werden, ob der Laserstrahl parallel zum Lineartisch verläuft [85]. Hierzu wird der Laserstrahl vom Spiegel reflektiert. Verläuft der Laserstrahl parallel zum Lineartisch, hat der reflektierte Strahl auf dem Papier dieselbe Höhe wie das Loch.

Abbildung 2.8 stellt eine 3D-Ansicht der Küvette und der Probenkammer dar und das Prinzip wird verdeutlicht.

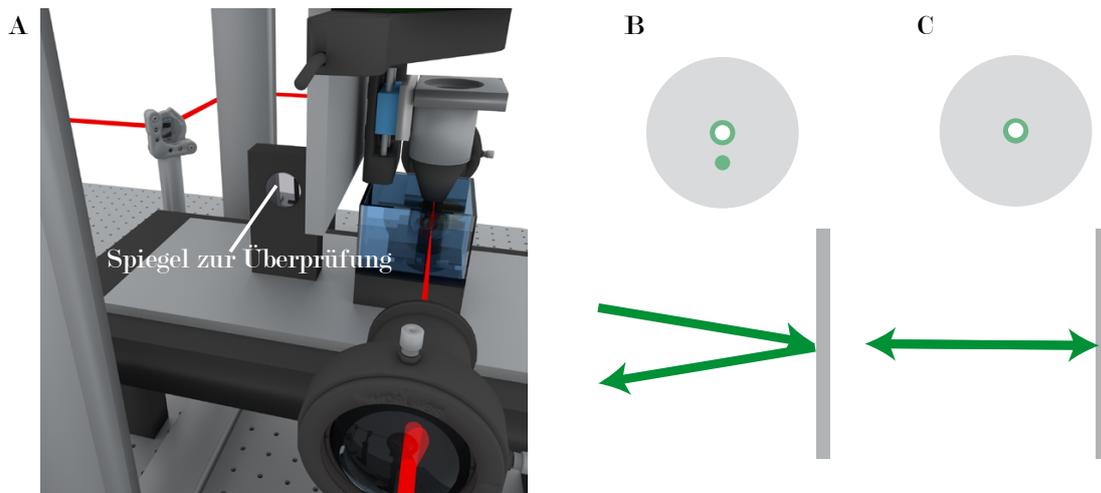


Abbildung 2.8: A 3D-Ansicht der Probenhalterung. Der Spiegel ist in einen schwarz lackierten Aluminiumblock eingefasst. B und C Die Verdeutlichung des Prinzips. B Ist der Strahl verkippt, trifft der reflektierte Strahl nicht mehr auf das Loch. C Ist der Strahl nicht verkippt, trifft der reflektierte Strahl auf das Loch.

2.4 Ansteuerung und Software

2.4.1 Computer und Software

Das Mikroskop wird mit einer selbstgeschriebenen Software angesteuert. Die Software wurde mit der Programmierumgebung LabVIEW 2015 (National Instruments) in der Programmiersprache G entwickelt. Ein Vorteil dieser Programmiersprache ist die grafische Darstellung von Programmierstrukturen. Außerdem bieten die meisten Hersteller vorgefertigte Programme für die Ansteuerung der einzelnen Komponenten in der LabVIEW-Umgebung an, was es für den Anwender relativ einfach macht, ein komplexes Programm zur Ansteuerung zu schreiben.

Das Programm läuft auf einer Tower-Workstation (Tower Server Chassis 743TQ-865B-SQ, Supermicro) mit einem INTEL Xeon E5-1630 V3 Prozessor (Intel) und 64 GB DDR4 RAM. Das Betriebssystem (Windows 10, Microsoft) und alle Programme befinden sich auf zwei 240 GB SSD-Festplatten (PM843T, Samsung) im RAID 1-Verbund. Somit wird der Nachteil von SSD-Festplatten bezüglich der Datensicherheit im Vergleich von HDD-Festplatten reduziert. Das Programm erlaubt, die Bildgröße der Aufnahme frei zu wählen. Für jede x-Position kann entschieden werden, von welcher Seite die Probe beleuchtet wird oder ob die Aufnahme aus zwei Aufnahmen, mit jeweils unterschiedlicher Beleuchtungsrichtung, zusammengesetzt wird. Die Daten für die unterschiedlichen Objektive sind in der Software gespeichert.

Die aufgenommenen Daten werden im TIFF-Format auf einen RAID 50-Verbund, bestehend aus acht 4 TB HDD-Festplatten (WD4003FZE, WD), gespeichert. Es wurde eine RAID 50-Umgebung gewählt, um eine hohe Schreib- und Lesegeschwindigkeit zu erreichen und zusätzlich eine hohe Datensicherheit zu erhalten. Die RAID-Verbünde werden mit einer RAID-Karte (9271-8i, LSI) kontrolliert. Die verschiedenen Einstellungen und Funktionen in der Software sind:

- Allgemeine Funktionen:**
- Bewegung der Beleuchtungsobjektive
 - Bewegung des Detektionsobjektivs
 - Bewegung der Probe in x-und y-Richtung mit gleichzeitiger Bewegung des Beleuchtungsobjektivs, damit Strahltaile und Detektionsobjektiv dieselbe x-Position haben.
- Allgemeine Einstellungen:**
- Position des Filterrads
 - Amplitude und Frequenzen der vier Galvanometer
 - Offsetspannung für alle vier Galvanometer
 - Belichtungszeit für den Liveview-Modus
- Einstellungen für Messungen:**
- z-Schrittweite
 - Anzahl der z-Schritte
 - Ausdehnung der Probe in x und y
 - Belichtungszeit
 - Farbkanäle
 - Beleuchtungsrichtung für jeden Bildstapel
 - Kachelgröße (Höhe und Breite)
 - Auswahl des Detektionsobjektivs

2.4.2 Ansteuerung der einzelnen Komponenten

Die Abbildung 2.9 zeigt die einzelnen Komponenten mit den jeweiligen Verbindungen zueinander. Die Kamera ist mit einer PCIe-Karte (Frame grabber CameraLink, Hamamatsu) über zwei CameraLink-Kabel (Hamamatsu) mit dem Rechner verbunden. Durch diese Verbindung ist eine maximale Datenübertragung von 100 Bildern/s möglich. Während der Messung wird per Software-Trigger eine Bildaufnahme gestartet. Alle anderen Komponenten sind per USB 2.0 Schnittstelle mit dem Computer verbunden.

Mit einem multifunktionalen Datenerfassungsgerät (USB-6353, National Instruments) können digitale und analoge Signale erzeugt und erfasst werden. Es handelt sich um ein Datenerfassungsgerät mit einem Klemmbrett. Drei digitale Ausgänge werden benötigt,

um die Laserstrahlung digital zu modulieren. Ein digitaler Eingang wird dazu benötigt, das TTL-Signal des optischen Choppers auszuwerten. Durch die Messung der Flanken des TTL-Signals ist es möglich, den passenden Zeitpunkt für eine Aufnahme zu bestimmen. Die zeitliche Auslenkung der Galvanometer wird durch ein analoges Signal gesteuert.

Die motorisierte Iris, der Chopper, die Rotationseinheit mit den Emissionsfiltern und die Linearversteller werden mit jeweils einem eigenen Kontrollgerät angesteuert, welches wiederum über USB 2.0 mit dem Computer verbunden ist. Mit einem Joystick kann die Probe bewegt werden.

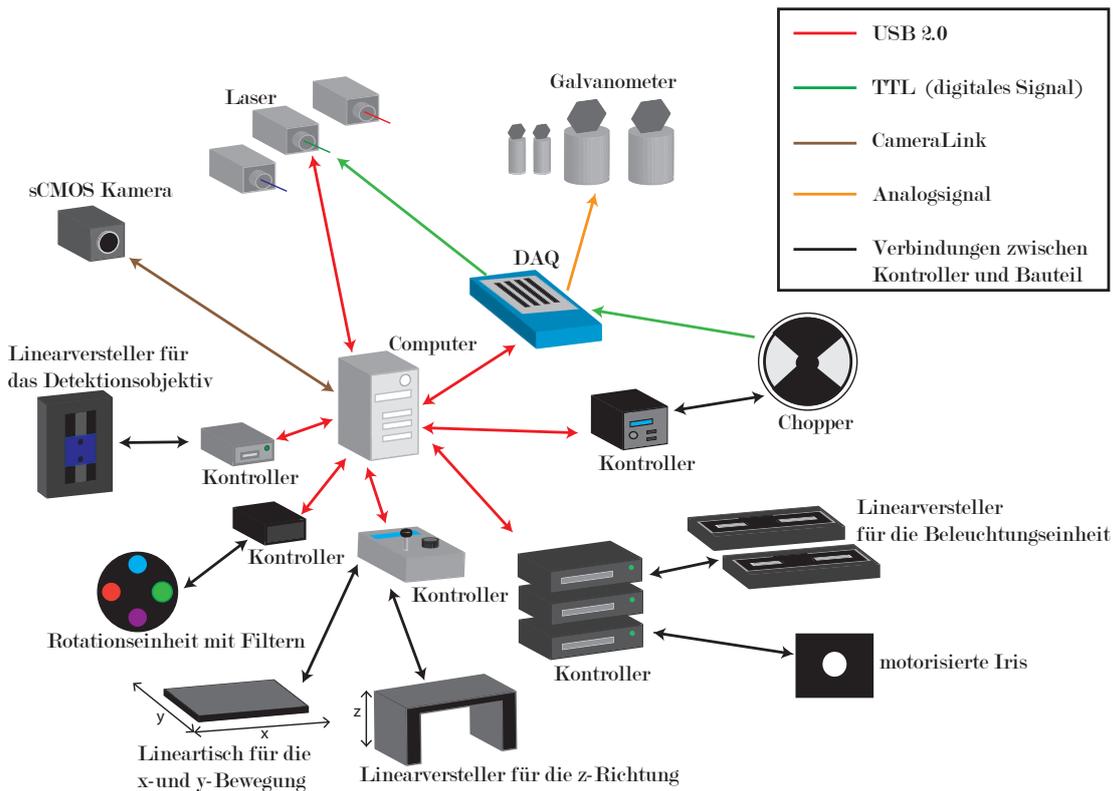


Abbildung 2.9: Ansteuerung des Mikroskops: Die Linearversteller, die Rotationseinheit, das Datenerfassungsgerät, die motorisierte Iris, die Laser und der Chopper werden per USB 2.0 angesteuert. Mit der DAQ-Einheit können analoge- und digitale Signale eingelesen und ausgegeben werden. Die Auslenkungen der Galvanometer werden mit einem analogen Signal gesteuert. Die Position des Choppers wird durch ein TTL-Signal bestimmt. Bei Erreichen einer bestimmten Position wird ein Trigger-Signal an die Kamera gesendet. Die Laserleistung kann per USB 2.0 geändert werden. Während der Messung werden die Laser durch digitale Modulation gesteuert. Die Pfeilrichtung gibt die Signalrichtung an.

2.5 Fokusstabilisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Fokusstabilisierung entwickelt. Die Grundlage ist der Vergleich der Aufnahme Bild_N an der Probenposition z mit der vorherigen Aufnahme Bild_{N-1} an der Probenposition $z - \Delta z$, wobei Δz die Schrittweite des z -

Linearverstellers, der die Probe in z-Richtung bewegt, ist. Die x- und y-Position der Probe bleibt während der Aufnahme eines Bildstapels konstant. Es wird angenommen, dass sich die beiden Aufnahmen sehr ähnlich sind. Für jede Aufnahme wird ein Fokusfunktionswert und die Summe der einzelnen Bildpunktwerte berechnet. Als Fokusfunktion wurde Vollath's $F4$ -Funktion verwendet. Diese ist ein Maß für die Bildunschärfe und besitzt eine geringe Sensitivität gegenüber Rauschen und kann mit heutigen Computern quasi in Echtzeit berechnet werden. In Unterabschnitt 4.6.1 werden mehrere mögliche Fokusfunktionen miteinander verglichen. Dabei stellt sich die Vollath's $F4$ -Funktion als beste Fokusfunktion heraus. Der Wert der $F4$ -Funktion ist von der Position f_{DO} des Detektionsobjektivs abhängig. Durch den motorisierten Linearversteller des Detektionsobjektivs kann f_{DO} variiert werden. Die $F4$ -Funktion hat ihr Maximum, wenn das Lichtblatt sich im Fokus des Detektionsobjektivs befindet. Bei jeder Aufnahme kann sich das Detektionsobjektiv um eine Distanz von Δf_{DO} bewegen. Diese mögliche Schrittweite ist für jede Aufnahme gleich. Jedoch wird die Position des Detektionsobjektivs nur angepasst, wenn bestimmte Bedingungen erfüllt sind. Die Abbildung 2.10 zeigt die $F4$ -Fokusfunktion in Abhängigkeit von der Position des Detektionsobjektivs.

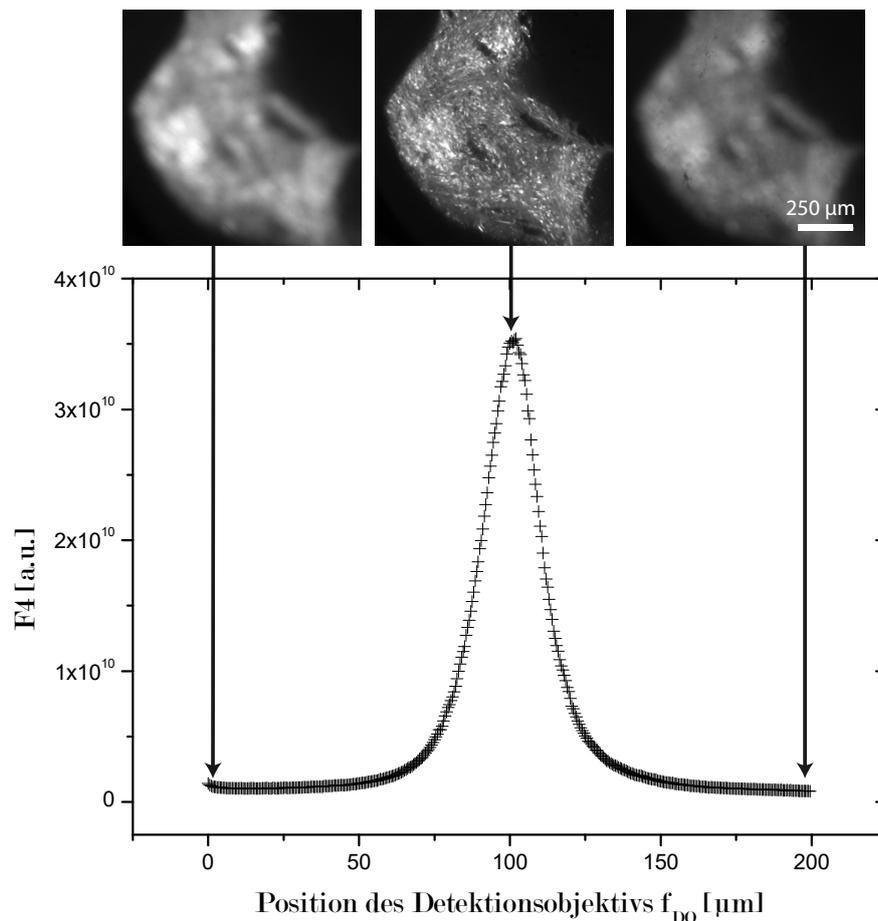


Abbildung 2.10: Der Graph zeigt den Wert der $F4$ -Funktion in Abhängigkeit von der Position des Detektionsobjektivs f_{DO} . Die oberen Bilder zeigen ein Transplantat in einem Maushirn, aufgenommen bei verschiedenen Positionen des Detektionsobjektivs f_{DO} . Die Aufnahmen wurden mit dem LaVision 12x Objektiv und einer Anregungswellenlänge von 488 nm aufgenommen.

Die mögliche Schrittweite Δf_{DO} ist für jedes Objektiv unterschiedlich und ist maßgeblich von der numerischen Apertur abhängig. Die beste Schrittweite Δf_{DO} ist experimentell bestimmt worden. Näheres ist im Unterabschnitt 4.6.2 zu finden.

Nach der Aufnahme von Bild_N werden die Werte der $F4$ -Funktion von Bild_N und dem vorherigem Bild_{N-1} und die jeweiligen Summen über die Intensitätswerte für beide Bilder, S_N und S_{N-1} , verglichen. Anschließend wird die Fokusposition $f_{\text{DO},N+1}$ für die Aufnahme von Bild_{N+1} angepasst oder unverändert gelassen. Nach der Aufnahme Bild_N und der Anpassung der Fokusposition hat das Objektiv, abhängig davon, welche Bedingung erfüllt wurde, folgende Position:

$$f_{\text{DO},N+1} = f_{\text{DO},N} \pm \Delta f_{\text{DO}} \text{ oder } f_{\text{DO},N+1} = f_{\text{DO},N} \quad (2.3)$$

$f_{\text{DO},N}$ ist die Position des Detektionsobjektivs für die Aufnahme von Bild_N . Das Vorzeichen (rot markiert) kann entweder positiv oder negativ sein. Das aktuelle Vorzeichen wird mit Hilfe einer Integer-Variable gespeichert. Entweder beträgt die Variable 1 oder -1. Durch Multiplikation mit -1 kommt es zu einem Vorzeichenwechsel. Für die Aufnahmen Bild_{N-1} und Bild_N werden die $F4$ -Funktionen $F4_{N-1}$ und $F4_N$ berechnet.

Wenn die $F4$ -Funktion bei Bild_N größer ist, kann es daran liegen, dass Bild_N fokussierter ist als Bild_{N-1} . Jedoch kann es auch daran liegen, dass der durchschnittliche Bildpunktwert von Bild_N größer ist, weil hellere Strukturen abgebildet wurden. Aus diesem Grund müssen die Summen der einzelnen Bildpunktwerte für die Bilder Bild_{N-1} und Bild_N , S_{N-1} und S_N , auch berücksichtigt werden. Daraus ergeben sich vier Fälle, die unterschieden werden müssen:

1. Fall: $F4_N > F4_{N-1}$ und $S_N < S_{N-1}$

In diesem Fall wird das Objektiv um Δf_{DO} oder um $-\Delta f_{\text{DO}}$ bewegt und das gespeicherte Vorzeichen ändert sich nicht. Es kommt nicht zu einer Änderung der Bewegungsrichtung. Wenn dieser Fall für die nächste Aufnahme auch gilt, bewegt sich das Objektiv in gleicher Richtung weiter. Tritt dieser Fall ein, ist es wahrscheinlich, dass das Bild_N fokussierter ist als das Bild_{N-1} , da der $F4$ -Funktionswert bei Bild_N höher ist, jedoch die Summe der einzelnen Bildpunktwerte bei Bild_{N-1} höher ausfällt.

2. Fall: $F4_N > F4_{N-1}$ und $S_N > S_{N-1}$

In diesem Fall kommt es zu keiner Bewegung des Detektionsobjektivs und das gespeicherte Vorzeichen ändert sich. Hier kann man nicht sicher sein, ob $F4_N > F4_{N-1}$ gilt, weil das Lichtblatt entweder besser im Fokus ist oder ein höheres Signal von der Probe kommt.

3. Fall: $F4_N < F4_{N-1}$ und $S_N < S_{N-1}$

In diesem Fall kommt es auch zu keiner Bewegung des Detektionsobjektivs und das gespeicherte Vorzeichen ändert sich.

4. Fall: $F4_N < F4_{N-1}$ und $S_N > S_{N-1}$

In diesem Fall bewegt sich das Objektiv um Δf_{DO} oder um $-\Delta f_{DO}$ und das gespeicherte Vorzeichen ändert sich. Es kommt somit zu einer Änderung der Bewegungsrichtung. Dieser Fall tritt häufig ein, wenn $Bild_{N-1}$ fokussierter ist als $Bild_N$

Befindet sich das Lichtblatt nicht mehr im Fokus des Detektionsobjektivs, so bewegt sich das Objektiv tendenziell so, dass sich das Lichtblatt wieder im Fokus befindet. Dies tritt ein, wenn Fall 1 mehrmals hintereinander auftritt und das Objektiv sich mehrmals in gleicher Richtung bewegt. Befindet sich das Lichtblatt im Fokus, so bleibt dieses in der Schärfenebene des Objektivs. Die Abbildung 2.11 zeigt die vier Fälle, die unterschieden werden müssen, und deren Auswirkung auf f_{DO} . Abbildung 2.12 zeigt, wie das Programm zur Fokusstabilisierung funktioniert. In vielen Fällen befinden sich die zu untersuchenden Strukturen ein Stück unterhalb der Probenoberfläche. Bei einer kleinen Defokussierung reicht dieses Stück aus, damit die Lichtscheibe wieder in dem Fokusbereich des Detektionsobjektivs liegt.

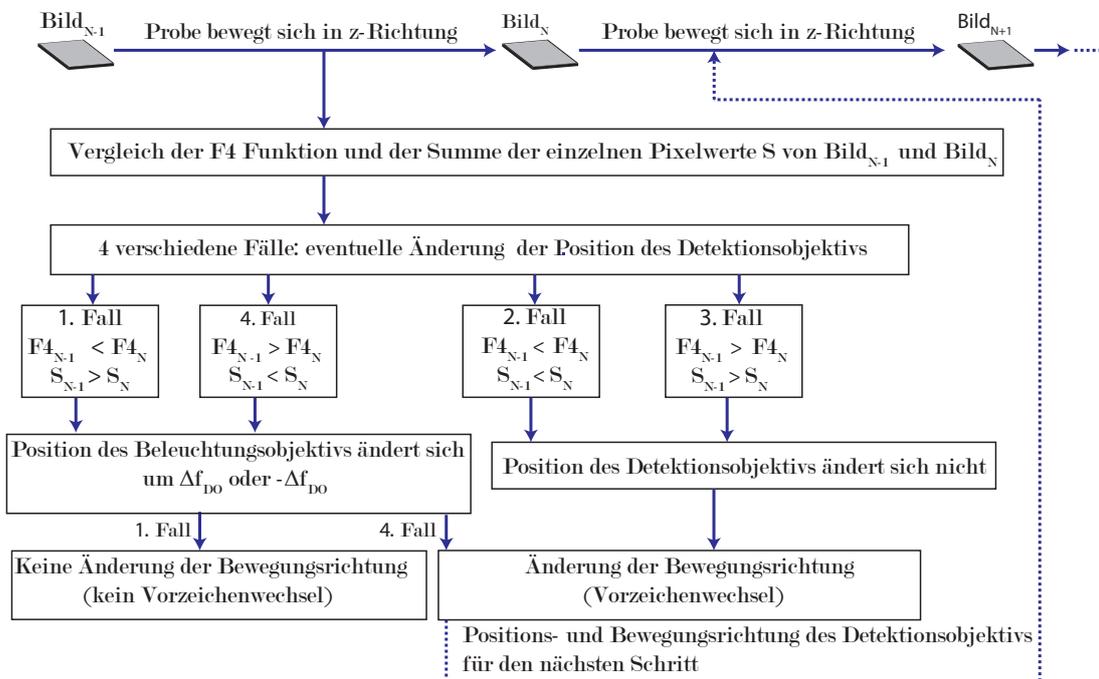


Abbildung 2.11: Während einer Messung vergleicht die Software die aktuelle Aufnahme mit der vorherigen Aufnahme. Für jede Aufnahme werden der Vollath's $F4$ -Fokusfunktionswert $F4$ und die Summe aller Bildpunktweite S berechnet. Es gibt 4 Fälle, die unterschieden werden. Abhängig von dem jeweiligen Fall kann sich das Detektionsobjektiv um einen bestimmten Betrag Δf_{DO} bewegen.

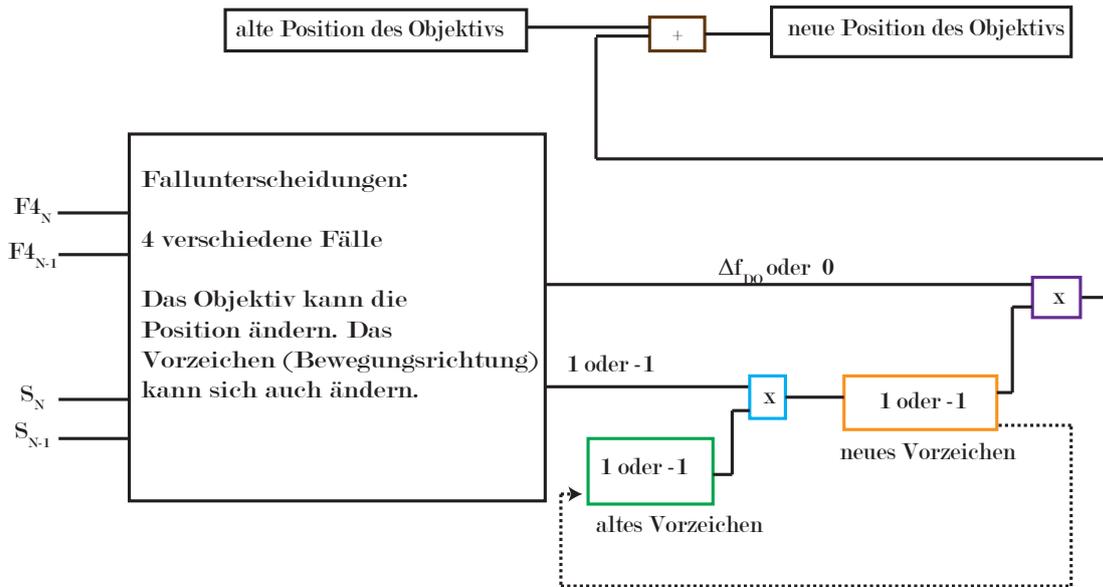


Abbildung 2.12: Realisierung der Fokusstabilisierung in der Software. Eine mögliche Bewegungsrichtung wird durch eine Änderung des Vorzeichens erreicht. Bei jeder Aufnahme wird der Variablen „Vorzeichen“ 1 oder -1 zugeordnet. Wird der Wert 1 zugeordnet, kommt es zu keiner Änderung des Vorzeichens. Wird der Wert -1 zugeordnet, kommt es zu einem Vorzeichenwechsel und somit zu einer Änderung der Bewegungsrichtung.

3 Theoretische Berechnungen

3.1 Analytische Berechnungen

3.1.1 Gauß-Strahlen

Die Probe wird mit einem Gauß-Strahl beleuchtet. Deshalb wird in diesem Abschnitt auf die mathematische Beschreibung eines Gauß-Strahls eingegangen. Die räumliche Intensitätsverteilung eines Gauß-Strahls kann durch folgende Formel beschrieben werden [59, 86]:

$$I(r, z) = I_0 \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega(z)^2}\right) \quad (3.1)$$

mit

$$\omega(z) = \omega_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_R}\right)^2} \quad (3.2)$$

und

$$z_R = \frac{\pi\eta\omega_0^2}{M^2\lambda} \quad (3.3)$$

Dabei ist z_R die Rayleighlänge, M^2 die Beugungsmaßzahl, η der Brechungsindex und ω_0 der Strahlradius. Bei $r = \omega_0$ ist die Intensität auf $1/e^2$ abgefallen. Die Rayleighlänge ist definiert als die Länge, bei der die Strahlbreite den Wert $\sqrt{2}\omega_0$ besitzt. Die Gleichung 3.3 besagt, dass eine schmale Strahltaile eine kurze Rayleighlänge bedingt. Es muss also ein Kompromiss zwischen einer schmalen Strahltaile und einer langen Rayleighlänge gefunden werden. Für $z \gg z_R$ nähert sich $\omega(z)$ einer Geraden an. Die Strahldivergenz φ kann durch folgende Gleichung berechnet werden:

$$\varphi \stackrel{z \gg z_R}{\approx} \arctan\left(\frac{M^2\lambda}{\pi\eta\omega_0}\right) \quad (3.4)$$

In Abbildung 3.1 ist das axiale Profil eines Gauß-Strahls mit seinen charakteristischen Größen ω_0 , φ und z_R abgebildet.

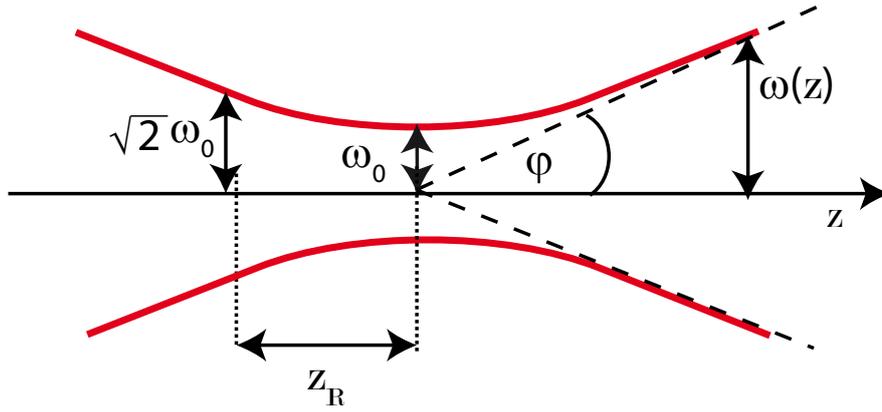


Abbildung 3.1: Darstellung des axialen Verlaufs eines Gauß-Strahls mit den charakteristischen Größen ω_0 , z_R und φ .

3.1.2 Fokussierung von Gauß-Strahlen

Trifft ein Gauß-Strahl (Primärstrahl) mit dem Tailenradius ω_0 auf eine ideale dünne Sammellinse mit der Brennweite f , so findet sich wieder ein Gauß-Strahl (Sekundärstrahl) mit einer Strahltaille von ω_f hinter der Linse [87]. Der Abstand zwischen der Linse und der Strahltaille des Sekundärstrahls beträgt s_f . s_f und ω_f können durch folgende Gleichungen bestimmt werden [87]:

$$s_f = f + \frac{f^2 (s_0 - f)}{(s_0 - f)^2 + z_R^2} \quad (3.5)$$

und

$$\omega_f = \omega_0 f \sqrt{\frac{1}{(s_0 - f)^2 + z_R^2}} \quad (3.6)$$

s_0 ist die Entfernung zwischen der Strahltaille und der Linse. Die Abbildung 3.2 zeigt das axiale Strahlprofil eines Gauß-Strahls vor und hinter einer Linse mit der Brennweite f . Für den Spezialfall $s_0 = f$ erhält man folgende vereinfachte Formel für ω_f :

$$\omega_f = \frac{\omega_0 f}{z_R} = \frac{M^2 \lambda f}{\pi \omega_0} \quad (3.7)$$

Wobei die Strahltaille ω_f im Brennpunkt der Linse F liegt.

Der resultierende Tailenradius des Sekundärstrahls ω_f ist somit abhängig von der Position der Strahltaille des Primärstrahls s_0 , daher muss die Position der Strahltaille bestimmt werden. Bei Strahlen mit einer kleinen Divergenz kann jedoch die Näherung $z_R \gg (s_0 - f)$ angewandt werden. Somit erhält man für ω_f folgenden Ausdruck:

$$\omega_f = \frac{\omega_0 f}{z_R} = \frac{M^2 \lambda f}{\pi \omega_0} \quad (3.8)$$

Dieser Ausdruck ist identisch mit Gleichung 3.7. Somit muss die Strahltaillenposition bei einem kollimierten Laserstrahl mit einem großen Tailenradius nicht berücksichtigt werden.

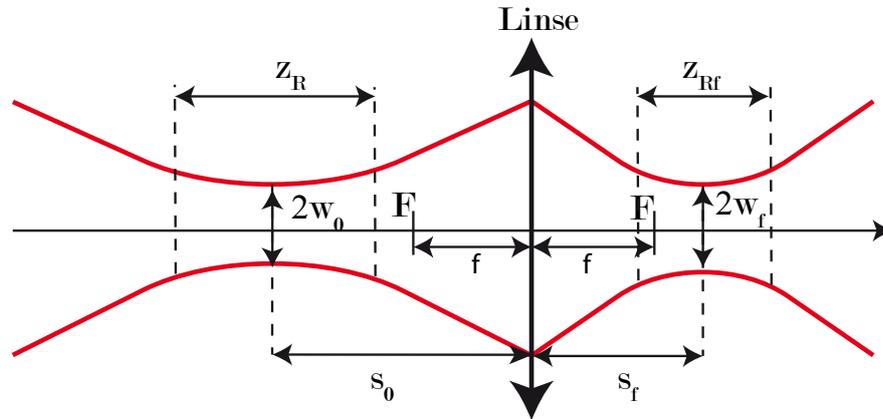


Abbildung 3.2: Fokussierung eines Gauß-Strahls mit einer idealen dünnen Sammellinse. Die Lage s_f und der Radius ω_f der Strahltaille hinter der Linse können mit den Gleichungen 3.5 und 3.6 berechnet werden.

3.1.3 Abschätzung des Tailenradius der Lichtscheibe

Die Beleuchtungsoptik des Mikroskops besteht aus zwei Achromaten mit den Brennweiten f_1 und f_2 und einem Mikroskopobjektiv (Beleuchtungsobjektiv) mit der Brennweite f_3 (siehe Abbildung 3.3). Bei der Abschätzung der resultierenden Strahltaille des Lichtblattes werden alle drei optischen Bauelemente als ideale dünne Linsen betrachtet. Hierzu wird der resultierende Tailenradius nach Gleichung 3.7 nach jeder Linse berechnet [87]. Für das Beleuchtungsobjektiv gilt für den Tailenradius ω_{f_3} :

$$\omega_{f_3} = \frac{M^2 \lambda f_3 f_1}{\pi f_2 \omega_S} \quad (3.9)$$

Die Strahltaille der Lichtscheibe ist also proportional zu f_1 und f_3 und reziprok zu f_2 und ω_S , wobei ω_S die Strahltaille vor der ersten Linse ist. Die Abbildung 3.3 zeigt eine schematische Darstellung des axialen Strahlprofils des rechten Beleuchtungspfades.

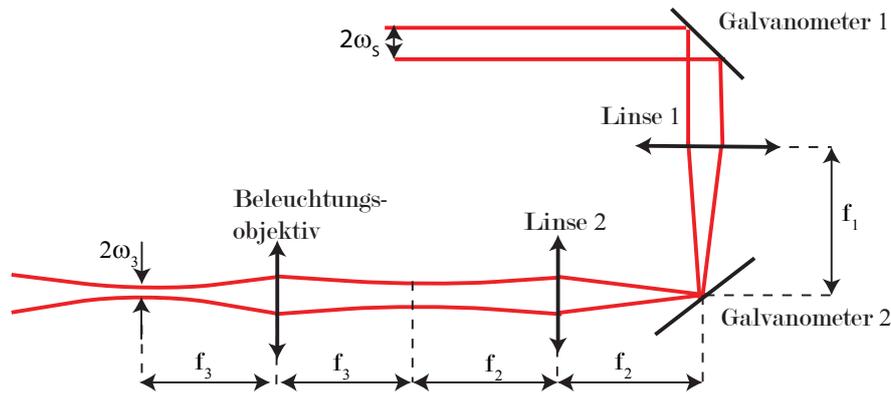


Abbildung 3.3: Die Abbildung zeigt die Auswirkung des Linsensystems auf einen Gaußstrahl. Der kollimierte Anfangsstrahl hat einen Strahldurchmesser von $2\omega_S$. Hinter der Linse 3 besitzt der Strahl einen Strahltaillenradius von ω_3 .

3.2 Einfluss der Galvanometer

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der Galvanometer auf den Strahlengang betrachtet. Im ersten Unterabschnitt geht es um das erste schnelle Galvanometer für die Lichtscheibenerzeugung. Im zweiten Unterabschnitt geht es um das zweite langsame Galvanometer für die Schwenkung der Lichtscheibe.

3.2.1 Galvanometer für die Lichtblatterzeugung

Dreht sich das erste schnelle Galvanometer um den Winkel $\frac{\alpha}{2}$, kommt es nach der ersten Linse zu eine Auslenkung von $b_1 = \tan(\alpha) f_1$ bezogen auf die optische Achse (siehe Abbildung 3.4). Bei einem Winkel des zweiten Galvanometers von 45° , bezogen auf die optische Achse, gilt $b_1 = b_2$. Dabei ist b_2 die Auslenkung des Strahls nach dem zweiten Galvanometer. Nach dem Beleuchtungsobjektiv hat der Strahl eine Auslenkung von $b_3 = \frac{f_3}{f_2} b_2$. Die Beleuchtungsbreite der Lichtscheibe beträgt $2b_3$. Für einen Auslenkwinkel α kann die halbe Beleuchtungsbreite b_3 durch folgende Formel berechnet werden:

$$b_3 = \tan(\alpha) \frac{f_1 f_3}{f_2} \quad (3.10)$$

In Abbildung 3.4 ist der Einfluss des ersten Galvanometers skizziert. Im Unterabschnitt 4.1.2 wird der Einfluss des ersten Galvanometers experimentell untersucht.

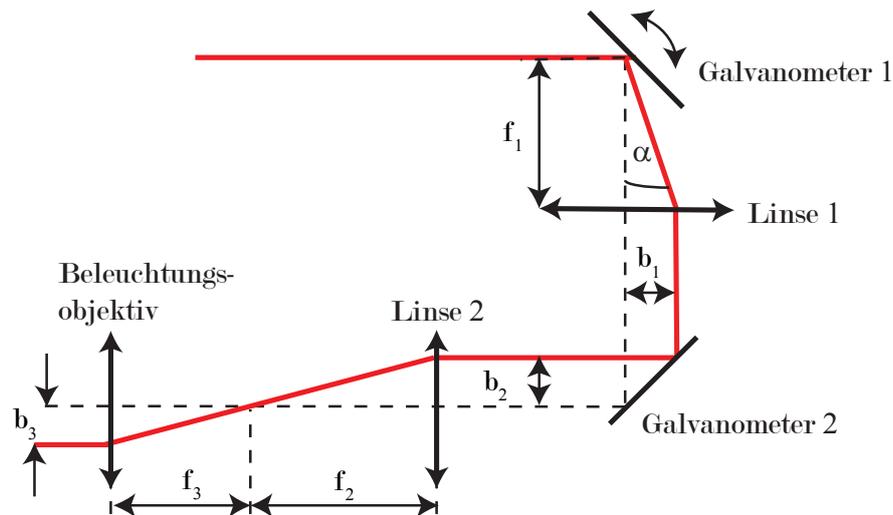


Abbildung 3.4: Durch die Drehung des Galvanometers 1 um $\frac{\alpha}{2}$ kommt es zu einer Auslenkung des Strahls nach dem Beleuchtungsobjektiv um b_3 .

3.2.2 Galvanometer für die Schwenkung des Lichtblattes

Bei der Drehung des zweiten Galvanometers um $\frac{\gamma}{2}$ kommt es zu einer Schwenkung der Lichtscheibe um den Winkel ϕ . Auch kommt es zu einer Auslenkung des Strahls nach der Linse 2 um $d_2 = \tan(\gamma) f_2$. In Abbildung 3.5 wird die Auswirkung einer Winkeländerung des zweiten Galvanometers um $\gamma = \arctan\left(\frac{d_2}{f_3}\right)$ verdeutlicht. Die Schwenkung der Lichtscheibe kann durch folgende Formel berechnet werden:

$$\phi = \arctan\left(\frac{\tan(\gamma) f_2}{f_3}\right) \quad (3.11)$$

Im Abschnitt 4.1.3 wird der Einfluss des zweiten Galvanometers experimentell untersucht.

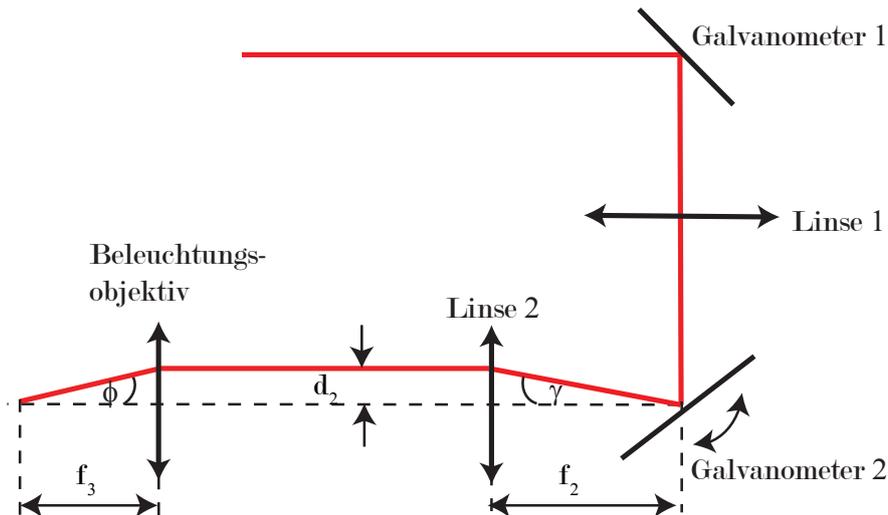


Abbildung 3.5: Durch die Drehung des Galvanometers 2 um den Winkel $\frac{\gamma}{2}$ kommt es zu einer Schwenkung der Lichtscheiben um den Winkel ϕ .

3.3 Berechnungen mit *Zemax*

Zemax ist eine kommerzielle Software für die Simulation von optischen Komponenten. Viele Firmen stellen für optische Komponenten *Zemax*-Dateien zur Verfügung, somit können die optischen Eigenschaften der verwendeten Materialien häufig mitberücksichtigt werden. Für die Simulationen mit *Zemax* standen die *Zemax*-Dateien für beide Achromate Linse 1 und Linse 2 (AC254-100-A und AC508-080-A, Thorlabs) und für den Strahlaufler (GBE20-A, Thorlabs) zur Verfügung. Für das Beleuchtungsobjektiv standen keine *Zemax*-Dateien zur Verfügung, deshalb wurde für das Beleuchtungsobjektiv eine ideale Linse mit einer Brennweite von 50 mm verwendet. Im Anhang A.3 befindet sich ein Bild des Linsendaten-Editors, der für die Simulation verwendet wurde. Die Abbildung 3.6 zeigt das dazugehörige Linsenlayout.

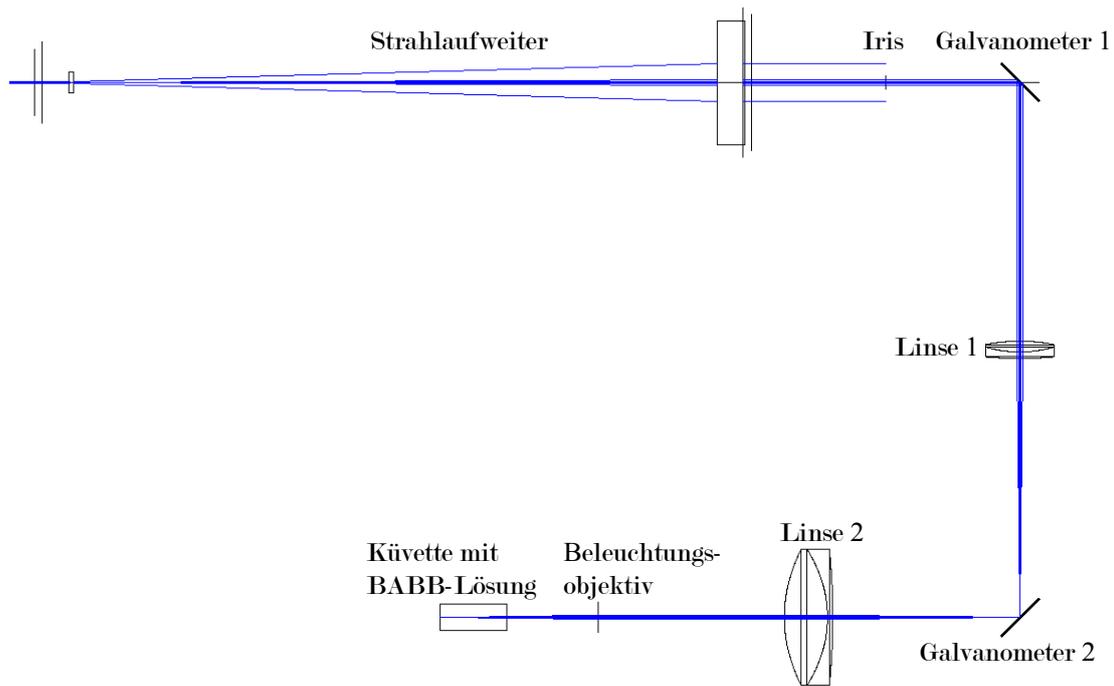


Abbildung 3.6: Die Abbildung zeigt das Layout in Zemax. Die Zemax-Dateien für den Strahlaufweiter und die beiden Achromate wurden vom Hersteller bereitgestellt.

3.3.1 Auslenkung des Beleuchtungsstrahls

Die Zemaxfunktion „Punktogramm“ bietet die Möglichkeit, die Qualität eines fokussierten Strahls zu beurteilen. Das Punktogramm zeigt, wo die einzelnen Strahlen eines Strahlbündels auf einen Detektor treffen würden. Für eine ideale Linse ohne Aberrationen würden sich alle Strahlen im Fokus treffen. Auf Grund der Welleneigenschaften von Licht besitzt der Brennpunkt eines fokussierten Strahls eine gewisse Ausdehnung. Diese Ausdehnung wird durch die Airy-Scheibe dargestellt. Treffen alle Strahlen innerhalb der Airy-Scheibe zusammen, so kann die Abbildung als beugungsbegrenzt angesehen werden.

Durch das Scannen des Strahls trifft das Strahlbündel die Linsen nicht mehr mittig, dadurch kann es zu Aberrationen und damit zu einer Verschlechterung der Strahlqualität kommen. Um abzuschätzen, wie stark sich die Strahlqualität in Abhängigkeit von der Auslenkung ändert, werden die Punktdiagramme bei unterschiedlichen Winkeln des Galvanometers 1 betrachtet. In Zemax kann ein Kippspiegel mit unterschiedlichen Winkeln simuliert werden. Nach Gleichung 3.10 kann der notwendige Ablenkwinkel α berechnet werden. Für eine maximale Auslenkung von $\pm 1,5$ mm ist eine Ablenkung von $\pm 1,38^\circ$ notwendig, wobei sich der Wert 1,5 mm durch die Bildsensorgröße von 13,3 mm und eine totale Vergrößerung von 4,44 (Leica Planapo 2x) ergibt. Abbildung 3.7 zeigt die Punktdiagramme bei unterschiedlichen Ablenkwinkeln α und die darauffolgenden Auslenkungen b_3 . Es ist zu erkennen, dass ein Großteil der Strahlen sich innerhalb der Airy-Scheibe befinden. Bei den Berechnungen wurde der Weg durch ein Medium mit

einer Dicke von 25 mm mit einem Brechungsindex von 1,56 berücksichtigt. Der Eingangsstrahl vor dem 20x Strahlauflöser besitzt einen Strahldurchmesser von 0,7 mm und der Öffnungsdurchmesser der Iris beträgt 5 mm.

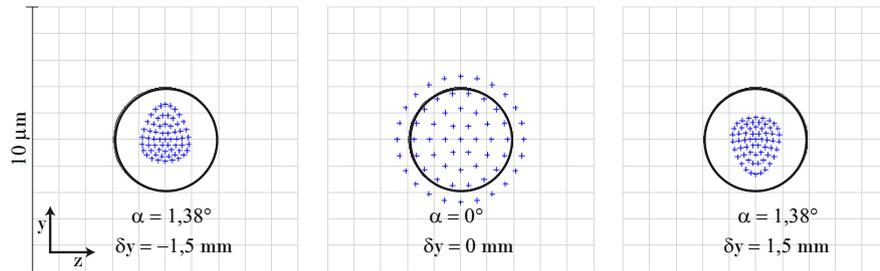


Abbildung 3.7: Punktdiagramme für den Fokus in der Küvette bei unterschiedlichen Auslenkungen des Beleuchtungsstrahls (-1,5 mm, 0 mm und 1,5 mm) durch Galvanometer 1. Ein Großteil der einzelnen Punkte befindet sich innerhalb der Airy-Scheibe. Für die Simulation wurde eine Wellenlänge von 488 nm ausgewählt.

Außerdem kann es durch die Auslenkung des Beleuchtungsstrahls zu einer Verschiebung der Strahltaile kommen, da sich bei normalen Linsen die Brennpunktposition beim Scannen ändert (siehe Abbildung 3.8). Dieser Effekt ist wellenlängenabhängig. In Abbildung 3.9 wird die Verschiebung in Abhängigkeit von der Auslenkung für alle drei Wellenlängen gezeigt. Als Referenzwert wurde die Strahltaillenposition bei einer Auslenkung von 0 mm und einer Wellenlänge von 488 nm genommen. Die Verschiebung des Brennpunktes beträgt bei einer Auslenkung von 1,5 mm ungefähr 120 μm . Die Verschiebung zwischen einer Anregung von 488 nm und 633 nm beträgt 85 μm . Die chromatische Verschiebung und die Verschiebung durch die Auslenkung sind entgegengesetzt. Es ist zu beachten, dass der hohe Brechungsindex eine Verschiebung des Brennpunktes verstärkt. Im Vergleich zu Wasser ist die Verschiebung um $\frac{\eta_{\text{BABB}}}{\eta_{\text{Wasser}}} = 1,17$ größer.

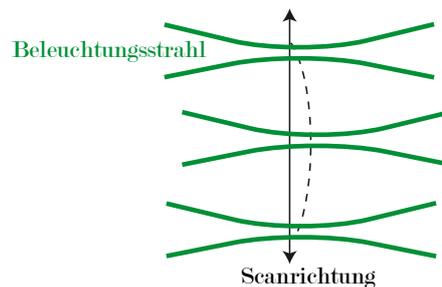


Abbildung 3.8: Durch die Auslenkung des Strahls kommt es zu einer Verschiebung der Strahltaile.

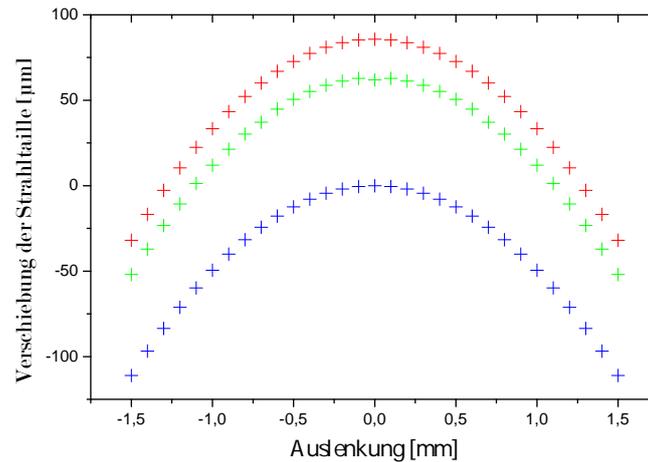


Abbildung 3.9: Die Abbildung zeigt die Brennpunktverschiebung bei verschiedenen Auslenkungen. Die Simulation wurde für die drei vorhandenen Anregungswellenlängen durchgeführt (blau: 488 nm, grün: 561 nm und rot: 633 nm). Als Referenzwert wurde der Strahl mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Auslenkung von 0 mm genommen.

3.3.2 Vergleich mit analytischen Berechnungen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Berechnungen anhand von Gleichung 3.9 für den Tailenradius des Beleuchtungsstrahls mit den Ergebnissen aus den *Zemax*-Simulationen verglichen. Für die *Zemax*-Simulation wurde ein Eingangsstrahl mit einem Strahldurchmesser von 0,7 mm verwendet, welcher mit dem Strahlaufweiter um den Faktor 20 aufgeweitet wurde. Die Iris nach dem Strahlaufweiter hat einen Durchmesser von 5 mm. Für die analytische Berechnung wurde ein ω_S von 2,5 mm gewählt, dieses entspricht dem Radius der Irisapertur. In Tabelle 3.1 sind die resultierenden Tailenradien der *Zemax*-Simulation und der analytischen Berechnungen für alle 3 Wellenlängen aufgelistet.

Wellenlänge [nm]	analytische Berechnung [µm]	<i>Zemax</i> [µm]
488	3,89	5,19
561	4,46	6,00
633	5,04	6,85

Tabelle 3.1: Die nach der Gleichung 3.9 abgeschätzten und die mit *Zemax* berechneten Tailenradien für alle drei Wellenlängen.

Bei der Abschätzung wurde für ω_S der halbe Blendendurchmesser gewählt. Jedoch entspricht das Strahlprofil nicht mehr einer Gauß-Verteilung. Aus diesem Grund sind die Werte aus den *Zemax*-Berechnungen etwas größer als die analytischen Berechnungen. Die Abbildung 3.10 zeigt das transversale Strahlprofil vor und hinter der Iris in der *Zemax*-Simulation.

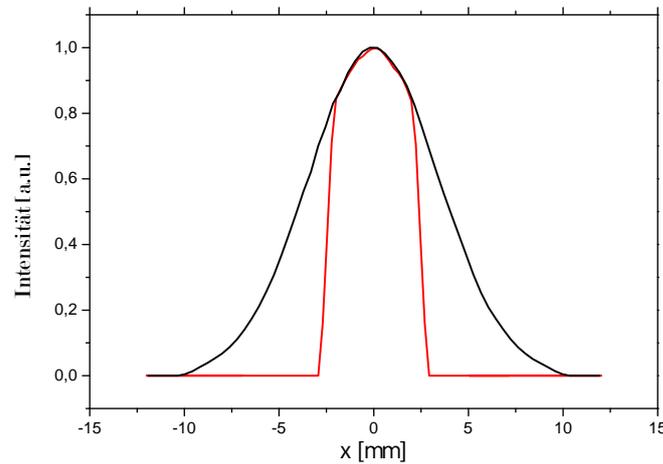


Abbildung 3.10: Strahlprofil vor (schwarze Linie) und hinter (rote Linie) der Blende. Der Blendendurchmesser beträgt 5 mm.

Mit der Blende ist es jedoch möglich, den Tailenradius des Lichtblattes einzustellen. Der Verlust an Laserleistung $P(A, \omega_{SA})$ durch die Blende kann durch folgende Gleichung bestimmt werden:

$$P(A, \omega_{SA}) = 1 - \exp\left(-2 \frac{R_B^2}{\omega_{SA}^2}\right) \quad (3.12)$$

Dabei ist R_B der Blendenradius und ω_{SA} der Strahlradius vor der Blende.

3.4 Einfluss von sphärischen Aberrationen auf die PSF

3.4.1 Analytische Berechnungen

Im Abschnitt 1.6 wurde gezeigt, wie sphärische Aberrationen analytisch berechnet werden können. Als erstes stellt sich die Frage, welchen Einfluss die numerische Apertur des Detektionsobjektivs auf die sphärischen Aberrationen hat. Hierzu wurde die 1., 2. und 3. Ordnung der sphärischen Aberration in Abhängigkeit von der numerischen Apertur nach Gleichung 1.12 berechnet. Diese Abhängigkeit ist in Abbildung 3.11 abgebildet. Die Kreise entsprechen den Ergebnissen der Berechnungen mit *Zemax* und die Linien entsprechen der analytischen Berechnung nach Gleichung 1.12. Im Anhang A.3.2 ist der Linsendaten-Editor der Simulation zu finden. Die Werte entsprechen dem Vorfaktor $NFP \eta_1 \sin(\alpha_1) A_{n,0}$ vor dem Zernike-Polynom (siehe Gleichung 1.12). Man erkennt einen starken Anstieg der 1. Ordnung ab einer numerischen Apertur von 0,3 und einen starken Anstieg der 2. Ordnung bei einer numerischen Apertur von 0,6. Für die 3. Ordnung steigt der Graph erst bei einer numerischen Apertur oberhalb von 0,8 an. Es wurde eine nominale Fokusposition NFP von 1 mm verwendet und der Bre-

chungsindex des Mediums beträgt 1,56. Die Defokussierung kann durch eine einfache Positionsänderung des Detektionsobjektivs kompensiert werden und muss deshalb nicht berücksichtigt werden.

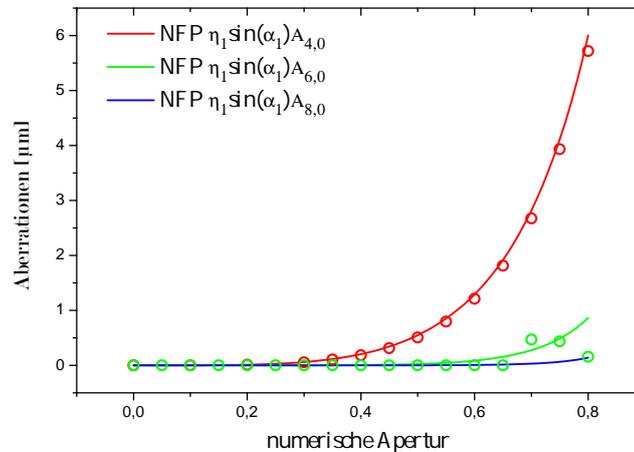


Abbildung 3.11: Die Werte von $dn_1 \sin(\alpha_1) A_{n,0}$ in Abhängigkeit zur numerischen Apertur. Es ist zu erkennen, dass die 1. Ordnung ab einer numerischen Apertur von 0,3 stark ansteigt. Ab einer numerischen Apertur von 0,6 kommt es zu einem Anstieg der 2. Ordnung. Die 3. Ordnung steigt erst oberhalb einer numerischen Apertur von 0,8 an. Die Kreise sind die Ergebnisse der *Zemax*-Simulation und die Linien entsprechen der analytischen Berechnung nach Gleichung 1.12.

Um die Auswirkungen von sphärischen Aberrationen auf die Abbildungsqualität zu verdeutlichen, wurde die Strehl-Zahl in Abhängigkeit von der NFP für 6 verschiedene numerische Aperturen berechnet (siehe Abbildung 3.12). Die Strehl-Zahl ist definiert als das Verhältnis der maximalen Intensität einer abgebildeten Punktquelle im Vergleich zur perfekten Abbildung durch ein beugungsbegrenztes optisches System. Die Strehl-Zahl entspricht dem Wert der Abbildungspunktspreizfunktion an der Position (0,0,0). Der Maximalwert der Strehl-Zahl beträgt damit 1. Ab einer Strehl-Zahl oberhalb von 0,8 spricht man von einer beugungsbegrenzten Auflösung. Die Abbildungspunktspreizfunktion mit Aberrationen kann nach Gleichung 1.16 berechnet werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Strehl-Zahl bei höheren numerischen Aperturen deutlich mit der NFP abnimmt. Gerade bei der Ultramikroskopie, bei der Proben mit einer großen Probentiefe untersucht werden, muss diese Tatsache beachtet werden. Die Ergebnisse der Abbildung 3.12 stimmen mit den Ergebnissen von Silvestri et al. überein [55]. Der Gleichung 1.19 ist zu entnehmen, dass die Auswirkung von Aberrationen bei größeren Wellenlängen abnimmt. Deshalb wurde für die Berechnungen die kleinste verfügbare Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet. Die theoretischen Berechnungen passen bis auf die auftretenden Oszillationen gut mit den *Zemax*-Simulationen überein.

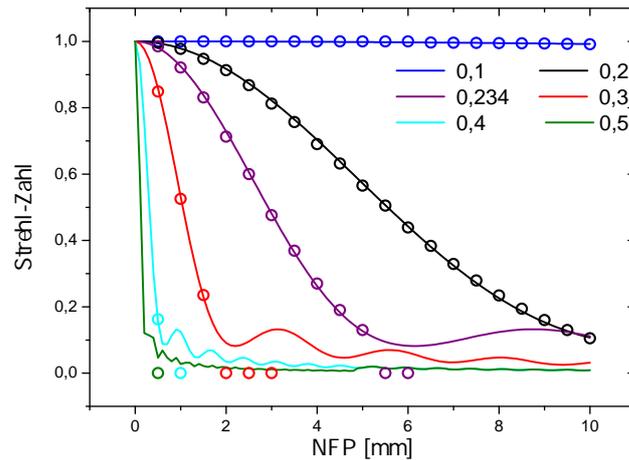


Abbildung 3.12: Die Strehl-Zahl in Abhängigkeit von der nominalen Fokusposition NFP bei unterschiedlichen numerischen Aperturen. Die Kreise entsprechen den Berechnungen mit *Zemax* und die Linien entsprechen der analytischen Berechnung.

3.4.2 Einfluss von sphärischen Aberrationen auf die laterale PSF

Gleichung 1.16 erlaubt die Berechnung der Abbildungspunktspreizfunktion $I_{Abb.}$ für verschiedene Objektive mit Berücksichtigung von sphärischen Aberrationen. In dieser Arbeit wurde die resultierende Beleuchtungspunktspreizfunktion für zwei Luftobjektive mit einer NA von 0,234 bzw. 0,5 berechnet. Die verwendeten numerischen Aperturen entsprechen den numerischen Aperturen der beiden vorhandenen Leica Luftobjektive (Leica Planapo 2x und Leica Planapo 5x). Hierzu wurde die laterale Abbildungspunktspreizfunktion in der $(x,y,0)$ -Ebene für verschiedene nominale Fokuspositionen NFP berechnet. Die dazugehörige Abberationsfunktion $\Psi(p, NFP)$ wurde mit Gleichung 1.12 bis zur 2. Ordnung berechnet. Nach Gleichungen 1.19 und 1.16 kann die Punktspreizfunktion für verschiedene NFP berechnet werden. Wie im vorherigen Abschnitt wurde ein Brechungsindex η_2 von 1,56 und eine Wellenlänge von 488 nm verwendet. Die Abbildung 3.13 zeigt die laterale Abbildungspunktspreizfunktion in der $(x,y,0)$ -Ebene eines Objektivs mit einer NA von 0,234 bei vier verschiedenen nominalen Fokuspositionen. In Abbildung 3.14 wird die laterale Abbildungspunktspreizfunktion eines Luftobjektivs mit einer NA von 0,5 bei unterschiedlichen nominalen Fokuspositionen abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Qualität der Abbildungspunktspreizfunktion des Objektivs mit höherer NA wesentlich anfälliger gegenüber der NFP ist. Schon bei einer NFP von 0,2 mm kommt es hier zu einer starken Reduktion der Abbildungsqualität. In beiden Abbildungen kann man die Bildung von Ringen um das zentrale Maximum deutlich erkennen.

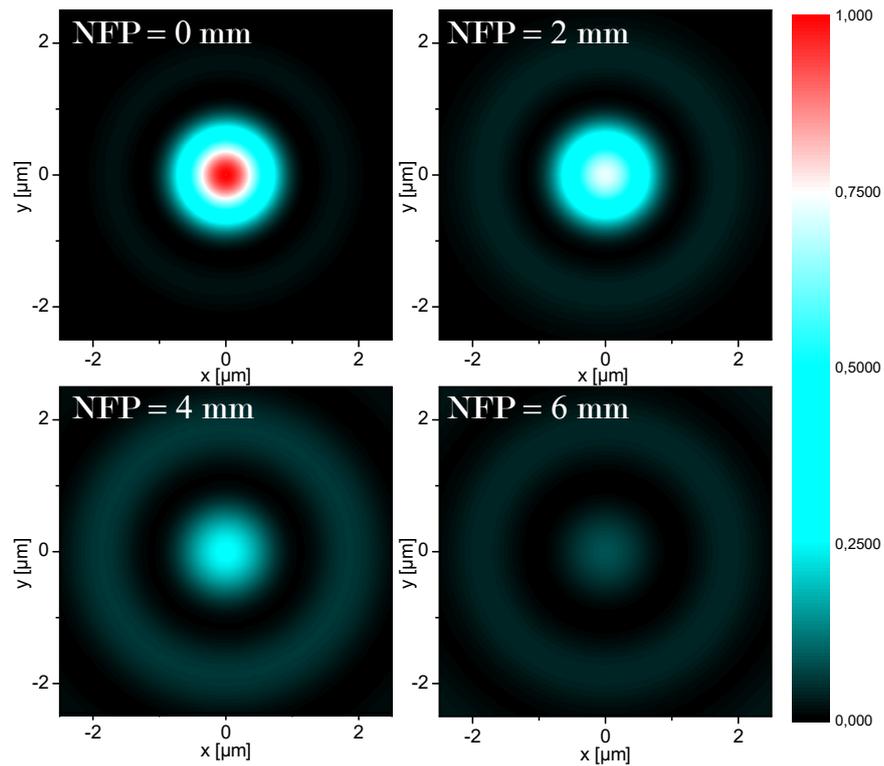


Abbildung 3.13: Laterale Abbildungspunktspreizfunktion eines Luftobjektivs mit einer NA von 0,234 bei unterschiedlichen nominalen Fokuspositionen.

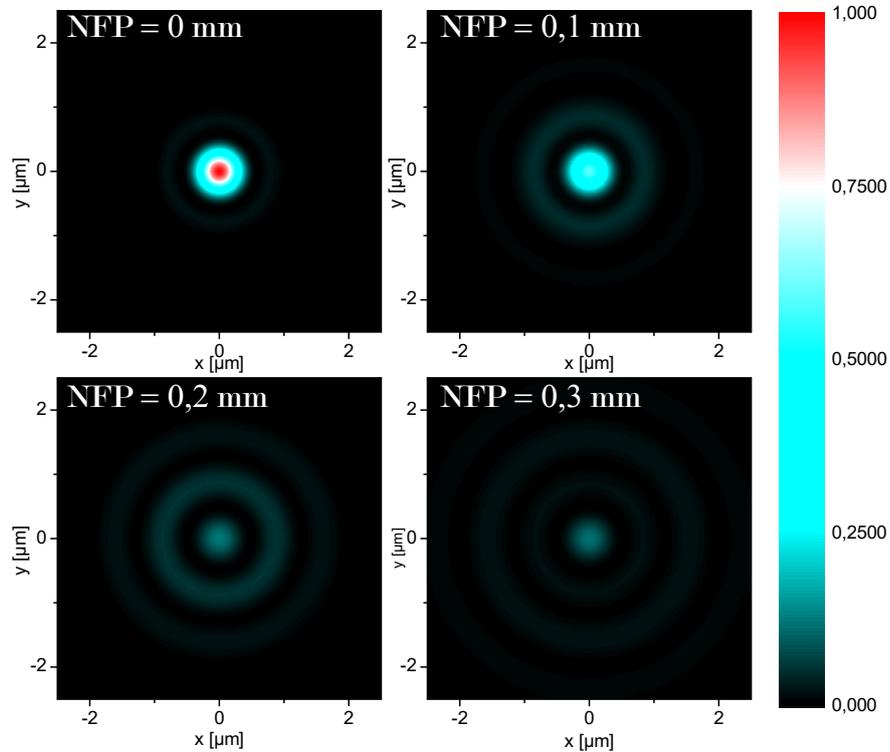


Abbildung 3.14: Laterale Abbildungspunktspreizfunktion eines Luftobjektivs mit einer NA von 0,5 bei unterschiedlichen nominalen Fokuspositionen.

3.4.3 Einfluss von sphärischen Aberrationen auf die axiale PSF

Auch auf die axiale Abbildungspunktspreizfunktion haben sphärische Aberrationen einen großen Einfluss [55]. Analog zum Unterabschnitt 3.4.2 wurde mit Hilfe der Aberrationsfunktion $\Psi(p, \text{NFP})$ (Gleichung 1.12) und den Gleichungen 1.19 und 1.16 die axiale Abbildungspunktspreizfunktion mit vorhandenen sphärischen Aberrationen berechnet. Die Abbildung 3.15 zeigt den Einfluss von sphärischen Aberrationen auf die axiale Abbildungspunktspreizfunktion bei einem Luftobjektiv mit einer NA von 0,234. Es ist deutlich zu erkennen, dass die axiale Ausdehnung der Abbildungspunktspreizfunktion bei höheren nominalen Fokuspositionen zunimmt. Die Wellenlänge beträgt 488 nm und der Brechungsindex n_2 beträgt 1,56. Die Abbildung 3.16 zeigt die axiale Abbildungspunktspreizfunktion eines Luftobjektivs mit einer NA von 0,5 bei unterschiedlichen nominalen Fokuspositionen.

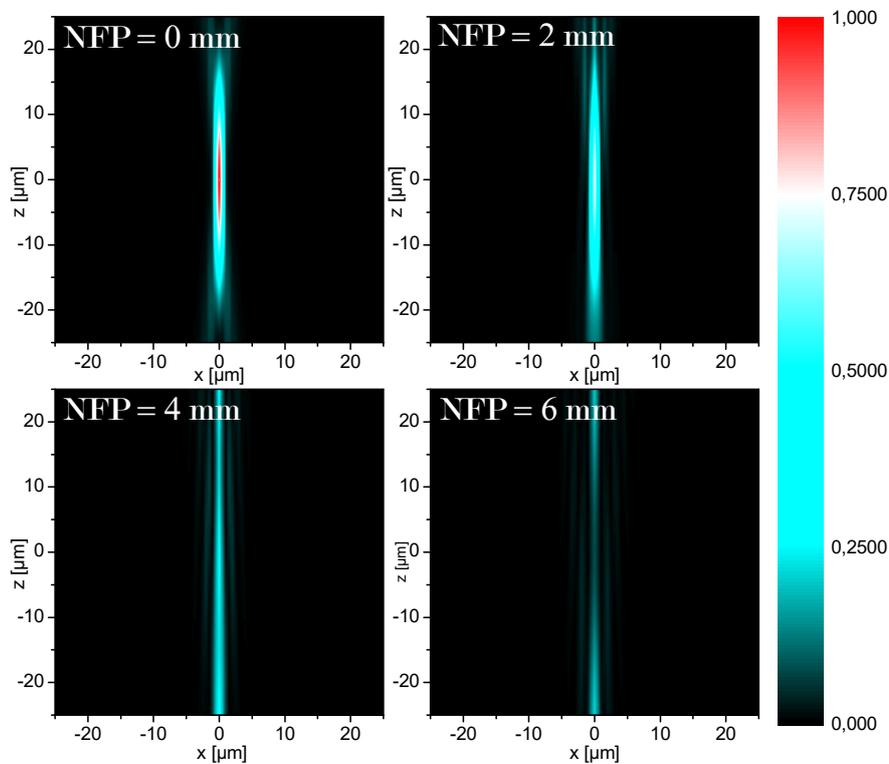


Abbildung 3.15: Axiale Abbildungspunktspreizfunktion eines Luftobjektivs mit einer NA von 0,234 bei unterschiedlichen nominalen Fokuspositionen.

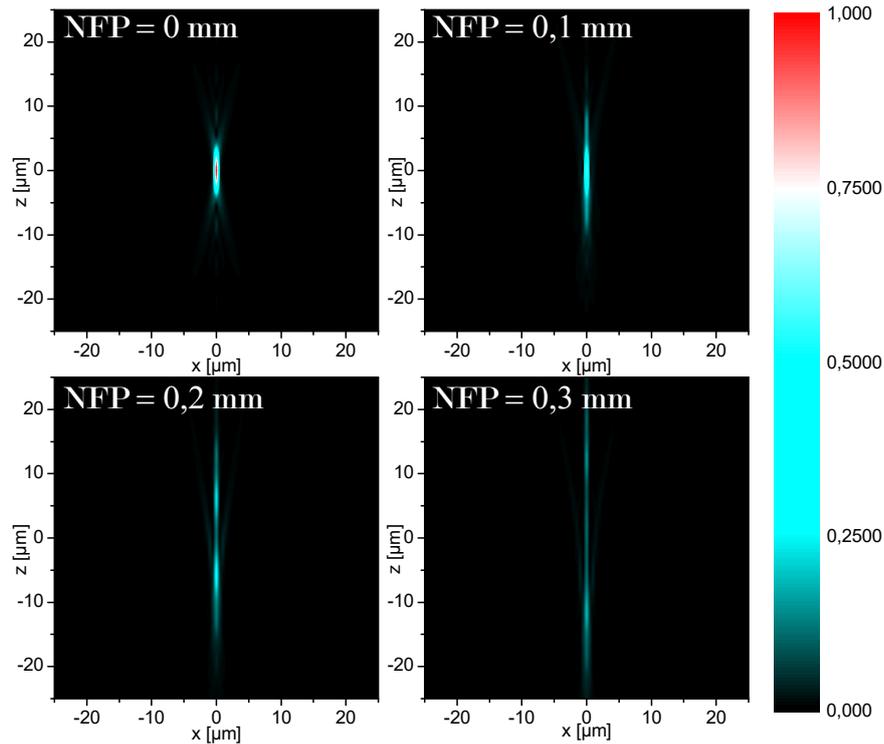


Abbildung 3.16: Axiale Abbildungspunktspreizfunktion eines Luftobjektivs mit einer NA von 0,5 bei unterschiedlichen nominalen Fokuspositionen.

Wie im Abschnitt 1.8 beschrieben, ist die totale Punktspreizfunktion eines Lichtscheibenmikroskops das Produkt aus der Abbildungspunktspreizfunktion und der Beleuchtungspunktspreizfunktion. Somit ist der Einfluss von sphärischen Aberrationen auch von der Strahlbreite des Lichtblattes abhängig. Je breiter das Lichtblatt ist, desto größer ist der Einfluss von sphärischen Aberrationen [55]. Die Abbildungen 3.17 und 3.18 zeigen den Einfluss von sphärischen Aberrationen auf die totale axiale Punktspreizfunktion in Abhängigkeit zum Beleuchtungsstrahlradius ω_0 . Die Unterabbildung A zeigt jeweils die axiale Abbildungspunktspreizfunktion, multipliziert mit der Funktion $\exp\left(-\frac{2z^2}{\omega_0^2}\right)$, ohne Aberrationen ($d = 0$). Die Unterabbildung B zeigt jeweils die axiale Abbildungspunktspreizfunktion mit sphärischen Aberrationen, multipliziert mit der gleichen Funktion $\exp\left(-\frac{2z^2}{\omega_0^2}\right)$. In Abbildung 3.17 wurde ein Luftobjektiv mit einer NA von 0,234 und in Abbildung 3.18 wurde ein Luftobjektiv mit einer NA von 0,5 für die Berechnungen verwendet. Die nominalen Fokuspositionen NFP für die Unterabbildung B betragen 4 mm (Abbildung 3.17) bzw. 0,2 mm (Abbildung 3.18). Es ist zu erkennen, dass der Einfluss von sphärischen Aberrationen mit der Strahlbreite ω_0 zunimmt. Bei einer numerischen Apertur von 0,5 besitzt die totale axiale Punktspreizfunktion zwei lokale Maxima bei höheren Tailenradien. Dieses deckt sich mit der Publikation von Silvestri et al. [55].

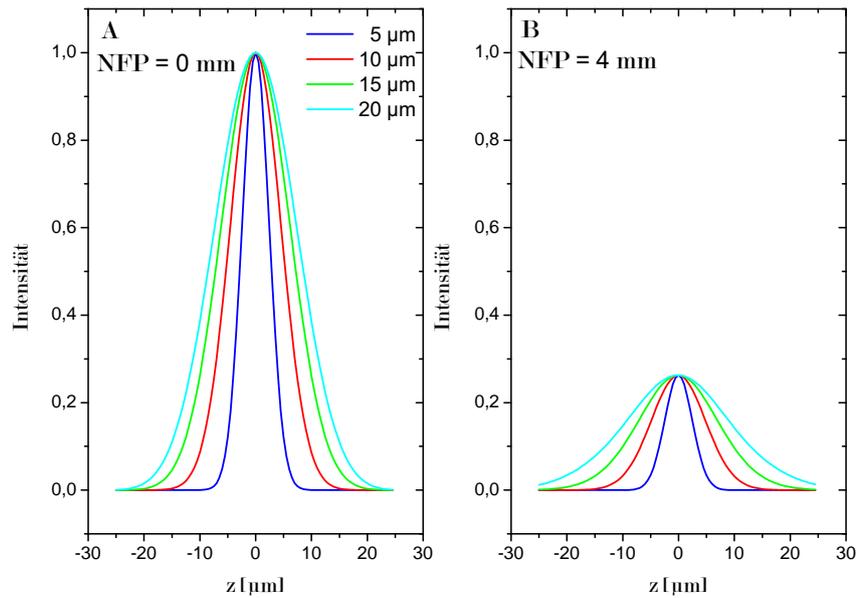


Abbildung 3.17: Die totale axiale Punktspreizfunktion bei verschiedenen Beleuchtungsstrahlradien ω_0 bei einem Luftobjektiv mit einer NA von 0,234 **A** ohne und **B** mit sphärischen Aberrationen. Sphärische Aberrationen führen zu einer starken Reduzierung der Intensität.

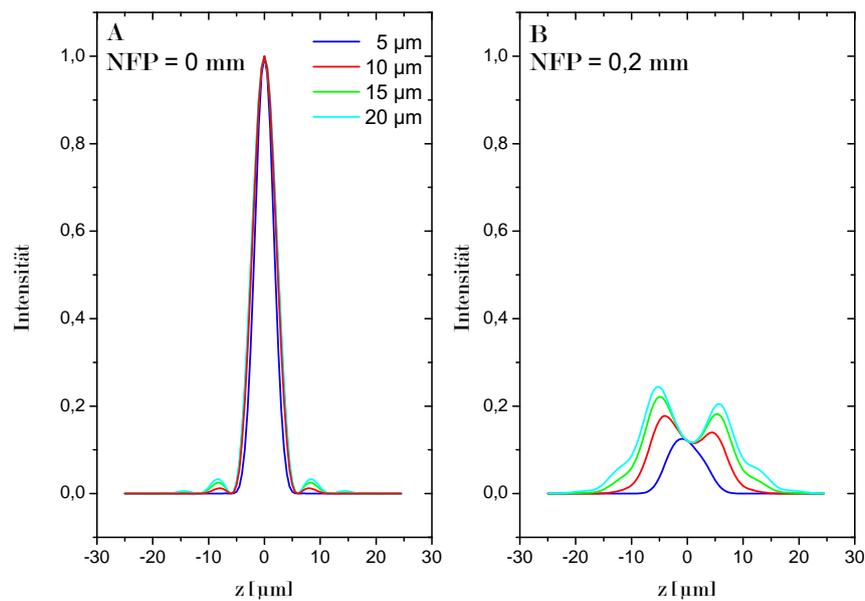


Abbildung 3.18: Die totale axiale Punktspreizfunktion bei verschiedenen Beleuchtungsstrahlradien ω_0 bei einem Luftobjektiv mit einer NA von 0,5 **A** ohne und **B** mit sphärischen Aberrationen. Sphärische Aberrationen führen zu einer starken Reduzierung der Intensität. Bei höheren Beleuchtungsstrahlradien besitzt die totale axiale Punktspreizfunktion zwei lokale Maxima.

3.4.4 Sphärische Aberrationen bei der Beleuchtung

Auch für die Beleuchtung müssen eventuell auftretende Aberrationen berücksichtigt werden. Beim hier entwickelten Mikroskop wird für die Beleuchtung ein Luftobjektiv verwendet. Auf Grund der Verwendung von BABB als Klärmittel ist die Verwendung eines Eintauchobjektivs für die Beleuchtung schwierig, da Dichtungen zerstört werden können. Durch die Anwendung eines Eintauchobjektivs für die Detektion benötigt die Küvette eine gewisse Kantenlänge. Die halbe Kantenlänge der Küvette beträgt 25 mm. Es muss nur die halbe Kantenlänge berücksichtigt werden, da sich die Probe bei den Messungen in der Mitte befindet. Der Strahlradius ω_2 vor dem Beleuchtungsobjektiv kann mit der Gleichung

$$\omega_2 = \frac{f_2 \omega_{\text{Iris}}}{f_1} = \frac{80 \text{ mm} \cdot 3,5 \text{ mm}}{100 \text{ mm}} = 2,8 \text{ mm} \quad (3.13)$$

abgeschätzt werden. ω_{Iris} ist der Strahlradius nach der Iris und durch die Spiegelapertur von 7 mm des ersten Galvanometers begrenzt. Daraus ergibt sich für den Strahlradius vor dem Beleuchtungsobjektiv ω_2 ein Maximalwert von 2,8 mm. Die Brennweite des Beleuchtungsobjektivs beträgt 50 mm. Daraus erhält man eine maximale mögliche effektive numerische Apertur für die Beleuchtung von $\arctan\left(\frac{2,8 \text{ mm}}{50 \text{ mm}}\right) = 0,056$. Die Abbildung 3.19 verdeutlicht die Berechnung. Bei dieser numerischen Apertur und einer halben Küvettenbreite d von 25 mm beträgt die Strehl-Zahl 0,9998, für eine Wellenlänge von 488 nm. Da dieser Wert sehr nahe an 1 liegt, müssen keine sphärischen Aberrationen korrigiert werden.

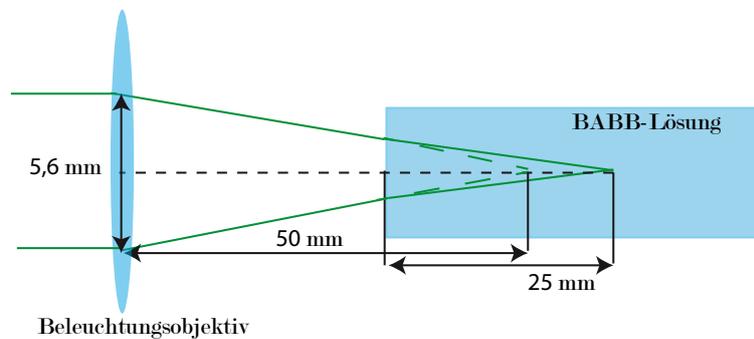


Abbildung 3.19: Der Beleuchtungsstrahl besitzt vor dem Beleuchtungsobjektiv einen maximalen Strahldurchmesser von 5,6 mm. Mit Hilfe der arctan-Funktion kann die maximale NA für die Beleuchtung bestimmt werden. Die gestrichene Linie gibt den Strahlverlauf ohne eine Änderung des Brechungsindex wieder.

4 Charakterisierung des Mikroskops

4.1 Charakterisierung des Beleuchtungsstrahls

In den folgenden Abschnitten wird der Beleuchtungsstrahl charakterisiert, hierfür wird die Autofluoreszenz der BABB-Lösung ausgenutzt. Mit einem *ImageJ* Makro wurde für jede x-Position eine Gauß-Anpassung des Strahls durchgeführt. Das Makro wurde von Dr. Jan-Peter Siebrasse freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Mit dem Programm *OriginPro* wurden der Strahltaillenradius nach dem Beleuchtungsobjektiv ω_0 und die dazugehörige Rayleighlänge z_R nach Gleichung 3.2 bestimmt. Abbildung 4.1 zeigt das axiale Strahlprofil, welches mit dem Makro bestimmt wurde.

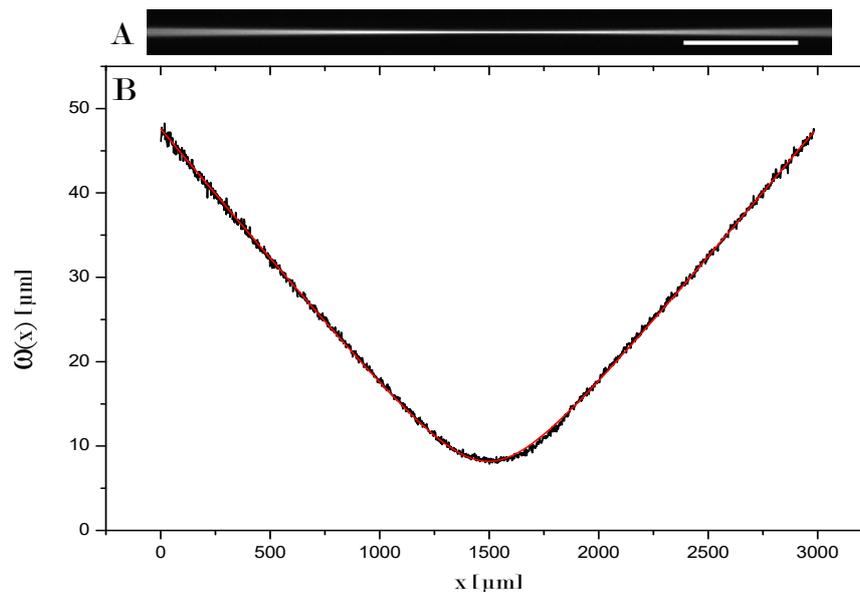


Abbildung 4.1: **A** Fokussierter Laserstrahl in der BABB-Lösung. **B** Axialer Strahlverlauf (schwarze Linie) mit der angepassten Kurve (rote Linie). Die Anregungswellenlänge beträgt 488 nm. Die Maßstabsbalkenlänge beträgt 500 µm.

4.1.1 Einfluss der Blende auf die Strahltaile

In diesem Abschnitt werden der Strahltaillenradius ω_0 und die Rayleighlänge z_R in Abhängigkeit zur Blendeneinstellung bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ge-

messen. Wie im Unterabschnitt 3.1.3 beschrieben, ist der Strahltaillenradius des Beleuchtungsstrahls reziprok zum Strahlradius des Eingangsstrahls vor der ersten Linse. In Abbildung 4.2 sind die Werte der Strahltaillentradien $\omega(x)$ entlang der x-Richtung für verschiedene Blendenöffnungen abgebildet. Wie die Theorie prognostiziert, nimmt die Breite der Strahltaille bei größeren Blendenöffnungen ab. In Abbildung 4.3 wird der Zusammenhang zwischen Tailenbreite und Blendendurchmesser gezeigt. An die Messwerte wurde mit *OriginPro* eine entsprechende Funktion angepasst. Für $\omega(x)$ wurde nach der Gleichung 3.9 die Anpassungsfunktion $x = \frac{A}{x} + B$ verwendet und für z_R wurde nach der Gleichung 3.3 die Anpassungsfunktion $x = \frac{A}{x^2} + B$ gewählt, wobei x eine Variable ist und nicht mit der x-Position des Strahls zu verwechseln ist. Bei der Anpassung erhält man für ω und z_R folgende Annäherungen:

$$\omega = \frac{26,9 \pm 1,62 \mu\text{m}}{D [\text{mm}]} + 2,16 \pm 0,39 \mu\text{m} \quad (4.1)$$

$$z_R = \frac{8443,24 \pm 668,16 \mu\text{m}}{D^2 [\text{mm}]} - 39,76 \pm 41,54 \mu\text{m} \quad (4.2)$$

Wobei $D [\text{mm}]$ der Blendendurchmesser in mm ist. Die Messungen wurden mit dem LaVision 4x Objektiv vorgenommen.

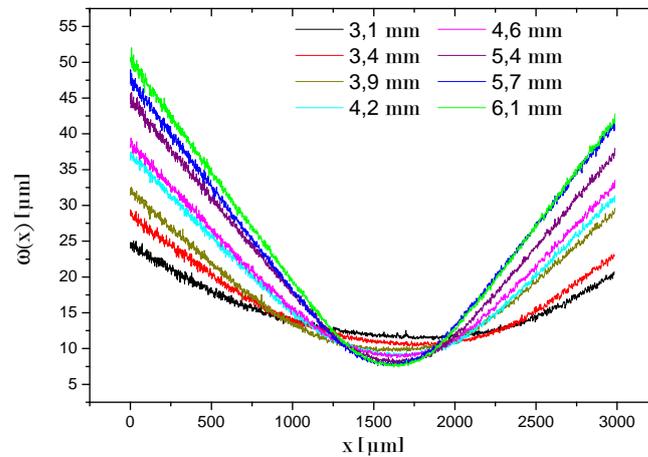


Abbildung 4.2: Axiales Intensitätsprofil des Laserstrahls in Abhängigkeit von der Blendeneinstellung. Es wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet.

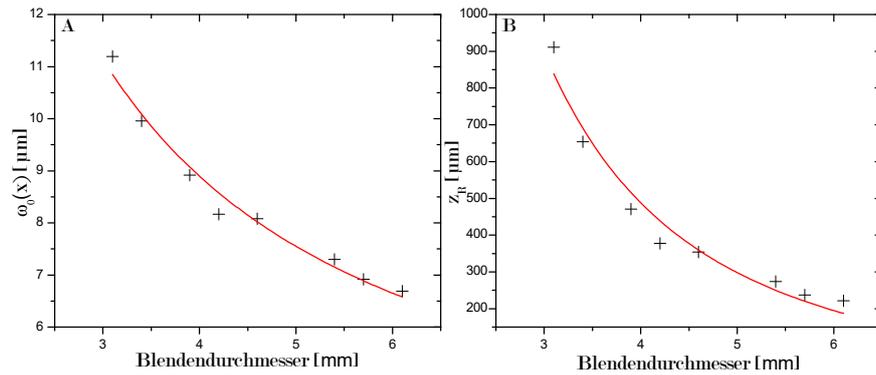


Abbildung 4.3: **A** Auswirkung der Blendenöffnung auf den Strahltaillenradius ω_0 . Die rote Linie zeigt die Anpassung nach der Formel $y = \frac{A}{x} + B$. **B** Auswirkung der Blendenöffnung auf die Rayleighlänge z_R . Die rote Linie zeigt die Anpassung nach der Formel $y = \frac{A}{x^2} + B$. Es wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet. Der Standardfehler der Anpassung mit *OriginPro* beträgt bei ω_0 zwischen 0,017 μm und 0,028 μm . Der Standardfehler für z_R liegt zwischen 1,01 μm und 2,81 μm .

4.1.2 Auslenkung des Beleuchtungsstrahls

In diesem Abschnitt wird der Strahl in Abhängigkeit von der Auslenkung untersucht. Als erstes wird die vertikale Lage des Strahls in Abhängigkeit zur angelegten Spannung am Galvanometer 1 bestimmt. Hierzu wird die vertikale y-Position der Strahltaille gemessen. Die Abbildung 4.4 zeigt die vertikale Auslenkung in Abhängigkeit zur angelegten Spannung V_1 am Galvanometer 1. Wie der Abbildung 4.4 zu entnehmen ist, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Auslenkung und angelegter Spannung V_1 . Dies ist notwendig, um eine gleichmäßige Beleuchtungsintensität entlang der Scanrichtung y zu erreichen. Bei einer angelegten Spannung von -1,2 V lag der Beleuchtungsstrahl bei diesen Messungen in der Detektormitte.

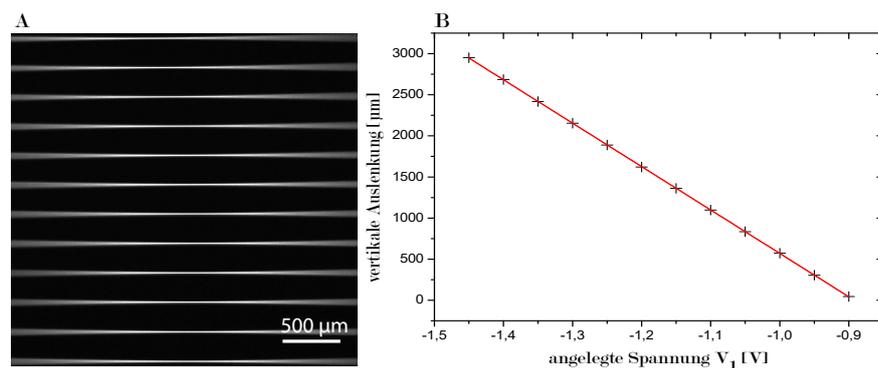


Abbildung 4.4: **A** Beleuchtungsstrahl bei verschiedenen Auslenkwinkeln des ersten Galvanometers (Galvanometer 1). **B** Vertikale Lage der ausgelenkten Strahlen abhängig von der angelegten Spannung V_1 . Die rote Linie zeigt eine lineare Anpassung.

Es stellt sich die Frage, wie weit sich möglicherweise die horizontale Position der Strahl-

taille bei der Auslenkung ändert. Hierfür wurden für verschiedene angelegte Spannungen V_1 am ersten Galvanometer der Strahlradius ω und die horizontale Position der Strahltaille gemessen. Alle Messungen wurden mit einer Anregung von 488 nm und dem LaVision 4x Objektiv durchgeführt. Die Blendenöffnung betrug 5,7 mm. Die Abbildung 4.5 zeigt die gemessenen Tailenradien und horizontalen Strahltailenpositionen bei unterschiedlich angelegten Spannungen.

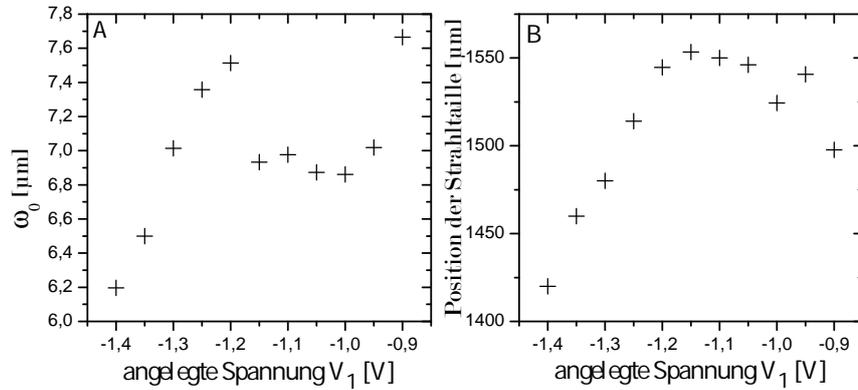


Abbildung 4.5: **A** Strahltailenradius ω_0 in Abhängigkeit zur angelegten Spannung V_1 . **B** Horizontale Position der Strahltaille bei verschiedenen angelegten Spannungen V_1 . Der Standardfehler der Anpassung mit *OriginPro* liegt bei ω_0 im Bereich von 0,02 μm und bei der horizontalen Verschiebung im Bereich von 1 μm .

Der laterale Strahltailenradius ω_0 bewegt sich im Bereich von 6,2 μm bis 7,7 μm und die Strahltailenposition bewegt sich innerhalb eines Bereichs von 133 μm . Es sei angemerkt, dass es sich um den lateralen Strahltailenradius handelt. In Abschnitt 4.4.4 wird die axiale Halbwertsbreite von fluoreszierenden Partikeln in Abhängigkeit zur Strahlauslenkung gemessen. Es zeigt sich, dass die axiale Auflösung unabhängig von der y-Position ist.

4.1.3 Schwenkung des Beleuchtungsstrahls

Durch die Winkeländerung des zweiten Galvanometers (Galvanometer 2) kommt es zu einer Schwenkung des Lichtblattes. Bei richtiger Justage liegen die Positionen der Strahltaille und des Schwenkpunktes in einem Punkt. Die Abbildung 4.6 zeigt den Beleuchtungsstrahl ohne und mit einer Schwenkung. Es wurde die Winkeländerung des Strahls in Abhängigkeit zur angelegten Spannung am zweiten Galvanometer untersucht. Hierfür wurde mit der $\arctan(x)$ -Funktion die Steigung des Strahls berechnet. In Abbildung 4.6 ist der Kippwinkel ϕ in Abhängigkeit zur angelegten Spannung V_1 abgebildet. Für die Messungen wurden dieselben Einstellungen wie im Unterabschnitt 4.1.2 verwendet.

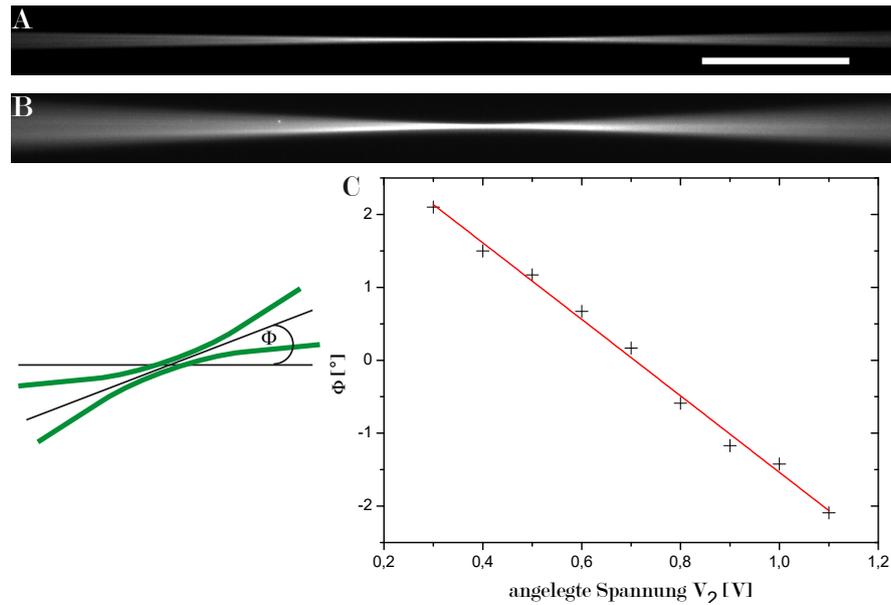


Abbildung 4.6: Bild **A** zeigt einen ungeschwenkten Strahl. Bild **B** zeigt die zeitliche mittlere Intensität des geschwenkten Strahls. Die Grafik **C** zeigt den Schwenkwinkel Φ in Abhängigkeit von der angelegten Spannung V_2 .

4.1.4 Charakterisierung des Beleuchtungsstrahls für verschiedene Wellenlängen

In diesem Unterabschnitt werden die Beleuchtungsstrahlen von allen drei vorhandenen Lasern miteinander verglichen. Hierzu wurde bei einer Blendenöffnung von 5,7 mm die Autofluoreszenz der BABB-Lösung gemessen. Die Grafik 4.7 zeigt die gemessenen axialen Strahlprofile für alle drei Laser.

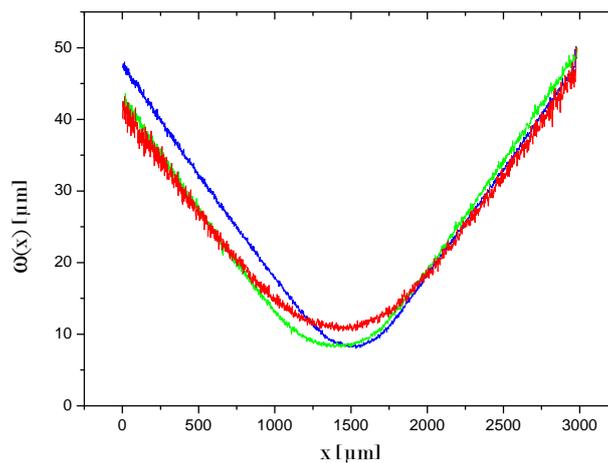


Abbildung 4.7: Die Grafik zeigt die axialen Strahlprofile bei verschiedenen Wellenlängen. (blaue Linie: 488 nm, grüne Linie: 561 nm und rote Linie: 633 nm)

In Tabelle 4.1 sind der Strahltaillenradius ω_0 nach dem Beleuchtungsobjektiv, der theo-

retische Strahlradius $\omega_{Z_{\max}}$, die Rayleighlänge z_R und die Verschiebung bezüglich des Strahls mit einer Wellenlänge von 488 nm für alle drei Laser aufgelistet. Der theoretische Strahltaillenradius ω_{theo} wurde mit *Zemax* bestimmt (siehe Unterabschnitt 3.3.2). Es besteht eine lineare Abhängigkeit von ω_0 bezüglich der Wellenlänge λ . Die Rayleighlänge sollte bei einer Anregung von 561 nm größer sein als bei einer Anregung von 488 nm.

Wellenlänge	ω_0 [μm]	$\omega_{Z_{\max}}$ [μm]	z_R [μm]	Verschiebung [μm]
488	$6,19 \pm 0,02$	5,19	$262,04 \pm 0,57$	0
561	$6,99 \pm 0,03$	6,00	$239,14 \pm 1,26$	$101,19 \pm 0,56$
633	$8,76 \pm 0,04$	6,85	$352,37 \pm 1,64$	$81,11 \pm 1,64$

Tabelle 4.1: In der Tabelle sind der Strahltaillenradius und die Verschiebung der Strahltaile bezüglich des Strahls mit einer Wellenlänge von 488 nm für die drei Laser aufgelistet. Die Standardabweichungen geben den Standardfehler bei der Anpassung der Kurven in Abbildung 4.7 wieder.

4.2 Herstellung eines Phantoms aus Epoxidharz

Für die Messung der totalen Punktspreizfunktion in einer BABB-Lösung ergibt sich das Problem der Nichtbeständigkeit von fluoreszierenden Polymerpartikeln in einer BABB-Lösung. Die getesteten Polymerkugeln wurden sofort nach dem Kontakt mit der BABB-Lösung zerstört. Silvestri et al. verwendeten fluoreszierende Kugeln aus Silikonglas [88]. Becker et al. dagegen betteten fluoreszierende Partikel in Polyesterharz ein [39]. Dieses Phantom erlaubte die Messung der Punktspreizfunktion in einer Klärlösung. Anstatt Polyesterharz wurde hier ein Epoxidharz verwendet (EPO-TEK 301-2, Epoxy Technology). Der Brechungsindex von EPO-TEK 301-2 beträgt laut Hersteller 1,539 bei 589 nm und ist somit fast gleich dem des Brechungsindex der BABB-Lösung von 1,56. Das verwendete Epoxidharz zeigte eine hohe Resistenz gegenüber der BABB-Lösung. Auch stellte sich eine sehr lange Haltbarkeit der Kugeln in dieser Umgebung heraus. Da das verwendete Epoxidharz für die Anwendung in der Restaurierung entwickelt wurde und dort ein exakter Brechungsindex notwendig ist, kann davon ausgegangen werden, dass bei der Herstellung der Komponenten auf die Einhaltung des Brechungsindex besonders geachtet wird. Das Phantom wurde durch folgendes Protokoll hergestellt:

1. Mischung von Epoxidharz und Härter nach der Anleitung des Herstellers.
2. Zugabe der gewünschten Menge fluoreszierender Partikel. Es stellte sich heraus, dass die Partikel im Härter nicht stabil sind. Erst in der Mischung von Härter und Epoxidharz werden die Partikel nicht mehr zerstört.

3. Die Mischung wird in eine Form, bestehend aus einer Grundplatte und einem Ober-
teil, langsam eingegossen. Dabei wird eine Einwegpipette verwendet, um die Bildung
von Luftlöchern zu vermeiden. Der Spalt zwischen Ober- und Grundplatte wird mit
klarem Nagellack versiegelt.
4. Nach dem Aushärten des Epoxidharzes kann durch Erwärmen der Form das Harz
leicht aus der Form herausgedrückt werden.
5. Mit einer Feile werden die einzelnen Flächen begradigt.
6. Mit Hilfe von Nassschleifpapier mit einer Körnung von 1000 werden die einzelnen
Flächen geschliffen.
7. Nach dem Schleifen wird das Phantom mit einer Polierpaste (SONAX Kratzer Ent-
ferner, SONAX GmbH) poliert. Sind nach dem Polieren noch Kratzer zu erkennen, wird
wieder mit Schritt 6 begonnen. Die Schritte 6 und 7 werden so lange wiederholt, bis
keine Kratzer mehr zu erkennen sind und das Phantom an allen Flächen transparent ist.

Das Foto 4.8 zeigt ein Phantom nach allen Bearbeitungsschritten.

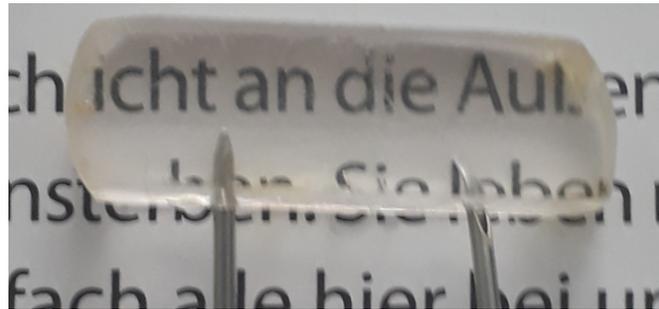


Abbildung 4.8: Foto des Phantoms nach allen Bearbeitungsschritten.

4.3 Messung der PSF

4.3.1 Das Nyquist-Theorem

Bei der Bildaufnahme mit einem Bildsensor muss die Größe der einzelnen Bildpunkte berücksichtigt werden. Jeder Bildpunkt integriert die auftreffende Intensität über eine bestimmte Fläche. Es stellt sich die Frage, wie groß der Bildpunkt maximal sein darf, damit es nicht zu einer Verschlechterung der Auflösung kommt. Laut dem Nyquist-Abtast-Theorem darf für die optische Mikroskopie mit einem selbstleuchtenden Punkt die Bildpunktgröße höchstens halb so groß wie die optische Auflösung nach dem Rayleigh-Kriterium sein [89]. Bei einem größeren Bildpunkt wird das Nyquist-Theorem verletzt.

Bei Verwendung einer hohen numerischen Apertur und einer verhältnismäßig kleinen Vergrößerung kann es zu einer Verletzung des Nyquist-Abtast-Theorems kommen. Die kleinste mögliche Vergrößerung M_{min} ohne Verletzung des Nyquist-Theorems ist gegeben durch [89]:

$$M_{min} = \frac{2eNA}{0,61\lambda} \quad (4.3)$$

e ist die Breite einer Bildsensorzelle. Diese Bedingung wird häufig in der Ultramikroskopie verletzt [39]. Auch bei diesem Mikroskop wurde zugunsten einer niedrigen optischen Vergrößerung auf die Einhaltung des Nyquist-Theorems verzichtet.

4.3.2 Einfluss der Bildpunktgröße auf die gemessene Halbwertsbreite

In diesem Unterabschnitt wird untersucht, welchen Einfluss die Bildpunktgröße d_M auf die Bestimmung der lateralen Halbwertsbreite eines fluoreszierenden Partikels hat. Die laterale Punktspreizfunktion wird einfachheitshalber durch eine zweidimensionale Normalverteilung approximiert (siehe Abbildung 4.10). Die Approximation erlaubt die analytische Berechnung der Stammfunktion. Die Normalverteilung wird stückweise über eine Fläche A integriert, wobei A der Fläche eines Bildpunktes entspricht. An diesen Werten wurde eine Gauß-Funktion angepasst. Für diese Anpassung wurde ein ungewichtetes Least-Squares-Verfahren verwendet. Aus diesen Daten ist es möglich, einen Zusammenhang zwischen der Bildpunktgröße und der gemessenen Halbwertsbreite zu erhalten. Auch wird der Phasenbezug zwischen einer zweidimensionalen Normalverteilung und den einzelnen Bildpunkten berücksichtigt (Abbildung 4.11).

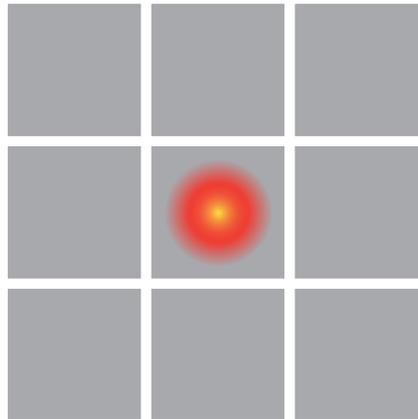


Abbildung 4.9: Die Abbildung zeigt ein Array von 9 Bildpunkten mit einer zweidimensionalen Normalverteilung in der Mitte.

Die Abbildung 4.10 zeigt den Intensitätsverlauf einer Airy-Scheibe (schwarze Linie). Die rote Linie zeigt die Anpassung mit Hilfe einer Normalverteilung. Es ist zu erkennen, dass das Hauptmaximum gut mit einer Normalverteilung genähert werden kann. Jedoch werden die Nebenmaxima bei der Näherung nicht mehr berücksichtigt.

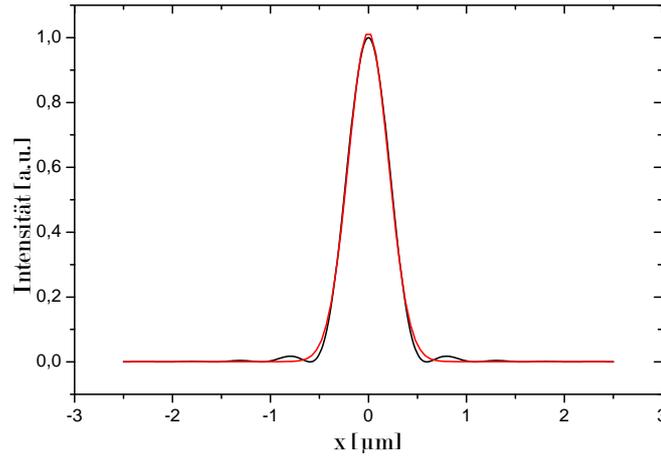


Abbildung 4.10: Intensitätsverlauf einer Airy-Scheibe (schwarze Linie) und die zugehörige Gauß-Anpassung (rote Linie).

Eine zweidimensionale rotationssymmetrische Normalverteilung $p(x, y)$ in der xy -Ebene wird durch folgende Gleichung beschrieben [90]:

$$p(x, y) = p(x)p(y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left(-\left[\frac{(x - \mu_x)^2}{2\sigma^2}\right]\right) \exp\left(-\left[\frac{(y - \mu_y)^2}{2\sigma^2}\right]\right) \quad (4.4)$$

Für die Integration über eine rechteckige Fläche mit dem Flächeninhalt $(x_2 - x_1)(y_2 - y_1)$ erhält man folgendes Integral:

$$\begin{aligned} I(x_1, x_2, y_1, y_2) &= \int_{x_1}^{x_2} \int_{y_1}^{y_2} p(x, y) dx dy = \int_{x_1}^{x_2} p(x) dx \int_{y_1}^{y_2} p(y) dy \\ &= \frac{1}{2\pi\sigma} \sqrt{\frac{\pi}{2}} \int_{x_1}^{x_2} p(x) dx \left(\operatorname{erf}\left(\frac{y_2 - \mu_y}{\sqrt{2}\sigma}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{y_1 - \mu_y}{\sqrt{2}\sigma}\right) \right) \\ &= \frac{1}{4} \left(\operatorname{erf}\left(\frac{x_2 - \mu_x}{\sqrt{2}\sigma}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{x_1 - \mu_x}{\sqrt{2}\sigma}\right) \right) \left(\operatorname{erf}\left(\frac{y_2 - \mu_y}{\sqrt{2}\sigma}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{y_1 - \mu_y}{\sqrt{2}\sigma}\right) \right) \end{aligned} \quad (4.5)$$

Dabei ist $\operatorname{erf}(x)$ die Fehlerfunktion:

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp(-t^2) dt \quad (4.6)$$

Bei einer zweidimensionalen Normalverteilung sind Terme, welche von x und y abhängig sind, separierbar.

$I(x_1, x_2, y_1, y_2)$ ist von μ_x und μ_y abhängig. Dies entspricht einer Verschiebung der zweidimensionalen Normalverteilung in x -Richtung bzw. in y -Richtung relativ der Position der Bildpunkte. Abbildung 4.11 verdeutlicht die Abhängigkeit der angepassten Halbwertsbreite von der Position der zweidimensionalen Normalverteilung relativ zu den einzelnen Bildpunkten. Werden die stückweise integrierten Normalverteilungen entlang der x -Richtung angepasst, ist das Ergebnis unabhängig von einer Verschiebung in der y -Richtung. Deshalb muss nur die Verschiebung bezüglich der x -Richtung berücksichtigt werden, wenn entlang dieser Richtung die Intensitätswerte gemessen werden. Die

angepasste Halbwertsbreite ist von der x-Position der zweidimensionalen Normalverteilung bezüglich der Bildpunkte abhängig. Bei den Werten in Abbildung 4.13 handelt es sich um einen Mittelwert von angepassten, stückweise integrierten Normalverteilungen mit unterschiedlichen μ_x . Die Verschiebung geht von 0 bis zu einer ganzen Bildpunktbreite d_M . Der Abstand zwischen zwei Verschiebungen beträgt $0,1 \mu\text{m}$. Somit beträgt die Anzahl der Anpassungen $n = \frac{d_M[\mu\text{m}]}{0,1} + 1$. Aus diesen Anpassungen kann eine Standardabweichung berechnet werden.

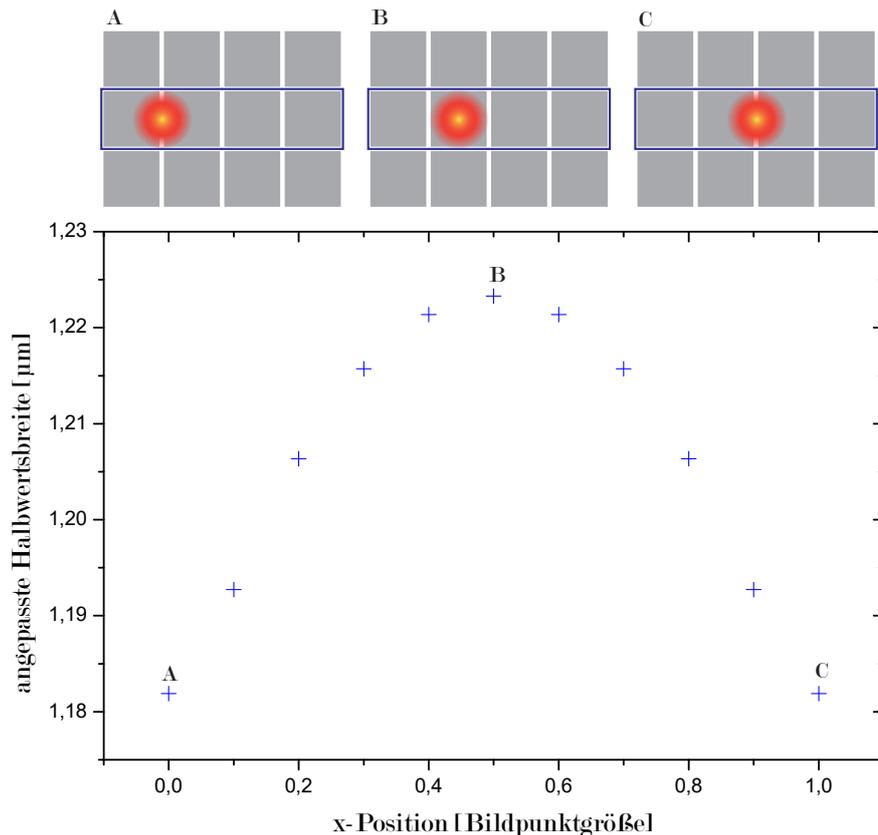


Abbildung 4.11: Die angepasste Halbwertsbreite ist von der Position der zweidimensionalen Normalverteilung relativ zu den einzelnen Bildpunkten abhängig. Es wird die Intensität von den Bildpunkten ausgewertet, die mit einem blauen Kasten umrandet sind. Die Halbwertsbreite der Normalverteilung beträgt $1 \mu\text{m}$ und die Bildpunktgröße beträgt $1 \mu\text{m}$. Die Verschiebung geht von 0 (Position A) bis zu einer ganzen Bildpunktweite (Position C).

In Abbildung 4.12 ist die Standardabweichung in Abhängigkeit von der Bildpunktgröße abgebildet. Es wurde eine Normalverteilung mit einer Halbwertsbreite von $1 \mu\text{m}$ bzw. $0,5 \mu\text{m}$ für diese Simulation verwendet. Es ist zu erkennen, dass die Standardabweichung stark ansteigt, wenn das Nyquist-Theorem nicht mehr erfüllt ist. Jedoch ist die Standardabweichung im Vergleich zu der Halbwertsbreite der zweidimensionalen Normalverteilung klein und die x-Position der zweidimensionalen Normalverteilung spielt somit eine untergeordnete Rolle.

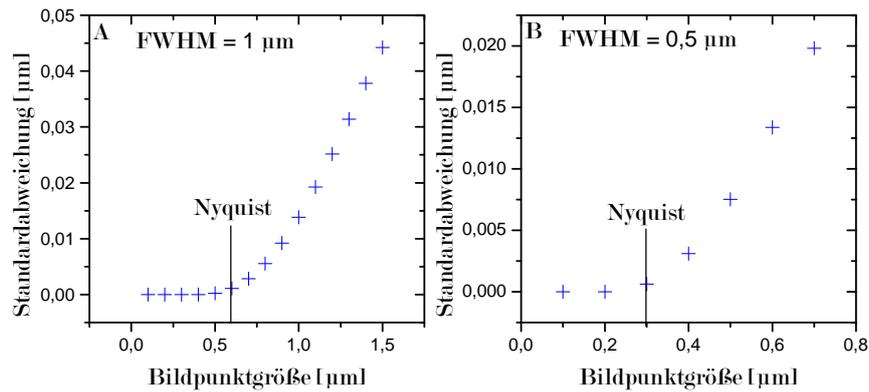


Abbildung 4.12: Es wurde die Standardabweichung berechnet, die durch unterschiedliche Positionen der zweidimensionalen Normalverteilung relativ zu den Zentren der Bildpunkte entsteht. In Abbildung **A** wurde die Standardabweichung für eine laterale Punktspreizfunktion mit einer Halbwertsbreite von 1 µm berechnet. In Abbildung **B** wurde die Standardabweichung für eine laterale Punktspreizfunktion mit einer Halbwertsbreite von 0,5 µm berechnet.

Die Abbildung 4.13 zeigt die angepasste Halbwertsbreite bei zwei Normalverteilungen mit unterschiedlichen Halbwertsbreiten in Abhängigkeit von der Bildpunktgröße. Es ist zu erkennen, dass es zu einem monotonen Anstieg der angepassten Halbwertsbreiten im Bezug zur Bildpunktgröße kommt. Das bedeutet, die tatsächliche Halbwertsbreite der zweidimensionalen Normalverteilung ist kleiner als der angepasste Wert, wenn die Bildpunkte nicht infinitesimal klein sind. Die stückweise integrierten Normalverteilungen wurden mit dem ungewichteten Least-Squares-Verfahren angepasst. Die Fehlerbalken verdeutlichen die Standardabweichungen des Mittelwertes der Anpassungen mit unterschiedlichen μ_x .

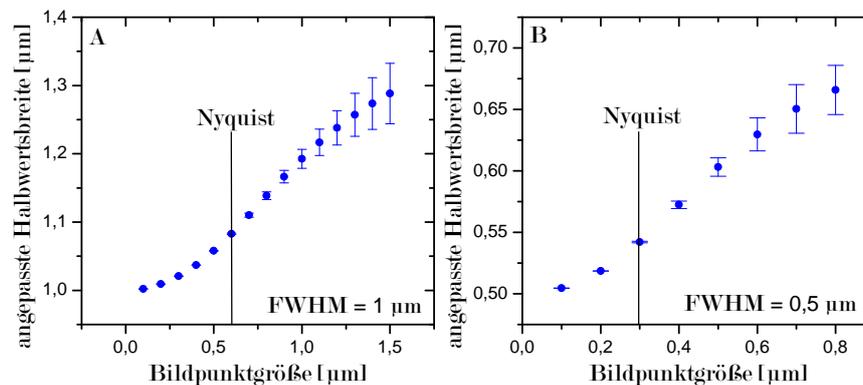


Abbildung 4.13: Vergleich der angepassten Halbwertsbreiten in Abhängigkeit von der Bildpunktgröße. $I(x_1, x_2, y_1, y_2)$ wurde mit einem ungewichteten Least-Squares-Verfahren angepasst. Bei Abbildung **A** wurde über eine Normalverteilung mit einer Halbwertsbreite von 1 µm stückweise integriert. Bei Abbildung **B** wurde eine Normalverteilung mit einer Halbwertsbreite von 0,5 µm betrachtet. Die angepasste Halbwertsbreite nimmt mit der Bildpunktgröße zu.

4.4 Messungen am Phantom

Für die Messung der lateralen und axialen Halbwertsbreiten wurden fluoreszierende Mikropartikel aus Polystyrol (FluoSpheres F8809, elife technologies) in einen Phantom aus Epoxidharz ausgewertet. Der mittlere Durchmesser der Partikel beträgt $0,2\ \mu\text{m}$ und liegt damit weit unterhalb der theoretischen lateralen Auflösung des Mikroskops. Obwohl das Absorptionsmaximum bei $580\ \text{nm}$ lag, konnten die Teilchen auch noch mit $488\ \text{nm}$ angeregt werden. Es war jedoch nicht möglich, die Mikropartikel mit einer Wellenlänge von $633\ \text{nm}$ anzuregen. Für die Anregung mit einer Wellenlänge von $488\ \text{nm}$ wurde ein Bandfilter (525/39 BrightLine HC, Semrock) verwendet und für die Anregung mit einer Wellenlänge von $561\ \text{nm}$ wurde ein Multibandpassfilter (ZET 488/561m, Chroma) als Emissionsfilter ausgewählt. Es wurden insgesamt vier Bildstapel mit zwei Luftobjektiven (Leica 2x und Leica 5x) und zwei Eintauchobjektiven (LaVision 4x und LaVision 12x) mit einer Schrittweite in axialer Richtung Δz von $1\ \mu\text{m}$ aufgenommen. Bei den Messungen mit einem Luftobjektiv wurde das Objektiv nach der Formel 1.5 bewegt, damit es zu keiner Defokussierung kommt. Außerdem war das Phantom bei den Messungen mit beiden Luftobjektiven hauchdünn mit einer BABB-Lösung bedeckt. Die Brennweite der verwendeten Tubuslinse betrug $200\ \text{mm}$. Die numerischen Aperturen und optischen Vergrößerungen für alle Objektive sind Tabelle 2.2 im Unterabschnitt 2.3.2 zu entnehmen. Die Blendenöffnung betrug bei den Messungen $5,7\ \text{mm}$. Diese Blendenöffnung wurde auch bei den Messungen von ganzen Maushirnen (siehe Kapitel 5) gewählt.

4.4.1 Messung der lateralen Halbwertsbreite mit unterschiedlichen Detektionsobjektiven

Um die laterale Halbwertsbreite abzuschätzen, wurde in *ImageJ* mit dem Linealwerkzeug der Intensitätsverlauf eines fluoreszierenden Partikels entlang der x-Richtung gemessen. Der Intensitätsverlauf wurde mit einer Gauß-Funktion in *OriginPro* angepasst. In Abbildung 4.14 wird diese Messmethode für die laterale Halbwertsbreite verdeutlicht.

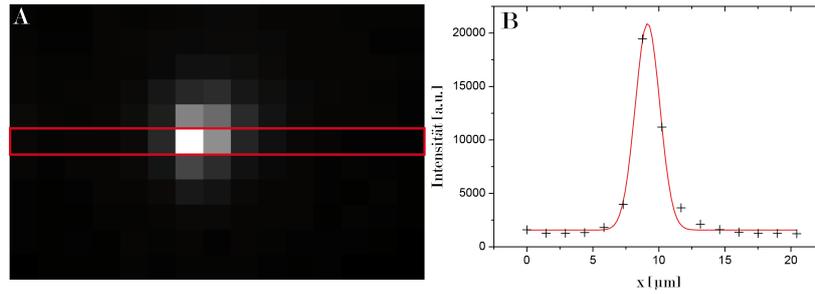


Abbildung 4.14: Messung der lateralen Halbwertsbreite entlang der x-Richtung. **A** Ein fluoreszierendes Partikel in einem Epoxidharz. Die Bildpunktweite entspricht $1,46 \mu\text{m}$. Es wurde die Intensität entlang des roten Rechtecks gemessen. **B** Intensitätsverlauf (schwarze Kreuze) mit einer Gauß-Anpassung (rote Linie). Es wurde mit einer Wellenlänge von 561 nm angeregt. Für die Detektion wurde das LaVision 4x Objektiv verwendet.

Es wurden fluoreszierende Partikel innerhalb des ganzen Bildbereichs ausgewählt. Durch die große Bildpunktgröße wird eine Gauß-Funktion im Schnitt nur über 2 Messwerte angepasst. In Tabelle 4.2 befinden sich die Ergebnisse der lateralen Halbwertsbreiten für vier verschiedene Objektive. $d_{xy,theo}$ ist die theoretische laterale Halbwertsbreite, welche nach Formel 1.25 berechnet werden kann. $d_{xy,G}$ berücksichtigt die Größe der einzelnen Bildpunkte und $d_{xy,exp}$ ist schließlich die gemessene Halbwertsbreite. Die Halbwertsbreite wurde aus je 10 fluoreszierenden Partikeln gewonnen. Die Schichtdicke des Epoxidharzes oberhalb der gemessenen Position beträgt ca. $400 \mu\text{m}$. Die Probentiefe ist notwendig, damit der divergente Strahl ganzheitlich auf das Phantom trifft. d_M ist die Bildpunktweite bei einer 200 mm Tubuslinse.

Objektiv	d_M [µm]	$d_{xy,theo}$ [µm]	$d_{xy,G}$ [µm]	$d_{xy,exp}$ [µm]
LaVision 4x	1,46	0,83	1,22	$2,16 \pm 0,13$
	1,46	0,95	1,25	$2,248 \pm 0,203$
LaVision 12x	0,54	0,47	0,58	$0,94 \pm 0,07$
	0,54	0,54	0,65	$1,03 \pm 0,08$
Leica 2x	1,63	1,06	1,35	$2,72 \pm 0,41$
	1,63	1,22	1,51	$2,87 \pm 0,43$
Leica 5x	0,65	0,50	0,63	$1,13 \pm 0,08$
	0,65	0,57	0,70	$1,57 \pm 0,06$

Tabelle 4.2: Die Tabelle zeigt die gemessenen und theoretischen lateralen Halbwertsbreiten für zwei Eintauchobjektive (LaVision 4x und LaVision 12x) und zwei Luftobjektive (Leica 2x und Leica 5x) bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen (blau: 488 nm und grün: 561 nm). Es wurde jeweils über 10 Messungen gemittelt.

Betrachtet man die Tabelle 4.2, so fällt eine relativ große Abweichung zwischen theoretischer und gemessener lateraler Halbwertsbreite auf. Auch unter Berücksichtigung der Vergrößerung der Halbwertsbreite durch die Verletzung des Nyquist-Theorems ist die gemessene laterale Halbwertsbreite zu groß.

4.4.2 Messung der axialen Halbwertsbreite mit unterschiedlichen Detektionsobjektiven

Für die Messung der axialen Halbwertsbreite wurde in *ImageJ* mit dem Werkzeug „Plot z-Axis Profile“ das Intensitätsprofil entlang der z-Richtung gemessen. Hierzu wurde mit dem „Ellipsenauswahl-Werkzeug“ um das fluoreszierende Teilchen ein Kreis gelegt. Innerhalb des Kreises wurde die mittlere Intensität bestimmt. Die Halbwertsbreite dieser gemittelten Intensitäten wurde mit *OriginPro* bestimmt. Für alle aufgenommenen Bildstapel wurde eine Schrittweite in axialer Richtung Δz von $1\ \mu\text{m}$ gewählt. Wie im vorherigen Abschnitt betrug die Probtiefe ca. $400\ \mu\text{m}$. Bei diesen Messungen wurde das Nyquist-Kriterium erfüllt. Bei den Messungen wurden die gleichen Emissionsfilter wie im vorherigen Abschnitt verwendet. Abbildung 4.15 zeigt den Verlauf der gemessenen axialen Halbwertsbreite entlang der x-Richtung für beide Eintauchobjektive und für zwei Anregungswellenlängen. Die axiale Halbwertsbreite wird stark vom Strahldurchmesser beeinflusst. Für die Bestimmung der axialen Halbwertsbreite in der Region der Strahltaile wurde der Mittelwert aus 10 Messungen genommen. In Tabelle 4.3 sind die axialen Halbwertsbreiten für vier verschiedene Objektive aufgelistet.

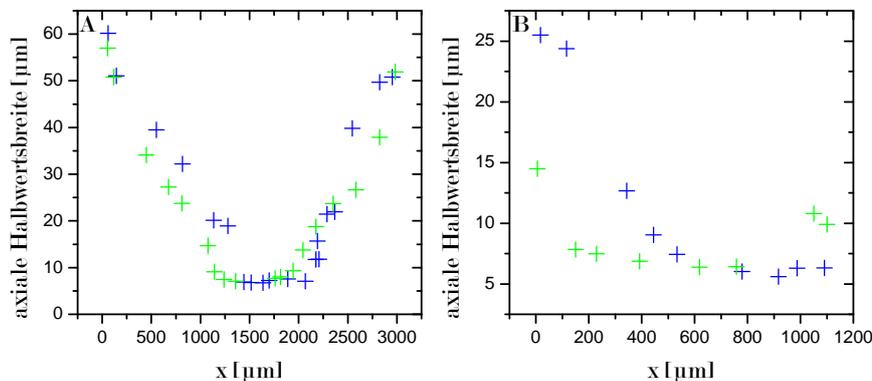


Abbildung 4.15: Axiale Halbwertsbreite entlang der Beleuchtungsrichtung. Abbildung **A** zeigt die axialen Halbwertsbreiten für das LaVision 4x Objektiv. Die Abbildung **B** zeigt die Messungen mit dem LaVision 12x Objektiv. Blaue Kreuze bedeuten eine Anregungswellenlänge von $488\ \text{nm}$ und grüne Kreuze eine Anregungswellenlänge von $561\ \text{nm}$. Jeder Wert entspricht einer Messung an einem fluoreszierenden Mikropartikel. Der Standardfehler der Anpassungen mit *OriginPro* liegt zwischen $0,1\ \mu\text{m}$ und $1\ \mu\text{m}$.

Die gemessene axiale Halbwertsbreite ist bei einer Blendeneinstellung von $5,7\ \text{mm}$ und der Benutzung des LaVision 4x Objektivs in einem Bereich von $1000\ \mu\text{m}$ kleiner oder

gleich $15\ \mu\text{m}$. Aus diesem Grund wurden bei Bildaufnahmen nur 35 % der Bildsensorbreite verwendet.

Für die theoretische Abschätzung wurden zu den, aus den Simulationen mit *Zemax* (Unterabschnitt 3.3.2, Tabelle 3.1), berechneten Tailenradien ω_{Zemax} entsprechende transversale Strahlprofile berechnet. Zudem wurde die theoretische axiale Abbildungspunktspreizfunktion $I_{\text{Abb.}}(z)$ des jeweiligen Objektivs verwendet (Gleichung 1.21). Um die totale Punktspreizfunktion zu erhalten, wurden beide Kurven miteinander multipliziert. Über die erhaltene Kurve wurde mit einer Gauß-Anpassung die Halbwertsbreite bestimmt.

Objektiv	$d_{z,\text{exp}}$ [μm]	$d_{z,\text{theo}}$ [μm]
LaVision 4x	$5,80 \pm 0,30$	5,63
	$6,25 \pm 0,29$	6,51
LaVision 12x	$5,60 \pm 0,21$	3,76
	$6,18 \pm 0,32$	4,24
Leica 2x	$5,71 \pm 0,33$	5,94
	$6,34 \pm 0,29$	6,86
Leica 5x	$5,93 \pm 0,38$	4,02
	$6,04 \pm 0,38$	4,66

Tabelle 4.3: Die Tabelle zeigt die gemessenen und theoretischen axialen Halbwertsbreiten an der Strahltaile für zwei Eintauchobjektive (LaVision 4x und LaVision 12x) und zwei Luftobjektive (Leica 2x und Leica 5x) bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen (blau: 488 nm und grün: 561 nm). Es wurde über 10 Messungen gemittelt.

4.4.3 Einfluss der gewählten Objektive auf die Bildqualität bei verschiedenen Probertiefen

In diesem Abschnitt wird die Empfindlichkeit der Abbildung bezüglich der Probertiefe im Phantom untersucht. Hierzu wurde jeweils ein Bildstapel des Phantoms mit 4 verschiedenen Objektiven aufgenommen. Es soll insbesondere geklärt werden, ob es einen Unterschied zwischen Luftobjektiven und Eintauchobjektiven gibt. In den Abbildungen 4.16 und 4.17 werden Bilder bei einer Probertiefe von $400\ \mu\text{m}$ bzw. einer Probertiefe von $4000\ \mu\text{m}$ gezeigt. In Abbildung 4.16 wird das Leica 2x Luftobjektiv mit dem LaVision 4x Eintauchobjektiv verglichen und in Abbildung 4.17 wird das Leica 5x Luftobjektiv mit dem LaVision 12x Objektiv verglichen. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei höheren numerischen Aperturen die Empfindlichkeit gegenüber der Proben-

tiefe und Inhomogenitäten in der Probe zunimmt. Beim LaVision 4x Objektiv ist die Abbildung in höheren Probertiefen deutlich besser als beim Leica 2x Objektiv. Beim Leica 5x Objektiv ist schon bei einer niedrigen Probedicke von $400\ \mu\text{m}$ eine drastische Verschlechterung gegenüber dem LaVision 12x Objektiv zu beobachten. Bei einer Probertiefe von $400\ \mu\text{m}$ beträgt die theoretische Strehl-Zahl beim Leica 2x Objektiv 0,99 und beim Leica 5x Objektiv 0,11. Aus diesem Grund sind die Aufnahmen mit dem Leica 5x Objektiv schon bei dieser Probertiefe sehr kontrastarm. Bei einer Probertiefe von $4000\ \mu\text{m}$ beträgt die theoretische Strehl-Zahl beim Leica 2x Objektiv nur noch 0,26 und beim Leica 5x Objektiv ist diese auf 0,008 herabgesunken. Für die Aufnahmen wurde eine Anregungswellenlänge von $561\ \text{nm}$ verwendet.

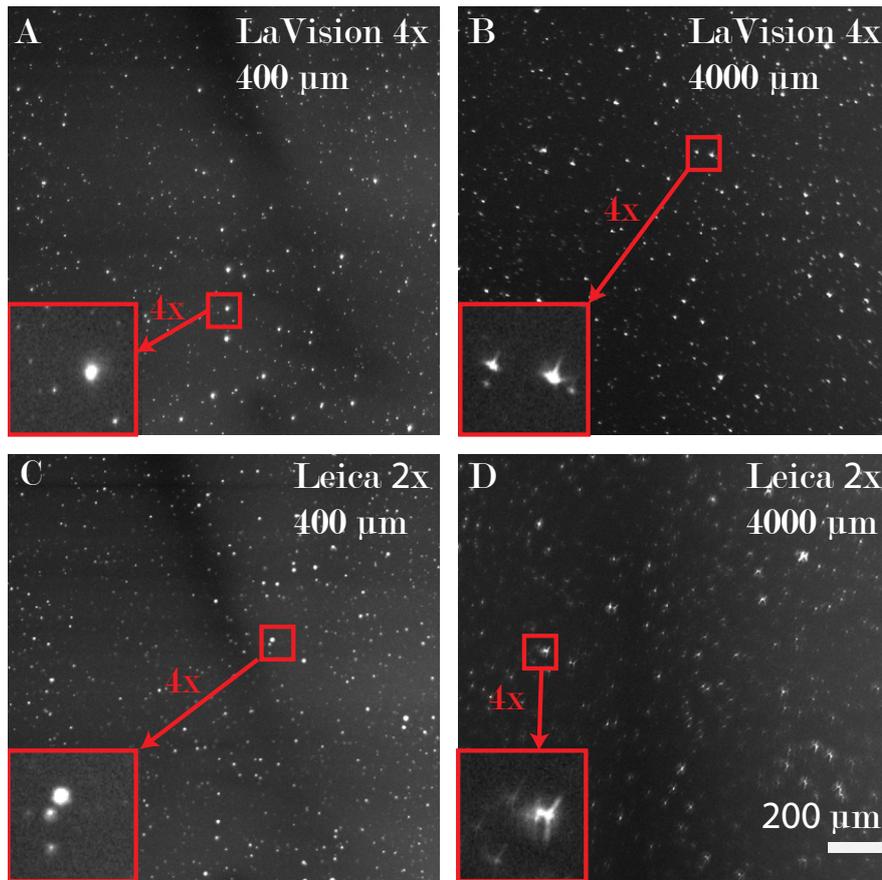


Abbildung 4.16: (A und B) Aufnahme mit dem LaVision 4x Objektiv. Fluoreszierende Mikropartikel bei einer Probertiefe von A $400\ \mu\text{m}$ und B $4000\ \mu\text{m}$. (C und D) Aufnahme mit dem Leica 2x Objektiv. Fluoreszierende Mikropartikel bei einer Probertiefe von C $400\ \mu\text{m}$ und D $4000\ \mu\text{m}$. Die roten Kästchen zeigen jeweils einen vierfach vergrößerten Ausschnitt.

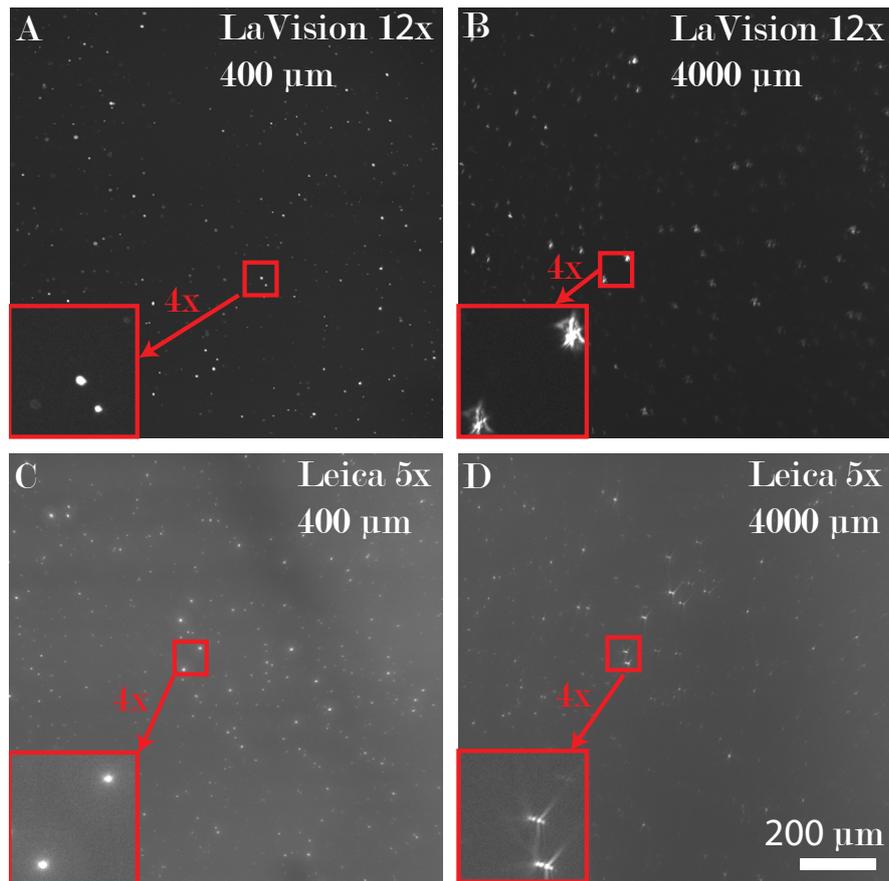


Abbildung 4.17: (A und B) Aufnahme mit dem LaVision 12x Objektiv. Fluoreszierende Mikropartikel bei einer Probentiefe von A 400 μm und B 4000 μm . (C und D) Aufnahme mit dem Leica 5x Objektiv. Fluoreszierende Mikropartikel bei einer Probentiefe von C 400 μm und D 4000 μm . Die roten Kästchen zeigen jeweils einen vierfach vergrößerten Ausschnitt.

4.4.4 Axiale Halbwertsbreite in Abhängigkeit von der y-Position

Um sicher zu gehen, dass die ganze Bildsensorlänge verwendet werden kann, wurde die Halbwertsbreite entlang der Scanrichtung gemessen. Die Grafik 4.18 zeigt die gemessenen Halbwertsbreiten von verschiedenen fluoreszierenden Partikeln. Die Partikel befanden sich in einem Streifen mit einer Breite von 100 μm . Es ist der Grafik zu entnehmen, dass die axiale Auflösung weitestgehend unabhängig von der y-Position ist. Dieses wurde schon in den Simulationen mit *Zemax* im Abschnitt 3.3.1 theoretisch festgestellt. Bei der Aufnahme wurde eine Blendenöffnung von 5,7 mm und eine Anregungswellenlänge von 488 μm verwendet.

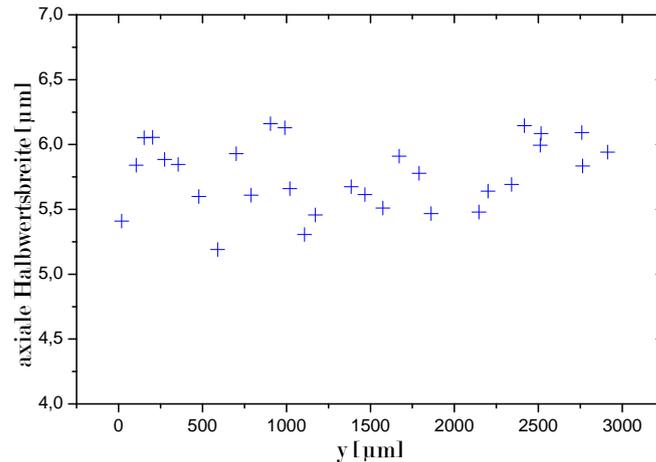


Abbildung 4.18: Die Grafik zeigt die gemessenen Halbwertsbreiten von verschiedenen Partikeln mit unterschiedlicher y-Position.

4.5 Messungen mit unterschiedlichen Objektiven an einem geklärten Maushirn

In diesem Abschnitt werden Aufnahmen von biologischen Proben, die mit unterschiedlichen Objektiven aufgenommen wurden, miteinander verglichen. Hier handelt es sich nun um Aufnahmen von einem Transplantat in einem ganzen Maushirn. Nähere Informationen über die verwendete Probe sind dem Abschnitt 5.3 zu entnehmen. Es wurden, wie im Abschnitt 4.4, zwei Luftobjektive von der Firma Leica und zwei Eintauchobjektive von der Firma LaVision miteinander verglichen. In Tabelle 2.2, im Unterabschnitt 2.3.2, sind die einzelnen Objektive mit ihren Eigenschaften (numerische Apertur und Vergrößerung) aufgelistet. Das Transplantat befindet sich ca. 1000 µm unterhalb der Probenoberfläche. Für alle Messungen in diesem Abschnitt wurde eine Blendenöffnung von 5,7 mm und eine Anregungswellenlänge von 488 µm gewählt. Abbildung 4.19 zeigt die gleiche Gehirnregion, welche mit dem Leica 2x Luftobjektiv bzw. mit dem LaVision 4x Eintauchobjektiv aufgenommen wurde. Wie zu erwarten ist keine große Abweichung zwischen beiden Aufnahmen zu erkennen. Dies kann durch eine geringe Probertiefe erklärt werden. Bei dieser Probertiefe beträgt die theoretische Strehl-Zahl für das Leica 2x Objektiv 0,925 (siehe Abbildung 3.12). Dies deckt sich auch mit den Messungen, die an fluoreszierenden Partikeln durchgeführt wurden (siehe Abbildung 4.16).

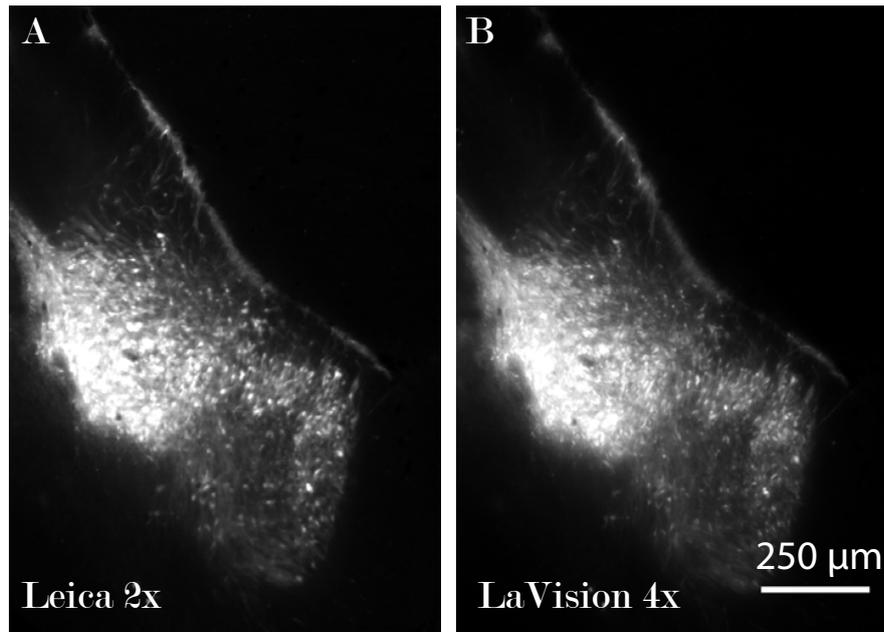


Abbildung 4.19: Vergleich zwischen dem **A** Leica 2x Luftobjektiv und dem **B** LaVision 4x Eintauchobjektiv. Die Bilder zeigen ein Transplantat in einem ganzen Maushirn. Man sieht, dass die Bildqualität zwischen beiden Objektiven ähnlich ist.

Die Abbildung 4.20 zeigt die gleiche Region, die jeweils mit dem Leica 5x Luftobjektiv und dem LaVision 12x Eintauchobjektiv aufgenommen wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei höheren numerischen Aperturen der Einfluss von sphärischen Aberrationen bei Luftobjektiven deutlich zunimmt. Die NA beim Leica 2x Luftobjektiv beträgt 0,234 und die NA beim Leica 5x Luftobjektiv beträgt 0,5. Es ist ein deutlicher Qualitätsunterschied in Hinblick auf den Kontrast zwischen dem Leica 5x Luftobjektiv und dem LaVision 12x Eintauchobjektiv zu erkennen. Dies deckt sich mit den Messungen, die an fluoreszierenden Partikeln im Unterabschnitt 4.4.3 vorgenommen wurden.

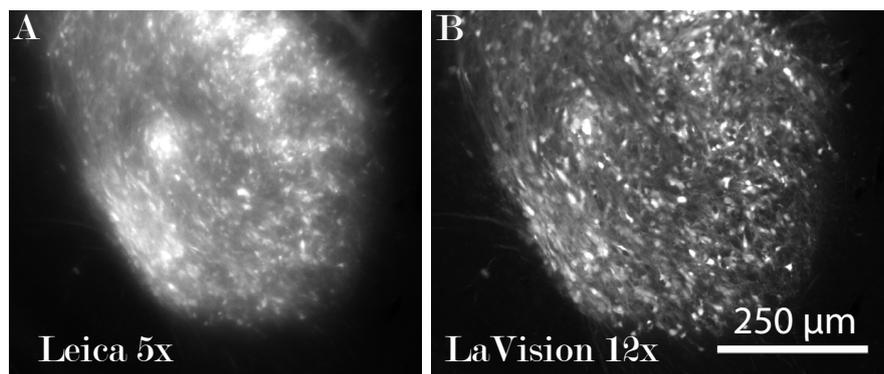


Abbildung 4.20: Vergleich zwischen dem **A** Leica 5x Luftobjektiv und dem **B** LaVision 12x Eintauchobjektiv. Es ist deutlich die schlechtere Bildqualität in Hinblick auf den Kontrast beim Leica 5x Luftobjektiv zu erkennen.

Die Abbildung 4.21 zeigt den Vergleich zwischen dem LaVision 4x Eintauchobjektiv

und dem LaVision 12x Eintauchobjektiv. Es ist deutlich die bessere Bildqualität bei Verwendung des 12x Objektivs zu erkennen. Dies ist mit der 1,7-fach höheren numerischen Apertur und der 2,7-fach stärkeren Vergrößerung zu erklären. Die Probentiefe liegt bei ca. 1000 μm .

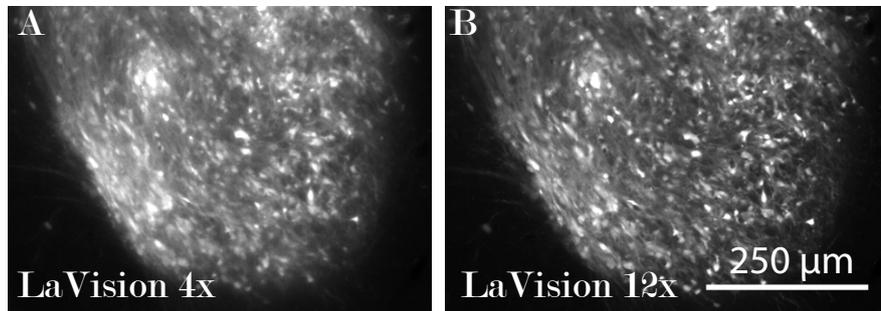


Abbildung 4.21: Vergleich zwischen dem **A** LaVision 4x und dem **B** LaVision 12x Objektiv. Es ist eine schlechtere Bildqualität beim LaVision 4x Objektiv zu erkennen.

4.6 Charakterisierung der Fokusstabilisierung

In diesem Abschnitt wird die Anwendung der Fokusstabilisierung untersucht. Im ersten Unterabschnitt werden verschiedene Fokusfunktionen auf ihre Eigenschaften untersucht. Im zweiten Unterabschnitt wird die Wirkung der verwendeten Schrittweite Δf_{DO} auf die Fokusstabilisierung eingehend untersucht. Im dritten Unterabschnitt wird die Bildqualität einer Aufnahme ohne Fokusstabilisierung mit einer Aufnahme mit Fokusstabilisierung verglichen und im letzten Unterabschnitt wird untersucht, wie viele Schritte die Fokussierung bei unterschiedlich starken Defokussierungen benötigt.

4.6.1 Vergleich verschiedener Fokusfunktionen

In diesem Unterabschnitt werden verschiedene Fokusfunktionen miteinander verglichen. Die bekanntesten Fokusfunktionen wurden schon im Abschnitt 1.10 erläutert. Es wurden jeweils für das LaVision 4x und für das LaVision 12x Objektiv zwei Bildstapel aufgenommen, wobei die Position der Probe während der Aufnahme sich nicht änderte. Für jedes der beiden Objektive wurde ein Probenbereich mit wenigen strukturellen Informationen und ein Probenbereich mit vielen strukturellen Informationen ausgewählt, um eine passende Fokusfunktion zu finden, die für beide Fälle ein solides Ergebnis liefert. Im Anhang A.2 sind fokussierte Bilder der einzelnen Bereiche abgebildet. Die z-Position der Probe blieb während der Aufnahme der Bildstapel unverändert. Während der Aufnahme wurde das Detektionsobjektiv nach jedem Bild um die Schrittweite Δf_{DO} bewegt. Am Anfang befindet sich die Lichtscheibe nicht im Fokus des Detektionsobjektivs. Erst etwa in der Mitte des Bildstapels befindet sich die Lichtscheibe im

Fokus. Danach kommt es wieder zu einer Defokussierung. Jeder Bildstapel beinhaltet 400 einzelne Bilder. Mit diesem Bildstapel ist es möglich, Fokusfunktionen qualitativ miteinander zu vergleichen. Die Schrittweite Δf_{DO} betrug beim LaVision 4x Objektiv $1\ \mu\text{m}$ und beim LaVision 12x Objektiv $0,5\ \mu\text{m}$.

Jeder Bildstapel wurde mit folgenden Fokusfunktionen untersucht: $F4$ (symmetrisch), $F4$ (horizontal), $F4$ (vertikal), $F5$, Brenner, Squared Gradient, Tenengrad, Intensitätsmittelwert, Varianz und der höchste Bildpunktwert. Abbildung 2.10 zeigt den Verlauf einer Fokusfunktion. Bei der $F4$ -Funktion wurde zwischen $F4$ (horizontal) und $F4$ (vertikal) unterschieden. Bei $F4$ (horizontal) werden Bildpunktwerte innerhalb einer Reihe multipliziert und bei $F4$ (vertikal) werden Bildpunktwerte innerhalb einer Spalte multipliziert. $F4$ (symmetrisch) ist das arithmetische Mittel von beiden Fokusfunktionen. Die Unterscheidung diente dazu, herauszufinden, welche Variante optimal ist.

Für die Auswertung vom Verlauf der Fokusfunktion wurden zwei Kriterien ausgewählt. Einmal wurde die Halbwertsbreite und zum anderen die normierte Höhe der Kurve bestimmt. Die Tabellen mit den Halbwertsbreiten und den normierten Höhen h sind dem Anhang A.2 zu entnehmen. In diesen Tabellen sind die Halbwertsbreite der Kurve und die normierte Höhe der Kurve aufgelistet. Die normierte Höhe h kann durch folgende Gleichung berechnet werden:

$$h = \frac{\text{Maximum} - \text{Grundlinie}}{\text{Maximum}} \quad (4.7)$$

Abbildung 4.22 zeigt verschiedene Fokusfunktionskurven. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Halbwertsbreiten und h sehr stark zwischen den einzelnen Fokusfunktionen unterscheiden und die $F4$ -Funktionen die Kurven mit der niedrigsten Halbwertsbreite und dem höchsten h besitzen. Aufgrund der Tatsache, dass die verwendete *LabVIEW*-Version keine komplizierten Transformationen, wie z. B. die diskrete Kosinustransformation, unterstützt, wurden nur einfache selbstprogrammierte Fokusfunktionen verwendet. Außerdem benötigten Fokusfunktionen, die auf einem spektralen Ansatz aufbauen, eine relativ hohe Rechenzeit [70]. Für die getesteten Fokusfunktionen wurde ein Ranking erstellt. Hierzu gab es für jedes der beiden Kriterien für die beste abschneidende Fokusfunktion 10 Punkte. Für jeden nachfolgenden Platz wurde ein Punkt abgezogen. Bei einer nicht vorhandenen Kurve wurde die Fokusfunktion mit null Punkten bewertet. In Tabelle 4.4 sind die Platzierungen der einzelnen Funktionen aufgelistet. Es hat sich die $F4$ -Funktion für diese Art der Proben als beste Fokusfunktion erwiesen. Für alle Bereiche und Detektionsobjektive lag die $F4$ -Funktion auf dem ersten Platz. Es sei angemerkt, dass die Zuverlässigkeit einer Funktion teilweise von der Probe selbst abhängt. Bei anderen Proben kann somit das Ranking abweichen. Für die nächsten Messungen wurde die horizontale $F4$ -Funktion als Fokusfunktion verwendet, um die Rechenzeit im Rahmen zu halten, da bei der symmetrischen $F4$ -Funktion die doppelte Anzahl an Berechnungen benötigt wird und auch die beiden asymmetrischen $F4$ -Funktionen solide Ergebnisse liefern.

Platzierung	Metrik	Punktzahl
1	$F4$ (symmetrisch)	65
1	$F4$ (horizontal)	65
3	$F4$ (vertikal)	62
4	Brenner	57
5	Tenengrad	47
6	Bildpunktwert	46
7	Squared Gradient	41
8	$F5$	10
8	Varianz	11
10	Intensitätsmittelwert	0

Tabelle 4.4: Ranking über die getesteten Fokusfunktionen.

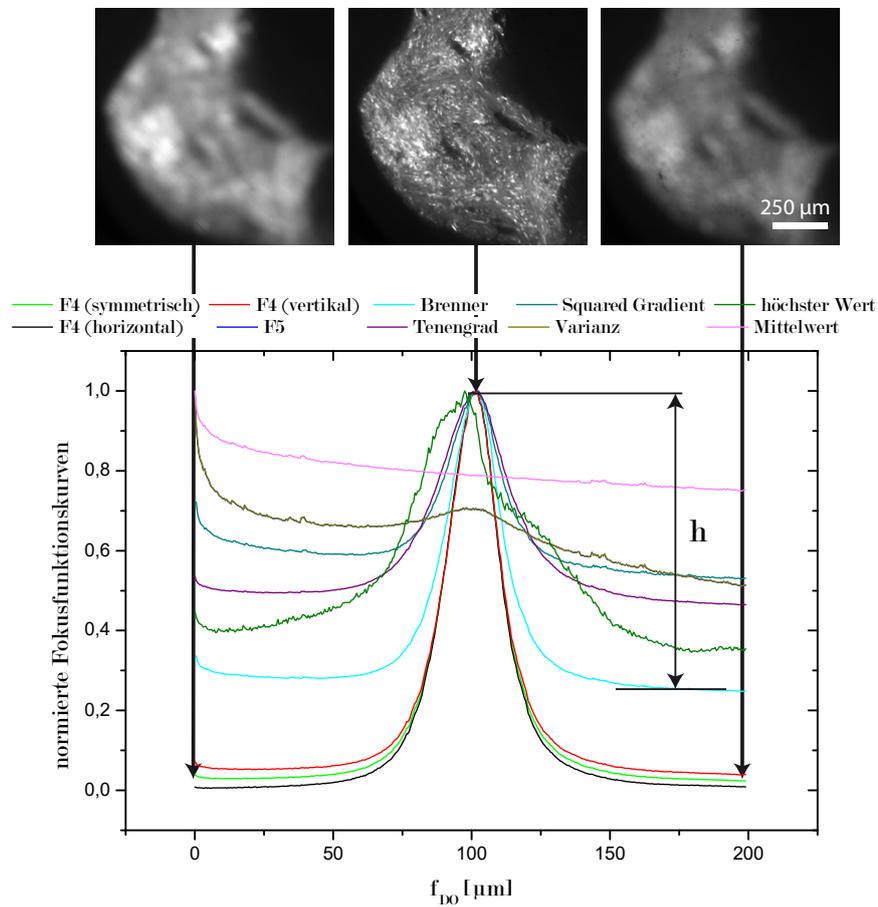


Abbildung 4.22: Die Abbildung zeigt die normierten Werte von verschiedenen Fokusfunktionen. Die Funktionskurven für die $F5$ -Funktion und die Varianz sind sehr ähnlich und können nicht voneinander unterschieden werden. In dieser Grafik wurde die normierte Höhe h für die Brenner-Funktion eingetragen. Die Aufnahmen wurden mit dem LaVision 12x Objektiv aufgenommen.

4.6.2 Unterschiedliche Schrittweiten

In diesem Unterabschnitt wird der Einfluss der möglichen Schrittweite Δf_{DO} für die Korrektur der Position des Detektionsobjektivs auf die Effektivität der Fokusstabilisierung betrachtet. Es wurden das LaVision 4x und das LaVision 12x Eintauchobjektiv verwendet. Für diesen Test wurde ein Bildstapel mit einer axialen Schrittweite von $\Delta z = 3 \mu\text{m}$ für das 4x Objektiv bzw. $\Delta z = 2 \mu\text{m}$ für das 12x Objektiv ausgewählt. Für jedes Objektiv wurden 4 Bildstapel mit verschiedenen Schrittweiten Δf_{DO} aufgenommen. Für jede ausgewählte Schrittweite wurde das Detektionsobjektiv um einen bestimmten Betrag nach oben bzw. nach unten aus dem Fokus bewegt, so dass es zu einer Defokussierung der Lichtscheiben kam. Insgesamt wurden somit 8 Bildstapel aufgenommen. Am Anfang wurde das Mikroskop manuell fokussiert. Für das 4x Objektiv wurde das Objektiv um $\pm 100 \mu\text{m}$ aus dem Fokusbereich gefahren und für das 12x Objektiv wurde das Detektionsobjektiv um $\pm 25 \mu\text{m}$ defokussiert. Mit dieser Startposition wurden Messungen mit jeweils 1000 Aufnahmen mit unterschiedlichen Schrittweiten Δf_{DO} durchgeführt. Es wurde ein Bereich mit wenig Informationen ausgewählt, da die Fokusstabilisierung auch für kontrastarme Bereiche funktionieren soll. Die Probe wurde bei allen Messungen mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm beleuchtet.

Zuerst wird die Testreihe mit dem 4x Objektiv betrachtet. Hierzu wurden die Schrittweiten $2 \mu\text{m}$, $3 \mu\text{m}$, $4 \mu\text{m}$ und $5 \mu\text{m}$ ausgewählt. In Abbildung 4.23 ist die Position des 4x Detektionsobjektivs bei den einzelnen Messungen abgebildet. Es zeigt sich, dass ab einer Schrittweite von $\Delta f_{\text{DO}} = 4 \mu\text{m}$ die Effektivität der Fokusstabilisierung drastisch zunimmt. Man erkennt, dass die Fokusstabilisierung unabhängig davon ist, in welcher Richtung das Detektionsobjektiv verstellt wird. Die Abbildung 4.25 zeigt das 1., 50., 100., 150., 200. und 250. Bild des Bildstapels bei einer Auslenkung von $100 \mu\text{m}$ und einer Schrittweite Δf_{DO} von $4 \mu\text{m}$. Es ist deutlich die Abnahme der Unschärfe erkennbar. Um den Einfluss der Schrittweite Δf_{DO} qualitativ auszuwerten, wurde für jede Schrittweite die Position des Detektionsobjektivs in einem Histogramm dargestellt. Die Histogramme zeigen jeweils die Anzahl der Bilder, die mit einem bestimmten Positionsbereich des Detektionsobjektivs aufgenommen wurden. In den Histogrammen ist deutlich ein Hauptmaximum zu erkennen, welches für jede Schrittweite eine andere Breite und Höhe hat. Das Hauptmaximum hat bei einer Schrittweite Δf_{DO} von $4 \mu\text{m}$ seinen größten Wert und hat bei dieser Schrittweite die geringste Breite. Bei größeren Schrittweiten als $4 \mu\text{m}$ kommt es zu größeren Schwankungen der Detektionsobjektivposition und das Hauptmaximum wird dadurch breiter.

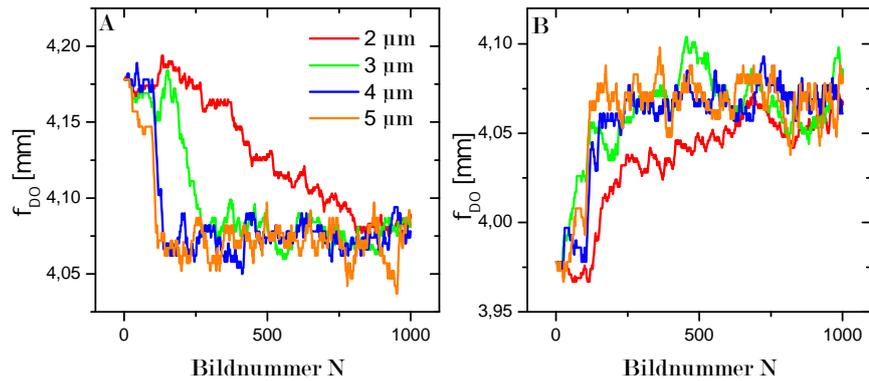


Abbildung 4.23: Die Abbildungen **A** und **B** zeigen die Position des Detektionsobjektivs f_{DO} . Vor der Aufnahme wurde das Objektiv um **A** $100\ \mu\text{m}$ bzw. um **B** $-100\ \mu\text{m}$ aus dem Fokusbereich gebracht. Es wurde immer der gleiche Bereich der Probe aufgenommen. Die axiale Schrittweite Δz betrug $3\ \mu\text{m}$.

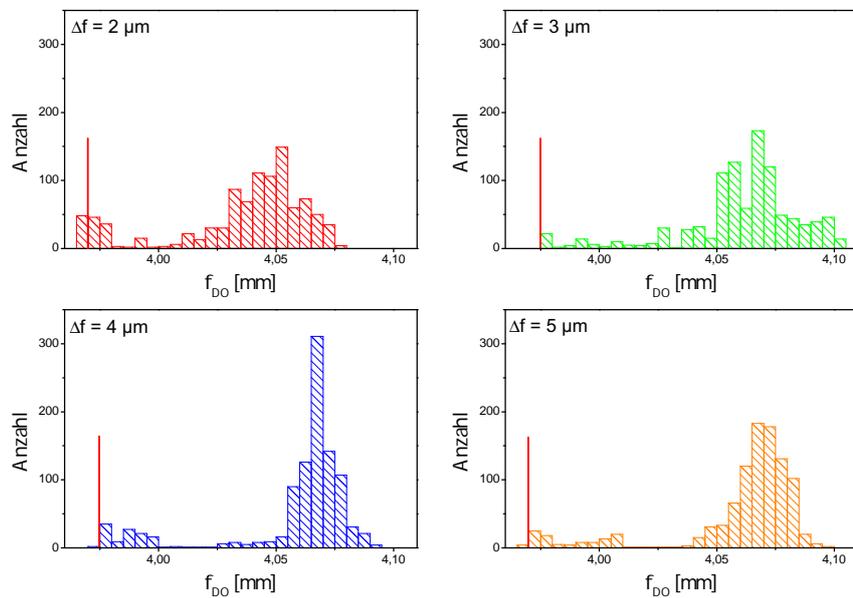


Abbildung 4.24: Histogramme mit der Position des Detektionsobjektivs f_{DO} während der Aufnahme eines Bildstapels mit verschiedenen Schrittweiten Δf_{DO} bei einer vorherigen Defokussierung um $-100\ \mu\text{m}$. Bei einer Schrittweite von $4\ \mu\text{m}$ ist das Hauptmaximum am schmalsten. Die rote senkrechte Linie zeigt die Anfangsposition des Detektionsobjektivs. Die Klassenbreite beträgt $5\ \mu\text{m}$.

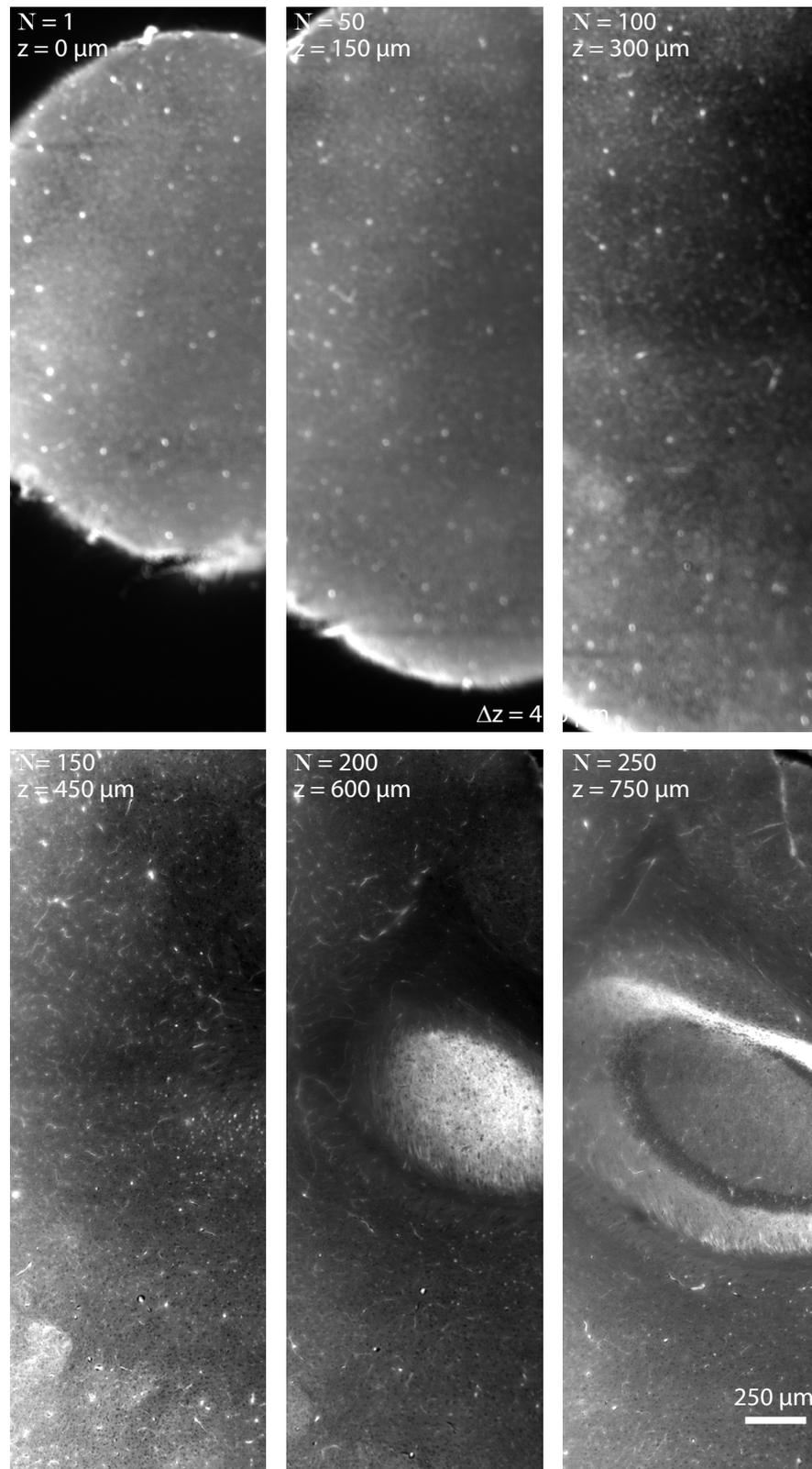


Abbildung 4.25: Die Abbildung zeigt die Aufnahmen mit den Bildnummern 1, 50, 100, 150, 200 und 250. Die Aufnahmen 1, 50 und 100 sind noch unfokussiert. Bei den Aufnahmen 150, 200 und 250 ist die Lichtscheibe im Fokus des Detektionsobjektivs. z gibt die z -Position der Aufnahme relativ zur z -Position der ersten Aufnahme an.

Als Zweites wird die Testreihe mit dem LaVision 12x Objektiv betrachtet. Wegen der kleineren Schärfentiefe wurde eine geringere Defokussierung von $\pm 25 \mu\text{m}$ gewählt. Die axiale Schrittweite Δz beträgt dabei $2 \mu\text{m}$. Für das Detektionsobjektiv wurden diesmal die Schrittweiten Δf_{DO} $0,5 \mu\text{m}$, $1 \mu\text{m}$, $1,5 \mu\text{m}$ und $2 \mu\text{m}$ ausgewählt. Die Abbildung 4.26 zeigt die Position des Detektionsobjektivs während der Messungen mit verschiedenen Werten für Δf_{DO} . Auch hier ist zu erkennen, dass eine gewisse Schrittweite notwendig ist, damit die Fokusstabilisierung funktioniert. Abbildung 4.27 zeigt die Histogramme mit der Position des Detektionsobjektivs bei verschiedenen Schrittweiten. Es ist zu erkennen, dass das Hauptmaximum bei einer Schrittweite von $1,5 \mu\text{m}$ am schmalsten ist. Vergleicht man beide Objektive, so sieht man, dass, wie erwartet, die beste Schrittweite von der numerischen Apertur des Objektivs abhängt. Abbildung 4.28 beinhaltet Aufnahmen des Bildstapels mit einer Auslenkung von $25 \mu\text{m}$ aus dem Fokusbereich und einer Schrittweite Δf_{DO} von $1,5 \mu\text{m}$. Auch hier sieht man, dass die Bildschärfe zunimmt.

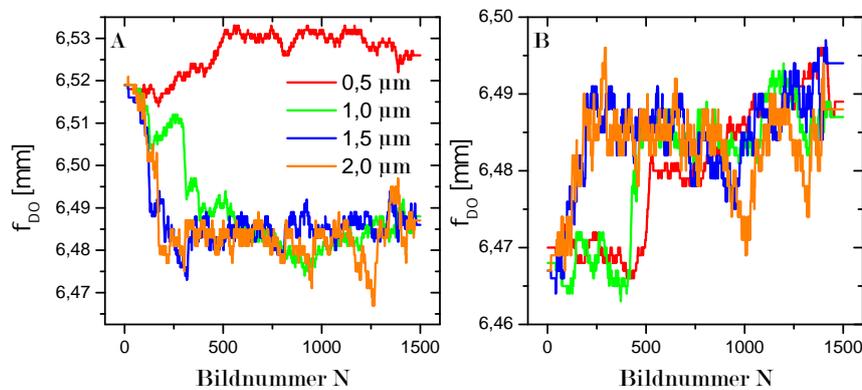


Abbildung 4.26: Die Abbildungen **A** und **B** zeigen die Position des Detektionsobjektivs. Vor der Aufnahme wurde das Objektiv um $25 \mu\text{m}$ **A** bzw. um $-25 \mu\text{m}$ **B** bewegt. Somit war die Beleuchtungsebene nicht mehr im Fokus des Objektivs. Es wurde immer der gleiche Bereich der Probe mit unterschiedlichen Schrittweiten Δf_{DO} aufgenommen.

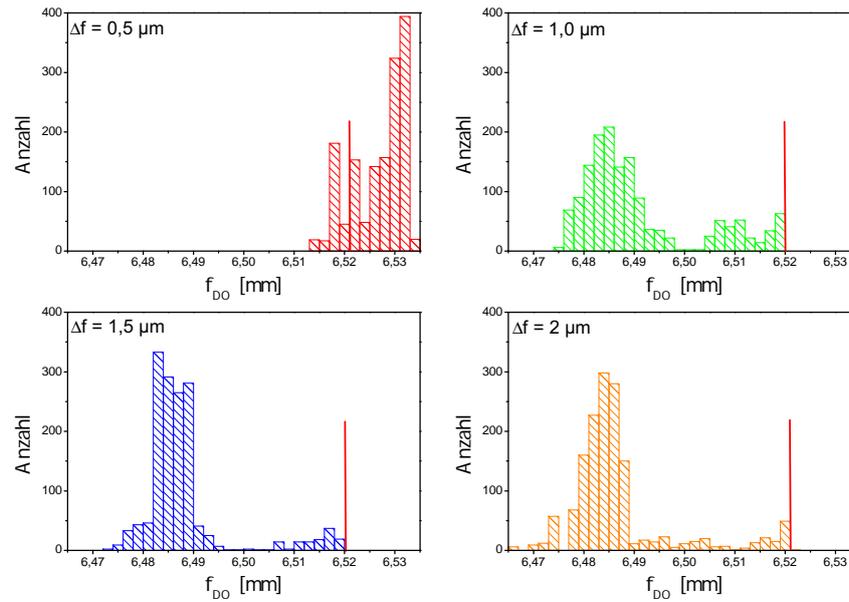


Abbildung 4.27: Histogramme mit der Position des Detektionsobjektivs f_{DO} während der Aufnahme eines Bildstapels mit verschiedenen Schrittweiten Δf_{DO} bei einer vorherigen Defokussierung um $25 \mu\text{m}$. Bei einer Schrittweite von $1,5 \mu\text{m}$ ist das Hauptmaximum am schmalsten. Die rote senkrechte Linie zeigt die Anfangsposition des Detektionsobjektivs. Die Klassenbreite beträgt $2 \mu\text{m}$.

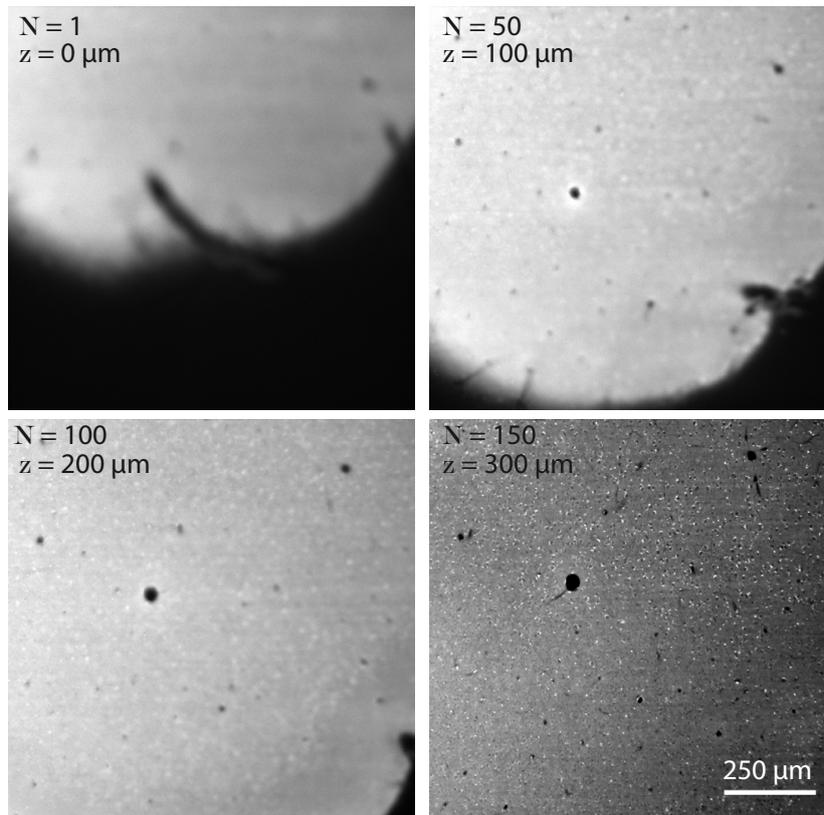


Abbildung 4.28: Die Abbildung zeigt die Aufnahmen mit den Bildnummern 1, 50, 100 und 150. Die Aufnahmen 1, 50 und 100 sind noch unfokussiert. Bei der Aufnahme 150 ist die Lichtscheibe im Fokus des Detektionsobjektivs. z gibt die z -Position der Aufnahme relativ zur z -Position der ersten Aufnahme an.

4.6.3 Vergleich mit und ohne Fokusstabilisierung

In diesem Unterabschnitt wird der Einfluss der Fokusstabilisierung auf die Bildqualität untersucht. Hierzu wurde für zwei unterschiedliche Bereiche im Gehirn, jeweils für das LaVision 4x und das LaVision 12x Objektiv, ein Bildstapel mit Fokusstabilisierung bzw. ohne eine Fokusstabilisierung aufgenommen. Dabei wurde der Fokus manuell eingestellt. Der erste Bildstapel wurde im Bereich des Transplantats aufgenommen, der zweite Bereich außerhalb. Somit wird die Fokusstabilisierung an zwei vollkommen unterschiedlichen Bereichen getestet. Die Maximumintensitätsprojektionen der vier aufgenommenen Bildstapel werden in Abbildung 4.29 (A und B) bzw. in Abbildung 4.30 (A und B) gezeigt. Die Diagramme C und D zeigen jeweils den Verlauf der Position des Detektionsobjektivs und die Diagramme E und F zeigen den Wert der symmetrischen $F4$ -Funktion für jedes aufgenommene Bild. Bei Abbildung 4.29 wurde das LaVison 4x Objektiv und bei Abbildung 4.30 wurde das LaVision 12x Objektiv verwendet. Betrachtet man jeweils die Unterabbildungen E und F, so sieht man, dass die symmetrische $F4$ -Funktion mit einer Fokusstabilisierung tendenziell höher ist als ohne Stabilisierung. Die axiale Schrittweite Δz betrug $3\ \mu\text{m}$ bei den Aufnahmen mit dem LaVision 4x Objektiv bzw. $2\ \mu\text{m}$ bei den Aufnahmen mit dem LaVision 12x Objektiv.

Der Tabelle 4.5 ist der prozentuale Anteil n_{FS} an Bildern, bei dem der symmetrische $F4$ -Funktionswert höher liegt als ohne eine Fokusstabilisierung, zu entnehmen. Bei den vier Testaufnahmen hatten 55 % bis 85 % der Bilder mit einer Fokusstabilisierung einen höheren symmetrischen $F4$ -Fokusfunktionswert als ohne Stabilisierung. Außerdem wird die Häufigkeit einer Positionsänderung $n_{P\ddot{A}}$ durch die Fälle 1 und 4 (siehe Abschnitt 2.5) untersucht. Es stellt sich heraus, dass bei 49 % bis 62 % der Aufnahmen eine Positionsänderung des Detektionsobjektivs stattfindet. Das bedeutet, das Detektionsobjektiv bewegt sich ungefähr bei jeder zweiten Bildaufnahme.

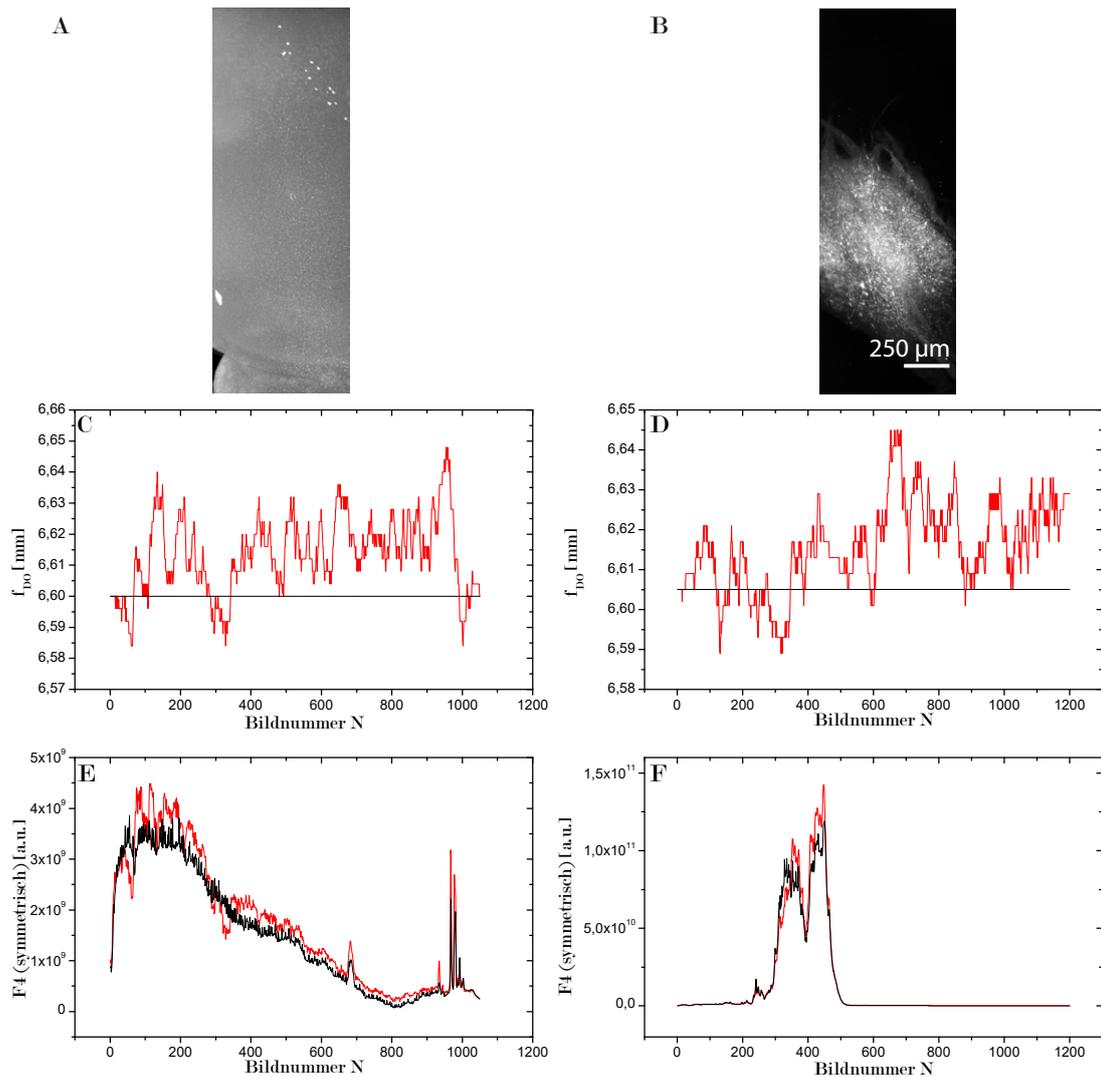


Abbildung 4.29: LaVision 4x Objektiv: Die Bilder **A** und **B** zeigen die Maximumintensitätsprojektionen der aufgenommenen Bildstapel. Die Diagramme **C** und **D** zeigen die Positionen des Detektionsobjektivs während der Messung. Die rote Linie zeigt die Positionsänderung während der Messung bei eingeschalteter Fokusstabilisierung und die schwarze Linie ohne eine Fokusstabilisierung. Die Diagramme **E** und **F** zeigen die symmetrischen $F4$ -Funktionswerte für jedes aufgenommene Bild. Die rote Linie zeigt die Werte mit einer Fokusstabilisierung und die schwarze Linie zeigt die Werte ohne Fokusstabilisierung.

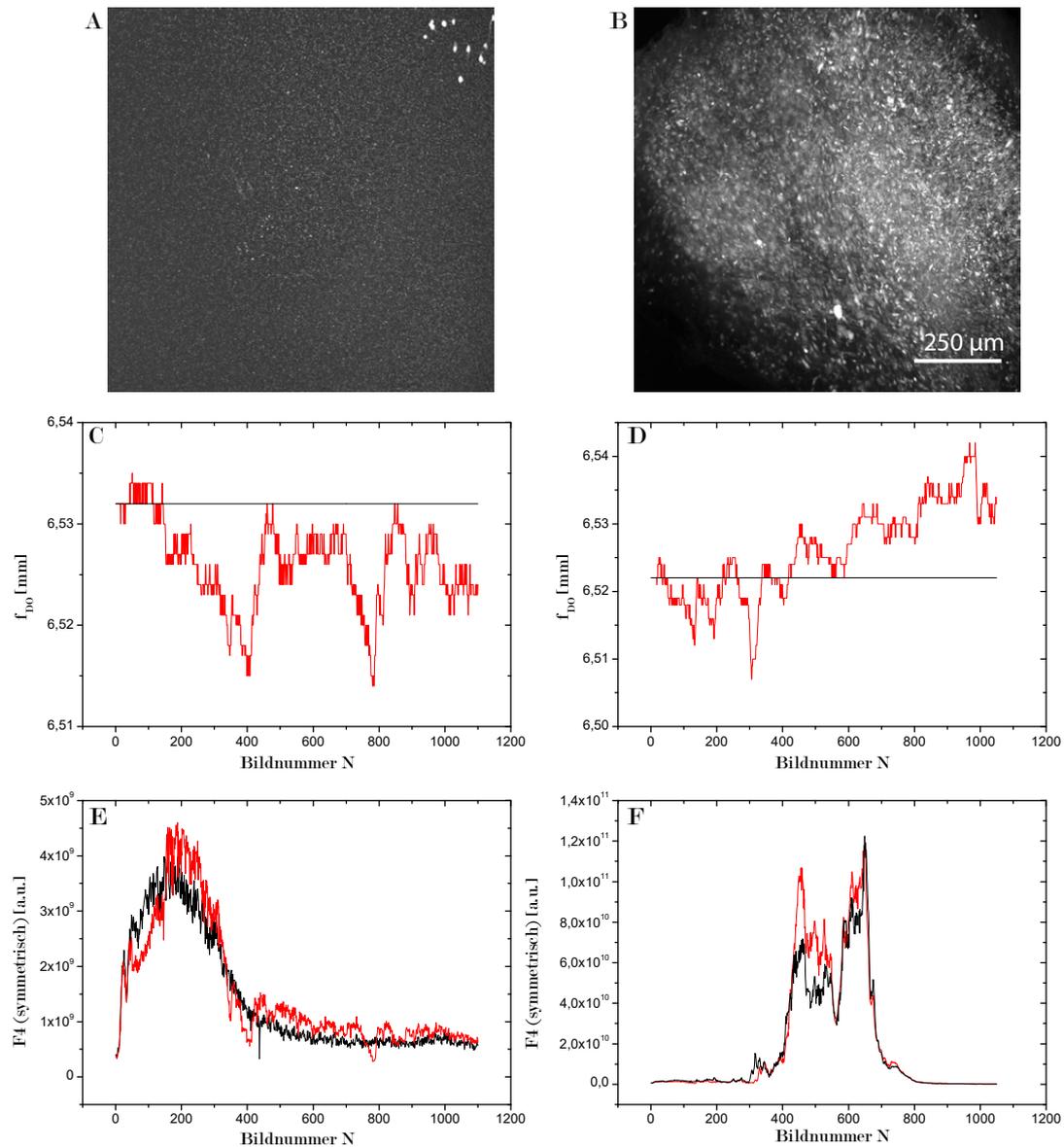


Abbildung 4.30: LaVision 12x Objektiv: Die Bilder **A** und **B** zeigen die Maximumintensitätsprojektionen der aufgenommenen Bildstapel. Die Diagramme **C** und **D** zeigen die Positionen des Detektorobjektivs während der Messung. Die rote Linie zeigt die Positionsänderung während der Messung bei eingeschalteter Fokusstabilisierung und die schwarze Linie ohne eine Fokusstabilisierung. Die Diagramme **E** und **F** zeigen die symmetrischen $F4$ -Funktionswerte für jedes aufgenommene Bild. Die rote Linie zeigt die Werte mit einer Fokusstabilisierung und die schwarze Linie zeigt die Werte ohne Fokusstabilisierung.

Objektiv	Bereich	n	n_{FS}	$n_{P\ddot{A}}$
		[%]	[%]	[%]
LaVision 4x	Gewebe	1050	85	62
LaVision 4x	Transplantat	1200	69	59
LaVision 12x	Gewebe	1100	75	61
LaVision 12x	Transplantat	1050	55	49

Tabelle 4.5: Statistischer Vergleich der Bildstapel mit und ohne Fokusstabilisierung. n ist die Anzahl der aufgenommenen Bilder. n_{FS} gibt den prozentualen Anteil der Bilder an, welche bei einer Fokusstabilisierung einen höheren symmetrischen $F4$ -Wert haben als bei einer nicht vorhandenen Fokusstabilisierung. $n_{P\ddot{A}}$ gibt den prozentualen Anteil an z-Schritten mit einer Positionsänderung des Detektionsobjektivs um Δf_{DO} an.

4.6.4 Unterschiedliche Defokussierungen des Detektionsobjektivs

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der Stärke der Defokussierung auf die Fokusstabilisierung betrachtet. Es wird untersucht, bis zu welcher Defokussierung es noch zu einer verhältnismäßig schnellen Fokussierung kommt. Dies erlaubt eine Einschätzung der Effektivität der Fokusstabilisierung. Für das LaVision 4x Objektiv wurden vier Bildstapel mit Defokussierungen von $0\ \mu\text{m}$, $100\ \mu\text{m}$, $200\ \mu\text{m}$ und $300\ \mu\text{m}$ aufgenommen. Das Diagramm B in Abbildung 4.31 zeigt die Position des Detektionsobjektivs während der einzelnen Messungen.

Mit dem LaVision 12x Objektiv wurden analog vier Bildstapel mit Defokussierungen von $0\ \mu\text{m}$, $25\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m}$ und $75\ \mu\text{m}$ aufgenommen. Von jedem Bildstapel ist das erste Bild abgebildet. Die Abbildung 4.32 zeigt analog wie in Abbildung 4.31 die Position des Detektionsobjektivs während der Aufnahmen. Auch hier sind die Anfangsbilder der Bildstapel abgebildet. Es wurde für beide Objektive dieselbe kontrastarme Region ausgewählt. Die axiale Schrittweite der Probe Δz beträgt beim 4x Objektiv $3\ \mu\text{m}$ und beim 12x Objektiv $2\ \mu\text{m}$. Δf_{DO} beträgt $4\ \mu\text{m}$ bzw. $1,5\ \mu\text{m}$. Die Abbildungen zeigen, dass es auch bei einer sehr starken Defokussierung immer noch zu einer Fokussierung kommt. Für alle Aufnahmen wurde eine Anregungswellenlänge von $488\ \text{nm}$ gewählt.

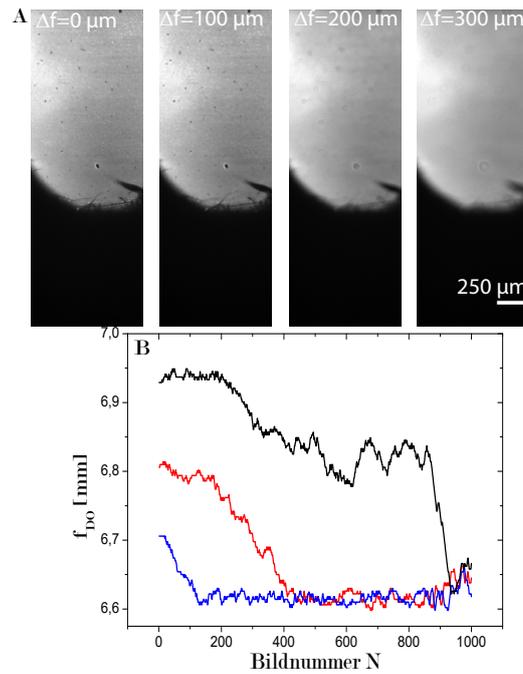


Abbildung 4.31: Die oberen vier Bilder zeigen das erste Bild von jedem aufgenommenen Bildstapel. Das Diagramm **B** zeigt die Position des Detektionsobjektivs bei jedem aufgenommenen Bild. Die einzelnen Defokussierungen bei den jeweiligen Messungen sind $100 \mu\text{m}$ (blaue Linie), $200 \mu\text{m}$ (rote Linie) und $300 \mu\text{m}$ (schwarze Linie).

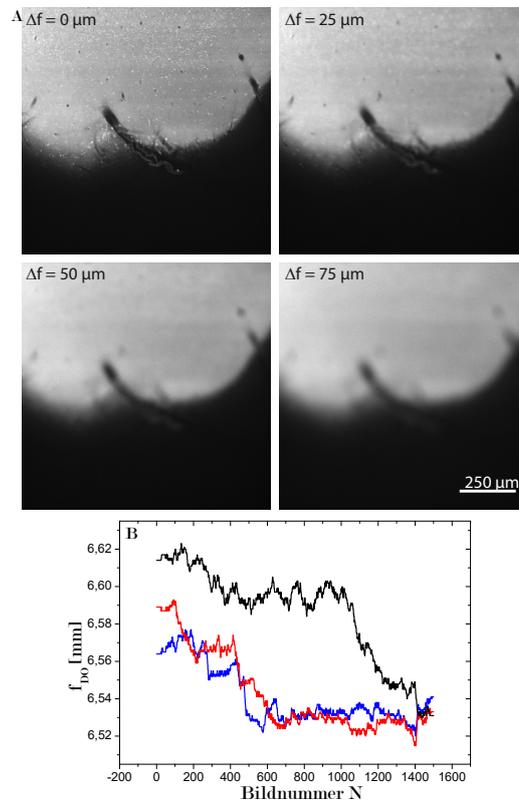


Abbildung 4.32: Die oberen vier Bilder zeigen das erste Bild von jedem aufgenommenen Bildstapel. Das Diagramm **B** zeigt die Position des Detektionsobjektivs bei jedem aufgenommenen Bild. Die einzelnen Defokussierungen bei den jeweiligen Messungen sind $25 \mu\text{m}$ (blaue Linie), $50 \mu\text{m}$ (rote Linie) und $75 \mu\text{m}$ (schwarze Linie).

5 Ultramikroskopie von ganzen Maushirnen

5.1 Zusammenfügen einzelner Bildstapel

Durch die begrenzte Bildgröße ist eine Aufnahme eines ganzen Mausgehirns mit einem einzelnen Bildstapel nicht möglich. Somit müssen mehrere sich überlappende Bildstapel mosaikartig aufgenommen werden. Wie in Unterabschnitt 3.1.1 besprochen, hat die Beleuchtung mit Gauß-Strahlen den Nachteil der starken Divergenz des Strahls. Aus diesem Grund kann beim LaVision 4x Objektiv nicht die ganze horizontale Breite des Bildsensors verwendet werden. Bei einer Blendeneinstellung von 15° wurde standardmäßig ein Drittel des Bildsensors verwendet. In diesem Bereich ist die axiale Halbwertsbreite des Beleuchtungsstrahls gleich oder kleiner als $15\ \mu\text{m}$ (siehe Abschnitt 4.4.2). Da sich die axiale Auflösung in Scanrichtung nicht dramatisch verschlechtert, kann die volle vertikale Breite des Bildsensors verwendet werden. Beim LaVision 12x Objektiv wurde der ganze Bildsensor verwendet. Das Zusammenfügen einzelner Kacheln zu einem ganzen Bild wird in Abbildung 5.1 verdeutlicht.

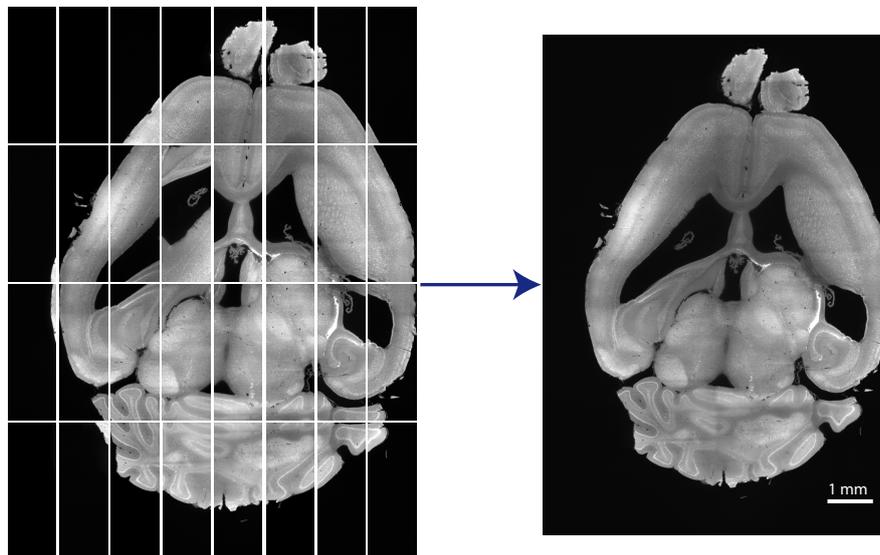


Abbildung 5.1: 8×4 Kacheln, aufgenommen mit dem LaVision 4x Objektiv, werden zu einem einzigen Bild zusammengefügt. Für die Beleuchtung wurde der Laser mit einer Wellenlänge von $561\ \text{nm}$ verwendet.

Für die ersten Aufnahmen wurde ein Programm in C++ für das Zusammenfügen ein-

zelter Kacheln geschrieben. Für spätere Aufnahmen wurde ein *ImageJ* Makro freundlicherweise von Christian J. Niedworok zur Verfügung gestellt. Mit diesem Makro ist es möglich, per Hand die einzelnen Positionen der Kacheln vor dem Zusammenfügen zu ändern, um evtl. Verschiebungen zu kompensieren.

5.2 Intensitätskorrektur

Geklärte Proben sind nicht vollkommen transparent. Durch Streuung und Absorption kommt es zum einen zu einer Verringerung der Intensität der anregenden Lichtscheibe und zum anderen geht ein Teil des Fluoreszenzlichts verloren [91]. Die Abschwächung der Intensität einer Strahlung in einem Medium wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben [92]:

$$I(x) = I_0 \exp(-\epsilon x) \quad (5.1)$$

Wobei ϵ der materialspezifische Extinktionskoeffizient ist. ϵ kann bei geklärten Gehirnen stark von der Wellenlänge abhängen. Für die Intensitätskorrektur wurde ein Programm in C++ geschrieben. Zum einen wird mit Hilfe des Programms versucht, die Abschwächung der Intensität des Beleuchtungsstrahls zu kompensieren und zum anderen wird versucht, die Abschwächung der Intensität des Fluoreszenzlichts zu kompensieren. Um festzustellen, wo sich Gewebe auf dem Bild befindet, wird ein unterer Grenzwert festgelegt. Hat der Bildpunkt einen höheren Wert als der Grenzwert, wird der Bildpunkt für die Kompensation berücksichtigt und es wird angenommen, dass es sich um Gewebe handelt.

Für die Korrektur der Beleuchtung wird spaltenweise vorgegangen. Bei jeder Reihe wird vom ersten Bildpunkt gestartet. Nach Gleichung 5.1 wird der Bildpunktwert mit dem Wert $\exp(\epsilon x_N)$ multipliziert, wobei x_N die Anzahl der berücksichtigten Bildpunkte ist. Bei einer zweiseitigen Beleuchtung wird von der rechten bzw. der linken Seite gestartet und es werden jeweils bis zur horizontalen Bildmitte die Bildpunktwerte korrigiert.

Für die Korrektur entlang der z-Richtung wird eine Matrix verwendet. Jedes Matrixelement ist für die axiale Korrektur eines Bildpunktwertes zuständig. Nach jedem Bild wird dem Matrixelement, in dem sich Gewebe befindet, eine 1 hinzuaddiert. Der Wert eines Matrixelementes repräsentiert die Anzahl der Ebenen, an denen am gleichen Punkt Gewebe vorhanden ist. Somit kann das Gewebe oberhalb der Aufnahme mitberücksichtigt werden. Besonders bei der Betrachtung von Maximumintensitätsprojektionen kann eine Intensitätskorrektur hilfreich sein. Der verwendete Extinktionskoeffizient ϵ , des bei dieser Dissertation verwendeten Gehirns, betrug 0,00025/Bildpunkt und muss empirisch bestimmt werden.

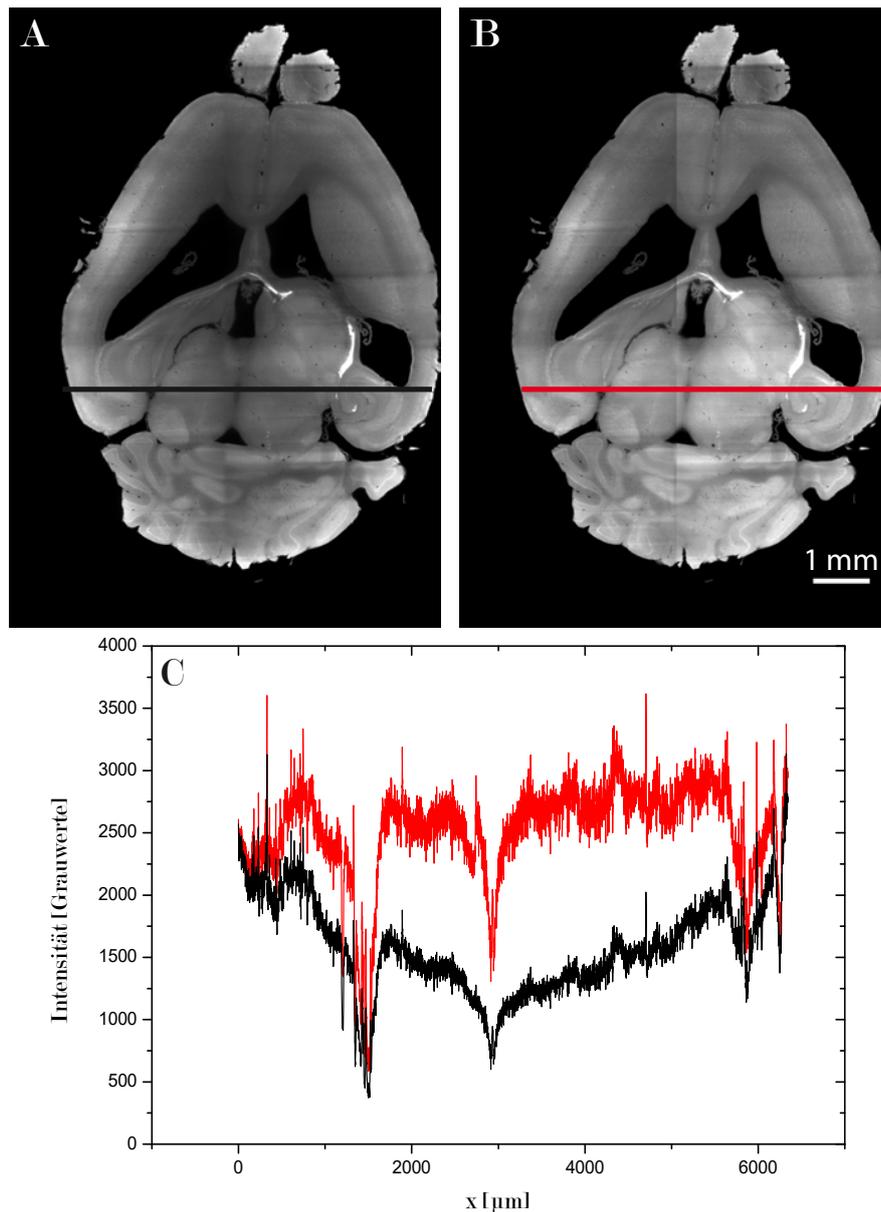


Abbildung 5.2: Die Abbildung zeigt die Auswirkung der Intensitätskorrektur. Bild A zeigt eine Aufnahme ohne Intensitätskorrektur und Bild B zeigt die gleiche Probe mit einer Intensitätskorrektur. Diagramm C zeigt die Auswirkung der Korrektur auf den Intensitätsverlauf. Die schwarze Linie zeigt den Intensitätsverlauf ohne eine Korrektur und die rote Linie mit Korrektur. Es wurde das LaVision 4x Objektiv verwendet. Die Anregungswellenlänge beträgt 488 nm.

5.3 Zwei-Farben-Abbildung eines Maushirn-Transplantats

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Maushirn mit einem Transplantat aus neuronalen Stammzellen (lt-NES Zellen) mit dem entwickelten Lichtscheibenmikroskop aufgenommen. lt-NES cells ist die Abkürzung für „long-term self-renewing neuroepithelial stem cells“ und wurden von der Arbeitsgruppe von Oliver Brüstle entwickelt [93]. Diese Zellen

sind von menschlichen embryonalen Stammzellen abgeleitet. Die humanen Stammzellen bilden ein rot fluoreszierendes Protein (mRFP1). Das Gen für diese Proteinsynthese wird durch Transduktion mit einem lentiviralen Vektor in die Zellen gebracht [10]. Der Maus wurde drei Monate nach der Geburt ein Transplantat mit den besagten Zellen in den Hippocampus transplantiert. Nach zehn Wochen wurde das Transplantat mit genetisch modifizierten Tollwutviren (RABV) infiziert. Diese modifizierten Viren stellen jedoch für den Menschen keine Gefahr mehr dar. Tollwutviren können sich über Synapsen im Nervensystem ausbreiten [94]. Mit Hilfe dieser Eigenschaft ist es möglich, Verbindungen zwischen den transplantierten Zellen und den vorhandenen Neuronen sichtbar zu machen [10, 95]. Neuronen, die sich mit einer Stammzelle verbinden, werden mit dem Virus infiziert und produzieren das grün fluoreszierende Protein EGFP. Durch die Produktion von EGFP kann nachgewiesen werden, dass es zu einer synaptischen Verbindung zwischen Stammzellen und Mauszellen gekommen ist. Die genetisch modifizierten Tollwutviren sind jedoch nicht in der Lage, das für die Ausbreitung wichtige B19 Glycoprotein zu bilden. Jedoch wird dieses in den Stammzellen durch Transduktion mit einem lentiviralen Vektor synthetisiert. Aus diesem Grund werden nur Neuronen, welche unmittelbar mit einer Stammzelle verknüpft sind, mit dem Virus infiziert und somit mit EGFP markiert. Die lt-NES Zellen sind mit EGFP und mRFP1 markiert. Auch Mausneuronen, welche relativ fern zum Transplantat liegen, können mit den transplantierten Zellen verschaltet sein. Deshalb ist eine Visualisierung des ganzen Maushirns notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass diese besagten Projektionen regionspezifisch sind [96]. Die Behandlung mit humanen Stammzellen könnte Patienten mit neurologischen Erkrankungen, wie der Parkinson-Krankheit oder der Huntington-Krankheit, helfen [11–13]. Bei der Parkinson-Krankheit könnte die Transplantation von Dopamin-produzierenden Zellen zu einer Besserung des Gesundheitszustandes des Patienten führen.

Zehn Tage nach der Infektion mit dem Tollwutvirus wurde die Maus mit 4% Paraformaldehyd perfusionsfixiert und das Gehirn entnommen. Das Gehirn wurde nach dem FluoClearBABB-Protokoll geklärt. Bei der Messung wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm für die Anregung des EGFP verwendet. Für die Anregung des mRFP1 wurde eine Anregungswellenlänge von 561 nm gewählt.

Abbildung 5.3 zeigt die Maximumintensitätsprojektion eines mit dem LaVision 4x Objektiv gemessenen Transplantationsgehirns. Es ist deutlich das Transplantat (gekennzeichnet mit einem roten Kasten) zu erkennen. Des Weiteren sind Projektionen des Transplantats im Septum zu erkennen (gekennzeichnet mit einem blauen Kasten). Das geklärte Gehirn wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Oliver Brüstle zur Verfügung gestellt. Die Transplantation der Zellen und die Injektion des RABV-Virus und die Klärung des Gehirns wurden von Anke Leinhaas durchgeführt.

Für die 3D-Darstellung der Datensätze wurde das kommerzielle Programm *Imaris* der Firma Bitplane verwendet. Für die Messung des ganzen Gehirns wurde das LaVision 4x Objektiv verwendet. Die Aufnahme besteht für jeden Farbkanal aus 51200 einzelnen

Bildern und die axiale Schrittweite Δz beträgt $3\ \mu\text{m}$. Abbildung 5.4 zeigt die transversale und sagittale Ansicht des gemessenen Gehirns mit jeweils einer Vergrößerung des Transplantats.

Abbildung 5.5 zeigt transversale und sagittale Ansichten des Gehirns, aufgenommen mit dem LaVision 12x Objektiv. Es ist zu erkennen, dass durch die größere numerische Apertur die Bildqualität, wie zu erwarten, besser ist als beim 4x Objektiv. Die axiale Schrittweite Δz beträgt $2\ \mu\text{m}$. Alle Aufnahmen zeigen das gleiche Gehirn. Bei den Abbildungen wurden keine weiteren Bildverarbeitungen, wie z.B. Entfaltungen, verwendet.

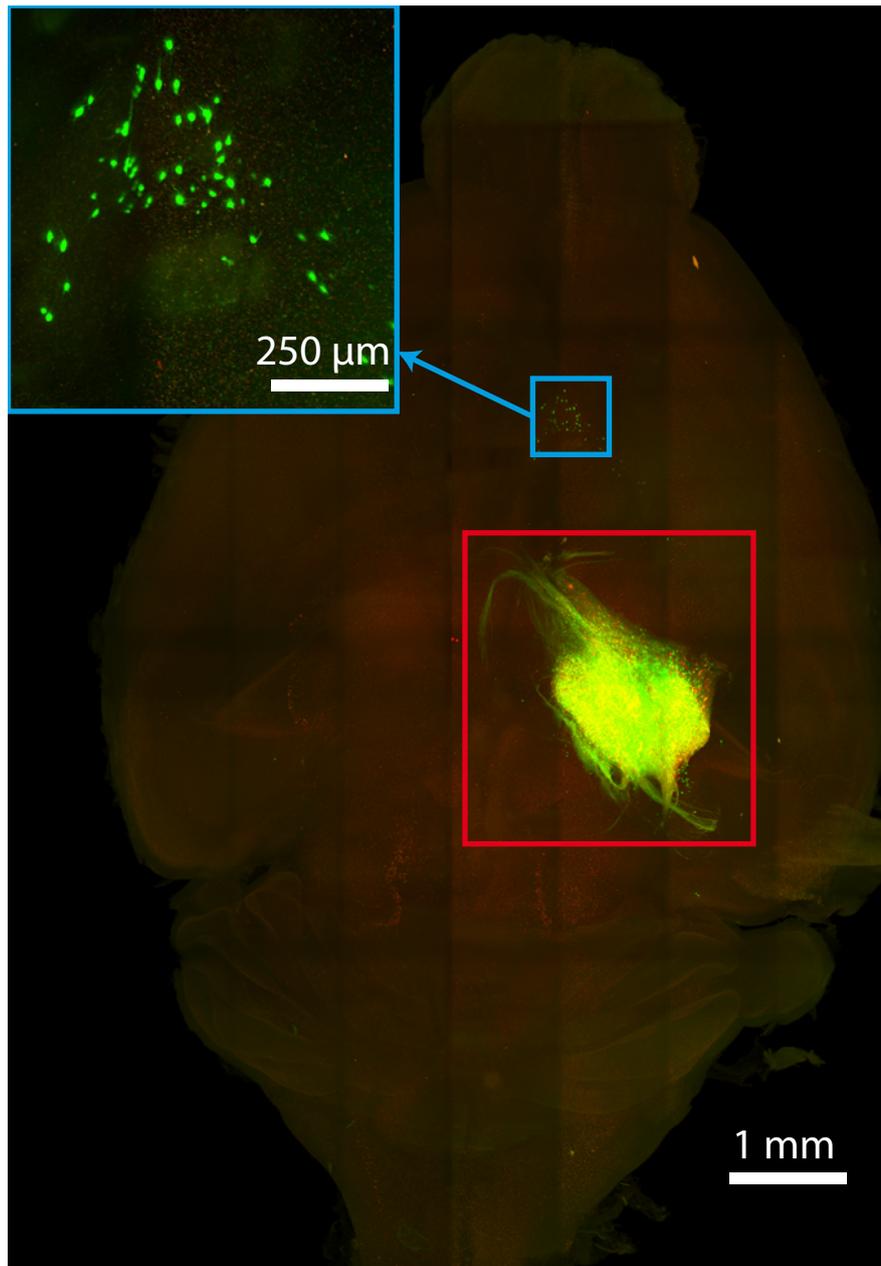


Abbildung 5.3: Maximumintensitätsprojektion eines Maushirns. Es wurden 8x4 Kacheln zusammengefügt. Das Transplantat wurde mit einem roten Kasten markiert. Der blaue Kasten verdeutlicht die Projektionen des Transplantats im Septum. Der Anschnitt zeigt eine Vergrößerung der Projektionen des Transplantats. Es wurde das LaVision 4x Objektiv verwendet. Die Messung wurde mit zwei Anregungswellenlängen (488 nm (grün) und 561 nm (rot)) durchgeführt. Das grüne Signal kommt von den transplantierten Stammzellen und den Neuronen, welche mit den transplantierten Stammzellen verbunden sind. Die transplantierten Stammzellen sind zusätzlich mit dem rot leuchtenden mRFP1 markiert.

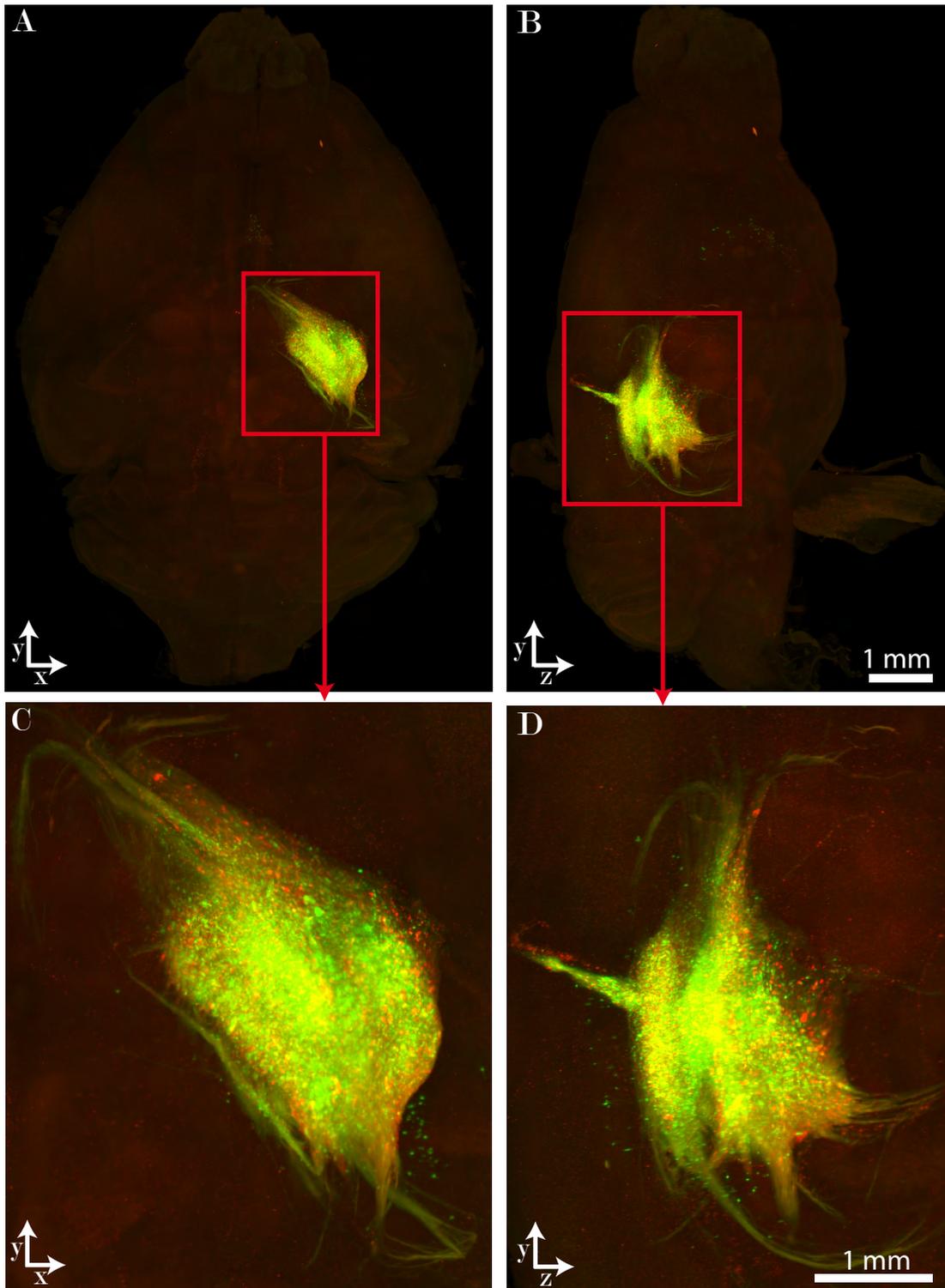


Abbildung 5.4: Die Abbildung zeigt die transversale **A** und sagittale **B** Maximumintensitätsprojektion des Gehirns, aufgenommen mit dem LaVision 4x Objektiv. Die Bilder **C** und **D** sind vergrößerte Ausschnitte von A und B. Die Markierungen entsprechen der Abbildung 5.3.

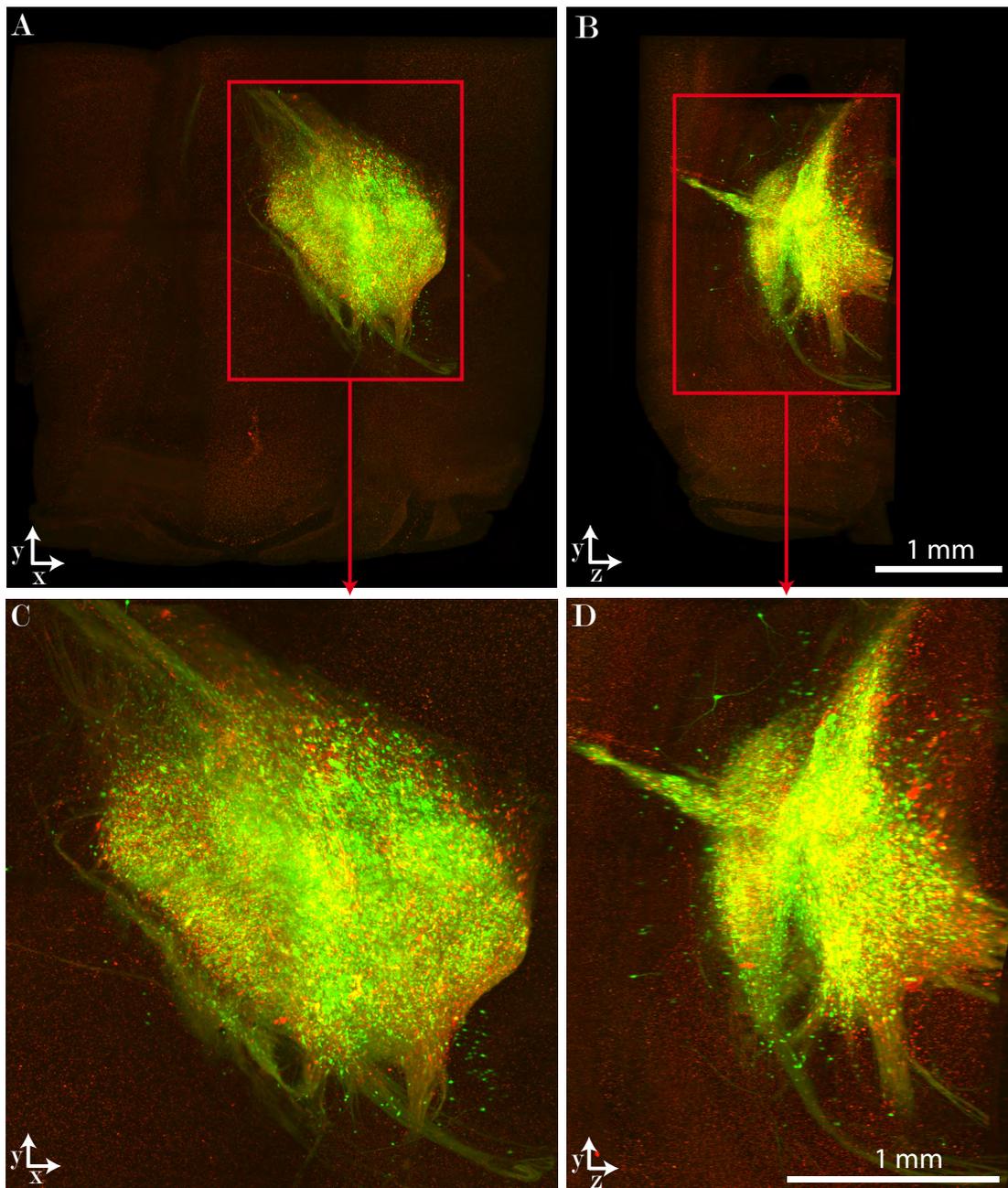


Abbildung 5.5: Die Abbildung zeigt die transversale **A** und sagittale **B** Maximumintensitätsprojektion eines Bereichs des Gehirns mit jeweils einer Vergrößerung des Transplantats (**C** und **D**), aufgenommen mit dem LaVision 12x Objektiv. Die Bilder **C** und **D** sind vergrößerte Ausschnitte von **A** und **B**. Die Markierungen entsprechen der Abbildung 5.3.

5.4 Fokusstabilisierung

In diesem Abschnitt wird die Fokusstabilisierung bei Aufnahmen großer Datenmengen betrachtet. Hierzu wurden 8x4x1600 einzelne Bilder mit zwei Anregungswellenlängen (488 nm und 561 nm) mit dem LaVision 4x Objektiv aufgenommen. Außerdem wurde eine Aufnahme mit 4x4x800 einzelnen Bildern mit dem LaVision 12x Objektiv bei den gleichen Wellenlängen aufgenommen. Die Maximumintensitätsprojektionen der Aufnahmen wurden in den Abbildungen 5.3, 5.4 und 5.5 gezeigt. Für jedes Bild wurde die Position des Detektionsobjektivs in einer Textdatei gespeichert. Über die einzelnen Positionen des Detektionsobjektivs wurde, für jeden Farbkanal und jedes Objektiv, ein Histogramm erstellt. Die beiden Farbkanäle wurden sequentiell für jeden z-Bildstapel aufgenommen. Die Histogramme zeigen, ob die mittlere Fokusposition mit der manuell eingestellten Position übereinstimmt. Außerdem kann abgeschätzt werden, um wie viel sich das Objektiv während einer Messung bewegt und ob die Wellenlänge einen Einfluss auf die Bewegung des Objektivs hat.

Bei der Messung mit dem 4x Objektiv stimmt die vorgegebene Anfangsposition des Detektionsobjektivs von 6,809 mm nicht mit der mittleren Position der Fokusstabilisierung überein. Dies ist durch das rechte Maximum, abseits der zweiten breiten Kurve, zu erkennen. Der Fokusbereich, welcher von der Fokusstabilisierung ausgemacht wird, weicht klar vom eingestellten Fokus ab. Das Detektionsobjektiv bewegt sich in einem Bereich von 50 μm bzw. 70 μm .

Bei der Messung mit dem 12x Objektiv befindet sich die vorgegebene Position des Detektionsobjektivs von 6,545 mm innerhalb der Kurve. Dies ist durch ein fehlendes zweites Maximum erkennbar. Das Detektionsobjektiv bewegt sich in einem Bereich von 25 μm .

Bei beiden Objektiven haben die Histogramme der beiden Farbkanäle eine ähnliche Form und besitzen keine starke Abweichung bezüglich der mittleren Position des Objektivs.

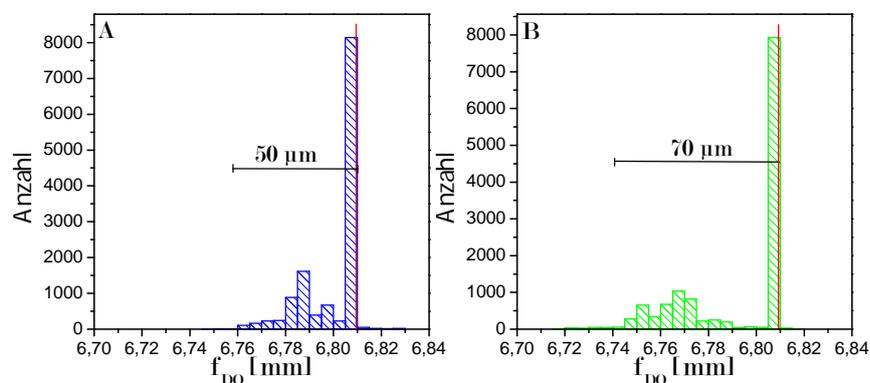


Abbildung 5.6: Histogramme mit der Position des LaVision 4x Detektionsobjektivs f_{DO} bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen. Das große einzelne Maximum ist durch die eingestellte Anfangsposition gegeben (rote senkrechte Linie). Die Anregungswellenlängen betragen **A** 488 nm und **B** 561 nm. Die Klassenbreite beträgt 5 μm .

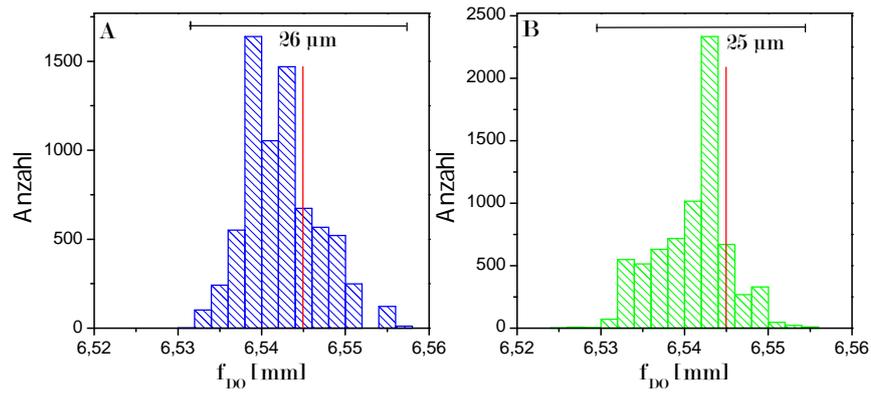


Abbildung 5.7: Histogramme mit der Position des LaVision 12x Detektionsobjektivs f_{DO} . Die Anfangsposition des Detektionsobjektivs wird durch die senkrechte rote Linie angegeben. Die Anregungswellenlängen betragen **A** 488 nm und **B** 561 nm. Die Klassenbreite beträgt 2 μm .

6 Diskussion

In diesem Kapitel werden im ersten Abschnitt allgemeine Aspekte des entwickelten Lichtscheibenmikroskops diskutiert. Es wird zum einen auf die Anforderungen des Aufbaus eingegangen, aber auch Aspekte wie Aufnahmegeschwindigkeit, Software und chromatische Aberration werden behandelt. In Abschnitt 6.2 wird das Auflösungsvermögen des Mikroskops diskutiert. Die Fokusstabilisierung wird in Abschnitt 6.3 behandelt. Ein wichtiges Thema ist der thermische Einfluss auf die Bildgebung. Der thermische Einfluss auf die Bildqualität wird in Abschnitt 6.4 besprochen. In Abschnitt 6.5 werden die Vor- und Nachteile verschiedener Beleuchtungsarten diskutiert und verdeutlicht, warum ein Gauß-Strahl die beste Lösung für die vorliegende Anwendung darstellt.

Auch die Probe an sich hat einen großen Einfluss auf die Bildqualität. Dieses wird im Abschnitt 6.6 erläutert. In Abschnitt 6.7 geht es um die mögliche Verwendung von adaptiven Optiken zur Verbesserung der Abbildung.

Wie in Abschnitt 2.1 erwähnt, wurde sich bei der Entwicklung des neuen Mikroskops an das Lichtscheibenmikroskop, das von Schwarz et al. [47] entwickelt wurde, orientiert. Deshalb werden die beiden Mikroskope in Abschnitt 6.8 miteinander verglichen. Im letzten Abschnitt werden wichtige Punkte kurz zusammengefasst und es wird ein Ausblick auf mögliche zukünftige Projekte gegeben.

6.1 Allgemeines über das entwickelte Lichtscheibenmikroskop

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Lichtscheibenmikroskop für die zuverlässige Messung von kompletten geklärten Maushirnen aufgebaut. Um eine hohe Auslastung des Mikroskops zu erreichen, ist ein zuverlässiges Funktionieren der Software und Hardware unabdingbar. Außerdem muss das Mikroskop robust gegenüber Temperaturschwankungen sein.

Die Bedienung des Mikroskops muss benutzerfreundlich sein, da gegebenenfalls mehrere Personen mit diesem Mikroskop arbeiten. Aus diesem Grunde wurde auf eine klar strukturierte Benutzeroberfläche geachtet. Auch bei der Programmierung der Software in der *LabVIEW*-Umgebung wurde auf die Überschaubarkeit des Programmcodes geachtet, damit auch später von anderen Benutzern Änderungen vorgenommen werden können. Aus diesem Grund wurde versucht, nur einfache Programmierstrukturen zu verwenden. Die entwickelte Software erlaubt eine völlig automatische Messung der

Probe. Das Starten einer Messung sollte in einer überschaubaren Zeit möglich sein. Das Wechseln der einzelnen Detektionsobjektive sollte ohne große Schwierigkeit möglich sein.

Für die Aufnahme von vielen Bildern ist auch eine solide Aufnahmegeschwindigkeit notwendig. Bei einer Belichtungszeit von 100 ms erreicht das Mikroskop eine Aufnahmegeschwindigkeit um die $5 \frac{\text{Bilder}}{\text{s}}$. Eine gewisse Belichtungszeit ist notwendig, damit die Reduzierung von Streifenartefakten durch ein Schwenken des Beleuchtungsstrahls möglich ist. Bei den benutzten Frequenzen der Galvanometer wird jeder Bereich bei einer Aufnahme 50 mal mit dem fokussierten Laserstrahl beleuchtet und die Lichtscheibe schwenkt sich 4 mal um ihre Strahltaile. Die verwendeten Galvanometer erlauben höhere Frequenzen, jedoch nimmt die Lautstärke deutlich zu. Die Aufnahmegeschwindigkeit des Mikroskops ist geringer als theoretisch möglich. Das kann durch zwei Tatsachen erklärt werden. Für die Speicherung der Bilder werden HDD-Festplatten verwendet. Diese haben einen großen Kostenvorteil gegenüber SSD-Festplatten, sind jedoch langsamer als SSD-Festplatten. Es hat sich herausgestellt, dass bei einer Speicherplatzbelegung von 85% die Aufnahmegeschwindigkeit deutlich abnimmt. Aus diesem Grund steht nicht der ganze Speicherplatz zur Verfügung. Auch ist eine regelmäßige Defragmentierung der HDD-Festplatten notwendig.

Es stellte sich heraus, dass die Linearversteller der einzelnen Hersteller unterschiedlich schnell in der Ansteuerung sind. Der Linearversteller von der Firma Physikalische Instrumente (M-112.12S) wies eine schnellere Ansteuerung auf als die z-Linearversteller von der Firma ASI (LS-25). Ein Grund kann die deutlich höhere Masse sein, die die ASI-Linearversteller heben müssen. Nach jeder Bildaufnahme bewegt sich mit dem motorisierten xy-Tisch eine relativ große Last in z-Richtung um Δz . Evtl. kann eine ausschließliche Bewegung der Küvette die Aufnahmegeschwindigkeit verkürzen. Die Speicherung des Bildes und die Bewegung der Probe laufen parallel zur selben Zeit ab, um trotzdem eine hohe Aufnahmegeschwindigkeit zu erreichen.

Die maximale gemessene chromatische Verschiebung der Strahltaile in Beleuchtungsrichtung beträgt bei diesem Mikroskop 101,2 μm . Dies entspricht beim LaVision 12x Objektiv 9% der Bildbreite. Diese Verschiebung kann durch eine Aufteilung der beiden Achromate in jeweils zwei Achromate mit einer größeren Brennweite verringert werden [57]. Eine andere Möglichkeit stellt eine Implementierung einer chromatischen Korrektur in der Software dar. Beim Wechseln der Anregungswellenlänge könnte die Verschiebung der Strahltaile, durch eine passende Bewegung des Linearverstellers, auf dem die Beleuchtungseinheit steht, korrigiert werden. Jedoch würde dies eine zusätzliche Verkomplizierung der Software bedeuten.

Für die Bildaufnahme wird die sCMOS-Kamera Orca Flash 4.0 V2 verwendet. Vergleicht man die Spezifikationen dieses Modells mit dem aktuellsten Modell dieser Kamerareihe, der Orca Flash 4.0 V3, so erkennt man keine signifikanten Unterschiede. Beide Modelle besitzen eine maximale Quantenausbeute von 82 % bei einer Wellenlänge von 560 nm. Es wäre somit bei der Verwendung der neusten Kamera-Version keine Verbesserung der Bildqualität zu erwarten.

6.2 Auflösung des Mikroskops

Die kleinste axiale Halbwertsbreite konnte mit dem LaVision 12x Objektiv mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm erreicht werden. Diese beträgt 5,6 μm bei einer theoretischen erwarteten Halbwertsbreite von 3,7 μm . Wie zu erwarten ist die axiale Halbwertsbreite bei den Objektiven mit einer höheren numerischen Apertur kleiner als bei den Objektiven mit einer niedrigen numerischen Apertur. Die gemessenen und theoretischen axialen Halbwertsbreiten sind der Tabelle 4.3 zu entnehmen.

Die gemessene laterale Halbwertsbreite weicht deutlich von der theoretischen lateralen Halbwertsbreite ab. Die gemessenen und theoretischen lateralen Halbwertsbreiten können der Tabelle 4.2 entnommen werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass bei den Messungen das Nyquist-Theorem verletzt wurde. Das Nyquist-Theorem könnte mit Hilfe einer zusätzlichen Zwischenvergrößerung durch eine Tubuslinse mit einer größeren Brennweite erfüllt werden. Eine Zwischenvergrößerung könnte jedoch zusätzliche Aberrationen verursachen. Das verwendete AF Micro-Nikkor 200 mm Makroobjektiv ist das Objektiv in der Produktserie mit der höchsten verfügbaren Brennweite. Durch die hohe Auslastung des Mikroskops ist ein Umbau am Detektionspfad schwierig.

Die axiale und laterale Auflösung des entwickelten Lichtscheibenmikroskops reicht aus, um Transplantate in ganzen Mausgehirnen aufzulösen. Auch können einzelne Neuronen und Dendriten mit dem Mikroskop aufgelöst werden.

6.3 Fokusstabilisierung

Durch die Verwendung einer Fokusstabilisierung kann die Empfindlichkeit des Mikroskops durch äußere Einflüsse (z. B. thermische Drift oder Temperaturänderung der Probenkammer) verringert werden. In vielen Fällen befinden sich die zu untersuchenden Strukturen ein Stück unterhalb der Probenoberfläche. Bei einer kleinen Defokussierung reicht dieses Stück aus, damit die Lichtscheibe wieder in dem Fokusbereich des Detektionsobjektivs liegt. Auch konnte gezeigt werden, dass Aufnahmen mit der Fokusstabilisierung gleich gut oder besser sind als Aufnahmen ohne Stabilisierung, bei denen der Fokus manuell optimiert wurde (siehe Unterabschnitt 4.6.3).

Es konnte gezeigt werden, dass die $F4$ -Funktion unter den getesteten Funktionen das beste Ergebnis liefert. Die Berechnung der $F4$ -Funktion eines Arrays mit 2048x2048 Elementen dauert weniger als 10 ms und benötigt keine komplizierten Berechnungen. Die Berechnung der $F4$ -Funktion und die dazugehörige Bewegung des Detektionsobjektivs wird parallel zur Speicherung des Bildes und der Bewegung der Probe vorgenommen. Aus diesem Grund kommt es durch die Fokusstabilisierung zu keiner Verlangsamung der Messung.

Die Fokusstabilisierung wurde bei mehreren Aufnahmen erfolgreich getestet und wird bei jetzigen Messungen mit dem Mikroskop verwendet.

6.4 Thermische Einflüsse

6.4.1 Thermische Einflüsse auf das Mikroskop

Ein Problem bei vielen optischen Aufbauten ist die thermische Drift. Das Mikroskop wird in einem Labor ohne Klimaanlage betrieben. Die verwendeten Spiegelhalter (Polaris-K1F2, Thorlabs) zeichnen sich durch eine kleine thermische Drift aus. Außerdem kehren diese nach einer thermischen Drift wieder in die Ausgangsstellung zurück, wenn die alte Temperatur wieder vorherrscht.

Es hat sich im Laufe der Zeit gezeigt, dass die vertikale Position (Detektionsrichtung) des Strahls sehr stabil ist. Jedoch ist die horizontale Strahlposition (Scanrichtung) deutlich instabiler. Dies ist auf die relativ hohe thermische Empfindlichkeit der Galvanometer zurückzuführen. Das erste kleine Galvanometer besitzt im Gegensatz zum zweiten großen Galvanometer keine eingebaute Heizung und somit keine Temperaturregulierung. Die thermische Drift kann jedoch durch eine Änderung des Gleichspannungsanteils des Signals behoben werden. Während der Messung ist die Beleuchtungsbreite etwas größer als die vertikale Bildbreite, so dass es zu keiner Beeinträchtigung der Bildaufnahme kommt. Auch scheint der Grob-Fein-Trieb, an dem die Detektionseinheit befestigt ist, wärmeempfindlich zu sein. Die Gängigkeit muss nach einer gewissen Zeit neu eingestellt werden. Es sei angemerkt, dass das Mikroskop ursprünglich für einen temperaturregulierten Raum entworfen wurde.

6.4.2 Thermische Einflüsse auf die optischen Eigenschaften der Klärlösung

In diesem Unterabschnitt wird der Einfluss der Temperatur auf den Brechungsindex η der BABB-Lösung getestet. Der Brechungsindex wurde mit einem kommerziellen temperaturstabilisierten Abbe-Refraktometer (AR2008, Krüss) gemessen. Das Refraktometer besitzt eine Messgenauigkeit von 0,0001 und die Temperatur kann durch einen Durchlauferhitzer mit einer Genauigkeit von 0,1 °C eingestellt werden. Es wurde in 1 °C-Schritten der Brechungsindex bestimmt. Für die Messung wurde ein Temperaturintervall von 20 °C bis 35 °C gewählt. Beim Betrachten der Abbildung 6.1 erkennt man einen linearen Zusammenhang zwischen Brechungsindex und Temperatur. Durch die Verwendung einer linearen Regression kann die Temperaturabhängigkeit des Brechungsindex der BABB-Lösung bestimmt werden. Aus der linearen Regression ergibt sich folgende lineare Abhängigkeit:

$$\eta(T) = -4,5 \cdot 10^{-4} \pm 1,6 \cdot 10^{-18} \frac{1}{^\circ\text{C}} T + 1,5676 \pm 4,4 \cdot 10^{-17} \quad (6.1)$$

Bei organischen Flüssigkeiten nimmt der Brechungsindex bei steigender Temperatur typischerweise um $3,5 \cdot 10^{-4} \frac{1}{^\circ\text{C}}$ bis $5,5 \cdot 10^{-4} \frac{1}{^\circ\text{C}}$ ab [97]. Die BABB-Lösung verhält sich

damit genauso wie andere organische Lösungen. Bei einer Änderung des Brechungsindex um $\Delta\eta$ verschiebt sich der Brennpunkt um $\Delta d = \frac{\Delta\eta}{\eta} d'$, wobei d' der alte Arbeitsabstand ist. Bei einem Eintauchobjektiv mit einem Arbeitsabstand von 1 cm, wie es beim LaVision 12x Objektiv der Fall ist, beträgt die Verschiebung des Brennpunktes 2,88 μm bei einer Temperaturänderung von 1°C. Die Schärfentiefe für dieses Detektionsobjektiv beträgt bei einer Wellenlänge von 488 nm, nach der Gleichung 1.28, 4,3 μm . Somit kann die Temperaturänderung während einer Messung zu einer Verschlechterung der Aufnahme führen. Der Fokusverschiebung durch eine Temperaturänderung kann durch die Fokusstabilisierung entgegengewirkt werden.

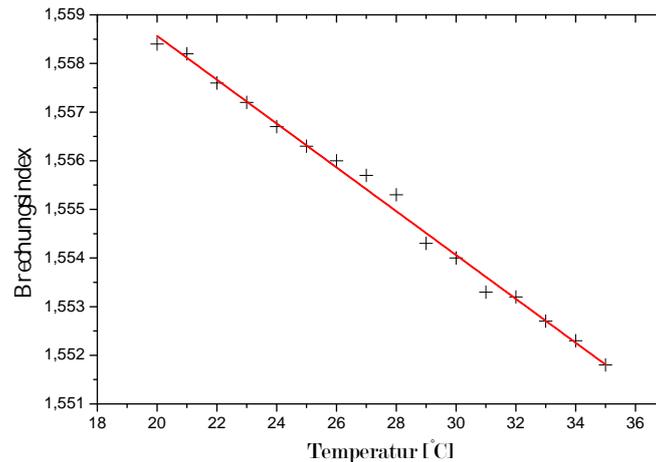


Abbildung 6.1: Die Grafik zeigt den Brechungsindex der BABB-Lösung bei verschiedenen Temperaturen. Die rote Linie ist die Regressionsgerade bezüglich der Messwerte.

6.5 Art der Beleuchtung

Wie im Abschnitt 1.3 beschrieben, gibt es neben der Beleuchtung mit einem Gauß-Strahl weitere Beleuchtungsmöglichkeiten. Die bekannteste Alternative zu einem Gauß-Strahl ist ein Bessel-Strahl. Dieser hat den Vorteil seiner selbstheilenden Eigenschaft. Müllenbroich et al. zeigten, dass bei Untersuchungen von Blutgefäßen in geklärten Mausgehirnen die Beleuchtung mit Bessel-Strahlen, in Kombination mit einer konfokalen Detektion, bessere Ergebnisse liefert als mit einem Gauß-Strahl [98]. Der große Nachteil von Bessel-Strahlen ist das konzentrische Ringsystem um den Hauptstrahl. Dadurch nimmt der Fluoreszenzanteil außerhalb der Schärfenebene stark zu. Abbildung 6.3 zeigt einen stationären Gauß-Strahl und einen stationären Bessel-Strahl in einer BABB-Lösung. Das Ringsystem des Hauptstrahls ist beim Bessel-Strahl deutlich sichtbar. Der Bessel-Strahl wurde durch eine ringförmige Blende vor dem ersten Galvanometer erzeugt. Es ist jedoch auch zu erkennen, dass der Gauß-Strahl stärker divergiert als der Bessel-Strahl. Dies ist ein weiterer Vorteil, neben der selbstheilenden Eigenschaft, eines Bessel-Strahls gegenüber einem Gauß-Strahl. Abbildung 6.3 zeigt jeweils eine Aufnahme mit einem Gauß-Strahl (C) und einem Bessel-Strahl (D). Es ist deutlich

zu erkennen, dass die Aufnahme mit dem Gauß-Strahl kontrastreicher ist.

Abbildung 6.2 zeigt den simulierten transversalen Querschnitt eines Gauß-Strahls A und eines Bessel-Strahls B. Die Unterabbildungen C und D zeigen das simulierte Intensitätsprofil in der zy -Ebene bei einem gescannten Gauß-Strahl C und einem gescannten Bessel-Strahl D. Ein hoher Anteil der Intensität befindet sich um den Hauptstrahl.

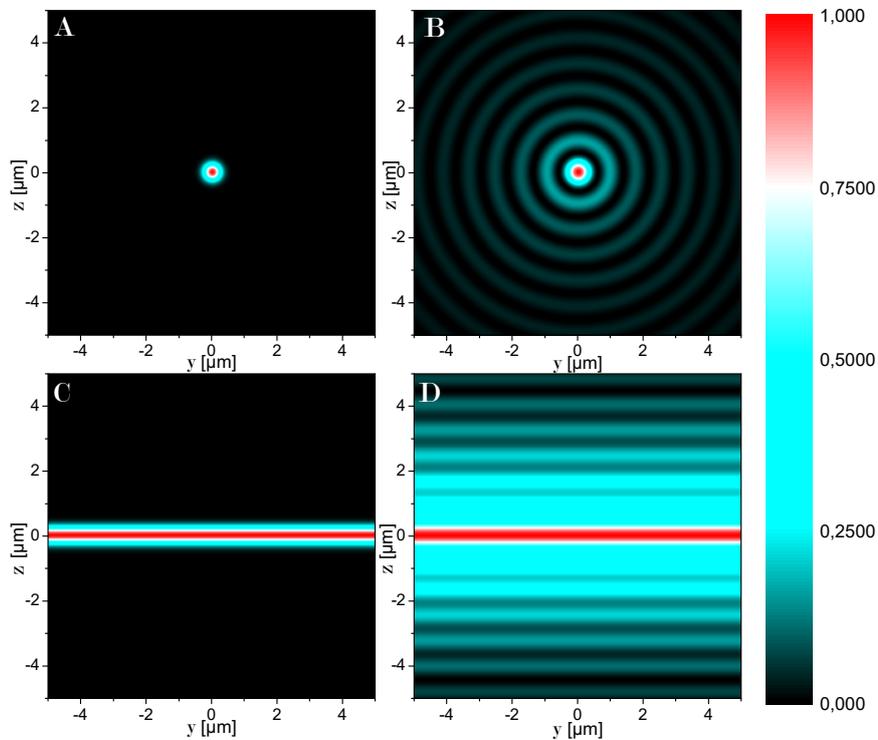


Abbildung 6.2: Gauß- versus Bessel-Strahl: Die Abbildungen A und B zeigen den simulierten transversalen Querschnitt eines Gauß- bzw. eines Bessel-Strahls. Es sind deutlich beim Bessel-Strahl die Nebenringe erkennbar. Die Unterabbildungen C und D zeigen das simulierte yz -Intensitätsprofil eines gescannten Gauß- bzw. eines gescannten Bessel-Strahls. Die Divergenz der beiden Strahlen wurde nicht berücksichtigt.

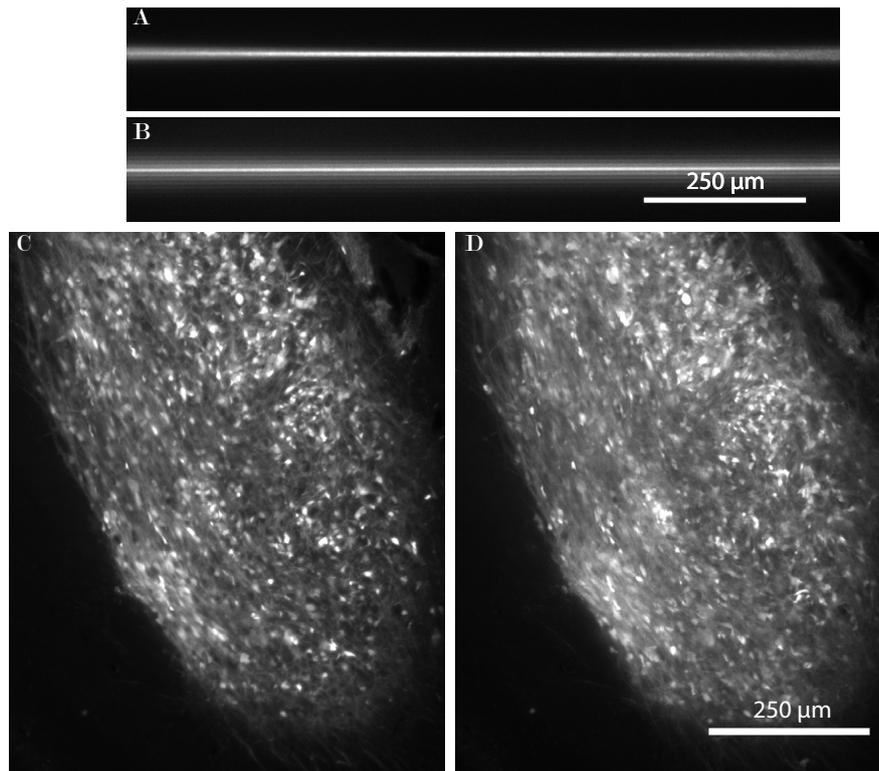


Abbildung 6.3: Autofluoreszenz eines Gauß-Strahls **A** bzw. eines Bessel-Strahls **B** in einer BABB-Lösung. Beim Bessel-Strahl ist das Ringsystem um den Hauptstrahl deutlich zu erkennen. Die Bilder **C** und **D** zeigen ein Transplantat in einem Mausgehirn, aufgenommen mit einem Gauß-Strahl **C** bzw. mit einem Bessel-Strahl **D**. Es ist zu erkennen, dass die Aufnahme **C** kontrastreicher ist als die Aufnahme **D**. Die Bilder wurden mit dem LaVision 12x Objektiv und mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm aufgenommen. Die Maßstabsbalkenlänge beträgt 250 µm.

Für das Herausfiltern von Anteilen, welche außerhalb des Fokusbereichs liegen, sind zwei Möglichkeiten bekannt.

Die erste Möglichkeit ist die Verwendung einer konfokalen Detektion [22]. Silvestri et al. benutzten eine konfokale Detektion bei der Aufnahme von ganzen Maushirnen [88]. Jedoch muss für den gesamten Zeitraum sichergestellt werden, dass Kamera und Strahl sich perfekt überschneiden und der Strahl keine Verkippung in der xy -Ebene aufweist. Bei einer relativ großen Bildbreite von über 1 mm kann schon eine kleine Verkippung eine große Auswirkung haben. Es konnte keine Publikation gefunden werden, bei der sichergestellt wird, dass die Strahlposition und die Position der aktiven Bildpunktzeilen immer übereinstimmen bzw. eine Verkippung des Strahls während der Messung erkannt und behoben wird. In Abschnitt 6.4.1 wurde darauf eingegangen, dass der Strahl durch Temperaturänderungen die Tendenz hat, entlang der Scanrichtung zu driften. Eine Verschiebung des Strahls relativ zur aktiven Bildpunktzeile während der Messung hätte eine gravierende Auswirkung auf die Bildqualität. Auch ist die Reduktion der Streifenartefakte durch die Schwenkung der Lichtscheibe nicht mehr möglich.

Die zweite Möglichkeit ist die Verwendung der im Abschnitt 1.3 erläuterten, strukturierten Beleuchtung [25]. Kalchmair et al. benutzten diesen Ansatz als erste für geklärte

Maushirne [99].

Mertz et al. entwickelten eine Methode, den Fluoreszenzanteil außerhalb der Schärfebene mit nur zwei Bildern herauszufiltern [100]. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der strukturierten Beleuchtung. Bei der sogenannten HiLo-Mikroskopie wird pro Bereich eine Aufnahme mit einer strukturierten Beleuchtung und eine Aufnahme ohne Modulation aufgenommen. Mit Hilfe eines Hochpassfilters und eines Tiefpassfilters wird aus beiden Bildern ein Bild mit geringer Unschärfe gewonnen. Bei dieser Methode spielt die genaue Phase der Modulation keine Rolle. Jedoch kann es bei dieser Methode zur Bildung von Artefakten kommen [101]. Eine Abwandlung der HiLo-Methode ist die 3D-HiLo-Methode [101]. Hierzu wird die Laserleistung nicht nur zweidimensional, sondern dreidimensional moduliert. Bei der Verwendung der HiLo-Mikroskopie kommt es jedoch zu einer Verdopplung der Messzeit bzw. des Speicherplatzbedarfs. Außerdem benötigen die Berechnungen der HiLo-Bilder eine gute IT-Infrastruktur.

Neben dem Bessel-Strahl gibt es noch den Airy-Strahl mit einer selbstheilenden Eigenschaft [28]. Bei diesem Strahl können die einzelnen Nebenmaxima benutzt werden, um die axiale Auflösung zu verbessern. Dabei ist jedoch eine Entfaltung der Rohdaten notwendig.

Die Entwicklung der ASLM „Axially Swept Light Sheet Microscopy“ erlaubt eine Verbesserung der mittleren axialen Auflösung [102]. Bei dieser Technik bewegt sich die Lichtscheibe während der Bildaufnahme in x-Richtung (Beleuchtungsrichtung), so dass sich die x-Position der Strahltaile während der Bildaufnahme ändert. Vom Bildsensor werden nur die Bildpunkte ausgelesen, die sich mit der Strahltaile überschneiden. Die Bewegung der Strahltaile kann durch ein adaptives Element, wie z. B. eine elektrisch fokussierbare Linse [103] oder eine TAG-Linse [104], erreicht werden. Jedoch ist diese Technik bei der Verwendung einer statischen Lichtscheibe leichter zu realisieren als bei einem gescannten Laserstrahl. Bei einer statischen Lichtscheibe wird die Probe entlang der Scanrichtung gleichzeitig beleuchtet. Bei einem gescannten Laserstrahl muss die Scangeschwindigkeit wesentlich höher sein als die Bewegung der Strahltaile in x-Richtung, damit die axiale Auflösung in Scanrichtung gleich bleibt. Außerdem können adaptive Linsen weitere Aberrationen erzeugen [105].

6.6 Einfluss der Probe auf die Bildqualität

Nicht nur eine Grenzfläche zwischen zwei Brechungsindizes, wie im Abschnitt 1.6 beschrieben, kann sphärische Aberrationen erzeugen. Auch Inhomogenitäten des Brechungsindex innerhalb der Probe führen zu Aberrationen. Gerade Objektive mit hohen numerischen Aperturen haben eine hohe Empfindlichkeit gegenüber diesen Inhomogenitäten. In Kombination mit einem großen Bildbereich können verschiedene Bereiche unterschiedlich stark im Fokus des Detektionsobjektivs liegen. Es hat sich herausgestellt,

dass die Qualität der Probenpräparation maßgeblich die Bildqualität beeinflusst. Streuzentren wie z. B. Narbengewebe am Einstichkanal, um Zellen oder Viren zu injizieren, können eine Streuung des Beleuchtungsstrahls verursachen. Durch diese Streuung kann es zu einer Verschlechterung der axialen Auflösung hinter dem Streuzentrum kommen. Dadurch, dass ein Gehirn kein homogenes Gebilde ist, kann die Aufnahmequalität von der Region abhängig sein. Erfahrungsgemäß ist z. B. die Bildqualität vor den Ventrikeln besser als hinter den Ventrikeln. Eine Verbesserung könnte durch die Beleuchtung mit selbstheilenden Strahlen erreicht werden, jedoch besitzen diese wiederum andere Nachteile (siehe Abschnitt 6.5).

6.7 Mögliche Verwendung von adaptiven Optiken

Die Verformung der Wellenfront durch die Probe bzw. durch die Probenkammer kann durch eine adaptive Optik korrigiert werden [106]. Hierzu wird die Wellenfront des emittierten Lichts nach dem Detektionsobjektiv durch ein adaptives Element wie z. B. einen deformierbaren Spiegel räumlich moduliert. Die richtige Einstellung kann direkt mit einem Shack-Hartmann-Sensor oder iterativ per Software bestimmt werden [107]. Bei der Benutzung eines Shack-Hartmann-Sensors ist ein Leuchtpunkt notwendig. Als Punktquelle können fluoreszierende Partikel [106] oder ein sogenannter „Guide Star“ [108] verwendet werden. Bei einem „Guide Star“ wird mit einer Zweiphotonenabsorption ein kleiner leuchtender Bereich in der Probe erzeugt. Dieser leuchtende Bereich kann für die Korrektur der Aberrationen verwendet werden. Bei der Benutzung eines Shack-Hartmann-Sensors können durch eine einzige Aufnahme die vorhandenen Aberrationen bestimmt und das adaptive Bauelement entsprechend angepasst werden. Die Verwendung von fluoreszierenden Partikeln ist bei der Reduzierung von Aberrationen, welche von der Probenkammer herrühren, interessant, da die Aberrationen bei jeder Messung sehr ähnlich sind. Dies ist z. B. bei der Verwendung eines zylinderförmigen Rohrs als Probenkammer der Fall [106]. Mit einem „Guide Star“ können Aberrationen, die von der Probe selbst kommen, korrigiert werden [108]. Da bei dem hier entwickelten Mikroskop die Aberrationen ausschließlich von der Probe kommen und eine Korrektur sich als schwierig erweist, wurde auf eine adaptive Optik verzichtet.

6.8 Vergleich mit dem Heidelberger Lichtscheibenmikroskop

Wie im Abschnitt 2.1 beschrieben, wurde das von Schwarz et al. [47] entwickelte Lichtscheibenmikroskop als Ansatzpunkt gewählt. Das Mikroskop befand sich im Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg. Jedoch wurde das Mikroskop schon vor der Entwicklung des neuen Mikroskops abgebaut und es standen keine wei-

teren Informationen, außer der Publikation [47], zur Verfügung. Während der Entwicklung des Mikroskops fand keine Kommunikation mit den Entwicklern des Heidelberger Lichtscheibenmikroskops statt. Deshalb ist es schwierig, beide Mikroskope miteinander zu vergleichen.

Ein zentraler Unterschied ist, dass beim Mikroskop in Heidelberg die Probe nur von einer Seite beleuchtet werden konnte, so dass die beiden einzelnen Datensätze von beiden Gehirnhälften nachträglich zusammengefügt werden mussten. Für die komplette Messung eines Mausgehirns musste die Probe nach der Messung der ersten Gehirnhälfte um 180° gedreht werden.

Für die Detektion wurde dieselbe Tubuslinse (AF Micro-Nikkor 200 mm 1:4D IF-ED, Nikon) verwendet. Zu Beginn wurden auch die gleichen Detektionsobjektive (Planapo 0.8x und Planapo 2.0x) von Leica verwendet. Jedoch wurden ab 2016 von der Firma LaVision BioTec Eintauchobjektive für organische Klärlösungen entwickelt und für das neue Mikroskop verwendet.

Für das neue Mikroskop wurde die im Jahr 2015 neueste Version der Orca Flash CMOS Kamera von Hamamatsu verwendet. Die Kamera (Orca Flash 4.0 V2) hat einen größeren Bildsensor als die Kamera in Heidelberg (Sensicam QE, PCO). Die Orca Flash 4.0 V2 hat eine Sensorgröße von $13,312 \times 13,312 \text{ mm}^2$ mit einer Zellengröße von $6,5 \mu\text{m}$. Die Zellengröße der Sensicam QE beträgt nur $8,875 \times 6,708 \text{ mm}^2$. Damit kann beim neuen Mikroskop eine höhere Bildbreite in Scanrichtung erreicht werden. Die Zellengröße bei dieser Kamera beträgt $6,45 \mu\text{m}$.

Für die Galvanometer wurden die Galvanometer der Firma Scanlab (dynAXIS XS und dynAXIS L) verwendet. In Heidelberg wurden Galvanometer der Firma Cambridge Technology (Modelle: 6215HSM und 6240HM) verwendet. Die Entscheidung fiel auf die Galvanometer der Firma Scanlab, da der deutsche Vertriebspartner von Cambridge Technology zum Zeitpunkt der Entwicklung des Mikroskops gewechselt wurde und die Kommunikation mit der Firma Scanlab einfacher war. Die technischen Daten zwischen den Galvanometern der beiden Firmen sind jedoch sehr ähnlich.

In Heidelberg wurden beide Galvanometer mit einer Sägezahnspannung angesteuert. Im neuen Aufbau wird anstatt einer Sägezahnspannung eine Dreieckspannung verwendet. Das hat den Vorteil, dass das Galvanometer sich mit einer gleichmäßigen Geschwindigkeit bewegt und nicht wie bei einer Sägezahnspannung eine steile Flanke besitzt, bei der sich das Galvanometer schnell zurückbewegt. Das erste Galvanometer wurde in Heidelberg mit einer Frequenz von 501 Hz betrieben. Beim zweiten Galvanometer wurde eine Frequenz von 52 Hz verwendet. Im Vergleich hat sich in Bonn eine Frequenz von 270 Hz für das erste Galvanometer als ausreichend erwiesen. Das zweite Galvanometer wird mit einer Frequenz von 40 Hz betrieben. Eine gewisse Scanfrequenz ist notwendig, damit der Beleuchtungsstrahl innerhalb einer Bildaufnahme mehrmals geschwenkt wird. Durch die Verwendung einer Dreieckspannung anstatt einer Sägezahnspannung sind kleinere Scanfrequenzen ausreichend, was evtl. die Lebensdauer des Galvanometers verlängert.

Tabelle 6.1 zeigt die verwendeten Brennweiten der benutzten Achromate und des ver-

wendeten Beleuchtungsobjektivs bei beiden Aufbauten. In der Publikation [47] ist nicht klar erkennbar, welche Achromate genau verwendet wurden, da der Hersteller (Linos) Linsen mit gleichen Brennweiten, aber unterschiedlichen Durchmessern hergestellt hat bzw. ob genau diese Achromate noch hergestellt werden. Die Artikelnummern der benutzten Linsen sind leider unbekannt. Somit ist es nicht möglich, mit dem Computerprogramm *Zemax* beide Mikroskope qualitativ miteinander zu vergleichen. Bei beiden Mikroskopen wurde dasselbe Beleuchtungsobjektiv (Planapo 2.0x, Leica) verwendet.

Linse	$f_{\text{Heidelberg}}$ [mm]	f_{Bonn} [mm]
Linse 1	100	100
Linse 2	150	80
Beleuchtungsobjektiv	50	50

Tabelle 6.1: Brennweiten der einzelnen Linsen beim Heidelberger bzw. beim Bonner Lichtscheibenmikroskop.

Nach Formel 3.9 kann der Strahltaillenradius ω_3 in Abhängigkeit von dem Anfangsstrahlradius ω_S abgeschätzt werden. Bei gleicher Blendeneinstellung ist der Strahltaillenradius beim Bonner Aufbau ca. um den Faktor 1,875 größer als beim Heidelberger Aufbau.

Beim Heidelberger Lichtscheibenmikroskop wurde der Strahl vor dem ersten Galvanometer um den Faktor 33 aufgeweitet. Im Bonner Aufbau wird der Strahl nur um den Faktor 20 aufgeweitet. Die Laserausgangsleistung ist mit 100 mW in Bonn doppelt so groß wie in Heidelberg.

6.9 Abschließende Zusammenfassung und Ausblick

6.9.1 Abschließende Zusammenfassung

Das entwickelte und aufgebaute Lichtscheibenmikroskop erlaubt die Messung von großen Proben. In den letzten 3 Jahren wurden verschiedene komplette geklärte Organe (Gehirn, Lunge, Niere, Pankreas) untersucht. Bis zum 27.08.2019 wurden insgesamt 146 Proben von unterschiedlichen Arbeitsgruppen abgebildet, dabei konnten die Messungen von mehreren Personen durchgeführt werden. Durch eine permanente Verbesserung der Software konnte die Anzahl von Softwareproblemen stark reduziert werden. Diese Anpassungen ermöglichten erst die Benutzung des Mikroskops durch mehrere Nutzer. Die Auflösung des Mikroskops beträgt bei der lateralen Ebene bis zu $0,94 \pm 0,07 \mu\text{m}$ und in der axialen Richtung bis zu $5,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$.

Dank der beidseitigen Beleuchtung muss die Probe während der Messung nicht gedreht

werden und die beiden Abbildungen der jeweiligen Gehirnhälften nicht mühselig per Bildverarbeitung zusammengefügt werden.

Spezielle Eintauchobjektive erlauben die Bildgebung bei großen Probentiefen. Gerade bei Objektiven mit hohen numerischen Aperturen ist eine Korrektur von sphärischen Aperturen unabdingbar.

Die softwarebasierte Fokusstabilisierung erlaubt die Messung von großen Proben, wie z. B. Rattengehirnen, auch ohne eine Temperaturregulierung des Raumes.

Dank diesem Lichtscheibenmikroskop konnten neue wissenschaftliche Erkenntnisse gewonnen werden [10].

6.9.2 Ausblick

Um eine höhere Auslastung des Mikroskops zu erreichen, könnten die aufgenommenen Daten automatisch nach einer Messung per 10-Gbit-Ethernet-Verbindung zu einem weiteren Rechner transferiert werden. An diesem Rechner könnte das Zusammenfügen der einzelnen aufgenommenen Kacheln (im engl. Stitching) realisiert werden. Im Moment wird für die Aufnahme und das Zusammenfügen der Kacheln und der Bildaufnahme ein Rechner verwendet. Für eine gleichzeitige Aufnahme würde die Prozessorleistung ausreichen, jedoch sind die verwendeten Festplatten für diese Anforderungen nicht ausgelegt. Ein NAS-System und eine Automatisierung der Datenübertragung könnten eine Lösung für das Problem darstellen.

Für die Aufnahmen von beiden Seiten wird ein optischer Chopper verwendet, um aus beiden aufgenommenen Bildern nachträglich ein einzelnes Bild zu erhalten. Ohne einen optischen Chopper im Mikroskop wird bei der beidseitigen Beleuchtung die Probe von beiden Seiten gleichzeitig beleuchtet. Somit entspricht die Aufnahme dem Mittelwert von beiden Beleuchtungsseiten. Mit dem Chopper kann von jeder Beleuchtungsseite eine Aufnahme gemacht werden. Somit können andere Arten der Bildzusammensetzung realisiert werden. Eine Alternative zu einem optischen Chopper wäre die Verwendung einer Pockels-Zelle. In Kombination mit einem polarisationsabhängigen Strahlteiler kann die Beleuchtungsrichtung gesteuert werden. Die Beleuchtungsintensität könnte somit theoretisch bis zu einem Faktor 2 erhöht werden im Vergleich zu einem polarisationsunabhängigen Strahlteiler und einem optischen Chopper.

Wie im Abschnitt 6.5 beschrieben, führt ein ASLM-Lichtscheibenmikroskop zu einer homogenen axialen Auflösung. Das Umbauen zu einem ASLM-Lichtscheibenmikroskop wäre somit eine Option für die Zukunft.

Das Emissionsspektrum von der Autofluoreszenz scheint breiter zu sein als das Emissionsspektrum des EGFP-Proteins. Dies erschwert die Benutzung von Multi-Notch-Filtern oder Multi-Bandpass-Filtern, da die nächste Anregungswellenlänge schon bei 561 nm liegt. Aus diesem Grund werden die Farbkanäle für jeden Bildstapel sequenziell aufgenommen. Diese sequenzielle Aufnahme der Farbkanäle wird durch die RMS-Wiederholgenauigkeit des z-Linearverstellers von $< 0,7 \mu\text{m}$ ermöglicht. Dies ist weit

kleiner als die maximale axiale Halbwertsbreite von $5,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Durch die Verwendung von zwei Tubuslinsen und zwei Kameras in Kombination mit einem dichroitischen Spiegel könnten zwei Farbkanäle parallel aufgenommen werden. Dies würde die Messzeit bei Zwei-Farben-Aufnahmen halbieren.

A Anhang

A.1 Materialliste

In folgenden Tabellen sind alle Komponenten aufgelistet, die in dem entwickelten Lichtscheibenmikroskop verbaut sind. In Tabelle A.1 sind die zur Verfügung stehenden Laser zu finden. Die Tabelle A.2 zeigt die verwendeten optischen Bauelemente im Beleuchtungspfad. Der Tabelle A.3 sind die zur Verfügung stehenden Detektionsobjektive zu entnehmen. Die zur Verfügung stehenden Tubuslinsen sind in Tabelle A.4 aufgelistet. Die vorhandenen Emissionsfilter sind in Tabelle A.5 zu finden. Die Tabelle A.6 beinhaltet alle benutzten Optikmechaniken. In Tabelle A.7 sind alle elektronischen Komponenten aufgelistet und zuletzt sind der Tabelle A.8 die einzelnen Komponenten im Ansteuerungscomputer zu entnehmen.

Bezeichnung	Firma	Wellenlänge	Laserart
LuxXplus 488-100	Omicron	488	Diodenlaser
DPSS 561-100	Coherent	561	diodengepumpter Festkörperlaser
LuxXplus 633-100	Omicron	633	Diodenlaser

Tabelle A.1: Auflistung der Laser, die sich in der Laserbox befinden.

Bezeichnung	Firma	Produktname
20x Strahlaufweiter	Thorlabs	GBE20-A
Strahlteiler	Thorlabs	CCM5-BS016/M
Achromat mit $f = 100$ mm	Thorlabs	
Achromat mit $f = 80$ mm	Thorlabs	
Makroskopobjektiv mit $f = 50$ mm	Leica	

Tabelle A.2: Auflistung der verwendeten Achromate und Objektive für die Beleuchtungseinheit.

Bezeichnung	Firma	NA	Vergrößerung*	Medium
Leica Planapo 1x	Leica	0,1	1x	Luft
Leica Planapo 2x	Leica	0,234	4x	Luft
Leica Planapo 5x	Leica	0,234	4x	Luft
LaVision LVMI-Fluor 4x	LaVision BioTec	0,3	4,44x	Eintauch
LaVision 12x NA 0,53 MI	LaVision BioTec	0,53	12x	Eintauch

Tabelle A.3: Auflistung der verwendeten Detektionsmethode. *Bezogen auf eine Tubuslinse mit einer Brennweite von 200 mm.

Objektivbezeichnung	Brennweite [mm]
AF Micro-Nikkor 200 mm 1:4D IF-ED	200
AF-S VR Micro-Nikkor 105 mm 1:2,8G IF-ED	105
AF-S DX Micro-Nikkor 85 mm 1:3,5G ED VR	85

Tabelle A.4: Auflistung der zur Verfügung stehenden Tubuslinsen.

Bezeichnung	Firma	Produktname
Bandpassfilter	Semrock	525/39 BrightLine HC
Multibandpassfilter	Chroma	ZET 488/561m
Multinotchfilter	Chroma	ZT405/488/561/640rpc

Tabelle A.5: Auflistung der zur Verfügung stehenden Emissionsfilter.

Bezeichnung	Firma	Produktname	Anzahl
optischer Tisch	Newport	M-VIS3648-PG2-325A	1
Spiegel	Thorlabs	BB1-E02	8
Spiegelhalter	Thorlabs	Polaris-K1F2	8
Kollimatorhalter	Thorlabs	Polaris-K1T1	1
Aluminiumsockel	Thorlabs	RS150/M	8
Sockelhalter	Thorlabs	RSHT4/M	8
Klemmgabel	Thorlabs	PF175	8
Aluminiumsockel	Thorlabs	RS150/M	8
Sockelhalter	Thorlabs	UPH150/M	8
Grob-Fein-Trieb	Zeiss	...	1
Groß-Küvette	Hellma	04-033-50-10	1

Tabelle A.6: Auflistung der verwendeten Optikmechaniken und Spiegel.

Bezeichnung	Firma	Produktname	Anzahl
motorisierte Iris	Owis	IBM 65-D0-35-HiDS	1
optischer Chopper	Thorlabs	MC2000B-EC	1
Galvanometer mit 7 mm Spiegel	Scanlab	dynAXIS XS	2
Galvanometer mit 20 mm Spiegel	Scanlab	dynAXIS L	2
USB Datenerfassungsgerät	NI	USB-6353	2
USB-Hub	Manhattan	13 Port USB 2.0-Hub	1
motorisierter Linearversteller	Owis	LTM 80-100-HSM	2
Kontroller für LTM 80-100-HSM	Owis	LTM 80-100-HSM	2
Kontroller für IBM 65-D0-35-HiDS	Owis	PS 10-DC	1
motorisierter Linearversteller	PI	M-112.12S	1
Kontroller für M-112.12S	PI	C-663.11	1
motorisierte Rotationseinheit	Thorlabs	PRM1/MZ8E	1
Kontroller für PRM1/MZ8E	Thorlabs	1	
Cmos Kamera	Hamamatsu	Orca-flash 4.0 v2	1
motorisierter xy-Tisch	ASI	MS-2000	1
motorisierte z-Versteller	ASI	LS-25	2
Kontroller für die ASI KmpONENTEN	ASI	MS-2000-WK	1

Tabelle A.7: Auflistung der motorisierten Komponenten und deren Kontroller.

Bezeichnung	Firma	Artikelbezeichnung	Anzahl
Betriebssystem	Windows	Windows 10 Professional	1
Programmierungsumgebung	NI	LabView 2015 Basic	1
Tower Workstation	Supermicro	743TQ-865B-SQ	1
Mainboard	Supermicro	X10SRI-F	1
DDR4 Arbeitsspeicher	Samsung	ECC Registered DDR4 2133	
Prozessor	Intel	Xeon E5-1630 V3	1
SSD-Festplatte (240 GB)	Samsung	PM843T	2
Raid-Karte	LSI	9271-8i	1
HDD-Festplatte (4 TB)	WD	WD4003FZE	8

Tabelle A.8: Auflistung der Komponenten im Ansteuerungscomputer.

A.2 Verschiedene Fokusfunktionen

Es wurden jeweils für das LaVision 4x und für das LaVision 12x Objektiv zwei Bildstapel aufgenommen, wobei die Position der Probe während der Aufnahme sich nicht änderte. Während der Aufnahme wurde das Detektionsobjektiv nach jedem Bild um die Schrittweite Δf_{DO} bewegt. Am Anfang befindet sich die Lichtscheibe nicht im Fokus des Detektionsobjektivs. Etwa in der Mitte des Bildstapels befindet sich die Lichtscheibe im Fokus. Danach kommt es wieder zu einer Defokussierung. Jeder Bildstapel beinhaltet 400 Bilder. Mit diesem Bildstapel ist es möglich, Fokusfunktionen qualitativ miteinander zu vergleichen.

Für das 4x Objektiv wurde eine Schrittweite Δf_{DO} von $1\ \mu\text{m}$ verwendet. Bei den Messungen mit dem 12x Objektiv wurde eine Schrittweite Δf_{DO} von $0,5\ \mu\text{m}$ gewählt. Alle Aufnahmen wurden mit einer Anregungswellenlänge von $488\ \text{nm}$ durchgeführt. Die verschiedenen Bereiche sind in den Abbildungen A.1 und A.2 abgebildet. Es wurde zum einen ein kontrastarmer Bereich und zum anderen ein kontrastreicher Bereich gewählt. Es ist wichtig, dass die Fokusfunktionen für beide Bereiche ein deutliches Maximum besitzen.

Es wurden insgesamt sechs Fokusfunktionen miteinander verglichen. Jede einzelne Kurve wurde in *OriginPro* mit einer Gauß-Kurve angepasst. Für jede Kurve wurden die Halbwertsbreite und die normierte Höhe h bestimmt. Ein Bindestrich bedeutet ein Nichtvorhandensein einer Fokusfunktionskurve. In den Tabellen A.9, A.10, A.11 und A.12 sind die Werte eingetragen.

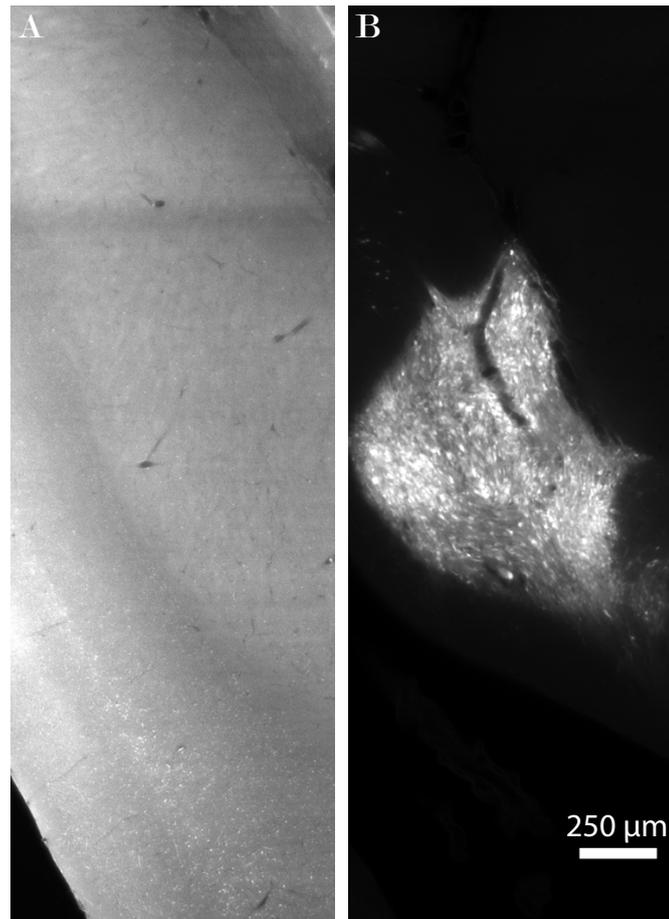


Abbildung A.1: Die Abbildung zeigt die beiden Bereiche, in denen die verschiedenen Fokusfunktionen für das 4x Objektiv getestet wurden.

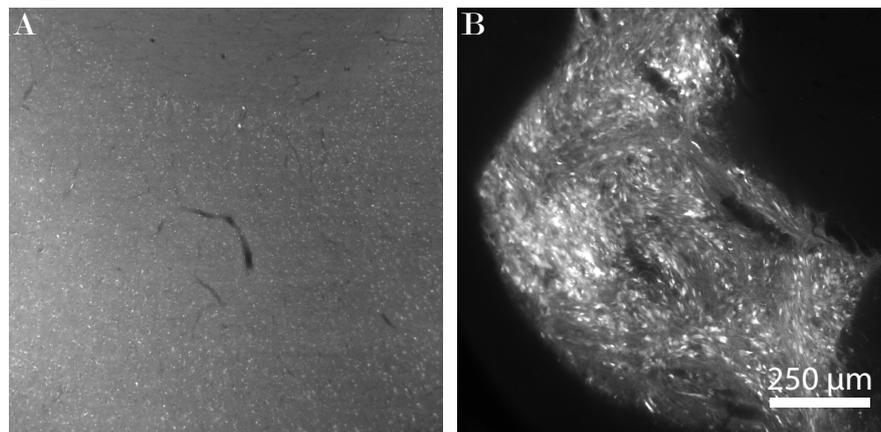


Abbildung A.2: Die Abbildung zeigt die beiden Bereiche, in denen die verschiedenen Fokusfunktionen für das 12x Objektiv getestet wurden.

Fokussfunktion	FWHM [μm]	normierte Höhe h
<i>F4</i> (horizontal)	24,49	0,94
<i>F4</i> (vertikal)	24,65	0,97
<i>F4</i> (symmetrisch)	24,58	0,96
<i>F5</i>	25,56	0,072
Brenner	24,15	0,72
Squared Gradient	22,88	0,42
Tenengrad	31,59	0,53
Intensitätsmittelwert	-	-
Varianz	26,02	0,066
höchster Wert	50,38	0,61

Tabelle A.9: In der Tabelle sind die Halbwertsbreite und die normierte Höhe für verschiedene Fokussfunktionen für einen kontrastreichen Bereich mit dem LaVision 12x Objektiv aufgenommen, aufgelistet. Bild **B** in Abbildung A.2 zeigt den Bereich.

Fokussfunktion	FWHM [μm]	normierte Höhe h
<i>F4</i> (horizontal)	19,76	1,06
<i>F4</i> (vertikal)	19,28	0,7751
<i>F4</i> (symmetrisch)	19,52	0,8975
<i>F5</i>	39,00	0,12
Brenner	18,02	0,25
Squared Gradient	18,32	0,082
Tenengrad	22,61	0,15
Intensitätsmittelwert	-	-
Varianz	38,47	0,11
höchster Wert	33,2	0,57

Tabelle A.10: In der Tabelle sind die Halbwertsbreite und die normierte Höhe für verschiedene Fokussfunktionen für einen kontrastarmen Bereich mit dem LaVision 12x Objektiv aufgenommen, aufgelistet. Bild **A** in Abbildung A.2 zeigt den Bereich.

Fokusfunktion	FWHM [μm]	normierte Höhe h
<i>F4</i> (horizontal)	88,00	0,91
<i>F4</i> (vertikal)	84,74	0,90
<i>F4</i> (symmetrisch)	86,16	0,91
<i>F5</i>	-	-
Brenner	84,10	0,79
Squared Gradient	81,08	0,65
Tenengrad	86,81	0,29
Intensitätsmittelwert	-	-
Varianz	-	-
höchster Wert	102,22	0,39

Tabelle A.11: In der Tabelle sind die Halbwertsbreite und die normierte Höhe für verschiedene Fokusfunktionen für einen kontrastreichen Bereich mit dem LaVision 4x Objektiv aufgenommen, aufgelistet. Bild **B** in Abbildung A.1 zeigt den Bereich.

Fokusfunktion	FWHM [μm]	normierte Höhe h
<i>F4</i> (horizontal)	64,27	0,89
<i>F4</i> (vertikal)	59,26	0,36
<i>F4</i> (symmetrisch)	61,55	0,51
<i>F5</i>	-	-
Brenner	105,60	0,046
Squared Gradient	-	-
Tenengrad	67,48	0,10
Intensitätsmittelwert	-	-
Varianz	-	-
höchster Wert	52,38	0,20

Tabelle A.12: In der Tabelle sind die Halbwertsbreite und die normierte Höhe für verschiedene Fokusfunktionen für einen kontrastarmen Bereich mit dem LaVision 4x Objektiv aufgenommen, aufgelistet. Bild **A** in Abbildung A.2 zeigt den Bereich.

A.3 Zemax

A.3.1 Linsendaten-Editor für die Simulation des Beleuchtungsstrahls

Oberfl: Typ	Kommentar	Radius	Dicke	Glas	Halber Durchm..	
OBJ	Standard	Unendlich	Unendlich		0.00000	
STO	Standard	Unendlich	10.00000		0.35000	
2	Standard	First mechani..	Unendlich	3.00000	12.40000 U	
3	Standard	Input mountin..	Unendlich	10.16000	15.25000 U	
4	Standard		Unendlich	-0.26752	0.35000	
5	Standard		Unendlich	0.00000	0.35000	
6*	Black Box..	BE20-A1.ZBB	<1.60000>		4.00000 U	
7*	Standard		Unendlich	0.26752 F	4.00000 U	
8	Standard	Nominal dista..	Unendlich	239.73764 V	0.37146	
9*	Black Box..	BE20-A2.ZBB	<10.00000>		23.25000 U	
10*	Standard		Unendlich	-0.60000	23.25000 U	
11	Standard	Output mounti..	Unendlich	3.10000	27.95000 U	
12	Standard	Last mechanic..	Unendlich	50.00000	25.40000 U	
13*	Standard		Unendlich	50.00000	25.00000 U	
14	Koordinat..		0.00000	-	0.00000	
15	Koordinat..	Elementkipfung	0.00000	-	0.00000	
16*	Standard		Unendlich	MIRROR	10.00000 U	
17	Koordinat..	Elementkipfung	0.00000	-	0.00000	
18	Koordinat..		0.00000	-	0.00000	
19	Standard		Unendlich	-97.06800	7.12450	
20*	Standard	AC254-100-A	-62.75000	-4.00000	N-BK7	12.70000 U
21*	Standard		45.71000	-2.50000	SF5	12.70000 U
22*	Standard		128.23000	-97.06801		12.70000 U
23	Standard		Unendlich	-0.06112		2.45136
24	Koordinat..		0.00000	-	0.00000	
25*	Standard		Unendlich	0.00000	MIRROR	10.00000 U
26	Koordinat..		0.00000	-	0.00000	
27	Standard		Unendlich	69.63250		2.45574
28*	Standard		247.20000	2.00000	N-SF6HT	25.40000 U
29*	Standard		46.40000	16.00000	N-BAF10	25.40000 U
30*	Standard	AC508-080-A	-54.90000	69.32530		25.40000 U
31	Paraxial		34.00000			5.00000 U
32*	Gradient 1		Unendlich	24.89535		5.00000 U
IMA	Gradient 1		Unendlich	-		1.52603

Abbildung A.3: Die Abbildung zeigt die ersten 6 Spalten des Linsendaten-Editors für die Berechnung der optischen Eigenschaften des Beleuchtungsstrahls.

A.3.2 Linsendaten-Editor für die Simulation von sphärischen Aberrationen

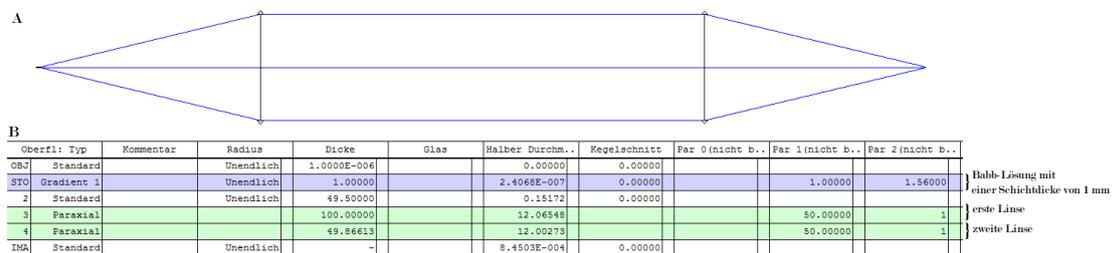


Abbildung A.4: Linsendaten-Editor und das zugehörige Linsen-Layout für die Simulationen in Zemax.

Literaturverzeichnis

- [1] R. M. Power and J. Huisken, “A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging,” *Nature Methods*, vol. 14, no. 4, pp. 360–373, 2017.
- [2] A. H. Voie, D. Burns, and F. Spelman, “Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens,” *Journal of microscopy*, vol. 170, no. 3, pp. 229–236, 1993.
- [3] P. J. Keller, A. D. Schmidt, J. Wittbrodt, and E. H. Stelzer, “Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy,” *Science*, vol. 322, no. 5904, pp. 1065–1069, 2008.
- [4] E. H. Stelzer, “Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology,” *Nature. Methods*, vol. 12, no. 1, pp. 23–26, 2015.
- [5] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. Stelzer, “Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy,” *Science*, vol. 305, no. 5686, pp. 1007–1009, 2004.
- [6] P. A. Santi, “Light sheet fluorescence microscopy: a review,” *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 59, no. 2, pp. 129–138, 2011.
- [7] H.-U. Dodt, U. Leischner, A. Schierloh, N. Jährling, C. P. Mauch, K. Deininger, J. M. Deussing, M. Eder, W. Zieglgänsberger, and K. Becker, “Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain,” *Nature Methods*, vol. 4, no. 4, pp. 331–336, 2007.
- [8] T. Bruns, M. Bauer, S. Bruns, H. Meyer, D. Kubin, and H. Schneckenburger, “Miniaturized modules for light sheet microscopy with low chromatic aberration,” *Journal of Microscopy*, vol. 264, no. 3, pp. 261–267, 2016.
- [9] F. O. Fahrbach, F. F. Voigt, B. Schmid, F. Helmchen, and J. Huisken, “Rapid 3d light-sheet microscopy with a tunable lens,” *Optics Express*, vol. 21, no. 18, pp. 21010–21026, 2013.

-
- [10] J. Doerr, M. K. Schwarz, D. Wiedermann, A. Leinhaas, A. Jakobs, F. Schloen, I. Schwarz, M. Diedenhofen, N. C. Braun, P. Koch, *et al.*, “Whole-brain 3d mapping of human neural transplant innervation,” *Nature Communications*, vol. 8, pp. 1–7, 2017.
- [11] A. A. Mansour, J. T. Gonçalves, C. W. Bloyd, H. Li, S. Fernandes, D. Quang, S. Johnston, S. L. Parylak, X. Jin, and F. H. Gage, “An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids,” *Nature Biotechnology*, vol. 36, no. 5, pp. 432–441, 2018.
- [12] R. A. Barker, J. Drouin-Ouellet, and M. Parmar, “Cell-based therapies for parkinson disease—past insights and future potential,” *Nature Reviews Neurology*, vol. 11, no. 9, pp. 1–12, 2015.
- [13] O. Lindvall, “Clinical translation of stem cell transplantation in parkinson’s disease,” *Journal of Internal Medicine*, vol. 279, no. 1, pp. 30–40, 2016.
- [14] H. Siedentopf and R. Zsigmondy, “Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Golddrüblingläser,” *Annalen der Physik*, vol. 315, no. 1, pp. 1–39, 1902.
- [15] T. Mappes, N. Jahr, A. Csaki, N. Vogler, J. Popp, and W. Fritzsche, “The invention of immersion ultramicroscopy in 1912—the birth of nanotechnology?,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 51, no. 45, pp. 11208–11212, 2012.
- [16] J. Swoger, P. Verveer, K. Greger, J. Huisken, and E. H. Stelzer, “Multi-view image fusion improves resolution in three-dimensional microscopy,” *Optics Express*, vol. 15, no. 13, pp. 8029–8042, 2007.
- [17] K. Chatterjee, F. W. Pratiwi, F. C. M. Wu, P. Chen, and B.-C. Chen, “Recent progress in light sheet microscopy for biological applications,” *Applied Spectroscopy*, vol. 72, no. 8, pp. 1137–1169, 2018.
- [18] F. O. Fahrbach, P. Simon, and A. Rohrbach, “Microscopy with self-reconstructing beams,” *Nature Photonics*, vol. 4, no. 11, pp. 780–785, 2010.
- [19] Z. Bouchal, J. Wagner, and M. Chlup, “Self-reconstruction of a distorted nondiffracting beam,” *Optics Communications*, vol. 151, no. 4-6, pp. 207–211, 1998.
- [20] M. Zhao, H. Zhang, Y. Li, A. Ashok, R. Liang, W. Zhou, and L. Peng, “Cellular imaging of deep organ using two-photon Bessel light-sheet nonlinear structured illumination microscopy,” *Biomedical Optics Express*, vol. 5, no. 5, pp. 1296–1308, 2014.

-
- [21] R. Tomer, K. Khairy, and P. J. Keller, “Shedding light on the system: studying embryonic development with light sheet microscopy,” *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 21, no. 5, pp. 558–565, 2011.
- [22] E. Baumgart and U. Kubitscheck, “Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection,” *Optics Express*, vol. 20, no. 19, pp. 21805–21814, 2012.
- [23] P. Zhang, M. Phipps, P. Goodwin, and J. Werner, “Confocal line scanning of a Bessel beam for fast 3d imaging,” *Optics Letters*, vol. 39, no. 12, pp. 3682–3685, 2014.
- [24] T. A. Planchon, L. Gao, D. E. Milkie, M. W. Davidson, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, and E. Betzig, “Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination,” *Nature Methods*, vol. 8, no. 5, pp. 417–423, 2011.
- [25] P. J. Keller, A. D. Schmidt, A. Santella, K. Khairy, Z. Bao, J. Wittbrodt, and E. H. Stelzer, “Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy,” *Nature Methods*, vol. 7, no. 8, pp. 637–642, 2010.
- [26] L. Gao, L. Shao, B.-C. Chen, and E. Betzig, “3d live fluorescence imaging of cellular dynamics using Bessel beam plane illumination microscopy,” *Nature Protocols*, vol. 9, no. 5, pp. 1083–1101, 2014.
- [27] J. Broky, G. A. Siviloglou, A. Dogariu, and D. N. Christodoulides, “Self-healing properties of optical Airy beams,” *Optics Express*, vol. 16, no. 17, pp. 12880–12891, 2008.
- [28] T. Vettenburg, H. I. Dalgarno, J. Nylk, C. Coll-Lladó, D. E. Ferrier, T. Čížmár, F. J. Gunn-Moore, and K. Dholakia, “Light-sheet microscopy using an airy beam,” *Nature Methods*, vol. 11, no. 5, pp. 541–544, 2014.
- [29] T. V. Truong, W. Supatto, D. S. Koos, J. M. Choi, and S. E. Fraser, “Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy,” *Nature Methods*, vol. 8, no. 9, pp. 757–760, 2011.
- [30] J. Andilla, R. Jorand, O. E. Olarte, A. C. Dufour, M. Cazales, Y. L. Montagner, R. Ceolato, N. Riviere, J.-C. Olivo-Marin, P. Loza-Alvarez, *et al.*, “Imaging tissue-mimic with light sheet microscopy: A comparative guideline,” *Scientific reports*, vol. 7, pp. 1–7, 2017.

- [31] F. O. Fahrbach, V. Gurchenkov, K. Alessandri, P. Nassoy, and A. Rohrbach, “Light-sheet microscopy in thick media using scanned Bessel beams and two-photon fluorescence excitation,” *Optics Express*, vol. 21, no. 11, pp. 13824–13839, 2013.
- [32] A. Kumar, Y. Wu, R. Christensen, P. Chandris, W. Gandler, E. McCreedy, A. Bokinsky, D. A. Colón-Ramos, Z. Bao, M. McAuliffe, *et al.*, “Dual-view plane illumination microscopy for rapid and spatially isotropic imaging,” *Nature Protocols*, vol. 9, no. 11, pp. 2555–2573, 2014.
- [33] Y. Wu, P. Wawrzusin, J. Senseney, R. S. Fischer, R. Christensen, A. Santella, A. G. York, P. W. Winter, C. M. Waterman, Z. Bao, *et al.*, “Spatially isotropic four-dimensional imaging with dual-view plane illumination microscopy,” *Nature Biotechnology*, vol. 31, no. 11, pp. 1032–1038, 2013.
- [34] R. K. Chhetri, F. Amat, Y. Wan, B. Höckendorf, W. C. Lemon, and P. J. Keller, “Whole-animal functional and developmental imaging with isotropic spatial resolution,” *Nature Methods*, vol. 12, no. 12, pp. 1171–1178, 2015.
- [35] D. S. Richardson and J. W. Lichtman, “Clarifying tissue clearing,” *Cell*, vol. 162, no. 2, pp. 246–257, 2015.
- [36] P. G. Pitrone, J. Schindelin, L. Stuyvenberg, S. Preibisch, M. Weber, K. W. Eliceiri, J. Huisken, and P. Tomancak, “OpenSPIM: an open-access light-sheet microscopy platform,” *Nature Methods*, vol. 10, no. 7, pp. 598–599, 2013.
- [37] E. G. Reynaud, J. Peychl, J. Huisken, and P. Tomancak, “Guide to light-sheet microscopy for adventurous biologists,” *Nature Methods*, vol. 12, no. 1, pp. 30–34, 2014.
- [38] K. Becker, N. Jährling, E. Kramer, F. Schnorrer, and H.-U. Dodt, “Ultramicroscopy: 3d reconstruction of large microscopical specimens,” *Journal of Biophotonics*, vol. 1, no. 1, pp. 36–42, 2008.
- [39] K. Becker, N. Jährling, S. Saghafi, and H.-U. Dodt, “Ultramicroscopy: light-sheet-based microscopy for imaging centimeter-sized objects with micrometer resolution,” *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2013, no. 8, pp. 704–713, 2013.
- [40] H.-U. Dodt, S. Saghafi, K. Becker, N. Jährling, A. Niendorf, C. Hahn, M. Pende, and M. Wanis, “Ultramicroscopy: development and outlook,” *Neurophotonics*, vol. 2, no. 4, pp. 1–8, 2015.
- [41] I. Powell, “Linear deiverging lens,” May 2 1989. US Patent 4,826,299.

- [42] M. Pende, K. Becker, M. Wanis, S. Saghafi, R. Kaur, C. Hahn, N. Pende, M. Foroughipour, T. Hummel, and H.-U. Dodt, “High-resolution ultramicroscopy of the developing and adult nervous system in optically cleared drosophila melanogaster,” *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, 2018.
- [43] M. Aswendt, M. Schwarz, W. M. Abdelmoula, J. Dijkstra, and S. Dedeurwaerdere, “Whole-brain microscopy meets in vivo neuroimaging: techniques, benefits, and limitations,” *Molecular Imaging and Biology*, vol. 19, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [44] A. Azaripour, T. Lagerweij, C. Scharfbillig, A. E. Jadczyk, B. Willershausen, and C. J. Van Noorden, “A survey of clearing techniques for 3d imaging of tissues with special reference to connective tissue,” *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 51, no. 2, pp. 9–23, 2016.
- [45] A. Ertürk and F. Bradke, “High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO),” *Experimental Neurology*, vol. 242, pp. 57–64, 2013.
- [46] W. Spalteholz, “Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten nebst Anhang über Knochenfärbung. 2. erw,” *Aufl. S Hirzel, Leipzig*, 1911.
- [47] M. K. Schwarz, A. Scherbarth, R. Sprengel, J. Engelhardt, P. Theer, and G. Giese, “Fluorescent-protein stabilization and high-resolution imaging of cleared, intact mouse brains,” *PloS one*, vol. 10, no. 5, pp. 1–26, 2015.
- [48] M. Stefaniuk, E. J. Gualda, M. Pawlowska, D. Legutko, P. Matryba, P. Koza, W. Konopka, D. Owczarek, M. Wawrzyniak, P. Loza-Alvarez, *et al.*, “Light-sheet microscopy imaging of a whole cleared rat brain with thyl-gfp transgene,” *Scientific Reports*, vol. 6, pp. 1–9, 2016.
- [49] A. Ertürk, K. Becker, N. Jährling, C. P. Mauch, C. D. Hojer, J. G. Egen, F. Hellal, F. Bradke, M. Sheng, and H.-U. Dodt, “Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO,” *Nature Protocols*, vol. 7, no. 11, pp. 1983–1995, 2012.
- [50] P. Ariel, “A beginner’s guide to tissue clearing,” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 84, pp. 35–39, 2017.
- [51] C. Pan, R. Cai, F. P. Quacquarelli, A. Ghasemigharagoz, A. Lourbopoulos, P. Matryba, N. Plesnila, M. Dichgans, F. Hellal, and A. Ertürk, “Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using udisco,” *Nature Methods*, vol. 13, no. 10, pp. 859–867, 2016.

- [52] E. A. Susaki, K. Tainaka, D. Perrin, H. Yukinaga, A. Kuno, and H. R. Ueda, “Advanced cubic protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging,” *Nature Protocols*, vol. 10, no. 11, pp. 1709–1727, 2015.
- [53] H. Hama, H. Hioki, K. Namiki, T. Hoshida, H. Kurokawa, F. Ishidate, T. Kaneko, T. Akagi, T. Saito, T. Saido, *et al.*, “Scales: an optical clearing palette for biological imaging,” *Nature Neuroscience*, vol. 18, no. 10, pp. 1518–1529, 2015.
- [54] R. Tomer, L. Ye, B. Hsueh, and K. Deisseroth, “Advanced clarity for rapid and high-resolution imaging of intact tissues,” *Nature Protocols*, vol. 9, no. 7, pp. 1682–1697, 2014.
- [55] L. Silvestri, L. Sacconi, and F. Pavone, “Correcting spherical aberrations in confocal light sheet microscopy: a theoretical study,” *Microscopy Research and Technique*, vol. 77, no. 7, pp. 483–491, 2014.
- [56] M. J. Booth and T. Wilson, “Refractive-index-mismatch induced aberrations in single-photon and two-photon microscopy and the use of aberration correction,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 6, no. 3, pp. 266–273, 2001.
- [57] E. Baumgart, *Konfokale Lichtscheiben-Fluoreszenzmikroskopie*. PhD thesis, Universitäts- und Landesbibliothek Bonn, 2014.
- [58] M. J. Booth, M. A. Neil, and T. Wilson, “Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media,” *Journal of Microscopy*, vol. 192, no. 2, pp. 90–98, 1998.
- [59] E. Hecht, *Optik*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2018.
- [60] P. Török, P. Varga, and G. Németh, “Analytical solution of the diffraction integrals and interpretation of wave-front distortion when light is focused through a planar interface between materials of mismatched refractive indices,” *JOSA A*, vol. 12, no. 12, pp. 2660–2671, 1995.
- [61] G. K. Lang, *Augenheilkunde*. Georg Thieme Verlag, 2014.
- [62] J. G. Ritter, R. Veith, J.-P. Siebrasse, and U. Kubitscheck, “High-contrast single-particle tracking by selective focal plane illumination microscopy,” *Optics Express*, vol. 16, no. 10, pp. 7142–7152, 2008.
- [63] U. Kubitscheck, *Fluorescence microscopy: from principles to biological applications*. John Wiley & Sons, 2017.

-
- [64] E. Fuchs, J. S. Jaffe, R. A. Long, and F. Azam, “Thin laser light sheet microscope for microbial oceanography,” *Optics express*, vol. 10, no. 2, pp. 145–154, 2002.
- [65] Q. Li, L. Bai, S. Xue, and L. Chen, “Autofocus system for microscope,” *Optical Engineering*, vol. 41, no. 6, pp. 1289–1295, 2002.
- [66] K. Guo, J. Liao, Z. Bian, X. Heng, and G. Zheng, “InstantScope: a low-cost whole slide imaging system with instant focal plane detection,” *Biomedical Optics Express*, vol. 6, no. 9, pp. 3210–3216, 2015.
- [67] H. Mir, P. Xu, and P. Van Beek, “An extensive empirical evaluation of focus measures for digital photography,” *Digital Photography X*, vol. 9023, pp. 1–11, 2014.
- [68] D. E. Ferguson, “Fibonacci searching,” *Communications of the ACM*, vol. 3, no. 12, p. 648, 1960.
- [69] T. Yeo, S. Ong, R. Sinniah, *et al.*, “Autofocusing for tissue microscopy,” *Image and Vision Computing*, vol. 11, no. 10, pp. 629–639, 1993.
- [70] L. A. Royer, W. C. Lemon, R. K. Chhetri, Y. Wan, M. Coleman, E. W. Myers, and P. J. Keller, “Adaptive light-sheet microscopy for long-term, high-resolution imaging in living organisms,” *Nature Biotechnology*, vol. 34, no. 12, pp. 1–12, 2016.
- [71] L. A. Royer, W. C. Lemon, R. K. Chhetri, and P. J. Keller, “A practical guide to adaptive light-sheet microscopy,” *Nature Protocols*, vol. 13, no. 11, pp. 2462–2500, 2018.
- [72] L. A. Royer, W. C. Lemon, R. K. Chhetri, Y. Wan, M. Coleman, E. W. Myers, and P. J. Keller, “Adaptive light-sheet microscopy for long-term, high-resolution imaging in living organisms - supplementary information,” *Nature Biotechnology*, vol. 34, no. 12, pp. 1–12, 2016.
- [73] Y. Sun, S. Duthaler, and B. J. Nelson, “Autofocusing algorithm selection in computer microscopy,” in *2005 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*, pp. 70–76, IEEE, 2005.
- [74] F. C. Groen, I. T. Young, and G. Ligthart, “A comparison of different focus functions for use in autofocus algorithms,” *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, vol. 6, no. 2, pp. 81–91, 1985.

- [75] Y. Sun, S. Duthaler, and B. J. Nelson, "Autofocusing in computer microscopy: selecting the optimal focus algorithm," *Microscopy Research and Technique*, vol. 65, no. 3, pp. 139–149, 2004.
- [76] J. F. Brenner, B. S. Dew, J. B. Horton, T. King, P. W. Neurath, and W. D. Selles, "An automated microscope for cytologic research a preliminary evaluation.," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 24, no. 1, pp. 100–111, 1976.
- [77] D. Vollath, "Automatic focusing by correlative methods," *Journal of Microscopy*, vol. 147, no. 3, pp. 279–288, 1987.
- [78] D. Vollath, "The influence of the scene parameters and of noise on the behaviour of automatic focusing algorithms," *Journal of Microscopy*, vol. 151, no. 2, pp. 133–146, 1988.
- [79] A. Santos, C. Ortiz de Solórzano, J. J. Vaquero, J. Pena, N. Malpica, and F. Del Pozo, "Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis," *Journal of Microscopy*, vol. 188, no. 3, pp. 264–272, 1997.
- [80] M. Kristan, J. Perš, M. Perše, and S. Kovačič, "A bayes-spectral-entropy-based measure of camera focus using a discrete cosine transform," *Pattern Recognition Letters*, vol. 27, no. 13, pp. 1431–1439, 2006.
- [81] J. Huisken and D. Y. Stainier, "Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM)," *Optics Letters*, vol. 32, no. 17, pp. 2608–2610, 2007.
- [82] J. Fehrenbach, P. Weiss, and C. Lorenzo, "Variational algorithms to remove stationary noise: applications to microscopy imaging," *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 21, no. 10, pp. 4420–4430, 2012.
- [83] X. Liang, Y. Zang, D. Dong, L. Zhang, M. Fang, X. Yang, A. Arranz, J. Ripoll, H. Hui, and J. Tian, "Stripe artifact elimination based on nonsubsampled contourlet transform for light sheet fluorescence microscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 21, no. 10, pp. 1–9, 2016.
- [84] J. Eichler, L. Dünkel, and B. Eppich, "Die Strahlqualitaet von Lasern—Wie bestimmt man Beugungsmasszahl und Strahldurchmesser in der Praxis?," *Laser Technik Journal*, vol. 1, no. 2, pp. 63–66, 2004.

-
- [85] M. C. Müllenbroich, L. Silvestri, L. Onofri, I. Costantini, M. van't Hoff, L. Sacconi, G. Iannello, and F. S. Pavone, "Comprehensive optical and data management infrastructure for high-throughput light-sheet microscopy of whole mouse brains," *Neurophotonics*, vol. 2, no. 4, pp. 1–13, 2015.
- [86] H. Kogelnik and T. Li, "Laser beams and resonators," *Applied Optics*, vol. 5, no. 10, pp. 1550–1567, 1966.
- [87] S. A. Self, "Focusing of spherical Gaussian beams," *Applied Optics*, vol. 22, no. 5, pp. 658–661, 1983.
- [88] L. Silvestri, A. Bria, L. Sacconi, G. Iannello, and F. Pavone, "Confocal light sheet microscopy: micron-scale neuroanatomy of the entire mouse brain," *Optics Express*, vol. 20, no. 18, pp. 20582–20598, 2012.
- [89] O. E. Olarte, J. Andilla, E. J. Gualda, and P. Loza-Alvarez, "Light-sheet microscopy: a tutorial," *Advances in Optics and Photonics*, vol. 10, no. 1, pp. 111–179, 2018.
- [90] G. Hübner, *Stochastik: eine anwendungsorientierte Einführung für Informatiker, Ingenieure und Mathematiker*. Springer-Verlag, 2013.
- [91] M. S. Uddin, H. K. Lee, S. Preibisch, and P. Tomancak, "Restoration of uneven illumination in light sheet microscopy images," *Microscopy and Microanalysis*, vol. 17, no. 4, pp. 607–613, 2011.
- [92] H. G. Pfeiffer and H. A. Liebhafsky, "The origins of beer's law," *Journal of Chemical Education*, vol. 28, no. 3, pp. 123–125, 1951.
- [93] A. Falk, P. Koch, J. Kesavan, Y. Takashima, J. Ladewig, M. Alexander, O. Wischow, J. Tailor, M. Trotter, S. Pollard, *et al.*, "Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons," *PloS one*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2012.
- [94] I. R. Wickersham, D. C. Lyon, R. J. Barnard, T. Mori, S. Finke, K.-K. Conzelmann, J. A. Young, and E. M. Callaway, "Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons," *Neuron*, vol. 53, no. 5, pp. 1–16, 2007.
- [95] I. R. Wickersham, S. Finke, K.-K. Conzelmann, and E. M. Callaway, "Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus," *Nature Methods*, vol. 4, no. 1, pp. 47–49, 2007.

- [96] J. A. Steinbeck, P. Koch, A. Derouiche, and O. Brüstle, “Human embryonic stem cell-derived neurons establish region-specific, long-range projections in the adult brain,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 69, no. 3, pp. 461–470, 2012.
- [97] A. Ault, *Techniques and experiments for organic chemistry*. University Science Books, 1998.
- [98] C. Müllenbroich, L. Silvestri, L. Turrini, T. Alterini, A. P. Di Giovanna, I. Costantini, A. Gheisari, F. Vanzi, L. Sacconi, and F. S. Pavone, “Increasing sensitivity and accuracy of brain-wide quantitative studies in light-sheet microscopy,” *BioRxiv*, pp. 1–29, 2017.
- [99] S. Kalchmair, N. Jährling, K. Becker, and H.-U. Dodt, “Image contrast enhancement in confocal ultramicroscopy,” *Optics Letters*, vol. 35, no. 1, pp. 79–81, 2010.
- [100] J. Mertz and J. Kim, “Scanning light-sheet microscopy in the whole mouse brain with HiLo background rejection,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, no. 1, pp. 1–7, 2010.
- [101] D. Bhattacharya, V. R. Singh, C. Zhi, P. T. So, P. Matsudaira, and G. Barbastathis, “Three dimensional hilo-based structured illumination for a digital scanned laser sheet microscopy (dslm) in thick tissue imaging,” *Optics Express*, vol. 20, no. 25, pp. 27337–27347, 2012.
- [102] K. M. Dean, P. Roudot, E. S. Welf, G. Danuser, and R. Fiolka, “Deconvolution-free subcellular imaging with axially swept light sheet microscopy,” *Biophysical Journal*, vol. 108, no. 12, pp. 2807–2815, 2015.
- [103] A. K. Chmielewski, A. Kyrsting, P. Mahou, M. T. Wayland, L. Muresan, J. F. Evers, and C. F. Kaminski, “Fast imaging of live organisms with sculpted light sheets,” *Scientific Reports*, vol. 5, pp. 1–9, 2015.
- [104] R. M. Power and J. Huisken, “Adaptable, illumination patterning light sheet microscopy,” *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2018.
- [105] Y.-K. Fuh, J.-K. Chen, and P.-W. Chen, “Characterization of electrically tunable liquid lens and adaptive optics for aberration correction,” *Optik*, vol. 126, no. 24, pp. 5456–5459, 2015.
- [106] C. Bourgenot, C. D. Saunter, J. M. Taylor, J. M. Girkin, and G. D. Love, “3d adaptive optics in a light sheet microscope,” *Optics Express*, vol. 20, no. 12, pp. 13252–13261, 2012.

-
- [107] A. Hubert, F. Harms, R. Juvénal, P. Treimany, X. Levecq, V. Loriette, G. Farkouh, F. Rouyer, and A. Fragola, “Adaptive optics light-sheet microscopy based on direct wavefront sensing without any guide star,” *Optics Letters*, vol. 44, no. 10, pp. 2514–2517, 2019.
- [108] K. Wang, D. E. Milkie, A. Saxena, P. Engerer, T. Misgeld, M. E. Bronner, J. Mumm, and E. Betzig, “Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes,” *Nature Methods*, vol. 11, no. 6, pp. 625–628, 2014.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Prinzip der Lichtscheibenmikroskopie	2
1.2	Lichtblatterzeugung durch schnelles Scannen	3
1.3	Suchergebnisse zwischen 2004 und 2018	7
1.4	Änderung des Brechungsindex an einer Grenzfläche	12
1.5	Differenz der optischen Weglängen	13
1.6	Die ersten vier relevanten Zernike-Polynome	15
1.7	Verdeutlichung des Rayleigh-Kriteriums	18
2.1	Vorteil eines schwenkbaren Lichtblattes	24
2.2	Verschiebung der Strahlteile bei der Bewegung der Küvette	25
2.3	Aufsicht des Strahlengangs	26
2.4	Die drei möglichen Positionen des optischen Choppers	27
2.5	Seitenansicht der Detektionseinheit	28
2.6	Aufsicht auf das Mikroskop	31
2.7	3D-Ansicht der Detektionseinheit	33
2.8	3D-Ansicht der Probenhalterung	34
2.9	Ansteuerung des Mikroskops	36
2.10	$F4$ -Funktion in Abhängigkeit von der Position des Detektionsobjektivs .	37
2.11	Prinzip der Fokusstabilisierung	39
2.12	Realisierung der Fokusstabilisierung in der Software	40
3.1	Darstellung des axialen Verlaufs eines Gauß-Strahls	42
3.2	Fokussierung eines Gauß-Strahls	43
3.3	Gauß-Strahl am Linsensystem	44
3.4	Einfluss des Galvanometers 1	45
3.5	Einfluss des Galvanometers 2	46
3.6	Layout der <i>Zemax</i> -Simulation	47
3.7	Punktogramme bei unterschiedlichen Auslenkungen	48
3.8	Verschiebung der Strahlteile	48
3.9	Verschiebung des Brennpunktes durch die Strahlauslenkung	49
3.10	Strahlprofil vor und hinter der Blende	50
3.11	Koeffizienten der 1., 2. und 3. sphärischen Ordnung in Abhängigkeit zur NA	51
3.12	Strehl-Zahl in Abhängigkeit von der NFP	52

3.13 Laterale PSF eines Objektivs mit einer NA von 0,234	53
3.14 Laterale PSF eines Objektivs mit einer NA von 0,5	53
3.15 Axiale PSF eines Objektivs mit einer NA von 0,234	54
3.16 Axiale PSF eines Objektivs mit einer NA von 0,5	55
3.17 Totale axiale PSF bei verschiedenen Strahlbreiten bei einer NA von 0,234	56
3.18 Totale axiale PSF bei verschiedenen Strahlbreiten bei einer NA von 0,5	56
3.19 Verdeutlichung der Berechnung	57
4.1 Axiales Intensitätsprofil des Laserstrahls	59
4.2 Axiales Intensitätsprofil des Laserstrahls in Abhängigkeit von der Blendeinstellung	60
4.3 Auswirkung der Blende auf den Beleuchtungsstrahl	61
4.4 Auslenkung des Beleuchtungsstrahls	61
4.5 Strahltaillenradius und Strahltaillenposition in Abhängigkeit von der Auslenkung	62
4.6 Schwenkung des Beleuchtungsstrahls	63
4.7 Axiale Strahlprofile bei verschiedenen Wellenlängen	63
4.8 Foto des Phantoms	65
4.9 Airy-Scheibe und Bildpunkte	66
4.10 Airy-Scheibe und Normalverteilung	67
4.11 Abhängigkeit der angepassten Halbwertsbreite von der Position der Airy-Scheibe	68
4.12 Standardabweichung in Abhängigkeit von der Bildpunktgröße	69
4.13 Angepasste Halbwertsbreiten in Abhängigkeit von der Bildpunktgröße .	69
4.14 Messung der lateralen Halbwertsbreite	71
4.15 Axiale Halbwertsbreite entlang der x-Richtung	72
4.16 Vergleich zwischen dem Leica 2x- und dem LaVision 4x Objektiv	74
4.17 Vergleich zwischen dem Leica 5x- und dem LaVision 12x Objektiv . . .	75
4.18 Axiale Halbwertsbreite in Abhängigkeit von der y-Position	76
4.19 Vergleich zwischen dem Leica 2x- und dem LaVision 4x Objektiv	77
4.20 Vergleich zwischen dem Leica 5x- und dem LaVision 12x Objektiv . . .	77
4.21 Vergleich zwischen dem LaVision 4x- und dem LaVision 12x Objektiv. .	78
4.22 Normierten Werte von verschiedenen Fokusfunktionen	80
4.23 Fokusstabilisierung mit unterschiedlichen Schrittweiten	82
4.24 Histogramme mit der Position des 4x Detektionsobjektivs	82
4.25 Bilder aus dem Bildstapel aufgenommen mit dem 4x Objektiv	83
4.26 Fokusstabilisierung mit unterschiedlichen Schrittweiten	84
4.27 Histogramme mit der Position des 12x Detektionsobjektivs	85
4.28 Bilder aus dem Bildstapel aufgenommen mit dem 12x Objektiv	85
4.29 Vergleich mit und ohne Fokusstabilisierung beim 4x Objektiv	87
4.30 Vergleich mit und ohne Fokusstabilisierung beim 12x Objektiv	88
4.31 Unterschiedliche Defokussierungen des 4x Detektionsobjektivs	90

4.32	Unterschiedliche Defokussierungen des 12x Detektionsobjektivs	90
5.1	Zusammenfügen einzelner Bildstapel	91
5.2	Intensitätskorrektur	93
5.3	Maximumintensitätsprojektion eines ganzen Maushirns	96
5.4	Transversale und sagittale Ansicht vom Transplantationsgehirn	97
5.5	Transversale und sagittale Ansicht mit dem LaVision 12x Objektiv . . .	98
5.6	Histogramme mit der Position des LaVision 4x Detektionsobjektivs . . .	99
5.7	Histogramme mit der Position des LaVision 12x Detektionsobjektivs . .	100
6.1	Abhängigkeit des Brechungsindex der BABB-Lösung von der Temperatur	105
6.2	Profil von einem Bessel-Strahl bzw. Gauß-Strahl	106
6.3	Messung mit einem Bessel-Strahl bzw. Gauß-Strahl	107
A.1	Bereiche zum Testen der Fokusfunktionen für das 4x Objektiv	119
A.2	Bereiche zum Testen der Fokusfunktionen für das 12x Objektiv	119
A.3	Linsendaten-Editor	122
A.4	Linsendaten-Editor und das zugehörige Linsen-Layout für die Simulationen in Zemax.	122

Tabellenverzeichnis

1.1	Die ersten vier relevanten geraden Zernike-Polynome	14
1.2	Fokusfunktionen, die auf Gradienten beruhen	20
1.3	Fokusfunktionen, die auf Korrelationen beruhen	20
1.4	Fokusfunktionen, die auf einen statistischen Ansatz beruhen	21
2.1	Die drei vorhandenen Laser	29
2.2	Daten der Detektionsobjektive	32
3.1	Theoretische berechnete Tailenradien mit einer vorhandenen Blende . .	49
4.1	Strahltaillenradius und die Verschiebung der Strahltaile bei verschiede- nen Anregungswellenlängen	64
4.2	Gemessene und theoretische laterale Halbwertsbreite	71
4.3	Gemessene und theoretische axiale Halbwertsbreite	73
4.4	Ranking über die getesteten Fokusfunktionen	80
4.5	Vergleich mit und ohne Fokusstabilisierung	89
6.1	Linsen beim Heidelberger Lichtscheibenmikroskop	111
A.1	Laser in der Laserbox	115
A.2	Achromate und Beleuchtungsobjektive	115
A.3	Detektionsobjektive	116
A.4	Tubuslinsen	116
A.5	Emissionsfilter	116
A.6	Optikmechaniken und Spiegel	116
A.7	Motorisierte Komponenten	117
A.8	Komponenten im Computer	117
A.9	Auswertung der Fokusfunktionen für einen kontrastreichen Bereich . . .	120
A.10	Auswertung der Fokusfunktionen für einen kontrastarmen Bereich . . .	120
A.11	Auswertung der Fokusfunktionen für einen kontrastreichen Bereich . . .	121
A.12	Auswertung der Fokusfunktionen für einen kontrastarmen Bereich . . .	121

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Abkürzungen

3DISCO	3D imaging of solvent-cleared organs
ACT	active clarity technique
AFP	aktuelle Fokusposition
BABB	Lösung aus Benzylalkohol und Benzoesäurebenzylester
CUBIC	clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational analysis
DAQ	data acquisition
diSPIM	dual-view inverted selective plane illumination microscope
GFP	green fluorescent protein
NA	numerische Apertur
NAS	network attached storage
NFP	nominale Fokusposition
OPFOS	orthogonal-plane fluorescence optical sectioning
PACT	passive clarity technique
PSF	Punktspreizfunktion
RITC	Rhodaminisothiocyana
sCMOS	scientific Complementary metal-oxide-semiconductor
SPIM	selective plane illumination microscopy

Symbole

α	halber Öffnungswinkel des Detektionsobjektivs
α_1, α_2	Einfallswinkel und Winkel des gebrochenen Strahls
γ	Korrektur um die Verschiebung Δd zu kompensieren
η	Brechungsindex des Mediums
λ	Wellenlänge
σ	Standardabweichung
ϕ	Schwenkung der Lichtscheiben um den Winkel ϕ
$\Psi(p, NFP)$	Aberrationfunktion
φ	Divergenzwinkel
$\omega, \omega_0, \omega_1, \omega_2, \omega_3$	Tailenradien

ω_{Iris}	Strahlradius nach der Iris
ω_{Zemax}	Strahltaile von <i>Zemax</i> -Berechnungen
$A_{n,0}$	Vorfaktor des Zernike-Polynoms
$B_n(\alpha)$	Faktor zum Berechnen von $A_{n,0}$
b_1, b_2 und b_3	Auslenkungen des Strahls durch den Galvanometer 1
Δd	verschiebung des Brennpunktes
D [mm]	Irisöffnung in mm angegeben
$d_{\text{FWHM,xy}}$	laterale Halbwertsbreite
d_2	Auslenkung des Strahls durch den Galvanometer 2
$d_{\text{FWHM,z}}$	axiale Halbwertsbreite
d_M	Bildpunktgröße
d_{Rayleigh}	laterale Auflösung unter dem Rayleigh-Kriterium
d_{ST}	Schärfentiefe
$d_{\text{xy,G}}$	theoretische laterale Halbwertsbreite mit Berücksichtigung von d_M
$d_{\text{xy,G}}$	gemessene laterale Halbwertsbreite
$d_{\text{xy,theo}}$	theoretische laterale Halbwertsbreite
e	Zellengröße des Bildsensors
f	Brennweite
f_1, f_2, f_3	Brennweiten einzelner Bauelemente im Mikroskop
$F4$	$F4$ -Fokusfunktionswert
f_{DO}	Position des Detektionsobjektivs
Δf_{DO}	Schrittweite bei der Fokusstabilisierung
$I_{\text{Abb.}}$	Abbildungspunktspreizfunktion
$I_{\text{Bel.}}$	Beleuchtungspunktspreizfunktion
I_{res}	resultierendes Bild bei einer strukturierten Beleuchtung
I_{total}	totale Punktspreizfunktion
$I_{0^\circ}, I_{120^\circ}$ und I_{240°	Bild mit einer sinusförmigen Intensitätsmodulation
$J_0(x)$	Bessel-Funktion erster Gattung, 0. Ordnung
$J_1(x)$	Bessel-Funktion erster Gattung, 1. Ordnung
L	optische Weglänge
l_1 und l_2	Wegstrecken
M	optische Vergrößerung
M^2	Beugungsmaßzahl
$P(p, NFP)$	Pupillenfunktion
r	Radialkoordinate
S_N	Summe der einzelnen Bildpunktwerte von Bild_N
u	axiale optische Einheit
v	laterale optische Einheit
V_1 bzw. V_2	angelegte Spannungen an Galvanometer 1 bzw. Galvanometer 2
$\Delta x_{\text{Küvette}}$	Verschiebung der Küvette
x, y und z	Raumkoordinaten
Δx_{BO}	notwendige Verschiebung des Beleuchtungsobjektivs
$Z_n^m(p, \phi)$	Zernike-Polynom
z_R	Rayleighlänge

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten vier Jahren unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich herzlichst bei Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck bedanken. Ich möchte mich für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe bedanken und die konstruktiven Gespräche.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Rudolf Merkel für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Prof. Dr. Arne Lützen danke ich für die Bereitschaft als fachnahes Mitglied der Promotionskommission anzugehören.

Prof. Dr. Benjamin Odermatt danke ich für die Bereitschaft als fachfremdes Mitglied der Promotionskommission anzugehören.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Oliver Brüstle für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein großer Dank geht an Dr. Jonas Doerr, Anke Leinhaas, Alexandra Rabe und Dr. Martin K. Schwarz für die freundliche Zusammenarbeit. Bei den Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt bedanke ich mich für das Herstellen verschiedener Komponenten für das Mikroskop. Ein großer Dank geht an den Werkstattleiter Herrn Königshoven für seine vielen guten Ideen.

Den Mitarbeitern der elektronischen Werkstatt möchte ich für ihre kompetente Hilfe danken.

Ich möchte mich bei Knut Hintzen für die schnelle und kompetente Hilfe bei IT-Problemen bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Support-Mitarbeitern von allen Firmen für deren Hilfe bei technischen Fragen oder Problemen.

Ein ganz großes Dankeschön geht an alle aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Biophysikalische Chemie.

Ich möchte mich bei Alexander Harder bedanken, mit dem ich die letzten vier Jahre das Büro geteilt habe.

Für das konstruktive Korrekturlesen bedanke ich mich bei Jana Bürgers, Alexander Harder, meiner Mutter Sigrid Schloen und meiner Schwester Gesa Schloen.

Am Ende möchte ich mich gerne bei meiner Schwester und bei meinen Eltern bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Bonn, 12. Februar 2020

Florian Schloen