

# **Optimierung und Charakterisierung eines Zwei-Photonen-Besselstrahl- Lichtscheibenmikroskops**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Alexander Harder**

aus Bonn

Bonn, August 2020



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

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck

2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel

Tag der Promotion: 19.01.2021

Erscheinungsjahr: 2021



# Inhaltsverzeichnis

## Zusammenfassung

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Der Zebrafisch (Zebrafisch) als Modellorganismus . . . . .	1
1.2. Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie (LSFM) . . . . .	3
1.2.1. Fluoreszenz . . . . .	6
1.2.2. Beleuchtungsarten in der Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie . . . . .	8
1.3. Abbildungsqualität in der Mikroskopie . . . . .	12
1.3.1. Auflösung . . . . .	12
1.3.2. Bildkontrast . . . . .	13
<b>2. Aufbau des Mikroskops</b>	<b>15</b>
2.1. Probenhalter . . . . .	16
2.2. Beleuchtungsstrahlengang . . . . .	16
2.3. Detektion . . . . .	20
2.3.1. Konfokale Detektion mit einem virtuellen Schlitz . . . . .	21
2.4. Ansteuerung der Komponenten . . . . .	22
<b>3. Kontrollsoftware</b>	<b>23</b>
3.1. Bildaufnahme . . . . .	24
3.1.1. Datenspeicherung . . . . .	24
3.1.2. Simultane Zwei-Farbedetektion . . . . .	25
3.1.3. Echtzeitansicht . . . . .	26
3.2. Strahlanalyse . . . . .	27
3.2.1. Strahlanalyseprogramm . . . . .	27
3.2.2. Z-Position des Strahls und dreidimensionale Strahlverkipfung . . . . .	33
3.3. Erzeugung der gerasterten Lichtscheibe . . . . .	36
3.3.1. Auslenkung der Spiegelachsen . . . . .	37
3.3.2. Kalibrierung der Spiegelachsen . . . . .	39

<b>4. Charakterisierung der optischen Eigenschaften des Mikroskops</b>	<b>43</b>
4.1. Verteilung der Laserleistung auf die Beleuchtungsarme . . . . .	43
4.2. Beleuchtungsprofile . . . . .	45
4.2.1. Beleuchtung mit Gaußstrahlen . . . . .	45
4.2.2. Beleuchtung mit Besselstrahlen . . . . .	48
4.3. Bildqualität . . . . .	57
4.3.1. Größe des Sichtfeldes . . . . .	57
4.3.2. Einfluss der konfokalen Detektion auf den Bildkontrast . . . . .	59
4.3.3. Laterale und axiale Auflösung . . . . .	63
<b>5. Hochgeschwindigkeitsaufnahmen</b>	<b>65</b>
5.1. Synchronisierung zwischen Kamera und Scanspiegeln bei hohen Scanfrequenzen . . . . .	66
5.1.1. Abhängigkeit der Spiegelverzögerung von der Scanfrequenz . . . . .	68
5.2. Aufnahmegeschwindigkeit in 3D . . . . .	71
5.3. Messung neuronaler Aktivität in Zebrafischlarven . . . . .	73
5.3.1. Messung in mehreren Z-Ebenen . . . . .	74
5.3.2. Messung in einer Z-Ebene . . . . .	80
<b>6. Optimierungen für Langzeitmessungen</b>	<b>83</b>
<b>7. Langzeitmessungen: Z-Autofokus</b>	<b>87</b>
7.1. Verlust des Z-Fokus bei Langzeitmessungen . . . . .	88
7.2. Prinzip der Autofokussierung . . . . .	89
7.2.1. Suchalgorithmus . . . . .	89
7.2.2. Fokusfunktion . . . . .	90
7.3. Neu entwickelte Fokusmetriken . . . . .	92
7.4. Optimierung der spektralen Fokusmetriken . . . . .	93
7.4.1. Einfluss der Bildhelligkeit auf die FFT . . . . .	94
7.4.2. Einfluss des Detektionsobjektivs . . . . .	95
7.5. Vergleich der Fokusmetriken anhand von Nanopartikeln . . . . .	100
7.6. Vergleich der Fokusmetriken in biologischen Proben . . . . .	102
7.6.1. Filterung der Bilder zur Reduzierung des Bildrauschens . . . . .	102
7.6.2. Vergleich der Fokusmetriken bei hohem Fluoreszenzsignal . . . . .	104
7.6.3. Vergleich der Fokusmetriken bei niedrigem Fluoreszenzsignal . . . . .	106
7.7. Abschließende Beurteilung der Fokusmetriken . . . . .	109
7.8. Erhöhung der Autofokusstabilität . . . . .	109

<b>8. Langzeitmessungen: Synchronisierung des konfokalen Detektors (Y-Fokus)</b>	<b>113</b>
8.1. Verlust der Synchronisierung zwischen Laser und Detektor . . . . .	114
8.2. Automatisierte Detektor-Synchronisierung (Y-Fokus) . . . . .	116
8.2.1. Implementierung des Programms in LabVIEW . . . . .	116
8.3. Anwendung des Y-Fokus in biologischen Proben . . . . .	122
8.4. Vergleich der Messungen . . . . .	125
<b>9. Langzeitmessungen: Strahlverkipfung in einer beliebigen Probe</b>	<b>127</b>
9.1. Messung der Kippwinkel $\Phi$ und $\Psi$ . . . . .	128
9.1.1. Filterung der Daten . . . . .	129
9.2. Quantifizierung der Winkelrekonstruktionsgenauigkeit . . . . .	130
9.3. Korrektur der Strahlverkipfung mit den motorisierten Spiegeln . . . . .	131
<b>10. Langzeitmessungen: Probenbewegung</b>	<b>133</b>
10.1. Messung der Probenbewegung . . . . .	133
10.1.1. Reduzierung der Bildstapel auf Maximumintensitätsprojektionen .	134
10.1.2. Registrierungsalgorithmus zur Berechnung der Verschiebung zwi-	
schen zwei Bildern . . . . .	135
10.1.3. Messung der Fischbewegung bei einer Langzeitmessung . . . . .	137
10.2. Automatische Korrektur der Probenbewegung . . . . .	139
<b>11. Langzeitmessungen: Biologische Proben</b>	<b>143</b>
11.1. Einfluss der Fokus- und Bewegungs-Korrekturen auf Langzeitmessungen .	143
11.2. Langzeitaufnahme der Migration von OPCs . . . . .	148
<b>12. Diskussion</b>	<b>155</b>
12.1. Optische Eigenschaften des Mikroskops . . . . .	155
12.2. Hochgeschwindigkeitsaufnahmen . . . . .	158
12.3. Langzeitaufnahmen . . . . .	159
12.4. Abschließende Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	163
<b>A. Anhang</b>	<b>165</b>
A.1. Mathematische Beschreibung der Fokusmetriken . . . . .	165
A.2. Eigenschaften der verwendeten Kamera . . . . .	168
A.3. Zemax Linsendaten . . . . .	169
A.4. Optimierung der spektralen Fokusmetriken . . . . .	169
A.5. Einfluss der Bildvorfilterung auf die Fokusmetriken . . . . .	171
A.5.1. Fokusmetriken im Gehirn einer Zebrafischlarve (Starkes Bildsignal)	171

A.5.2. Fokusmetriken im Rückenmark einer Zebrafischlarve (Schwach Bildsignal) . . . . .	177
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>183</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>191</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>195</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>196</b>

# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein existierendes konfokales Zwei-Photonen-Lichtscheibenmikroskop charakterisiert und modifiziert. Das System wurde sowohl für Aufnahmen bei hohen Geschwindigkeiten, als auch für Langzeitaufnahmen optimiert. Das Mikroskop wurde ursprünglich von Eugen Baumgart für die Untersuchung lebender Zebrafischlarven entworfen und gebaut.

Die im ursprünglichen Aufbau verwendete Gaußbeleuchtung wurde durch eine zusätzliche Besselbeleuchtung ergänzt, wodurch sich das nutzbare Sichtfeld um den Faktor 4 erhöhte und die axiale Auflösung verbesserte.

Durch die Kombination von Lichtscheibenmikroskopie und konfokaler Detektion mit einem *Rolling Shutter*, konnte der Bildkontrast bei Zwei-Photonen-Absorption gesteigert werden. Für die einfache Kalibrierung des Mikroskops wurde ein Strahlanalyseprogrammes entwickelt, mit welchem die Lage und Verkippung des Laserstrahls in der Probe bestimmt werden kann.

Durch die Erweiterung des Aufbaus um eine zweite Detektionskamera und eine zweite Laserlinie können zwei Farbkanäle gleichzeitig aufgenommen werden.

Bei hohen Aufnahmezeiten zeigte sich eine Desynchronisation zwischen Anregungslaser und *Rolling Shutter*, welche als Funktion der Scanfrequenz gemessen und durch frequenzabhängige Korrekturen aufgehoben wurde.

Bei einer dreidimensionalen Aufnahme wurde eine Aufnahmezeit von 3,5 Hz bei konfokaler Detektion erreicht. Damit konnte stimulierte Neuronenaktivität im optischen Tektum fünf Tage alter Zebrafischlarven beobachtet werden.

Um die Probe fixiert im Sichtfeld der Kamera zu halten, wurde eine automatische Korrektur der Probenbewegung in allen Raumrichtungen entwickelt. Diese basiert auf der Messung der Bildverschiebung der Maximumintensitätsprojektionen entlang der drei Raumrichtungen.

Im Verlauf von Langzeitmessungen kam es sowohl zu einer Defokussierung in Detektionsrichtung (Z-Defokus), wie auch zu einem Verlust der Synchronisation zwischen Laser und Detektor (Y-Defokus). Daher wurden zwei automatische Fokussysteme entwickelt, um beide Effekte zu kompensieren. Hierbei wurden drei neuartige Fokusmetriken entwi-

ckelt und mit bekannten Metriken verglichen. Eine besondere Herausforderung bei der Fokussierung stellte Rauschen dar, welches durch verschiedene Vorbehandlungsschritte reduziert werden konnte. Insgesamt hat sich die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Metrik der kombinierten FFT mit Hochpassfilter als die Beste für das verwendete Mikroskop erwiesen.

Für die Autofokussierung in Y-Richtung wurde eine völlig neue Methode entwickelt. Diese erlaubt erstmalig die Kontraststeigerung durch konfokale Detektion bei Langzeitaufnahmen, ohne einen Verlust des Bildsignals, durch eine Desynchronisierung zwischen Anregungslaser und Detektor, zu riskieren. Bei der Y-Fokussierung wird ein kleiner Bereich der Probe mit dem Anregungslaser durchfahren und aus virtuellen Detektoren werden Bilder rekonstruiert, welche sich aufgrund ihres Abstandes zur Strahlmitte in ihrer Helligkeit und ihrem Fokuswert unterscheiden.

Aus den Einzelbildern der Autofokussierungen konnte zudem die Verkippung der Lichtscheibe entlang der Raumwinkel  $\Phi$ ,  $\Theta$  und  $\Psi$  gemessen werden. Dies ermöglicht eine automatische Korrektur der Verkippungen. Bei der Winkelmessung wurde ausgenutzt, dass einige der untersuchten Fokusmetriken den Bildfokus zeilen- bzw. spaltenweise berechnen und anschließend aufsummieren. Indem diese Werte vor der Summierung separat gespeichert werden, bleibt die Information über die Verkippung der Lichtscheibe erhalten.

# 1. Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung eines bestehenden Zweiphotonenlichtscheibenmikroskops, welches für die Untersuchung von Zebrafischlarven *in vivo* gebaut wurde. Das Mikroskop sollte insbesondere für die Beobachtung dynamischer Prozesse optimiert werden. Dazu gehören sowohl Wachstumsprozesse, welche sich über einen Zeitraum von mehreren Stunden erstrecken, als auch Neuronenaktivitäten mit einer Dauer von wenigen Millisekunden.

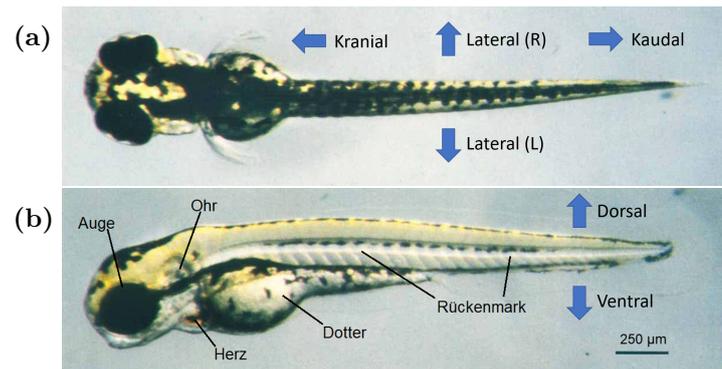
Diese beiden Anwendungsbereiche stellen ganz unterschiedliche Anforderungen an das Mikroskop. Zum einen wird eine Bildaufnahmerate von mehreren Hertz für die schnellen Prozesse benötigt. Zum anderen muss das System über mehrere Stunden stabil arbeiten, um Wachstumsprozesse verfolgen zu können.

In diesem Kapitel werden die Grundlagen dargestellt, auf denen die dann folgenden Kapitel aufbauen. Als Erstes wird die untersuchte Probe vorgestellt. Danach folgt eine Einleitung in die verwendete Mikroskopietechnik. Schließlich wird auf die Qualität von Abbildungen eingegangen.

## 1.1. Der Zebraärbling (Zebrafisch) als Modellorganismus

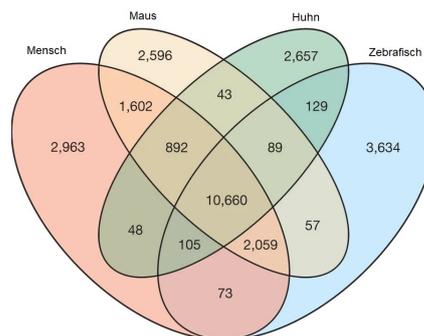
Der Zebraärbling, oder Zebrafisch, (*Danio rerio*) ist ein Süßwasserfisch aus der Familie der Karpfenfische. In Abbildung 1.1 ist eine drei Tage alte Zebrafischlarve zu sehen, in der markante Körperteile hervorgehoben sind. In Abbildung 1.1 sind zudem durch blaue Pfeile die anatomischen Hauptrichtungen mit ihren Bezeichnungen aufgeführt. Anhand dieser können die Ausrichtungen von Probenaufnahmen im Fisch beschrieben werden.

In den letzten Jahrzehnten erfreute sich der Zebrafisch wachsender Beliebtheit als Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie und Genetik, sowie neuerdings auch in den Verhaltensneurowissenschaften [21]. Die Gründe hierfür sind zahlreich. So zeigt der Zebrafisch eine hohe physiologische und genetische Homologie zum Menschen und genetische Manipulationen sind relativ einfach [33]. Bei 71,4% der menschlichen Gene findet sich mindestens ein orthologes Gen im Zebrafisch und von diesen Genen haben 47% eine eins-zu-eins Beziehung zwischen Mensch und Zebrafisch [76].



**Abbildung 1.1.:** Durchlichtaufnahme einer 3 Tage alten Zebrafischlarve. **(a):** Dorsale Ansicht. **(b):** Laterale Ansicht. Es wurden einige markante Körperteile hervorgehoben. Modifiziert aus [36].

Von orthologen Genen zwischen zwei Spezies spricht man, wenn diese auf ein Gen im letzten gemeinsamen Vorfahr zurückgehen. Die hohe genetische Verwandtschaft zwischen Mensch und Zebrafisch wird in Abbildung 1.2 verdeutlicht.



**Abbildung 1.2.:** Anzahl orthologer Gene, welche sich Menschen, Mäuse, Hühner und Zebrafische teilen. Die Zahlen beziehen sich auf die Anzahl der Genkopien zum Zeitpunkt der Artentrennung. Modifiziert aus [27].

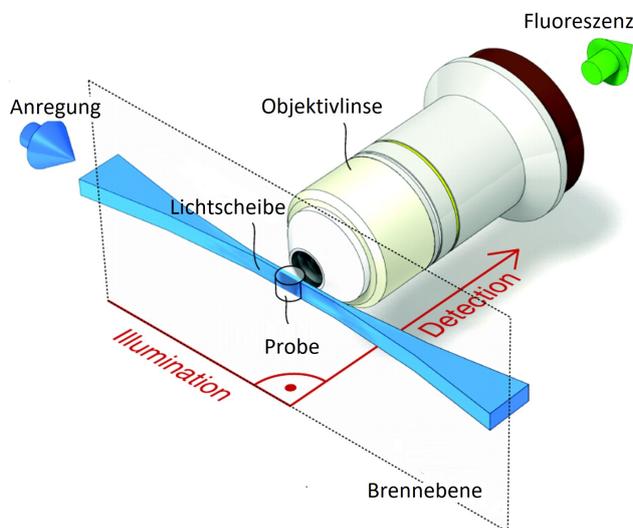
Weiterhin eignen sich die Embryonen des Zebrafisches hervorragend für mikroskopische Untersuchungen, da sie optisch durchsichtig sind und sich innerhalb weniger Tage vollständig außerhalb des Uterus der Mutter entwickeln.

Auch wenn nicht alle Erkenntnisse direkt vom Zebrafisch auf den Menschen übertragen werden können, eignet er sich aufgrund all dieser Vorzüge als Modellorganismus für die Untersuchung menschlicher Erkrankungen.

## 1.2. Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie (LSFM)

Die Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie (LSFM) ist eine besondere Form der Fluoreszenzmikroskopie, bei welcher der Beleuchtungs- und Detektionspfad voneinander entkoppelt sind. In manchen Publikationen wird diese Art der Mikroskopie als Selective Plane Illumination Microscopy (SPIM) bezeichnet [31].

In der klassischen Epifluoreszenzmikroskopie wird eine Probe durch dasselbe Objektiv beleuchtet, welches auch das von der Probe emittierte Licht sammelt. In der Lichtscheibenmikroskopie werden zwei verschiedene Objektive benutzt, welche in der Regel orthogonal zueinander angeordnet sind. Mit dem Beleuchtungsobjektiv wird eine Lichtscheibe erzeugt, welche sich im Fokus des Detektionsobjektivs befindet [78] (siehe Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3.:** Prinzip der Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie (LSFM). Eine Probe wird mit einer Lichtscheibe (blau) beleuchtet, die sich in der Fokusebene des Detektionsobjektivs befindet. Die von der Probe emittierte Fluoreszenz (grüner Pfeil) wird von dem Detektionsobjektiv gesammelt. Modifiziert aus [30].

Als Lichtquelle werden in der LSFM in der Regel Laser verwendet, da diese monochromatisch sind und eine ausreichende Intensität zur Fluoreszenzanregung bereitstellen. Mit monochromatischem Licht können gezielt bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden. Um aus einem Laser eine Lichtscheibe zu formen, haben sich zwei Methoden etabliert. Entweder kann der Laserstrahl mit einer Zylinderlinse aufgeweitet werden oder er wird durch die Probe gescannt, wodurch im zeitlichen Mittel eine Lichtscheibe entsteht [35].

Durch die Beleuchtung von nur einer dünnen Schicht der Probe steigt die axiale Auflösung im Vergleich zur Epifluoreszenzmikroskopie [55]. Zudem wird hierdurch die Phototoxizität und das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe stark reduziert [71].

Desweiteren erlaubt die Lichtscheibenmikroskopie dreidimensionale Aufnahmen. Zu diesem Zweck kann entweder die Probe mit einem Linearversteller oder die Lichtscheibe mit einem Galvanometer- oder Piezoscanner in Detektionsrichtung ( $Z$ -Achse) bewegt werden [20]. Da Linearversteller in der Regel relativ langsam sind, erlaubt die zweite Variante deutlich schnellere 3D-Aufnahmen. In diesem Fall muss jedoch auch der Fokus der Detektion synchron zur Lichtscheibe bewegt werden.

Da in der Epifluoreszenzmikroskopie das gesamte Probenvolumen auf einmal beleuchtet wird, stammt ein erheblicher Anteil der detektierten Fluoreszenz von außerhalb der Fokusebene des Detektionsobjektivs. Bei dieser Art der Beleuchtung beträgt die Helligkeit des Hintergrundes häufig 15% bis 30% der Maximalintensität des Farbstoffes [46]. Da Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene angeregt wird, trägt diese Anregung zum Ausbleichen der Farbstoffe bei, obwohl die Fluoreszenz zu einem großen Teil nicht detektiert wird und somit keine Informationen zur Bildgebung beisteuert [40].

Um die Menge an Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren, kann konfokale Beleuchtung und Detektion benutzt werden, wie sie in Laser-Scanning-Mikroskopen verwendet wird. Hierbei wird der Laser auf einen Punkt in der Probe fokussiert, welcher daraufhin durch die Fokusebene des Objektivs gerastert wird. Eine Lochblende blockiert einen Großteil des Hintergrundlichts, wodurch die aufgenommenen Bilder kontrastreicher sind und ein höheres Signal-zu-Rausch Verhältnis haben [40]. Da hierbei jedoch der gesamte Kegel oberhalb und unterhalb des Fokuspunktes beleuchtet wird, sind die Fluoreszenzfarbstoffe dennoch stark von Phototoxizität und Ausbleichen betroffen [13]. Bei 3D-Aufnahmen wird dieser Effekt noch verstärkt, da hier die Probe mehrfach dem Anregungslicht ausgesetzt wird [4]. Da bei der konfokalen Detektion die Fokusebene punktweise gerastert werden muss, ist diese Methode verhältnismäßig langsam. Die Aufnahmedauer steigt mit der Anzahl der Bildpixel und kann mehrere Sekunden betragen [46], was bei der Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Proben unzureichend sein kann [51].

Da in der LSFM nur die Fokusebene beleuchtet wird, ist eine konfokale Detektion in der Regel nicht notwendig, um Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene zu unterdrücken. Dies erlaubt die gleichzeitige Aufnahme aller Bildpunkte mit einer Digitalkamera, wodurch hohe Aufnahmezeiten ermöglicht werden [45]. Daneben ist es auch möglich, die LSFM mit einer konfokalen Detektion zu kombinieren, wodurch sich der Bildkontrast steigern lässt.

Durch die Kombination einer hohen axialen Auflösung, niedriger Phototoxizität und

hoher Aufnahmezeiten, ist die LSM optimal für die Untersuchung lebender Proben geeignet [31]. Ein weiterer Vorteil ist der relativ einfache Aufbau eines Lichtscheibenmikroskops, wodurch die selbständige und kostengünstige Konstruktion eines solchen Systems ermöglicht wird [59].

### **Erzeugung der Lichtscheibe**

Es existieren zwei verbreitete Methoden zur Erzeugung einer Lichtscheibe aus einem Laserstrahl. Bei der ersten Methode wird der Laserstrahl mit einer Zylinderlinse fokussiert. Da bei dieser besonderen Linsenart die Flächen einfach gekrümmt sind, erfolgt die Strahlaufweitung nur in einer Richtung. Dabei wird die gesamte Laserleistung über die Lichtscheibe verteilt. Dadurch ist dieser Ansatz besonders geeignet, wenn niedrige Anregungsintensitäten ausreichend für ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis sind. Zusätzlich wird ein Ausbleichen der Probe reduziert. Durch die gleichzeitige Beleuchtung der gesamten Bildebene ist diese Methode auch besonders für Hochgeschwindigkeitsaufnahmen geeignet. Ein Nachteil der Strahlaufweitung mit einer Zylinderlinse ist die resultierende Intensitätsverteilung in der Lichtscheibe in Ausweitrungsrichtung. Analog zum Ausgangsstrahl ist diese gaußförmig mit einem Intensitätsmaximum in der Mitte. Zu den Rändern der Lichtscheibe hin nimmt die Intensität hingegen rapide ab, wodurch sich eine inhomogene Helligkeitsverteilung in den aufgenommenen Bildern ergibt.

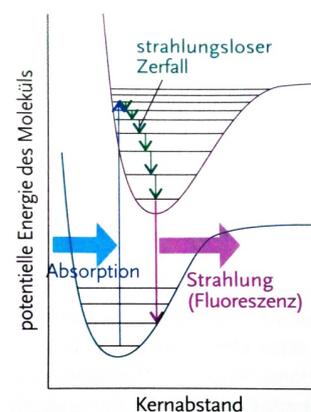
Die zweite Methode ist auch unter dem Namen Digitally Scanned Light Sheet Microscopy (DSLMS) bekannt. Hier wird der Laserstrahl durch die Fokusebene des Detektionsobjektivs bewegt und es entsteht im zeitlichen Mittel eine virtuelle Lichtscheibe [4]. Dazu werden bewegliche Spiegel benutzt, welche sich an einer zur hinteren Brennebene des Beleuchtungsobjektivs konjugierten Position befinden. Hier wird die Lichtintensität nicht auf die Lichtscheibe verteilt, sondern sie bleibt im Laserstrahl konzentriert. Aufgrund der Bewegung des Strahls durch die Bildebene ergibt sich somit eine homogene Intensitätsverteilung in der Lichtscheibe. Bei gleicher Laserleistung und Lichtscheibendicke ist die lokale Lichtintensität innerhalb derselben Beleuchtungszeit höher als bei Verwendung einer Zylinderlinse, da der Laserstrahl in beiden Dimensionen fokussiert bleibt. Dies ist insbesondere vorteilhaft bei der Verwendung von Zwei-Photonen-Anregung, welche besonders hohe Anregungsintensitäten erfordert. Durch eine Änderung der Amplitude der Scanspiegel kann die Breite der Lichtscheibe an die Probengröße angepasst werden. Da die Lichtscheibe nur im zeitlichen Mittel entsteht, ist die maximale Aufnahmezeit in der Regel niedriger als bei Verwendung einer Zylinderlinse [63].

### 1.2.1. Fluoreszenz

Fluoreszenz ist ein Prozess, bei dem ein Atom oder Molekül spontan Licht emittiert, nachdem es zuvor optisch angeregt wurde. Das Prinzip der Fluoreszenz wird in Abbildung 1.4 skizziert. Bei Raumtemperatur befinden sich die meisten Atome und Moleküle im elektronischen Grundzustand  $S_0$ . Absorbieren sie ein Photon mit der passenden Energie  $E_{absorb}$ , können sie in einen elektronisch angeregten Zustand  $S_i$ ,  $i > 0$  versetzt werden. Dazu muss  $E_{absorb}$  mindestens der Energiedifferenz des Grundzustandes und des angeregten Zustandes entsprechen.

Da jeder elektronische Zustand eine Reihe an Schwingungszuständen annehmen kann, ist es sehr wahrscheinlich, dass das Atom bei der Anregung in einen höheren Schwingungszustand versetzt wird. Durch Stöße mit anderen Molekülen relaxiert es dann ohne Abgabe von Strahlung auf das niedrigste Schwingungsniveau des aktuellen elektronischen Zustandes, wobei Wärme freigesetzt wird. Dieser Prozess erfolgt innerhalb von  $10^{-12}$  s [83]. Das Atom kann nun vom Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustands wieder unter Abgabe eines Photons in den elektronischen Grundzustand zurückkehren. Dieser Übergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Aufgrund der abgegebenen Wärme besitzt das emittierte Photon weniger Energie als das zuvor absorbierte Photon und erscheint daher rotverschoben.

Neben der Fluoreszenz existieren noch weitere Übergänge vom Schwingungsgrundzustand des angeregten elektronischen Zustands in den elektronischen Grundzustand. Bei der sogenannten *Internal Conversion* (IC) findet ein isoenergetischer, und damit strahlungsloser, Übergang in einen hoch angeregten Schwingungszustand des nächst tieferliegenden elektronischen Zustands statt. Beim *Intersystem Crossing* (ISC) geht das Atom in einen anderen elektronischen Anregungszustand über, wobei sich die Multiplizität ändert. Das einfachste Beispiel hierfür ist der Übergang von einem Singulettzustand mit Gesamtspin 0 zu einem Triplettzustand mit Gesamtspin 1. Dies erfolgt nur selten, da diese Spinänderung quantenmechanisch verboten ist. Gleichzeitig ist der Triplettzustand relativ stabil, da auch der Übergang in den elektronischen Grundzustand mit Gesamtspin 0 verboten ist. Wird bei letztgenanntem Übergang Strahlung emittiert, spricht man von Phosphoreszenz, die innerhalb von Bruchteilen einer Sekunde bis hin zu mehreren Minuten erfolgt [46].



**Abbildung 1.4.:** Prinzip der Fluoreszenz. Aus [3].

### Zwei-Photonen-Absorption (2P)

Werden zwei Photonen gleichzeitig von einem Atom oder Molekül absorbiert, so kann dieses in einen angeregten Zustand versetzt werden, ohne dass die Energie eines einzelnen Photons ausreicht, um die Energiedifferenz zwischen den Zuständen zu überbrücken. Damit eine derartige Zwei-Photonen (2P)-Absorption erfolgen kann, muss die Summe der Energien der Photonen  $E_1 + E_2$  der Energiedifferenz  $\Delta E$  zwischen den Zuständen entsprechen.

$$\Delta E = E_1 + E_2 = h\nu_1 + h\nu_2 \quad (1.1)$$

Hier ist  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum und  $\nu_i$  sind die Schwingungsfrequenzen der Photonen. Zusätzlich muss die Absorption gleichzeitig im Sinne der Energie-Zeit-Unschärferelation erfolgen. Das Prinzip der 2P-Absorption wird in Abbildung 1.5 dargestellt. Hier wird ohne Beschränkung der Allgemeinheit  $E_1 = E_2 = h\nu_2$  angenommen. Werden zwei Photonen gleichzeitig absorbiert, so wird das Molekül anschaulich vom ersten Photon in einen virtuellen Zwischenzustand gehoben und vom zweiten Photon weiter in den angeregten elektronischen Zustand [68]. Geht das Molekül nun durch Fluoreszenz wieder in den elektronischen Grundzustand über, wird ein einzelnes Photon emittiert. Die Energie des emittierten Photons ist höher als die Einzelenergien der absorbierten Photonen, jedoch ist sie aufgrund strahlungsloser Verluste geringer als die Summe ihrer Energien [58]. Die Wahrscheinlichkeit der simultanen Absorption ist sehr gering und wird durch den Zwei-Photonen-Wirkungsquerschnitt  $\sigma_{2P}$  beschrieben, dessen Einheit Goeppert-Mayer (GM) ist:

$$1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s Photon}^{-2} \text{ Molekül}^{-1} . \quad (1.2)$$

Üblicherweise gilt für den 2P-Wirkungsquerschnitt eines Materials  $\sigma_{2P} < 10 \text{ GM}$  [52]. Dabei besagt ein Wirkungsquerschnitt von 1 GM, dass bei einem Photonenfluss von  $1 \frac{\text{Photon}}{\text{s cm}^2}$  in einem Material der Dichte  $1 \frac{\text{Molekül}}{\text{cm}^3}$  auf einer Distanz von 1 cm nur ein von  $10^{50}$  Photonen absorbiert wird. Die Wahrscheinlichkeit für zwei gleichzeitig absorbierte Photonen ist proportional zum Quadrat der Intensität des einfallenden Lichts  $I(r, t)$  [58]. Um die notwendige Photonendichte zu erreichen, werden gepulste Laser als Lichtquelle verwendet. Zusätzlich muss der Laserstrahl fokussiert werden und nur im Fokus kommt es zu einer nennenswerten 2P-Absorption.

Dieser Umstand hat praktische Auswirkungen auf mikroskopische Anwendungen. Bei der Epifluoreszenzmikroskopie wird die zu beobachtende Probe durch dasselbe Objektiv beleuchtet, welches auch das Fluoreszenzlicht detektiert. Bei der 2P-Absorption wird der fluoreszierende Bereich auf die Fokusebene beschränkt, wodurch sich die axiale Auflösung deutlich verbessert und der Bildkontrast steigt. In der Lichtscheibenmikroskopie führt die 2P-Absorption jedoch zu einem verringerten nutzbaren Sichtfeld innerhalb der Fokusebene, da

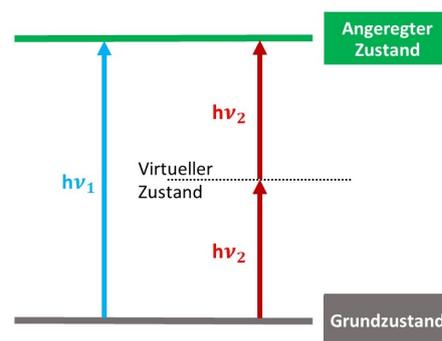
hier die Beleuchtung orthogonal zur Detektion erfolgt. Um dies zu kompensieren, kann ein zweiter Beleuchtungsstrahl verwendet werden, welcher dem ersten entgegengesetzt die Probe beleuchtet. Werden die Fokusse nebeneinander gelegt, kann somit die Größe des Sichtfeldes verdoppelt werden. Ein anderer Ansatz benutzt Besselstrahlen zur Probenbeleuchtung. Diese besitzen einen wesentlich längeren Fokus in axialer Richtung. Es hat sich insbesondere die Kombination von Besselstrahlen mit 2P-Absorption als vorteilhaft erwiesen, da hier die Nebenmaxima des Besselstrahls nicht nennenswert zur Fluoreszenz beitragen. Dadurch verbessern sich die axiale Auflösung und der Bildkontrast [19].

Die Verwendung von 2P-Absorption hat einige Vorteile bei der Beobachtung lebender Proben. Die Wellenlänge des Anregungslichts liegt meist im Infrarotbereich, wodurch es in biologischem Gewebe weniger gestreut oder absorbiert wird als sichtbares Licht. Daher ist bei Ein-Photonen (1P)-Absorption die Eindringtiefe je nach Präparat auf 50 – 80  $\mu\text{m}$  begrenzt, während mit 2P-Absorption auch Tiefen von 200  $\mu\text{m}$  oder sogar 1000  $\mu\text{m}$  erreicht werden [73].

Ein weiterer Vorteil ist, dass das Anregungslicht im Infrarotbereich für viele Organismen unsichtbar ist, wodurch sich auch der Sehapparat dieser Organismen untersuchen lässt, ohne diesen bei der Beobachtung ungewollt zu stimulieren.

### 1.2.2. Beleuchtungsarten in der Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie

Für die Beleuchtung können verschiedene Strahlprofile verwendet werden. Zu den bekanntesten Strahlarten gehören Gaußstrahlen und Besselstrahlen, welche hier kurz beschrieben werden.



**Abbildung 1.5.:** Prinzip der 2P-Absorption.

## Gaußstrahlen

Das Emissionsprofil vieler Laserquellen entspricht dem eines Gaußstrahls. Daher kann diese Strahlart sehr einfach für die Beleuchtung in der Mikroskopie verwendet werden. Die räumliche Intensitätsverteilung  $I(r, z)$  eines Gaußstrahls kann mit folgender Formel beschrieben werden [25]:

$$I(r, z) = I_0 \left( \frac{\omega_0}{\omega(z)} \right)^2 \exp \left( -\frac{2r^2}{\omega(z)^2} \right). \quad (1.3)$$

Hier ist  $\omega_0$  der  $\frac{1}{e^2}$ -Radius des Strahls an der Strahltaile.  $r$  und  $z$  beschreiben den Abstand von der Strahltaile in radialer, bzw. axialer Richtung. Weiterhin gelten

$$\omega(z) = \omega_0 \sqrt{1 + \left( \frac{z}{Z_R} \right)^2} \quad (1.4)$$

und

$$Z_R = \frac{\pi n \omega_0^2}{M^2 \lambda}. \quad (1.5)$$

$Z_R$  wird Rayleighlänge genannt und beschreibt die axiale Distanz von der Strahltaile bis zu dem Punkt, wo sich die Querschnittfläche des Strahls verdoppelt hat. An diesem Punkt ist der Radius um  $\sqrt{2}$  größer als  $\omega_0$  und die Intensität auf der optischen Achse ist um den Faktor 2 kleiner als in der Strahltaile.  $n$  ist der Brechungsindex des Mediums und  $M^2$  ist die Beugungsmaßzahl.  $M^2$  ist eine dimensionslose Einheit, welche umso größer ist, je schlechter der Strahl zu fokussieren ist. Sie beschreibt das Verhältnis des Divergenzwinkels  $\psi_{real}$  zum Divergenzwinkel eines idealen Gaußstrahls  $\psi_{Gauss}$ :

$$M^2 = \frac{\psi_{real}}{\psi_{Gauss}}. \quad (1.6)$$

Für einen idealen Gaußstrahl folgt somit  $M^2 = 1$ , während für einen realen Gaußstrahl stets  $M^2 > 1$  gilt. Aus Gleichung (1.3) und Gleichung (1.4) folgt für die Intensität entlang der optischen Achse

$$I(0, z) = \frac{I_0}{1 + \left( \frac{z}{Z_R} \right)^2}. \quad (1.7)$$

Gleichung (1.7) entspricht damit einem Lorentz-Profil. Desweiteren kann für einen Gaußstrahl die Intensität  $I_0$  durch die Leistung  $P_0$  ausgedrückt werden:

$$I_0 = \frac{2 P_0}{\pi \omega_0^2}. \quad (1.8)$$

Damit kann Gleichung (1.3) umgeformt werden, zu

$$I(r, z) = \frac{2 P_0}{\pi \omega^2(z)} \exp\left(-\frac{2r^2}{w(z)^2}\right). \quad (1.9)$$

Wird ein Gaußstrahl mit Tailenradius  $\omega_{0,ini}$  von einer als ideal angenommenen dünnen Sammellinse mit Brennweite  $f$  fokussiert, so findet sich hinter der Linse wieder ein Gaußstrahl mit Radius  $\omega_f$  [62]. Für den Radius des fokussierten Strahls gilt dann:

$$\omega_f = \frac{\omega_0 f}{\sqrt{(s_0 - f)^2 + Z_R^2}}. \quad (1.10)$$

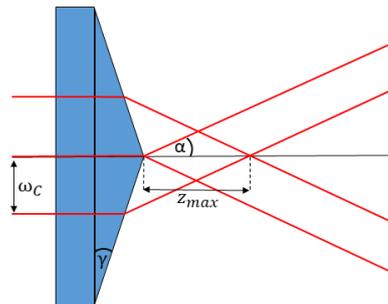
Hier ist  $s_0$  der Abstand zwischen der Strahltaile des einfallenden Strahls und der Linse. Für den Spezialfall  $s_0 = f$  folgt

$$\omega_f = \frac{\omega_0 f}{Z_R} = \frac{M^2 \lambda f}{\pi n w_0}. \quad (1.11)$$

Die Größe der Strahltaile des fokussierten Strahls ist also umgekehrt proportional zu der Strahltaile des einfallenden Strahls.

### Besselstrahlen

Besselstrahlen wurden von Jim Durnin 1987 als Lösung der paraxialen Helmholtz-Gleichung vorgeschlagen [16] und erstmalig von Durnin und Joseph H. Eberly experimentell nachgewiesen [17]. Besselstrahlen können im Labor erzeugen werden, indem man ein Axicon mit monochromatischen ebenen Wellen beleuchtet [26] (siehe Abbildung 1.6).



**Abbildung 1.6.:** Erzeugung von Besselstrahlen durch ein Axicon mit Axiconwinkel  $\gamma$ .

Ein Axicon ist eine spezielle kegelförmige Linse, deren optische Eigenschaften maßgeblich durch ihren Axiconwinkel  $\gamma$  bestimmt wird. Trifft eine monochromatische ebene Welle auf ein Axicon mit Axiconwinkel  $\gamma$ , so formt sich hinter dem Axicon ein divergierender

Kegel ebener Wellen mit Öffnungswinkel  $\alpha$ . Die ebenen Wellen können innerhalb der Weglänge  $z_{max}$  miteinander interferieren und dabei den Besselstrahl formen.

Auch wenn es experimentell möglich ist, Besselstrahlen höherer Ordnung zu generieren [2], sollen hier nur die Strahlen nullter Ordnung betrachtet werden. Deren Intensitätsverteilung  $I(r, z)$  ist gegeben durch[44]:

$$I(r, z) = \frac{4k_r P_0}{\omega_c} \frac{z}{z_{max}} J_0^2(k_r r) \exp\left(-\frac{2z^2}{z_{max}^2}\right). \quad (1.12)$$

Hier ist  $J_0$  die Besselfunktion nullter Ordnung und erster Art.  $P$  ist die Laserleistung und  $\omega_c$  ist der Radius des Laserstrahls, wenn dieser auf das Axicon trifft. Weiterhin gilt  $k_r = k \sin(\alpha) = \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\alpha)$ . Der Öffnungswinkel  $\alpha$  kann mithilfe geometrischer Überlegungen und Anwendung des Snelliusschen Brechungssesetzes aus dem Axiconwinkel  $\gamma$  berechnet werden:

$$\alpha = \sin^{-1}\left(\frac{n_{axicon}}{n_{luft}} \sin(\gamma)\right) - \gamma. \quad (1.13)$$

Hier sind  $n_{axicon}$  und  $n_{luft}$  die jeweiligen Brechungsindizes des Axicons und der Luft. Mit der Kleinwinkelnäherung  $\sin(\gamma) = \gamma$ , sowie  $n_{luft} = 1$  folgt

$$\alpha \approx (n_{axicon} - 1) \gamma. \quad (1.14)$$

Wichtige Parameter bei der Betrachtung von Besselstrahlen sind die Interferenzlänge  $z_{max}$ , der typische Ringabstand  $\Delta\rho$  und der radiale Abstand zwischen der Strahlmitte und dem ersten Minimum  $r_0$ . Für  $z_{max}$  folgt aus geometrischen Überlegungen:

$$z_{max} = \omega_c \left(\frac{1}{\tan(\alpha)} - \tan(\gamma)\right) \approx \frac{\omega_c}{\tan(\alpha)}. \quad (1.15)$$

Die anderen Parameter lassen sich wie folgt berechnen [44]:

$$\Delta\rho \approx \frac{\lambda}{2 \sin(\alpha)}, \quad (1.16)$$

$$r_0 = \frac{2,405}{k \sin(\alpha)} = \frac{1,2025 \lambda}{\pi \sin(\alpha)}. \quad (1.17)$$

Der Faktor 2,405 aus Gleichung (1.17) folgt aus der ersten Nullstelle der Besselfunktion  $J_0$ .

### 1.3. Abbildungsqualität in der Mikroskopie

Die Qualität einer Abbildung wird maßgeblich durch die beiden Größen Auflösung und Kontrast bestimmt. Daher werden hier diese Konzepte kurz erläutert.

#### 1.3.1. Auflösung

Im Folgenden wird die maximal erreichbare Auflösung bei der Beobachtung eines selbstleuchtenden Objekt betrachtet. In der klassischen Fluoreszenzmikroskopie hängt diese nicht von der Wellenlänge der Beleuchtung, sondern von der Wellenlänge  $\lambda_{em}$  der Fluoreszenz ab [15]. Eine weitere entscheidende Größe für das Auflösungsvermögen ist die Numerische Apertur (NA) des Detektionsobjektives. Wird ein selbstleuchtender Punkt durch ein Mikroskop abgebildet, so entspricht das entstehende Bild einem Beugungsmuster, deren Helligkeitsverteilung von der Punktspreizfunktion (PSF) abhängt. In der Fokusebene entspricht die PSF einer Anordnung konzentrischer Beugungsringe, deren helle Region im Zentrum auch als Airy-Scheibe bezeichnet wird. Die laterale Auflösung wird klassischerweise über das Rayleigh-Kriterium definiert. Dieses besagt, dass zwei fluoreszierende Punkte gerade dann noch unterscheidbar sind, wenn das Hauptmaximum der Beugungsfigur eines Punktes im ersten Minimum der Beugungsringe des zweiten Punktes liegt. Es ist jedoch anzumerken, dass es sich beim Rayleigh-Kriterium nur um eine Konvention handelt. Auch Punkte, welche näher beieinander liegen, können unter günstigen Bedingungen noch unterscheidbar sein [14]. Die laterale Auflösung nach dem Rayleigh-Kriterium beträgt [40]:

$$d_{Rayleigh} = \frac{0,61\lambda_{em}}{NA} . \quad (1.18)$$

Dies ist experimentell häufig nur schwer zu bestimmen. Es ist in der Regel einfacher, die Halbwertsbreite der lateralen PSF zu messen. Diese ist für einen selbstleuchtenden Punkt durch

$$FWHM_{y,x} = \frac{0,51\lambda_{em}}{NA} \quad (1.19)$$

gegeben. Bei homogener Beleuchtung der Probe entspricht die Halbwertsbreite der PSF entlang der Detektionsrichtung [40]

$$FWHM_z = \frac{0,88\lambda_{em}}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} . \quad (1.20)$$

Hier ist  $n$  der Brechungsindex des Mediums, in welchem sich die Punktquelle befindet. In der Lichtscheibenmikroskopie ist die axiale Auflösung sowohl von der numerischen

Apertur des Detektionsobjektivs, als auch von von der Dicke  $\omega$  der Lichtscheibe abhängig [66]. Durch die Verwendung einer Lichtscheibe, welche dünner als  $FWHM_z$  ist, kann die axiale Halbwertsbreite weiter reduziert werden.

### 1.3.2. Bildkontrast

Der Kontrast eines Bildes beschreibt den Unterschied zwischen hellen und dunklen Bereichen eines Bildes und ist damit ein Maß, wie gut sich bestimmte Bilddetails von der unmittelbaren Nachbarschaft abheben. In Bildern mit komplexer Intensitätsverteilung erweist sich die Messung des Kontrastes jedoch als schwierig, da diese von der Struktur des abzubildenden Objekts und der Modulationstransferfunktion (MTF) des Objektivs abhängt [53]. Um die Vergleichbarkeit des Kontrastes verschiedener Systeme zu erhöhen, ist es daher sinnvoll einfache Strukturen, wie periodische Gitter oder einzelne Punkte vor einem gleichmäßigen Hintergrund, abzubilden.

Der Kontrast wird mithilfe der maximalen und minimalen Bildintensität  $I_{max}$  und  $I_{min}$  definiert. Der sogenannte Weber-Kontrast ist gegeben durch [82]:

$$K_W = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{min}} . \quad (1.21)$$

Ein etwas anderes Maß ist der Michelson-Kontrast, welcher durch

$$K_M = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}} \quad (1.22)$$

gegeben ist [43]. Beide Kontrastmaße sind gleich null, wenn sich  $I_{max}$  und  $I_{min}$  nicht unterscheiden und sie sind maximal für  $I_{min} = 0$ . In diesem Fall ist der Weber-Kontrast unendlich, während der Michelson-Kontrast den Wert eins annimmt. Daneben existieren weitere Kontrastmaße, auf welche hier nicht weiter eingegangen wird.



## 2. Aufbau des Mikroskops

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein bereits bestehendes Lichtscheibenmikroskop mit 2P-Anregung modifiziert und erweitert. Die ursprüngliche Form des Mikroskops wurde von Eugen Baumgart entworfen und aufgebaut.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Anpassungen dienten der Optimierung des Systems für Aufnahmen *in vivo* in Zebrafischlarven. Das Mikroskop sollte auf der einen Seite Langzeitaufnahmen ermöglichen, um die Entwicklung der Larven zu untersuchen. Auf der anderen Seite sollte es auch Hochgeschwindigkeitsaufnahmen erlauben, bei welchen Neuronenaktivitäten beobachtet werden. Außerdem wurde eine Beleuchtung mit Besselstrahlen etabliert, wodurch sich das laterale Sichtfeld vergrößerte und die axiale Auflösung verbessert wurde.

Als Lichtquelle dient ein gepulster Laser mit variabler Ausgangswellenlänge zwischen 680 und 1300 nm (Insight Deepsee, *Spectra-Physics*). Der Laser besitzt einen zweiten Ausgang bei einer festen Wellenlänge von 1041 nm. Er ist für 2P-Anregung ausgelegt, wodurch er in Kombination mit Fluorophoren mit Anregungswellenlängen von etwa 340 bis 650 nm verwendet werden kann.

Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 angeschnitten, bietet die 2P-Anregung diverse Vorteile bei der Abbildung biologischer Proben. Zum Ersten dringt infrarotes Licht tiefer in biologisches Gewebe ein als sichtbares oder UV-Licht [30]. Die Absorption von UV-Licht ist um mehrere Größenordnungen höher als die von infrarotem Licht [67]. Zum Zweiten wird durch 2P-Anregung die Menge an gestreutem Licht in der Probe reduziert. Diese kann durch den Streuquerschnitt  $\sigma_{Rayleigh}$  der sogenannten Rayleigh-Streuung parametrisiert werden und ist proportional zu  $\lambda_0^{-4}$  [58].  $\lambda_0$  beschreibt hier die Wellenlänge im Vakuum. Daraus folgt, dass infrarotes Licht deutlich weniger als sichtbares Licht gestreut wird. Somit steigt die räumliche Auflösung, da weniger Licht von außerhalb der Fokusebene detektiert wird.

Darüber hinaus ermöglicht die 2P-Anregung Untersuchungen im visuellen System der Zebrafischlarven, ohne dieses durch die Beobachtung zu beeinträchtigen. Auf diesen Umstand wird in Abschnitt 5.3 näher eingegangen.

Dieses Kapitel besteht aus vier Abschnitten. Zunächst wird in Abschnitt 2.1 die Proben-

halterung beschrieben, in der die untersuchten Fische in ihrer natürlichen Lage positioniert werden können. Anschließend wird in Abschnitt 2.2 der Beleuchtungsstrahlengang und in Abschnitt 2.3 die Detektion beschrieben. Schließlich wird in Abschnitt 2.4 die Ansteuerung der elektronischen Komponenten beschrieben.

## 2.1. Probenhalter

Der Probenhalter wurde speziell für die Beobachtung von Zebrafischlarven gebaut. Die Larve ist in einem Medium aus Agarose mit sehr niedriger Gelierungstemperatur (A2576, Sigma-Aldrich) eingebettet, welches sich wiederum in einem Kunststoffröhrchen aus Perfluorethylenpropylen (FEP) befindet (Bohlander GmbH). Das Röhrchen wird horizontal im Probenhalter (siehe Abbildung 2.1) fixiert und in eine mit Wasser gefüllte Kammer getaucht. FEP hat den Vorteil, dass sein Brechungsindex von etwa  $n_{FEP} = 1,34$  [10] sehr nahe an dem von Wasser ( $n_{Wasser} = 1,33$  [24]) liegt, wodurch geringere Aberrationen durch das Röhrchen entstehen als dies bei einem Rohr aus Glas der Fall wäre. Auch der Brechungsindex von Agarose ( $n_{Agarose} = 1,33$  bei einer Konzentration von 1,5% [32]) unterscheidet sich nur geringfügig von dem des Wassers.

Das Röhrchen ist an beiden Enden im Halter fixiert. Ein Loch unter dem Röhrchen erlaubt eine Beleuchtung der Larve mit Durchlicht. Die horizontale Befestigung hat den Vorteil, dass Fischlarven in dem Röhrchen in einer für sie natürlichen Position gehalten werden. Dies ist wichtig für Langzeituntersuchungen zur Entwicklung der Larven, da bei einer unnatürlichen Lagerung ein unerwünschter Einfluss auf das Wachstum nicht ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 2.1.:** Fotografie des Probenhalters.

## 2.2. Beleuchtungsstrahlengang

Eine Übersicht des Beleuchtungsstrahlenganges findet sich in Abbildung 2.2. Es stehen zwei gegenläufige Beleuchtungsarme zur Verfügung. Die Beleuchtungsobjektive (CFI APO 40XW NIR NA0.8 3.5 mm WD water dipping, Nikon) befinden sich zusammen mit je zwei Linsen des Scanrelais (55-S120-16T-600-1300nm, Special Optics) und den Scanspiegeln (PI S334 Piezoscanner, Physikinstrumente) auf einer Grundplatte, welche mithilfe eines motorisierten Linearverstellers (M405, Thorlabs) bewegen lässt. Da-

mit können die Brennpunkte der Objektive gegeneinander verschoben werden und somit entweder überlappen oder nebeneinander positioniert werden. Werden die Brennpunkte nebeneinander gelegt, vergrößert sich das Sichtfeld, was insbesondere bei der Beleuchtung mit Gaußstrahlen vorteilhaft ist. Dadurch können zum Beispiel beide Seiten des Optischen Tektums einer Zebrafischlarve gleichzeitig beobachtet werden. Näheres hierzu findet sich in Abschnitt 5.3. Bei Verwendung zweier Gaußstrahlen mit gleichen Strahlparametern verdoppelt sich effektiv das Sichtfeld. Werden die Brennpunkte übereinander gelegt, wird die Probe homogener ausgeleuchtet. Dadurch können Schatten reduziert werden, die durch Objekte im Strahlengang hervorgerufen werden. Dies ist jedoch nur sinnvoll, wenn die Menge des in der Probe gestreuten Lichts entlang beider Beleuchtungspfade relativ gering ist. Möchte man zum Beispiel eine Region nahe der Oberfläche im Kopfbereich einer Zebrafischlarve beobachten, so muss einer der Beleuchtungsstrahlen häufig einen Großteil des Körpers passieren. Dadurch wird er so stark gestreut, dass die Bildqualität insgesamt sinkt, da nun Bereiche außerhalb der Fokusebene des Detektionsobjektives beleuchtet werden.

In Abbildung 2.2a ist eine schematische Darstellung des ursprünglichen Beleuchtungsstrahlengangs abgebildet. Laser 1 mit variabler Wellenlänge wird zunächst mit einem Strahlaufweiter, bestehend aus zwei Parabolspiegeln

(MPD254254-90-M01 und MPD254508-90-M01, Thorlabs), auf den doppelten Durchmesser aufgeweitet. Durch die Verbreiterung des Strahldurchmessers sinkt die Strahltaile des fokussierten Strahls (siehe Gleichung (1.11)). Mit zwei  $\frac{\lambda}{2}$ -Platten (8-9014-1/2-700-1550nm, Special Optics) wird die Polarität des Lasers um einen festen Winkel gedreht. Die  $\frac{\lambda}{2}$ -Platten sind jeweils in einer motorisierten Rotationseinheit (PRM1/MZ8E, Thorlabs) eingefasst, was die Drehung der Rotation um einen beliebigen Winkel erlaubt. In Kombination mit einem polarisierenden Strahlteilerwürfel (CM1-PBS253, Thorlabs), welcher Licht mit jeweils einer bestimmten Polarisation entweder seitlich reflektiert oder gerade passieren lässt, kann somit die Laserleistung auf zwei Strahlen aufgeteilt werden. Im ursprünglichen Aufbau wurden zwei solcher Paare aus  $\frac{\lambda}{2}$ -Platte und Strahlteiler verwendet, wobei das erste dazu diente, die Gesamtleistung des Systems zu regulieren. Dieses wurde entfernt, da diese optischen Elemente zwangsläufig zu Verlusten der Leistung führen und die Gesamtleistung auch über den Laserausgang kontrolliert werden kann.

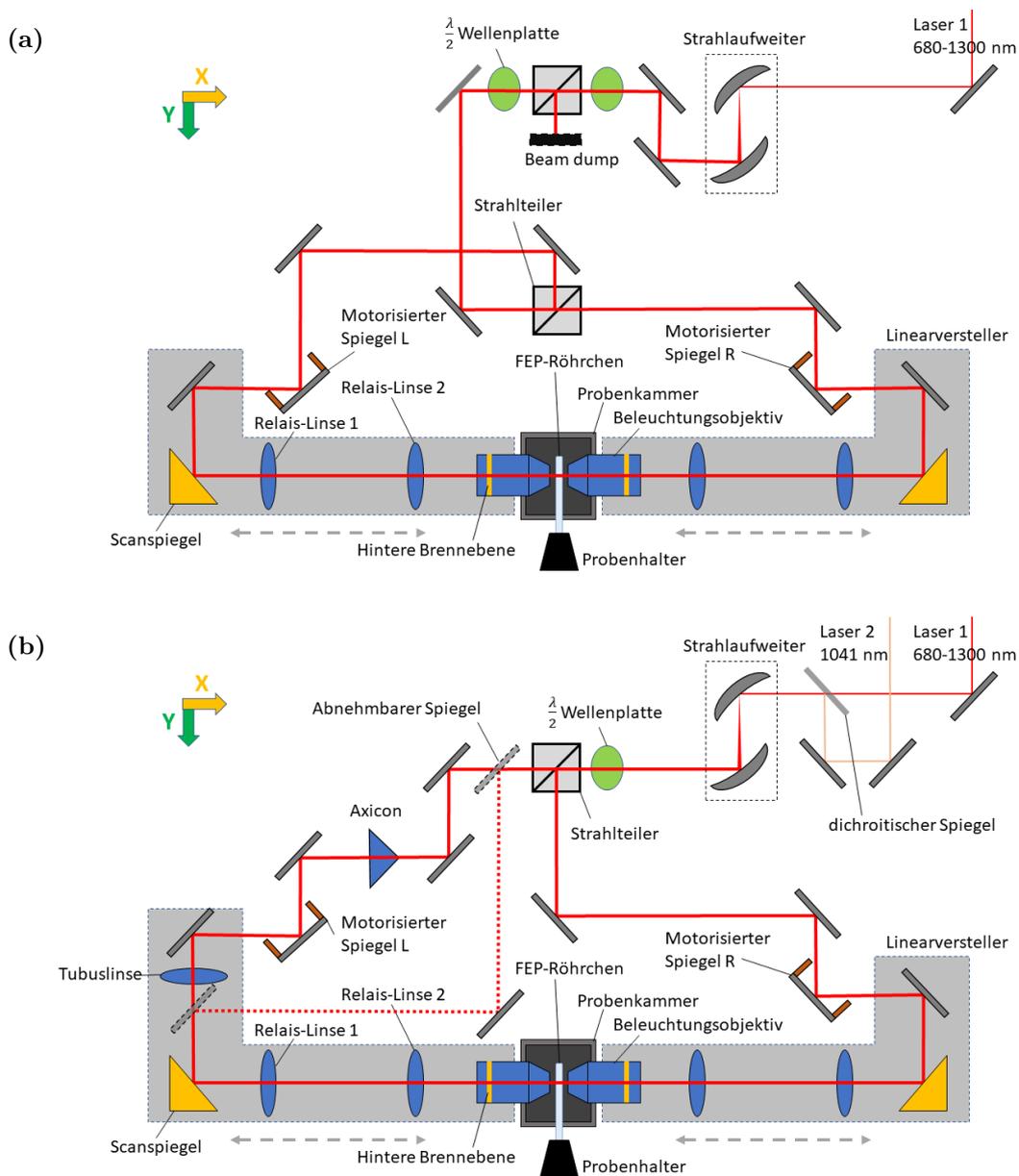
Mit dem zweiten Paar wird die Leistung auf die beiden Beleuchtungsarme aufgeteilt. In jedem Beleuchtungsarm ist jeweils ein Spiegel mit zwei motorisierten Aktuatoren (Z806, Thorlabs) platziert. Dadurch können diese Spiegel mithilfe der Steuerungssoftware des Mikroskops entlang zweier Achsen verkippt werden. In jedem Beleuchtungsarm wird

die Lichtscheibe mit einem Scanspiegel erzeugt (siehe Abschnitt 3.3). Die Auslenkung des Strahls wird anschließend durch ein Scanrelais in 4f-Konfiguration in die hintere Brennebene des Beleuchtungsobjektiv übertragen. Die hier parallelen Strahlen werden anschließend von dem Objektiv auf eine Position in der Probenkammer fokussiert, welche proportional zur Spiegelauslenkung ist.

Eine schematische Darstellung der Beleuchtung nach den Umbauarbeiten findet sich in Abbildung 2.2b. Durch den Umbau hat sich die Gesamtlänge beider Beleuchtungsarme um etwa 160 cm von 393 cm auf 233 cm verkürzt. Ein kürzerer Strahlengang erhöht die Langzeitstabilität des Systems, da der Austrittswinkel des Lasers zwangsläufig mit der Zeit schwankt und somit zu einer Translation des Strahls orthogonal zur Ausbreitungsrichtung führt. Diese Translation ist proportional zur Länge des Strahlengangs und führt in der Probenkammer zu einer Defokussierung des Systems, da sich der Abstand zwischen der Lichtscheibe und der Fokusebene des Detektionsobjektivs verändert. Außerdem führt dies zu einer Desynchronisierung zwischen Laserstrahl und konfokalem Schlitzdetektor, worauf in Kapitel 8 näher eingegangen wird.

Von Jana Bürgers wurde der Strahl des zweiten Laserausgangs (Laser 2) mit zwei weiteren Justagespiegeln, sowie einem dichroitischen Spiegel in den Strahlengang eingekoppelt. Die Beleuchtung der Probe bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen erlaubt die gleichzeitige Anregung verschiedener Fluorophore.

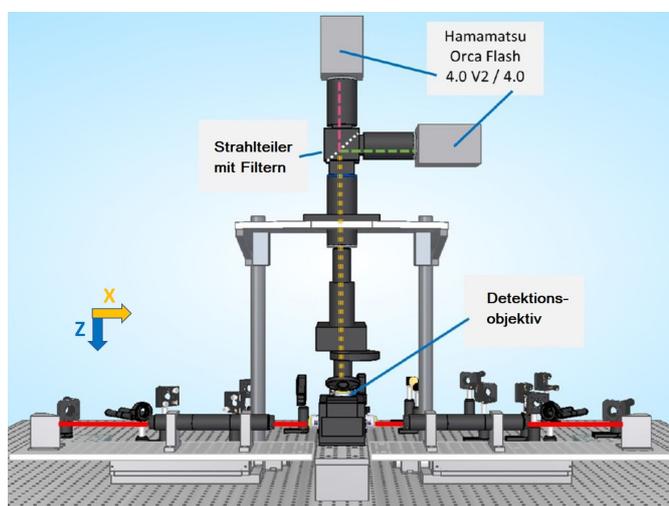
Im linken Beleuchtungsarm wurden zusätzliche Optiken zur Generierung eines Besselstrahls eingebaut. Diese sind ein Axicon (AX1205-B/Ar 650-1050 nm, Thorlabs), welches den Gaußstrahl in einen Besselstrahl umformt, und eine achromatische Doubletlinse (ACA254-200-B/AR 650-1050 nm, Thorlabs), mit dessen Hilfe der Besselstrahl in die Probenkammer übertragen wird. Hierauf wird in Abschnitt 4.2.2 näher eingegangen. Mithilfe zweier abnehmbarer Spiegel (KS1R, Thorlabs) können diese Optiken umgangen werden und die Probe mit dem ursprünglichen Gaußstrahl beleuchtet werden.



**Abbildung 2.2.:** Schematische Darstellung des Beleuchtungsstrahlengangs. **(a):** Ursprünglicher Aufbau zu Beginn der Arbeit. **(b):** Aufbau nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Umbauten.

## 2.3. Detektion

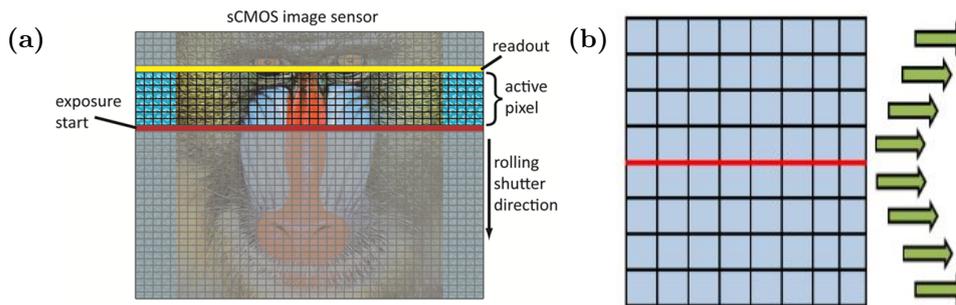
Eine schematische Darstellung der Detektionseinheit ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Orthogonal zu den beiden Beleuchtungsobjektiven, befindet sich das Detektionsobjektiv (CFI APO 40XW NIR NA0.8 3.5mm WD water dipping, Nikon), welches das Fluoreszenzlicht sammelt. Das Objektiv ist an einem Piezo Focus (PIFOC) (PI PD72Z4CAA, Physikinstrumente) mit einem Fahrbereich von 400 nm aufgehängt. Mit dem PIFOC kann sowohl das System fokussiert werden, als auch das Objektiv parallel zur Lichtscheibe entlang der Z-Achse bewegt werden, um so schnelle 3D-Aufnahmen zu ermöglichen. Der PIFOC wiederum wird von einem motorisierten Fokusblock mit Objektivrevolver (MGZ30-MOT, Thorlabs) gehalten, mit welchem das System grob fokussiert werden kann. Oberhalb des Fokusblocks befindet sich ein motorisiertes Filterrad (FW102C, Thorlabs), welches mit bis zu 6 Emissionsfiltern bestückt werden kann. In der Praxis wird jedoch mindestens eine Position unbesetzt gehalten, da diese Filter bei gleichzeitiger Zwei-Farben-Anregung nicht verwendet werden. Das gesammelte Licht wird mit einer Tubuslinse (ITL200, Nikon) auf den Kamerachip fokussiert. Zwischen Tubuslinse und Kamera wurde von Jana Bürgers ein System zur Strahlteilung (TwinCam, Cairn Research) installiert. In die TwinCam können ein Infrarot-Filter zum Blockieren des Anregungslichtes, sowie ein dichroischer Strahlteilerwürfel installiert werden. Letzterer separiert das Licht in Abhängigkeit von der Wellenlänge und verteilt es auf die beiden Kameras (Orca Flash 4.0 V2, Hamamatsu).



**Abbildung 2.3.:** Schematische Darstellung der Detektion. Modifiziert aus [9].

### 2.3.1. Konfokale Detektion mit einem virtuellen Schlitz

Für die Detektion werden Kameras mit einem scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor (sCMOS) Bildsensor verwendet, welcher eine Weiterentwicklung des CMOS-Bildsensors ist. Jeder Pixel eines CMOS-Bildsensors besitzt eine eigene Verstärkereinheit zum Auslesen des Spannungssignals. sCMOS-Sensoren können meist in zwei verschiedenen Modi betrieben werden. Im *Global Shutter* Modus werden alle Pixel gleichzeitig belichtet. Die Kameras in diesem Mikroskop werden im *Rolling Shutter* Modus betrieben. Dessen Funktionsweise wird in Abbildung 2.4a skizziert.



**Abbildung 2.4.:** Schema des Bildsensors. **(a):** Prinzip des *Rolling Shutters*. Aus [4]. **(b):** Ausleseverfahren des verwendeten Sensors im *Area* Modus. Aus [38].

Hier wird zunächst nur die oberste Pixelzeile aktiviert und belichtet. Nach Ablauf einer Aktivierungszeit  $t_A$  wird die nächste Zeile aktiviert. Die Dauer der Belichtung jeder Zeile beträgt  $N \cdot t_A$ . Danach wird die Spannung aller Pixel in der Zeile ausgelesen. Da die Belichtungszeit um  $N$  größer als die Aktivierungszeit  $t_A$  ist, entsteht somit ein Band aus  $N$  aktiven Pixelreihen, welches sich von oben nach unten entlang des Detektors bewegt. In der Lichtscheibenmikroskopie kann der *Rolling Shutter* auch zur konfokalen Detektion verwendet werden. Das aktive Pixelband entspricht effektiv einem virtuellen konfokalen Schlitz, welcher entlang des Bildsensors bewegt wird. Um eine konfokale Detektion zu erreichen, muss folglich der Anregungslaser parallel zum *Rolling Shutter* bewegt werden, wodurch die Detektion auf die aktuelle Position der Beleuchtung beschränkt wird. Diese Art der Detektion wird auch *Lightsheet* Modus genannt.

Die Aufnahme ohne konfokale Detektion wird hingegen als *Area* Modus bezeichnet. Um die Aufnahme rate in diesem Fall zu erhöhen, besteht der Bildsensor des verwendeten Kamertyps aus zwei Untereinheiten, welche simultan ausgelesen werden. Startend in der Mitte, wird der Sensor zeilenweise nach oben und unten ausgelesen. Dies wird in Abbildung 2.4b veranschaulicht. Aufgrund des *Rolling Shutter* ist die maximale Aufnahme rate der Kamera abhängig von der vertikalen Bildbreite (siehe Tabelle A.1).

## 2.4. Ansteuerung der Komponenten

Die meisten elektronischen Komponenten des Mikroskops sind per USB-Schnittstelle mit dem Computer verbunden. Die beiden Kameras sind über je zwei CameraLink-Kabel (Hamamatsu) mit einer PCIe-Karte (Frame Grabber CameraLink, Hamamatsu) im Rechner verbunden. Zusätzlich wird ein multifunktionales Datenerfassungsgerät (PXI-1033, National Instruments) verwendet. Dieses dient als Chassis für zwei modulare Messgeräte (PXI-6733 und PXI-6220, National Instruments), mit welchen analoge und digitale Signale erzeugt und erfasst werden können. Über die analogen Ausgänge wird die zeitliche Auslenkung der Scanspiegel und des PIFOCs gesteuert. Zwei weitere Ausgänge werden zum Triggern der Kameras benutzt. Auf diese Weise können die Kameras mit den Scanspiegeln synchronisiert werden. Zusätzlich ist der Triggerausgang einer der beiden Kameras mit einem digitalen Eingang des Messgerätes verbunden. Somit kann optional das Ausgangssignal der Kamera zum Triggern verwendet werden. Wird die Kamera nicht extern getriggert, erhöht sich ihre maximale Bildrate im *Area* Modus. Dies ist jedoch im *Lightsheet* Modus zumeist nachteilig, da in diesem Fall die Spiegel nur mit Verzögerung angesteuert werden können.

Die zur Kontrolle des Systems geschriebene Software wird in Kapitel 3 beschrieben.

## 3. Kontrollsoftware

Die Software zur Steuerung des Mikroskops wurde mit dem Programmiersystem LabVIEW 2014 (National Instruments) entwickelt. LabVIEW besteht aus einem Frontpanel, welches als Benutzerschnittstelle dient und einem Blockdiagramm, welches den grafischen Programmcode enthält.

Viele Hersteller stellen vorgefertigte Programme für die Ansteuerung ihrer Bauteile in der LabVIEW-Umgebung bereit. Dieser Umstand und die grafische Programmieroberfläche erlauben das schnelle Erstellen komplexer Programme zur Steuerung des Mikroskops.

Die mit LabVIEW geschriebenen Kontrollprogramme befinden sich auf insgesamt drei Rechnern. Mit dem Hauptprogramm werden alle Komponenten mit Ausnahme der Laserquelle gesteuert. Darüber hinaus dient es der Datenerfassung mit der ersten Kamera. Auf einem zweiten Rechner befindet sich ein Programm zur Datenerfassung mit der zweiten Kamera. Es erhält dazu die entsprechenden Befehle vom Hauptprogramm über ein Netzkabel.

Auf einem dritten Rechner befindet sich ein unabhängiges Programm, welches zum zeitversetzten Starten des Lasers verwendet wird. Der Laser wird im regulären Betrieb über ein proprietäres Programm gesteuert. Die verwendete Laserquelle benötigt nach dem Einschalten über dieses Programm etwa eine Stunde um Betriebstemperatur zu erreichen. Innerhalb dieser Zeitspanne steigt die Ausgangsleistung auf etwa das Doppelte des Anfangswertes und der Austrittswinkel des Lasers variiert stark. Es ist daher in dieser Zeit nicht empfehlenswert das Mikroskop zu benutzen. Um Wartezeiten vor dem Gebrauch des Instruments zu vermeiden, wurde ein Programm in LabVIEW geschrieben, mit dem der Laser zu einer gewünschten Zeit gestartet werden kann.

Im Folgenden werden einige wichtige Funktionen des Hauptprogramms betrachtet. In Abschnitt 3.1 wird die Aufnahme der Bilder beschrieben. Danach wird in Abschnitt 3.2 die Analyse des Laserstrahls anhand der detektierten Bilder erläutert. Schließlich wird in Abschnitt 3.3 dargelegt, wie die gerasterte Lichtscheibe generiert wird.

## 3.1. Bildaufnahme

Die Ansteuerung und das Auslesen der beiden Kameras erfolgt über die in LabVIEW geschriebene Software. In diesem Abschnitt wird erläutert, wie die aufgenommenen Bilder in Echtzeit betrachtet und gespeichert werden können. Darüber hinaus wird beschrieben, wie eine zweite Kamera zur simultanen Zwei-Farbandetektion verwendet werden kann.

### 3.1.1. Datenspeicherung

Je nach Art der Probe und der Aufnahmeart, kann die erzeugte Datenmenge stark variieren. Die aufgenommenen Bilder werden standardmäßig als Tagged Image File Format (TIFF)-Dateien gespeichert, da sie dabei nicht komprimiert werden und die Dateien somit nicht verlustbehaftet sind. Aus diesem Grund ist das TIFF-Format bei vielen Anwendungen mit hohem Anspruch an die Bildqualität verbreitet. Eine einzelne TIFF-Datei kann aus einem oder mehreren Bildern bestehen. Den Bildern vorangestellt ist ein sogenannter Header. In diesem sind Informationen über die darauffolgenden Bilder gespeichert. Dazu gehören die Bildgröße und die Offset-Werte, welche die Positionen der einzelnen Bilder in der Datei referenzieren. Auch andere Metadaten können gespeichert werden. Ein Nachteil des TIFF-Formates ist die begrenzte unterstützte Dateigröße. So sind die Offset-Werte in 32 Bit gespeichert und können somit nur Werte zwischen 0 und  $2^{32} - 1$  annehmen. Dies begrenzt die unterstützte Dateigröße auf etwa 4,3 GB. Mit der verwendeten Kamera können Einzelbilder mit einer maximalen Auflösung von 2048 x 2048 Pixeln aufgenommen werden, was etwa 8 MB an Speicherplatz entspricht. Das bedeutet, dass Bildstapel mit voller Auflösung im TIFF-Format auf etwa 537 Bilder begrenzt sind. Da mit dem verwendeten Mikroskop Aufnahmezeiten von bis zu 30 Hz möglich sind, entspräche dies einer maximalen Aufnahmedauer von etwa 18 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Header in LabVIEW implementiert, mit dem die Daten im BigTIFF-Format gespeichert werden können. Dieses Format ähnelt TIFF, jedoch verwendet BigTIFF 64 Bit Offset-Werte und kann somit erheblich größere Dateien referenzieren. Allerdings ist TIFF wesentlich verbreiteter als BigTIFF und mehr Bildbearbeitungsprogramme unterstützen dieses. Daher wird das BigTIFF-Format bei der Datenaufnahme nur verwendet, falls dies nötig ist. Die Kontrollsoftware berechnet vor der Bildaufnahme, ob die zu erwartende Datenmenge über oder unterhalb der 4,3 GB Schwelle liegt.

## Geschwindigkeit der Datenspeicherung

Um große Mengen an Daten in hoher Geschwindigkeit speichern zu können, unterstützt die verwendete Kamera das direkte Schreiben der Bilder auf die Festplatte. Da hierfür ein proprietäres Dateiformat des Kameraherstellers verwendet wird, muss die Datei anschließend in TIFF umgewandelt werden. Bei der Speicherung im proprietären Format traten jedoch bei großen Datenmengen häufig Fehler beim Schreiben auf. Aus diesem Grund wurde die Datenspeicherung so implementiert, dass nur Bündel von jeweils maximal 50 Bildern in diesem Format gespeichert werden. Bei der Umwandlung in TIFF werden diese Bündel dann in eine Datei zusammengefügt.

Bei der schnellen Bildaufnahme hat sich die Schreibrate der Festplatte als unzureichend herausgestellt. Es handelt sich hier um ein Hard Disk Drive (HDD)-System mit 18 TB Speicherplatz. Bei maximaler Auflösung und Aufnahmezeit müssen bis zu 240 MB an Daten pro Sekunde geschrieben werden. Dies liegt deutlich über der maximalen Schreibgeschwindigkeit der HDD-Festplatte von 171 MB pro Sekunde. Die Daten werden daher zunächst im proprietären Dateiformat auf eine Solid-State-Drive (SSD)-Festplatte geschrieben, auf welcher sich auch das Betriebssystem des Computers befindet. Diese bietet eine Schreibgeschwindigkeit von bis zu 480 MB pro Sekunde, was für das verwendete Mikroskop mehr als ausreichend ist. Bei der Übertragung auf die HDD erfolgt dann die Umwandlung in das TIFF-Format.

### 3.1.2. Simultane Zwei-Farbendetektion

Durch die simultane Benutzung von zwei Kameras ist es möglich, zwei Farbkanäle gleichzeitig aufzunehmen. Der Kamerahersteller empfiehlt, je eine Kamera mit einem Computer zu benutzen. Daher werden die beiden Kameras von zwei separaten PCs angesteuert. Der erste Rechner (PC1) dient dabei gleichzeitig zur Steuerung des Systems (Master) und ist mit allen anderen Komponenten verbunden. Für den zweiten Rechner (PC2) wurde in LabVIEW eine weitere Kontrollsoftware (Slave) entwickelt, welche hauptsächlich für die Datenerfassung mit der Kamera verwendet wird. Zusätzlich kann der zweite Rechner auch für die Autofokussierung benutzt werden. Die beiden Rechner sind über ein Netzwerkkabel miteinander verbunden. Über dieses können die beiden Kontrollprogramme mit dem Protokoll User Datagram Protocol (UDP) miteinander kommunizieren. In der Praxis werden hierfür zumeist Befehle in Form einer Zeichenkette (String) von PC1 an PC2 gesendet. Zusätzlich beinhalten die Befehle Informationen wie die Anzahl der aufzunehmenden Bilder, die Belichtungszeit oder den Bildausschnitt auf dem Bildsensor der Kamera. Bei der Datenübertragung kann es vorkommen, dass ein Befehl nicht korrekt

empfangen wurde. Aus diesem Grund enthält jeder Befehl zusätzlich einen Zeitstempel und wird in einer Textdatei auf PC2 gespeichert. Diese wird vom Slave-Programm periodisch ausgelesen und der Zeitstempel des zuletzt empfangenen Befehls wird mit dem neuesten Zeitstempel in der Datei verglichen. Ist der gespeicherte Stempel in der Datei aktueller, wird der Befehl aus der Datei verarbeitet, als wäre er über das UDP-Protokoll empfangen worden.

Bei der Aufnahme von Bildstapeln schreibt das Slave-Programm außerdem die zuletzt aufgenommene Bildnummer in eine Textdatei auf PC1. Diese wird vom Master-Programm ausgelesen und mit der erwarteten Bildnummer verglichen. Erst wenn diese miteinander übereinstimmen, wird über ein Triggersignal die nächste Bildaufnahme gestartet. Dadurch wird verhindert, dass die zweite Kamera noch nicht für die neue Aufnahme bereit ist, da bis zu diesem Zeitpunkt der Triggereingang der Kamera blind geschaltet ist.

### 3.1.3. Echtzeitansicht

Neben der Aufnahme von Bildstapeln, kann mit dem Kontrollprogramm auch eine Echtzeitwiedergabe des aktuell von der Kamera aufgenommenen Bildes betrachtet werden. Dies ist nützlich zur Justage des Lasers und um geeignete Probenregionen auszuwählen. Die Echtzeitansicht läuft dabei parallel zu den restlichen Programmfunktionen, damit diese nicht durch erstere gestört werden.

#### Multipositionen-Echtzeitansicht

Mithilfe der Zweiachsen-Scanspiegel und des PIFOCs kann die betrachtete Z-Ebene schnell verändert werden. Um sich einen besseren Überblick der Probe in 3D zu verschaffen, können bis zu sechs verschiedene Z-Ebenen quasi gleichzeitig in sechs Fenstern betrachtet werden. Die gewünschten Z-Ebenen werden in eine Liste eingegeben und anschließend von dem Mikroskop angesteuert. Dabei ist es möglich, diese Ebenen auch während der Echtzeitansicht zu ändern.

Die Multipositionen-Echtzeitansicht kann alternativ auch zur gleichzeitigen Betrachtung, der von den beiden Kameras aufgenommen Bilder, auf PC1 benutzt werden. Dazu wird das Bild von PC2 als TIFF-Datei auf der SSD von PC1 zwischengespeichert. Dieses wird dann von dem Kontrollprogramm auf PC1 gelesen.

In den Fenstern werden dann die folgenden Aufnahmen simultan angezeigt:

1. Bild von PC1
2. Bild von PC2
3. Summe der Bilder
4. Mittelwert der Bilder
5. Differenz der Bilder
6. Alternierend das Bild von PC1 oder PC2

Insbesondere die alternierende Ansicht eignet sich dabei gut um die Aufnahmen der Kameras zum Überlappen zu bringen. Falls sich die Intensitäten der beiden Bilder stark unterscheiden, kann ihre Helligkeit zuvor normalisiert werden.

## 3.2. Strahlanalyse

Um eine, wie in Abschnitt 2.3.1 beschriebene, konfokale Detektion zu erreichen, muss das Mikroskop zunächst kalibriert werden. Dabei müssen zwei Aspekte betrachtet werden:

1. Die Ausbreitungsrichtung des Strahls muss orthogonal zur Scanrichtung sein.
2. Die Auslenkung des Laserstrahls in Scanrichtung muss bekannt sein.

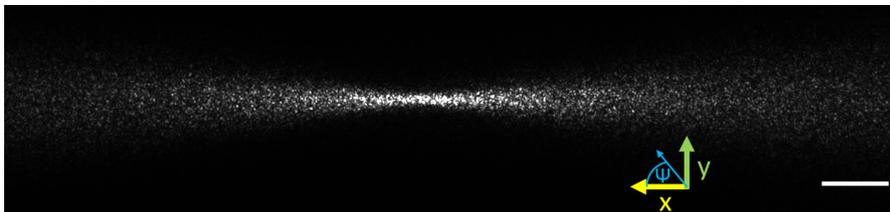
Um dies zu gewährleisten, muss vor jeder Aufnahme die Lage des Laserstrahls in der Probenkammer analysiert werden. Hierfür wird ein Bild des, in einem homogenen Medium gestreuten, Lichts des Lasers aufgenommen. Als Streumedium kann die Wand des FEP-Röhrchens oder die im Röhrchen befindliche Agarose verwendet werden.

Hier wird zunächst beschrieben, wie die aufgenommenen Bilder analysiert werden, um Informationen über den Laserstrahl zu erhalten. Danach wird in Abschnitt 3.2.2 demonstriert, wie aus den zweidimensionalen Aufnahmen die dreidimensionale Lage des Strahls rekonstruiert werden kann.

### 3.2.1. Strahlanalyseprogramm

Mit dem hier beschriebenen Unterprogramm kann der Laserstrahl anhand der aufgenommenen Bilder in Echtzeit analysiert werden. Dabei muss zuerst ausgewählt werden, ob das gemessene Profil das eines Gauß- oder Besselstrahls ist. Außerdem muss angegeben werden, ob Einphotonen- oder Zweiphotonenanregung verwendet wird. In Abbildung 3.1

ist beispielhaft das 1P-Profil eines Gaußstrahls abgebildet. Detektiert wurde das in der Wand eines FEP-Röhrchens gestreute Licht. Eingezeichnet sind die Scanrichtung (Y) und die Strahlpropagationsrichtung (X).



**Abbildung 3.1.:** Gestreutes Licht eines Gaußstrahls in der Wand eines FEP-Röhrchens. Skala 25  $\mu\text{m}$ .

Um die Rechenzeit für die Analyse in Echtzeit zu reduzieren, kann das Bild in einem ersten Schritt in horizontaler Richtung verkleinert werden, indem über eine gewünschte Anzahl  $d_h$  Spalten gemittelt wird. Mit dem Programm können folgende Größen des Strahls ermittelt werden:

1. Vertikale (Y) und axiale (X) Position der Strahltaile
2. Strahlradius  $\omega(x)$  entlang der Strahlpropagation
3. Verkippung  $\Psi$  in der Bildebene
4. Axiale Halbwertsbreite (FWHM)
5. Reyleighlänge  $Z_R$  bei Gaußstrahlen
6. Weglänge  $Z_{max}$  bei Besselstrahlen

### Vertikale Position (Y) des Strahls und Strahlverkippung $\Psi$ in der Bildebene

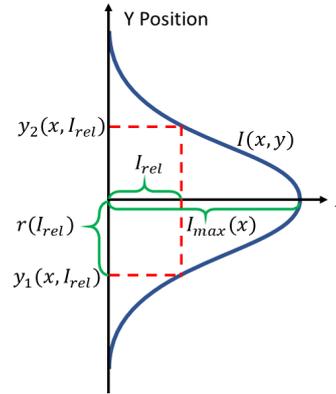
Um die Y-Position des Strahls zu detektieren, wird für jede X-Position die Lage des Pixels mit der höchsten Intensität bestimmt. Dies dient als erste Näherung der Lage der radialen Strahlmitte. Anschließend wird in Y-Richtung nach dem Pixel vor und hinter dem Maximum gesucht, bei dem die Intensität auf ein charakteristisches Maß  $I_{rel}$  der Maximalintensität  $I_{max}(x)$  abgefallen ist. Dafür wurden für  $I_{rel}$  die Werte 0,5,  $\frac{1}{\sqrt{e}} \approx 0,607$  und 0,7 gewählt. Damit ergeben sich für jede X-Position sechs charakteristische Positionen  $y_i(x, I_{rel})$ , deren Mittelwert eine bessere Näherung der jeweiligen radialen Strahlmitte darstellt (siehe Abbildung 3.2).

Alternativ kann die Strahlmitte über eine Gaußanpassung bestimmt werden. Dies erfordert jedoch deutlich mehr Zeit und hat sich als störanfälliger gegenüber Rauschen erwiesen. Die Rechenzeit wird in Abschnitt 3.2.1 verglichen.

Aus den radialen Mittelpunkten lässt sich nun mithilfe einer linearen Anpassung die Lage der Strahltaile  $c_{Strahl}(x)$  als Funktion der X-Position bestimmen. Dabei ist zu beachten, dass die Intensität des Strahls mit zunehmendem Abstand von der Strahltaile in axialer Richtung abnimmt.

Wenn die Intensität zu sehr abnimmt, wird das Signal zu schwach um daraus den Strahl zu rekonstruieren. Dies ist insbesondere bei Zweiphotonenanregung der Fall und diese

Positionen werden vor der Anpassung herausgefiltert. Aus der Steigung  $m_L$  der Anpassung folgt die Strahlverkipfung orthogonal zur Detektionsrichtung zu  $\phi_{orth} = \tan(m_L)$ . Zur Erhöhung der Genauigkeit wird die Anpassung mit der Intensität  $I(x)$  gewichtet.



**Abbildung 3.2.:** Radiale Strahlmitte.

### Strahlradius entlang der Strahlpropagation

Aus den in Abschnitt 3.2.1 bestimmten Positionen  $y_i(x, I_{rel})$  lässt sich der  $\frac{1}{e^2}$ -Strahlradius  $\omega(x)$  ableiten. Dazu werden zunächst die Radien  $r(I_{rel})$  der charakteristischen Werte  $y_i(x, I_{rel})$  gemessen. Das Verhältnis dieser Radien zu  $\omega_0$  ist abhängig von der verwendeten Strahlart. Für Gaußstrahlen folgt:

$$\frac{r_{Gau\beta}(I_{rel})}{\omega_0} = \sqrt{\frac{-\ln(I_{rel})}{2}} \quad (3.1)$$

Da das Quadrat einer Gaußfunktion wieder einer Gaußfunktion entspricht, ist Gleichung (3.1) auch bei Zweiphotonenanregung gültig. Jedoch ist zu beachten, dass nun der  $\frac{1}{e^2}$ -Strahlradius um den Faktor  $\sqrt{2}$  kleiner ist als bei Einphotonenanregung. Die Werte für Besselstrahlen hängen hingegen von der Anregungsart ab und wurden für diverse  $I_{rel}$  numerisch berechnet. Die Werte finden sich in Tabelle 3.1. Der so ermittelte  $\frac{1}{e^2}$ -Strahlradius als Funktion der X-Position ist in der Regel noch sehr verrauscht, weswegen er analog zu Abschnitt 3.2.1 geglättet wird.

$I_{rel}$	$\frac{1}{e^2}$	0,3	0,4	0,5	$\frac{1}{\sqrt{e}}$	0,7
$\frac{r_{Bessel}(1P)}{\omega_0}$	1	0,8191	0,7284	0,6429	0,5529	0,4713
$\frac{r_{Bessel}(2P)}{\omega_0}$	1	0,7964	0,7013	0,6143	0,5250	0,4454

**Tabelle 3.1.:** Charakteristische Radien von Besselstrahlen in Einheiten des  $\frac{1}{e^2}$ -Radius  $\omega_0$  für verschiedene relative Intensitäten  $I_{rel}$ .

### Position der Strahlteile und axiale Halbwertsbreite

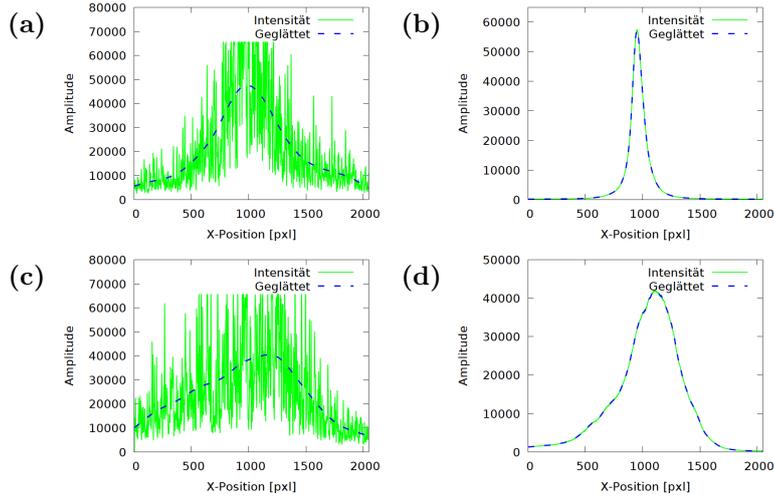
Um die Position der Strahlteile zu bestimmen, werden sowohl  $\omega(x)$  als auch die Strahlintensität in Propagationsrichtung  $I(x) = I(c_{Strahl}(x))$  berücksichtigt. Da die Reduzierung der Bildbreite um  $d_h$  mit einem Präzisionsverlust verbunden ist, wird hierfür  $I(x)$  aus dem Originalbild (mit  $d_h = 1$ ) entnommen. Je nach Strahlart ist  $I(x)$  mehr oder weniger verrauscht, weswegen auch hier eine Glättung vorgenommen wird. Um den Präzisionsverlust durch die Glättung gering zu halten, wird zuerst das relative Rauschlevel  $R_{rel}$  gemessen, welches wie folgt gemessen wird:

$$R_{rel}(I) = \frac{|I'(x)|}{\sum_x I(x)} \cdot 100 . \quad (3.2)$$

Hier ist  $I'(x)$  die Ableitung von  $I$  an der Stelle  $x$ .  $I'(x)$  wurde mit einer vorgefertigten Funktion in LabVIEW berechnet. Es hat sich experimentell herausgestellt, dass rauscharme Signale ein relatives Rauschen von etwa  $R_{rel} \approx 1$  besitzen, während stark verrauschte Signale etwa  $R_{rel} \approx 18$  besitzen. Deswegen wird  $I(x)$  wie folgt geglättet:

1. Herunterskalieren um den Faktor  $R_{rel}$ .
2. Zehnfache Faltung mit einem Gauß-Filter
3. Hochskalieren um den Faktor  $R_{rel}$ .
4.  $4R_{rel}$ -fache Faltung mit einem Gauß-Filter

Hierbei wurde  $R_{rel}$  zunächst zu einer Ganzzahl gerundet. In Abbildung 3.3 wird die Glättung von  $I(x)$  für vier verschiedene Strahlarten demonstriert. Die Strahlen mit 2P-Anregung wurden in einer Farbstofflösung (5(6)-Carboxyfluorescein, 21877, Sigma-Aldrich) aufgenommen. Die Strahlen mit 1P-Anregung wurden in der Wand des FEP-Röhrchens aufgenommen, wodurch auf diese Art das Mikroskop auf einfache Art für den Betrieb justiert werden kann. Da hier gestreutes Licht und keine Fluoreszenz detektiert wird, ist die Intensität entsprechend stark verrauscht.



**Abbildung 3.3.:** Rauschlevel  $R_{rel}$  für ausgewählte Strahlarten. **(a):** 1P-Gaußstrahl.  $R_{rel} = 18$ . **(b):** 2P-Gaußstrahl.  $R_{rel} = 1$ . **(c):** 1P-Besselstrahl.  $R_{rel} = 18$ . **(d):** 2P-Besselstrahl.  $R_{rel} = 1$ .

Die X-Koordinate der Strahltille wird schließlich wie folgt berechnet:

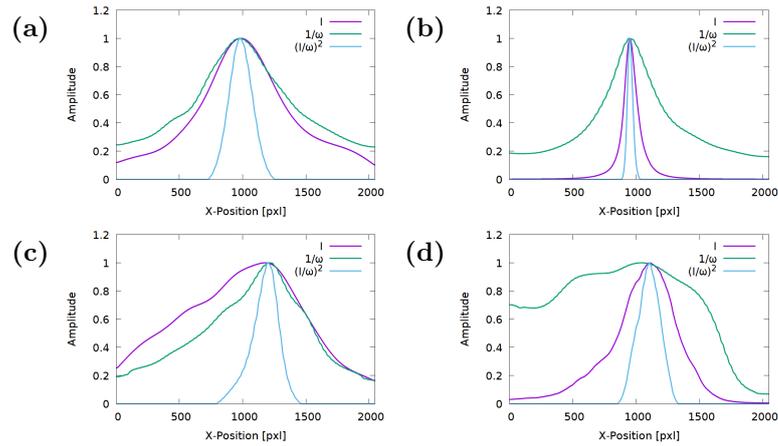
$$x_{center} = CoM \left( \frac{I^2(x)}{\omega^2(x)} \right). \quad (3.3)$$

Hier beschreibt  $CoM(f(x))$  den Massenschwerpunkt

$$CoM(f(x)) = \frac{\sum f(x) \cdot x}{\sum f(x)}. \quad (3.4)$$

Eine beispielhafte Bestimmung der X-Position der Strahltille für ausgewählte Strahlarten findet sich in Abbildung 3.4. Die Y-Koordinate  $y_{center}$  folgt durch Einsetzen von  $x_{center}$  in  $c_{Strahl}(x)$ . Die vertikale Strahlposition wird durch  $y_{center}$  definiert.

Aus der geglätteten Intensität  $I(x)$  lässt sich auch das axiale FWHM bestimmen. Dazu wird vom Maximum in beide Richtungen der Abstand zur nächsten Position mit der halben Amplitude gemessen.



**Abbildung 3.4.:** X-Position der Strahlteile für ausgewählte Strahlarten. **(a):** 1P-Gaußstrahl. **(b):** 2P-Gaußstrahl. **(c):** 1P-Besselstrahl. **(d):** 2P-Besselstrahl.

### Rechenzeit

In diesem Abschnitt wird die Rechenzeit des Strahlanalyseprogramms in Abhängigkeit der Bildverkleinerung  $d_h$  für verschiedene Strahlarten bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die Berechnung für jede Einzelmessung 20-mal wiederholt und gemittelt. Der Fehler der Messung entspricht der Standardabweichung. Es wurde unterschieden, ob die vertikale Strahlposition anhand des Mittelwerts der charakteristischen Positionen oder mit einer Gaußanpassung bestimmt wurde (siehe Abschnitt 3.2.1). Die gemessenen Rechenzeiten ohne Gaußanpassung finden sich in Tabelle 3.2.

$d_h$	1	2	4	8	16	32
Gauß 1P	32,2	20,8	15,2	14,8	11,3	10,8
Bessel 1P	34,1	22,9	17,4	14,9	13,6	13,0
Gauß 2P	31,2	19,9	14,4	12,1	11,6	11,1
Bessel 2P	32,5	21,2	16,0	13,1	11,8	11,3

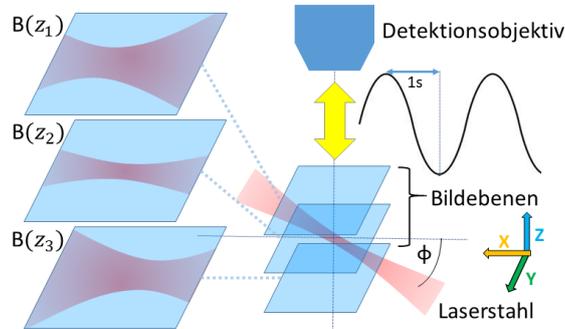
**Tabelle 3.2.:** Rechenzeit des Strahlanalyseprogramms in ms in Abhängigkeit von  $d_h$  für verschiedene Strahlarten. Fehler der Messung: 0,5 ms.

Wie man sieht, nimmt die Rechenzeit mit steigendem  $d_h$  ab. Die Rechenzeit ist außerdem deutlich höher, wenn eine Gaußanpassung zur Bestimmung der Y-Position verwendet wird. In diesem Fall ist die Rechenzeit außerdem abhängig von der Strahlart und steigt um mehr als das 20-Fache bei Verwendung von 2P-Absorption. Um eine schnelle Berechnung zu gewährleisten, erfolgt die Berechnung daher standardmäßig ohne Gaußanpassung.

### 3.2.2. Z-Position des Strahls und dreidimensionale Strahlverkipfung

Mithilfe des in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Analyseprogramms lassen sich die Lage und die Verkipfung des Laserstrahls um  $\Psi$  für verschiedene Strahlarten innerhalb der Bildebene des Mikroskops bestimmen. In der Realität ist der Strahl jedoch häufig auch orthogonal zur Bildebene um einen Winkel  $\Phi$  verkippt (siehe Abbildung 3.5).

Diese Verkipfung ist aus einer einzelnen Aufnahme des Strahls nicht unbedingt ersichtlich (siehe  $B(z_2)$  in Abbildung 3.5). Sie wirkt sich jedoch negativ auf die Bildqualität aus, da in diesem Fall die erzeugte Lichtscheibe nicht vollständig in der Fokalebene des Detektionsobjektivs liegt. Um dies zu vermeiden, wurde ein Unterprogramm entwickelt, das die Justage des Laserstrahls orthogonal zur Detektion unterstützt. Es liefert dabei In-



**Abbildung 3.5.:** Strahlverkipfung orthogonal zur Fokalebene des Detektionsobjektivs.

formationen über die Verkipfung  $\Phi$  in quasi-Echtzeit, mit deren Hilfe die Strahlverkipfung manuell mit den Justagespiegeln angepasst werden kann. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 3.5 skizziert. Zunächst wird das gestreute Licht des Laserstrahls in der Wand des FEP-Röhrchens detektiert. Alternativ kann auch das Röhrchen mit gehärteter Agarose gefüllt und das von dieser Agarose gestreute Licht verwendet werden. Das Detektionsobjektiv wird in einer Sinusform bewegt, wodurch dessen Fokalebene durch den Laserstrahl geführt wird. Dazu wird eine sinusförmige Eingangsspannung an den PIFOC gelegt. Während der Bewegung werden bei maximaler Aufnahmezeit (100 Hz) Bilder  $B(z)$  des Strahls aufgenommen und von dem Strahlanalyseprogramm in Echtzeit analysiert. Die Bilder werden um  $d_h = 4$  in X-Richtung verkleinert, wodurch die Analysezeit weniger als 18 ms pro Bild beträgt (siehe Tabelle 3.2). Aus den einzelnen Bildern  $B(z)$  wird die Z-Position der Strahltaile sowie der Winkel  $\Phi$  bestimmt. Um die Z-Position zu messen, wird der Strahlradius  $\omega_0(z)$  an der Strahltaile betrachtet. Diese erscheint umso breiter, je größer der Abstand zwischen der detektierten Z-Ebene und der tatsächlichen Z-Position der Taile ist (siehe Abbildung 3.5).

$\omega_0(z)$  ist exemplarisch in Abbildung 3.6 für einen Gaußstrahl als Funktion der Z-Position dargestellt. An diese Werte wird eine umgekehrte Gaußanpassung durchgeführt. Die Lage des Minimums dieser Anpassung entspricht der Z-Position des Strahls entlang der Detektionsrichtung.

Hier muss allerdings auch die Masse des Objektivs berücksichtigt werden. Aufgrund dieser entspricht die Position des Objektivs nicht exakt der vorgegebenen Spannung, sondern läuft dieser hinterher und ist um einen Offset  $\pm Z_{off}$  verschoben. Das Vorzeichen von  $\pm Z_{off}$  ist abhängig von der aktuellen Bewegungsrichtung. Aus diesem Grund wird die Z-Position sowohl bei Aufwärts- als auch Abwärtsbewegungen des Objektivs gemessen und die beiden Werte gemittelt, wodurch sich der Offset aufhebt. Bei einer Periodendauer von 2s wurde der Offset zu:

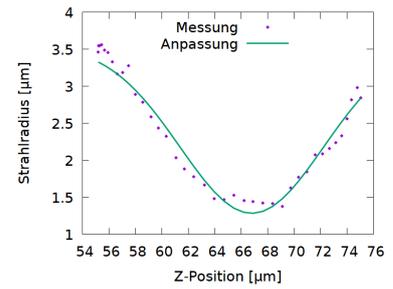
$$\pm Z_{off} = (0,14 \pm 0,03) \mu\text{m} \quad (3.5)$$

gemessen. Dabei wurde über 130 Perioden gemittelt.

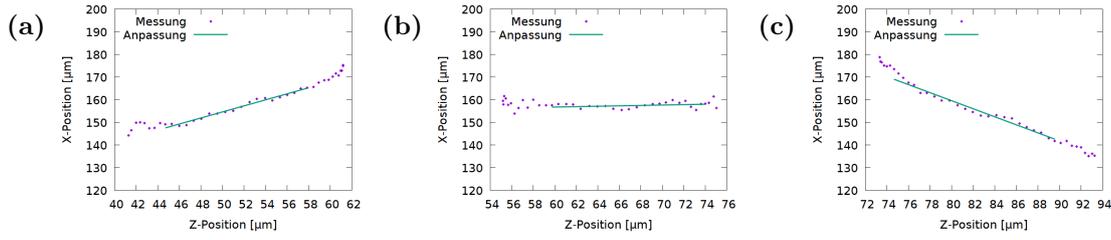
Die Messung der Strahlverkipfung benutzt zwei Ansätze, welche gleichzeitig gemessen und in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

### Verschiebung der Strahltaile entlang der X-Achse

Der erste Ansatz beruht auf der Messung der Verschiebung der Strahltaile entlang der X-Achse. Dafür wird die X-Position der Strahltaile für jedes Bild  $B(z)$  bestimmt und in einer Datenreihe gespeichert. Für eine Strahlverkipfung  $\Theta \neq 0^\circ$ , ändert sich diese mit der Z-Position (siehe Abbildung 3.5). Die gemessenen X-Positionen der Strahltaile sind in Abbildung 3.7 für einen Gaußstrahl bei unterschiedlichen Verkipfungen  $\Theta$  dargestellt. An die Positionen wurde eine lineare Anpassung  $A_l$  durchgeführt. Somit lässt sich aus der Verschiebung der Strahltaile in den Bildern  $B(z)$  die Verkipfung  $\Theta$  in quasi-Echtzeit abschätzen



**Abbildung 3.6.:**  $\omega_0(z)$  für verschiedene Z-Positionen.



**Abbildung 3.7.:** Verschiebung der Strahltaile entlang der X-Achse bei unterschiedlichen Winkeln  $\Phi$ . (a): Positive Verkippung. (b): minimale Verkippung. (c): Negative Verkippung.

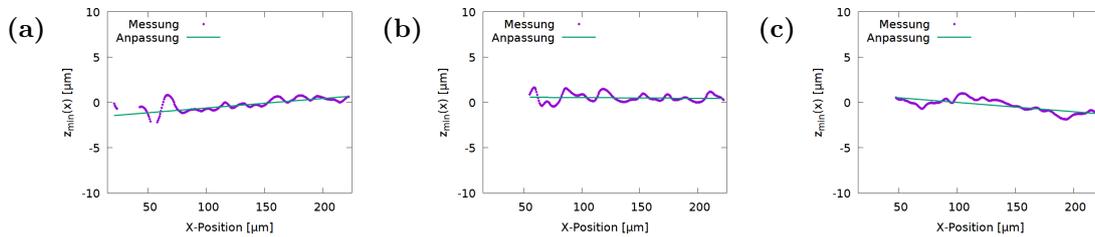
### Strahlbreite $\omega$ an jeder X-Position als Funktion der Z-Position

Der zweite Ansatz zur Messung von  $\Theta$  betrachtet die Strahlbreite  $\omega_x(z)$  an jeder X-Position des Bildstapels als Funktion der Z-Position.

Dazu werden für jede Bildebene  $z$  die Strahlbreiten  $\omega_z(x)$  berechnet. Anschließend werden diese in einem zweidimensionalen Array  $\omega(x, z)$  gespeichert. Aus diesem kann für jede X-Position ein Unterarray  $\omega_x(z)$  extrahiert werden. Nun kann für jedes  $\omega_x(z)$  die Position mit der minimalen Strahlbreite  $z_{min}(x)$  bestimmt werden. In Abbildung 3.8 ist  $z_{min}(x)$  für einen Gaußstrahl bei unterschiedlichen Verkippungen  $\Theta$  dargestellt. Die Steigung  $m$  einer linearen Anpassung an diese Daten liefert den Verkippungswinkel  $\Phi$ . Für diesen folgt:

$$\Phi = \tan^{-1}(m). \quad (3.6)$$

In Tabelle 3.3 ist der gemessene Winkel  $\Phi$  für Strahlen mit unterschiedlichen Verkippungen dargestellt. Es wurde über  $N$  Perioden gemittelt und der Messfehler für  $\Phi$  entspricht der Standardabweichung  $\sigma_\Phi$ . Wie man anhand von Tabelle 3.3 erkennt, konnte mit dieser Methode die Strahlverkippung  $\Phi$  auf weniger als  $\frac{1}{10}$  Grad genau bestimmt werden.



**Abbildung 3.8.:**  $z_{min}(x)$ . (a): Positive Verkippung. (b): minimale Verkippung. (c): Negative Verkippung.

	$\Phi$ [Grad]	$\sigma_\Phi$ [Grad]	# Z-Positionen	N
Gauss, aufsteigend	0,594	0,070	39	44
Gauss, gerade	0,009	0,059	39	40
Gauss, fallend	-0,761	0,086	39	52
Bessel, aufsteigend	0,742	0,078	39	37
Bessel, gerade	-0,032	0,057	39	27
Bessel, fallend	-0,714	0,067	39	44

**Tabelle 3.3.:** Bestimmung des Verkippungswinkels  $\Phi$  aus  $\omega_{min,z}(x)$

### 3.3. Erzeugung der gerasterten Lichtscheibe

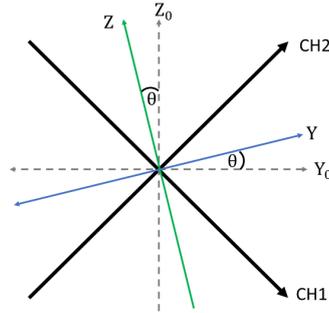
Zur Erzeugung der Lichtscheibe wird der Lichtstrahl mit den Zweiachsenscanspiegeln entlang der Y-Achse gerastert. Zusätzlich kann die Lichtscheibe orthogonal zur Bildebene in Z-Richtung verschoben werden. Eine parallele Bewegung des Detektionsobjektivs erlaubt dreidimensionale Aufnahmen, ohne die Probe zu bewegen. Dies ermöglicht deutlich höhere Aufnahmezeiten, da die maximale Geschwindigkeit, mit der die Probe bewegt werden kann, durch mehrere Faktoren limitiert wird. Hierzu zählt die maximale Geschwindigkeit der Translationseinheit, welche wiederum von verschiedenen Faktoren, wie z. B. dem Eigengewicht der Translationseinheit und dem Gewicht der Probe, abhängt. Außerdem muss die Probenhalterung ausreichend rigide konstruiert werden, um mechanische Verformungen durch die Beschleunigungskräfte zu vermeiden. Darüber hinaus kann sich eine zu schnelle Lageänderung negativ auf lebende Proben auswirken und bei diesen zu unerwünschtem Verhalten führen.

Zur Auslenkung des Lichtstrahls entlang zweier Achsen, können auch zwei orthogonal zu einander angeordnete Einachsenscanspiegel verwendet werden. Viele Hersteller bieten diese kombiniert in einem einzelnen Bauteil an. Um Platz zu sparen, sind die Spiegel in diesen Systemen eng hintereinander liegend verbaut und es befinden sich meistens keine weiteren optische Elemente zwischen ihnen. Dadurch bilden die Spiegel jedoch keine konjugierten Ebenen und der Lichtstrahl kann mit diesen Systemen nicht telezentrisch entlang beider Richtungen ausgelenkt werden. In mindestens einer der beiden Scanrichtungen führt die Auslenkung gleichzeitig zu einer Verkippung des Strahls. Um dies zu vermeiden, kann eine zusätzliche Relaisoptik zwischen den Spiegeln verwendet werden. Dies erfordert jedoch eine weiter auseinanderliegende Positionierung der Spiegel [51].

Mit einem Zweiachsenspiegel kann die Scanrichtung auch gegen die Bildebene verkippt werden, indem beide Achsen gleichzeitig bewegt werden. Somit kann z. B. eine Verkippung des Scanspiegels relativ zur Detektionsachse ausgeglichen werden, ohne den Spiegel als Ganzes drehen zu müssen.

### 3.3.1. Auslenkung der Spiegelachsen

Die Scanachsen CH1 und CH2 der verwendeten Spiegel sind um 45 Grad, bzw.  $\frac{\pi}{4}$  gegen die Achse  $Z_0$  verkippt.  $Z_0$  entspricht bei einer perfekten Positionierung des Spiegels der Detektionsrichtung  $Z$ . Möchte man den Laserstrahl in  $Y_0$ -Richtung orthogonal zu  $Z_0$  bewegen, müssen dementsprechend beide Achsen bewegt werden. Häufig sind die Spiegel um einen Winkel  $\Theta$  gegen die Detektionsrichtung  $Z$  verkippt (siehe Abbildung 3.9).



**Abbildung 3.9.:** Verkipfung der Scanachsen gegen die Detektionsrichtung  $Z$  (grüner Pfeil).

#### Auslenkung des Laserstrahls entlang der Y-Achse

Sei  $y_0$  die gewünschte Auslenkung des Strahls entlang  $Y_0$ . Dann folgt für die Auslenkungen  $A_{CH1}(y_0)$  und  $A_{CH2}(y_0)$  der Spiegelachsen CH1 und CH2:

$$A_{CH1}(y_0) = y_0 \cdot \cos\left(\frac{\pi}{4}\right) = \frac{y_0}{\sqrt{2}} \quad (3.7)$$

und

$$A_{CH2}(y_0) = y_0 \cdot \sin\left(\frac{\pi}{4}\right) = \frac{y_0}{\sqrt{2}}. \quad (3.8)$$

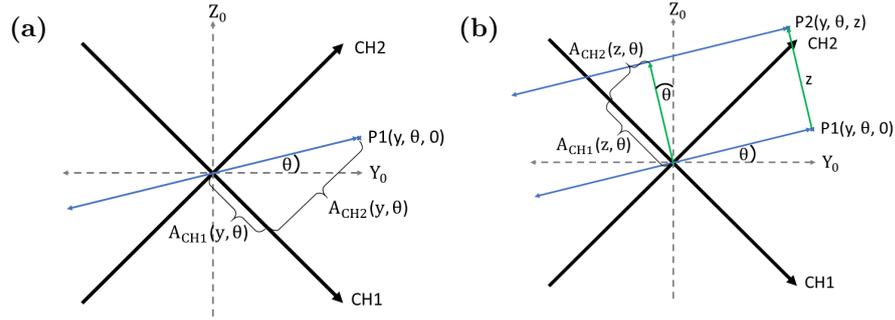
Da in der Praxis die Detektionsrichtung  $Z$  häufig nicht mit  $Z_0$  übereinstimmt, kann die Scanachse  $Y$  um den Winkel  $\Theta$  gegenüber  $Y_0$  verkippt werden. Um den Strahl zu Punkt  $P1(y, \Theta)$  zu bewegen (siehe Abbildung 3.10a), folgt für die Auslenkungen der Achsen CH1 und CH2:

$$A_{CH1}(y, \Theta) = y \cdot \cos\left(\frac{\pi}{4} + \Theta\right) \quad (3.9)$$

und

$$A_{CH2}(y, \Theta) = y \cdot \sin\left(\frac{\pi}{4} + \Theta\right). \quad (3.10)$$

Der Abstand zwischen P1 und dem Koordinatenursprung entspricht dabei genau  $y_0$ .



**Abbildung 3.10.:** Auslenkung der Spiegelachsen. **(a):** Erzeugung der Lichtscheibe (blauer Pfeil) in Y-Richtung. **(b):** Verschiebung der Lichtscheibe in Z-Richtung (grüne Pfeile).

### Verschiebung der Lichtscheibe entlang der Z-Achse

Das Prinzip der Verschiebung des Laserstrahls in Z-Richtung wird in Abbildung 3.10b skizziert. Die Verschiebung um  $z$  erfolgt orthogonal zur Scanachse Y. Es folgt für die Auslenkungen  $A_{CH1}(z, \Theta)$  und  $A_{CH2}(z, \Theta)$  der Achsen CH1 und CH2:

$$A_{CH1}(z, \Theta) = -z \cdot \cos\left(\frac{\pi}{4} - \Theta\right) \quad (3.11)$$

und

$$A_{CH2}(z, \Theta) = z \cdot \sin\left(\frac{\pi}{4} - \Theta\right). \quad (3.12)$$

### Kombinierte Auslenkung der Scanachsen und angelegte Spannung

Der Lichtstrahl kann mit den Scanspiegeln gleichzeitig entlang der Achsen Y und Z ausgelenkt werden. Die Auslenkungen der Achsen CH1 und CH2 erhält man dann durch Kombination der Gleichungen 3.9 und 3.11, bzw. 3.10 und 3.12. Um den Strahl gleichzeitig entlang  $y$  und  $z$  zu verschieben, betragen die Auslenkungen der Spiegelachsen

$$A_{CH1}(y, z, \Theta) = y \cdot \cos\left(\frac{\pi}{4} + \Theta\right) - z \cdot \cos\left(\frac{\pi}{4} - \Theta\right) \quad (3.13)$$

und

$$A_{CH2}(y, z, \Theta) = y \cdot \sin\left(\frac{\pi}{4} + \Theta\right) + z \cdot \sin\left(\frac{\pi}{4} - \Theta\right). \quad (3.14)$$

Die Auslenkung ist proportional zur angelegten Spannung  $U$  am Spiegel und die Eingangsspannung der beiden Achsen CH1 und CH2 kann Werte zwischen 0 V und 10 V annehmen. Die Spiegel befinden sich somit bei  $U_{CH1} = U_{CH2} = 5$  V in der Nullstellung.

Damit folgt für die angelegten Spannungen an den Achsen CH1 und CH2:

$$U_{CH1}(y, z, \Theta) = U_y \cdot \cos\left(\frac{\pi}{4} + \Theta\right) - U_z \cdot \cos\left(\frac{\pi}{4} - \Theta\right) + 5 V \quad (3.15)$$

und

$$U_{CH2}(y, z, \Theta) = U_y \cdot \sin\left(\frac{\pi}{4} + \Theta\right) + U_z \cdot \sin\left(\frac{\pi}{4} - \Theta\right) + 5 V. \quad (3.16)$$

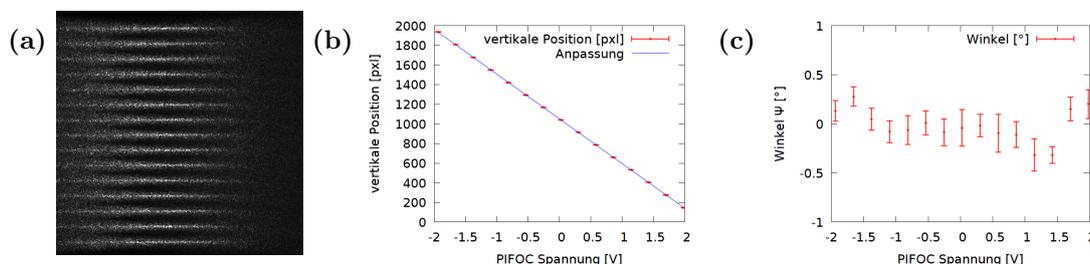
Hier entspricht  $U_y$  der Spannung, um den Strahl um  $y$  entlang der  $Y$ -Achse zu verschieben und  $U_z$  entspricht der Spannung, um den Strahl um  $z$  entlang der  $Z$ -Achse zu verschieben.

### 3.3.2. Kalibrierung der Spiegelachsen

Um herauszufinden, um welche Distanz sich die Laserposition bei einer angelegten Spannung  $U$  verschiebt, müssen die Spiegelachsen zunächst kalibriert werden. Dies wird im Folgenden beschrieben.

#### Kalibrierung der Spiegelauslenkung entlang der $Y$ -Achse

Zur Erzeugung der Lichtscheibe, wird der Laserstrahl mit dem Scanspiegel durch die Probe bewegt. Um eine gleichmäßige Beleuchtung zu gewährleisten, sollte die Verschiebung des Strahles linear proportional zur angelegten Spannung sein. Um dies zu untersuchen, wurde das im FEP-Röhrchen gestreute Laserlicht bei unterschiedlichen, am Spiegel angelegten, Spannungen aufgenommen.



**Abbildung 3.11.:** Laserstrahl bei unterschiedlichen Spannungen am Scanspiegel. **(a):** Vom FEP-Röhrchen gestreutes Licht bei 15 verschiedenen Spannungen. **(b):** Vertikale Lage des Strahls. **(c):** Winkel  $\Psi$  des Strahls.

Abbildung 3.11a zeigt den Beleuchtungsstrahl bei 15 verschiedenen Auslenkungen. Der Strahl wurde mit dem in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Programm analysiert und daraus die vertikale Position bestimmt. Die Messung der Auslenkung wurde 20 mal wiederholt und die vertikale Position wurde in Abbildung 3.11b gegen die Spannung aufgetragen.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist der Zusammenhang linear und die Positionen konnten mit hoher Wiederholgenauigkeit von unter einem Pixel eingestellt werden. Dies ist wichtig, um eine genaue Synchronisation von Strahlauslenkung und Kameraauslesung zu ermöglichen. Um diese Synchronisation über einen möglichst großen Bildausschnitt zu gewährleisten, ist es notwendig, dass sich der Winkel  $\Psi$  des Strahls bei einer Auslenkung nicht verändert. Falls sich der Winkel zu stark verändert, überlappen Teile des Strahls nicht mehr mit dem konfokalen Schlitz und die dort angeregte Fluoreszenz trägt nicht zur Abbildung bei. Aus diesem Grund wurde bei der Messung mit demselben Programm auch der Winkel  $\Psi$  bestimmt, welcher in Abbildung 3.11c gegen die Spannung aufgetragen ist. Offensichtlich besteht kein direkter Zusammenhang zwischen den beiden Größen und der Winkel wird als konstant entlang der vertikalen Achse erachtet.

Die Messung erfolgte mit Besselbeleuchtung bei einer Wellenlänge von 930 nm.

### Kalibrierung der Spiegelauslenkung entlang der Z-Achse

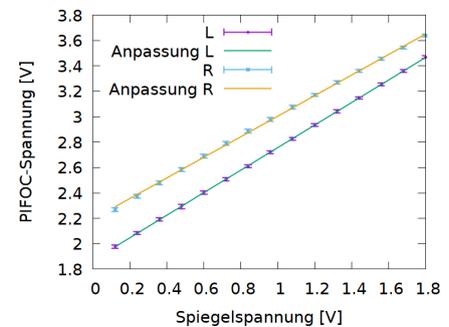
Für die Aufnahme von Bildstapeln wird die Lichtscheibe in Z-Richtung bewegt. Dies erfordert jedoch eine Kalibrierung der Z-Schrittweite bei Auslenkung der Scanspiegel. Als Referenz dient der PIFOC, welcher vom Hersteller kalibriert wurde. Der PIFOC besitzt eine maximale Auslenkung von  $400\ \mu\text{m}$  bei einer Eingangsspannung von 0 bis 10 Volt. Dies entspricht einer Auslenkung von  $40\ \frac{\mu\text{m}}{\text{V}}$ .

Zur Kalibrierung der Scanspiegel wurde der Strahl entlang der Z-Achse durch Carboxyfluorescein bewegt und die 2P-Fluoreszenz detektiert.

Es wurde an insgesamt 15 Positionen gemessen und der Strahl wurde in  $0,12\ \text{V}$ -Schritten bewegt. An jeder Strahlposition wurde das Detektionsobjektiv mit dem PIFOC bewegt, um die detektierte Strahltaile zu minimieren. Die Messung der Strahltaile erfolgte mit dem im Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Programm. Aus jeweils 15 PIFOC-Positionen wurde die Position mit der minimalen Taille bestimmt. Die bestimmten Auslenkungen des PIFOC sind für die 15 Spiegelauslenkungen in Abbildung 3.12 dargestellt.

Der Kehrwert der Steigung der Ausgleichsgeraden entspricht dem Verhältnis der Spiegelspannung zur PIFOC-Spannung  $\frac{U_{\text{Spiegel}}}{U_{\text{PIFOC}}}$ .

Für den linken Spiegel fand sich  $\frac{U_{\text{Spiegel,L}}}{U_{\text{PIFOC}}} = 1,127 \pm 0,002$  und für den rechten Spiegel fand sich  $\frac{U_{\text{Spiegel,R}}}{U_{\text{PIFOC}}} = 1,235 \pm 0,008$ .



**Abbildung 3.12.:** Verschiebung des Strahls in Z-Richtung.

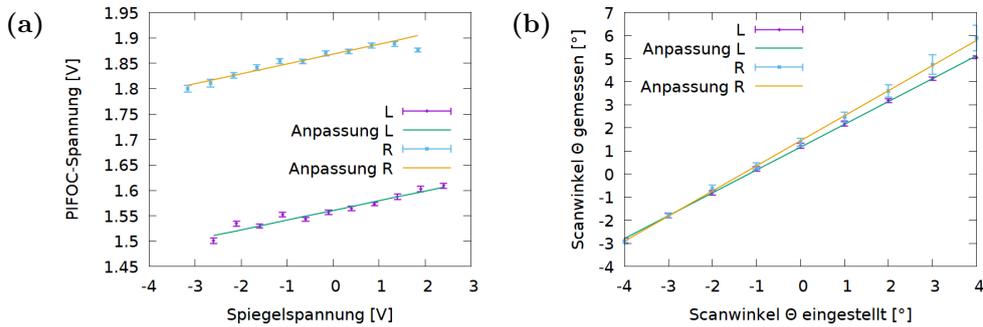
### Kalibrierung des Scanwinkels $\Theta$

Durch geringe Fehlpositionierungen der Scanspiegel oder der Detektionsoptiken kann es zu einer Verkippung  $\Theta$  des Lichtblattes gegenüber der Fokalebene des Detektionsobjektivs kommen. Diese Verkippung kann durch Drehung der Scanachse um  $\Theta$  kompensiert werden, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben wurde. Um  $\Theta$  zu messen, wurde die 2P-Fluoreszenz des Laserstrahls in Carboxyfluorescein gemessen. Der Strahl wurde mit den Spiegeln an 11 Positionen entlang der Scanachse ausgelenkt und es wurde die Position bestimmt, an der die Strahltaile minimal wird. Dies geschah analog zur Kalibrierung der Spiegelauslenkung entlang der Z-Achse. Mit dem aus dieser Kalibrierung bekannten Verhältnis  $\frac{U_{Spiegel}}{U_{PIFOC}}$  kann dann aus der Steigung  $m_{PIFOC}$  der Ausgleichsgeraden der Winkel

$$\Theta = \tan\left(\frac{U_{Spiegel}}{U_{PIFOC}} \cdot m_{PIFOC}\right) \quad (3.17)$$

bestimmt werden. Um die Genauigkeit der Messung zu erhöhen, wurde sie für unterschiedliche Verkippungen der Scanachse wiederholt. Die Nullstelle der Anpassungsgeraden entspricht dem Winkel  $\Theta$ . Diese Methode hat den Vorteil, dass das Verhältnis  $\frac{U_{Spiegel}}{U_{PIFOC}}$  nicht bekannt sein muss.

Es fanden sich  $\Theta_L = (-1,169 \pm 0,019)$  Grad und  $\Theta_R = (-1,446 \pm 0,028)$  Grad.



**Abbildung 3.13.:** Messung des Winkels  $\Theta$ . **(a):** Messung bei einer Verkippung der Scanachse von 0 Grad. Aufgetragen ist die PIFOC-Spannung, bei welcher die Strahltaile minimal wird, gegen die Spiegelspannung. **(b):**  $\Theta$  als Funktion des eingestellten Scanwinkels.



## 4. Charakterisierung der optischen Eigenschaften des Mikroskops

In diesem Kapitel werden die optischen Eigenschaften des Mikroskops untersucht und charakterisiert. Hierfür wird zunächst in Abschnitt 4.1 die Verteilung der Laserleistung auf die beiden Beleuchtungsarme kalibriert. Danach werden in Abschnitt 4.2 die für die Beleuchtung verwendeten Laserprofile untersucht und miteinander verglichen. Zusätzlich wird die Planung der Besselbeleuchtung beschrieben. Anschließend wird in Abschnitt 4.3 die Qualität der aufgenommenen Bilder untersucht. Dabei wird auch der Einfluss der beiden Beleuchtungsarten und der konfokalen Detektion auf die Bildqualität betrachtet.

### 4.1. Verteilung der Laserleistung auf die Beleuchtungsarme

Der Laserstrahl wird mittels einer  $\frac{\lambda}{2}$ -Platte, welche die Polarisationsrichtung um einen gewählten Winkel dreht, und eines polarisierenden Strahlteilers auf zwei Arme aufgeteilt. Die Intensität einer Welle ist proportional zum Quadrat ihrer Amplitude. Tritt eine Welle mit Intensität  $I_0$  auf einen idealen Polarisator, der um den Winkel  $\alpha$  gegen die Polarisationsrichtung der Welle gedreht ist, so gilt für die Intensität  $I$  der Welle hinter dem Polarisator

$$I(\alpha) = I_0 \cos^2(\alpha). \quad (4.1)$$

Gleichung (4.1) ist auch als Gesetz von Malus bekannt [77]. Um die Laserintensität proportional auf die beiden Beleuchtungsarme aufzuteilen, muss die Intensität bei einem gegebenen Winkel bekannt sein. Dazu wurde sowohl die Intensität des Strahles, welcher den Polarisator gerade passiert, als auch die des abgelenkten Strahles als Funktion des Winkels der  $\frac{\lambda}{2}$ -Platte vermessen. Ersterer wird hier als L bezeichnet, während der abgelenkte Strahl als R bezeichnet wird. Zur Messung wurde ein thermisches Photometer (S370C, Thorlabs) hinter dem Strahlteilerwürfel platziert. Dabei zeigte sich, dass die Intensitäten beider Strahlen zu jeder Zeit größer als Null sind (siehe Abbildung 4.1a). Offensichtlich ist der Laser nicht ideal polarisiert und Gleichung (4.1) muss entsprechend

modifiziert werden. An die gemessene Intensität wurde daher eine Funktion der Form

$$I(\alpha) = I_{0,eff} \cos^2(\alpha - \alpha_0) + I_{off} \quad (4.2)$$

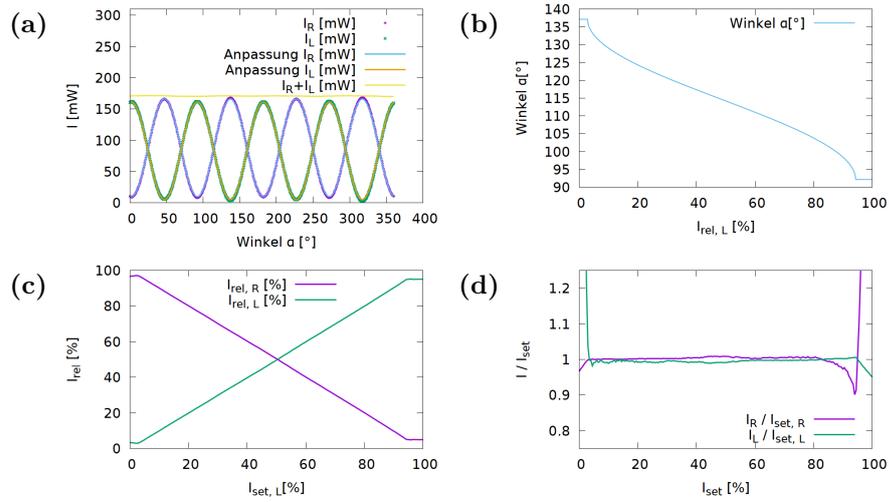
angepasst. Hier beschreibt  $\alpha_0$  den Winkel, unter dem die Intensität maximal wird, und  $I_{off}$  beschreibt die Intensität, die am Minimum gemessen wird. Die Anpassungen an die Daten nach Gleichung (4.2) sind ebenfalls in Abbildung 4.1a abgebildet. Gleichung (4.2) kann nun nach  $\alpha$  umgeformt werden:

$$\alpha = \cos^{-1} \left( \sqrt{\frac{I(\alpha) - I_{off}}{I_{0,eff}}} \right) + \alpha_0. \quad (4.3)$$

Mit der relativen Intensität  $I_{rel} = \frac{I(\alpha)}{I_{0,eff} + I_{off}}$  folgt:

$$\alpha = \cos^{-1} \left( \sqrt{\frac{I_{rel}(I_{0,eff} + I_{off}) - I_{off}}{I_{0,eff}}} \right) + \alpha_0. \quad (4.4)$$

Gleichung (4.4) ist für den Beleuchtungsarm L in Abbildung 4.1b dargestellt.



**Abbildung 4.1.:** Verteilung der Laserintensität auf die Beleuchtungsarme L und R. (a):  $I_R$  und  $I_L$  als Funktion des Winkels  $\alpha$  der  $\frac{\lambda}{2}$ -Platte. (b): Winkel  $\alpha$  als Funktion von  $I_{rel,L}$ . (c): Gemessene  $I_{rel,R}$  und  $I_{rel,L}$  als Funktion des eingestellten  $I_{rel,L}$ . (d): Verhältnis aus gemessener zu eingestellter Laserintensität.

Die entsprechenden Parameter sind in der Kontrollsoftware des Mikroskops gespeichert, wodurch das Programm bei einer gewünschten relativen Intensitätsverteilung auf die

Beleuchtungsarme L und R automatisch den Winkel  $\alpha$  einstellt. Zur Kontrolle der automatisch eingestellten Intensität, wurde mit einem thermischen Photometer die Intensität als Funktion der eingestellten  $I_{rel}$  gemessen. Dies ist in Abbildung 4.1c für beide Beleuchtungsarme abgebildet. Wie zu sehen ist, stimmen eingestellte und gemessene Intensität gut überein. Um dies weiter zu verdeutlichen, ist in Abbildung 4.1d das Verhältnis von gemessener  $I$  zu eingestellter Intensität  $I_{set}$  als Funktion von  $I_{rel}$  dargestellt.

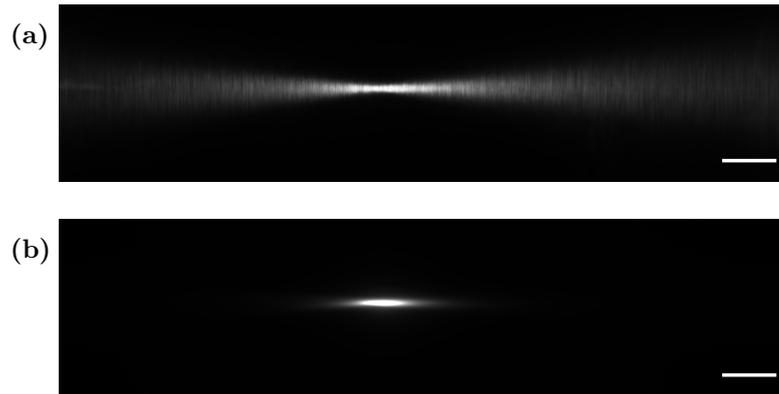
## 4.2. Beleuchtungsprofile

In diesem Abschnitt werden die beiden für die Beleuchtung verwendeten Strahlprofile untersucht und miteinander verglichen. Zu Beginn der Arbeit bestand nur die Möglichkeit der Verwendung von Gaußstrahlen. Daher wird in Abschnitt 4.2.1 zunächst nur das Gaußstrahlprofil qualitativ untersucht. Die gefundenen Ergebnisse dienen der Erweiterung des Mikroskops um eine zusätzliche Beleuchtung mit Besselstrahlen. Die Planung des Aufbaus und eine qualitative Charakterisierung des Besselstrahlprofils finden sich in Abschnitt 4.2.2.

### 4.2.1. Beleuchtung mit Gaußstrahlen

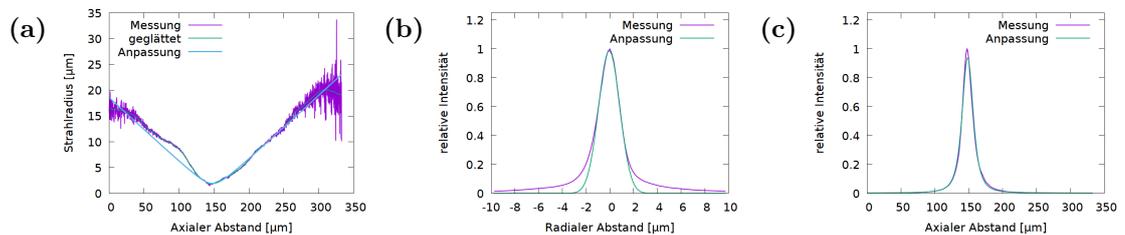
Zur qualitativen Untersuchung des Gaußstrahlprofils wurde zunächst das im FEP-Röhrchen gestreute Licht verwendet. Dieses ist in Abbildung 4.2a dargestellt. Die Aufnahme erfolgte im *Area* Modus. Da die Streuung in FEP sehr inhomogen ist, wurde das Röhrchen bei der Aufnahme bewegt und über 10 Bilder gemittelt. Die Anregung erfolgte bei 930 nm, da sich diese Anregungswellenlänge mit dem verwendeten Laser als optimal zur Anregung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) erwiesen hat. In Verbindung mit diesem Mikroskop, ist GFP der wichtigste benutzte Farbstoff, da es als Marker für viele verschiedene Proteine verwendet werden kann und sich somit zu einem Standard in der Zellbiologie entwickelt hat [11]. Zur Untersuchung der Strahlen wurde das in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Strahlanalyseprogramm verwendet. Da dieses in die Kontrollsoftware des Mikroskops integriert ist, liefert es wichtige Strahlparameter, wie zum Beispiel die Breite der Strahltaile und dessen Lage in Echtzeit. Mit diesen Informationen kann das Detektionsobjektiv optimal auf den Strahl fokussiert werden, wodurch systematische Fehler bei der Strahlanalyse reduziert werden.

Bei der Analyse in Echtzeit stellte sich heraus, dass der gemessene Strahlradius von der verwendeten Belichtungszeit abhängt. Da mit dieser Methode also keine verlässlichen Daten gemessen werden können, wurde auf eine weitere Auswertung des gestreuten Lichtes verzichtet.



**Abbildung 4.2.:** Gaußstrahlen bei (a): 1P-Streuung und (b): 2P-Fluoreszenz. Skala 25  $\mu\text{m}$ .

Stattdessen wurde die 2P-Emission des Gaußstrahls in einer Farbstofflösung (5(6)-Carboxyfluorescein, 21877, Sigma-Aldrich) untersucht. Diese ist in Abbildung 4.2b abgebildet. Dabei wurde über insgesamt 200 Aufnahmen gemittelt. Die Aufnahmen erfolgten ebenfalls im *Area* Modus bei einer Anregungswellenlänge von 930 nm. Aus Abbildung 4.2b wurden mithilfe des Strahlanalyseprogramms drei Strahlprofile erstellt, welche in Abbildung 4.3 abgebildet sind.



**Abbildung 4.3.:** Profile eines fokussierten Gaußstrahls. (a): Axialer Verlauf des Strahlradius  $\omega(z)$ . Berechnet nach Abschnitt 3.2.1. (b): Radiale Intensitätsverteilung durch die Strahltaile. (c): Axiale Intensitätsverteilung.

Die Profile lassen lediglich qualitative Aussagen über den Strahl zu, da die Abbildung das Ergebnis einer Faltung aus Beleuchtungs- und Abbildungsfunktion ist. Dadurch stammt ein Teil des detektierten Lichts von außerhalb der Fokusebene und das erzeugte Bild entspricht keinem perfekten Schnitt durch den Strahl in der Fokusebene. Die axiale Lokalisierungsgenauigkeit ist eine Funktion der NA (siehe Gleichung (1.20)). Für eine präzise, quantitative Untersuchung der Strahlparameter können fluoreszierende Nanopartikel oder die Messerschneidenmethode verwendet werden [61].

In Abbildung 4.3a ist der axiale Strahlverlauf des Strahlradius  $\omega(z)$  dargestellt, wel-

cher nach Abschnitt 3.2.1 berechnet wurde. Auffällig ist hier, dass die Kurve beidseitig der Taille nach etwa  $50\ \mu\text{m}$  einen Knick aufweist und danach abflacht. Ab diesen Punkten steigt auch das Signalrauschen mit zunehmendem Abstand von der Taille. Dies ist auf den Zwei-Photonen-Charakter der Anregung zurückzuführen, wodurch es nur in der Nähe des Fokus zu nennenswerter Absorption kommt. In Abbildung 4.3b findet sich die radiale Intensitätsverteilung  $I(r, z = 0)$  durch die Strahltaile und in Abbildung 4.3c findet sich die axiale Intensitätsverteilung  $I(r = 0, z)$ .

Aus den Strahlprofilen lassen sich charakteristische Werte ableiten. Diese sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Zur Messung der Werte wurden 20 Aufnahmen des Strahls gemacht, welche sich wiederum aus jeweils 10 gemittelten Aufnahmen zusammensetzen. Der Messfehler entspricht der Standardabweichung aus 20 Aufnahmen.

Parameter	Messwert [ $\mu\text{m}$ ]
$FWHM_Z$	$17,57 \pm 0,03$
$Z_R$ (aus FWHM)	$15,22 \pm 0,03$
$Z_R$ (radial)	$15,8 \pm 0,2$
$Z_R$ (axiale Anpassung)	$14,57 \pm 0,05$
$Z_R$ (kombiniert)	$15,06 \pm 0,03$
$\omega_0$ (durch Taille)	$2,18 \pm 0,01$
$\omega_0$ (Minimum des geglätteten $\omega(z)$ )	$1,85 \pm 0,02$
$\omega_0$ (Anpassung durch Taille)	$1,78 \pm 0,01$
$\omega_0$ (kombiniert, nur Minimum und Anpassung)	$1,81 \pm 0,01$
$FWHM_r$ (durch Taille)	$2,11 \pm 0,01$
$FWHM_r$ (Anpassung durch Taille)	$2,11 \pm 0,01$
$FWHM_r$ (kombiniert)	$2,11 \pm 0,01$

**Tabelle 4.1.:** Strahlparameter des 2P-Gaußstrahls. Die Werte sind abhängig von der Abbildungsfunktion. Bestimmt für ein Objektiv mit  $NA = 0,8$ .

Für die Bestimmung von  $\omega_0$  und  $Z_R$  wurden verschiedene Messmethoden verwendet und die Ergebnisse anschließend kombiniert. Zur Bestimmung von  $Z_R$  (radial) wurde die Distanz vom Minimum des geglätteten  $\omega(z)$  bis zu den beiden Positionen mit dem  $\sqrt{2}$ -fachen Radius gemessen.  $Z_R$  (axiale Anpassung) folgt aus einer Lorentz-Anpassung an das axiale Intensitätsprofil nach Gleichung (1.7). Da das aufgenommene Z-Profil einer quadrierten Lorentz-Verteilung entspricht, wurde vor der Anpassung zunächst die Wurzel des Profils berechnet.  $Z_R$  lässt sich auch aus der axialen Halbwertsbreite  $FWHM_Z$  berechnen. Für einen 2P-Gaußstrahl fällt die Intensität im Abstand  $Z_R$  von der Strahltaile jedoch auf  $\frac{I_0}{4}$  ab, und nicht auf  $\frac{I_0}{2}$ , wie im Fall eines 1P-Strahls [65]. Aus Gleichung (1.7) folgt, dass der  $\frac{1}{4}$ -Radius eines Lorentzprofils das  $\sqrt{3}$ -fache des  $\frac{1}{2}$ -Radius beträgt.

Damit folgt

$$Z_R(\text{aus FWHM}) = \frac{\sqrt{3}}{2} FWHM_Z. \quad (4.5)$$

Der ermittelte Wert für  $\omega_0$  hängt deutlich von der Messmethode ab, da das radiale Strahlprofil an den Seiten verbreitert ist und nicht einem idealen Gaußprofil entspricht. Dies ist gut in Abbildung 4.3b zu erkennen und könnte durch Licht von außerhalb der Fokusebene erklärt werden. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass das durch 2P-Anregung induzierte Fluoreszenzlicht wiederum zu Fluoreszenzanregung in der umliegenden Farbstofflösung führt. Bei der Bestimmung von  $\omega_0$  (durch Taille) wurde die Distanz vom Maximum zu den nächsten Punkten gemessen, deren Intensität auf  $\frac{1}{e^2}$  gefallen ist. Aufgrund der Strahlverbreiterung beschreibt dieser Wert jedoch nicht den Gaußcharakter des Strahls. Die Strahleigenschaften werden besser durch den durch Gaußanpassung bestimmten Wert  $\omega_0$  (Anpassung durch Taille) beschrieben.

Die kombinierten Werte in Tabelle 4.1 wurden durch Mittlung der Werte aus verschiedenen Messmethoden bestimmt. Dabei wurden die Werte  $f_i$  mit dem jeweiligen reziproken Fehler  $\sigma_i^{-1}$  nach

$$f_{\text{kombiniert}} = \frac{\sum_i \frac{f_i}{\sigma_i}}{\sum_i \sigma_i^{-1}} \quad (4.6)$$

gewichtet.

Aus dem Strahlradius des 2P-Strahls  $\omega_0^{2P}$  lässt sich der Radius des 1P-Strahls berechnen, zu

$$\omega_0^{1P} = \sqrt{2} \cdot \omega_0^{2P} = (2,56 \pm 0,01) \text{ m}. \quad (4.7)$$

Damit lässt sich die Beugungsmaßzahl  $M^2$  aus Gleichung (1.5) berechnen, zu

$$M^2 = \frac{\pi n \omega_0^2}{z_R \lambda} = (1,98 \pm 0,02). \quad (4.8)$$

Bei der verwendeten Laserquelle handelt es sich um einen Festkörperlaser. Bei dieser Laserart sind typische Werte für  $M^2$  im Bereich 1,5 – 20 [18]. Die Strahlqualität kann somit als relativ gut bewertet werden.

#### 4.2.2. Beleuchtung mit Besselstrahlen

Um das nutzbare laterale Sichtfeld zu vergrößern, wurde das Mikroskop um einen Aufbau zur Beleuchtung mit Besselstrahlen ergänzt. Im Vergleich zu Gaußstrahlen besitzen diese einen verlängerten axialen Fokus. Dadurch fällt die Intensität in axialer Richtung langsamer ab und das Sichtfeld vergrößert sich. Die Herausforderung bei der Planung

des Aufbaus bestand darin, das Sichtfeld unter den beiden folgenden Gesichtspunkten zu erhöhen:

1. Die Strahltaile sollte kleiner oder gleich groß wie bei Gaußbeleuchtung sein, damit die axiale Auflösung des Mikroskops nicht negativ beeinflusst wird.
2. Mit der Besselbeleuchtung sollten ähnlich hohe Anregungsintensitäten wie mit der Gaußbeleuchtung erzielt werden können.

Der zweite Punkt ist wichtig, da bei der Beleuchtung Zwei-Photonen-Absorption verwendet wird, welche proportional zum Quadrat der Anregungsintensität ist. Es werden also sehr hohe Anregungsintensitäten benötigt. Andererseits ist die verfügbare Laserleistung begrenzt. Der verwendete Laser liefert bei einer Anregungswellenlänge von 930 nm etwa 1 W Durchschnittsleistung. Davon werden für den laufenden Betrieb etwa 20 bis 25 Prozent zum Mikroskop geleitet und dort in der Regel gleichmäßig auf die beiden Beleuchtungsarme verteilt. Aus diesem Grund sollte mit der Besselbeleuchtung eine Anregungsintensität von mindestens

$$I_{Bessel}(r = 0, z) \geq \frac{I_{Gau\beta}(r = 0, z)}{\sqrt{4}} = \frac{I_{Gau\beta}(r = 0, z)}{2} \quad (4.9)$$

erreicht werden.

Hierbei muss man jedoch beachten, dass sich bei Besselstrahlen ein erheblicher Teil der Energie in den Nebenmaxima befindet. Im Falle eines idealen Besselstrahls ist diese Energiemenge sogar unendlich. Dies ist einer der Gründe, warum die Erzeugung solcher Strahlen in der Praxis unmöglich ist.

Die im Hauptmaximum eines realen Besselstrahls verfügbare Maximalintensität ist abhängig von der Erzeugung des Strahls und wird im folgenden Abschnitt betrachtet.

### Theoretische Berechnung des Strahlprofils

Um die beiden Strahlarten vergleichen zu können, wurde die Intensitätsverteilung  $I(r, z)$  als Funktion der Eingangsleistung  $P_0$  betrachtet, welche für die Strahlen nach Gleichung (1.9) und Gleichung (1.12) berechnet werden kann. Mit Gleichung (1.15) und  $k_r = \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\alpha)$ , kann Gleichung (1.12) auch als

$$I(r, z) \approx \frac{8\pi P_0 \sin(\alpha) \tan(\alpha) z}{\lambda \omega_c^2} J_0^2 \left( \frac{2\pi r}{\lambda} \sin(\alpha) \right) \exp \left( -\frac{2z^2 \tan^2(\alpha)}{\omega_c^2} \right) \quad (4.10)$$

geschrieben werden. Wird der Besselstrahl nach der Generierung durch ein Linsensystem gelenkt, so muss die Gesamtvergrößerung  $M$  des Systems beachtet werden.

Durch die Vergrößerung ändern sich der Strahlradius  $\omega_c$  und der Öffnungswinkel  $\alpha$ . Nach Durchquerung des Linsensystems findet sich:

$$\omega'_c = M \cdot \omega_c \quad (4.11)$$

und

$$\tan(\alpha') = \frac{\tan(\alpha)}{M}. \quad (4.12)$$

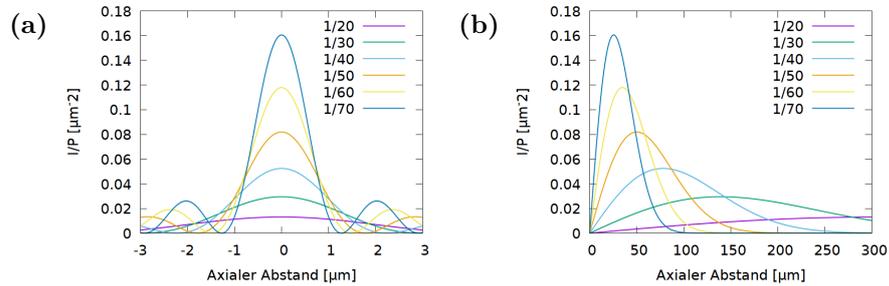
Für kleine Winkel  $\alpha$  kann zudem mit Kleinwinkelnäherung

$$\sin(\alpha') = \frac{\sin(\alpha)}{M} \quad (4.13)$$

angenommen werden. Damit folgt für die Intensität des Besselstrahls:

$$I(r, z) \approx \frac{8\pi P_0 \sin(\alpha) \tan(\alpha)}{\lambda M^4 \omega_c^2} z J_0^2 \left( \frac{2\pi r}{M \lambda} \sin(\alpha) \right) \exp \left( -\frac{2z^2 \tan^2(\alpha)}{M^4 \omega_c^2} \right). \quad (4.14)$$

Für den Aufbau wurde eine Axiconlinse (AX1205-B, Thorlabs) mit  $\gamma = 0,5$  Grad und  $n_{axicon} = 1,458$  gewählt. Aus Gleichung (1.15) folgt  $\alpha = 0,229$  Grad. Mit Gleichung (4.14) wurde  $\frac{I(r, z)}{P_0}$  für dieses Axicon mit  $\lambda = 930$  nm und  $\omega_c = 1$   $\mu\text{m}$  bei verschiedenen Vergrößerungen berechnet (siehe Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4.:** Berechnete Intensität eines Besselstrahls  $\frac{I(r, z)}{P_0}$  bei verschiedenen Vergrößerungen  $M$ . (a): Radiale Intensitätsverteilung. (b): Axiale Intensitätsverteilung.  $\lambda = 930$  nm.  $\omega_c = 1$   $\mu\text{m}$ .  $\gamma = 0,5$  Grad.

Für Gleichung (1.15) und Gleichung (1.17) folgt aus den Gleichungen 4.11 und 4.12:

$$z_{max} \propto M^2 \quad (4.15)$$

und

$$r_0 \propto M. \quad (4.16)$$

Bei der Wahl der Vergrößerung  $M$  muss somit ein Kompromiss zwischen hoher axialer Ausdehnung und geringem Strahlradius gefunden werden. In Tabelle 4.2 sind die entsprechenden  $z_{max}$ ,  $r_0$  und Intensitätsmaxima  $\frac{I_{max}}{P_0}$  aufgelistet.

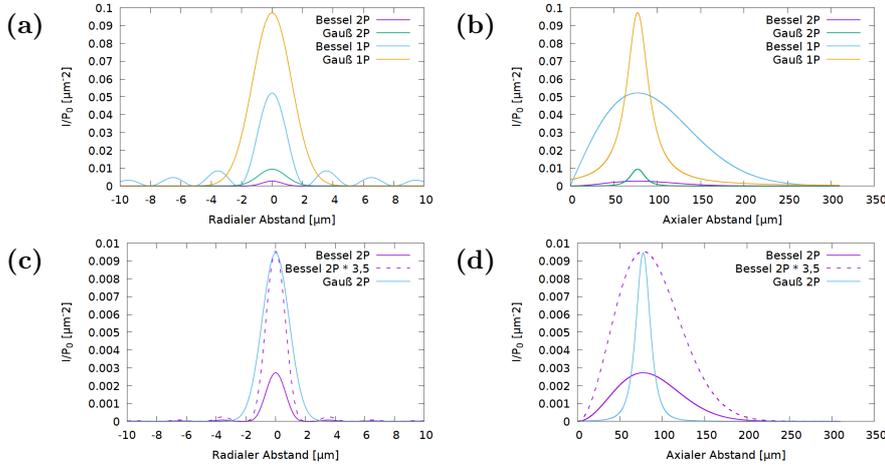
$M$	1	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{30}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{60}$	$\frac{1}{70}$
$z_{max}$ [ $\mu\text{m}$ ]	250178,47	625,03	277,69	156,15	99,90	69,35	50,93
$r_0$ [ $\mu\text{m}$ ]	89,061	4,453	2,969	2,227	1,781	1,484	1,272
$\frac{I_{max}}{P_0}$ [ $\mu\text{m}^{-2}$ ]	1,64E-05	0,0131	0,0295	0,0524	0,0819	0,1179	0,1605

**Tabelle 4.2.:** Berechnete Parameter eines Besselstrahls bei verschiedenen Vergrößerungen  $M$ .  $\gamma = 0,5$  Grad.

Die Intensität in axialer Richtung wird maximal für  $z = \frac{z_{max}}{2}$ . Für einen Gaußstrahl folgt mit Gleichung (1.8) und Gleichung (4.7):

$$\frac{I_{max}^{Gau\beta}}{P_0} = (0,097 \pm 0,001) \mu\text{m}^{-2}. \quad (4.17)$$

Um Gleichung (4.9) zu erfüllen, wurde daher  $M = \frac{1}{40}$  gewählt. In Abbildung 4.5 werden die radialen und axialen Intensitätsverteilungen eines Gaußstrahls und eines Besselstrahls miteinander verglichen.



**Abbildung 4.5.:** Theoretischer Vergleich der Intensität  $\frac{I(r,z)}{P_0}$  zwischen Gauß- und Besselstrahlen. (a): Radiales Intensitätsprofil durch die Strahltaile. (b): Axiales Intensitätsprofil für  $r = 0$ . (c): Radiales Intensitätsprofil bei 2P-Anregung. (d): Axiales Intensitätsprofil bei 2P-Anregung. In c und d ist zusätzlich das 2P-Profil des Besselstrahls bei 3,5-facher Leistung eingezeichnet.

Hierfür wurde die Intensität in Relation zur Eingangsleistung  $\frac{I(r,z)}{P_0}$  nach Gleichung (1.9) und Gleichung (4.14) mit  $M = \frac{1}{40}$  berechnet. Die 2P-Profile folgen durch Quadrieren der 1P-Profile. Hier fällt auf, dass die Maximalintensität des Besselstrahls bei gleicher Laserleistung  $P$  geringer als die des Gaußstrahls ist, obwohl ersterer einen geringeren Strahlradius besitzt. Der Grund hierfür ist, dass ein Teil der Energie des Besselstrahls in den Nebenmaxima gebunden ist.

Um die 2P-Profile besser vergleichen zu können, wurde in Abbildung 4.5c und Abbildung 4.5d zusätzlich die Intensitätsverteilung des Besselstrahls bei 3,5-facher Leistung eingezeichnet, da dann beide Strahlen in etwa die gleiche maximale Intensität aufweisen. Bei dem idealen Besselstrahl beträgt das axiale  $FWHM_z^{Bessel,2P} = 89,5 \mu\text{m}$  und ist damit etwa fünfmal so groß wie das gemessene  $FWHM_z^{Gau\beta,2P}$  des Gaußstrahls. Dementsprechend sollte sich auch das nutzbare Sichtfeld des Mikroskops um den Faktor 5 bei Beleuchtung mit Besselstrahlen erhöhen. Gleichzeitig sollte der  $\frac{1}{e^2}$ -Radius auf  $\omega_0^{Bessel,2P} = 1,24 \mu\text{m}$  sinken und sich somit die axiale Auflösung erhöhen.

Diese Zahlen sollten jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da es nicht möglich ist, einen idealen Besselstrahl unter Laborbedingungen zu erzeugen. Reale Besselstrahlen können mathematisch als Faltung eines Bessel- und eines Gaußstrahls verstanden werden. Deswegen muss man davon ausgehen, dass diese Werte im Labor nicht erreicht werden können.

### Einstellen der Vergrößerung des Besselstrahls

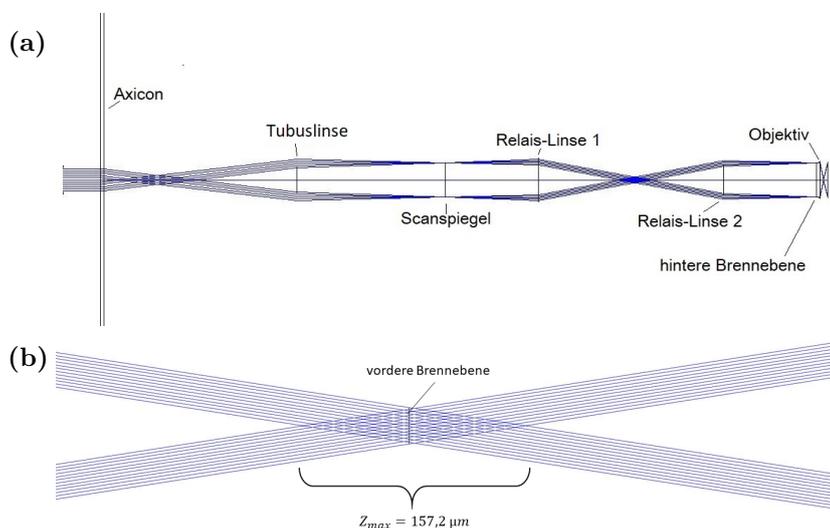
Um eine Vergrößerung des Besselstrahls von  $M = \frac{1}{40}$  zu erreichen, muss eine zusätzliche Linse in den Strahlengang eingesetzt werden. Die Relaislinsen 1 und 2 haben beide eine Brennweite von  $f_{R1,R2} = 125 \text{ mm}$  und somit beträgt ihre Vergrößerung  $M_{Relais} = 1$ . Das Beleuchtungsobjektiv dient nicht der Vergrößerung, sondern es fokussiert den Strahl in die Probenkammer. Da es eine effektive Brennweite von  $f_{Objektiv} = 5 \text{ mm}$  besitzt, kann es in Kombination mit einer Tubuslinse zur Vergrößerung benutzt werden. Die Brennweite der Tubuslinse beträgt

$$f_{Tubus} = \frac{f_{Objektiv}}{M} = 200 \text{ mm}. \quad (4.18)$$

Um die Dispersion in der Tubuslinse zu minimieren, wurde eine achromatische Doubletlinse (ACA254-200-B/AR 650-1050 nm, Thorlabs) gewählt. Diese Linsenart zeichnet sich durch geringe sphärische und chromatische Aberrationen aus und kann bei hohen Laserleistungen verwendet werden.

### Planung des Aufbaus mit Zemax

Der Aufbau der Besselbeleuchtung wurde mit *Zemax* (Zemax LLC) geplant. *Zemax* ist eine kommerzielle Software, mit der optische Systeme simuliert werden können. Viele Hersteller stellen *Zemax*-Dateien zur Verfügung, die einzelne optische Komponenten beschreiben. Die Dateien berücksichtigen insbesondere die optischen Eigenschaften der verwendeten Materialien. Es konnte bei der Planung jedoch lediglich auf die *Zemax*-Datei der Axicon-Linse (AX2505-B, Thorlabs) zugegriffen werden. Aus diesem Grund wurden die Tubuslinse, das Beleuchtungsobjektiv, sowie die beiden Relais-Linsen durch ideale Linsen mit den Brennweiten  $f_{Tubus} = 200$  mm,  $f_{Objektiv} = 5$  mm und  $f_{R1,R2} = 125$  mm approximiert. Abbildung A.1 zeigt den Inhalt des Linsendaten-Editors, welcher für die Simulation verwendet wurde. Die Tubuslinse wird hier als Achromat bezeichnet. Das zugehörige Linsensystem findet sich in Abbildung 4.6.



**Abbildung 4.6.:** Layout der Besselbeleuchtung in *Zemax*. **(a):** Übersicht des Strahlenganges. Die Y-Achse wurde zur Verbesserung der Übersichtlichkeit um den Faktor 15 gestreckt. **(b):** Vergrößerte Ansicht des Strahlenganges in der Brennebene des Beleuchtungsobjektivs.

Wie man in Abbildung 4.6a sieht, kommt es im Strahlengang insgesamt dreimal zur Formierung von Besselstrahlen. Dies geschieht direkt hinter dem Axicon, zwischen den Relaislinsen und hinter dem Objektiv in der Probenkammer, was man an den raufenförmigen Überschneidungen der Strahlen erkennen kann.

Nach Passieren des Axicons entspricht der Laserstrahl im Fernfeld einem divergierenden Kegel mit halbem Öffnungswinkel  $\alpha$  (siehe Abbildung 1.6). Der Durchmesser des

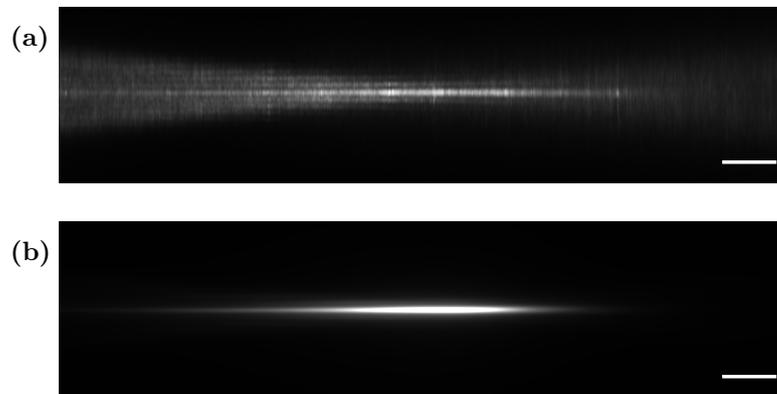
einhüllenden Kegels nimmt dabei mit der Entfernung zu, während der Strahldurchmesser konstant bleibt. Wird aus diesem Kegel durch ein Linsensystem wieder ein Besselstrahl geformt, so ist die Form des Besselstrahls unabhängig von dem Kegeldurchmesser, jedoch bewirkt dieser eine Verschiebung des Strahls entlang der optischen Achse. Diese beträgt

$$\Delta z_{Bessel} = \frac{M D_{innen}}{\tan(\alpha)}. \quad (4.19)$$

Hier entspricht  $D_{innen}$  dem Innendurchmesser des Kegels und  $M$  der Vergrößerung. Durch eine geschickte Wahl des Abstandes zwischen Axicon und Tubuslinse lässt sich somit effektiv die Distanz zwischen Objektiv und Besselstrahl in der Probenkammer beeinflussen. Mit *Zemax* wurde diese Distanz zu etwa 260 mm bestimmt, wodurch der Besselstrahl in der hinteren Brennebene des Objektivs liegt. Dies wird in Abbildung 4.6b verdeutlicht.

### Qualitative Messung des Besselstrahlprofils

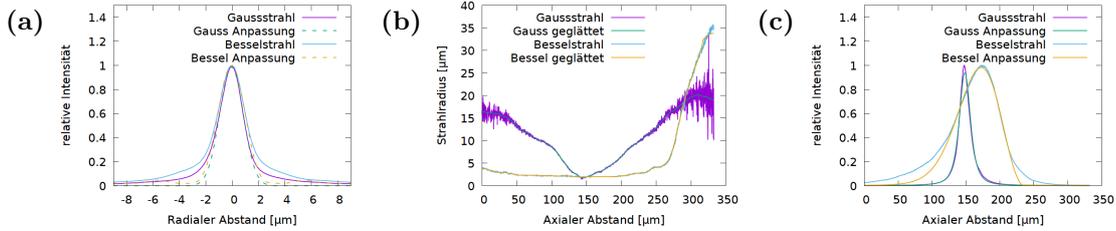
Zur qualitativen Messung des Besselstrahlprofils wurde analog zur Untersuchung des Gaußstrahls in Abschnitt 4.2.1 vorgegangen. Die Messung erfolgte erneut im *Area* Modus bei einer Anregungswellenlänge von 930 nm. In Abbildung 4.7a ist das im FEP-Röhrchen gestreute Licht des Besselstrahls zu sehen. Hierbei wurde über 10 Aufnahmen gemittelt. Eine Abbildung der 2P Emission in 5(6)-Carboxyfluorescein findet sich in Abbildung 4.7b. Hier wurde über 200 Aufnahmen gemittelt.



**Abbildung 4.7.:** Besselstrahlen bei (a): 1P-Streuung und (b): 2P-Fluoreszenz. Skala 25  $\mu\text{m}$ .

Wie bei der Untersuchung des Gaußstrahls war die Messung des 1P-Strahlradius von der Belichtungszeit abhängig, daher wurde nur die Messung des 2P-Strahls ausgewertet.

Mit Hilfe des Strahlanalyseprogramms wurden die Strahlprofile gemessen (siehe Abbildung 4.8). Zum Vergleich zwischen Bessel- und Gaußstrahlen wurden zusätzlich die Profile aus Abbildung 4.3 eingezeichnet. In Abbildung 4.8a findet sich die radiale Intensitätsverteilung  $I(r, z = 0)$  durch die Strahltaille, in Abbildung 4.8b findet sich der axiale Verlauf des Strahlradius  $\omega(z)$  und in Abbildung 4.8c findet sich die axiale Intensitätsverteilung  $I(r = 0, z)$ .



**Abbildung 4.8.:** Vergleich zwischen Bessel- und Gaußstrahlen. **(a):** Radiale Intensitätsverteilung durch die Strahltaille. **(b):** Axialer Verlauf des Strahlradius  $\omega(z)$ . **(c):** Axiale Intensitätsverteilung.

Für die Messung von  $z_{max}$  wurde eine Funktion in der Form von Gleichung (1.12) an  $\sqrt{I(r = 0, z)}$  angepasst. In Abbildung 4.8c ist das Quadrat dieser Anpassung eingezeichnet. In der Nähe der Strahltaille stimmt die Anpassung gut mit den Daten überein. In größerer Entfernung von der Taille können die Messwerte jedoch nicht mehr durch die Anpassung beschrieben werden. Hier wird die Abweichung des erzeugten Strahls von einem idealen Besselstrahl deutlich.

Die Parameter  $FWHM_z$ ,  $\omega_0$  und  $FWHM_r$  wurden analog zu Abschnitt 4.2.1 gemessen. Ähnlich wie bei dem Gaußstrahl ist das radiale Profil des Besselstrahls an den Seiten verbreitert und es sind keine Nebenmaxima erkennbar, wie sie theoretisch zu erwarten wären. Dies wird durch die Anpassung in Abbildung 4.8a deutlich und kann teilweise durch Licht von außerhalb der Fokusebene erklärt werden, wodurch die Ringe verschwommen detektiert werden. Gegen diese Erklärung spricht der Fakt, dass die Nebenmaxima bei 1P-Streuung im FEP-Röhrchen deutlich zu erkennen sind (siehe Abbildung 4.7a). Ein weiterer möglicher Grund ist sekundäre Fluoreszenz des Farbstoffs, wodurch die Maxima miteinander zu verschwimmen scheinen.

Die aus den Profilen abgeleiteten Parameter des Besselstrahls finden sich in Tabelle 4.3. Die gemessenen Werte sind schlechter als die theoretisch erwarteten. Die axiale Ausdehnung, gegeben durch  $FWHM_z$  und  $z_{max}$ , ist um etwa 20 % geringer als erwartet, während die Strahltaille deutlich breiter ist. Sowohl  $\omega_0$  als auch  $FWHM_r$  sind etwa 59 % höher als erwartet und damit größer als die Werte des Gaußstrahls.

Parameter	Messwert [ $\mu\text{m}$ ]	Theoretisch [ $\mu\text{m}$ ]
$FWHM_z$	$72,8 \pm 1,7$	89,5
$z_{max}$	$122,4 \pm 2,0$	156,2
$\omega_0$ (durch Taille)	$2,90 \pm 0,03$	-
$\omega_0$ (Minimum des geglätteten $\omega(z)$ )	$1,99 \pm 0,02$	-
$\omega_0$ (Anpassung durch Taille)	$1,96 \pm 0,01$	-
$\omega_0$ (kombiniert, nur Minimum und Anpassung)	$1,97 \pm 0,01$	1,24
$FWHM_r$ (durch Taille)	$2,45 \pm 0,01$	-
$FWHM_r$ (Anpassung durch Taille)	$2,39 \pm 0,02$	-
$FWHM_r$ (kombiniert)	$2,42 \pm 0,01$	1,52
$FWHM_z^{Gau\beta}$	$17,57 \pm 0,03$	-
$\omega_0^{Gau\beta}$	$1,81 \pm 0,01$	-
$FWHM_r^{Gau\beta}$	$2,11 \pm 0,01$	-

**Tabelle 4.3.:** Strahlparameter des 2P-Besselstrahls. Die Werte sind abhängig von der Abbildungsfunktion. Bestimmt für ein Objektiv mit  $NA = 0,8$ .

Hier muss jedoch beachtet werden, dass bei der theoretischen Berechnung ein idealer Besselstrahl vorausgesetzt wurde, welcher unmöglich zu realisieren ist. Eine häufige Fehlerquelle ist die Spitze des Axicons. Bei der Herstellung dieser speziellen Linsenform ist es in der Regel nicht möglich, einen perfekten Kegel zu formen. Dadurch ist die Spitze eines realen Axicons abgeflacht und lässt einen Teil des einfallenden Lichts gerade passieren, wodurch Aberrationen bei der Strahlformation entstehen. Dieses Licht kann mit einer ringförmigen Maske entfernt werden. Dazu wird die Maske in einer mit der hinteren Brennebene des Objektivs konjugierten Ebene platziert [54]. Das Blockieren des Lichtes bedeutet jedoch einen Verlust des Photonbudgets, welches zwingend nötig für die 2P-Anregung ist. Zudem erhöht die Maske die Anforderungen an die Langzeitstabilität des Mikroskops, da der vom Axicon erzeugte Ring genau mit der Maske überlagert werden muss.

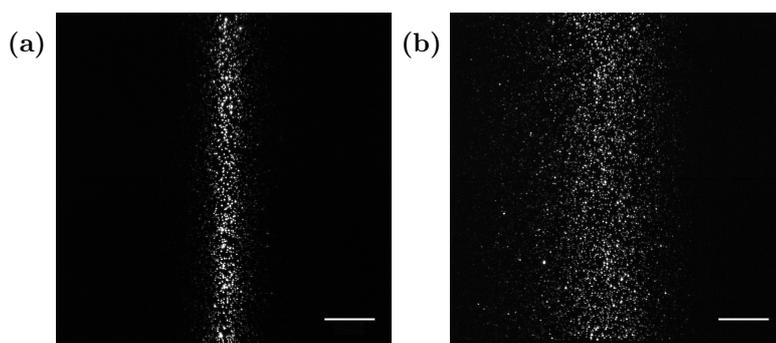
Obwohl die theoretischen Werte nicht erreicht werden, ist das  $FWHM_z$  des Besselstrahls mehr als vier mal so hoch wie jenes des Gaußstrahls, wodurch das Sichtfeld um eben diesen Faktor steigt. Zudem bleibt der Strahlradius über eine Distanz von etwa  $150 \mu\text{m}$  nahezu konstant, während der Gaußstrahl stark divergiert. Dies wird in Abbildung 4.8b deutlich. Dadurch profitiert bei Besselbeleuchtung das gesamte Sichtfeld von der geringen Strahltaile.

### 4.3. Bildqualität

In diesem Abschnitt werden verschiedene Aspekte der Qualität der aufgenommenen Bilder betrachtet. In Abschnitt 4.3.1 wird die Größe des effektiven Sichtfeldes und in Abschnitt 4.3.3 wird das Auflösungsvermögen in Abhängigkeit der verwendeten Beleuchtung untersucht. Darüber hinaus wird in Abschnitt 4.3.2 der Einfluss der konfokalen Detektion auf den Bildkontrast quantifiziert.

#### 4.3.1. Größe des Sichtfeldes

Wie in Abschnitt 4.2.2 gezeigt wurde, unterscheiden sich die Beleuchtungsarten mit Gauß- und Besselstrahlen hinsichtlich ihres longitudinalen Intensitätsverlaufes. Hier wird untersucht, wie sich dies auf die Größe des nutzbaren Sichtfeldes auswirkt. Dazu wird zunächst das nutzbare Sichtfeld bei der Abbildung fluoreszierender Nanopartikel (FluoSpheres carboxylate, yellow-green, Invitrogen) betrachtet. Die Nanopartikel wurden dazu in Agarose eingebettet und es wurde eine Z-Ebene aufgenommen (siehe Abbildung 4.9).



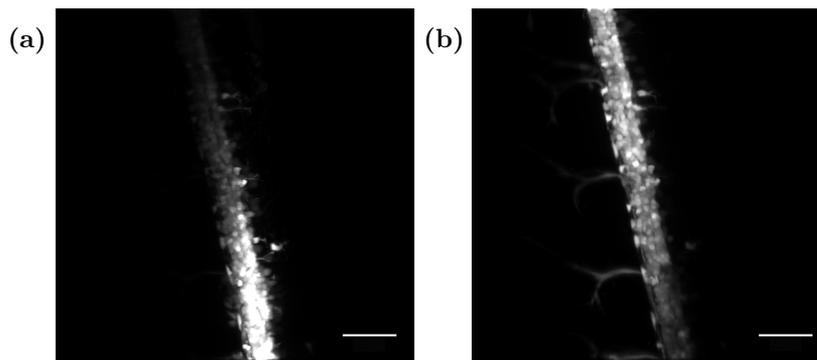
**Abbildung 4.9.:** Fluoreszierende Nanopartikel in Agarose.

(a): Gaußbeleuchtung. (b): Besselbeleuchtung. Konfokale Detektion. Skala 50  $\mu\text{m}$ .

Das nutzbare Sichtfeld mit Besselbeleuchtung ist etwa vier mal so hoch wie jenes bei Gaußbeleuchtung. Dies entspricht den Erwartungen, da das  $FWHM_z$  des Besselstrahls um diesen Faktor größer als jenes des Gaußstrahls ist.

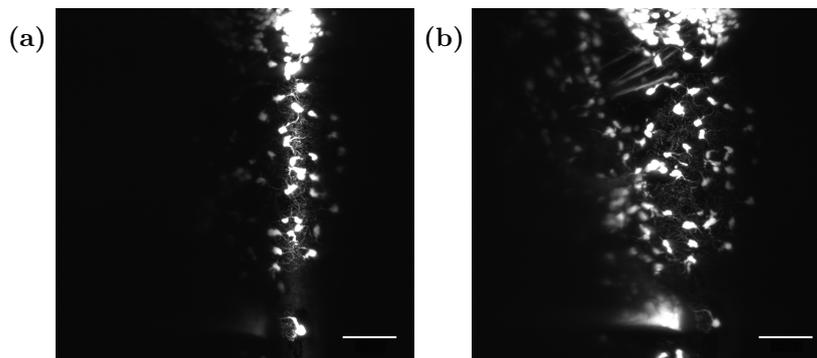
Um den Nutzen des vergrößerten Sichtfeldes in biologischen Proben zu demonstrieren, wurden Aufnahmen in verschiedenen Bereichen in Zebrafischlarven erzeugt. Der erste Bereich befindet sich im Rückenmark der Larven (siehe Abbildung 4.10).

Aufgrund der länglichen Geometrie des Rückenmarks, ist das Sichtfeld mit Gaußbeleuchtung in der Regel ausreichend für die Beobachtung dieser Art von Proben. Es kann bei der Platzierung der Larven jedoch nicht garantiert werden, dass sie absolut gerade in den FEP-Röhrchen liegen.



**Abbildung 4.10.:** Zellen im Rückenmark einer zwei Tage alten Zebrafischlarve. Maximumintensitätsprojektion von 100 Z-Ebenen mit Schrittweite 1  $\mu\text{m}$ . **(a):** Gaußbeleuchtung. **(b):** Dieselbe Position mit Besselbeleuchtung. Konfokale Detektion. Skala 50  $\mu\text{m}$ .

In diesem Fall ist das Rückenmark gegenüber der Scanrichtung der Lichtscheibe verkippt, wodurch es nicht vollständig abgebildet werden kann. Dies wird in Abbildung 4.10a verdeutlicht. Abgebildet ist eine Maximumintensitätsprojektion von 100 Z-Ebenen mit Schrittweite 1  $\mu\text{m}$  im Rückenmark einer zwei Tage alten Zebrafischlarve. Durch Verwendung von Besselbeleuchtung kann auch das verkippte Rückenmark vollständig abgebildet werden, wie in Abbildung 4.10b demonstriert wird.



**Abbildung 4.11.:** Zellen im Gehirn einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. Maximumintensitätsprojektion von 100 Z-Ebenen mit Schrittweite 1  $\mu\text{m}$ . **(a):** Gaußbeleuchtung. **(b):** Dieselbe Position mit Besselbeleuchtung. Konfokale Detektion. Skala 50  $\mu\text{m}$ .

Noch deutlicher als im Rückenmark, macht sich das vergrößerte Sichtfeld im Gehirn der Fischlarven bemerkbar. Dies wird in Abbildung 4.11 verdeutlicht. Hier sind Maximumintensitätsprojektionen von 100 Z-Ebenen mit Schrittweite 1  $\mu\text{m}$  im Gehirn einer fünf Tage alten Zebrafischlarve abgebildet. Aufgrund des vier mal größeren Sichtfeldes sind mit Besselbeleuchtung deutlich mehr Zellen sichtbar als mit Gaußbeleuchtung.

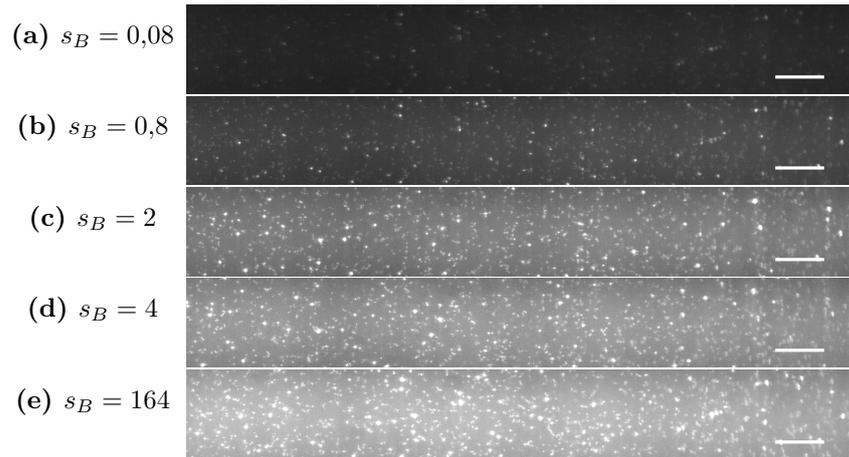
### 4.3.2. Einfluss der konfokalen Detektion auf den Bildkontrast

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der konfokalen Detektion auf die Bildqualität untersucht, wobei insbesondere die Verbesserung des Bildkontrastes betrachtet wird. Es werden hierzu zwei Modellsysteme betrachtet. Zum einen werden fluoreszierende Nanopartikel vor einem homogenen Hintergrund betrachtet, um die Kontrastverbesserung in Abhängigkeit der Detektorbreite zu untersuchen. Zum anderen wird eine lebende Zebrafischlarve sowohl mit konfokaler als auch konventioneller Detektion abgebildet, um die Kontrastverbesserung *in vivo* zu demonstrieren.

#### Messung des Bildkontrasts mit fluoreszierenden Nanopartikeln

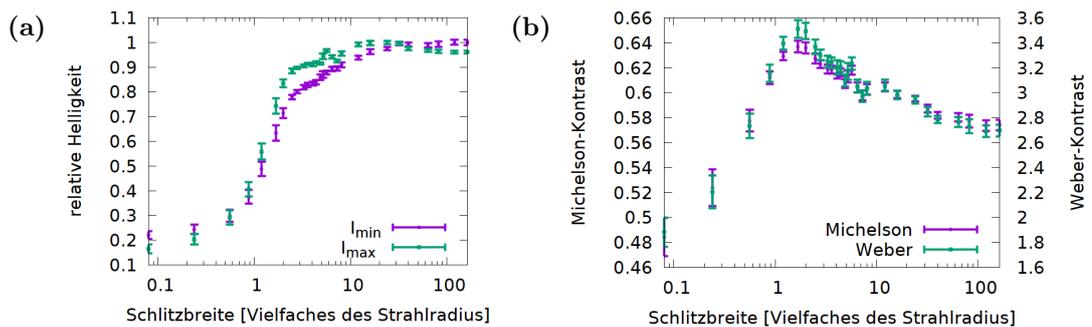
Um den Einfluss des konfokalen Schlitzdetektors auf den Bildkontrast zu quantifizieren, wurden fluoreszenzmarkierte Polystyrenkugeln (FluoSpheres carboxylate, yellow-green, Invitrogen) mit einem Durchmesser von  $0,2\ \mu\text{m}$  zusammen mit einer Farbstofflösung (5(6)-Carboxyfluorescein, 21877, Sigma-Aldrich) in ein Agarosegel (A2576, Sigma-Aldrich) in einem FEP-Röhrchen eingebettet. Die Polystyrenkugeln wurden zuvor im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt. Die Konzentration des Farbstoffes betrug  $1\ \mu\text{g}:5\ \text{ml}$  Wasser und die Agarosekonzentration betrug 1,25%. Die Kugeln, der Farbstoff und die Agarose wurden anschließend im Verhältnis 1:1:6 gemischt. Die Polystyrenkugeln stellten bei der Abbildung das Objekt dar, während die Farbstofflösung als homogener Hintergrund fungierte.

Die Abbildung erfolgte durch 2P-Anregung mit Besselbeleuchtung. Aufgenommen wurde eine Z-Ebene in der Mitte des Röhrchens, welche für ausgewählte Schlitzbreiten  $s_B$  zwischen einem und 2048 Pixeln aufgenommen wurde. Jede Aufnahme wurde 10 mal wiederholt. Aufnahmen mit ausgewählten Schlitzbreiten finden sich in Abbildung 4.12. Um den Bildkontrast nach den Formeln 1.22 und 1.21 berechnen zu können, muss für die Bilder die Intensität des Signals  $I_{max}$  und des Hintergrundes  $I_{min}$  bestimmt werden. Eine simple Extraktion der Pixel mit der höchsten, bzw. niedrigsten Intensität hat sich dabei jedoch als zu störanfällig gegenüber Schwankungen erwiesen. Daher wurde wie folgt vorgegangen: Zur Bestimmung von  $I_{max}$  wurden die Maxima der 20 hellsten Polystyrenkugeln gemittelt. Bei der Ermittlung von  $I_{min}$  mussten zunächst defekte Pixel, die nicht proportional auf das einfallende Licht reagieren und daher deutlich dunkler als ihre direkten Nachbarn waren, von der weiteren Betrachtung ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurde ein Median-Filter mit einer 20%-Schwelle auf die Bilder angewandt.



**Abbildung 4.12.:** Nanopartikel bei unterschiedlichen Schlitzbreiten  $s_B$  des *Rolling Shutter*s. Skala 20  $\mu\text{m}$ .

Dabei wurde die Intensität jedes Pixels, dessen Helligkeit mehr als 20% unter dem Medianwert der direkten Nachbarpixel liegt, durch den Medianwert ersetzt. Danach wurden die Bilder um den Faktor 16 herunter skaliert und der Wert des dunkelsten Pixels bestimmt. Sowohl  $I_{max}$  als auch  $I_{min}$  wurden über die 10 Aufnahmen mit jeder Schlitzbreite gemittelt. Die Auswertung erfolgte mit einem in LabVIEW selbstgeschriebenen Programm. Die Resultate der Messungen zur Bildhelligkeit und zum Bildkontrast sind in Abbildung 4.13 dargestellt. Die Schlitzbreiten sind in Einheiten des  $\frac{1}{e^2}$ -Radius  $\omega_0$  des Beleuchtungsstrahls angegeben und die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen bei Mittlung über 10 Aufnahmen.



**Abbildung 4.13.:** Helligkeit und des Kontrast von Nanopartikeln bei unterschiedlichen Schlitzbreiten des *Rolling Shutter*s. **(a):** Relative Helligkeiten  $I_{min}$  und  $I_{max}$ . **(b):** Bildkontrast nach Michelson und Weber. Die kleinste eingestellte Schlitzbreite entspricht einem Pixel. Die größte eingestellte Schlitzbreite entspricht der gesamten Bildhöhe.

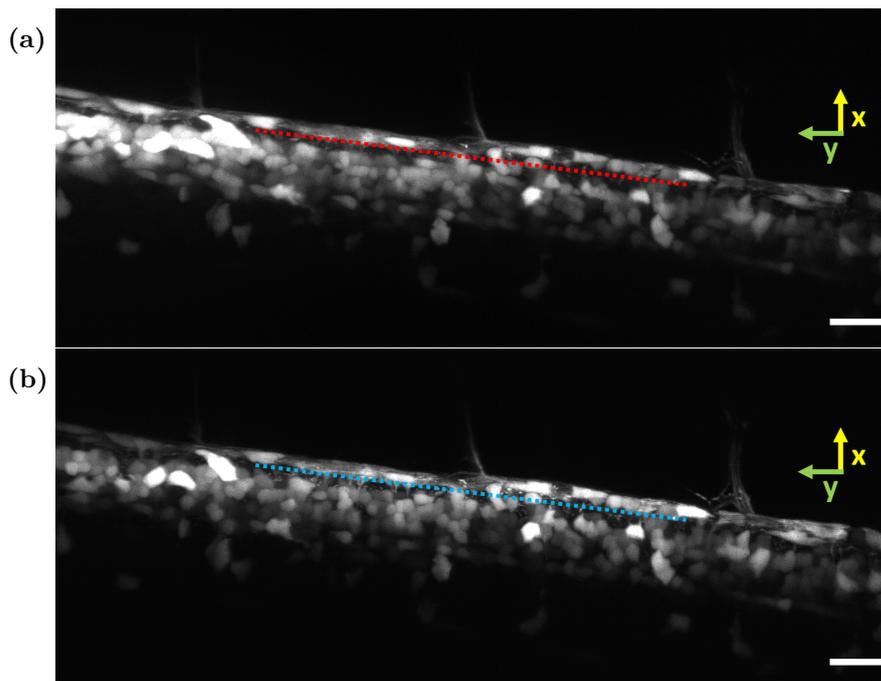
Abbildung 4.13a zeigt die Helligkeit von  $I_{min}$  und  $I_{max}$  als Funktion der Breite des Detektors. Beginnend bei der kleinsten Detektorbreite von einem Pixel, was etwa dem 0,08-Fachen des Strahlradius entspricht, nehmen beide Helligkeiten mit steigender Detektorgröße bis zum zweifachen Strahlradius exponentiell zu. Dabei steigt die Helligkeit von  $I_{max}$  deutlich schneller um etwa den Faktor 5, während  $I_{min}$  nur um den Faktor 3,2 steigt. Dies lässt sich anschaulich wie folgt erklären. Vergrößert man die Detektorbreite, so verringert sich der konfokale Effekt und es wird mehr gestreutes Hintergrundlicht detektiert. Gleichzeitig steigt die Helligkeit des Signals, da ein größerer Teil des Anregungsstrahls zur Fluoreszenz verwendet werden kann. Oberhalb von  $2\omega_0$ , nehmen  $I_{min}$  und  $I_{max}$  nur noch linear mit zunehmender Detektorbreite zu, wobei die Zunahme von  $I_{min}$  deutlich höher ist. Während hier  $I_{min}$  um etwa 40% steigt, steigt  $I_{max}$  nur um etwa 15%. Der absolute Helligkeitszuwachs ist bei beiden Werten in etwa gleich. Dies lässt darauf schließen, dass oberhalb einer Detektorbreite von  $2\omega_0$  die Zunahme von  $I_{max}$  hauptsächlich auf eine Zunahme des Hintergrundes  $I_{min}$  mit steigender Detektorbreite zurückzuführen ist.

Das Verhalten der Helligkeiten spiegelt sich auch in den gemessenen Werten des Bildkontrastes in Abbildung 4.13b wieder. Dieser steigt zwischen der kleinsten Detektorbreite bis etwa  $2\omega_0$  steil an, da hier die Fluoreszenzzunahme die Auswirkungen des konfokalen Effekts überwiegt. Oberhalb von  $2\omega_0$  nimmt der Kontrast jedoch in etwa linear ab, da hier der Anteil des Hintergrundes  $I_{min}$  an der Gesamthelligkeit zunimmt, ohne dass sich die Fluoreszenz des Signals nennenswert erhöht.

### Abbildung von Oligodendrozyten in Zebrafischlarven

Um die Verbesserung der Bildqualität in biologischen Proben durch die konfokale Detektion zu untersuchen, wurden Abbildungen von Oligodendrozyten in drei Tage alten Zebrafischlarven *Tg(olig2:EGFP)* aufgenommen. Die Detektion erfolgte einmal in klassischer Weitfelddetektion und einmal mit konfokaler Schlitzdetektion. Für die Weitfelddetektion wurde der Laserstrahl zur Erzeugung des Lichtblattes mit einem Dreieckssignal bei 30 Hz durch die Probe bewegt. Zur Anregung wurde die Probe mit Gaußstrahlen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 930$  nm beleuchtet. In Abbildung 4.14 sind Maximintensitätsprojektionen von Z-Stapeln mit jeweils 80 Bildern und Schrittweite 1  $\mu\text{m}$  abgebildet. Um die Aufnahmen besser vergleichen zu können, betrug in beiden Fällen die Belichtungszeit 430 ms je Z-Ebene. Beim Vergleich der beiden Aufnahmen wird der höhere Bildkontrast der konfokalen Aufnahme augenscheinlich.

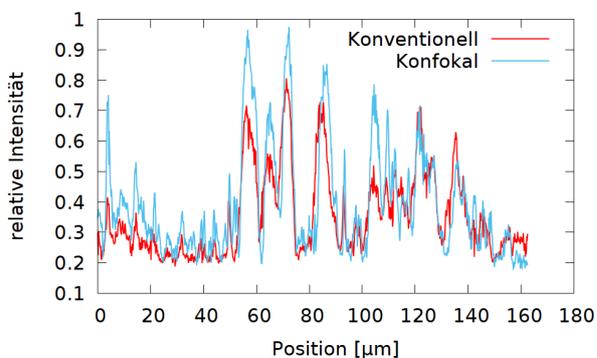
Um dies zu verdeutlichen, sind in Abbildung 4.15 die normierten Intensitätsprofile entlang der roten bzw. blauen Linie in Abbildung 4.14 abgebildet.



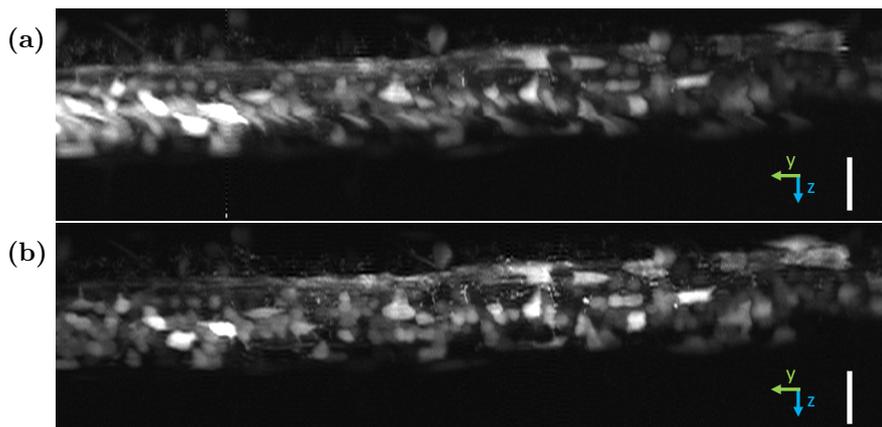
**Abbildung 4.14.:** Konventionelle und konfokale Abbildung in Zebrafischlarven. **(a):** Konventionelle Weitfelddetektion. **(b):** Konfokale Detektion mit einer Detektorbreite von 50 Pixeln. Die Intensitätsprofile entlang der roten bzw. blauen Linie sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Skala 20  $\mu\text{m}$ .

Hier ist eine deutliche Steigerung des Abbildungskontrastes bei Verwendung der konfokalen Detektion zu beobachten, wodurch mehr Details in Abbildung 4.14b sichtbar sind.

Durch die konfokale Detektion verbessert sich auch die Tiefendiskriminierung entlang der Z-Richtung, da Fluoreszenz- und Streulicht aus Bereichen außerhalb der Fokusebene unterdrückt werden. Dies wird in Abbildung 4.16 deutlich. Hier sind Seitenansichten derselben Probe wie in Abbildung 4.14 abgebildet, die durch Maximumintensitätsprojektion entlang der Beleuchtungs(X)-Achse erzeugt wurden. Es ist gut zu erkennen, dass die konfokale Detektion den Bildkontrast in Z-Richtung erhöht.



**Abbildung 4.15.:** Normierte Intensitätsprofile entlang der roten, bzw. blauen Linie in Abbildung 4.14.



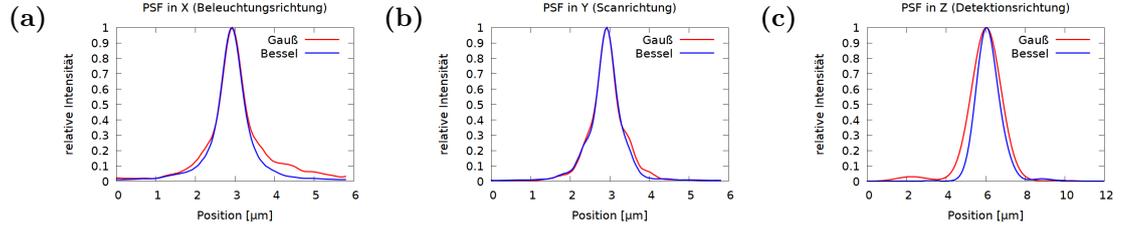
**Abbildung 4.16.:** Seitenansicht von konventioneller und konfokaler Abbildung in Zebrafischlarven. **(a):** Konventionelle Weitfelddetektion. **(b):** Konfokale Detektion mit einer Detektorbreite von 50 Pixeln. Beleuchtung mit Gaußstrahlen. Skala 20  $\mu\text{m}$ .

### 4.3.3. Laterale und axiale Auflösung

Um das laterale und axiale Auflösungsvermögen des Mikroskops zu untersuchen, wurden fluoreszierende Nanopartikel (FluoSpheres carboxylate, yellow-green, Invitrogen) mit einem Durchmesser von  $0,2\ \mu\text{m}$  in ein Agarosegel (A2576, Sigma-Aldrich) in einem FEP-Röhrchen eingebettet. Anschließend wurde mit Gauß- und Bessel-Beleuchtung jeweils ein Bildstapel mit 300 Z-Ebenen und einer Schrittweite von  $0,1\ \mu\text{m}$  aufgenommen. Es wurde konfokale Detektion mit einer Schlitzbreite von 101 Pixeln verwendet, was etwa dem Achtfachen des Strahlradius entspricht. Durch die Verwendung eines relativ großen Detektordurchmessers wurde sichergestellt, dass die Messergebnisse nicht durch eine Desynchronisierung zwischen Laser und Detektor verfälscht werden. Solange der Durchmesser des Detektors mindestens so groß wie derjenige des Strahls ist, ist keine Steigerung der Auflösung durch die konfokale Detektion zu erwarten [64]. Ist der Durchmesser jedoch kleiner als der des Strahls, steigt die Auflösung. Auf der anderen Seite sinkt in diesem Fall der Kontrast, wodurch die Bildqualität insgesamt abnimmt (siehe Abschnitt 4.3.2).

Um das laterale und axiale Auflösungsvermögen zu bestimmen, wurden die Halbwertsbreiten der PSF der Nanopartikel mit dem kommerziellen Programm *Huygens PSF Distiller* bestimmt. Dieses durchsucht den Bildstapel automatisch nach Bildpunkten und mittelt diese. Aus den gemittelten Bildpunkten werden anschließend die Halbwertsbreiten extrahiert. Die Anregung erfolgte bei  $\lambda_{\text{Absorption}} = 930\ \text{nm}$  und die Emission bei  $\lambda_{\text{Absorption}} = 515\ \text{nm}$ . Durch die automatische Detektion wurden von dem Programm sieben Bildpunkte im Falle der Gaußbeleuchtung und sechs Bildpunkte im Falle der

Besselbeleuchtung erkannt. In Abbildung 4.17 sind Querschnitte durch die gemittelten Bildpunkte abgebildet.



**Abbildung 4.17.:** Querschnitte durch die gemittelten Punktspreizfunktionen fluoreszierender Nanopartikel zur Bestimmung Auflösungsvermögens. Anregung mit Gauß- und Besselstrahlen. **(a):** Scanrichtung (X). **(b):** Anregungsrichtung (Y). **(c):** Detektionsrichtung (Z).

Die laterale Auflösung ist bei beiden Beleuchtungsarten identisch, wobei die Auflösung in Beleuchtungsrichtung (X) jeweils etwa 15% schlechter als in Scanrichtung (Y) ist. Diese Aufweitung der PSF wird wahrscheinlich durch die Wand des FEP-Röhrchens verursacht, welche in X-Richtung gekrümmt ist und somit wie eine schwache Linse fungiert. Wie zu erwarten war, hat sich die axiale Auflösung durch Verwendung der Besselbeleuchtung leicht verbessert. Zwar ist die Taille des Gaußstrahls etwas schmaler als jene des Besselstrahls, jedoch bleibt letztere über eine Distanz von etwa  $150 \mu\text{m}$  nahezu konstant. Dadurch ist diese im Mittel deutlich geringer, und die axiale Auflösung verbessert sich um etwa 25%.

$FWHM$ [ $\mu\text{m}$ ]	Gauß	Bessel	Theoretisch
X	$0,664 \pm 0,007$	$0,652 \pm 0,007$	0,328
Y	$0,565 \pm 0,006$	$0,567 \pm 0,006$	0,328
Z	$1,745 \pm 0,002$	$1,308 \pm 0,001$	1,710

**Tabelle 4.4.:** Gemessene und theoretische Halbwertsbreiten der PSF fluoreszierender Nanopartikel. Anregung bei  $\lambda_{Absorption} = 930 \text{ nm}$ . Emission bei  $\lambda_{em} = 515 \text{ nm}$ .

In Tabelle 4.4 sind die gemessenen Halbwertsbreiten aufgelistet. Zusätzlich sind die theoretischen Halbwertsbreiten aufgetragen, welche nach Gleichung (1.19) und Gleichung (1.20) berechnet wurden. Aufgrund des geringen Durchmessers des Besselstrahls liegt die tatsächlich erreichbare axiale Auflösung deutlich unterhalb des theoretisch erwarteten Wertes. Dieser wurde unter der Annahme einer Weitfeldbeleuchtung errechnet und berücksichtigt lediglich die NA des Detektionsobjektivs.

## 5. Hochgeschwindigkeitsaufnahmen

Mit dem Mikroskop sollen unter anderem Neuronenaktivitäten von Zebrafischlarven in 3D aufgenommen werden. Um dies zu ermöglichen, wird eine hohe Bildaufnahme rate von mehreren Hertz benötigt.

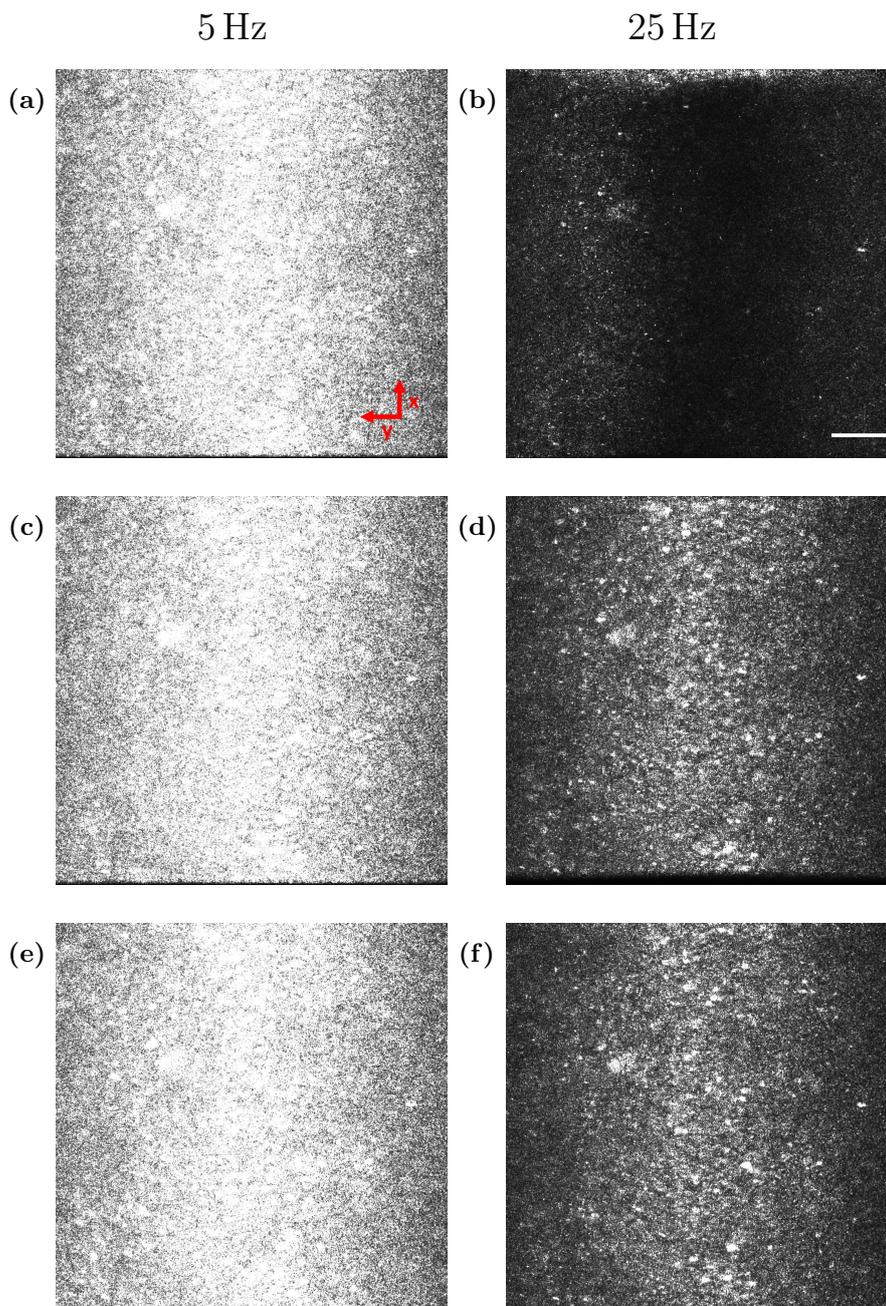
Ein Vorteil der klassischen Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie gegenüber der Laser-Scanning-Mikroskopie ist die deutlich höhere mögliche Aufnahmegeschwindigkeit. Dies wird durch die parallele Detektion aller Bildpunkte erreicht, wodurch die Aufnahme rate der Kamera zu einem limitierenden Faktor wird. Mit einer modernen sCMOS Kamera, wie der verwendeten ORCA-Flash 4.0 V2 von Hamamatsu, können Bildraten von 100 Hz bei voller Auflösung erreicht werden. Durch die Verwendung des *Lightsheet*-Modus zur konfokalen Detektion, reduziert sich die maximale Bildrate der verwendeten Kamera auf 49 Hz. Die Aufnahme rate wird jedoch final durch die Eigenschaften des benutzten Farbstoffes limitiert. Hier sind besonders die Phototoxizität und die Emissionsratensättigung aufgrund der Fluoreszenzlebensdauer zu nennen [81]. Um mit schwach leuchtenden Farbstoffen ein ausreichendes Signal-Rausch Verhältnis zu erreichen, wird eine Mischung aus hoher Anregungsleistung und -Dauer benötigt. Das bedeutet, dass bei einer Reduzierung der Aufnahme dauer gleichzeitig die Anregungsleistung erhöht werden muss. Die maximale Anregungsleistung ist jedoch begrenzt, da diese zu Schäden am Farbstoff und der Probe führen kann.

Außerdem hat sich bei den Aufnahmen herausgestellt, dass sich bei zu hohen Laserleistungen die Probe zu sehr erwärmt. Lebende Proben, wie Zebrafischlarven, reagieren darauf unter anderem mit ungewollter Bewegung, was die Beobachtung erschwert. Bei zu starker Laserleistung wird sogar das Gewebe zerstört und das Agarosemedium beginnt zu kochen. Daher liegt die maximal verwendete Bildrate des Mikroskops bei 30 Hz, was der maximalen Scanrate der verwendeten Zweiachsenscanspiegel entspricht.

Das vorliegende Kapitel besteht aus drei Abschnitten. Zuerst werden in Abschnitt 5.1 Optimierungen zur Synchronisierung zwischen Kamera und Scanspiegeln bei hohen Scanfrequenzen diskutiert. Danach wird in Abschnitt 5.2 die Geschwindigkeit volumetrischer Aufnahmen betrachtet und schließlich werden in Abschnitt 5.3 Experimente zur Messung der Neuronenaktivität in Zebrafischlarven vorgestellt.

## 5.1. Synchronisierung zwischen Kamera und Scanspiegeln bei hohen Scanfrequenzen

Der Laser kann in der Probenkammer mit je einem Zweiachsenscanspiegel pro Beleuchtungsseite in zwei Raumrichtungen bewegt werden. Die Position wird über die Eingangsspannung am Spiegel festgelegt. Aufgrund des Gewichts des Spiegels hat dieser eine endliche Trägheit und Lageänderungen aufgrund einer veränderten Eingangsspannung erfolgen nicht instantan, sondern mit einer gewissen Verzögerung. Wird diese Verzögerung nicht ausgeglichen, bewegen sich der Laserstrahl und die aktive Pixelregion im Kamerachip nicht synchron zueinander. Hierdurch kann die durch den Laser erzeugte Fluoreszenz teilweise nicht vom konfokalen Detektor eingefangen werden. Dieser Umstand wird in Abbildung 5.1a und 5.1b verdeutlicht. Der Laserstrahl wird hier bei geringer Leistung entlang der Y-Achse durch Agarose bewegt und das gestreute Licht wird mit dem konfokalen Detektor gesammelt. Die Bewegung folgt dabei einem Sägezahnsignal vom oberen zum unteren Bildrand. Die Schlitzbreite beträgt 29 Pixel, was effektiv  $4,7 \mu\text{m}$  entspricht. Die Abbildungen 5.1a und 5.1b zeigen das erzeugte Bild bei einer Scangeschwindigkeit von 5 bzw. 25 Hz. Während das Lichtblatt bei 5 Hz klar zu erkennen ist, ist dies bei 25 Hz nicht der Fall. Das erzeugte Bild ist in diesem Fall am oberen Rand am hellsten, da hier Laserstrahl und Detektor kurz überlappen. Anschließend befindet sich die Strahltaile jedoch außerhalb des Detektors, wodurch die Bildmitte dunkel erscheint. Am linken und rechten Rand ist das Bild heller, da hier der Strahl breiter ist und somit ein Teil des Lichtes vom Detektor eingesammelt wird.



**Abbildung 5.1.:** Erzeugte Lichtscheibe bei unterschiedlichen Scangeschwindigkeiten.  
(a) und (b): Ohne Korrekturen.  
(c) und (d): Mit verzögertem Kamerastart.  
(e) und (f): Mit verzögertem Kamerastart und angepasster Scanamplitude.  
Konfokale Detektion. Skala 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.1. Abhängigkeit der Spiegelverzögerung von der Scanfrequenz

Um die Verzögerung zwischen konfokalem Detektor und der Strahlposition bei unterschiedlichen Scanfrequenzen zu messen, wird das in Agarose gestreute Licht mit der Kamera ohne konfokaler Detektion aufgezeichnet. Aus dem so erzeugten Bildstapel lässt sich mit dem in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Programm die vertikale Position des Strahls für jedes Bild bestimmen. Daraus erhält man mithilfe einer linearen Regression die Position als Funktion der Zeit.

Ein Problem stellt hier die verwendete Kamera dar, welche über eine maximale Bildrate von 100 Hz verfügt. Diese Rate ist ungenügend, um den Scanvorgang bei höheren Scanfrequenzen ausreichend abzutasten. Bei der höchsten Scanfrequenz von 30 Hz können zum Beispiel nur drei Bilder aufgenommen werden, in denen der Strahl zudem zu verschwommen ist, um dessen Lage präzise zu bestimmen. Aufgrund der Architektur des Kamerasensors lässt sich die Bildrate jedoch erhöhen, indem die vertikale Bildhöhe reduziert wird. Dies liegt daran, dass der Sensor zeilenweise von der Sensormitte startend ausgelesen wird (siehe Abbildung 2.4b).

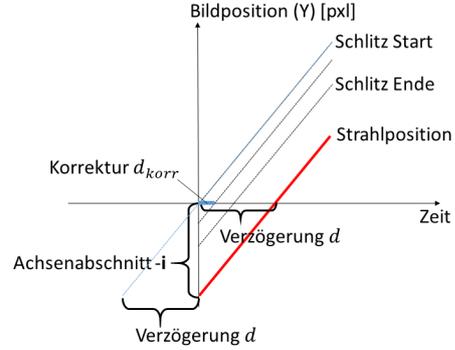
Bei einer Reduzierung der Bildhöhe um den Faktor 32 steigt die maximale Bildrate auf über 1000 Hz, was ausreichend ist, um die Strahlbewegung mit einer Auflösung von 1 ms zu verfolgen (Siehe Tabelle A.1). Um die Bewegung des Strahls über einen größeren Bildausschnitt zu messen, wird die Messung mehrfach wiederholt. Dabei wird jeweils ein anderer Abschnitt des Bildsensors ausgelesen und am Ende werden diese Abschnitte zu einem Bild zusammengefügt. Da auf der unteren Sensorhälfte die Ausleserichtung der Richtung der Laserbewegung entspricht, erscheint der Strahl in der unteren Bildhälfte verbreitert und die Lokalisierung der Strahlposition wird unpräziser. Deswegen wird für die Messung nur die obere Sensorhälfte verwendet, wodurch sich auch die Dauer der Gesamtmessung halbiert. Bei niedrigen Scanfrequenzen wird der verwendete Bildausschnitt ein weiteres Mal reduziert, um die Messung zu beschleunigen.

Alternativ zum Zusammenfügen von Einzelmessungen, könnte die Kamera um 90 Grad gedreht werden. Da die Bildrate von der horizontalen Sensorbreite unabhängig ist, kann so die Bewegung des Lasers mit nur einer Messung verfolgt werden. Es ergeben sich jedoch zwei praktische Probleme, weswegen sich gegen diese Methode entschieden wurde. Zum einen muss die Kamera vor und nach der Messung neu justiert werden, wobei es jeweils zu Justagefehlern kommen kann. Zum anderen wird nur ein Bruchteil des Strahlprofils abgebildet, was die Lokalisierung erschwert.

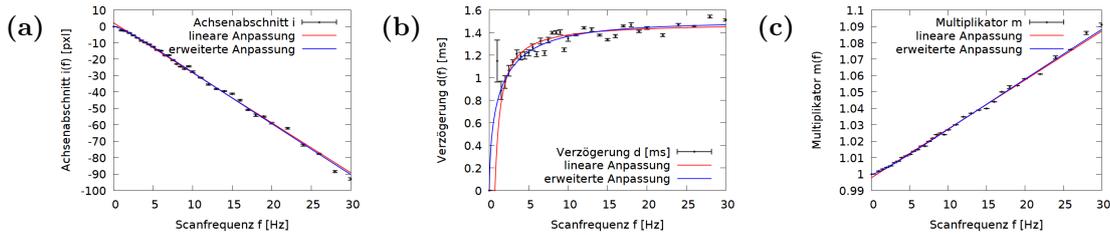
### Bestimmung der Spiegelverzögerung mittels linearer Regression

Nachdem aus den Bildstapeln die Position des Lasers als Funktion der Zeit bestimmt wurde, lässt sich aus dem Achsenabschnitt  $i$  der Regressionsgeraden die Verzögerung  $d$  ableiten (siehe Abbildung 5.2).

Dazu wurde zuerst der Achsenabschnitt bei unterschiedlichen Scanfrequenzen gemessen. Diese Messung wurde 10 mal wiederholt und gemittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.3a abgebildet. Der Wert für die Frequenz von  $f = 0$  Hz wurde nicht gemessen, sondern wird als Randbedingung gefordert. In rot ist eine lineare Anpassung eingezeichnet, welche bei hohen Scanfrequenzen gut mit den Daten übereinstimmt. Sie entspricht jedoch nicht der Randbedingung, dass der Achsenabschnitt bei 0 Hz ebenfalls Null sein muss.



**Abbildung 5.2.:** Bestimmung der Verzögerung  $d$  aus  $i$ .



**Abbildung 5.3.:** Messungen zur Trägheit der Scanspiegel als Funktion der Frequenz. **(a):** Achsenabschnitt  $i$  der Anpassungsgeraden an die Strahlposition. **(b):** Verzögerung  $d$ . **(c):** Multiplikator  $m$ . Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus  $N=10$  Messungen.

In der Tat wechselt die lineare Anpassung für Frequenzen nahe Null das Vorzeichen, was einer negativen Verzögerung entspräche. Um dies zu kompensieren, wurde eine erweiterte Anpassung der Form

$$\mathbf{i}(f) = f * \left( a_1 + a_2 * \exp(-\sqrt{f}/b) \right) \quad (5.1)$$

mit den freien Parametern  $a_1$ ,  $a_2$  und  $b$  durchgeführt. Die ermittelten Parameter aus Gleichung (5.1) werden im Steuerungsprogramm gespeichert und das Programm errechnet für die eingestellte Scanfrequenz den jeweiligen Achsenabschnitt  $i$ .

Mit der Geradensteigung  $g$ , der Belichtungszeit  $t$ , der Schlitzbreite  $s$  und der Sensorhöhe

$h$  folgt für die Verzögerung  $d$

$$d(f) = \frac{-i}{g} = \frac{-i \cdot t}{s} = \frac{-i}{f \cdot h}. \quad (5.2)$$

Hierbei gilt

$$f = \frac{s}{t \cdot h}. \quad (5.3)$$

Durch Einsetzen von Gleichung (5.1) in Gleichung (5.2) folgt

$$d(f) = -\frac{a_1 + a_2 * \exp(-\sqrt{f}/b)}{h}. \quad (5.4)$$

Die aus  $\mathbf{i}$  errechnete Verzögerung  $d$  ist in Abbildung 5.3b für dieselben Messwerte wie in Abbildung 5.3a abgebildet. Die rote und blaue Kurve folgen aus der linearen bzw. erweiterten Anpassung an  $\mathbf{i}$ .

Bei der bisherigen Rechnung wird von einem infinitesimal kleinen konfokalen Schlitz ausgegangen. Bei einem Schlitz mit endlicher Breite wird daher die Verzögerung überschätzt und entspricht dem Abstand zwischen dem Start des Schlitzes und des Laserstrahls. Um die Verzögerung zwischen der Schlitzmitte und dem Laserstrahl zu bestimmen, muss von der Verzögerung ein Korrekturterm  $d_{korr}$  subtrahiert werden. Dieser errechnet sich nach

$$d_{korr}(f) = \frac{s-1}{2 \cdot g} = \frac{s-1}{2 \cdot f \cdot h}. \quad (5.5)$$

Damit folgt für die effektive Verzögerung  $d_{eff}$

$$d_{eff}(f) = d - d_{korr}. \quad (5.6)$$

Die Auswirkungen der effektiven Verzögerung sind in Abbildung 5.1c und 5.1d zu sehen. In diesem Fall sind die Kamera und der Scanspiegel synchronisiert und das Licht des Lasers wird auch bei 25 Hz vom konfokalen Detektor gesammelt (siehe Abbildung 5.1d). Die Lichtscheibe füllt jedoch nicht den gesamten Bildausschnitt aus, was am dunklen unteren Bildrand zu erkennen ist. Dieser Effekt tritt auch bei geringeren Scanfrequenzen auf, jedoch nimmt er mit steigender Frequenz zu. Der Grund hierfür ist, dass der Laserstrahl aufgrund der Verzögerung innerhalb der vorgegebenen Aufnahmezeit nicht bis zum vorgesehenen Endpunkt laufen kann. Aus Abbildung 5.2 geht hervor, dass die fehlende Entfernung genau dem Achsenabschnitt  $\mathbf{i}$  entspricht. Um dies zu kompensieren, wird ein Multiplikator  $m$  eingeführt, mit welchem sowohl die Scanamplitude, als auch

die Aufnahmedauer multipliziert werden. Aus geometrischen Überlegungen folgt

$$m(f) = \frac{h - 2 \cdot i}{h}. \quad (5.7)$$

Der aus **i** errechnete Multiplikator  $m$  ist in Abbildung 5.3c für dieselben Messwerte wie in Abbildung 5.3a abgebildet. Die rote und blaue Kurve folgen aus der linearen bzw. erweiterten Anpassung an **i**. Durch die Multiplikation mit  $m$  erhöht sich jedoch die Verzögerung zwischen Detektor und Laserstrahl um  $d$ , wodurch für die effektive Verzögerung mit Multiplikator

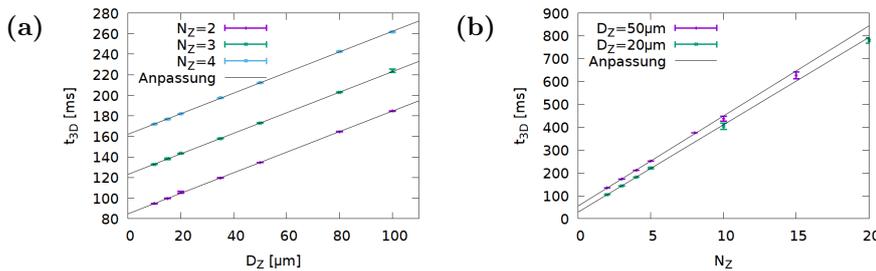
$$d_{eff,mult}(f) = 2 \cdot d - d_{korr} \quad (5.8)$$

folgt. Abbildung 5.1e und 5.1f veranschaulichen den Effekt der gleichzeitigen Multiplikation mit  $m$  und Anwendung der Verzögerung  $d_{eff,mult}$ . Der Scanner und die Kamera sind synchron und der gesamte Bildausschnitt wird verwendet.

## 5.2. Aufnahmegeschwindigkeit in 3D

Die Aufnahmerate des Mikroskops ist im *Rolling Shutter*-Modus durch die maximale Frequenz der Scanspiegel auf 30 Hz begrenzt. Durch Verwendung schnellerer Spiegel könnte diese Rate weiter erhöht werden, jedoch führt dies zu einer geringeren Belichtungszeit und somit zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis. Insbesondere steigt der Anspruch an die Leuchtkraft der Fluorophore bei 2P-Anregung.

In diesem Abschnitt wird die maximale dreidimensionale Aufnahmerate untersucht. Dazu wurde die 3D-Aufnahmezeit  $t_{3D}$ , in Abhängigkeit von der Anzahl der Z-Ebenen  $N_Z$  und der Gesamtdistanz entlang der Z-Achse  $D_Z$ , gemessen. Die Scanfrequenz betrug 29,8 Hz je Z-Ebene. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.4 dargestellt.



**Abbildung 5.4.:** Messung der Aufnahmezeit  $t_{3D}$ . **(a):**  $t_{3D}$  als Funktion der Distanz  $D_Z$ . **(b):**  $t_{3D}$  als Funktion der Ebenenanzahl  $N_Z$ . Scanrate 29,8 Hz pro Ebene

Hierbei ist jeder Messwert das Ergebnis der Mittlung von 30 Volumendurchläufen.

Zur Untersuchung des Einflusses von  $D_Z$  auf  $t_{3D}$  wurde die Distanz für  $N_Z = \{2, 3, 4\}$  variiert und  $t_{3D}$  gemessen. Um die Abhängigkeit von  $t_{3D}$  von  $N_Z$  zu bestimmen, wurde  $N_Z$  für  $D_Z = 50 \mu\text{m}$  bzw.  $D_Z = 20 \mu\text{m}$  variiert. Es zeigte sich, dass  $t_{3D}$  linear mit sowohl  $N_Z$ , wie auch  $D_Z$  zunimmt. Es fanden sich

$$\frac{t_{3D}}{D_Z} = (1,000 \pm 0,002) \frac{\text{ms}}{\mu\text{m}} \quad (5.9)$$

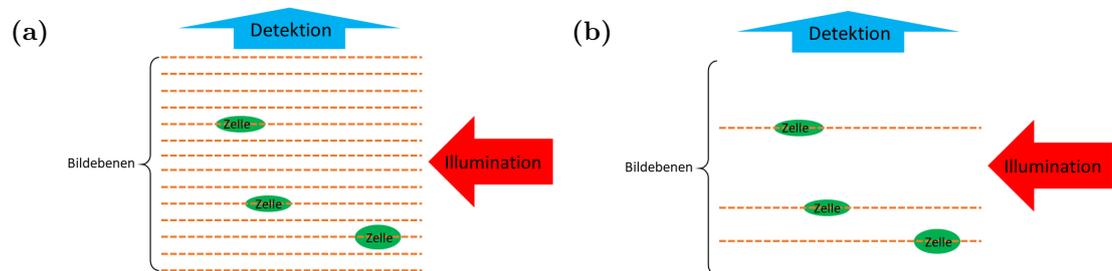
und

$$\frac{t_{3D}}{N_Z} = (37,8 \pm 0,2) \frac{\text{ms}}{\text{Z-Ebene}}. \quad (5.10)$$

Die effektive Aufnahmezeit pro Z-Ebene beträgt somit  $(25,8 \pm 0,1)$  Hz und ist aufgrund der Z-Bewegung zwischen den Aufnahmen leicht geringer als die Scanrate von 29,8 Hz. Somit kann ein Volumen von 100  $\mu\text{m}$  Tiefe und 100 Ebenen im *Rolling Shutter*-Modus in etwa 5 Sekunden aufgenommen werden.

### Erhöhung der Aufnahmegeschwindigkeit

Wie im letzten Abschnitt erläutert wurde, wird die Aufnahmegeschwindigkeit in 3D maßgeblich durch  $N_Z$  limitiert. Um die Aufnahmezeit für eine gegebene Distanz  $D_Z$  zu steigern, kann somit  $N_Z$  reduziert werden. Dies ist insbesondere vorteilhaft, wenn nur ein geringer Teil der Z-Ebenen Fluorophore aufweist (siehe Abbildung 5.5).



**Abbildung 5.5.:** Selektive Tiefenansteuerung. **(a):** In einem Volumen mit Tiefe  $D_Z$  werden  $N$  äquidistante Ebenen aufgenommen. **(b):** Im selben Volumen werden nur Ebenen mit hoher Bildinformation aufgenommen.

Bei der Aufnahme eines Bildstapels mit Z-Distanz  $D_Z$  werden in der Regel  $N_Z$  äquidistante Ebenen aufgenommen. Die Aufnahmezeit steigt entsprechend Gleichung (5.10) linear mit  $N_Z$ . In manchen Anwendungen enthält der Bildstapel zum größten Teil nur geringe Mengen an Bildinformationen in Form fluoreszierender Zellen. In diesem Fall kann die Aufnahmezeit reduziert werden, wenn nur Ebenen mit hoher Bildinforma-

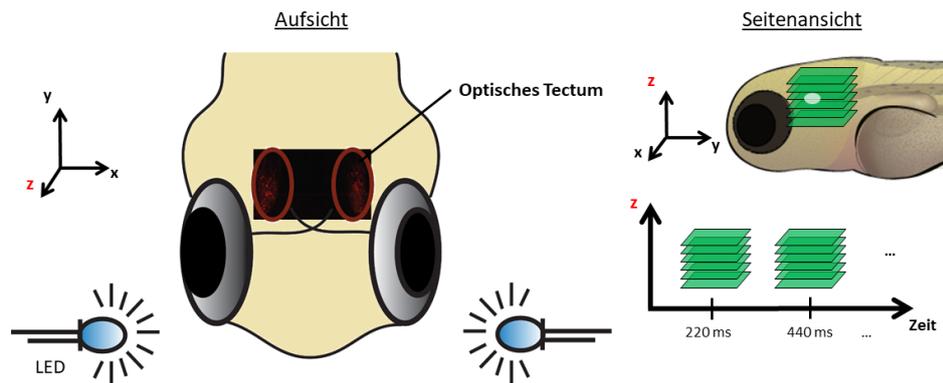
tion aufgenommen werden. Diese sind im Allgemeinen nicht äquidistant und ihre jeweilige Z-Position muss zuvor bestimmt werden. Dazu kann wahlweise zuerst ein Bildstapel mit hoher Ebenenzahl aufgenommen werden, aus welchem die entsprechenden Ebenen ausgewählt werden. Alternativ kann hierzu die in Abschnitt 3.1.3 beschriebene Multipositionen-Echtzeitansicht verwendet werden. Die gewählten Positionen werden als Datenreihe gespeichert und zyklisch mithilfe der Zwei-Achsen-Scanspiegel angesteuert. Dies geschieht innerhalb weniger Millisekunden.

### 5.3. Messung neuronaler Aktivität in Zebrafischlarven

Der Zebrafisch hat sich zu einem etablierten Modell zur Untersuchung der Funktion und Entwicklung visueller neuronaler Netzwerke *in vivo* entwickelt. Bei diesen Tieren wird ein Großteil des visuell gesteuerten Verhaltens vom optischen Tektum reguliert, welches gleichzeitig das visuelle Hauptzentrum der niederen Wirbeltiere darstellt [5].

In Neuronen ist elektrische Aktivität eng mit einem Fluss an  $Ca^{2+}$  Ionen verbunden. Mithilfe geeigneter Kalziumreporter wie *GCaMP* können Änderungen der  $Ca^{2+}$ -Konzentration und damit Neuronensignale sichtbar gemacht werden. *GCaMP* ist ein Farbstoff, der unter anderem das grün fluoreszierende Protein (GFP) und das Kalzium bindende Protein Calmodulin (CaM) enthält. In der Anwesenheit von  $Ca^{2+}$  Ionen unterläuft *GCaMP* einer strukturellen Änderung, wodurch es von einem schwach fluoreszierenden Zustand in einen Zustand mit heller Fluoreszenz übergeht [80] [1]. Die durch den Kalziumfluss erzeugten Signale sind in der Regel weniger als eine Sekunde lang sichtbar, wodurch die Beobachtung dieser Signale hohe Aufnahmezeiten erfordert.

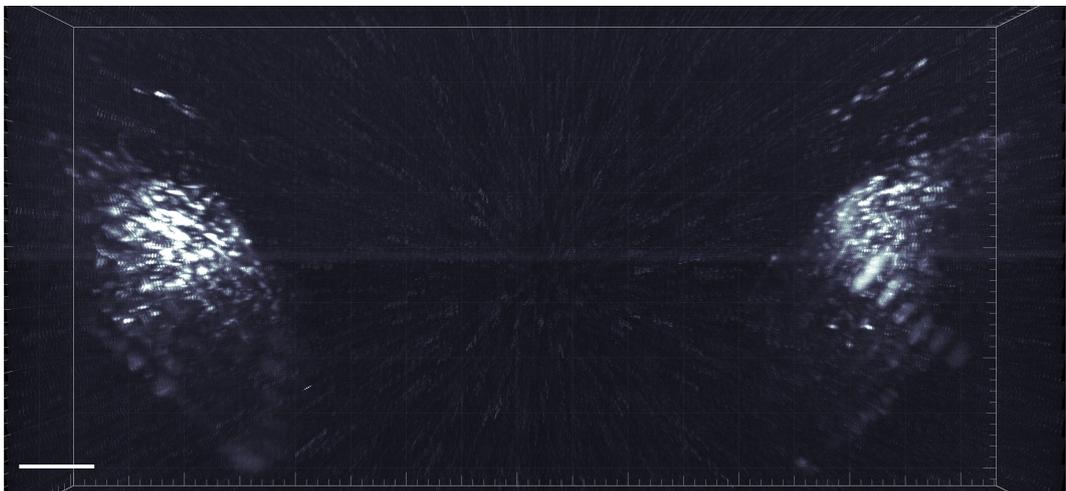
Mit dem verwendeten Mikroskop wurden angeregte Neuronensignale im optischen Tektum einer Zebrafischlarve untersucht. Die Durchführung des Experiments ist in Abbildung 5.6 skizziert. Die Larve wurde in ihrer natürlichen Position in Agarose fixiert, welche sich wiederum in einem FEP-Röhrchen befand. Vor jedem Auge befand sich je eine LED, mit welcher periodisch blaue Lichtblitze generiert wurden. Mit zwei gegenläufigen Lichtscheiben wurden die Neuronen im optischen Tektum abgebildet. Die Anregung erfolgte bei 930 nm mit Gaußbeleuchtung, wobei jeweils die Strahlteile in eine der beiden Hälften des Tektums gelegt wurde. Bei sechs abgebildeten Ebenen betrug die Aufnahmezeitdauer 220 ms pro Volumen. Durch den *Rolling Shutter* wird das blaue Licht des LED-Blitzes bei der Detektion unterdrückt. Dies ist vorteilhaft, da dieses teilweise den für GFP optimierten Emissionsfilter passiert.



**Abbildung 5.6.:** Experiment zur Neuronenantwort im optischen Tektum einer Zebrafischlarve auf einen optischen Stimulus.

### 5.3.1. Messung in mehreren Z-Ebenen

Für die dreidimensionale Beobachtung der stimulierten Neuronenaktivität wurden sechs äquidistante Z-Ebenen mit einem Abstand von je  $7\ \mu\text{m}$  in einer fünf Tage alten Zebrafischlarve *Tg(Ath5:Gal4::UAS:GCamp6s)* aufgenommen. Für die dreidimensionale Darstellung der Ebenen wurde das Programm *Imaris* (Bitplane) verwendet. Ein Video der Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_1.mp4*. Eine Maximumintensitätsprojektion aller Zeitpunkte findet sich in Abbildung 5.7.

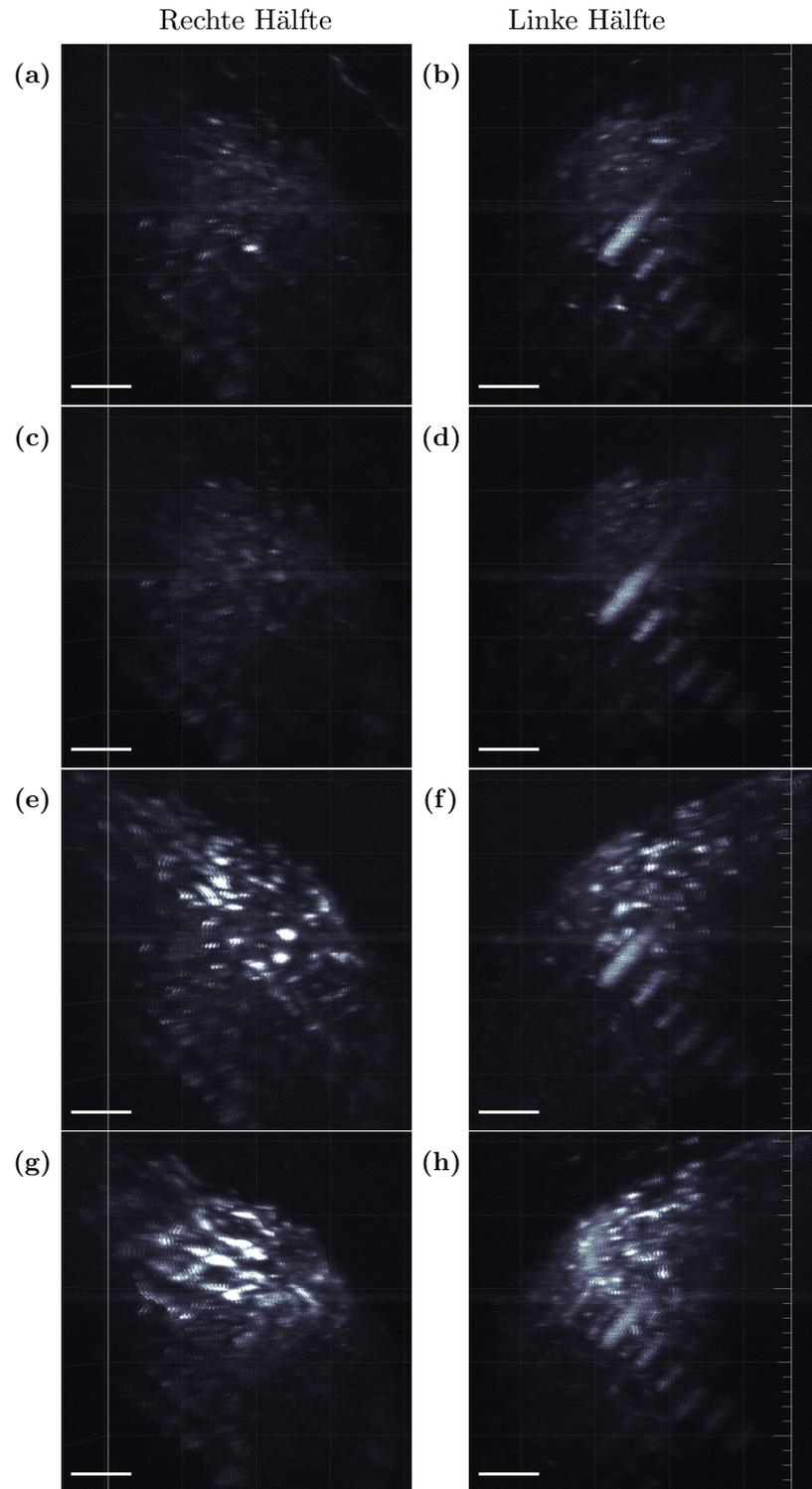


**Abbildung 5.7.:** Übersichtsaufnahme des optischen Tektums. Maximumintensitätsprojektion aus 570 Zeitpunkten. Konfokale Detektion. Skala  $25\ \mu\text{m}$ .

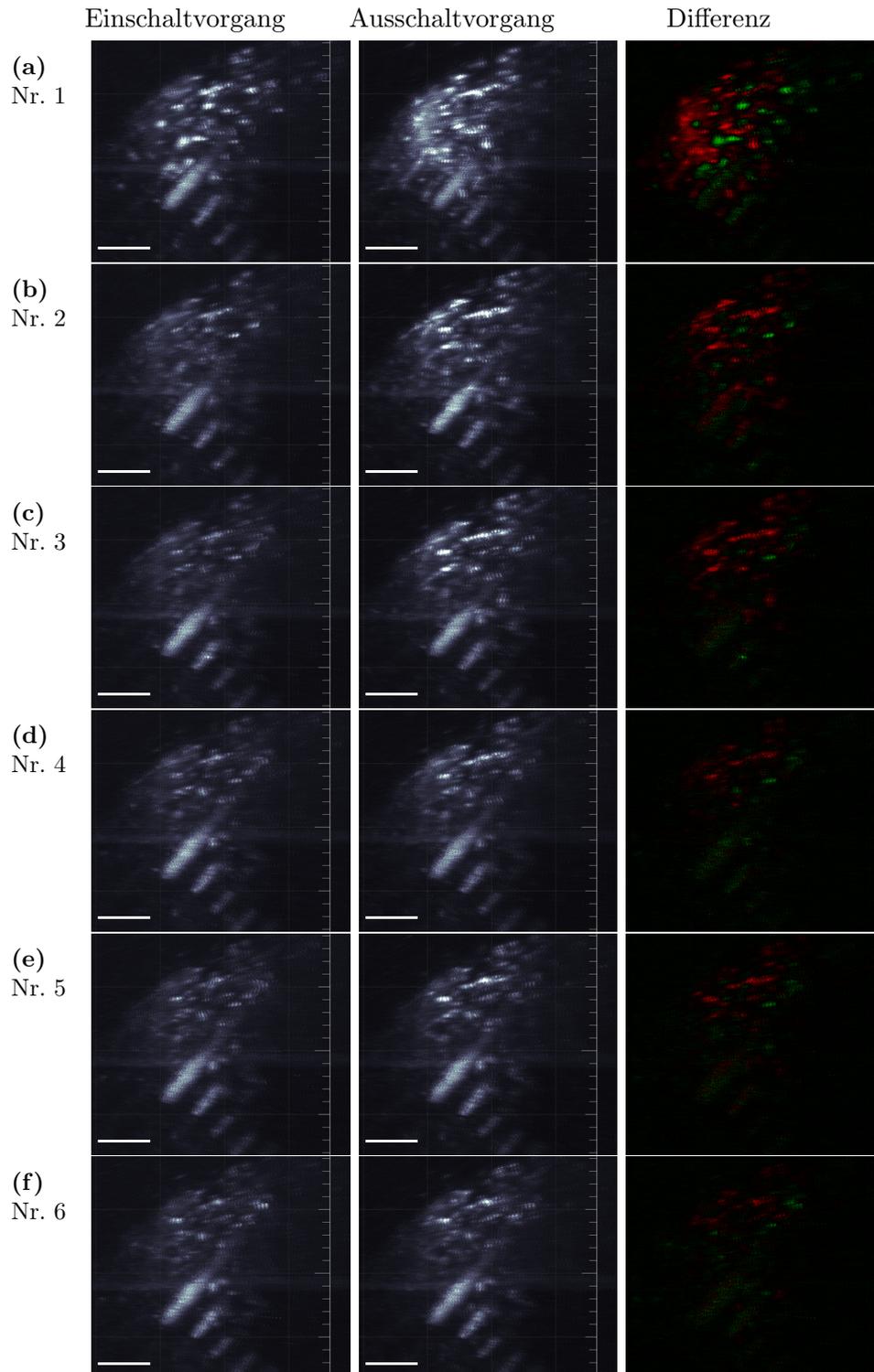
Die Abbildung dient der Übersicht über die untersuchte Region in der Fischlarve. Mit der verwendeten Technik können beide Hälften des optischen Tektums gleichzeitig dreidimensional beobachtet werden.

In Abbildung 5.8 sind vergrößerte Ausschnitte der beiden Hälften des optischen Tektums zu ausgewählten Zeitpunkten dargestellt. Zu Beginn der Messung wurde vermehrte Neuronenaktivität registriert, welche wahrscheinlich durch den Anregungslaser der Lichtscheibe hervorgerufen wurde (siehe Abbildung 5.8a und Abbildung 5.8b). Die Aktivität legte sich nach einigen Sekunden wieder, sodass vor dem ersten Einschalten der LEDs die Aktivität auf die Grundlinie zurückgegangen ist, was in Abbildung 5.8c und Abbildung 5.8d verdeutlicht wird. Nach 37 Sekunden begann das Beleuchtungsmuster, in dem sich 6 Pulse von je 6 Sekunden mit je 6 Sekunden Pause abwechselten. Auf das Ein- und Ausschalten der LEDs reagierte der Fisch mit zwei distinkten Aktivitätsmustern. Diese sind in Abbildung 5.8e und Abbildung 5.8f für den ersten Einschaltvorgang, sowie in Abbildung 5.8g und Abbildung 5.8h für den ersten Ausschaltvorgang abgebildet.

Die Aktivitätsmuster konnten in den sechs generierten Pulsen reproduziert werden. Dies wird in Abbildung 5.9 für die linke Hälfte und in Abbildung 5.10 für die rechte Hälfte des optischen Tektums demonstriert. In der linken Spalte ist jeweils die Neuronenaktivität beim Einschaltvorgang und in der mittleren Spalte jene des Ausschaltvorgangs für die sechs Lichtpulse der LED dargestellt. In der dritten Spalte ist die Differenz der ersten beiden Spalten zu sehen. Hierbei sind Bereiche, die beim Einschalten der LED heller sind, in grün und solche die beim Ausschalten heller sind in rot markiert. Hervorgerufen wird dieses Verhalten durch zwei verschiedene Arten von bipolaren Zellen in der Retina, welche durch Synapsen mit den lichtempfindlichen Sinneszellen verbunden sind. Ihre Aufgabe ist die Sammlung, Gewichtung und Weiterleitung der Informationen der Fotorezeptoren. Ein Teil der bipolaren Zellen wird durch Licht angeregt (*ON*) und ist bei Dunkelheit unterdrückt. Beim anderen Zelltyp ist das Gegenteil der Fall und die Zelle ist bei Dunkelheit aktiv (*OFF*). Die so erzeugten Signale werden in das optische Tektum weitergeleitet und dort verarbeitet.

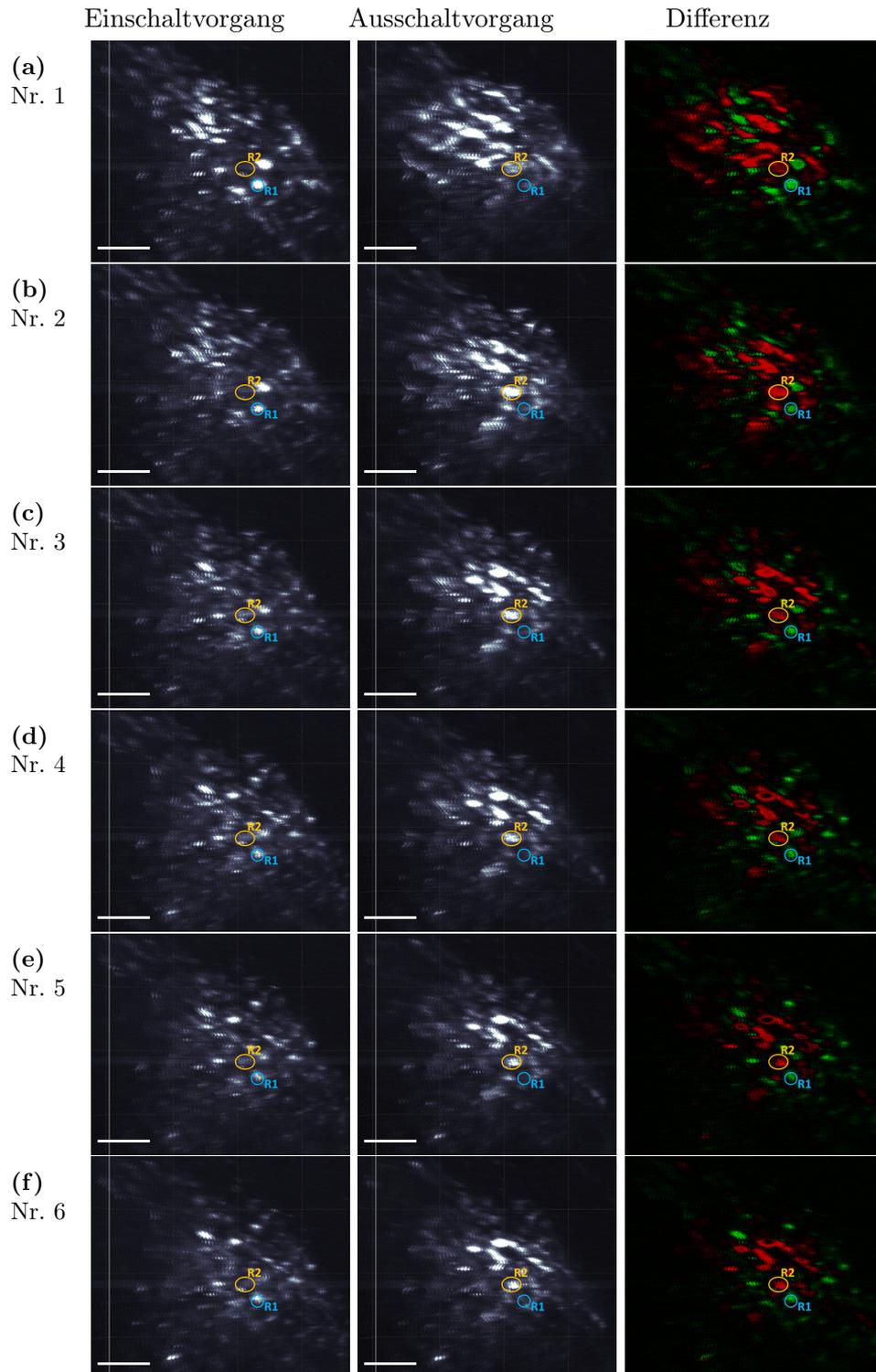


**Abbildung 5.8.:** Dreidimensionale Ansicht der Neuronenaktivität in sechs Z-Ebenen. (a) und (b): Durch den Laser angeregte Aktivität. (c) und (d): Grundlinie vor Beginn des Experiments. (e) und (f): Erstes Einschalten der LEDs. (g) und (h): Erstes Ausschalten der LEDs. Konfokale Detektion. Skala 15  $\mu\text{m}$ .



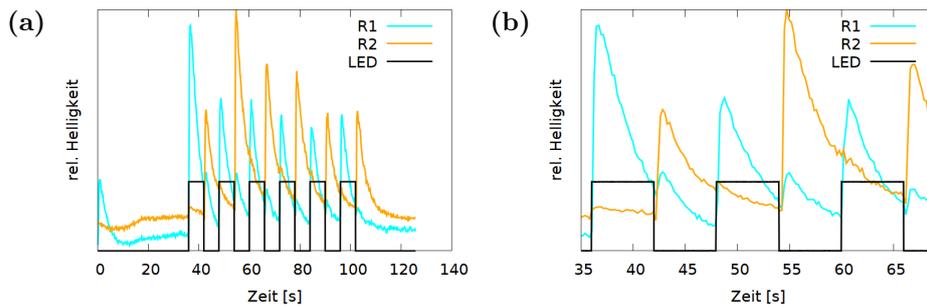
**Abbildung 5.9.:** Neuronenantwort auf sechs Lichtpulse im linken Optischen Tektum. **Grüne Bereiche** in der dritten Spalte sind heller beim Einschalten und **rote Bereiche** sind heller beim Ausschalten.

(a) bis (f): Nummer des Lichtpulses. Konfokale Detektion. Skala 15  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 5.10.:** Neuronenantwort auf sechs Lichtpulse im rechten Optischen Tektum. **Grüne Bereiche** in der dritten Spalte sind heller beim Einschalten und **rote Bereiche** sind heller beim Ausschalten.

(a) bis (f): Nummer des Lichtpulses. Konfokale Detektion. Skala 15  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 5.11.:** Relative Helligkeit der Synapsen R1 und R2 als Funktion der Zeit. In (b) ist eine vergrößerte Ansicht der ersten drei Lichtpulse dargestellt.

Dieses Verhalten wird in den in Abbildung 5.10 markierten Synapsen R1 und R2 sichtbar. Die Synapse R1 (*ON*) ist beim Einschaltvorgang hell und beim Ausschaltvorgang dunkel. Bei der Synapse R2 (*OFF*) ist dies genau entgegengesetzt. In Abbildung 5.11 ist die relative Helligkeit der Synapsen R1 und R2 als Funktion der Zeit dargestellt. In schwarz ist zusätzlich die relative Helligkeit der beiden LEDs eingezeichnet. Man kann deutlich erkennen, wie die Helligkeit von R1 beim Einschalten sprunghaft ansteigt, während dies bei R2 beim Ausschalten der LEDs der Fall ist. In Abbildung 5.11b ist eine vergrößerte Ansicht der ersten drei Lichtpulse dargestellt. Daran erkennt man, dass der Helligkeitsanstieg von R1 unterhalb von 200 ms nach dem LED Signal erfolgt, während der Anstieg der Helligkeit von R2 etwa 400 ms verzögert nach dem Ausschalten erfolgt. Weiterhin ist erkennbar, dass R1 und R2 auch beim jeweils anderen Schaltvorgang der LED einen kleinen Helligkeitsanstieg vorweisen. Dies könnte auf einen Anstieg der Aktivität der umliegenden Synapsen zurückzuführen sein.

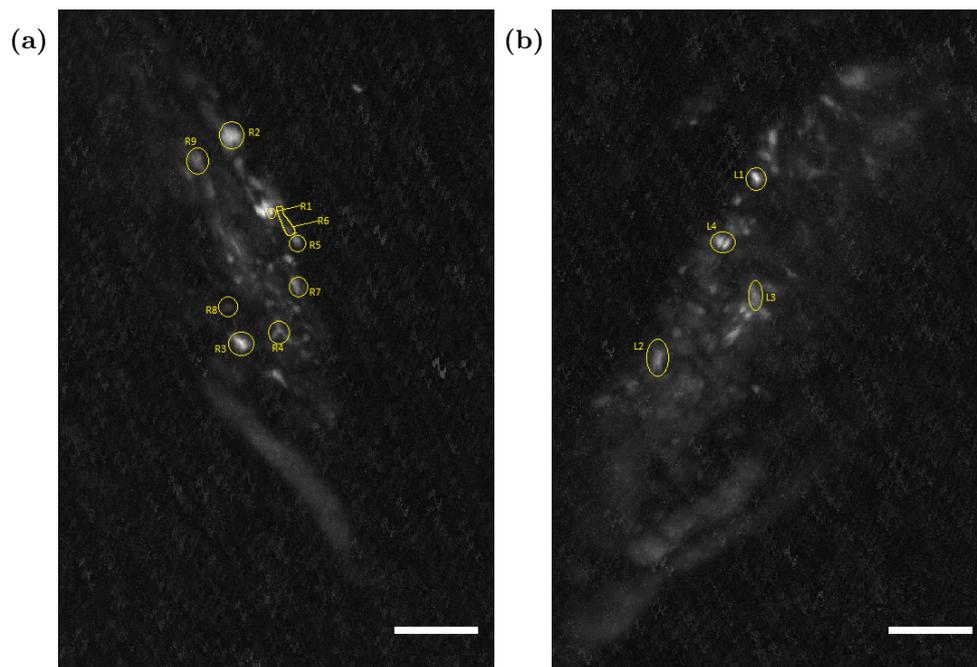
Bipolare Zellen besitzen zwei an gegenüberliegenden Polen ausgebildete Fortsätze [37], über die sie mit benachbarten Zellen kommunizieren. Das sogenannte Axon leitet Signale weg vom Zellkörper und hin zu den Ganglienzellen. Demgegenüber leitet das Dendrit Signale von den Photorezeptoren zum Zellkörper hin. Eine Besonderheit der bipolaren Zellen der Retina ist, dass sie im Unterschied zu den meisten anderen Neuronen Informationen durch graduierte Potentialänderungen kodieren. Hierbei wird in der Synapse eine variable Menge an Botenstoffen ausgeschüttet, wobei die Menge abhängig von der Stärke des Signals ist. Auf diese Weise wird der Fluss an Kalziumionen moduliert, was sich in einem unterschiedlich starken Bildsignal bemerkbar macht.

Auch die Helligkeitsmodulation von R1 und R2 im optischen Tektum (siehe Abbildung 5.10) variiert zwischen den einzelnen Lichtpulsen. Die Aktivität von R1 ist beim ersten Einschaltvorgang am größten, während dies bei R2 beim zweiten Ausschalten der LED der Fall ist.

### 5.3.2. Messung in einer Z-Ebene

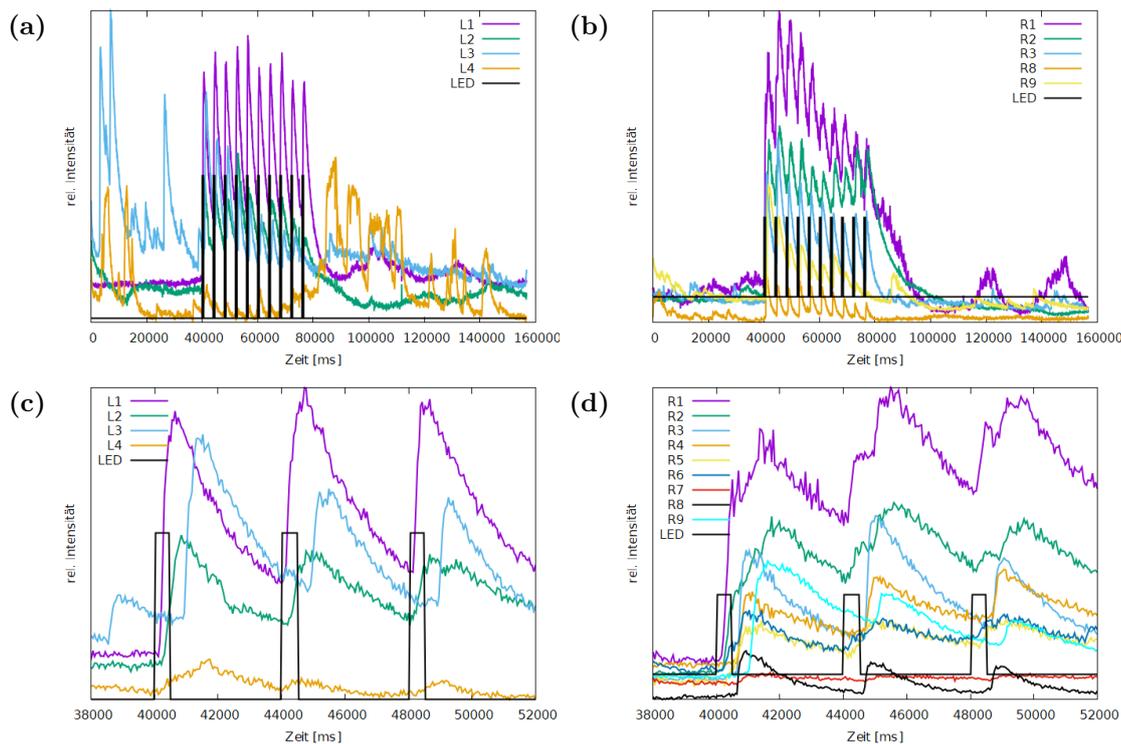
Bei der Betrachtung von nur einer einzelnen Z-Ebene lassen sich deutlich höhere Bildraten als bei volumetrischen Aufnahmen erreichen.

In Abbildung 5.12 ist eine Maximumintensitätsprojektion eines Zeitstapels im optischen Tektum einer fünf Tage alten Zebrafischlarve *Tg(Ath5:Gal4::UAS:GCamp6s)* abgebildet. Ein Video der Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_2.gif*. Die Aufnahme erfolgte bei 20,4 Hz über eine Gesamtzeit von 157 s.



**Abbildung 5.12.:** Maximumintensitätsprojektion eines Zeitstapels im optischen Tektum einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. In beiden Hälften des Tektums sind Zellen mit modulierter Helligkeit hervorgehoben. **(a):** Rechte Hälfte. **(b):** Linke Hälfte. Konfokale Detektion. Skala 15  $\mu\text{m}$ .

Es wurden 3200 Bilder aufgenommen. In beiden Hälften des optischen Tektums sind Zellen markiert, welche aufgrund des optischen Stimulus eine Modulation ihrer Helligkeit erfahren haben. Der zeitliche Verlauf der Helligkeiten ausgewählter Zellen ist in Abbildung 5.13a für die linke Hälfte und in Abbildung 5.13b für die rechte Hälfte des optischen Tektums dargestellt. In schwarz ist zusätzlich die relative Intensität der LEDs dargestellt. Innerhalb der ersten 40 Sekunden wird mit ausgeschalteten LEDs die Grundlinie der Zellen aufgenommen. Dabei zeigte sich bei den Zellen L3 und L4 ausgeprägte spontane Aktivität.



**Abbildung 5.13.:** Zeitlicher Verlauf der Neuronenaktivität in einer Z-Ebene. **(a)** und **(b):** Modulation der Helligkeit der in Abbildung 5.12 markierten Zellen. **(c)** und **(d):** Ausschnitte aus den Helligkeitsverläufen in **a** und **b**.

Mit den LEDs wurden insgesamt 10 Lichtblitze mit einer Dauer von je 0,5 s und 4 s Pause zwischen den Blitzen generiert. Bei den ausgewählten Zellen zeigte sich durch den Lichtblitz ein deutlicher Anstieg der Helligkeit. Dabei konnte beobachtet werden, dass dieser Anstieg bei den Zellen nach unterschiedlichen Verzögerungen einsetzte. Um dies zu verdeutlichen, ist in Abbildung 5.13c und Abbildung 5.13d jeweils ein verkürzter Ausschnitt der Helligkeitsverläufe dargestellt.

Interessant ist der Helligkeitsverlauf von Zelle L4 (siehe Abbildung 5.13a). Hier ist die stimulierte Helligkeitsmodulation deutlich geringer als die spontane Aktivität der Zelle. Diese nimmt nach dem letzten Lichtblitz deutlich zu.



## 6. Optimierungen für Langzeitmessungen

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Benjamin Odermatt am Anatomischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn, wurde der Einfluss des 36K-Proteins auf die Myelinisierung von Axonen im zentralen Nervensystem (ZNS) von Zebrafischlarven untersucht.

Axone sind Nervenzellfortsätze mit einer häufig langen, schlauchartigen Form. Myelin ist eine Biomembran, die zu etwa 70% aus Lipiden und 30% aus Proteinen besteht [41], und sie umgibt die meisten Axone von Wirbeltieren. Die sogenannte Myelinscheide fungiert als elektrisch isolierende Hülle und führt somit zu einer Senkung von Membranleitwert und Membrankapazität. Dies ermöglicht eine besonders schnelle Erregungsweiterleitung. Bei demyelinisierenden Erkrankungen, wie zum Beispiel der multiplen Sklerose, verlieren die Nervenzellen ihre Myelinhülle. Dadurch verlieren sie häufig die Möglichkeit, ihre normale Funktion auszuüben.

Im Gegensatz zu Menschen und anderen Säugetieren können Zebrafische Axone nach einer Verletzung erfolgreich regenerieren und remyelinisieren. Zusätzlich zu den Proteinen im Myelin von Säugetieren ist das 36K-Protein ein Hauptbestandteil des ZNS-Myelins von Knochenfischen und eines der am häufigsten vorkommenden Proteine im Gehirn von Zebrafischen. Dennoch blieb die Funktion von 36K lange unbekannt. Deswegen sollte durch die Kooperation die Funktion von 36K mit Hilfe translationsblockierender Morpholinos untersucht werden. Morpholinos sind Nukleinsäuren-Analoga, welche die Expression bestimmter Gene unterdrücken. Bei Aufnahmen mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Mikroskop zeigten morphante Larven weniger dorsal migrierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC). Diese Zellen sind an der Myelinbildung beteiligt und es wird auf sie in Abschnitt 11.2 näher eingegangen. Zusätzlich konnte bei diesen Larven eine Hochregulation des Notch-Signalweges beobachtet werden. Über ein Notch-Signal kann ein Neuron, welches einem bestimmten Merkmal besitzt, dieses bei benachbarten Zellen ausschalten. Mit Hilfe eines Gamma-Sekretase-Inhibitors, welcher die Aktivierung von Notch verhindert, konnten die OPC-Zahlen in 36K-Morphanten wiederhergestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass 36K die anfängliche Myelinisierung durch Hemmung der Notch-Signalübertragung reguliert [47].

Neben Einzelaufnahmen der Larven in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, erlaubt das hier beschriebene Mikroskop auch Langzeitaufnahmen der Larven. Dadurch kann die Dynamik der Entwicklungsprozesse weitergehend untersucht werden.

### Probleme bei Langzeitaufnahmen

Die Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie (LSFM) ist besonders für Langzeitaufnahmen geeignet, da sie eine Reihe an Vorteilen gegenüber anderen Mikroskopietechniken besitzt. Zu diesen Vorteilen zählen eine hohe Aufnahmegeschwindigkeit, hoher Bildkontrast, sowie ein geringes Photobleichen [34]. In Abschnitt 4.3.2 wurde zudem gezeigt, wie der Bildkontrast durch konfokale Detektion weiter gesteigert werden kann.

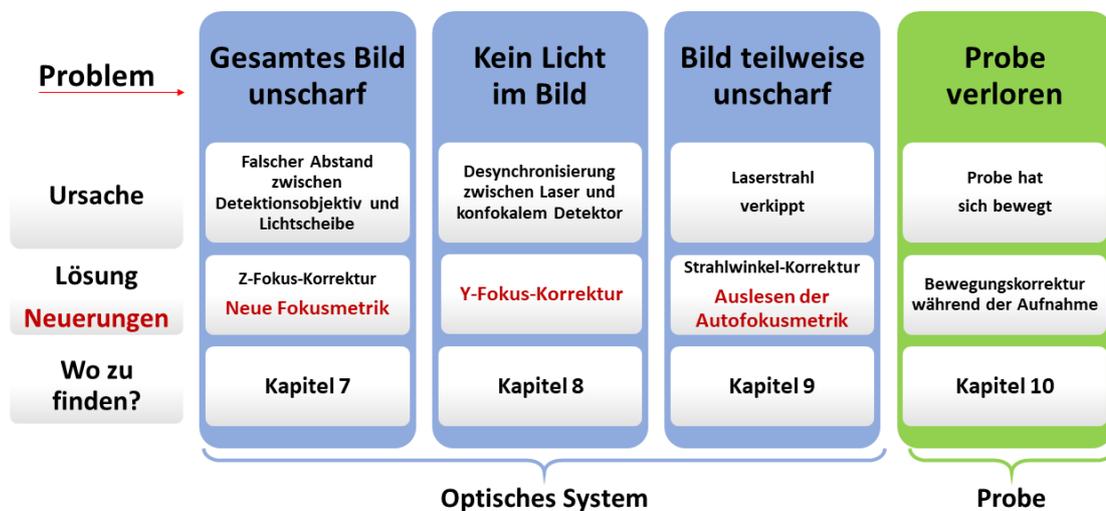


Abbildung 6.1.: Mögliche Probleme bei Langzeitaufnahmen.

Trotz der genannten Vorteile sind Langzeitaufnahmen nicht trivial und erfordern Aufwand um die Aufnahmequalität über den gesamten Messzeitraum konstant zu halten. In den folgenden Kapiteln werden bei Langzeitaufnahmen auftretende Probleme erörtert und passende Lösungen präsentiert. Die hier behandelten Themen sind in Abbildung 6.1 aufgelistet und in Abbildung 6.2 schematisch dargestellt. Sie lassen sich grob in zwei Kategorien einteilen:

1. Die Stabilität des optischen Systems.
2. Die Stabilität der Probenposition.

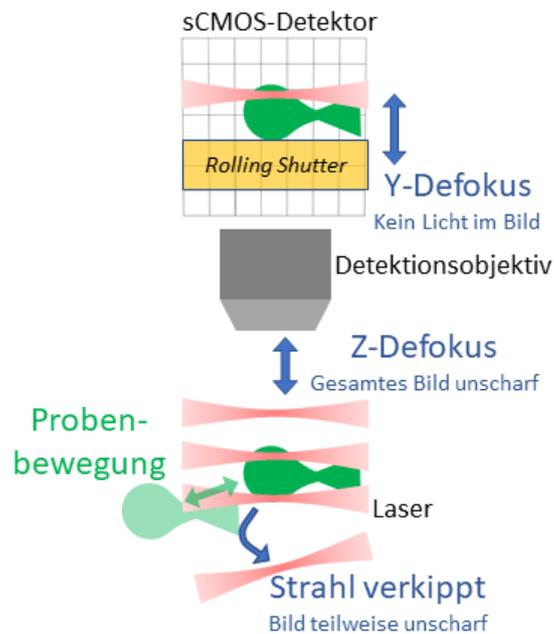
Die erste Kategorie wird stark durch thermische Schwankungen beeinflusst, durch die sich die optischen Wege verändern. Dies führt zu einer Lageänderung des Laserstrahls

und kann sich durch einen Verlust des Bildfokus bemerkbar machen. Daher wurde ein Autofokussystem (Z-Fokus) entwickelt, welches eine neu entwickelte Fokusmetrik verwendet und in Kapitel 7 beschrieben wird.

Zusätzlich bewirkt die Lageänderung des Strahls einen Verlust der konfokalen Detektion, wenn Laser und Detektor nicht mehr überlappen. Dadurch sinkt das detektierte Signal, was bis zum Totalverlust führen kann. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit war dem Autor keine Publikation bekannt, in der dieses Problem für Langzeitaufnahmen in der Lichtscheibenmikroskopie gelöst werden konnte. Um dennoch von der Kontraststeigerung der konfokalen Detektion bei Langzeitaufnahmen profitieren zu können, wurde eine neue Methode entwickelt, mit der Laser und Detektor automatisch synchronisiert werden (Y-Fokus). Diese Methode wird in Kapitel 8 beschrieben.

Neben einer Translation der Strahlposition kann auch eine Änderung des Winkels der Strahlpropagation in der Probenkammer auftreten. Dies bewirkt eine Verkipfung der Lichtscheibe, wodurch diese eventuell nicht mehr vollständig in der Fokusebene des Detektionsobjektivs liegt. Wenn der Laserstrahl relativ zum konfokalen Schlitzdetektor verkippt ist, wird möglicherweise ein Teil des Strahls nicht mehr vom Detektor erfasst. Zur Vermessung der Strahlverkipfung wurde ein neues Verfahren entwickelt, welches die Aufnahmen des Autofokus analysiert. Dieses wird in Kapitel 9 beschrieben. Die Winkeländerung kann anschließend mithilfe der motorisierten Spiegel korrigiert werden.

In der zweiten Kategorie wird die Stabilität der Probenposition berücksichtigt. Mit dem Mikroskop werden lebende Fischlarven untersucht, welche sich während der Aufnahme bewegen können. Dies kann durch eine Betäubung der Larve reduziert werden. Häufig ist dennoch eine Restbewegung bemerkbar, wodurch der untersuchte Probenbereich das Sichtfeld teilweise verlässt. Aus diesem Grund wurde eine automatische Korrektur der Probenbewegung entwickelt, welche in Kapitel 10 beschrieben wird.



**Abbildung 6.2.:** Darstellung der Probleme.



## 7. Langzeitmessungen: Z-Autofokus

Um bei mikroskopischen Aufnahmen eine optimale Bildqualität zu erreichen, muss die Detektionsebene mit der Beleuchtungsebene überlappen. In der Lichtscheibenmikroskopie wird erstere durch die Fokusebene des Detektionsobjektives und letztere durch das Zentrum der Lichtscheibe (in Detektionsrichtung) definiert. Sind die Ebenen zueinander verschoben, macht sich dies in einer Defokussierung bemerkbar, wodurch die Bildqualität sinkt. Geringe Defokussierungen sind mit bloßem Auge nicht immer ersichtlich. Dadurch kann es für einen ungeübten Beobachter schwierig sein, die beiden Ebenen zum Überlappen zu bringen.

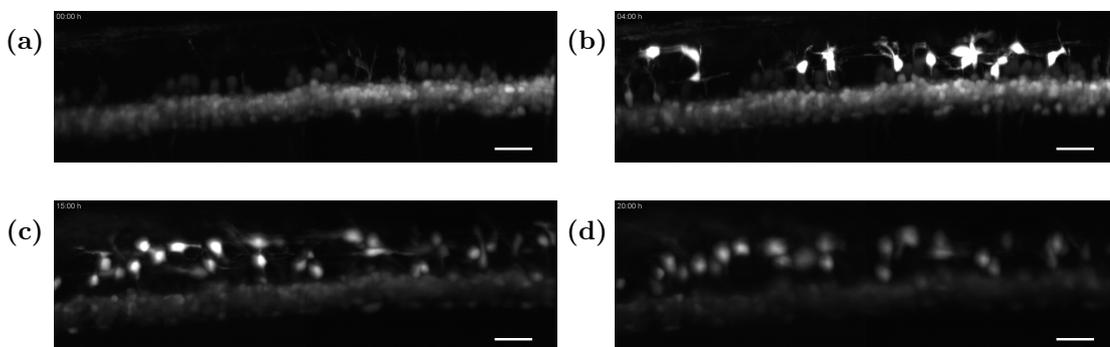
Desweiteren kann eine Defokussierung im Verlauf von Langzeitaufnahmen auftreten. Eine der Ursachen hierfür sind Temperaturschwankungen, welche sich auf alle Komponenten des Mikroskops auswirken. Die Schwankungen können sowohl eine thermische Ausdehnung, als auch eine Änderung der Brechungsindizes bewirken, wodurch sich die optischen Wege im Mikroskop verändern. Zudem unterliegt der Austrittswinkel jeder realen Laserquelle geringen Schwankungen. Durch all diese Effekte kann sich die relative Lage von Detektionsebene und Anregungsebene mit der Zeit verändern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System zur automatischen Fokussierung des Detektionsobjektives (Z-Fokus) entwickelt, welches in diesem Kapitel beschrieben und charakterisiert wird. Zunächst werden die Auswirkungen einer Defokussierung anhand eines Beispiels in Abschnitt 7.1 demonstriert. Danach wird in Abschnitt 7.2 das allgemeine Funktionsprinzip des Fokussystems skizziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei neue Metriken zur Bestimmung des Bildfokus entwickelt, die in Abschnitt 7.3 vorgestellt werden. Diese Neuentwicklungen werden zusammen mit weiteren, bekannten Fokusmetriken evaluiert und miteinander verglichen. Zuvor müssen die Metriken, welche einen spektralen Ansatz verfolgen, optimiert und an das optische System angepasst werden. Dies wird in Abschnitt 7.4 beschrieben. Danach erfolgt der Vergleich der Metriken zunächst in Abschnitt 7.5 anhand fluoreszierender Nanopartikel und danach in Abschnitt 7.6 anhand biologischer Proben. Da insbesondere in biologischen Proben das Bildrauschen den limitierenden Faktor für die Präzision der Fokusmetriken darstellt, werden in Abschnitt 7.6 Filterungen zur Reduzierung des Rauschens vorgestellt. Für jede untersuch-

te Fokusmetrik wurde separat die optimale Kombination an Filterungen ermittelt und beim Vergleich der Metriken berücksichtigt. Die abschließender Beurteilung der Metriken folgt in Abschnitt 7.7, wobei sich eine der Neuentwicklungen als optimal erwiesen hat. Schließlich werden in Abschnitt 7.8 Fehlerquellen bei der Fokussierung diskutiert und Lösungsansätze zur Steigerung der Stabilität vorgeschlagen.

## 7.1. Verlust des Z-Fokus bei Langzeitmessungen

Hier soll anhand eines Beispiels kurz die Auswirkung eines Fokusverlust bei einer Langzeitmessung auf die Bildqualität demonstriert werden. In Abbildung 7.1 sind dazu Maximumintensitätsprojektionen an vier Zeitpunkten einer Langzeitmessung migrierender OPCs in zwei Tage alten Zebrafischlarven *Tg(olig2:GFP)* abgebildet.



**Abbildung 7.1.:** Verlust des Z-Fokus bei der Langzeitmessung migrierender OPCs im Rückenmark zwei Tage alter Zebrafischlarven. **(a):** 00:00h. **(b):** 04:00h. **(c):** 15:00h. **(d):** 20:00h. Skala 25  $\mu\text{m}$ .

Alle 15 Minuten wurde ein Bildstapel aus 100 Z-Ebenen im Abstand von je 1  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Der verwendete Farbstoff in den Zellen war grün fluoreszierendes Protein (GFP) und die Anregung erfolgte mit Gaußbeleuchtung bei 930 nm. Die Aufnahme wurde ohne Autofokussierung durchgeführt. Ein Video der Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_3.avi*.

Die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen begannen etwa eine Stunde nach Beginn der Aufnahme zu migrieren. Wie man in Abbildung 7.1c und Abbildung 7.1d sieht, kam es im Verlauf der Messung zu einem deutlichen Fokusverlust, wodurch die Form der Zellen kaum noch zu erkennen war. Es war jedoch möglich, die Anzahl der Zellen zu bestimmen.

Eine der Hauptursachen für die Defokussierung sind Temperaturschwankungen im Verlauf der Messung. Leider ist eine Kontrolle der Temperatur über eine Klimaanlage am

Ort des verwendeten Mikroskops nicht möglich. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Autofokussystem zur Stabilisierung des Systems bei Langzeitaufnahmen entwickelt, welches in den folgenden Abschnitten näher beschrieben wird.

## 7.2. Prinzip der Autofokussierung

Das Autofokussystem arbeitet passiv. Es verwendet das vom optischen System eingefangene Licht und errechnet daraus mithilfe einer geeigneten Fokusfunktion einen Wert für den Bildkontrast. Der Kontrast erreicht ein Maximum, wenn die Probe optimal fokussiert ist, d.h. wenn die Beleuchtungsebene in der Fokusebene des Detektionsobjektives liegt. Um den optimalen Fokus zu finden, kann das Objektiv relativ zur Beleuchtungsebene bewegt und die Kontrastwerte an verschiedenen Positionen bestimmt werden. Der Autofokus besteht somit aus zwei Teilen:

1. Ein Suchalgorithmus zur Bewegung des Detektionsobjektives.
2. Eine Fokusfunktion zur Bestimmung der relativen Bildschärfe.

In den folgenden Abschnitten wird näher auf die beiden Komponenten eingegangen.

Aus den Kontrastwerten kann mittels einer Gaußanpassung der optimale Abstand zwischen Beleuchtungsebene und Objektiv errechnet werden. Das Ergebnis ist um so genauer, je mehr Positionen für die Berechnung benutzt werden, jedoch erhöhen mehr Bilder auch die Aufnahmezeit und die Gesamtmenge an Licht, der die Probe ausgesetzt wird. Dies kann zu einem vorzeitigen Bleichen der Fluoreszenzfarbstoffe und anderen Schäden an der Probe führen. Mithilfe von effizienten Suchalgorithmen kann der optimale Fokusabstand auch mit einer verhältnismäßig kleinen Anzahl Aufnahmen ermittelt werden.

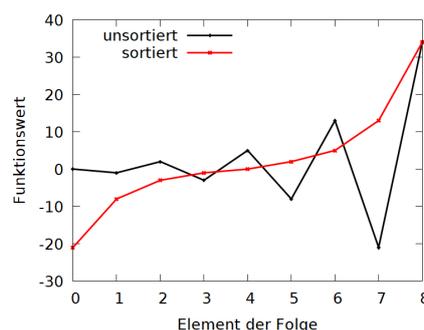
### 7.2.1. Suchalgorithmus

Der in dieser Arbeit entwickelte Suchalgorithmus basiert auf der Fibonacci-Folge und benötigt einen Startwert, in dessen Umgebung das Fokusmaximum vermutet wird. Die Elemente der Folge entsprechen den relativen Abständen zum Startwert. Die Fibonacci-Folge beginnt zweimal mit der Zahl 1 und danach ist jeder Wert der Folge das Ergebnis der Summe der beiden vorherigen Werte. Für die praktische Implementierung wird der erste Wert der Folge durch 0 ersetzt, damit der Startwert Teil der Folge ist. Zusätzlich wird die Folge nach einem gewählten Element abgebrochen. Danach wird jeder Wert der Reihe abwechselnd mit  $+1$  und  $-1$  multipliziert und die Folge wird aufsteigend sortiert.

Dies ist für eine Folge mit neun Elementen in Abbildung 7.2 illustriert. Durch Multiplikation mit einer gewählten Schrittweite erhält man eine Reihe von Positionen um den Startwert.

Die so konstruierte Folge hat eine Reihe an Vorteilen. Zum einen befinden sich viele Positionen in der Nähe des geschätzten Optimums und nur wenige in größerer Entfernung zu diesem. Zum anderen ist sie asymmetrisch in Bezug auf den Startwert. Da der Kontrast symmetrisch mit steigendem Abstand vom Optimum abnimmt, liefert die Fokusfunktion unterhalb und oberhalb des Optimums dieselbe Information. Durch das asymmetrische Abtasten soll verhindert werden, Kontrastinformationen doppelt aufzunehmen.

Nachdem die Kontrastwerte für alle Positionen der Reihe berechnet wurden, wird die optimale Fokusposition mithilfe einer Gaußanpassung bestimmt. Da nicht gewährleistet ist, dass sich das Optimum in der Nähe des Startwertes befindet, kann es sein, dass sich nicht genügend viele aufgenommene Positionen in der Nähe des tatsächlichen Optimums befinden und somit die Bestimmung dessen Lage zu ungenau wird. Daher wird die Suche mit reduzierter Schrittweite und -Anzahl wiederholt. Die Schrittweite wird auf ein Drittel reduziert, während die Anzahl um 2 reduziert wird. Nun wird der mit der Gaußanpassung ermittelte Wert als Startpunkt gewählt und die Werte werden abwechselnd mit  $-1$  und  $+1$  multipliziert.



**Abbildung 7.2.:** Modifizierte Fibonacci-Folge.

### 7.2.2. Fokusfunktion

Um den relativen Kontrast eines Bildes zu bestimmen, können unterschiedliche Fokusfunktionen verwendet werden. Um zuverlässig die optimale Position des Detektionsobjektives zu bestimmen, sollte eine Fokusfunktion die folgenden Kriterien erfüllen [49]:

1. Die Funktion darf nur ein Maximum besitzen.
2. Das System muss am Maximum bestmöglich fokussiert sein.
3. Die Anwendbarkeit der Funktion darf nicht auf bestimmte Arten von Bildern beschränkt sein.
4. Die Funktion sollte möglichst schnell berechenbar sein.
5. Die Funktion sollte robust gegenüber Rauschen sein.

Insbesondere das Rauschen stellt die größte Herausforderung dar. Es konnte gezeigt werden, dass die meisten verbreiteten Fokusmetriken mit hoher Genauigkeit die korrekte Fokusposition in einem Bildstapel finden, sofern dieser frei von Rauschen ist [57]. Erst durch die Addition von Rauschen zeigen die untersuchten Metriken deutliche qualitative Unterschiede.

In der Praxis ist jede Aufnahme mit Rauschen behaftet. Eine Ursache hierfür ist Licht, welches in der Probe gestreut und anschließend detektiert wird, obwohl es von außerhalb der Fokusebene stammt. Dies ist ein statistischer Prozess und liefert keine Bildinformationen. Daneben tritt Rauschen im Bildsensor der Kamera auf. Bei scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor (sCMOS)-Sensoren ist dies zum großen Teil Dunkelrauschen, welches unabhängig vom detektierten Licht ist. Die Hauptursachen hierfür sind das Rauschen der Ausleseverstärker der einzelnen Pixel und der wärmebedingte Dunkelstrom. Um letzteren zu reduzieren, werden die Kameras mit Wasser gekühlt. Die tiefste einstellbare Temperatur wird jedoch durch die Umgebungstemperatur und die Luftfeuchtigkeit begrenzt. Wird diese unterschritten, bildet sich Kondenswasser auf der Kameralinse.

Der Anteil des Dunkelrauschens am aufgenommenen Bild ist umso höher, je weniger Licht vom Sensor detektiert wird. Aufgrund des geringen 2P-Wirkungsquerschnitts  $\sigma_{2P}$  der meisten Farbstoffe, haben 2P-Aufnahmen häufig ein schlechtes *Signal-Rausch-Verhältnis*. Daher stellt Dunkelrauschen ein signifikantes Problem bei der Fokussierung von 2P-Aufnahmen dar. Mit dem verwendeten Mikroskop werden relativ große, lebende Proben untersucht. Deswegen ist auch ein hohes Maß an im Gewebe gestreuten Licht zu erwarten, welches zusätzliches Rauschen verursacht.

Aus diesem Grund wurde für die Autofokussierung eine Metrik gesucht, welche möglichst widerstandsfähig gegenüber Rauschen ist. Dazu wurden eine Reihe bekannter Fokusmetriken miteinander verglichen. Um die Rauschanfälligkeit weiter zu reduzieren wurden darüber hinaus drei neue Fokusmetriken entwickelt.

Fokusfunktionen können in Klassen eingeteilt werden, wobei sich die Einteilung je nach Autor und Publikation unterscheidet [72, 22].

Royer et al. teilen die Funktionen in vier Klassen ein, die im Folgenden kurz beschrieben werden [57].

1. Metriken, welche den Gradienten zwischen Bildpunkten berechnen, messen die Schärfe von Kanten im Bild.
2. Statistische Metriken betrachten die Bildpunkte als Ereignisse einer Zufallsvariablen und berechnen aus dieser stochastische Größen, wie z. B. die Varianz oder die Entropie.
3. Korrelationsbasierte Metriken beruhen auf der Autokorrelation des Bildes.
4. Metriken mit spektralen Ansätzen transformieren das Bild in den Frequenzraum.

Eine detaillierte Auflistung aller untersuchten Fokusmetriken und ihrer mathematischen Beschreibungen findet sich in Abschnitt A.1.

### 7.3. Neu entwickelte Fokusmetriken

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei neue Fokusmetriken entwickelt, die einen spektralen Ansatz verfolgen und wie folgt definiert sind:

Quadierte FFT:

$$F_{FFT}(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{1 < x < r_0, y} |\mathcal{F}_x(I_y)|^2 \quad (7.1)$$

Quadierte FFT mit Hochpassfilter:

$$F_{HPFFT}(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{r_{HP} < x < r_0, y} |\mathcal{F}_x(I_y)|^2 \quad (7.2)$$

Kombinierte FFT mit Hochpassfilter:

$$F_{HPFFT}(I) = \frac{1}{n^2(I)} \sum_{1 < x < r_0, y} |\mathcal{F}_x(I_y)| \cdot \sum_{r_{HP} < x < r_0, y} |\mathcal{F}_x(I_y)|^2 \quad (7.3)$$

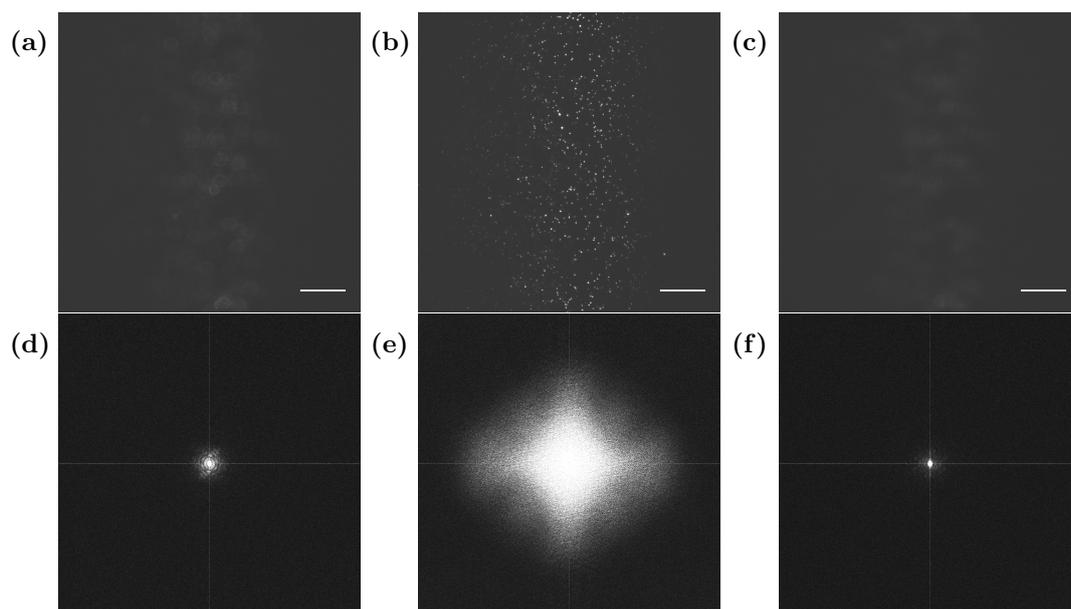
Gleichung (7.3) ist eine Kombination von Gleichung (7.1) und Gleichung (7.2).  $I$  ist ein monochromatisches zweidimensionales Bild mit Pixelintensitäten  $I_{x,y}$  und der Pixelanzahl  $n(I)$ .  $\mathcal{F}_x(I_y)$  ist die eindimensionale schnelle Fouriertransformierte (FFT) der Bildzeile  $I_y$  in  $x$ -Richtung.  $r_0$  ist der angenommene Stützradius der optischen Transferfunktion (OTF), welcher experimentell für die verwendeten Optiken bestimmt werden muss. Unter der Annahme einer lateral isotropen PSF beträgt das Verhältnis zwischen

PSF-Radius  $r_p$  und OTF-Stützradius  $r_p = \frac{\min(b(I), h(I))}{r_0}$  [57].  $r_{HP}$  ist ein weiterer Parameter, der experimentell bestimmt werden muss und anschaulich den Radius eines Hochpassfilters beschreibt.

Im Folgenden werden die Fokusmetriken evaluiert und miteinander verglichen.

## 7.4. Optimierung der spektralen Fokusmetriken

Bevor die Eignung der spektralen Metriken zur Autofokussierung evaluiert werden kann, müssen diese zuerst an das optische System angepasst werden. Hierfür wurde ein Bildstapel  $B_n$  von fluoreszierenden Nanopartikeln mit Besselbeleuchtung aufgenommen. Während das Detektionsobjektiv in Schritten von  $0,1 \mu\text{m}$  bewegt wurde, blieb die Z-Ebene der Lichtscheibe unverändert. Die Gesamtdistanz betrug  $30 \mu\text{m}$ . Zu Beginn der Aufnahme war das System nicht fokussiert. Der optimale Fokus wurde ungefähr in der Mitte des Stapels erreicht. In Abbildung 7.3 sind drei Aufnahmen aus dem Stapel an verschiedenen Tiefen und ihre entsprechenden 2D-Fourierspektren abgebildet. Es handelt sich hierbei um das oberste Bild, das Bild im Fokus und um das unterste Bild des Stapels.



**Abbildung 7.3.:** Ausschnitte aus einem Bildstapel  $B_n$  von fluoreszierenden Nanopartikeln. (a): Bild 1. (b): Bild 146. (c): Bild 300. Die untere Zeile zeigt die entsprechenden 2D-Fourierspektren. Besselbeleuchtung. Konfokale Detektion. Skala  $50 \mu\text{m}$ .

### 7.4.1. Einfluss der Bildhelligkeit auf die FFT

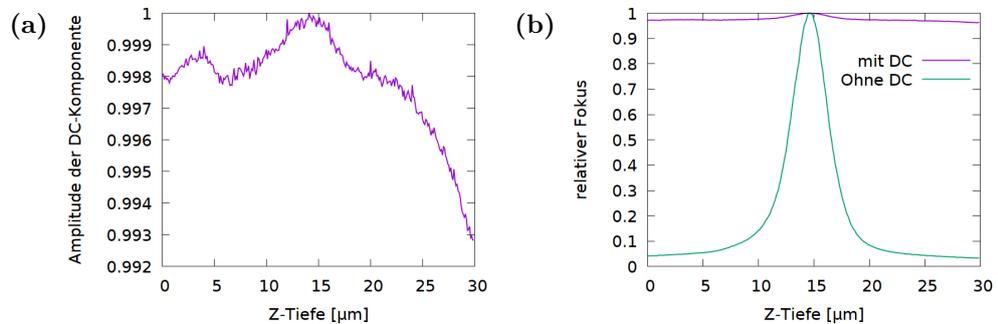
Die in den Gleichungen 7.1 - 7.3 verwendete eindimensionale Schnelle Fouriertransformation (FFT) berechnet die diskrete Fouriertransformation einer Sequenz  $\{x_n\} = x_0, x_1, \dots, x_{N-1}$  und ist wie folgt definiert:

$$y_k = \sum_{n=0}^{N-1} x_n e^{\left(\frac{-2i\pi kn}{N}\right)}. \quad (7.4)$$

Hier entspricht  $N$  der Länge der Sequenz. Offensichtlich folgt für  $k = 0$ :

$$y_0 = \sum_{n=0}^{N-1} x_n. \quad (7.5)$$

Dass nullte Element der FFT entspricht also der Summe der Elemente von  $x_n$ . Es wird häufig auch als Direct Current (DC) Komponente bezeichnet und entspricht anschaulich der Bildhelligkeit. Bei Anwendung der eindimensionalen FFT auf eine Bildzeile entspricht dies genau der Summe der Pixelintensitäten in dieser Zeile. Die DC-Komponente enthält also keine Informationen über die enthaltenen Bildfrequenzen. Daher wird in diesem Abschnitt untersucht, ob sich ein Ignorieren der DC-Komponente positiv auf die Fokusmetriken auswirkt. In Abbildung 7.4a ist die DC-Komponente als Funktion der Tiefe im Bildstapel dargestellt.



**Abbildung 7.4.:** Einfluss der DC-Komponente auf die Fokusmetrik der quadrierten FFT. **(a):** DC-Komponente als Funktion der Tiefe im Bildstapel. **(b):** Quadrierte FFT mit und ohne Berücksichtigung der DC-Komponente.

Wie man sieht, verändert sie sich nur marginal und hat neben dem Maximum in der Stapelmitte noch ein zweites Maximum relativ am Anfang des Stapels. In Abbildung 7.4b ist die nach Gleichung (7.1) definierte Fokusmetrik als Funktion der Stapeltiefe abgebildet, wobei die DC-Komponente einmal in der Aufsummierung berücksichtigt wird und

einmal nicht. Wie man sieht, ist die Fokusmetrik deutlich sensitiver bei Ignorierung der DC-Komponente. Dies wird deutlich bei Betrachtung der normierten Höhe  $h$ , die wie folgt definiert ist:

$$h = \frac{I_{Max} - I_{Min}}{I_{Max}}. \quad (7.6)$$

Die gemessene normierte Höhe betrug bei Berücksichtigung der DC-Komponente  $h_0 = 0,038$ . Ohne DC-Komponente betrug sie  $h_1 = 0,967$ . Somit steigt  $h$  um etwa den Faktor 25 bei Ignorierung der DC-Komponente, wodurch die beste Fokusposition effektiver lokalisiert werden kann.

### 7.4.2. Einfluss des Detektionsobjektivs

Von besonderer Bedeutung für die spektralen Metriken ist das Detektionsobjektiv, welches als Fouriertransformationslinse verstanden werden kann. Das elektrische Feld des Beugungsbildes in der bildseitigen Brennebene entspricht der räumlichen Fouriertransformierten des elektrischen Feldes in der objektseitigen Brennebene. Die höchste übertragbare Bildfrequenz  $f_{max}$  ist durch die NA des Detektionsobjektives begrenzt, wodurch bei jeder Abbildung durch ein Linsensystem zwangsläufig Informationen verloren gehen. Anschaulich funktioniert eine Linse also wie ein Tiefpassfilter.

Anders betrachtet liefern Frequenzen im Fourierraum des Bildes oberhalb von  $f_{max}$  keine Informationen über das abgebildete Objekt, sondern sie entsprechen lediglich Rauschen, welches die Bildqualität reduziert. Das Rauschen entsteht bei der Detektion des Lichtes durch den Bildsensor der Kamera.

Die spektralen Metriken werden durch den angenommenen Stützradius  $r_0$  der optischen Transferfunktion (OTF) parametrisiert. Dieser entspricht anschaulich dem Radius im Fourierraum, bei dem die Bildfrequenz  $f_{max}$  entspricht.  $r_0$  muss experimentell für die verwendeten Optiken bestimmt werden.

### Optimierung des Stützradius $r_0$ der optischen Transferfunktion

Unter der Annahme einer lateral isotropen PSF, beträgt das Verhältnis zwischen dem PSF-Radius  $r_p$  und dem OTF-Stützradius  $r_p = \frac{\min(b(I), h(I))}{r_0}$  [57].

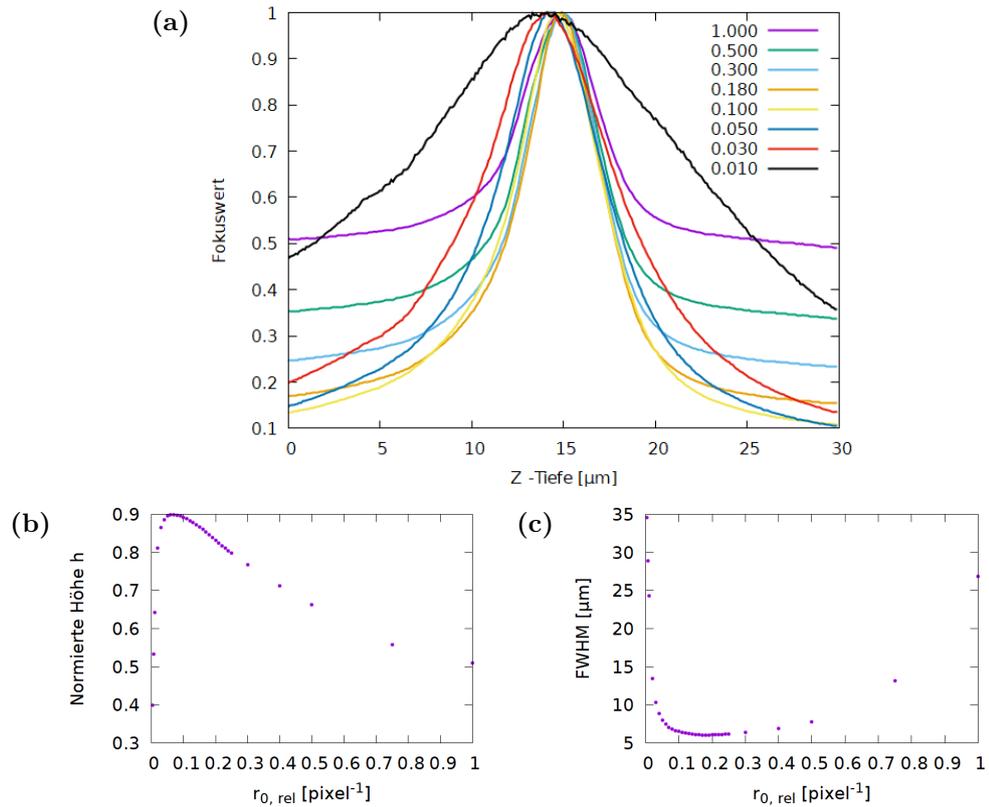
Hier sind  $b(I)$  und  $h(I)$  die Breite und Höhe des Bildes. Der PSF-Radius  $r_p$  kann aus dem Mittelwert der gemessenen lateralen Halbwertsbreiten der PSF abgeschätzt werden. Diese beträgt  $FWHM_{xy} = 0,612 \pm 0,003 \mu\text{m}$  (siehe Tabelle 4.4). Mit der Näherung der PSF durch eine Gaußglocke folgt für den  $\frac{1}{e^2}$ -Radius  $r_p$ :

$$r_p \approx \frac{1,699}{2} FWHM_{xy} = (0,520 \pm 0,003) \mu\text{m} = (3,20 \pm 0,02) \text{Pixel}. \quad (7.7)$$

$r_0$  ist abhängig von der Kantenlänge des Bildes und es wird daher im Folgenden nur die relative Größe

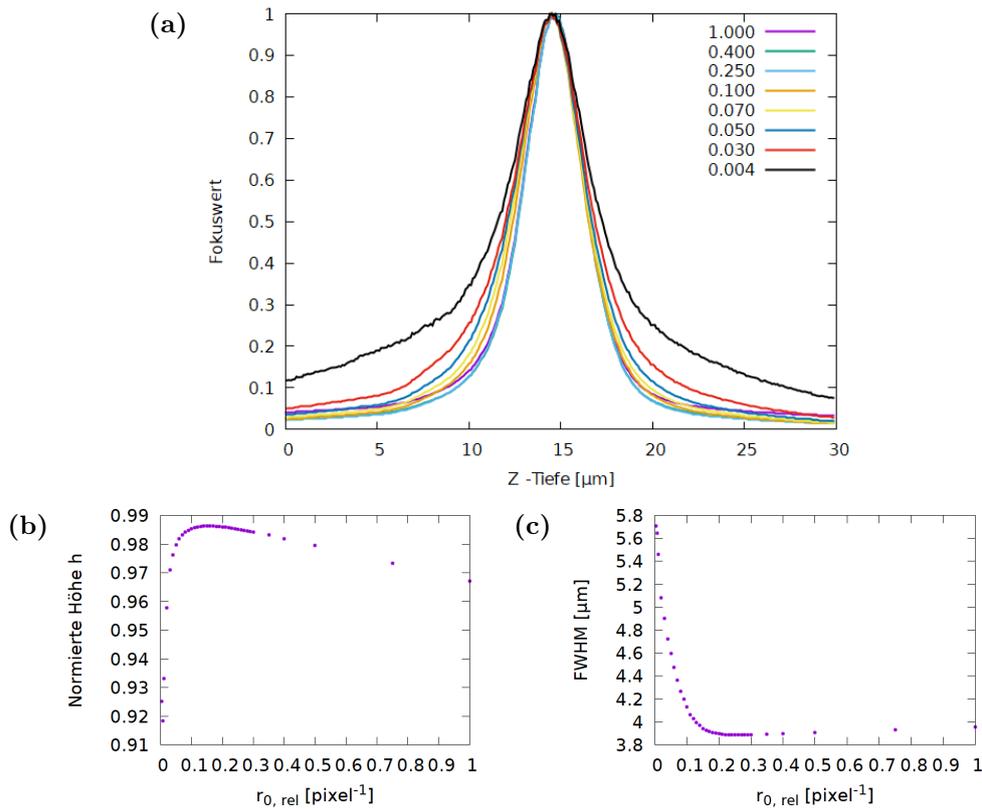
$$r_{0,rel} = \frac{r_0}{\min(b(I), h(I))} = \frac{1}{r_p} \approx (0,313 \pm 0,002) \text{ Pixel}^{-1}. \quad (7.8)$$

betrachtet. Der nach Gleichung (7.8) für  $r_{0,rel}$  bestimmte Wert ist nur ein grober Richtwert und wird im Folgenden näher untersucht. Für den Bildstapel  $B_n$  wurden die Fokuswerte der *normierten DCT Shannon Entropie* und der *quadrierten FFT* als Funktion der Z-Tiefe für verschiedene Radien  $r_{rel}$  berechnet (siehe Abbildung 7.5 und Abbildung 7.6).



**Abbildung 7.5.:** Messung des Stützradius  $r_{0,rel}$  der OTF der *normierten DCT Shannon Entropie*. **(a):** Wert der Metrik als Funktion der Probentiefe für ausgewählte  $r_{0,rel}$ . **(b):** Normierte Höhe  $h$  als Funktion von  $r_{0,rel}$ . **(c):** Halbwertsbreite (FWHM) als Funktion von  $r_{0,rel}$ .

Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit sind nur die Graphen von ausgewählten  $r_{0,rel}$  abgebildet. Zur Optimierung von  $r_{0,rel}$  wird die volle Breite bei halber Höhe (FWHM) der Graphen betrachtet.



**Abbildung 7.6.:** Messung des Stützradius  $r_{0,rel}$  der OTF der *quadrierten FFT*. **(a):** Wert der Metrik als Funktion der Probentiefe für ausgewählte  $r_{0,rel}$ . **(b):** Normierte Höhe  $h$  als Funktion von  $r_{0,rel}$ . **(c):** Halbwertsbreite (FWHM) als Funktion von  $r_{0,rel}$ .

Je kleiner die FWHM ist, desto präziser kann das Maximum und somit die beste Fokusposition bestimmt werden. Dazu wird  $r_{0,rel}$  mit einer Präzision von 0,01 variiert und die FWHM mit einem selbstgeschriebenen Unterprogramm in LabVIEW bestimmt. Die Halbwertsbreite der Graphen als Funktion von  $r_{0,rel}$  ist in Abbildung 7.5c und 7.6c dargestellt. Mit kleiner werdendem  $r_{rel}$  sinkt zunächst auch FWHM, bis diese ein Minimum erreicht. Verringert man  $r_{0,rel}$  weiter, so nimmt FWHM exponentiell zu. Es werden hier offensichtlich Bildfrequenzen verworfen, welche einen signifikanten Beitrag zur Bildqualität liefern. Bei  $r_{0,rel} = 0$  können keine Informationen von der Fokusmetrik verarbeitet werden und die Halbwertsbreite wird unendlich. Für die beiden Fokusmetriken fanden sich zwei verschiedene Optima für  $r_{0,rel}$ .

Diese sind:

$$r_{0,rel}(\text{DCTS}) = 0,18 \text{ Pixel}^{-1} \quad (7.9)$$

und

$$r_{0,rel}(\text{quadrierte FFT}) = 0,25 \text{ Pixel}^{-1}. \quad (7.10)$$

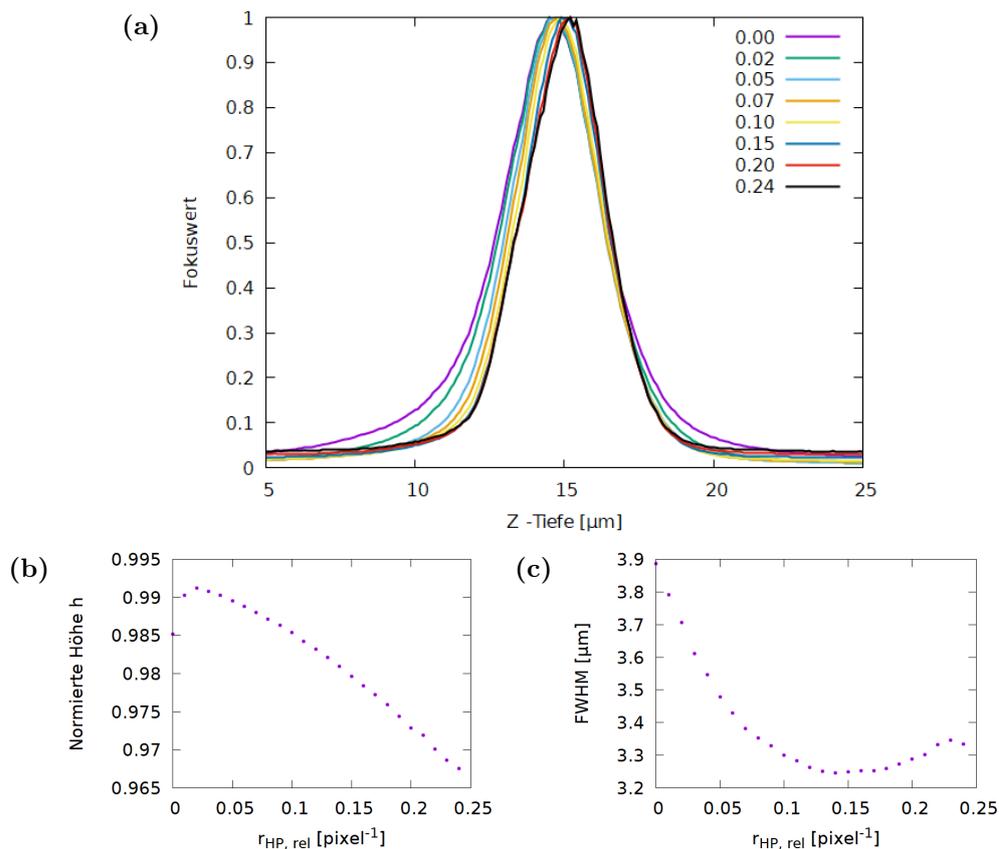
Dass sich die Radien bei den beiden Metriken unterscheiden, kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen werden zwei verschiedene Transformationen verwendet. Bei der *normierten DCTS Shannon Entropie* ist dies die diskrete Kosinustransformation (DCT), während die *quadrierte FFT* die diskrete Fouriertransformation (DFT) verwendet. Außerdem wird bei der DCT eine zweidimensionale Transformation berechnet, während bei der DFT eine eindimensionale Rechnung erfolgt.

In Abbildung 7.5b und 7.6b sind auch die normierten Höhen  $h$  der Graphen als Funktion von  $r_{0,rel}$  abgebildet. Diese erreichen im Fall der *DCTS* ein Maximum bei  $r_{0,rel} = 0,07$  und im Fall der *quadrierten FFT* bei  $r_{0,rel} = 0,16$ . Hier ist jedoch zu beachten, dass unterhalb von  $r_{0,rel}$  die Halbwertsbreite zunimmt und somit die Graphen teilweise zu breit sind, um die normierte Höhe innerhalb der betrachteten Proben tiefe von  $30 \mu\text{m}$  korrekt bestimmen zu können. Die Werte für  $h$  und FWHM der beiden Fokusmetriken finden sich in Tabelle A.3.

### Optimierung von $r_{HP}$

Die in Gleichung (7.2) und Gleichung (7.3) verwendete Größe  $r_{HP}$  beschreibt anschaulich den Radius eines Hochpassfilters und muss ebenfalls experimentell bestimmt werden. Analog zu  $r_{0,rel}$  wird der relative Radius  $r_{HP,rel} = \frac{r_{HP}}{\min(b(I), h(I))}$  untersucht. Es wird wieder der Bildstapel  $B_n$  an Nanopartikeln betrachtet. In Abbildung 7.7 wird die in Gleichung (7.2) beschriebene Metrik der *quadrierten FFT mit Hochpassfilter* als Funktion der Proben tiefe für verschiedene  $r_{HP,rel}$  betrachtet.

Da durch die Verwendung eines Hochpassfilters bewusst Bildinformationen verworfen werden, sinkt die normierte Höhe mit steigendem  $r_{HP,rel}$  (siehe Abbildung 7.7b). Die Kurven flachen im Bereich großer Defokussierung merklich ab, da hier kaum hohe Frequenzen zum Bild beitragen. Dadurch verliert die Metrik im Bereich großer Defokussierung an Sensitivität für eine Änderung des Fokuswerts. Die normierte Höhe  $h$  scheint zunächst zu steigen und das gemessene  $h$  erreicht bei  $r_{HP,rel} = 0,02$  ein Maximum. Dies ist jedoch ein Messartefakt, welches durch die endliche Größe der betrachteten Proben tiefe verursacht wird. Betrachtet man die Halbwertsbreite (siehe Abbildung 7.7c), so sieht man, dass diese bei etwa  $r_{HP,rel} = 0,14$  minimal wird. Es besteht bei einem derart großen Hochpassfilter jedoch die Gefahr, dass wichtige Bildfrequenzen verloren gehen.



**Abbildung 7.7.:** Messung des Hochpass-Radius  $r_{HP,rel}$  an fluoreszierenden Nanopartikeln. **(a):** Quadrierte FFT mit Hochpassfilter als Funktion der Probertiefe für ausgewählte  $r_{HP,rel}$ . **(b):** Normierte Höhe  $h$  als Funktion von  $r_{HP,rel}$ . **(c):** Halbwertsbreite (FWHM) als Funktion von  $r_{HP,rel}$ .

Je nach der Art der betrachteten Probe kann somit nicht sichergestellt werden, dass im fokussierten Bild genügen Bildfrequenzen oberhalb von  $r_{HP,rel}$  vorhanden sind, um den Fokus korrekt zu bestimmen. Es ist daher ein gewisses Maß an Fingerspitzengefühl bei der Bestimmung von  $r_{HP,rel}$  notwendig. Die Kurve in Abbildung 7.7c fällt zunächst sehr schnell und flacht anschließend oberhalb von etwa 0,07 merklich ab. Aus diesem Grund wurde aus der Messung ein Wert von

$$r_{HP,rel} = 0,07 \quad (7.11)$$

abgeleitet. Eine tabellarische Auflistung der Werte für  $h$  und FWHM als Funktion von  $r_{HP,rel}$  findet sich in Tabelle A.2.

## 7.5. Vergleich der Fokusmetriken anhand von Nanopartikeln

Nachdem die Fokusmetriken mit spektralem Ansatz an das Mikroskop in Abschnitt 7.4 angepasst wurden, folgt hier der Vergleich aller betrachteten Fokusmetriken.

Bevor die Fokusmetriken anhand biologischer Proben näher untersucht werden, erfolgt zunächst eine Vorauswahl der vielversprechendsten Metriken anhand fluoreszierender Nanopartikel. Dazu dient derselbe Bildstapel  $B_n$  wie in Abschnitt 7.4. In Abbildung 7.8 ist der Fokuswert der untersuchten Funktionen als Funktion der Probentiefe dargestellt. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit sind die Metriken *Brenner* und *Squared Gradient* nicht abgebildet, da ihre Funktionswerte über den betrachteten Fokusbereich zu sehr streuen.

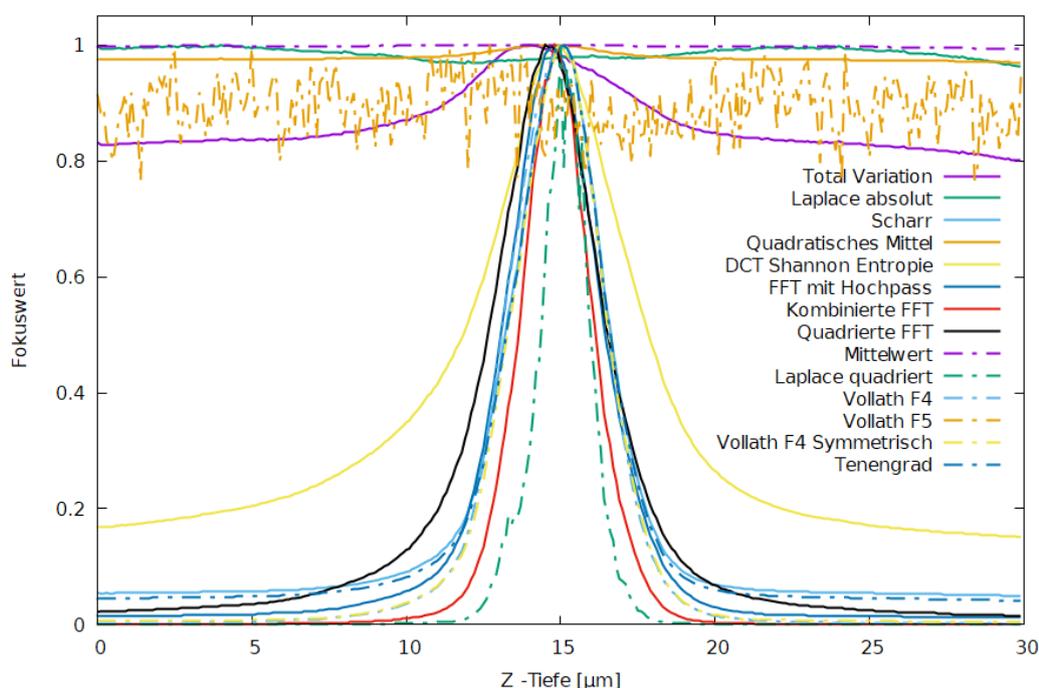


Abbildung 7.8.: Vorauswahl der Fokusmetriken.

In Tabelle 7.1 sind für alle Funktionen die normierte Höhe  $h$ , die Halbwertsbreite FWHM, die Rechenzeit  $t$ , die Anzahl an Nebenmaxima *Maxima* und die relativen Amplituden der Nebenmaxima  $\frac{Max}{Nachbar}$  aufgelistet. Ein Messpunkt wird als Nebenmaximum gezählt, wenn er folgende Bedingungen erfüllt:

1. Es handelt sich nicht um das globale Maximum.
2. Der Wert liegt mehr als 5% über dem Mittelwert der direkten Nachbarn.

Da die Bilder mit Rauschen behaftet sind, und sich die Probe im Aufnahmezeitraum geringfügig bewegen kann, sind die Fokuswerte geringen Schwankungen unterworfen. Mit der zweiten Bedingung soll verhindert werden, dass diese fälschlicherweise als Nebenmaxima interpretiert werden.

Metrik	$h$	FWHM [ $\mu\text{m}$ ]	$t$ [ms]	<i>Maxima</i>	$\frac{Max}{Nachbar}$
Quadrierter Laplace-Filter	0,9995	1,62	53,09	8	1,41
Absoluter Laplace-Filter	0,0369	-	62,07	0	-
Quadrierter Scharr-Filter	0,9501	3,43	91,80	0	-
Quadratisches Mittel	0,0298	-	10,25	0	-
Mittelwert	0,0072	-	10,12	0	-
DCT Shannon Entropie	0,8489	6,01	182,46	0	-
Quadrierte FFT	0,9852	3,89	25,02	0	-
FFT mit Hochpass	0,9880	3,38	24,75	0	-
Kombinierte FFT	0,9995	2,50	25,24	0	-
Vollath F4	0,9988	3,46	20,61	45	1,16
Vollath F5	0,2351	28,75	19,33	55	1,08
Vollath F4 symmetrisch	0,9959	3,30	50,02	13	1,07
Brenner	-	-	18,83	100	1,43
Squared Gradient	-	-	17,65	97	1,47
Tenengrad	0,9582	3,38	91,14	0	-
Total Variation	0,1995	13,43	99,51	0	-

**Tabelle 7.1.:** Charakteristische Werte der Graphen ausgewählter Fokusfunktionen. Aufgenommen in fluoreszierenden Nanopartikeln.

Von den untersuchten Fokusmetriken besitzen einige Funktionen kein klar definiertes Maximum. Dies sind die Metriken *Absoluter Laplace-Filter*, *Mittelwert*, *Vollath F5*, *Brenner* und *Squared Gradient*. Diese Funktionen disqualifizieren sich somit für die weitere Betrachtung. Außerdem ausgeschlossen wurden die Funktionen *Quadratisches Mittel* und *Total Variation*, da die normierte Höhe  $h$  dieser Funktionen zu gering ist und das Maximum der Letztgenannten stark von den anderen Funktionen abweicht.

Bei dem Vergleich der Metriken anhand fluoreszierender Nanopartikel hat sich die *kombinierte FFT mit Hochpassfilter* als am besten herausgestellt. Diese Metrik besitzt zusammen mit dem *quadrierten Laplace-Filter* das höchste  $h$  und nach diesem die zweitkleinste FWHM. Der *quadrierte Laplace-Filter* hat sich jedoch als zu rauschanfällig erwiesen und besitzt mehrere Nebenmaxima, welche im Mittel mehr als 40% über ihren direkten Nachbarn liegen (siehe Tabelle 7.1).

## 7.6. Vergleich der Fokusmetriken in biologischen Proben

Für einen detaillierten Vergleich der Fokusmetriken werden zwei Aufnahmen in biologischen Proben untersucht. Dies sind eine Hirnregion einer fünf Tage alten Zebrafischlarve, sowie eine Region im Rückenmark derselben Larve. Die Aufnahme im Rückenmark wurde bei reduzierter Laserleistung aufgenommen, um die Metriken bei schwachem Fluoreszenzsignal zu untersuchen.

Zur Beleuchtung wurde jeweils ein Besselstrahl verwendet und die Z-Ebene der Lichtscheibe wurde während der Aufnahme nicht verändert. Das Detektionsobjektiv wurde in 0,5  $\mu\text{m}$  Schritten entlang einer Gesamtdistanz von 50  $\mu\text{m}$  bewegt und befand sich etwa in der Mitte des Bildstapels im Fokus.

Eine Betrachtung der Fokusmetriken bei geringer Signalstärke ist wichtig, da die maximale Bildhelligkeit von der betrachteten Probe abhängt. Dies soll im folgenden kurz erläutert werden:

Da für die 2P-Anregung hohe Lichtintensitäten benötigt werden, kann dies zu erhöhter Phototoxizität und Bleichung führen. Zudem führt dies häufig zu einer lokalen Erwärmung des Probengewebes. In Extremfällen wurde bei einigen Aufnahmen die Bildung von Luftblasen beobachtet, was auf ein Kochen des Gewebes hindeutet. Deswegen muss stets ein Kompromiss zwischen hoher Signalstärke und guter Probenvitalität gefunden werden. Insbesondere wenn sich die Probe in einem frühen Entwicklungsstadium befindet, wird der Fluoreszenzfarbstoff häufig nur schwach und von wenigen Zellen exprimiert. Da die Anregungsintensität nicht beliebig erhöht werden kann, muss das geringe Fluoreszenzlicht zur Fokussierung ausreichen.

### 7.6.1. Filterung der Bilder zur Reduzierung des Bildrauschens

Die mit dem Mikroskop aufgenommenen Bilder sind mit Rauschen behaftet, welches sich negativ auf die Qualität des Autofokussystems auswirkt. Um das Rauschen zu reduzieren, wurden folgende Funktionen implementiert, mit denen die Bilder gefiltert werden können:

1. Herunterskalieren des Bildes um den Faktor 2
2. Faltung mit einem Gauß-Filter mit Kernelgröße 3x3
3. Anwendung eines Schwellwertes. Dabei werden die Pixelwerte unterhalb der Schwelle auf Null gesetzt und von höheren Pixelwerten wird der Schwellwert subtrahiert.

Der Schwellwert entspricht dabei wahlweise der mittleren Pixelintensität oder der Summe aus mittlerer Pixelintensität und Standardabweichung der Intensitäten. Die Funktionen können einzeln angewendet oder beliebig kombiniert werden.

Neben dem Bildrauschen können auch andere Aberrationen, welche nicht auf einer Defokussierung beruhen, die Bildqualität reduzieren. Diese werden jedoch bei der Vorbehandlung nicht berücksichtigt. Dies liegt daran, dass Fokusmetriken auf derartige Aberrationen ähnlich wie auf eine Defokussierung reagieren [74]. Anschaulich betrachtet führen Bildaberrationen zu einem vergrößerten Volumen der PSF, was sich wiederum wie eine Tiefpassfilterung auswirkt.

### **Einfluss der Bildvorfilterung auf die Fokusqualität**

Bevor die Fokusmetriken anhand der beiden biologischen Proben verglichen werden, wird hier zunächst der Einfluss der Vorfilterschritte auf die Fokusmetriken untersucht. Sowohl für die Aufnahme mit starkem Signal, als auch diejenige mit schwachem Signal, wurde für jede Fokusmetrik jeweils die beste Kombination an Vorfilterungen bestimmt. Es wurde dabei nach 3 Kriterien geurteilt.

1. Die Anzahl an Nebenmaxima sollte möglichst gering sein.
2. Die normierte Höhe  $h$  sollte möglichst hoch sein.
3. Die Halbwertsbreite FWHM sollte möglichst gering sein.

Bei der Bestimmung der Nebenmaxima wurden nur solche berücksichtigt, deren Funktionswert 5% oder mehr über ihren direkten Nachbarn liegt. Dadurch soll verhindert werden, dass kleine Schwankungen in der Amplitude fälschlicherweise als Maxima gezählt werden, obwohl sie im Rahmen der Messungenauigkeit liegen. Da diese Schwelle willkürlich gesetzt wurde, wird in der Bewertung der Metriken ein Nebenmaximum gleichwertig wie kein Nebenmaximum gewertet.

Mit Ausnahme der *normierten DCT Shannon Entropie* hat sich die Anwendung eines Schwellwerts bei allen Funktionen positiv auf  $h$  und FWHM ausgewirkt. Dies liegt wahrscheinlich an der Normierung dieser Funktion. Durch die Faltung mit einem Gaußfilter wurde die Menge an Rauschen in den Aufnahmen reduziert, wodurch insbesondere bei den beiden Vollathfunktionen die Anzahl der Nebenmaxima reduziert werden konnte. Gleichzeitig verringerte sich bei diesen beiden Funktionen  $h$  und FWHM stieg leicht. Im Gegensatz dazu verbesserten sich  $h$  und FWHM durch den Gaußfilter bei den Funktionen *Scharr* und *Tenengrad*, während die anderen Funktionen unbeeinträchtigt blieben. Durch das Herunterskalieren erhöhte sich in den meisten Fällen  $h$  und die Rechenzeit

sank. Im Falle des *quadrierten Laplace-Filters* sank außerdem FWHM um etwa den Faktor 2, während dieser Wert bei den Funktionen *FFT mit Hochpass* und *kombinierte FFT* sogar stieg. Außerdem führte das Herunterskalieren bei diesen drei Funktionen zu einer Verschiebung der Lage des Maximums.

Die vollständigen Ergebnisse der Bildvorfilterungen auf die betrachteten Fokusmetriken sind sehr umfangreich und befinden sich daher in Abschnitt A.5.1 für den Bildstapel mit starkem Bildsignal und in Abschnitt A.5.2 für den Bildstapel mit schwachem Bildsignal. Dort finden sich jeweils Profile aller Metriken mit den möglichen Kombinationen an Vorfilterungen, sowie Tabellen mit den charakteristischen Werten.

Die jeweils beste gefundene Kombination an Bildvorfilterungen der Metriken findet sich in Tabelle 7.2.

	Starkes Signal	Schwaches Signal
Quadrierter Laplace-Filter	H G S	H S
Quadrierter Scharr-Filter	H G S	H G S
DCT Shannon Entropie	H	H G
Quadrierte FFT	S	H G S
FFT mit Hochpass	G S	H G S
Kombinierte FFT	G S	H G S
Vollath F4	H S	H G S
Vollath F4 symmetrisch	H G S	H G S
Tenengrad	H G S	H G S

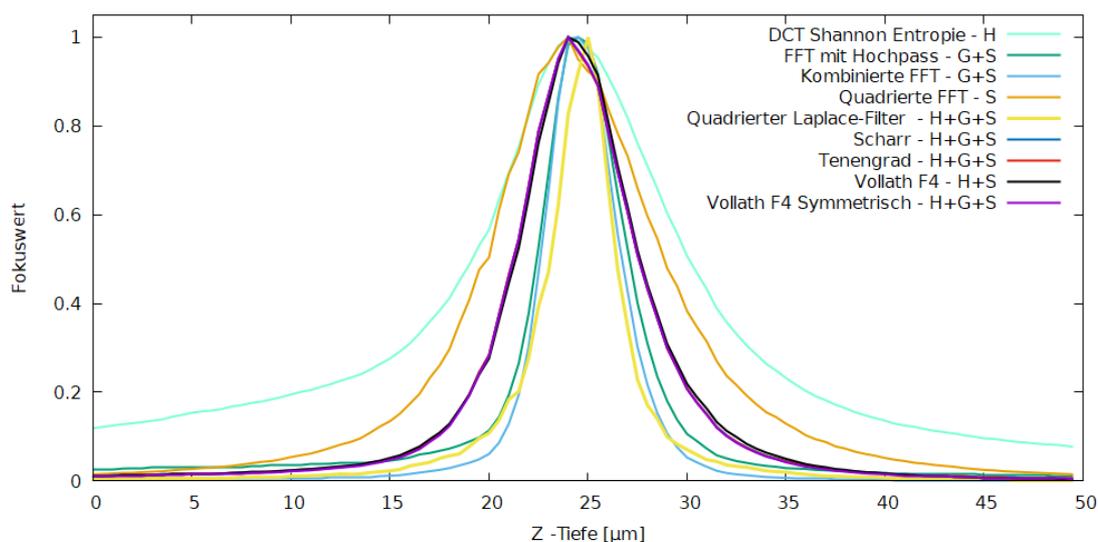
**Tabelle 7.2.:** Optimale Bildvorfilterungen der Fokusmetriken.  
**G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.

### 7.6.2. Vergleich der Fokusmetriken bei hohem Fluoreszenzsignal

Die Profile der Fokusmetriken mit optimierter Vorfilterung in einer Probe mit hohem Fluoreszenzsignal finden sich in Abbildung 7.9. Die charakteristischen Werte der optimierten Fokusmetriken finden sich in Tabelle 7.3. Bei dem Vergleich der Metriken, in einer biologischen Probe mit hohem Fluoreszenzsignal, hat sich die kombinierte FFT als optimal herausgestellt. Hier war  $h$  am höchsten und FWHM am zweitniedrigsten. Die FWHM war bei der Laplace-Funktion am niedrigsten, jedoch hat diese ausgeprägte Nebenmaxima und das Hauptmaximum weicht von dem Massenschwerpunkt (CoM) der anderen Fokusfunktionen um etwa  $0,5 \mu\text{m}$  ab.

	$Max$ [ $\mu m$ ]	$CoM$ [ $\mu m$ ]	$h$	$t$ [ms]	FWHM [ $\mu m$ ]	$Maxima$	$\frac{Max}{Nachbar}$
<b>Quadrierter Laplace-Filter</b>							
H G S	25	24,44	0,9983	98,5	3,475	4	1,12
<b>Scharr</b>							
H G S	24	24,37	0,9941	102,9	6,365	0	0,00
<b>DCT Shannon Entropie</b>							
H	24	23,62	0,9227	197,9	11,000	0	0,00
<b>Quadrierte FFT</b>							
S	24	24,57	0,9854	63,8	9,107	0	0,00
<b>FFT mit Hochpass</b>							
G S	24,5	24,01	0,9883	125,1	4,698	0	0,00
<b>Kombinierte FFT</b>							
G S	24,5	24,56	0,9992	126,1	4,157	0	0,00
<b>Vollath F4</b>							
H S	24	24,43	0,9960	54,9	6,343	1	1,05
<b>Vollath F4 Symmetrisch</b>							
H G S	24	24,37	0,9956	76,5	6,363	0	0,00
<b>Tenengrad</b>							
H G S	24	24,37	0,9945	103,9	6,369	0	0,00

**Tabelle 7.3.:** Vergleich der optimierten Fokusmetriken im Gehirn einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. **G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.



**Abbildung 7.9.:** Fokusmetriken mit optimierten Vorfilterungen im Gehirn einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. **H:** Herunterskalieren. **G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert.

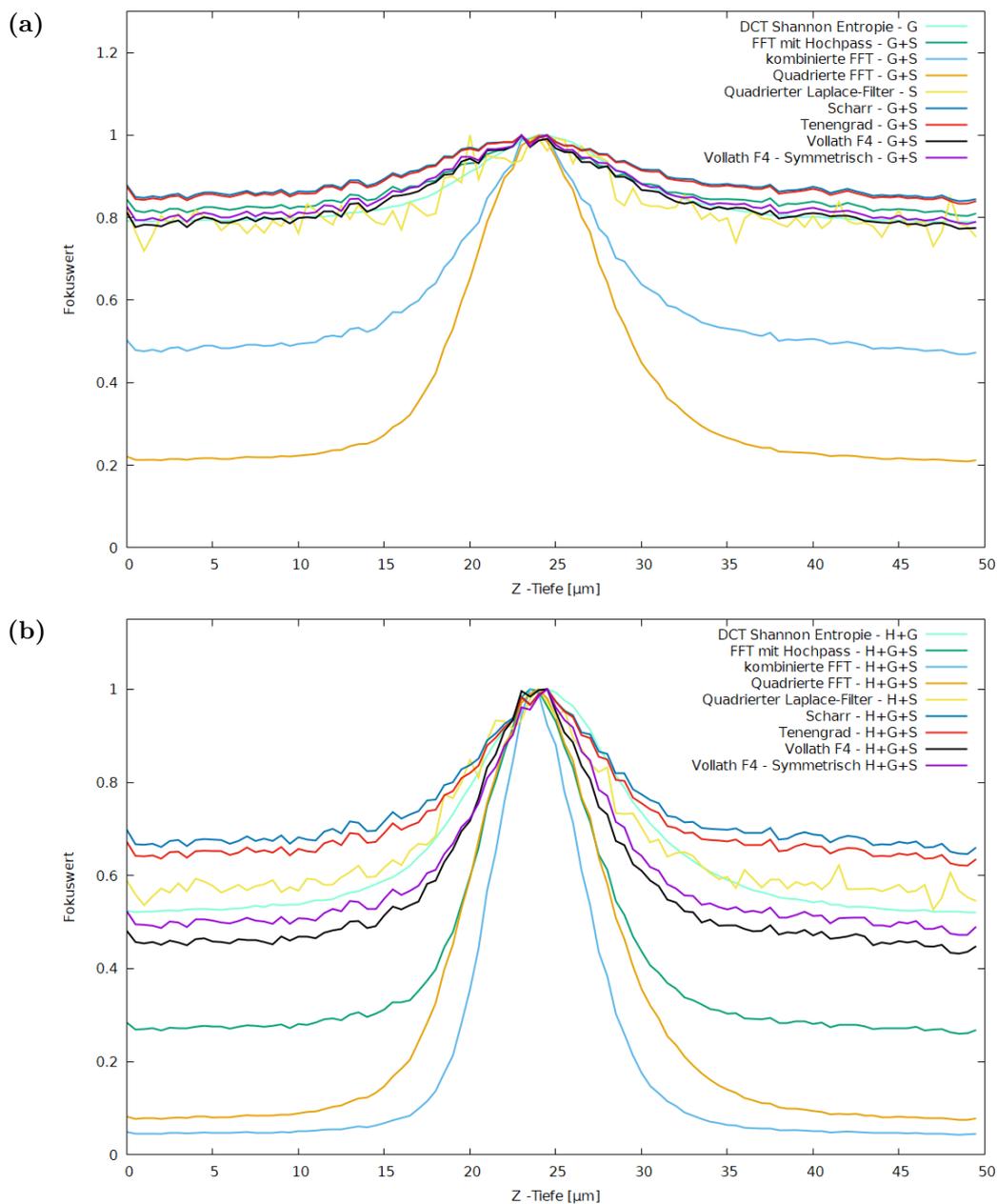
### 7.6.3. Vergleich der Fokusmetriken bei niedrigem Fluoreszenzsignal

Bei geringer Fluoreszenz hat sich das Herunterskalieren der Aufnahmen als besonders vorteilhaft erwiesen, weswegen an dieser Stelle die Metriken einmal mit und einmal ohne Skalierung betrachtet werden. Die Profile der Fokusmetriken mit optimierter Vorfilterung in einer Probe mit niedrigem Fluoreszenzsignal finden sich in Abbildung 7.10. In Tabelle 7.4 sind die Ergebnisse mit und ohne Skalierung aufgelistet. Ohne Skalierung hat sich die quadrierte FFT als beste Metrik erwiesen. Sie war am wenigsten rauschanfällig und gehörte zusammen mit der kombinierten FFT zu den beiden Metriken mit  $h \geq 0,5$ . Bei den anderen Metriken ist das Maximum nur schwach definiert und im Falle der Laplace-Funktion praktisch nicht auszumachen. Durch das Herunterskalieren steigt  $h$  bei allen Metriken deutlich. Besonders profitiert hier die kombinierte FFT, welche sich nun an die Spitze der Metriken setzt.

	$Max$ [ $\mu m$ ]	$CoM$ [ $\mu m$ ]	$h$	$t$ [ms]	$Maxima$	FWHM [ $\mu m$ ]	$\frac{Max}{Nachbar}$
<b>Quadrierter Laplace-Filter</b>							
S	24	24,47	0,2887	179,3	8	26,724	1,07
H S	24	24,22	0,4732	84,6	7	34,857	1,07
<b>Scharr</b>							
G S	24,5	23,94	0,1602	258,8	0	-40,890	0,00
H G S	24,5	24,03	0,3540	103,8	0	61,539	0,00
<b>DCT Shannon Entropie</b>							
G	24,5	24,70	0,2106	704,9	0	17,481	0,00
H G	24,5	24,77	0,4795	219,4	0	-47,479	0,00
<b>Quadrierte FFT</b>							
G S	24	24,32	0,7906	127,4	0	10,732	0,00
H G S	24	24,33	0,9247	71,2	1	9,323	1,07
<b>FFT mit Hochpass</b>							
G S	24,5	24,00	0,1962	127,9	0	67,839	0,00
H G S	23,5	24,21	0,7401	71,1	1	9,989	1,05
<b>Kombinierte FFT</b>							
G S	24,5	24,18	0,5323	128,6	0	26,462	0,00
H G S	23,5	24,19	0,9565	71,5	1	6,448	1,08
<b>Vollath F4</b>							
G S	23	24,05	0,2269	127,6	0	76,408	0,00
H G S	24,5	24,15	0,5676	70,4	1	20,822	1,05
<b>Vollath F4 Symmetrisch</b>							
G S	23	23,99	0,2153	197,9	0	372,880	0,00
H G S	24,5	24,19	0,5272	76,4	1	42,783	1,06
<b>Tenengrad</b>							
G S	24,5	23,94	0,1654	258,4	0	-49,887	0,00
H G S	24,5	24,06	0,3787	103,6	0	59,938	0,00

**Tabelle 7.4.:** Vergleich der optimierten Fokusmetriken im Rückenmark einer fünf Tage alten Zebrafischlarve.

**G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.



**Abbildung 7.10.:** Vergleich der Fokusmetriken in einer schwach leuchtenden biologischen Probe. **(a):** Ohne Herunterskalierung. **(b):** Nach Herunterskalierung um den Faktor 2.

H: Herunterskalieren. G: Gaußfilter. S: Schwellwert.

## 7.7. Abschließende Beurteilung der Fokusmetriken

Von den untersuchten Fokusmetriken hat sich insgesamt die kombinierte FFT als optimal für das verwendete Mikroskop erwiesen. Durch die kombinierte Vorfilterung mit einem Gaußfilter und einem Schwellwert ließ sich die Robustheit dieser Funktion weiter steigern. Es hat sich außerdem gezeigt, dass ein Herunterskalieren der Aufnahmen bei schwachen Lichtverhältnissen die Fokussierung stark verbessert. Bei guten Lichtverhältnissen ist diese Verbesserung deutlich geringer und im Falle der beiden FFT-Metriken mit Hochpassfilter hat sich das Herunterskalieren sogar als nachteilig herausgestellt, da hier die Bildinformationen der kleinsten Strukturen verloren gehen.

Aus diesem Grund wird für die Fokussierung standardmäßig die kombinierte FFT mit Gaußfilter und Schwellwert verwendet und das Herunterskalieren kann hinzu geschaltet werden, wenn schwache Fluoreszenz zu erwarten ist.

## 7.8. Erhöhung der Autofokusstabilität

Bei der Autofokussierung können Fehler niemals ausgeschlossen werden. Daher werden hier mögliche Fehlerquellen diskutiert und Lösungsansätze behandelt.

### Auswahl der Z-Ebene zur Autofokussierung

Damit die Autofokussierung erfolgreich ist, muss ein Mindestmaß an Fluoreszenzlicht vom Objektiv gesammelt werden. Fehlt dieses Licht, bestehen die aufgenommenen Bilder lediglich aus Rauschen, welches zum Beispiel durch den Bildsensor hervorgerufen wird. In diesem Fall kann der Fokus nicht korrekt bestimmt werden und das Maximum einer Anpassung kann einen zufälligen Wert annehmen.

Aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung der Fluorophore in den betrachteten Proben, enthalten die aufgenommenen Z-Stapel häufig viele Ebenen mit keinem oder nur unzureichendem Signal für die Autofokussierung. Um die optimale Z-Ebene zur Fokussierung zu bestimmen, wird daher bei einer Langzeitmessung der zuletzt aufgenommene Bildstapel untersucht. Dieser besteht typischerweise aus etwa 100 Z-Ebenen. Da die Berechnung der Fokuswerte aller Z-Ebenen recht zeitaufwendig ist, wird stattdessen die Helligkeitsverteilung im Z-Stapel analysiert.

Für ein bestmögliches Fokusergebnis sollte die Ebene möglichst hell sein. Gleichzeitig muss beachtet werden, dass die Bildqualität mit zunehmender Probentiefe abnimmt, da das Fluoreszenzlicht mehr Gewebe passiert. Die Ebene sollte also auch möglichst am oberen Ende des Bildstapels liegen.

Die gleichzeitige Erfüllung beider Kriterien ist nicht immer möglich, daher wird die Fokusebene in folgenden Schritten bestimmt:

1. Messung der mittleren Helligkeit  $I_i$  in allen Bildebenen  $i$
2. Glättung mit einem Gaußfilter
3. Bestimmung des Mittelwerts der Helligkeitsverteilung  $I(z)$

Anschließend wird, vom oberen Ende des Stapels ausgehend, die erste Ebene ausgewählt deren Helligkeit über dem Mittelwert liegt.

### Abschätzung des Rauschniveaus

Bei der Auswahl der besten Z-Position zur Fokussierung wird implizit davon ausgegangen, dass in einem Bildstapel immer eine Z-Ebene mit ausreichend Signal vorhanden ist. Verschiedene Ursachen können jedoch dazu führen, dass dies nicht zutrifft. In einigen Experimenten ist beispielsweise zu Beginn der Langzeitaufnahme kaum oder gar kein Fluoreszenzsignal vorhanden. Eine robuste Autofokussierung ist in diesem Fall erst nach einiger Zeit möglich, sobald die Fluoreszenz ein ausreichend hohes Niveau erreicht hat. Dies ist dann der Fall, wenn das Bildsignal vom Hintergrundrauschen unterscheidbar ist.

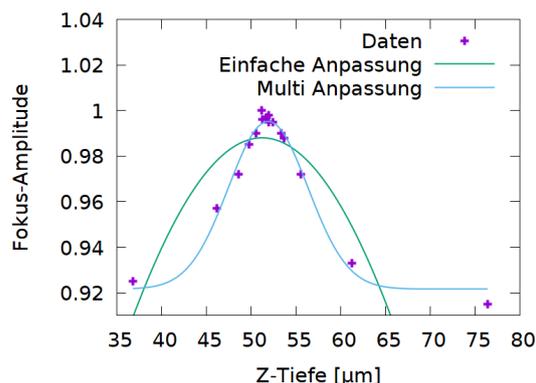
Um die Höhe des Rauschens abzuschätzen, wird zu Beginn jeder Langzeitaufnahme ein Referenzbild ohne Anregungslaser aufgenommen und von diesem der Fokuswert  $F_{Rauschen}$  bestimmt. Da in diesem Fall kein Fluoreszenzlicht angeregt wird, entspricht  $F_{Rauschen}$  somit der Höhe des Hintergrundrauschens. Für alle folgenden Autofokussierungen gilt für den höchsten Fokuswert  $F_{Max}$  die Einschränkung

$$F_{Max} \geq 2 \cdot F_{Rauschen} . \quad (7.12)$$

Wird diese Einschränkung nicht erfüllt, wird die Fokussierung als gescheitert betrachtet und die letzte Fokusposition beibehalten.

### Stabilität der Gauß-Anpassung

Eine Ursache für eine fehlerhafte Fokussierung ist eine schlechte Gauß-Anpassung an die Fokuswerte als Funktion der Z-Position, wodurch die optimale Fokusposition nicht korrekt bestimmt werden kann. In Abbildung 7.11 ist beispielhaft eine Gauß-Anpassung an aufgenommene Fokuswerte der *kombinierten FFT* abgebildet.



**Abbildung 7.11.:** Gauß-Anpassung mit verschiedenen Startwerten.

Für die Anpassung wurde die in LabVIEW vorhandene Funktion *Gaussian Peak Fit* verwendet. Dabei zeigte sich jedoch eine deutliche Abweichung der Anpassung von den Fokuswerten. So wich das Maximum der Anpassung um etwa  $0,7\ \mu\text{m}$  vom realen Optimum ab. Aus diesem Grund wurde eine Routine geschrieben, welche die Anpassung verbessert.

Zunächst wird die Lage des Maximums durch Berechnung des Schwerpunkts der Daten genähert. Anschließend werden insgesamt 11 Anpassungen mit verschiedenen Standardabweichungen als Startwert durchgeführt. Aus diesen Anpassungen wird anschließend diejenige mit dem geringsten Residuum ausgewählt. Das Ergebnis dieser Multi Gauß-Anpassung ist ebenfalls in Abbildung 7.11 dargestellt.

Darüber hinaus wird nach der Anpassung deren Güte bestimmt. Hierfür wird neben des Residuums  $r$  der Anpassung zusätzlich der Korrelationskoeffizient  $c$  zwischen den Daten und der Anpassung berechnet. Aufgrund von Langzeitmessungen an fluoreszierenden Nanopartikeln wurden für  $r$  und  $|c|$  jeweils Schwellwerte bestimmt, welche die Anpassung einhalten muss. Sofern sie es nicht tut, wird die Anpassung als gescheitert betrachtet und die Fokusposition aus der vorherigen Messung beibehalten.

Es wurden folgende Schwellwerte festgelegt:

$$0,0002 < r < 0,07 \quad (7.13)$$

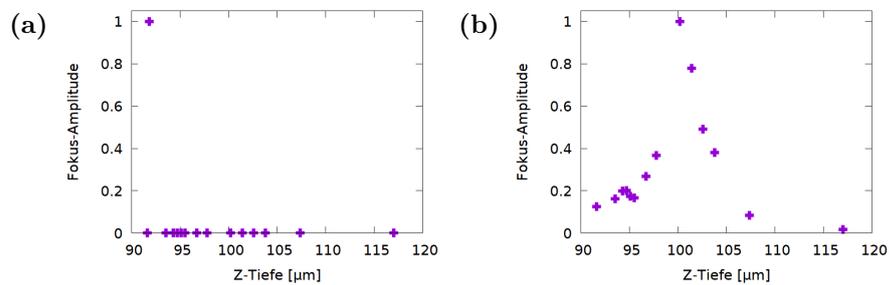
$$0,7 < |c| < 0,998 \quad (7.14)$$

### Bildartefakte

Ein weiteres Problem kann durch Bildartefakte in den aufgenommenen Bildern verursacht werden. Die Ursache dieser Artefakte ist nicht vollständig geklärt. Sie treten hauptsächlich bei Aufnahmen im Kopfbereich der Zebrafischlarven auf, wenn ein Teil des Anregungslasers eines der Augen der Larve passiert.

Es könnte sich hierbei also um Licht handeln, welches vom Auge direkt in den Detektorpfad umgelenkt wurde.

Aufgrund dieser Artefakte kann es zu unrealistisch hohen Fokuswerten kommen. Im Betrieb des Mikroskops wurden artefaktbedingte Fokuswerte gefunden, welche um einen Faktor von mehr als  $10^5$  größer als der entsprechende Fokuswert des tatsächlichen Optimums waren. Dies ist beispielhaft in Abbildung 7.12a dargestellt.



**Abbildung 7.12.:** Autofokussierung mit einem Fokusartefakt. **(a):** Originaldaten. **(b):** Dieselben Daten nach Entfernen des Artefakts.

Aufgrund des Artefakts ist die tatsächliche Verteilung der Datenpunkte nicht zu erkennen. Bei einer Gaußanpassung an diese Daten wird folglich das falsche Maximum als Optimum bestimmt.

Aus diesem Grund werden vor der Gauß-Anpassung zunächst die Fokuswerte auf Ausreißer untersucht und der höchste Fokuswert aus der Datenreihe entfernt, sofern dieser mehr als  $10^4$ -fach größer als der zweithöchste Wert ist. In Abbildung 7.12b ist die Datenreihe aus dem Beispiel nach der Filterung abgebildet.

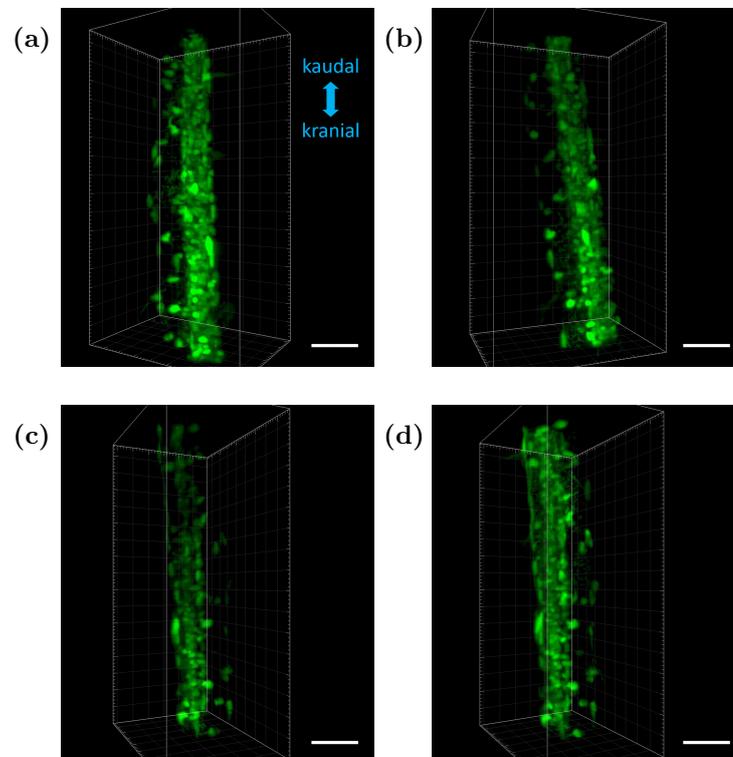
## 8. Langzeitmessungen: Synchronisierung des konfokalen Detektors (Y-Fokus)

Die Kombination von LSFM mit einer konfokalen Detektion hat sich in stark streuenden Proben als vorteilhaft erwiesen. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch sowohl der Bildkontrast, wie auch das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert werden kann und darüber hinaus die Genauigkeit der optischen Schnitte steigt[4]. In dieser Arbeit wurde dies auch für 2P-Anregung demonstriert (siehe Abschnitt 4.3.2). Damit der konfokale Effekt entsteht, müssen Anregung und Detektion sehr genau synchronisiert werden. Dies stellt hohe Ansprüche an die Stabilität des Mikroskops, was insbesondere im Hinblick auf Langzeitaufnahmen, mit einer Dauer von mehreren Stunden, problematisch werden kann. Im Vergleich mit einem klassischen konfokalen Mikroskop, erweist sich hier die besondere Beleuchtungsgeometrie der Lichtscheibenmikroskopie als Nachteil. In einem klassischen Konfokalmikroskop dient dasselbe Objektiv gleichzeitig zur Beleuchtung und zur Detektion. Diese beiden Strahlengänge sind daher intrinsisch synchronisiert. Bei der LSFM sind die beiden Strahlengänge entkoppelt und passieren verschiedene Objektive. Es bedarf daher zusätzlichen Aufwand, um ihre Synchronisierung zu gewährleisten. Um die Langzeitstabilität zu erhöhen, sollte daher eine möglichst stabile Laserquelle verwendet werden. Außerdem ist es sinnvoll, die Raumtemperatur möglichst konstant zu halten und beim Bau des Mikroskops spezielle Bauteile mit einem geringen Wärmeausdehnungskoeffizienten zu verwenden. Wie bereits erwähnt wurde, ist eine Kontrolle der Temperatur über eine Klimaanlage am Ort des verwendeten Mikroskops nicht möglich. Darüber hinaus kann zwar mit den genannten Maßnahmen die Stabilität erhöht werden, jedoch ist ein Verlust der Synchronisierung nicht ausgeschlossen. Dadurch kann es zu einer Verschiebung  $\Delta_{\text{Detektor}}$  zwischen Laser und Schlitzdetektor kommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuartiges Verfahren entwickelt, welches aktiv die Synchronisation über längere Zeiträume gewährleistet (Y-Fokus). Dieses Verfahren erlaubt die Nutzung der Kontraststeigerung durch konfokale Detektion, ohne einen Signalverlust durch eine Desynchronisierung zwischen Laser und Detektor zu riskieren. Die Auswirkungen einer Desynchronisierung werden in Abschnitt 8.1 anhand eines Beispiels

demonstriert. In Abschnitt 8.2 wird die neu entwickelte Methode vorgestellt und anhand fluoreszierender Nanopartikel demonstriert. Danach wird in Abschnitt 8.3 die Methode in einer biologischen Probe mit zuvor unbekannter Struktur verwendet. Schließlich werden in Abschnitt 8.4 die Ergebnisse aus Abschnitt 8.2 und Abschnitt 8.3 miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die entwickelte Methode unabhängig von der Probenstruktur anwendbar ist.

## 8.1. Verlust der Synchronisierung zwischen Laser und Detektor

Neben einer Defokussierung in Z-Richtung, kann es im Verlauf einer Langzeitmessung auch zu einer Desynchronisierung zwischen Laser und *Rolling Shutter* kommen. Dies macht sich durch einen Verlust der Helligkeit bemerkbar (siehe Abbildung 8.1).



**Abbildung 8.1.:** Desynchronisierung zwischen Laser und *Rolling Shutter* bei einer Langzeitaufnahme im Rückenmark einer vier Tage alten Zebrafischlarve. **(a):** 2:02h. **(b):** 2:56h. **(c):** 4:33h. **(d):** 4:40h. Gaußbeleuchtung. Konfokale Detektion. Skala 50  $\mu\text{m}$ .

Es handelt sich hierbei um Ausschnitte einer Langzeitmessung im Rückenmark einer vier Tage alten Zebrafischlarve *Tg(olig2:GFP)*. Ein Video der Aufnahme befindet sich

auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_4.mp4*. Die Scanrichtung  $Y$  des Lasers in diesen Abbildungen verläuft von unten nach oben. Die Messung wurde ohne das im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Programm zur automatischen Synchronisierung (Y-Fokus) durchgeführt. Zu Beginn der Messung waren Laser und *Rolling Shutter* synchron, was sich in einer gleichmäßigen Helligkeitsverteilung in der Probe äußert. Im Verlauf der Messung verschob sich die Lage des Lasers relativ zum *Rolling Shutter*, was durch eine Helligkeitsabnahme im oberen Bildbereich von Abbildung 8.1b und Abbildung 8.1c erkennbar ist. Dass der untere Bildbereich unberührt bleibt, lässt zudem auf eine leichte Differenz in der Geschwindigkeit des Laser-Scans und des *Rolling Shutter*s schließen.

Die Desynchronisierung wurde während der Aufnahme bemerkt und manuell korrigiert. Dazu wurde die Position des Lasers durch Ausprobieren angepasst und gleichzeitig die Bildhelligkeit beobachtet. In Abbildung 8.1d ist der Zeitpunkt direkt nach der manuellen Justage abgebildet. Es ist zu sehen, dass, die gleichzeitige Helligkeitsverteilung wiederhergestellt wurde. Diese Form der Justage ist jedoch ineffizient, da hierzu mehrere Aufnahmen nötig sind, in welchen die jeweilige Bildebene komplett gescannt wird. Für die Aufnahme wurde eine Schlitzbreite von 98 Pixeln verwendet, was in etwa dem 4,4-fachen des Strahldurchmessers entspricht. Dadurch war es relativ einfach, durch Ausprobieren den Strahl in den Bereich der aktiven Pixel zu legen, da nicht unbedingt die Mitte des *Rolling Shutter*s getroffen werden musste. Wie in Abschnitt 4.3.2 gezeigt wurde, ist der Bildkontrast maximal, wenn der Durchmesser des Detektors dem des Laserstrahls entspricht. In diesem Fall ist es deutlich schwieriger, die optimale Laserposition durch Ausprobieren zu ermitteln.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neuartige Methode entwickelt, mit welcher die Desynchronisierung zwischen Laser und Detektor automatisch bestimmt und korrigiert wird. Die neue Methode hat gegenüber der Fokussierung durch Ausprobieren den Vorteil, dass sie nur zwei Scanvorgänge benötigt. Dabei wird im ersten Scan eine Region mit hoher Leuchtintensität gesucht und der zweite Scan erfolgt ausschließlich innerhalb dieser Region. Dadurch wird die Menge an Licht, welcher die Probe ausgesetzt wird, reduziert. Darüber hinaus wird im zweiten Scan der Abstand zwischen Laserposition und der Mitte des *Rolling Shutter*s bestimmt, wodurch diese genau überlagert werden können.

Die detaillierte Funktionsweise der Methode wird im Folgenden erläutert.

## 8.2. Automatisierte Detektor-Synchronisierung (Y-Fokus)

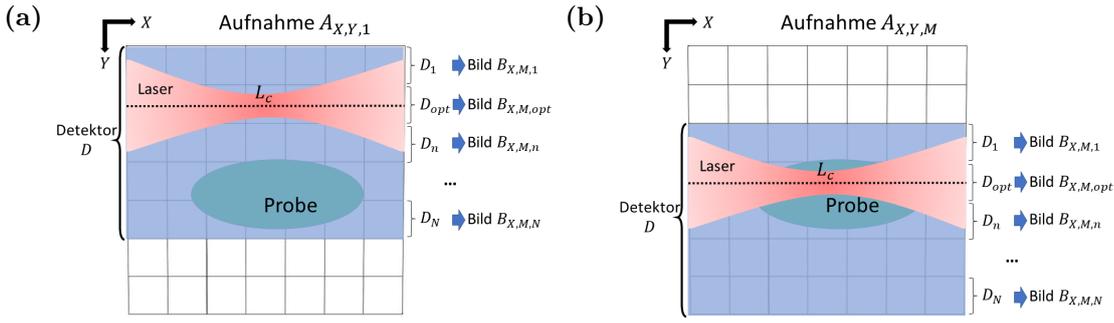
Das entwickelte Verfahren zur automatisierten Synchronisierung benutzt die Fluoreszenz der betrachteten Probe und funktioniert unabhängig von deren Struktur. Die grundlegende Idee ist, den konfokalen Detektor  $D$  mit Schlitzbreite  $N$  virtuell in mehrere schmale Schlitzdetektoren  $D_n$  aufzuteilen. Diese sind jeweils nur eine Pixelzeile breit und werden individuell ausgelesen, sodass für jeden Detektor  $D_n$  ein separates Bild  $B_n$  der Probe erzeugt wird. Da die  $D_n$  um jeweils eine Pixelzeile zueinander verschoben sind, werden sie unterschiedlich gut vom Anregungslaser beleuchtet. Dementsprechend unterscheiden sich auch die erzeugten Bilder  $B_n$  in ihrer Helligkeit.

Gesucht wird die Detektorzeile  $D_{opt}$ , welche sich parallel zum Mittelpunkt  $L_c$  des Anregungslasers bewegt. Das korrespondierende Bild  $B_{opt}$  wird vom Laser optimal ausgeleuchtet. Mit zunehmendem Abstand von  $D_{opt}$  werden die Zeilen  $D_n$  schlechter ausgeleuchtet, wodurch die Helligkeit und Bildqualität in  $B_n$  sinken. Dies kann anschaulich als eine Defokussierung verstanden werden. Aus den Bildern  $B_n$  kann daher, analog zur Fokussierung in Detektionsrichtung, mithilfe einer geeigneten Fokusmetrik das am besten fokussierte Bild  $B_{opt}$  bestimmt werden. Aus diesem Bild folgt die optimale Detektorposition  $D_{opt}$ .

Bisher wurde implizit angenommen, dass es immer eine Detektorzeile gibt, welche sich exakt parallel zu  $L_c$  bewegt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass auch  $D_{opt}$  geringfügig gegenüber  $L_c$  verschoben ist. Aus der Verteilung der Fokuswerte der Bilder  $B_n$  lässt sich die Gesamtverschiebung  $\Delta_{Detektor}$  mit Subpixelgenauigkeit bestimmen. Dazu kann beispielsweise eine Gaußanpassung oder eine Berechnung des Schwerpunktes der Verteilung verwendet werden. Die Lokalisierungsgenauigkeit ist dabei umso höher, je kleiner die effektive Pixelgröße  $d_{pixel}$  des Detektors ist. Für das verwendete Mikroskop beträgt diese  $d_{pixel} = 0,1625 \mu\text{m}$ .

### 8.2.1. Implementierung des Programms in LabVIEW

Bei der Bilderzeugung im *Lightsheet* Modus wird über alle Detektorzeilen des Schlitzdetektors integriert, ohne dass diese individuell ausgelesen werden können. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Programm geschrieben, mit dem der Laser in diskreten Schritten  $m$  durch die Probe bewegt, und an jeder Position des Lasers eine Aufnahme  $A_{X,Y,m}$  der Probe mit globaler Detektion erzeugt wird. Hier entsprechen  $X$  und  $Y$  der Breite, bzw. Höhe der Aufnahme  $A$ . Aus diesen Aufnahmen wird jeweils nur ein Band an Bildzeilen betrachtet, das der Lage des Schlitzdetektors  $D$  zum Zeitpunkt  $t_m$  entspricht (siehe Abbildung 8.2).



**Abbildung 8.2.:** Prinzip der Synchronisierung des konfokalen Detektors  $D$ . **(a):** Zeitpunkt  $t_1$ . Das Bündel virtueller Schlitzdetektoren wird durch die Probe bewegt.  $L_c$  befindet sich außerhalb der Probe.

**(b):** Zeitpunkt  $t_M$ .  $L_c$  befindet sich in der Probe.

Parallel zur Bewegung des Lasers, verschiebt sich das Band der aktiven Zeilen um jeweils einen Pixel. Die Zeilen in diesem Band entsprechen den virtuellen Detektoren  $D_n$ .

Mit der Bildhöhe  $Y$  und der Detektorbreite  $N$  folgt für die nötige Anzahl  $M$  der aufzunehmenden Bilder  $A_{X,Y,m}$

$$M = Y - N. \quad (8.1)$$

Da am Ende der Aufnahme jeder Detektor  $D_n$  über eine Distanz von  $M$  Pixeln bewegt wurde, entspricht  $M$  auch der Höhe der Bilder  $B_n$ . Die Breite beträgt  $X$ , sodass aus jedem Detektor  $D_n$  ein Bild  $B_{X,M,n}$  erzeugt wird.

Zur Steigerung der Aufnahmegeschwindigkeit wird im *Area Modus* (globale Detektion) das Ausgangssignal der Kamera zum Triggern verwendet.

### Auswahl eines geeigneten Bildausschnitts

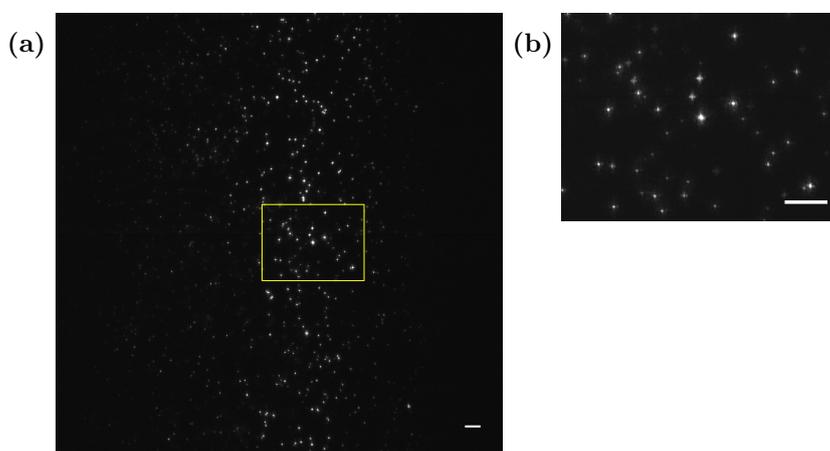
Eine typische Detektorbreite für das verwendete Mikroskop ist  $N = 100$ . Bei einer Vergrößerung von 40 beträgt die effektive Pixelgröße  $d_{pixel} = 0,1625 \mu\text{m}$ . Somit kann für diese Werte eine Gesamtverschiebung  $\Delta_{Detektor}$  von bis zu  $\pm 8,125 \mu\text{m}$  gemessen werden. Bei voller Kameraauflösung von  $2048 \times 2048$  Pixeln folgen aus Gleichung (8.1) zwei praktische Probleme. Es müssen  $M = 1948$  Aufnahmen  $A_{X,Y,m}$  aufgenommen werden, was bei der maximalen Bildrate der Kamera von 100 Hz etwa 20 s dauert (siehe Tabelle A.1). Dies ist nicht sehr praktikabel und zudem besteht die Gefahr, dass sich die Probe im Aufnahmezeitraum bewegt, wodurch die Messung verfälscht werden kann.

Das zweite Problem ist die generierte Datenmenge. Die in diesem Beispiel erzeugten 1948

Bilder  $B_{X,M,n}$  haben eine Größe von 2048 x 1948 Pixeln, was einer Gesamtdatenmenge von etwa 8 GB entspricht.

Um die genannten Probleme zu umgehen, wird daher nur ein kleiner Bildausschnitt von 400 x 300 Pixeln betrachtet. Durch die Reduzierung der vertikalen Bildhöhe steigt zudem die maximale Bildrate der Kamera (siehe Tabelle A.1).

Hierdurch ergibt sich die Notwendigkeit, zunächst eine Übersichtsaufnahme der Probe zu erstellen. Aus dieser Übersicht wird automatisch der Bildausschnitt für die weitere Analyse ausgewählt. Dazu wird das Bild zunächst mit einem Gauß-Filter gefaltet, um Rauschen zu unterdrücken. Der Bildausschnitt wird anschließend um den Pixel mit der höchsten Intensität gelegt. Hierbei werden jedoch nur Pixel berücksichtigt, welche mindestens den halben Bildausschnitt vom Bildrand entfernt sind. Dies ist beispielhaft in Abbildung 8.3 dargestellt, wo fluoreszierende Nanopartikel mit Besselstrahlen beleuchtet werden.

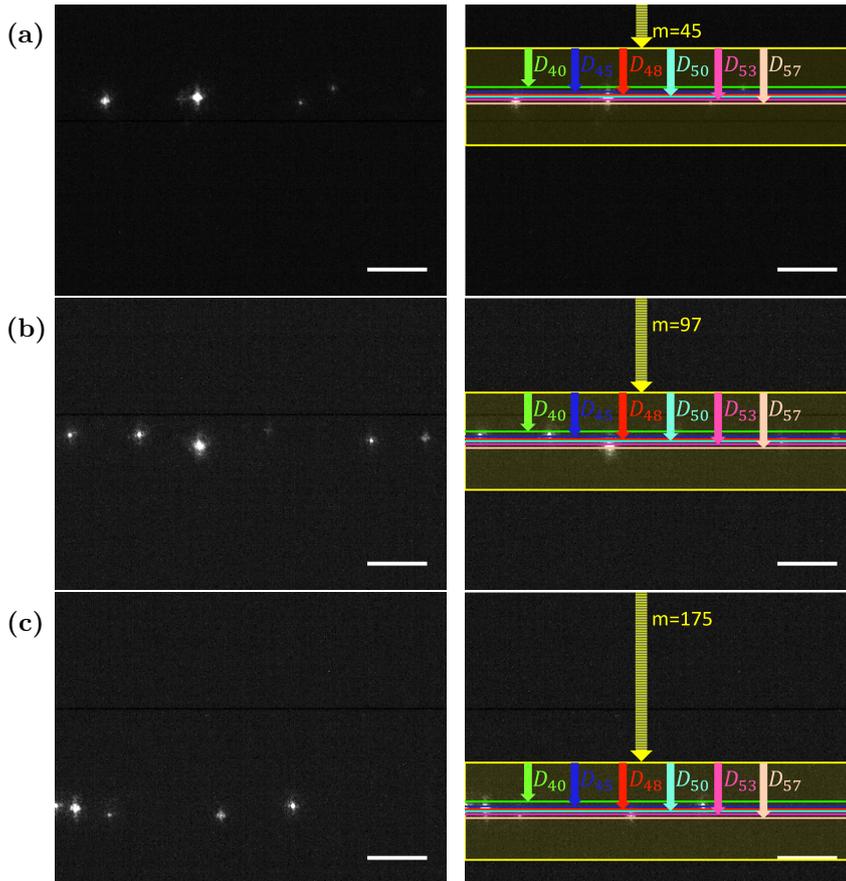


**Abbildung 8.3.:** Übersichtsaufnahme zur Lokalisierung eines Bildausschnitts für die Synchronisierung. **(a):** Fluoreszierende Nanopartikel. **(b):** Vergrößerung des Ausschnittes in **a**. Nur dieser Bereich wird für die Synchronisierung verwendet. Besselbeleuchtung. Konfokale Detektion. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

### Bilderzeugung aus den virtuellen Detektoren

Nachdem ein Auswahlbereich um eine geeignete Probe gefunden wurde, wird der Laser in diskreten Schritten  $m$  durch diesen Bereich bewegt und für jede Position des Lasers eine Aufnahme  $A_{X,Y,m}$  aufgenommen. In Abbildung 8.4 sind exemplarisch drei  $A_{X,Y,m}$  aus einem Stapel von  $M = 200$  Aufnahmen dargestellt, bei dessen Aufnahme ein Besselstrahl durch eine Probe von fluoreszierenden Nanopartikeln bewegt wurde.

Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 930 \text{ nm}$  und es wurde die 2P-Fluoreszenz detektiert. Die Detektion der 200 Aufnahmen  $A_{X,Y,m}$  dauerte etwa 590 ms. Anhand dieser Aufnahmen lässt sich die jeweilige Position des Lasers erahnen, jedoch ist die Konzentration an Nanopartikeln zu gering, um sie genau bestimmen zu können. In einer biologischen Probe mit komplexer Struktur ist dies noch schwerer, da diese Struktur in der Regel nicht *a priori* bekannt ist und große Bildausschnitte keine oder nur sehr geringe Fluoreszenz aufweisen können.



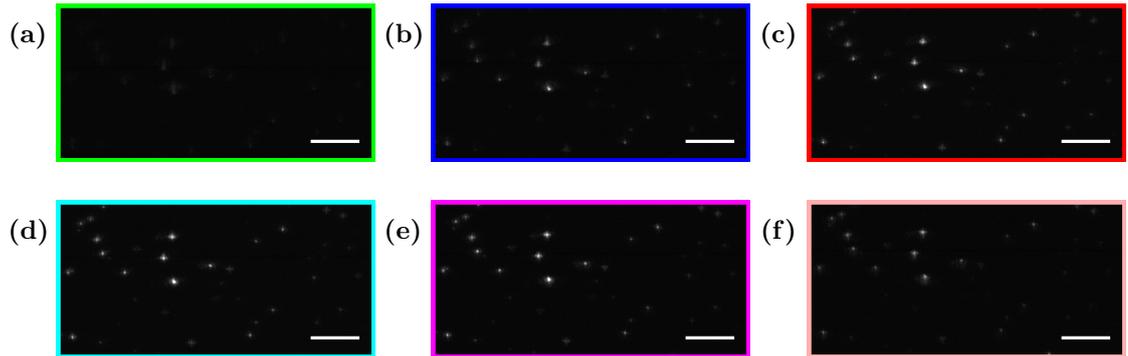
**Abbildung 8.4.:** Aufnahmen  $A_{X,Y,m}$  von Nanopartikeln an unterschiedlichen Laserpositionen. **(a):**  $m = 45$ . **(b):**  $m = 97$ . **(c):**  $m = 175$ .

In der rechten Spalte ist die Lage des Detektors  $D$  (gelb umrandet), sowie von sechs  $D_n$  (farbige Linien) hervorgehoben. Skala  $10 \mu\text{m}$ .

Aus den  $A_{X,Y,m}$  werden  $N = 100$  Bilder  $B_{X,M,n}$  erzeugt. Diese entstehen durch Auslesen der virtuellen Detektoren  $D_n$ , welche jeweils eine feste vertikale Position im sich bewegendem Detektor  $D$  haben. Der Detektor  $D$  wiederum bewegt sich parallel zur erwarteten Position  $L_{c,erwartet}$ .

Um dies zu verdeutlichen, ist in der rechten Spalte von Abbildung 8.4 die Lage des Detektors  $D$  zum Zeitpunkt  $t_m$  gelb umrandet und mit gestrichelten Pfeilen markiert. Zusätzlich sind sechs exemplarische  $D_n$  mit farbigen Linien hervorgehoben und ihre Lage in  $D$  mit Pfeilen markiert.

Für  $N = 100$  entspricht  $D_{50}$  (türkise Linie in Abbildung 8.4) dem Detektor an der Position  $L_{c,erwartet}$ . In Abbildung 8.5 sind die aus den markierten  $D_n$  erzeugten Bilder  $B_{X,M,n}$  dargestellt. Ein Video mit weiteren  $B_{X,M,n}$  befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_5.avi*.



**Abbildung 8.5.:** Aus virtuellen Detektoren  $D_n$  rekonstruierte Bilder  $B_{X,M,n}$  fluoreszierender Nanopartikel. (a):  $n = 40$ . (b):  $n = 45$ . (c):  $n = 48$ . (d):  $n = 50$ . (e):  $n = 53$ . (f):  $n = 57$ . Die entsprechenden  $D_n$  sind in Abbildung 8.4 als Farbige Linien dargestellt. Skala  $10 \mu\text{m}$ .

Um die Verbindung zu den in Abbildung 8.4 markierten  $D_n$  zu betonen, sind die  $B_{X,M,n}$  in den passenden Farben umrandet. Man erkennt dieselben Nanopartikel, wie sie in Abbildung 8.3b zu sehen sind. Im Vergleich zu dieser Abbildung ist jedoch die vertikale Bildhöhe in den  $B_{X,M,n}$  um  $N = 100$  Pixeln geringer. Die neue Bildhöhe  $M$  beträgt

$$M = Y - N. \quad (8.2)$$

Anhand von Abbildung 8.5 wird ersichtlich, wie sich die  $B_{X,M,n}$  in ihrer Helligkeit und Fokusqualität unterscheiden. Zudem sind die  $B_{X,M,n}$  um jeweils einen Pixel in vertikaler Richtung verschoben und zeigen somit unterschiedliche Probenausschnitte. Damit immer derselbe Probenausschnitt betrachtet wird, muss die Verschiebung in einem weiteren Schritt korrigiert werden. Dabei werden die  $B_{X,M,n}$  auf denjenigen Bereich reduziert, welcher in allen Bildern vorhanden ist (siehe Abbildung 8.6). Somit wird sichergestellt, dass die Änderung der Bildqualität nur von  $\Delta_{\text{Detektor}}$  und nicht von der Probe selbst abhängt.

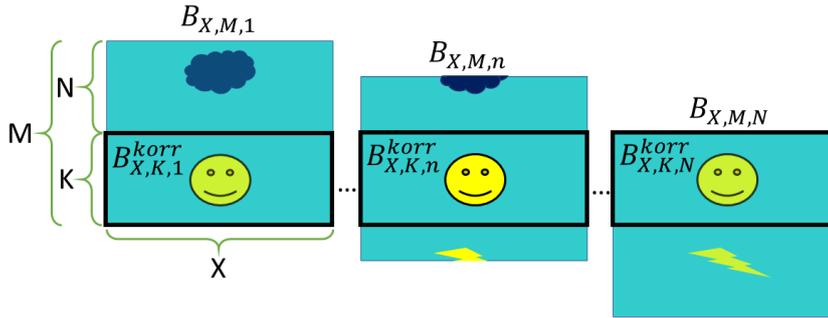


Abbildung 8.6.: Korrektur der  $B_{X,M,n}$ .

Durch diese Korrektur verringert sich die vertikale Bildhöhe abermals um  $N$  zu

$$K = M - N = Y - 2N. \quad (8.3)$$

In Abbildung 8.7 sind korrigierte  $B_{X,K,n}^{korr}$  abgebildet. Diese wurden aus den unkorrigierten  $B_{X,M,n}$  in Abbildung 8.5 berechnet. Ein Video mit weiteren  $B_{X,K,n}^{korr}$  befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_6.avi*.

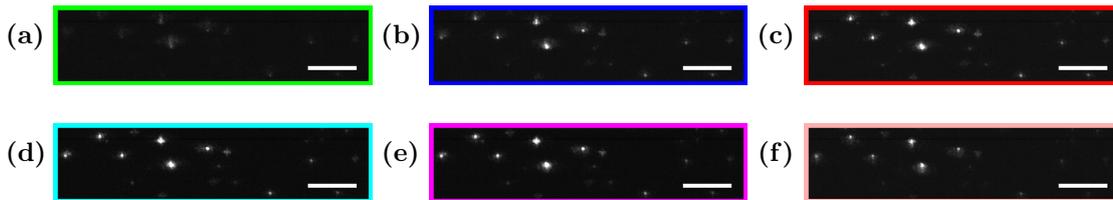
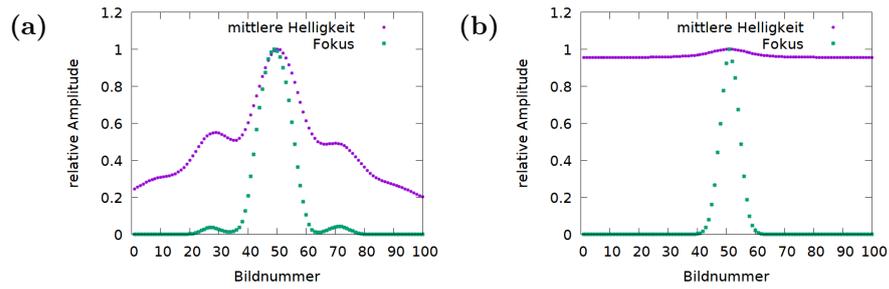


Abbildung 8.7.: Aus virtuellen Detektoren  $D_n$  rekonstruierte Bilder  $B_{X,K,n}^{korr}$  fluoreszierender Nanopartikel nach Korrektur der vertikalen Verschiebung. (a):  $n = 40$ . (b):  $n = 45$ . (c):  $n = 48$ . (d):  $n = 50$ . (e):  $n = 53$ . (f):  $n = 57$ . Skala  $10 \mu\text{m}$ .

### Bestimmung der Desynchronisierung $\Delta_{\text{Detektor}}$

Aus dem Bildstapel der korrigierten  $B_{X,K,n}^{korr}$  kann nun die Desynchronisierung  $\Delta_{\text{Detektor}}$  bestimmt werden. Dies wird in Abbildung 8.8b verdeutlicht, wo die mittlere Helligkeit und die Fokusqualität der  $B_{X,K,n}^{korr}$  als Funktion der Bildnummer dargestellt sind. Der Fokuswert wurde nach Gleichung (7.3) berechnet.



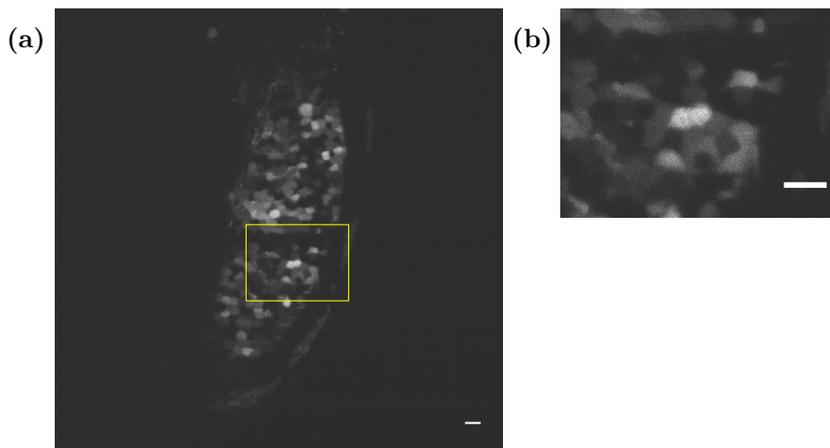
**Abbildung 8.8.:** Helligkeit und Fokus in den Bildern  $B_{X,K,n}^{korr}$  der virtuellen Detektoren  $D_n$  von fluoreszierenden Nanopartikeln. **(a):** 1P-Streuung. **(b):** 2P-Fluoreszenz.

Neben der 2P-Fluoreszenz der Nanopartikel wurde auch die 1P-Streuung eines Besselstrahls an besagten Partikeln mit den virtuellen Detektoren aufgenommen. In Abbildung 8.8a sind die Helligkeit und der Fokuswert der korrigierten  $B_{X,K,n}^{korr}$  als Funktion der Bildnummer bei Aufnahme der 1P-Streuung dargestellt. Sowohl die Helligkeit, wie auch der Fokus sind proportional zur radialen Intensitätsverteilung des Besselstrahls und unabhängig von der Intensitätsverteilung der Probe. Beim Vergleich von Abbildung 8.8a mit Abbildung 8.8b wird deutlich, wie die Nebenmaxima des Besselstrahls bei 2P-Anregung unterdrückt werden.

### 8.3. Anwendung des Y-Fokus in biologischen Proben

Fluoreszierende Nanopartikel können in erster Näherung als leuchtende Punkte betrachtet werden und stellen somit ein relativ simples Modell zur Quantifizierung einer optischen Methode dar. Dadurch können auch die Helligkeit und der relative Bildfokus in den Bildern  $B_{X,M,n}$  der virtuellen Detektoren relativ leicht bestimmt werden. Im laufenden Betrieb des Mikroskops stehen die Nanopartikel jedoch in der Regel nicht zur Verfügung, wodurch das Fluoreszenzlicht der Probe zur Synchronisierung des Schlitzdetektors verwendet werden muss. Im Gegensatz zu den Nanopartikeln haben diese Proben eine komplexe Struktur und Helligkeitsverteilung.

In diesem Abschnitt soll anhand von Aufnahmen einer drei Tage alten Zebrafischlarve demonstriert werden, dass die automatische Detektorsynchronisierung auch in einer Probe mit komplexer Struktur funktioniert. Hierfür wurde zunächst eine Übersichtsaufnahme von Neuronen im Gehirn der Larve aufgenommen, aus der automatisch eine Region für die weitere Analyse ausgewählt wurde. Dies ist in Abbildung 8.9 zu sehen.



**Abbildung 8.9.:** Übersichtsaufnahme im Gehirn einer Zebrafischlarve. **(a):** Aufnahme der Hirnregion. **(b):** Vergrößerung des Ausschnittes in **a**. Besselbeleuchtung. Konfokale Detektion. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

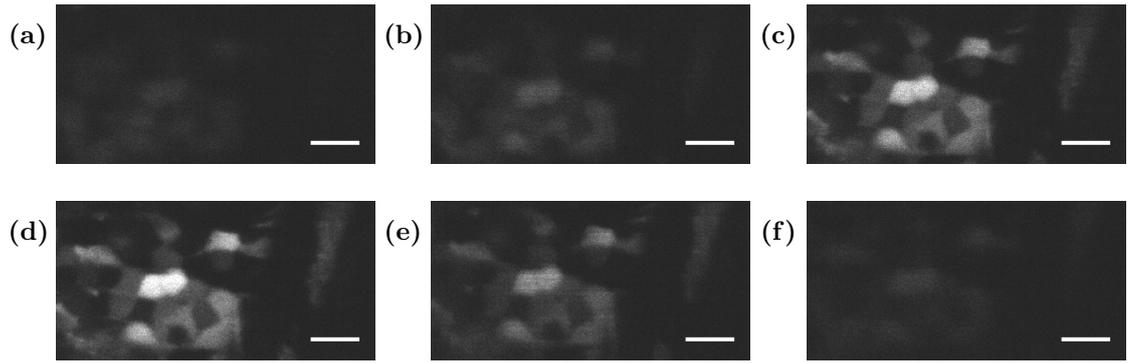
Die Aufnahmen erfolgten mit 2P-Anregung durch einen Besselstrahl bei der Anregungswellenlänge  $\lambda = 930$  nm. In Abbildung 8.10 sind exemplarisch drei Aufnahmen  $A_{X,Y,m}$  dargestellt, die den Laserstrahl an verschiedenen Positionen in der untersuchten Region abbilden.



**Abbildung 8.10.:** Aufnahmen  $A_{X,Y,m}$  im Gehirn einer Zebrafischlarve an unterschiedlichen Laserpositionen. **(a):**  $m = 19$ . **(b):**  $m = 102$ . **(c):**  $m = 159$ . Die Lage des Detektors  $D$  ist gelb umrandet. Skala 10  $\mu\text{m}$ .

Man kann aus diesen Aufnahmen die jeweils aktuelle Position des Lasers erahnen, jedoch sind die aufgenommenen Bilder, mathematisch betrachtet, das Ergebnis einer Multiplikation der Anregungsintensität des Lasers und der Fluorophorverteilung der Probe. Ohne Kenntnis der Beschaffenheit der Probe wird es somit schwer, die Laserposition exakt zu bestimmen.

In Abbildung 8.11 sind exemplarisch sechs aus den virtuellen Detektoren erzeugte Bilder  $B_{X,M,n}$  dargestellt. Ein Video mit weiteren  $B_{X,M,n}$  befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_7.avi*.



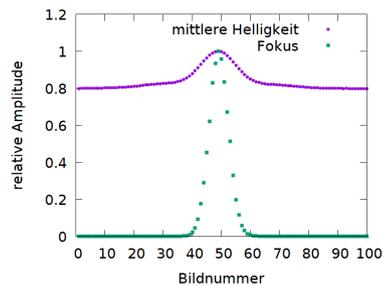
**Abbildung 8.11.:** Rekonstruierte Bilder  $B_{X,M,n}$  der virtuellen Detektoren in einer Zebrafischlarve. (a):  $n = 34$ . (b):  $n = 38$ . (c):  $n = 45$ . (d):  $n = 49$ . (e):  $n = 56$ . (f):  $n = 63$ . Skala  $10 \mu\text{m}$ .

Es ist deutlich zu erkennen, wie sich die Bilder in Helligkeit und Fokusqualität unterscheiden. Da die unkorrigierten  $B_{X,M,n}$  vertikal zueinander verschoben sind, wird dies im nächsten Schritt korrigiert, damit immer derselbe Probenausschnitt betrachtet wird. In Abbildung 8.12 sind die korrigierten  $B_{X,K,n}^{korr}$  dargestellt. Ein Video mit weiteren  $B_{X,K,n}^{korr}$  befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_8.avi*.



**Abbildung 8.12.:** Rekonstruierte Bilder  $B_{X,K,n}^{korr}$  der virtuellen Detektoren in einer Zebrafischlarve nach Korrektur der vertikalen Verschiebung. (a):  $n = 34$ . (b):  $n = 38$ . (c):  $n = 45$ . (d):  $n = 49$ . (e):  $n = 56$ . (f):  $n = 63$ . Skala  $10 \mu\text{m}$ .

Die relative Helligkeit und Fokusqualität der korrigierten  $B_{X,K,n}^{korr}$  sind in Abbildung 8.13 als Funktion der Bildnummer dargestellt.



**Abbildung 8.13.:** Helligkeit und Fokuswert der Bilder  $B_{X,K,n}^{korr}$  in einer Zebrafischlarve. 2P-Anregung.

## 8.4. Vergleich der Messungen

Vergleicht man Abbildung 8.13 mit Abbildung 8.8b so fällt auf, dass sich die Kurven der biologischen Probe in ihrer Form nicht wesentlich von der Untersuchung der Nanopartikel unterscheiden. Aufgrund der veränderten Gesamthelligkeit in den untersuchten Bereichen, unterscheiden sich jedoch die Kurven der Helligkeiten in ihren Amplituden. Hieraus folgt, dass die vorgestellte Methode zur automatischen Synchronisierung des Schlitzdetektors nicht von der betrachteten Probe abhängig ist, sofern diese ausreichend hell ist und sie im Aufnahmezeitraum des Bildstapels der  $A_{X,Y,m}$  als statisch angesehen werden kann.



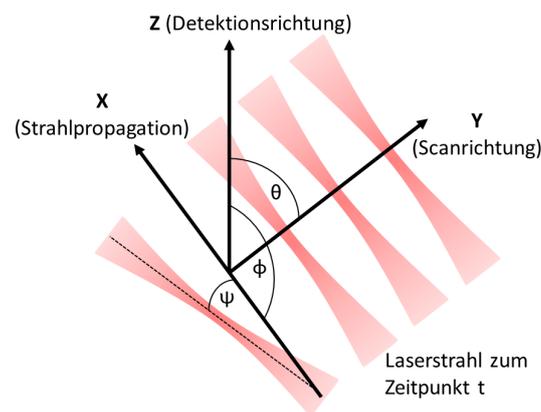
## 9. Langzeitmessungen: Strahlverkipfung in einer beliebigen Probe

Die generierte Lichtscheibe ist im Idealfall orthogonal zur Detektionsrichtung Z. Da die exakte Lage des Laserstrahls einer thermischen Drift unterliegt, kann die Orthogonalität nicht über längere Zeiträume garantiert werden. Verändert sich der Austrittswinkel des Lasers aus der Lichtquelle, so ändert sich auch die Lage der Lichtscheibe. Dies wird in Abbildung 9.1 demonstriert.

Eine Verkipfung des Laserstrahls kann zu einer Verkipfung der Lichtscheibe um  $\Psi$  in der X-Y-Ebene und um  $\Phi$  in der X-Z-Ebene führen. Die Lichtscheibe kann auch durch eine Änderung der Scanachse um  $\Theta$  in der Y-Z-Ebene verkippt werden.  $\Theta$  ist dabei unabhängig von der Verkipfung des Laserstrahls, da dieser rotationssymmetrisch ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Methode entwickelt, mit der die Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$  während einer Langzeitmessung automatisch gemessen und korrigiert werden können. Hierfür werden die Winkel aus den Bildstapeln der beiden Autofokussysteme (siehe Kapitel 7 und Kapitel 8) rekonstruiert. Nach der Messung der Strahlverkipfungswinkel, können diese mit den motorisierten Spiegeln L und R korrigiert werden.

In Abschnitt 9.1 wird die entwickelte Methode zur Winkelmessung vorgestellt. Danach wird in Abschnitt 9.2 die Genauigkeit der Winkelmessung untersucht und in Abschnitt 9.3 wird die Kalibrierung der motorisierten Scanspiegel zur automatischen Winkelkorrektur beschrieben.



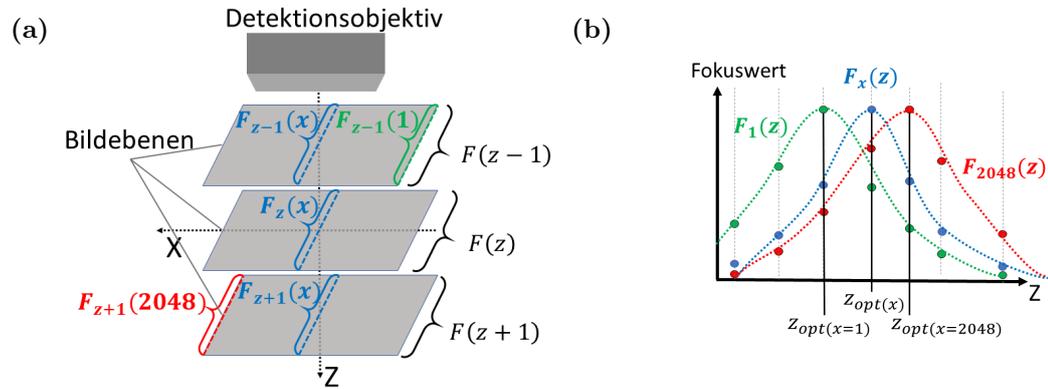
**Abbildung 9.1.:** Mögliche Verkipfungen der Lichtscheibe.

## 9.1. Messung der Kippwinkel $\Phi$ und $\Psi$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neuartige Methode entwickelt, mit der die Kippwinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  aus dem Z- bzw. Y-Fokus rekonstruiert werden können. Die Methode wird hier anhand der Bestimmung von  $\Phi$  aus dem Z-Fokus erläutert. Die Bestimmung von  $\Psi$  aus dem Y-Fokus folgt analog.

Bei einer klassischen Autofokussierung wird für jede betrachtete Z-Position ein Fokuswert  $F(z)$  in Form eines Skalars für das gesamte Bild bestimmt. Durch Auftragen der Fokuswerte  $F(z)$  gegen die Positionen  $z$  lässt sich die beste Fokusposition bestimmen. Dabei erhält man jedoch keine Information über den Strahlwinkel  $\Phi$ .

Die Berechnung des Fokuswertes jeder Z-Bildebene wurde nun dahingehend modifiziert, dass die Information über den Strahlwinkel erhalten bleibt. Die Idee dahinter wird in Abbildung 9.2 skizziert.



**Abbildung 9.2.:** Berechnung der Strahlverkipfung aus der Autofokussierung. **(a):** Drei Bildebenen mit  $2048 \times 2048$  Pixeln. **(b):** Bestimmung der besten Fokuspositionen  $z_{opt}(x)$  aus  $F_x(z)$ . Für jedes  $F_x(z)$  ist eine Gaußanpassung eingezeichnet.

In jeder Z-Bildebene wird für jede X-Position ein separater Fokuswert  $F_z(x)$  bestimmt (siehe Abbildung 9.2a). Hierbei wird ausgenutzt, dass viele Fokusmetriken das Bild zeilen- bzw. spaltenweise analysieren und anschließend die Ergebnisse für das Gesamtbild aufsummiert werden. Für die weitergehende Betrachtung wird ohne Beschränkung der Allgemeinheit angenommen, dass die Analyse in X-Richtung erfolgt.

Für den Fokuswert eines Bildes an der Position  $z$  gilt dann:

$$F(z) = \sum_x F_z(x). \quad (9.1)$$

Zu der beschriebenen Art von Fokusmetriken zählen auch die drei im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Metriken. Um die Information über den Winkel  $\Phi$  zu erhalten genügt es daher, die Fokuswerte  $F_z(x)$  vor der Aufsummierung in einer zweidimensionalen Datenreihe  $F(x, z)$  zu speichern.

Für jede X-Position werden anschließend aus  $F(x, z)$  die Fokuswerte  $F_x(z)$  gegen die Z-Position aufgetragen und somit die für den jeweiligen X-Wert beste Fokusposition  $z_{opt}(x)$  bestimmt (siehe Abbildung 9.2b). In dieser Arbeit wird hierfür eine Gaußanpassung (gestrichelte Linien in Abbildung 9.2b) an die  $F_x(z)$  verwendet. Die Strahlverkipfung lässt sich anschließend durch eine lineare Anpassung an  $z_{opt}(x)$  bestimmen. Der Kippwinkel  $\Phi$  entspricht dabei der Steigung der Anpassungsgeraden.

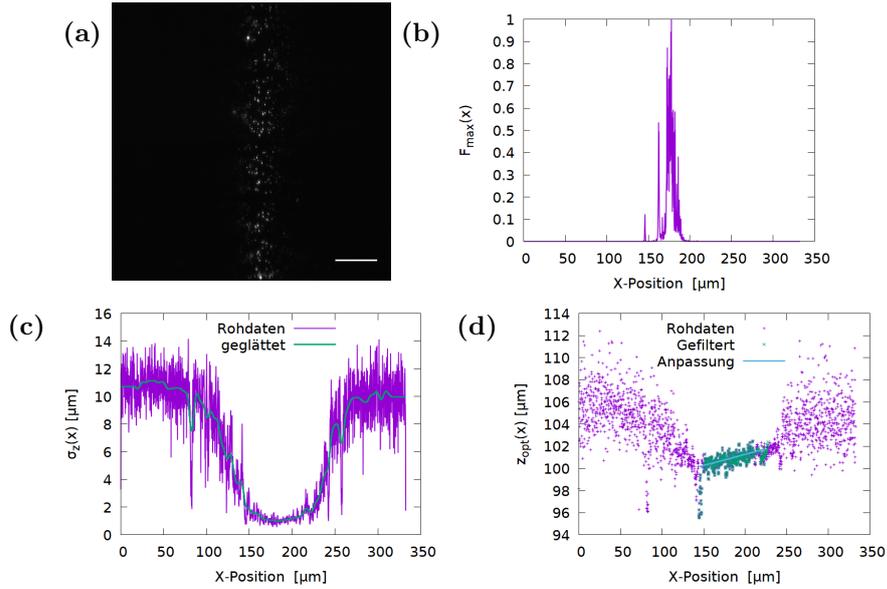
Die Messung von  $\Psi$  folgt analog, indem für jedes Bild  $B_{X,K,n}^{korr}$  (siehe Kapitel 8) an jeder X-Position der Fokuswert  $F_y(x)$  bestimmt und in der Reihe  $F(x, y)$  gespeichert wird. Anschließend wird für jede X-Position aus den Fokuswerten  $F_x(y)$  die beste Fokusposition  $y_{opt}(x)$  errechnet. Aus einer linearen Anpassung an  $y_{opt}(x)$  folgt der Winkel  $\Psi$ .

Im Folgenden wird die Rekonstruktionsgenauigkeit der Strahlverkipfung anhand der Autofokussierung untersucht. Die verwendete Fokusmetrik ist die kombinierte FFT mit Hochpass.

### 9.1.1. Filterung der Daten

Da die aufgenommenen Bilder in der Regel eine inhomogene Helligkeitsverteilung besitzen und große Bildabschnitte häufig kein Fluoreszenzsignal aufweisen, können nicht alle Bildspalten bzw. -Reihen für die Winkelrekonstruktion verwendet werden. Daher müssen diese zunächst identifiziert und aus den Daten herausgefiltert werden. In Abbildung 9.3a ist eine konfokale Aufnahme fluoreszierender Nanopartikel zu sehen, welche mit Gaußbeleuchtung erstellt wurde. Diese Nanopartikel wurden zur Fokussierung in Z-Richtung verwendet. Wie man in der Abbildung erkennt, konzentriert sich die gesamte Fluoreszenz auf einen schmalen vertikalen Streifen in der Bildmitte.

Bei der Fokussierung wurde die Verkipfung um  $\Phi$  nach der in Abschnitt 9.1 beschriebenen Methode gemessen. Für die aufgenommenen Bilder wurde der Fokuswert spaltenweise berechnet (in Y-Richtung) und in einer Datenreihe gespeichert. Somit erhält jedes Bild je einen Fokuswert für jede X-Position. Nun wird für jede X-Position des Bildstapels eine Gaußanpassung an die Fokuswerte in Z-Richtung vorgenommen und das jeweilige Optimum  $z_{opt}(x)$  gegen die X-Position aufgetragen (siehe Abbildung 9.3d). Für die X-Positionen, innerhalb des fluoreszierenden Streifens aus Abbildung 9.3a, ist mit bloßem Auge ein linearer Zusammenhang zwischen  $z_{opt}(x)$  und der X-Position erkennbar. Außerhalb dieses Streifens ist jedoch kein Zusammenhang erkennbar.



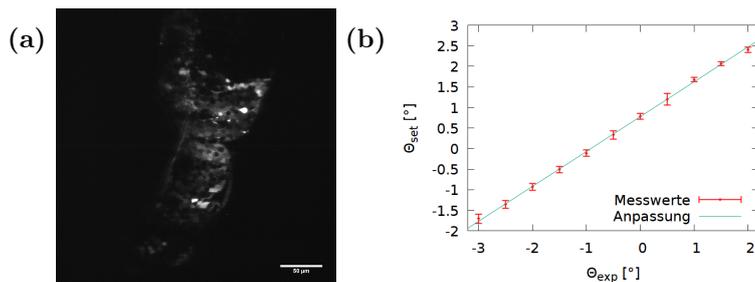
**Abbildung 9.3.:** Datenfilterung zur Messung der Strahlverkipfungen. **(a):** Fluoreszierende Nanopartikel. **(b):** Intensitätsmaximum  $F_{max}(x)$ . **(c):** Standardabweichung  $\sigma_z(x)$ . **(d):** Beste Fokusposition  $z_{opt}(x)$ . Gaußbeleuchtung. Skala 50  $\mu\text{m}$ .

Um diese Werte zu entfernen, werden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wird das Intensitätsmaximum der Fokuswerte  $F_{max}(x)$  als Funktion der X-Position betrachtet (siehe Abbildung 9.3b). Aus  $z_{opt}(x)$  werden anschließend alle Werte entfernt, für deren X-Position gilt  $F_{max}(x) \leq 10^{-4}$ . Zusätzlich wird die Standardabweichung  $\sigma_z(x)$  der Fokuswerte betrachtet (siehe Abbildung 9.3c). Es werden alle Werte aus  $z_{opt}(x)$  entfernt, für welche  $\sigma_z(x) > \frac{Max(\sigma_z(x)) - Min(\sigma_z(x))}{2}$  gilt. Um den Einfluss durch Rauschen zu minimieren, wird  $\sigma_z(x)$  zuvor durch einen Gaußfilter geglättet.

## 9.2. Quantifizierung der Winkelrekonstruktionsgenauigkeit

Um die Genauigkeit der Winkelrekonstruktion in biologischen Proben zu quantifizieren, wurde die Strahlverkipfung  $\Theta_{exp}$  im Gehirn einer drei Tage alten Zebrafischlarve bestimmt. Hierfür wurde die Lichtscheibe mithilfe der Zwei-Achsen-Scanspiegel um verschiedene Winkel  $\Theta_{set}$  verkippt. Abbildung 9.4a zeigt eine Aufnahme der untersuchten Region und in Abbildung 9.4b ist  $\Theta_{exp}$  als Funktion von  $\Theta_{set}$  dargestellt. Die Anregung erfolgte bei 930 nm mit Besselbeleuchtung und konfokaler Detektion.

Es ist ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Größen zu erkennen.



**Abbildung 9.4.:** Quantifizierung der Rekonstruktionsgenauigkeit von  $\Theta$ . **(a):** Region im Gehirn einer drei Tage alten Zebrafischlarve. **(b):** Gemessener Winkel  $\Theta_{exp}$  als Funktion des eingestellten Winkels  $\Theta_{set}$ . Besselbeleuchtung.

Die Fehler der Messpunkte entsprechen der jeweiligen Standardabweichung von 10 Einzelmessungen. Diese betrug im Mittel 0,084 Grad.

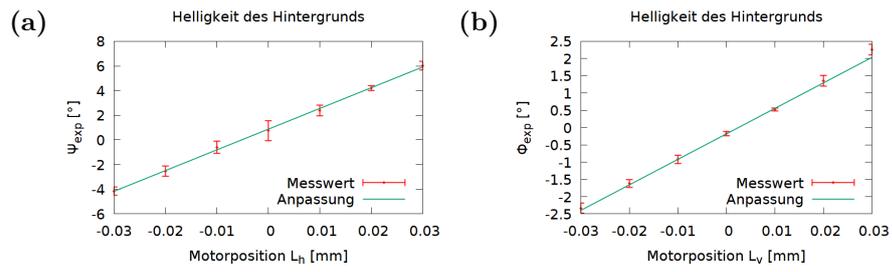
Aus einer linearen Anpassung folgt die Steigung  $\frac{\Theta_{exp}}{\Theta_{set}}$ , welche im Idealfall 1 beträgt. Es fand sich

$$\frac{\Theta_{exp}}{\Theta_{set}} = (0,847 \pm 0,008). \quad (9.2)$$

Dies bedeutet, dass die angewandte Methode die tatsächliche Verkippung leicht unterschätzt und diese etwa 18% über der gemessenen Verkippung liegt. Dennoch hat sie sich als wirkungsvolles Mittel zur Bestimmung der Strahlverkippung erwiesen.

### 9.3. Korrektur der Strahlverkippung mit den motorisierten Spiegeln

Zur Korrektur der Verkippung des Strahls um  $\Phi$  und  $\Psi$  (siehe Abbildung 9.1), können die motorisierten Spiegel L und R (siehe Abbildung 2.2) verwendet werden. Um sie zu kalibrieren, wurden fluoreszierende Nanopartikel mit Besselstrahlen beleuchtet. In Abbildung 9.5 sind die gemessenen Winkel  $\Phi_{exp}$  und  $\Psi_{exp}$  für verschiedene Motorpositionen des Spiegels L dargestellt. Hier bezeichnen  $L_h$  und  $L_v$  die Positionen des Motors für horizontale, bzw. vertikale Spiegelverkippungen. Es wurde jeweils über 10 Messungen gemittelt. Der Winkel  $\Phi$  wurde über die Z-Fokussierung bestimmt, während  $\Psi$  über die Y-Fokussierung (siehe Kapitel 8) bestimmt wurde.



**Abbildung 9.5.:** Messung der Strahlverkipfungen  $\Psi_{exp}$  (a) und  $\Phi_{exp}$  (b) als Funktion der Spiegelmotorposition.

Die Steigungen  $\frac{\Phi_{exp}}{L_v}$  und  $\frac{\Psi_{exp}}{L_h}$  der jeweiligen linearen Anpassung entspricht der Winkeländerung je Motorbewegung. Es fanden sich

$$\frac{\Psi_{exp}}{L_h} = (168 \pm 2) \frac{\text{Grad}}{\text{mm}} \quad (9.3)$$

und

$$\frac{\Phi_{exp}}{L_v} = (74 \pm 2) \frac{\text{Grad}}{\text{mm}}. \quad (9.4)$$

## 10. Langzeitmessungen: Probenbewegung

Um die Entwicklung einzelner Zellen in einem Organismus über einen Zeitraum von mehreren Stunden zu verfolgen ist es notwendig, diese Zellen während der gesamten Messung im Sichtfeld des Mikroskops zu halten. Dazu sind die zu untersuchenden Fische in Agarose eingebettet, welche einerseits fest genug sein muss um die Fische am Schwimmen zu hindern. Gleichzeitig muss sie flexibel sein, um ein ungestörtes Wachstum zu gewährleisten. Da es jedoch schwierig ist, diese beiden Anforderungen gleichzeitig zu erfüllen, wird eine kleine Bewegungsfreiheit in Kauf genommen, um die Entwicklung des Fisches nicht negativ zu beeinflussen. Darüber hinaus kann es aufgrund des Wachstums passieren, dass die untersuchten Zellen ihre Lage im Organismus ändern. Infolge dieser Bewegungen ist es möglich, dass die untersuchten Zellen während der Messung aus dem Sichtfeld heraus wandern.

Um dies zu verhindern, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein System zur automatischen Korrektur der Probenbewegung entwickelt.

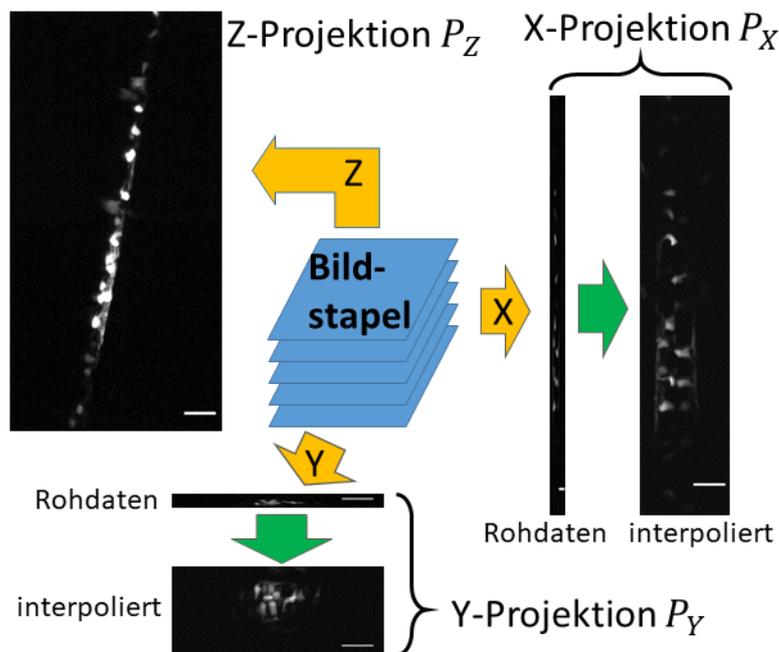
In Abschnitt 10.1 wird zunächst das Verfahren zur Messung der Probenbewegung beschrieben. Danach wird in Abschnitt 10.2 erläutert, wie die Probenbewegung automatisch während einer Langzeitaufnahme korrigiert werden kann.

### 10.1. Messung der Probenbewegung

Um die Probenbewegung entlang der Raumrichtungen X, Y, und Z zu messen, werden die aufgenommenen Bildstapel zunächst auf zweidimensionale Maximumintensitätsprojektionen reduziert. Dies wird in Abschnitt 10.1.1 erläutert. Danach wird in Abschnitt 10.1.2 der verwendete Algorithmus zur Messung der Bildverschiebung der Projektionen zwischen den Aufnahmezeitpunkten vorgestellt. Die Bildverschiebungen entsprechen den Probenbewegungen. Schließlich wird in Abschnitt 10.1.3 die Bewegung eines Fisches unter Realbedingungen bei einer Langzeitaufnahme gemessen. Dabei zeigte sich, dass die Messgenauigkeit durch Vorbehandlung der Projektionen mit einem Gaußfilter und einem Schwellwert verbessert werden konnte.

### 10.1.1. Reduzierung der Bildstapel auf Maximumintensitätsprojektionen

Um die Bewegung der Probe zwischen zwei Zeitpunkten zu messen, werden dazu zunächst aus den Bildstapeln mittels eines eigens dafür geschriebenen Programms Maximumintensitätsprojektionen  $P_{X,Y,Z}$  für alle drei Raumrichtungen erstellt. Dadurch reduziert sich das Problem einer dreidimensionalen Translationen auf drei zweidimensionale Translationen. Da der Abstand zwischen zwei Z-Ebenen in der Regel größer ist als die effektive Pixelgröße, können die Projektionen interpoliert werden, um eine isotrope Auflösung zu erreichen. Dazu wird zunächst die schnelle Fouriertransformation (FFT) des Bildes berechnet und das transformierte Bild in eine leere Matrix der gewünschten Größe eingebettet. Durch Anwenden der inversen Fouriertransformation ( $\text{FFT}^{-1}$ ) erhält man das interpolierte Bild [23] (siehe Abbildung 10.1).



**Abbildung 10.1.:** Generierung von Maximumintensitätsprojektionen aus einem Bildstapel (gelbe Pfeile). Projektionen können interpoliert werden um eine isotrope Auflösung zu erreichen (grüne Pfeile). Skala 25  $\mu\text{m}$ .

Die drei gewonnenen Projektionen  $P_{X,Y,Z}$  können nun mit den Projektionen aus dem vorherigen Zeitpunkt verglichen werden. Jede Projektion entlang einer Raumrichtung liefert die Verschiebungen entlang der beiden anderen Richtungen. Aus den drei Projektionen erhält man somit für jede Translation zwei Werte, welche gemittelt werden.

### 10.1.2. Registrierungsalgorithmus zur Berechnung der Verschiebung zwischen zwei Bildern

Um die Verschiebung zwischen zwei Bildern zu bestimmen, kann die Kreuzkorrelation der Bilder berechnet werden. Diese ist ein Maß für die Korrelation der Bilder in Abhängigkeit der relativen zweidimensionalen Verschiebung. Die Position, an welcher die Korrelation ein Maximum erreicht, entspricht der Verschiebung zwischen den beiden Bildern. Da die Kreuzkorrelation für jeden Bildpunkt berechnet werden muss, ist dieser Vorgang für große Bilder sehr rechenintensiv und der Aufwand steigt quadratisch mit der Anzahl an Bildpunkten [7].

Eine verbreitete Methode zur Berechnung der Kreuzkorrelation zwischen zwei Bildern nutzt die Transformation in den Frequenzraum mittels der schnellen Fouriertransformation. Für zwei Bilder  $f(x, y)$  und  $g(x, y)$  mit den Fouriertransformierten  $(\mathcal{F}f)(x, y)$  und  $(\mathcal{F}g)(x, y)$  folgt die Verschiebung

$$T(x, y) = \text{Max} (\mathcal{F}^{-1} ((\mathcal{F}f)^*(x, y)(\mathcal{F}g)(x, y))). \quad (10.1)$$

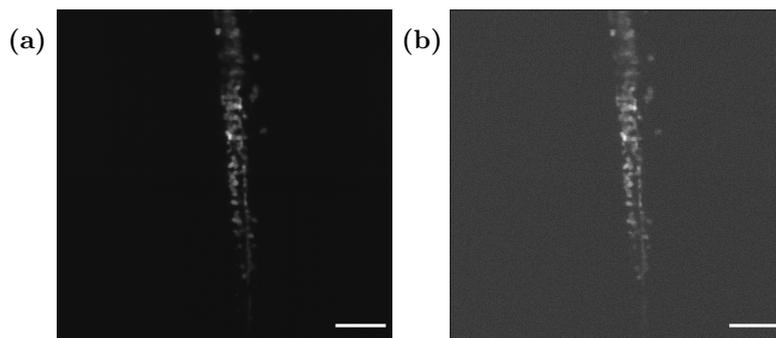
Um hierbei Subpixelauflösung zu erreichen, können die Bilder  $f(x, y)$  und  $g(x, y)$  zunächst um einen Faktor  $\kappa_{ini}$  hoch skaliert werden, was jedoch zu einem drastischen Anstieg an Rechenzeit und Speicherbedarf führt.

Fienup *et al.* haben einen deutlich effizienteren Algorithmus vorgeschlagen, mit welchem ebenfalls Subpixelauflösung erzielt wird [23]. Hierfür wird in einem ersten Schritt die Verschiebung näherungsweise nach Gleichung (10.1) berechnet. Anschließend wird die diskrete Fouriertransformation (DFT) nur in der näheren Umgebung der geschätzten Verschiebung um  $\kappa_{sub}$  hoch skaliert und das Maximum bestimmt.

Die Vorlage für das in dieser Arbeit implementierte Programm, wurde von Manuel Guizar Sicaïros in der Programmiersprache Python geschrieben [23]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es in LabVIEW umgesetzt und dabei leicht modifiziert. Im Programm von Sicaïros wird das Bild im ersten Schritt um den Faktor  $\kappa_{ini} = 2$  hoch skaliert, um die Präzision der genäherten Verschiebung zu erhöhen. Auf diesen Schritt wurde bei der Implementierung bewusst verzichtet, da die mit der verwendeten Kamera aufgenommenen Bilder mit 2048 x 2048 Pixeln sehr groß sind. Eine Hochskalierung des ganzen Bildes erhöht die Rechenzeit und kann in dem verwendeten 32-Bit-System zu Speicherplatzproblemen führen.

### Vergleich der Registrierungsalgorithmen und Auflösungsvermögen

Es wurden drei Algorithmen zur Messung der Bildverschiebung implementiert und miteinander verglichen. Der erste Algorithmus berechnet die Kreuzkorrelation der beiden Bilder und sucht danach das Maximum der Korrelationsmatrix. Zur Berechnung der Kreuzkorrelation stand ein vorgefertigtes Programm in LabVIEW zur Verfügung. Die anderen beiden Algorithmen nutzen den Algorithmus von Fienup *et al.*, welcher einmal mit und einmal ohne zweifacher Vorkalibrierung implementiert ist.

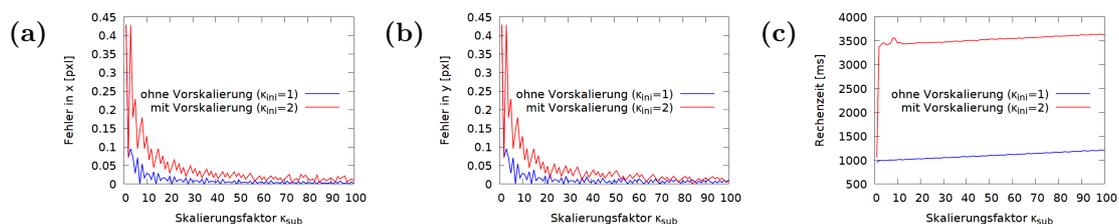


**Abbildung 10.2.:** Synthetische Bildverschiebung. (a): Das Originalbild. (b): Das Bild nach Verschiebung um  $7,428571$  Pixel und Addition von Rauschen. Skala  $50\ \mu\text{m}$ .

Zur Überprüfung des Auflösungsvermögens wurde ein  $2048 \times 2048$  Bild  $f(x, y)$  (Abbildung 10.2a) um den Faktor  $\kappa_{ini} = 1,75$  auf  $3584 \times 3584$  Pixel hoch skaliert und um jeweils 13 Pixel entlang  $x$  und  $y$  verschoben. Anschließend wurde es wieder auf die Ausgangsgröße zurück skaliert, womit sich eine effektive Verschiebung von  $d_{eff} = \frac{13}{1,75} = 7,428571$  Pixeln ergibt. Das so entstandene Bild  $g(x, y)$  wurde zusätzlich mit weißem Rauschen überlagert, dessen Intensität von Null bis zum 0,3-fachen des Maximalwertes von  $f(x, y)$  reicht (siehe Abbildung 10.2b).

Nun wurde die Verschiebung  $d$  mit den einzelnen Algorithmen gemessen und daraus der Fehler der Messung  $\Delta d = |d - d_{eff}|$  berechnet. Für eine Registrierung mit einfacher Pixelgenauigkeit benötigt der Algorithmus nach Fienup *et al.* etwa 700 ms, während der Weg über die Berechnung der Korrelationsmatrix über drei Sekunden dauert. Im letztgenannten Fall betrug die Abweichung jedoch mehr als drei Pixel für beide Bildkoordinaten, welche sich auf einfache Pixelgenauigkeit reduzieren ließ, sofern das verschobene Bild nicht mit Rauschen überlagert wurde.

Mit den Registrierungsalgorithmen nach Fienup *et al.* wurde die Verschiebung  $d$  zudem für verschiedene Skalierungsfaktoren  $\kappa_{sub}$  gemessen. Der Fehler in  $X$ - und  $Y$ -Richtung ist in Abbildung 10.3a und Abbildung 10.3b gegen  $\kappa_{sub}$  aufgetragen.



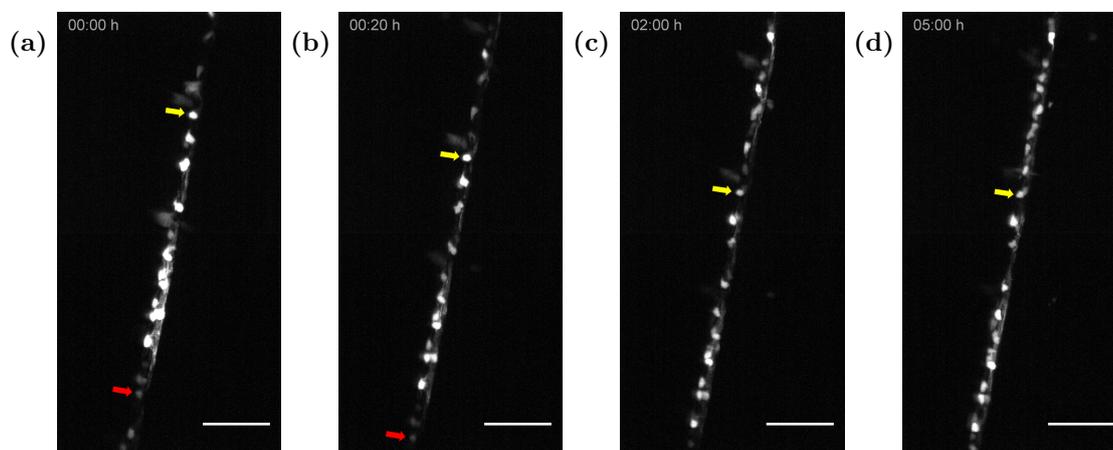
**Abbildung 10.3.:** Evaluierung der Algorithmen zur Messung der Bildverschiebung nach Fienup *et al.* (a): Fehler in  $X$ -Richtung. (b): Fehler in  $Y$ -Richtung. (c): Rechenzeit.

Wie erwartet, nimmt der Fehler mit zunehmendem  $\kappa_{sub}$  ab, wobei der Algorithmus ohne Vorkalierung ( $\kappa_{ini} = 1$ ) fast ausnahmslos genauere Ergebnisse lieferte. Es wurde zudem die benötigte Rechenzeit gemessen, welche in Abbildung 10.3c abgebildet ist. Durch das Vorkalieren auf die doppelte Kantenlänge ( $\kappa_{ini} = 2$ ) erhöht sich die Rechenzeit um über zwei Sekunden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde letztlich der Algorithmus nach Fienup *et al.* ohne Vorkalierung für die Messung der Bildverschiebung verwendet.

### 10.1.3. Messung der Fischbewegung bei einer Langzeitmessung

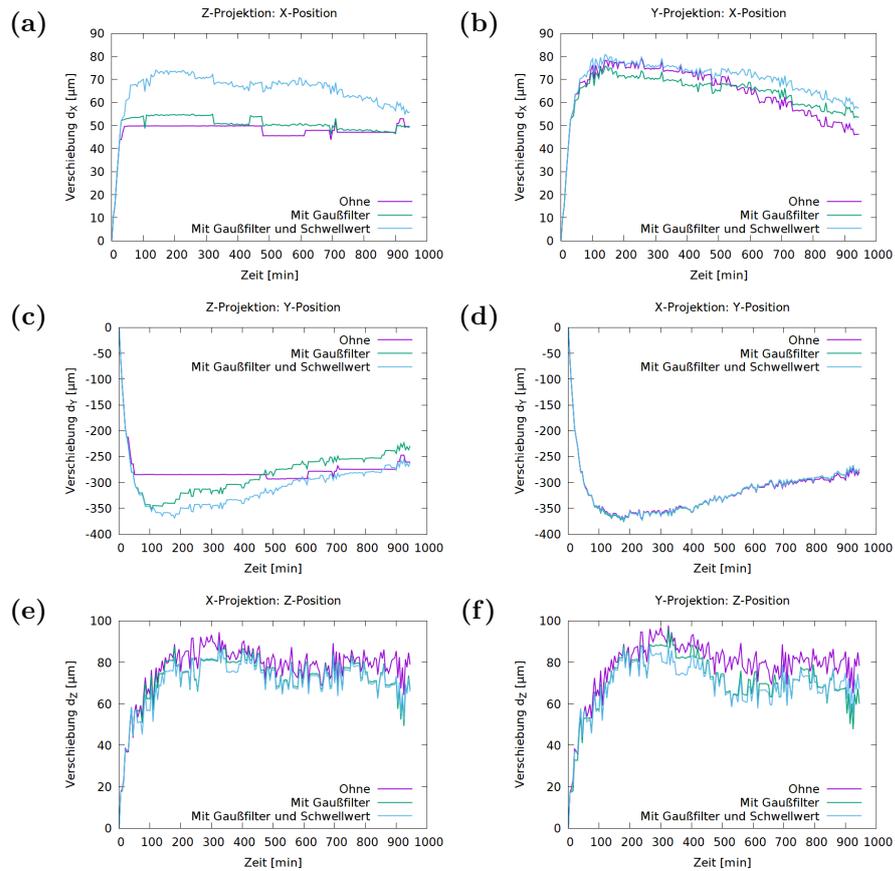
In Abbildung 10.4 sind Ausschnitte aus einer Langzeitmessung im Rückenmark einer Zebrafischlarve abgebildet.



**Abbildung 10.4.:** Langzeitmessung im Rückenmark einer Zebrafischlarve zur Messung der Probenverschiebung. (a): 0:00 h. (b): 0:20 h. (c): 2:00 h. (d): 5:00 h. Skala 50  $\mu\text{m}$ .

Zu sehen sind Maximumintensitätsprojektionen  $P_Z$  von jeweils 70 Bildern in einem Sta-

pel mit Schrittweite  $1\ \mu\text{m}$ . Ein Video der Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_9.avi*. Die Aufnahme erfolgte mit Gaußbeleuchtung. Während der Aufnahme kam es zu einer Verschiebung der Probe. Um dies zu verdeutlichen, wurde eine Zelle mit einem gelben Pfeil markiert. Aufgrund der Verschiebung verlassen einige Zellen das Sichtfeld. Dies wird durch eine mit einem roten Pfeil markierte Zelle verdeutlicht, die nur in Abbildung 10.4a und Abbildung 10.4b sichtbar ist. Durch das Verlassen der Zellen des Sichtfeldes geht Information verloren, welche nicht durch eine Nachbearbeitung der Bilder wiederhergestellt werden kann.



**Abbildung 10.5.:** Gemessene Verschiebungen der Probe bei einer Langzeitmessung. (a):  $d_X$  aus  $P_Z$ . (b):  $d_X$  aus  $P_Y$ . (c):  $d_Y$  aus  $P_Z$ . (d):  $d_Y$  aus  $P_X$ . (e):  $d_Z$  aus  $P_X$ . (f):  $d_Z$  aus  $P_Y$ . Skalierungsfaktor  $\kappa_{sub} = 100$ .

Um die Verschiebung  $d_{X,Y,Z}$  entlang der drei Raumrichtungen  $X$ ,  $Y$ , und  $Z$  zu messen, wurden die entsprechenden Projektionen  $P_{X,Y,Z}$  aus den Bildstapeln generiert. Aus der Projektion entlang einer Richtung erhält man Informationen über die Verschiebung

entlang der anderen beiden Richtungen. In Abbildung 10.5 sind die gemessenen Verschiebungen als Funktion der Zeit dargestellt (violette Kurven).

Zur Berechnung wurde ein Skalierungsfaktor von 100 verwendet. Betrachtet man die aus der Z-Projektion  $P_Z$  gemessenen Verschiebungen (Abbildung 10.5a und Abbildung 10.5d) scheint es Zeiträume zu geben, in welchen sich der Fisch nicht bewegt hat. Dies ist jedoch bei einer lebenden Probe äußerst unwahrscheinlich und widerspricht sowohl den Beobachtungen in Abbildung 10.4 als auch den aus den beiden anderen Projektionen gemessenen Verschiebungen (siehe Abbildung 10.5b und Abbildung 10.5d).

Die Ursache liegt wahrscheinlich in der geringen Menge an Z-Ebenen, auf welche die Projektion angewendet wird. Jeder Bildpunkt der Z-Projektion ist das Maximum aus 70 Pixeln, während dies in X- und Y-Richtung 1024, bzw. 2048 sind. Dadurch ist die Z-Projektion stärker mit Rauschen belastet als die anderen Projektionen.

Aus diesem Grund wurden die Projektionen mit einem Gaußfilter sowie einem Schwellwert, welcher der mittleren Bildhelligkeit entspricht, vorbehandelt. Die gemessenen Verschiebungen mit vorheriger Gaußfilterung sind in grün, und diejenigen mit Gaußfilterung und Schwellwert sind in blau eingezeichnet. Die alleinige Anwendung eines Schwellwerts ohne vorheriger Gaußfilterung hatte keinen Effekt und ist daher nicht abgebildet.

Wird nur eine Gaußfilterung verwendet, verbessert sich die Rekonstruktion der Verschiebung. Dennoch gibt es hier Zeitabschnitte, in denen die gemessene Bewegung nahe Null ist. Wird nach dem Gaußfilter zusätzlich ein Schwellwert angewandt, verbessert sich die Rekonstruktion erheblich und es kommt zu einer guten Übereinstimmung der Verschiebungen zwischen den drei Projektionen.

## 10.2. Automatische Korrektur der Probenbewegung

Um zu verhindern, dass während einer Langzeitaufnahme Teile der Probe das Sichtfeld verlassen, kann die Probenbewegung mit Hilfe des motorisierten Probenhalters korrigiert werden. Dies geschieht vollautomatisch mit einem im Rahmen dieser Arbeit geschriebenen Programm.

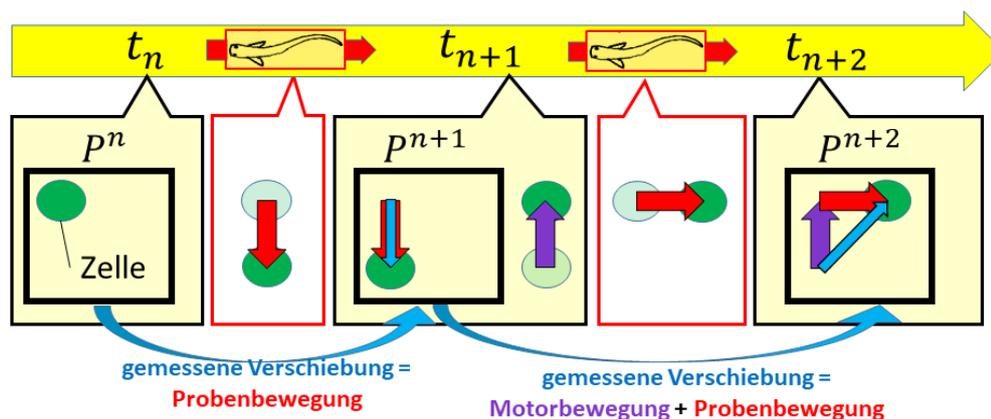
Es hat sich dabei herausgestellt, dass der entsprechende Befehl zur Bewegung nicht immer korrekt von den Motoren empfangen wird. Aus diesem Grund wurde eine Feedback-Schleife geschrieben, welche die Position der Motoren überwacht. Sollte sich diese nicht korrekt verändern, wird der Befehl wiederholt, bis er korrekt ausgeführt wurde.

In dem Programm werden aus jedem Bildstapel zum Zeitpunkt  $t_n$  drei Projektionen  $P_{X,Y,Z}^n$  erstellt und zwischengespeichert. Bei der nächsten Aufnahme zum Zeitpunkt  $t_{n+1}$  werden die neuen Projektionen  $P_{X,Y,Z}^{n+1}$  mit  $P_{X,Y,Z}^n$  verglichen und so die Verschie-

bung automatisch berechnet. Daraufhin wird der Probenhalter entgegen der gemessenen Verschiebung bewegt.

Da die Korrektur der Probenbewegung erst nach der Aufnahme des Bildstapels erfolgt, entsprechen die Projektionen  $P_{X,Y,Z}^{n+1}$  nach der Korrektur nicht mehr der tatsächlichen Position der Probe. Dadurch verfälscht sich die gemessene Verschiebung beim Vergleich von  $P_{X,Y,Z}^{n+2}$  mit  $P_{X,Y,Z}^{n+1}$ .

Im Folgenden wird die Berechnung der realen Probenbewegung aus der gemessenen Verschiebung beispielhaft anhand der Projektion in Z-Richtung  $P = P_Z$  skizziert (siehe Abbildung 10.6).



**Abbildung 10.6.:** Automatische Bewegungskorrektur. **Roter Pfeil:** Probenbewegung. **Lila Pfeil:** Motorbewegung. **Blauer Pfeil:** gemessene Verschiebung.

Zwischen den Aufnahmen der Bildstapel zu den Zeitpunkten  $t_n$  und  $t_{n+1}$  bewegt sich die Probe (roter Pfeil). Zum Zeitpunkt  $t_{n+1}$  wird die Projektion  $P^{n+1}$  mit  $P^n$  verglichen und die Verschiebung berechnet (blauer Pfeil). Anschließend wird die Verschiebung durch eine Motorbewegung korrigiert (lila Pfeil). Bevor eine neue Projektion  $P^{n+2}$  zum Zeitpunkt  $t_{n+2}$  aufgenommen wird, bewegt sich die Probe erneut (roter Pfeil). Beim Vergleich mit  $P^{n+1}$  wird nun eine Verschiebung gemessen, welche der Summe der Probenbewegung und der Motorbewegung entspricht (blauer Pfeil). Durch Subtraktion der vorherigen Motorbewegung (lila Pfeil) erhält man die reale Probenbewegung (roter Pfeil).

Alternativ zum Vergleich mit der vorherigen Projektion könnte auch die Projektion  $P^1$  der ersten Aufnahme als Referenz für alle Zeitpunkte  $t_{n>1}$  verwendet werden. Dadurch muss die Motorbewegung bei der Berechnung nicht berücksichtigt werden.

Die Morphologie der Probe kann sich jedoch im Verlauf der Langzeitmessung verändern, wodurch der Algorithmus bei diesem Ansatz die Verschiebung zur Ursprungsform even-

tuell nicht korrekt bestimmt.

Da im verwendeten Ansatz nur die Verschiebung zum letzten Zeitpunkt betrachtet wird, kann die Formänderung in der Regel vernachlässigt werden.

Ein zweites Problem beim Vergleich mit  $P^1$  kann das Bleichen der Probe darstellen, das durch eine hohe Lichtabsorption verursacht wird. Mit der Zeit sinkt dadurch die Helligkeit der Probe und es ist nicht auszuschließen, dass sich dies negativ auf den Algorithmus auswirkt.



# 11. Langzeitmessungen: Biologische Proben

Mit den in dieser Arbeit entwickelten Optimierungen lassen sich die Vorteile der konfokalen Detektion auch für Langzeitmessungen biologischer Proben *in vivo* nutzen, ohne einen Signalverlust durch die Desynchronisierung zwischen Detektor und Anregungslaser zu riskieren. Zusätzlich wird einem Verlust der Bildschärfe und ungewollten Probenbewegungen entgegengewirkt.

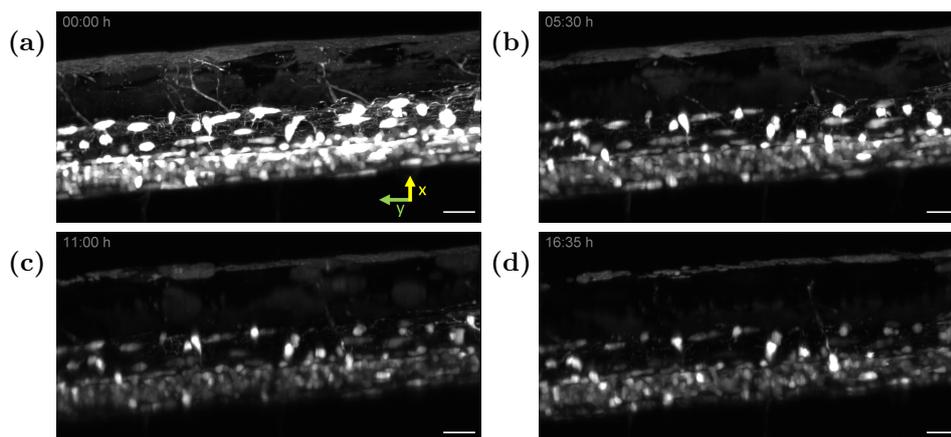
Um dies zu verdeutlichen, wird in Abschnitt 11.1 zunächst die Effektivität der angewandten Korrekturen untersucht. Anschließend wird in Abschnitt 11.2 demonstriert, wie die dorsale Migration von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC) in jungen Zebrafischlarven dank der Korrekturen über einen Zeitraum von über 20 Stunden untersucht werden kann.

## 11.1. Einfluss der Fokus- und Bewegungs-Korrekturen auf Langzeitmessungen

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der bisher beschriebenen Optimierungen auf die Langzeitaufnahme lebender Proben untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Region im Rückenmark einer vier Tage alten Zebrafischlarve *Tg(olig2:GFP)* über einen Zeitraum von mehr als 16 Stunden beobachtet. Alle fünf Minuten erfolgte die Aufnahme eines Z-Stapels, bestehend aus jeweils 100 Ebenen mit einer Schrittweite von 1  $\mu\text{m}$ . Die geringen zeitlichen Abstände der Aufnahmen erlauben die Beobachtung morphologischer Veränderungen mit hoher Präzision. Die Anregung erfolgte mit Besselstrahlen bei einer Wellenlänge von 930 nm.

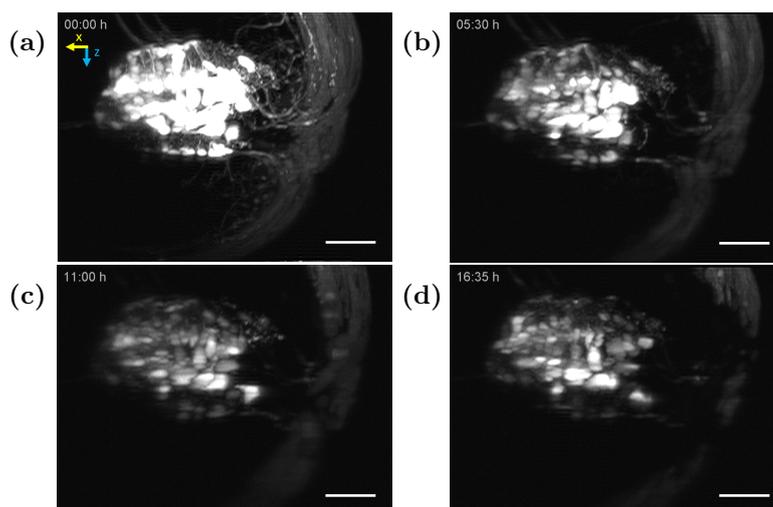
### Korrektur der Probenbewegung

In Abbildung 11.1 sind Maximumintensitätsprojektionen entlang der Z-Richtung für vier exemplarische Zeitpunkte der Messung abgebildet. Ein Video der Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_10.avi*.



**Abbildung 11.1.:** Z-Projektion mit Bewegungskorrektur. **(a):** Start der Messung. **(b):** Nach 5:30 h. **(c):** Nach 11:00 h. **(d):** Ende der Messung nach 16:35 h. Skala 25  $\mu\text{m}$ .

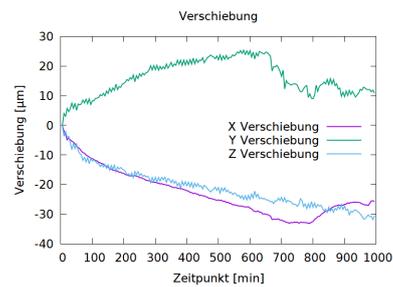
In Abbildung 11.2 sind Maximumintensitätsprojektionen entlang der Y-Richtung für dieselben Zeitpunkte wie in Abbildung 11.1 abgebildet. Ein Video der Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_11.avi*.



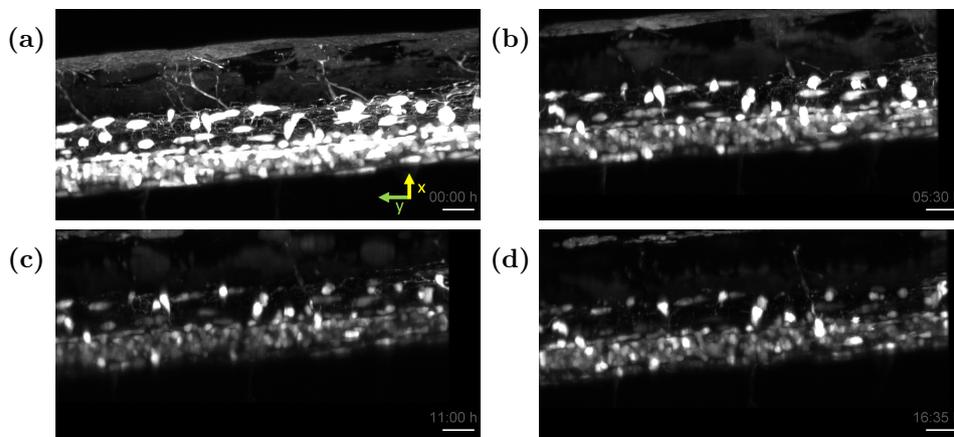
**Abbildung 11.2.:** Y-Projektion mit Bewegungskorrektur. **(a):** Start der Messung. **(b):** Nach 5:30 h. **(c):** Nach 11:00 h. **(d):** Ende der Messung nach 16:35 h. Skala 25  $\mu\text{m}$ .

Anhand der beiden Abbildungen erkennt man, dass die Probenposition während der Messung durch die automatische Bewegungskorrektur konstant gehalten werden konnte. In Abbildung 11.3 ist die gemessene Probenbewegung als Funktion der Zeit dargestellt, welche mit den Motoren der Probenhalterung korrigiert wurde.

Durch die Bewegungskorrektur wurde der untersuchte Abschnitt des Rückenmarks über den gesamten Messzeitraum im Sichtfeld des Detektionsobjektivs gehalten, wie man anhand Abbildung 11.1 erkennen kann. Um zu verdeutlichen, wie sehr sich die Probe ohne die entsprechende Korrektur bewegt hätte, wurde aus den gemessenen Verschiebungen in Abbildung 11.3 die freie Probenbewegung errechnet und die Maximumintensitätsprojektionen um die entsprechenden Werte nachträglich verschoben. Dies ist in Abbildung 11.4 für die Projektionen in Z-Richtung und in Abbildung 11.5 für die Projektionen in Y-Richtung abgebildet.

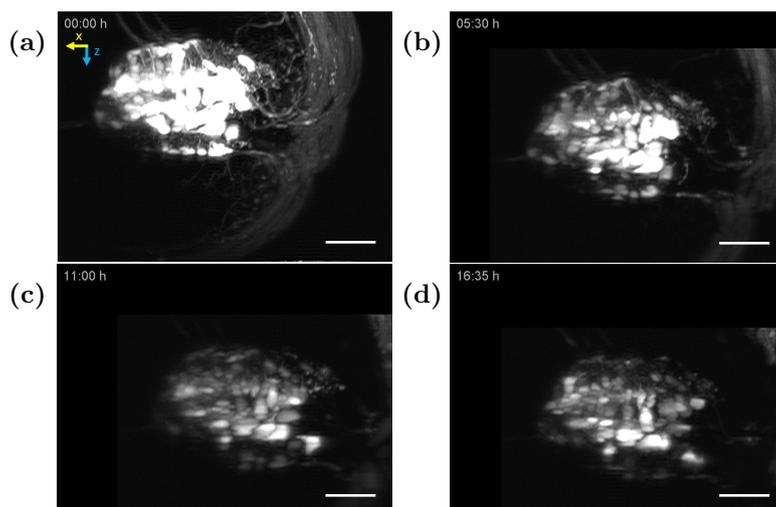


**Abbildung 11.3.:** Korrektur der Probenverschiebung.



**Abbildung 11.4.:** Unkorrigierte Verschiebung der Z-Projektion. **(a):** Start der Messung. **(b):** Nach 5:30 h. **(c):** Nach 11:00 h. **(d):** Ende der Messung nach 16:35 h. Skala 25  $\mu\text{m}$ .

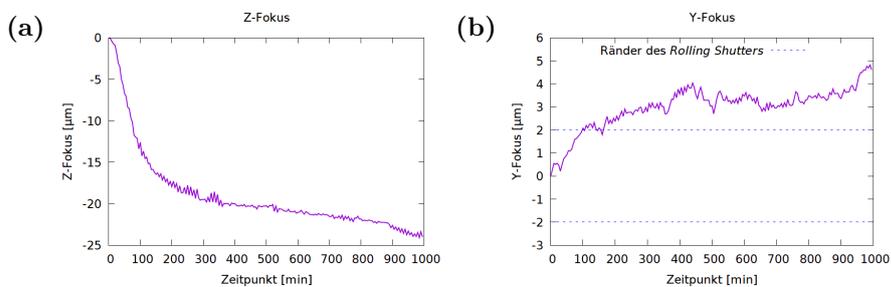
Auf der beiliegenden CD finden sich die passenden Videos als *Ergänzendes\_Video\_12.avi* und *Ergänzendes\_Video\_13.avi*. Durch die Bewegung in Scanrichtung (Y-Richtung) hätten sich einige der Zellen aus dem Sichtfeld herausbewegt. Durch die Bewegung in Beleuchtungsrichtung (X-Richtung), hätte sich die Lage der Strahlteile relativ zu den betrachteten Zellen verändert, wodurch diese mit einer veränderten Anregungsintensität beleuchtet worden wären. Dementsprechend hätte sich die Helligkeitsverteilung des Fluoreszenzlichtes verändert. Je nach wissenschaftlicher Fragestellung kann dies zu Messfehlern und Fehlinterpretationen führen, wenn z. B. einige Zellen plötzlich deutlich heller oder dunkler erscheinen.



**Abbildung 11.5.:** Unkorrigierte Verschiebung der Y-Projektion. **(a):** Start der Messung. **(b):** Nach 5:30 h. **(c):** Nach 11:00 h. **(d):** Ende der Messung nach 16:35 h. Skala 25  $\mu\text{m}$ .

### Fokuskorrekturen

Durch den Z-Autofokus wurde die Lichtscheibe über den gesamten Messzeitraum in der Brennebene des Detektionsobjektivs gehalten. Die Bewegung des Objektivs zur Defokuskorrektur ist in Abbildung 11.6a abgebildet. Durch den Y-Fokus wurde zudem die relative Lage zwischen Laser und *Rolling Shutter* konstant gehalten. Dabei wurde die Position des Lasers in Scanrichtung korrigiert (siehe Abbildung 11.6b).



**Abbildung 11.6.:** Fokuskorrekturen. **(a):** Bewegung des Detektionsobjektivs (Z-Fokus). **(b):** Korrektur der Laserposition relativ zum *Rolling Shutter* (Y-Fokus).

Die beiden gestrichelten Linien in Abbildung 11.6b markieren die Ränder des *Rolling Shutter*s zum Zeitpunkt der ersten Aufnahme.

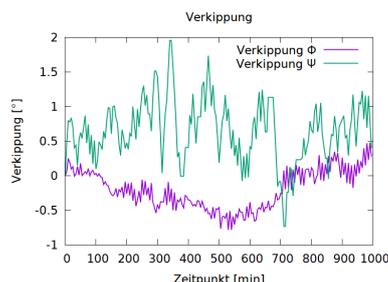
Der Strahlradius betrug  $\omega_0 = (1,973 \pm 0,011) \mu\text{m}$  und der Durchmesser des *Rolling Shutter*s betrug  $D_{RS} = 4,06 \mu\text{m}$ , was in etwa dem doppelten Strahlradius  $2\omega_0$  entspricht.

Ohne Synchronisierung hätten sich Laser und *Rolling Shutter* im Verlauf der Messung um mehr als  $2\omega_0$  gegeneinander verschoben, wodurch kein Fluoreszenzlicht mehr detektiert worden wäre.

### Messung der Kippwinkel $\Phi$ und $\Psi$

In Abbildung 11.7 sind die gemessenen Verkippungswinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  als Funktion der Zeit dargestellt. Hierbei hat sich die Bestimmung von  $\Phi$  als deutlich präziser herausgestellt. Man kann erkennen, wie der Laserstrahl zunächst bis etwa  $\Phi = -0,5$  Grad in eine Richtung verkippt ist.

Anschließend ist der Strahl um etwa denselben Betrag in die andere Richtung gekippt. Aufgrund der Messungenauigkeit der Y-Verkippung kann die Änderung von  $\Psi$  für die einzelnen Zeitpunkte nicht genau bestimmt werden. Die Messung von  $\Psi$  ist umso genauer, je größer die leuchtende Fläche im untersuchten Probenausschnitt ist. Falls der Algorithmus eine Zelle für die Y-Synchronisierung aussucht welche sehr hell aber gleichzeitig klein und von wenig Fluoreszenz umgeben ist, fehlt die notwendige räumliche Information zur korrekten Bestimmung von  $\Psi$ .

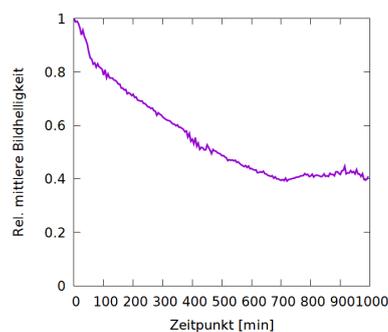


**Abbildung 11.7.:** Winkel  $\Phi$  und  $\Psi$ .

### Phototoxizität

Die für 2P-Anregung benötigte hohe Anregungsintensität führte zu einem Bleichen der Probe, wodurch die Intensität der Fluoreszenz mit der Zeit abnahm.

Dies wird in Abbildung 11.8 verdeutlicht. Hier ist die relative mittlere Bildhelligkeit der Z-Projektion  $P_Z$  als Funktion der Aufnahmezeit dargestellt. Die Helligkeit nahm zunächst stetig ab und erreichte bei etwa 40% der Ausgangsleistung ein Plateau. Um die Bleichung der Probe zu reduzieren, kann die Anregungsintensität verringert werden. Hierbei muss jedoch in der Regel ein geringeres *Signal-Rausch-Verhältnis* in Kauf genommen werden. Zudem kann es ratsam sein, die Abstände zwischen den Aufnahmen zu vergrößern, da hierdurch der Helligkeitsverlust verzögert wird. Dies bietet sich an, wenn eine geringere zeitliche Auflösung für die Beantwortung der jeweiligen Fragestellung ausreichend ist.

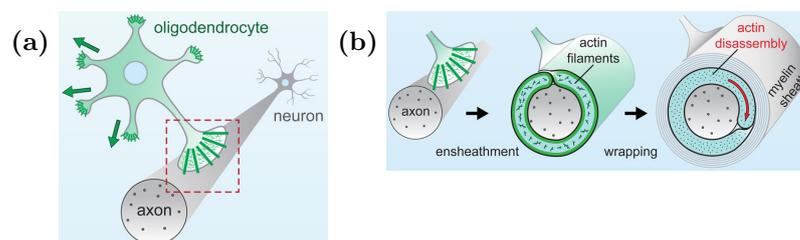


**Abbildung 11.8.:** Mittlere Bildhelligkeit von  $P_Z$ .

## 11.2. Langzeitaufnahme der Migration von OPCs

In diesem Abschnitt wird die dorsale Migration von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs) in jungen Zebrafischlarven untersucht.

OPCs stammen aus dem Neuroepithel des Rückenmarks und wandern von dort in andere Bereiche des Zentralnervensystems (ZNS) [50]. Dies geschieht in mehreren Wellen und führt schließlich zur Bildung von Oligodendrozyten [70]. Aufgrund ihrer aktiven Selbst-abstoßung sind die OPCs in etwa gleich weit voneinander entfernt, wodurch am Ende der Migration eine homogene Verteilung im ZNS erreicht wird [29] [6]. OPCs untersuchen ständig ihre Umgebung, indem sie ihre Fortsätze aktiv ausdehnen und zurückziehen [42]. Sowohl Oligodendrozyten als auch ihre Vorläuferzellen zählen zu den Gliazellen. Dieser Sammelbegriff umfasst Zellen im Nervengewebe, die sich funktionell und strukturell von den Neuronen unterscheiden. Die Zellkörper (Somata) der Oligodendrozyten sind etwa 6–8  $\mu\text{m}$  groß und sie besitzen ca. 1-40, gering verzweigte zelluläre Fortsätze [69]. Mit diesen Fortsätzen umhüllen sie die Axone der Nervenzellen mit einer Markscheide aus Myelin. Diese fungiert als elektrisch isolierende Hülle und führt zu einer Senkung von Membranleitwert und Membrankapazität. Hierdurch können die myelinisierten Axone Aktionspotentiale (APs) nur an den kurzen Abschnitten zwischen den Myelinscheiben (Ranvier-Schnürringe) aufbauen, wodurch eine besonders schnelle Erregungsweiterleitung ermöglicht wird. Man spricht in diesem Fall von einer saltatorischen Erregungsweiterleitung. Der Geschwindigkeitsgewinn kann anhand eines Beispiels veranschaulicht werden: Um eine Übertragungsgeschwindigkeit von  $25 \frac{\text{m}}{\text{s}}$  zu erreichen, muss das unmyelinisierte Axon eines Riesenkalmars einen Durchmesser von etwa 500  $\mu\text{m}$  haben. Demgegenüber erreicht das myelinisierte Axon eines Säugetiers dieselbe Geschwindigkeit bei einem Durchmesser von wenigen  $\mu\text{m}$  und verbraucht etwa 5000 mal weniger Energie [56]. Die Myelinisierung wird anhand eines Modells in Abbildung 11.9 demonstriert.

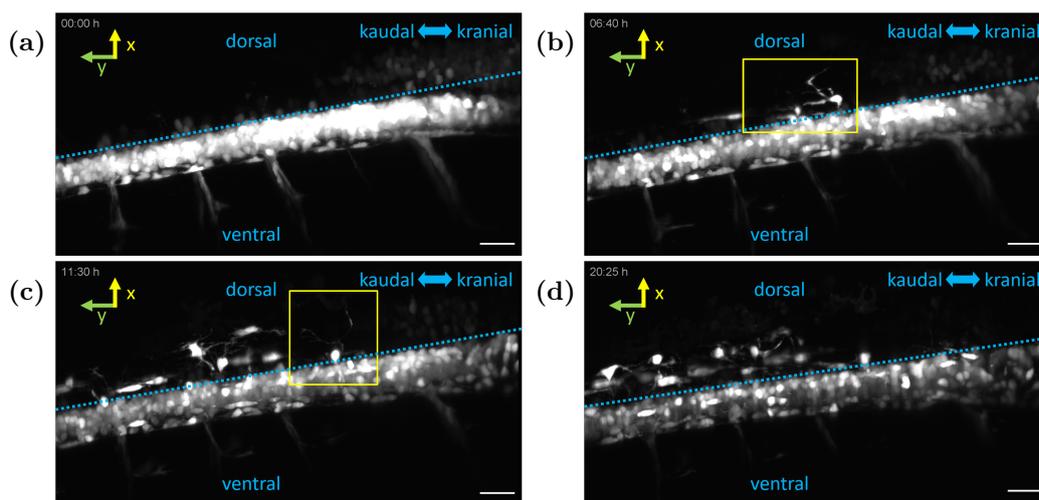


**Abbildung 11.9.:** Zwei-Stufen Modell der Myelinisierung von Axonen. **(a):** Ein Fortsatz eines Oligodendrozyten berührt ein Axon. **(b):** Der Fortsatz umhüllt das Axon und erzeugt die Myelinschicht. Modifiziert aus [85].

Nachdem der Fortsatz eines Oligodendrozyten ein Axon gefunden hat, umhüllt dieser spiralförmig das Axon. Dieser Prozess wird durch den Aufbau des Strukturproteins Aktin im Rand des Fortsatzes vorangetrieben, wobei sich dieser unter bereits bestehende Schichten schiebt. In einem zweiten Schritt wird das Aktin wieder abgebaut, wobei die Myelinhülle zurückbleibt [85].

Bei demyelisierenden Erkrankungen, wie zum Beispiel der multiplen Sklerose, verlieren die Nervenzellen ihre Myelinhülle. Dadurch verlieren sie häufig die Möglichkeit, ihre normale Funktion auszuüben und sterben auch teilweise ab.

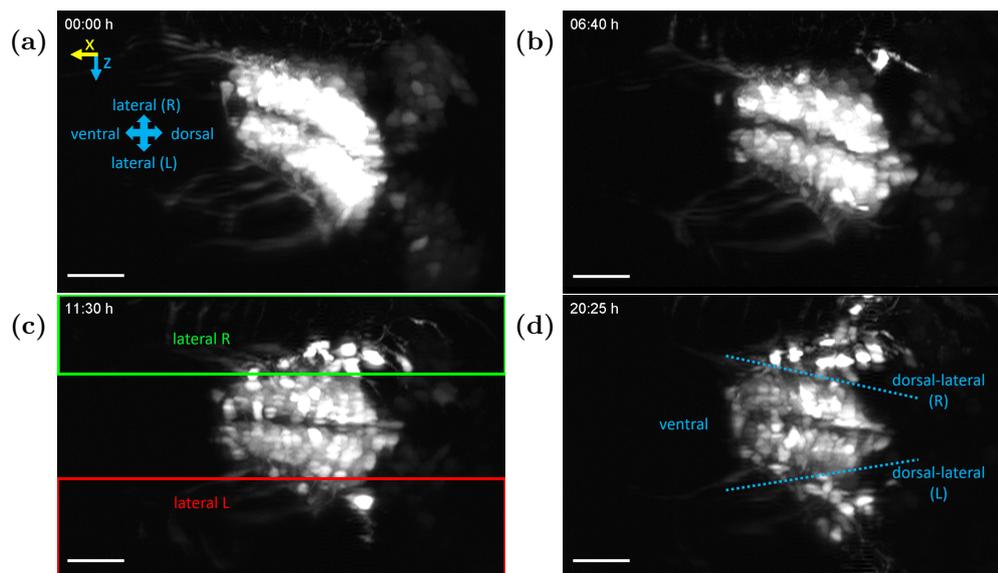
Mithilfe der automatischen Fokus- und Bewegungskorrekturen, konnte die Migration von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs) im Rückenmark einer zwei Tage alten Zebrafischlarve *Tg(olig2:GFP)* über einen Zeitraum von mehr als 20 Stunden beobachtet werden. Die Migration erfolgte von den beiden Hauptsträngen des Rückenmarks ausgehend in dorsaler Richtung. Um eine möglichst hohe zeitliche Auflösung der Migration zu erreichen, erfolgte alle 5 Minuten die Aufnahme eines Z-Stapels, bestehend aus jeweils 125 Ebenen mit einer Schrittweite von 1  $\mu\text{m}$ . Die Anregung erfolgte mit Besselstrahlen bei einer Wellenlänge von 930 nm.



**Abbildung 11.10.:** Z-Projektion im Rückenmark einer zwei Tage alten Zebrafischlarve mit Korrekturen. Die blau gestrichelte Linie trennt den dorsalen vom ventralen Bereich. **(a):** Start der Messung. **(b):** Nach 6:40 h. **(c):** Nach 11:30 h. **(d):** Ende der Messung nach 20:25 h. Skala 25  $\mu\text{m}$ .

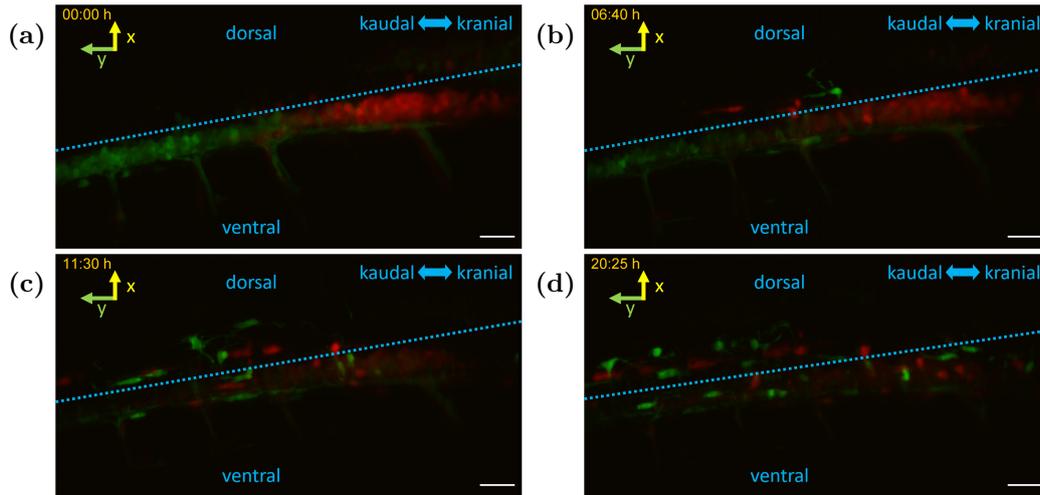
In Abbildung 11.10 sind Maximumintensitätsprojektionen entlang der Z-Richtung für 4 exemplarische Zeitpunkte der Messung abgebildet. Ein Video der Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_14.avi*. In den Projektionen in Abbildung 11.10 ist die Grenze zwischen den Hauptsträngen des Rückenmarks und dem

dazu dorsal liegenden Bereich mit einer blau gestrichelten Linie eingezeichnet. Die in den Hauptsträngen sichtbaren Zellen sind eine Mischung aus OPCs und Motorneuronen und sie lassen sich in den vorliegenden Aufnahmen nicht voneinander unterscheiden. Die migrierten Zellen, welche die markierte Linie überqueren sind hingegen ausnahmslos OPCs, von denen einige ausreifen und zu Oligodendrozyten werden. In Abbildung 11.11 sind Maximumintensitätsprojektionen entlang der Y-Richtung für dieselben Zeitpunkte wie in Abbildung 11.10 abgebildet.



**Abbildung 11.11.:** Y-Projektion im Rückenmark einer zwei Tage alten Zebrafischlarve mit Korrekturen. **(a):** Start der Messung. **(b):** Nach 6:40 h. **(c):** Nach 11:30 h. **(d):** Ende der Messung nach 20:25 h. Skala 25  $\mu\text{m}$ .

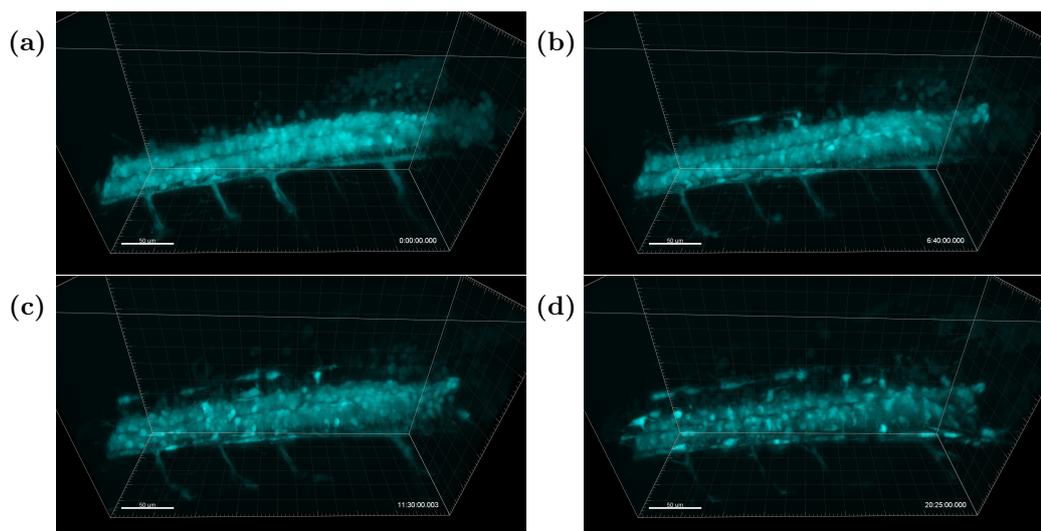
Ein Video dieser Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_15.avi*. Man erkennt auch hier deutlich die migrierenden OPCs. Zusätzlich fällt auf, dass die OPCs sich auch in lateraler Richtung bewegen. Teilweise befinden sie sich zwar lateral, aber nicht dorsal der beiden Hauptstränge. Dies führt dazu, dass sie in Abbildung 11.10 nicht als migrierende Zellen ausgemacht werden können. Aus diesem Grund wurden je eine Maximumintensitätsprojektion der obersten 35  $\mu\text{m}$  und der untersten 45  $\mu\text{m}$  der Bildstapel erzeugt. Darin werden die beiden lateral der Hauptstränge liegenden Bereiche abgebildet (grüner bzw. roter Kasten in Abbildung 11.11c). Ausschnitte aus den so erzeugten Projektionen sind in Abbildung 11.12 abgebildet. Hierbei ist der obere Bereich (lateral R) in grün und der untere Bereich (lateral L) in rot dargestellt. Ein Video der Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_16.avi*.



**Abbildung 11.12.:** Z-Projektion der obersten 35 µm (grün) und der untersten 45 µm (rot) der Bildstapel. **(a):** Start der Messung. **(b):** Nach 6:40 h. **(c):** Nach 11:30 h. **(d):** Ende der Messung nach 20:25 h. Skala 25 µm.

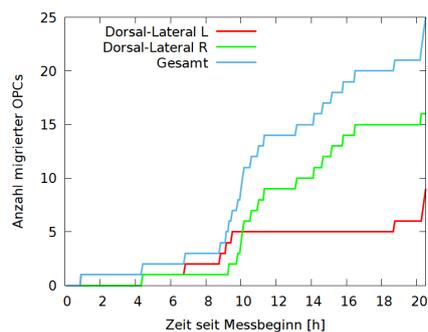
Da das Rückenmark zu Beginn der Messung schräg zur Detektionsrichtung lag, sind in der Abbildung auch Zellen aus den Hauptsträngen zu sehen (Siehe Abbildung 11.12a). Da sich das Rückenmark im Verlauf des Wachstums der Larve begradigt, nimmt der Anteil dieser Zellen in den Projektionen jedoch mit der Zeit ab. In dieser Darstellung ist gut erkennbar, aus welcher Hälfte des Rückenmarks die jeweiligen OPCs migrieren. Die Zellen aus dem unteren Bereich (lateral L, rot in Abbildung 11.12) sind dabei unschärfer, da hier das emittierte Licht deutlich mehr Gewebe auf dem Weg zum Detektionsobjektiv passieren muss. Mit der blau gestrichelten Linie ist dieselbe Grenze zwischen den Hauptsträngen und dem dazu lateral gelegenen Bereich wie in Abbildung 11.10 dargestellt. Hieran ist gut erkennbar, dass ein Großteil der migrierenden OPCs diese Grenze auch nach 20 Stunden nicht passiert hat. Um zu klären, ob dies zu einem späteren Zeitpunkt eintritt wäre eine Messung über einen längeren Zeitpunkt notwendig. Man erkennt deutlich in Abbildung 11.12d, dass die OPCs sich wie erwartet in etwa gleichmäßig im Raum verteilen.

Um die Anzahl der migrierten Zellen als Funktion der Zeit zu bestimmen, wurde das kommerzielle Programm *Imaris* (Bitplane) verwendet, um die Bildstapel in 3D zu betrachten. In Abbildung 11.13 ist die dreidimensionale Darstellung der Bildstapel zu den vier untersuchten Zeitpunkten abgebildet. Ein Video der Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_17.avi*.

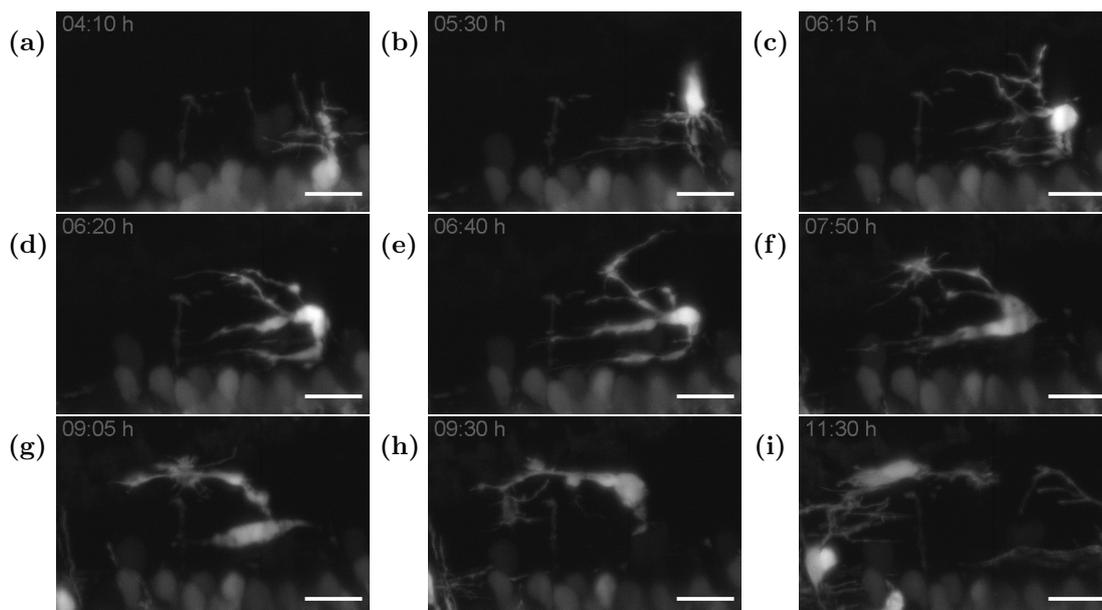


**Abbildung 11.13.:** Dreidimensionale Darstellung der Bildstapel. (a): Start der Messung. (b): Nach 6:40 h. (c): Nach 11:30 h. (d): Ende der Messung nach 20:25 h. Skala 50 µm.

Anhand der dreidimensionalen Abbildung lässt sich die Migration der OPCs aus den beiden Hauptsträngen des Rückenmarks heraus in dorsal-lateraler Richtung beobachten. Dabei wurde manuell die Anzahl der migrierten OPCs für die beiden Hälften des Rückenmarks gezählt und in Abbildung 11.14 als Funktion der Zeit dargestellt. Zusätzlich ist die Gesamtzahl aller Migrierten Zellen abgebildet. Eine Zelle wurde als migriert betrachtet, wenn sie eine der beiden in Abbildung 11.11d markierten Grenzen (gestrichelte blaue Linien) passierte. Dabei war zu beobachten, dass der Großteil der Migration etwa 9 Stunden nach Messbeginn einsetzte und bis etwa 16 Stunden nach Messbeginn anhielt. Kurz vor Ende der Messung wurden vereinzelt weitere Ereignisse registriert. Im linken Bereich wurden nur etwa halb so viele Migrationsereignisse wie auf der rechten Seite erkannt. Da die linke Seite weiter vom Detektionsobjektiv entfernt war, ist in diesem Bereich die Bildqualität geringer und es ist schwieriger einzelne Zellen auszumachen. Die unterschiedliche Anzahl der registrierten Ereignisse könnte somit ein Artefakt der Bildaufnahme sein. Es wurde erwartet, auf beiden Seiten in etwa gleich viele Migrationsereignisse zu beobachten.



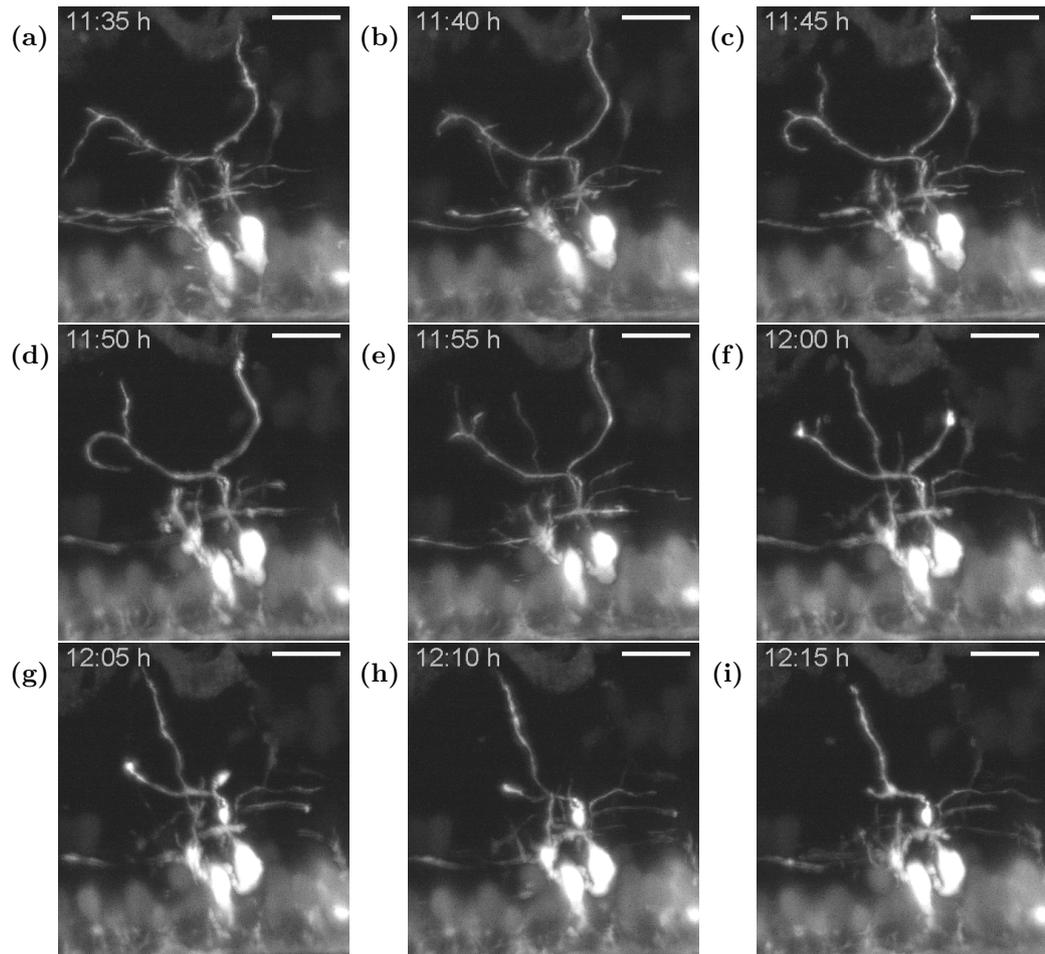
**Abbildung 11.14.:** Anzahl migrierter OPCs seit Beginn der Messung.



**Abbildung 11.15.:** Vergrößerung der Migration einer Oligodendrozyten-Vorläuferzelle. Skala 15 µm.

Mit dem Mikroskop lassen sich nicht nur die Zellkörper, sondern auch die Fortsätze der OPCs auflösen. Um dies zu demonstrieren, sind in Abbildung 11.15 vergrößerte Ausschnitte der Langzeitaufnahme zu neun Zeitpunkten dargestellt. Abgebildet sind Maximumintensitätsprojektionen der oberen 35 µm des in Abbildung 11.10b markierten Bereichs der Bildstapel. Um die relativ dunklen Verzweigungen der Fortsätze besser sichtbar zu machen, wurde eine Gammakorrektur um den Faktor 0,5 durchgeführt. Ein Video der Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_18.avi*. Die migrierte Zelle nutzt die Fortsätze um ihre Umgebung abzusuchen und bewegt sich anschließend zu einem der untersuchten Orte, wo sie dann bis zum Ende der gesamten Messung verbleibt. Da die Zellen mit zytoplasmatischem GFP markiert sind, ist die Bildung von Myelin in den Aufnahmen leider nicht sichtbar. Hierfür wäre ein membrangebundener Farbstoff notwendig.

In Abbildung 11.16 wird der Vorteil der hohen zeitlichen Auflösung offenkundig. Analog zu Abbildung 11.15 sind hier vergrößerte Ausschnitte der Langzeitaufnahme zu neun Zeitpunkten im Abstand von je 5 Minuten dargestellt. Es handelt sich um Maximumintensitätsprojektionen der oberen 35 µm des in Abbildung 11.10c markierten Bereichs der Bildstapel. Auch hier wurde eine Gammakorrektur um den Faktor 0,5 durchgeführt. Ein Video der Aufnahme befindet sich auf der beiliegenden CD als *Ergänzendes\_Video\_19.avi*.



**Abbildung 11.16.:** Vergrößerung einer Oligodendrozyten-Vorläuferzelle, die ihre Umgebung mit Zellfortsätzen absucht. Skala 15  $\mu\text{m}$ .

Zu sehen ist eine Oligodendrozyten-Vorläuferzelle, die sich nur wenige  $\mu\text{m}$  aus dem rechten Hauptstrang des Rückenmarks herausbewegt hat und mit ihren Fortsätzen die Umgebung absucht. Ab Abbildung 11.16d ziehen sich dabei die Fortsätze in hohem Tempo zum Zellkörper zurück. Um Prozesse wie diesen mit noch höherer zeitlicher Auflösung zu beobachten, kann die Aufnahmerate des Mikroskops weiter gesteigert werden. Hierfür können die Abstände zwischen den Aufnahmen verkürzt und gegebenenfalls die Belichtungszeit reduziert werden. Hier muss jedoch stets die Gesundheit der Probe und die Signalstärke berücksichtigt werden. Eine untere Grenze der Aufnahmezeit stellen die automatischen Korrekturen zur Autofokussierung und Probenpositionierung dar. Die hierfür benötigte Zeit liegt deutlich unter einer Minute und sollte daher bei den meisten Anwendungen keine Einschränkung darstellen.

## 12. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein bestehendes konfokales Lichtscheibenmikroskop charakterisiert und modifiziert. Dabei wurde das System sowohl für Hochgeschwindigkeitsaufnahmen, als auch für Aufnahmen über längere Zeiträume optimiert.

Bei der Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit wird in Abschnitt 12.1 zunächst auf die optischen Eigenschaften des Mikroskops eingegangen. Danach werden in Abschnitt 12.2 die Optimierungen für Hochgeschwindigkeitsaufnahmen und in Abschnitt 12.3 jene für Langzeitaufnahmen betrachtet und diskutiert. In Abschnitt 12.4 folgt eine abschließende Zusammenfassung mit Ausblick auf zukünftige Entwicklungen.

### 12.1. Optische Eigenschaften des Mikroskops

#### Probenbeleuchtung

Die im ursprünglichen Aufbau verwendete Gaußillumination wurde durch eine zusätzliche Besselbeleuchtung ergänzt. Der Besselstrahl wurde durch ein Axicon generiert und anschließend durch ein Linsensystem geformt und in die Probenkammer projiziert. Durch die Kombination der konfokalen Detektion mit 2P-Anregung wurde das Problem der Nebenmaxima bei Besselbeleuchtung umgangen, welche normalerweise die axiale Auflösung reduzieren.

Die Vermessung der beiden Strahlprofile erfolgte anhand der jeweiligen 2P-Fluoreszenz in einer Farbstofflösung. Da das aufgenommene Bild das Ergebnis einer Faltung aus Beleuchtungs- und Abbildungsfunktion ist, lassen sich lediglich qualitative Aussagen über die Strahlen treffen. Da die Untersuchung jedoch nur darauf abzielte, die beiden Strahlprofile zu vergleichen, erschien die verwendete Methode als ausreichend.

Durch Verwendung der Besselillumination konnte das nutzbare Sichtfeld um den Faktor 4 erhöht werden und die axiale Auflösung verbesserte sich um etwa 25 %. Obwohl die theoretisch berechneten Werte in der Praxis nicht gänzlich erreicht wurden, stellt die Besselbeleuchtung somit eine deutliche Verbesserung gegenüber der ursprünglichen Gaußbeleuchtung dar und erlaubt die Beobachtung deutlich größerer Strukturen im selben Zeitraum. Um dasselbe Sichtfeld mit Gaußbeleuchtung zu erreichen, wären vier

Aufnahmen nötig. Zwischen den Aufnahmen müsste die Probe bewegt werden, was die Aufnahmedauer zusätzlich erhöht und eine weitere Fehlerquelle darstellt.

Dass die theoretisch erwarteten Besselstrahlparameter nicht erreicht wurden, könnte teilweise durch die verwendete Messmethode erklärt werden, welche nur qualitative Aussagen zulässt. Bei den Aufnahmen waren die radialen Profile beider Strahlarten an den Seiten verbreitert, was durch Licht von außerhalb der Fokusebene erklärt werden könnte. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass das durch 2P-Anregung induzierte Fluoreszenzlicht wiederum zu Fluoreszenzanregung in der umliegenden Farbstofflösung führte. Für einen präzisen Vergleich mit den theoretischen Werten, könnte eine Untersuchung der Strahlparameter mit fluoreszierenden Nanopartikel oder der Messerschneidenmethode durchgeführt werden [61].

Das Besselstrahlprofil könnte zudem negativ durch Licht beeinflusst werden, welches die Spitze des Axicons gerade passiert ohne abgelenkt zu werden. Dieses Licht könnte mit einer ringförmigen Maske entfernt werden, welche in einer, mit der hinteren Brennebene des Objektivs konjugierten Ebene, platziert wird [54]. Das Blockieren des Lichtes bedeutet jedoch einen Verlust des Photonenbudgets, welches zwingend notwendig für die 2P-Anregung ist. Zudem erhöht die Maske die Anforderungen an die Langzeitstabilität des Mikroskops, da der vom Axicon erzeugte Ring genau mit der Maske überlagert werden muss. Aufgrund dieser Einschränkungen wurde sich gegen die Nutzung einer derartigen Maske entschieden.

Schließlich muss beachtet werden, dass bei den theoretischen Überlegungen von idealen Besselstrahlen ausgegangen wurde, welche im Labor unmöglich zu realisieren sind.

### **Konfokale Detektion**

Durch die Kombination der Lichtscheibenmikroskopie mit der konfokalen Detektion eines *Rolling Shutters* konnte der Bildkontrast bei 2P-Anregung gesteigert werden. Dies wurde zuvor bereits für die Lichtscheibenmikroskopie mit 1P-Anregung demonstriert [4]. In den Messungen wurde der Bildkontrast maximal, wenn der Detektordurchmesser dem Durchmesser des Anregungsstrahls entsprach. Reduzierte man den Detektordurchmesser weiter, so war dies mit einer rapiden Abnahme des Kontrastes verbunden. Diese Beobachtung deckt sich mit Erkenntnissen zu klassischen Konfokalmikroskopen. Hier ist der Bildkontrast maximal, wenn der Lochblendendurchmesser im ersten Minimum des Beugungsscheibchens liegt [64].

Für die konfokale Detektion ist es erforderlich, die Scanspiegel vor der Verwendung des Mikroskops zu kalibrieren. Mit dem neu entwickelten Strahlanalyseprogramm kann diese Kalibrierung automatisch und benutzerfreundlich vor Beginn einer Messung durch-

geführt werden. Sie dauert nur wenige Sekunden und stellt somit keine nennenswerte Verzögerung bei der Benutzung des Gerätes dar.

Zudem kann mit der entwickelten Software die Verkippung des Strahls in Echtzeit gemessen und korrigiert werden. Durch ein Unterprogramm ist die Winkelmessung auch orthogonal zur Bildebene in Echtzeit (Verzögerung  $< 1$  s) möglich. Das Detektionsobjektiv wird hierfür sinusförmig bewegt, wodurch die Strahlpropagation dreidimensional rekonstruiert wird. Die Korrektur einer dreidimensionalen Strahlverkippung ist mit diesem Unterprogramm aktuell ausschließlich manuell möglich und wird daher nur erfahrenen Nutzern empfohlen. Andererseits ist diese Art der Korrektur nur bei sehr großen Kippwinkeln notwendig und muss daher lediglich in Ausnahmefällen durchgeführt werden.

Kleinere Strahlverkippungen können stattdessen mit einem anderen, ebenfalls neu geschriebenen, Programm im regulären Mikroskopbetrieb bestimmt und korrigiert werden. In diesem Fall wird die in dieser Arbeit neu entwickelte Methode verwendet, welche die Winkel aus den beiden Autofokussierungen bestimmt.

### **Mögliche Verbesserung der räumlichen Auflösung**

Bei der Messung der lateralen Auflösung zeigte sich eine leichte Diskrepanz zwischen der Beleuchtungs- und der Scan-Richtung (X und Y). So war die Auflösung in X-Richtung um etwa 16% niedriger als in Y-Richtung. Dies lässt sich nicht allein durch die konfokale Detektion erklären, da der Durchmesser des verwendeten Detektors jenem des Strahles entsprach. Bei dieser Einstellung ist der Bildkontrast maximal aber die Auflösung ist nicht besser als im nicht-konfokalen Fall [64]. Eine mögliche Ursache ist das FEP-Röhrchen, in welchem sich die Proben befinden. Aufgrund des Unterschiedes im Brechungsindex zum umgebenden Medium, fungierte dieses wie eine schwache Linse in X-Richtung. Durch Verwendung anderer Materialien oder Formen des Röhrchens könnte dieser Effekt reduziert werden. Ein weiterer Ansatz wäre die Verwendung von adaptiven Optiken. Dabei wird die Verformung der Wellenfront des emittierten Lichts durch ein adaptives Element, wie z. B. einen deformierbaren Spiegel, moduliert. Dieser kann im Detektionspfad hinter dem Objektiv angebracht werden. Zur Bestimmung der optimalen Modulation kann dann ein Wellenfrontsensor in Form eines Hartmann-Shack-Sensors verwendet werden. Alternativ kann die optimale Einstellung auch iterativ bestimmt werden [28].

Andererseits waren die Unterschiede in den Auflösungen gering und machten sich im laufenden Betrieb nicht bemerkbar. Da die Implementierung adaptiver Optiken mit einem deutlichen zeitlichen und finanziellen Mehraufwand verbunden ist, muss eine Kosten-Nutzen-Abwägung getroffen werden. Je nach wissenschaftlicher Fragestellung, könnte eine Erhöhung der Auflösung für zukünftige Experimente vonnöten werden.

Dazu kann ein Detektionsobjektiv mit höherer numerischer Apertur (NA) verwendet werden. Nach Gleichung (1.19) und Gleichung (1.20) ist die Halbwertsbreite der PSF invers proportional zur NA. Hierbei muss jedoch die Größe des Objektivs berücksichtigt werden, da Objektive mit hoher NA in der Regel einen hohen Durchmesser besitzen. Dadurch kann es schwierig werden, ein solches Objektiv orthogonal zu den Beleuchtungsobjektiven in der Probenkammer zu platzieren.

Eine relativ junge Methode zur Steigerung der Auflösung stellt die sogenannte *Expansion microscopy* (ExM) dar [12]. Die Steigerung der Auflösung wird hier durch ein Vergrößern der Probe erreicht. Dafür muss das biologische Material vollständig zersetzt werden, sodass in der expandierten Probe nur die Fluorophore übrig bleiben. Daher ist diese Methode leider ungeeignet für Experimente *in vivo*, für welche das Mikroskop primär entwickelt wurde.

## 12.2. Hochgeschwindigkeitsaufnahmen

Die konfokale Detektion wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für Hochgeschwindigkeitsaufnahmen verwendet, um von der Kontraststeigerung zu profitieren. Dabei zeigte sich eine Desynchronisation zwischen Anregungslaser und *Rolling Shutter*, welche mit zunehmender Scanfrequenz zunahm und auf die Massenträgheit der Spiegel zurückzuführen ist. Diese Desynchronisation wurde als Funktion der Scanfrequenz gemessen und durch frequenzabhängige Korrekturen vollständig aufgehoben.

Die Aufnahmezeit in 3D konnte gesteigert werden, indem nur ausgewählte Ebenen beleuchtet wurden. Bei Verwendung von sechs Ebenen, mit einer Gesamtdistanz von 35  $\mu\text{m}$ , wurde somit eine Aufnahmezeit von 3,5 Hz bei konfokaler Detektion erreicht. Dies erlaubte die Beobachtung stimulierter Neuronenaktivität im optischen Tektum von fünf Tage alten Zebrafischlarven. Zur Stimulation des visuellen Systems der Larven dienten zwei LEDs, welche sich vor den Augen der Fische befanden. Bei jeweils sechs Ein- und Ausschaltvorgängen der LEDs, konnten zwei distinkte Aktivitätsmuster ausgemacht und reproduziert werden.

Obwohl die Aufnahmezeit deutlich durch Reduzierung der Anzahl an Bildebenen steigt, gelingt dies nur durch den bewussten Verzicht auf räumliche Information. Daher ist hier Vorsicht geboten und es muss vor Beginn der Aufnahme abgewägt werden, welche Bildebenen relevant und welche verzichtbar sind. Dementsprechend muss auch bei der Wahl der Anzahl an Ebenen ein Kompromiss zwischen Aufnahmezeit und räumlicher Information gefunden werden. Die Auswahl der relevanten Ebenen wird durch die, in dieser Arbeit neu geschriebene, Multipositionen-Echtzeitansicht ermöglicht. Diese erlaubt die

gleichzeitige Betrachtung von bis zu sechs Z-Ebenen, welche während der Betrachtung variiert werden können, um so die relevanten Bildebenen zu bestimmen.

Die maximale Scanrate pro Bildebene wurde durch die Geschwindigkeit der Scanspiegel, sowie der Helligkeit der Fluorophore begrenzt. Erstere ist auf 30 Hz begrenzt und könnte durch die Verwendung schnellerer Spiegel weiter gesteigert werden. Jedoch würde dadurch das ohnehin schon geringe Signal-Rausch-Verhältnis der 2P-Anregung weiter sinken. Zudem sind die Spiegel schnell genug, um die zeitversetzte Reaktion einzelner Neuronen auf den äußeren Stimulus abzubilden.

## 12.3. Langzeitaufnahmen

### Generelles zur Fokusstabilisierung

Aufgrund ungewollter Bewegungen der Laserposition, sowie thermischer Einflüsse auf das optische System, kam es im Verlauf von Langzeitmessungen sowohl zu einer Defokussierung in Detektionsrichtung (Z-Defokus), wie auch zu einem Verlust der Synchronisation zwischen Laser und *Rolling Shutter* (Y-Defokus). Um beide Hindernisse zu kompensieren, wurden zwei automatische Fokussysteme entwickelt.

Für die Berechnung der Fokuswerte wurden drei neuartige Fokusmetriken entwickelt und mit bekannten Metriken verglichen. Eine besondere Herausforderung bei der Fokussierung stellte das Rauschen dar, welches durch das geringe Signal-Rausch-Verhältnis der 2P-Anregung verursacht wurde. Dabei zeigten sich spektrale Fokusmetriken durch ihren intrinsischen Tiefpassfilter weniger rauschanfällig als andere Metriken. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Royer *et al.* [57]. Der Einfluss des Rauschens konnte durch eine Kombination an Vorfilterungen weiter reduziert werden. Insgesamt hat sich die, im Rahmen dieser Arbeit entwickelte, Metrik der kombinierten FFT mit Hochpassfilter als die Beste für das verwendete Mikroskop erwiesen. Die Metrik wurde bisher noch nicht in anderen Systemen getestet aber es ist anzunehmen, dass sie dort ebenfalls Vorteile gegenüber anderen Fokusmetriken bietet. Sollte sich dies in zukünftigen Untersuchungen bewahrheiten, könnte die neu entwickelte Metrik in nahezu allen Bereichen mit automatischer Fokussierung Verwendung finden. Dabei wäre die Anwendung nicht nur auf die Mikroskopie beschränkt. Die neue Metrik könnte möglicherweise in Fotokameras auch für den nicht wissenschaftlichen Gebrauch verwendet werden.

Bei Langzeitmessungen in biologischen Proben mit hohem Rauschanteil zeigte der Autofokus gelegentlich Aussetzer bei denen die optimale Fokusposition nicht gefunden wurde. Die genaue Ursache hierfür bleibt unklar, aber sie ist höchstwahrscheinlich auf den star-

ken Rauschanteil in den Bildern zurückzuführen. Diese Fehleranfälligkeit könnte durch eine stärkere Vorfilterung der Aufnahmen reduziert werden, wobei jedoch auch zusätzliche Bildinformationen verloren gehen. Dabei würde auch die Sensitivität für kleinste Bildstrukturen verloren gehen, was somit zu einem systematischen Fehler bei der Bestimmung der optimalen Fokusposition führen würde. Da die Aussetzer des Autofokus nur vereinzelt auftreten und das System anschließend die optimale Fokusposition in der Regel wiederfindet, werden die aktuellen, moderaten Vorfilterungen beibehalten.

### **Y-Fokus zur Langzeitstabilisierung der konfokalen Detektion**

Für die Fokussierung in Y-Richtung wurde eine völlig neue Methode entwickelt, bei welcher ein kleiner Bereich der Probe mit dem Anregungslaser durchfahren wird. Dem Autor dieser Arbeit ist keine andere Methode aus der Literatur bekannt, mit der die Synchronisierung zwischen Anregungslaser und konfokalem Detektor automatisch bei der Betrachtung einer Probe mit unbekannter Struktur ohne zusätzliche Bauelemente erfolgt.

Bei der entwickelten Y-Fokussierung werden Bilder aus virtuellen Detektoren rekonstruiert, die sich aufgrund ihres Abstandes zur Strahlmitte in ihrer Helligkeit und ihrem Fokuswert unterscheiden. Die Methode benötigt keine weiteren Bauteile und funktioniert unabhängig von der Probenstruktur. Dadurch kann sie relativ einfach auch in anderen Lichtscheibenmikroskopen mit konfokaler Schlitzdetektion verwendet werden, ohne diese umbauen zu müssen.

Das erlaubt die Nutzung der Methode in vielen Aufbauten für verschiedenste Anwendungen, die von konfokaler Detektion profitieren. Es gilt jedoch die Einschränkung, dass der Y-Fokus nur zuverlässig arbeitet, falls die Probe für die Dauer der Fokussierung als statisch betrachtet werden kann. Da die Fokussierung in der hier angewandten Form weniger als 600 ms für einen Scanvorgang benötigt, sollte das nur in seltenen Fällen ein Problem darstellen. Insbesondere Langzeitaufnahmen in stark streuenden, lebenden Proben profitieren von der konfokalen Detektion mit Y-Autofokus, da hier die Bildqualität signifikant verbessert werden kann.

Durch den Y-Fokus konnte bei einer 20 stündigen Langzeitmessung mit konfokaler Detektion der Verlust der Synchronisation über die gesamte Aufnahmedauer verhindert werden. Ohne Anwendung der neu entwickelten Methode hätten sich Anregungslaser und Detektor um mehr als den Strahldurchmesser gegeneinander verschoben, wodurch am Ende der Messung kein Bildsignal mehr hätte beobachtet werden können.

Bei der Messung konnte die Kontraststeigerung der konfokalen Detektion ausgenutzt werden um die Dynamik migrierender Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs) mit hoher

zeitlicher und räumlicher Auflösung dreidimensional beobachten zu können. Trotz des durch die 2P-Anregung starken Ausbleichens der Probe, zeigte sich die kurze Spanne von fünf Minuten zwischen den Aufnahmen als vorteilhaft um die Bewegung der Zellfortsätze der OPCs zu untersuchen. Für eine noch höhere zeitliche Auflösung kann die Wartezeit zwischen den Aufnahmen in zukünftigen Experimenten weiter reduziert werden.

### **Messung der Verkippung der Lichtscheibe in einer beliebigen Probe**

Aus den Einzelbildern der Autofokussierungen konnte durch eine im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelte Methode die Verkippung der Lichtscheibe entlang der Raumwinkel  $\Phi$ ,  $\Theta$  und  $\Psi$  rekonstruiert werden. Die Winkelmessung erfolgt parallel während der Autofokussierung und funktioniert unabhängig von der Struktur der betrachteten Probe. Dabei wurde ausgenutzt, dass einige der untersuchten Fokusmetriken den Bildfokus zeilen- bzw. spaltenweise berechnen und anschließend aufsummieren. Indem diese Werte vor der Summierung separat gespeichert werden, bleibt die Information über die Verkippung der Lichtscheibe erhalten. Der Kippwinkel konnte über eine lineare Anpassung aus der optimalen Fokusposition als Funktion der Bildzeile bzw. -Spalte berechnet werden. Einen anderen Ansatz zur Bestimmung der Kippwinkel verfolgten Royer *et al.* [57]. Sie teilten die einzelnen Bilder des Fokus-Bildstapels in kleinere Einheiten, wodurch sie mehrere Fokusstapel erhielten. Für jeden dieser Bildstapel berechneten sie die optimale Fokusposition und nutzten anschließend deren dreidimensionale Verteilung, um die wahrscheinlichste Lage einer Ebene durch diese Punkte zu finden. Aus einer linearen Ebenenanpassung extrahierten sie dann die Kippwinkel  $\Phi$  und  $\Theta$ .

Eine Schwierigkeit dieses Ansatzes ist die Wahl der Größe der Bild-Untereinheiten. Ist diese zu groß gewählt, sinkt die Auflösung der Winkelbestimmung. Sind die Untereinheiten jedoch zu klein, ist eine robuste Bestimmung des Fokuswertes nicht mehr möglich. Zudem können Bildartefakte an den Bildkanten auftreten, welche die Fokusmetrik stören. Die in dieser Arbeit entwickelte und getestete Methode hat diese Schwierigkeit nicht, da hierbei die gesamte Bildhöhe, bzw. -Breite für die Berechnung verwendet wird. Zudem ist die Bestimmung der Winkel rechnerisch einfacher, da zwei eindimensionale statt eines zweidimensionalen Problems gelöst werden müssen.

Schließlich erlaubt die in dieser Arbeit entwickelte Methode auch die Bestimmung von  $\Psi$  aus der, ebenfalls neu entwickelten, Y-Fokussierung. Durch die Bestimmung von  $\Psi$  kann der Anregungslaser parallel zum konfokalen Detektor gehalten werden. Dabei gilt in der aktuellen Programmfassung jedoch die Einschränkung, dass die Fluorophore möglichst gleichmäßig über das Sichtfeld verteilt sein müssen, da der Algorithmus automatisch den hellsten Bildpunkt auswählt ohne dessen Umgebung zu berücksichtigen. Nur wenn

auch die Umgebung ausreichend hell ist, kann das Programm auf genügend räumliche Information zur präzisen Bestimmung von  $\Psi$  zurückgreifen. Um die Einschränkung der gleichmäßig verteilten Fluorophore zu umgehen, könnte der Algorithmus in Zukunft dahingehend verbessert werden, dass er automatisch nach hellen Flächen sucht.

### **Automatische Bewegungskorrektur der Probe in vivo**

Um die Probe bei Langzeitaufnahmen fixiert im Sichtfeld der Kamera zu halten, wurde eine automatische Korrektur der Probenbewegung in allen Raumrichtungen entwickelt. Diese basiert auf der Messung der Bildverschiebung der Maximumintensitätsprojektionen entlang der drei Raumrichtungen. Der verwendete Algorithmus basiert auf einer Fouriertransformation und erreicht Subpixelauflösung. In der ursprünglich von Manuel Guizar Sicaire vorgeschlagenen Version [23], wurden die Bilder in einem ersten Schritt um den Faktor 2 vergrößert. Da hierfür sehr viel Arbeitsspeicher benötigt wird, wurde dieser Schritt bei der Implementierung ausgelassen, wodurch die Rechenzeit um etwa den Faktor 3 sank und die Präzision gesteigert werden konnte. Durch eine zusätzliche Vorbehandlung mit einem Gaußfilter konnte die Fehleranfälligkeit durch Rauschen reduziert werden.

Mit der verwendeten Methode können nur Translationen korrigiert werden. Rotationen der Probe werden bei der Messung der Bildverschiebung nicht berücksichtigt. Diese wurden jedoch im Verlauf der Langzeitmessungen nicht beobachtet und daher erschien eine Korrektur der Translationen als ausreichend. Prinzipiell wäre eine zusätzliche Messung der Rotation möglich, jedoch werden dadurch die Berechnungen komplexer und möglicherweise fehleranfälliger. Die verwendete Methode hat sich als robust erwiesen und die Verschiebungen konnten auch bei sich entwickelnden Proben korrigiert werden.

## 12.4. Abschließende Zusammenfassung und Ausblick

Durch eine Beleuchtung mit Besselstrahlen konnten das nutzbare Sichtfeld und die axiale Auflösung des Mikroskops erhöht werden. Es zeigte sich, dass der Bildkontrast bei 2P-Anregung durch konfokale Detektion mit einem *Rolling Shutter* steigt. Diese konfokale Detektion konnte erfolgreich bei Hochgeschwindigkeitsaufnahmen und bei Langzeitaufnahmen angewandt werden. Bei letzteren ist eine konfokale Detektion mit einem Lichtscheibenmikroskop normalerweise nur eingeschränkt möglich, da sich die Positionen des Laserstrahls und des Detektors relativ zueinander verschieben können. Es konnte keine Publikation gefunden werden, in welcher diese Verschiebung gemessen und behoben werden konnte. Mit der hier vorgestellten Methode ist dies erstmalig über einen Zeitraum von über 20 Stunden gelungen.

Des Weiteren wurde eine neue Fokusmetrik entwickelt, welche sich besser als bestehende Metriken für die Autofokussierung des benutzten Mikroskops eignet. Möglicherweise gilt dies auch für andere Systeme. Es wurde zudem ein neues Verfahren entwickelt, um die Verkipfung des Anregungslasers anhand der Einzelbilder des Autofokussystems zu ermitteln.

Die automatische Bewegungskorrektur könnte in Zukunft um eine Korrektur der Probenrotation ergänzt werden. Dafür wäre eine motorisierte Dreheinheit erforderlich, welche das FEP-Röhrchen dreht. Mit der im Rahmen dieser Arbeit geschriebenen Kontrollsoftware können mehrere Positionen in einem Fisch nacheinander angesteuert und betrachtet werden. Hierfür wird der Fisch zuerst manuell an die gewünschten Positionen bewegt. Die Positionen werden dann in einer Liste gespeichert und können anschließend bei einer Langzeitaufnahme zyklisch von der Software angesteuert werden.

Im aktuellen Aufbau ist die Betrachtung mehrerer Positionen nur innerhalb eines Fisches möglich, da die Orientierung der Fische im Röhrchen nicht kontrolliert werden kann. Daher müssen die Röhrchen vor der Messung manuell in der korrekten Ausrichtung platziert werden. Durch einen zusätzlichen Motor wäre eine Rotation auch während der Aufnahme möglich. Dies würde die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Fische erlauben und den Probendurchsatz signifikant erhöhen.



# A. Anhang

## A.1. Mathematische Beschreibung der Fokusmetriken

Hier werden die in der Arbeit verwendeten Fokusfunktionen aufgelistet. Die drei im Rahmen der Arbeit neu entwickelten Metriken sind mit dem Zusatz *Neuentwicklung* vermerkt.  $I$  ist ein monochromatisches zweidimensionales Bild mit Pixelintensitäten  $I_{x,y}$  und der Pixelanzahl  $n(I)$ . Die Breite und Höhe des Bildes sind durch  $b(I)$  und  $h(I)$  gegeben.  $L_p(I)$  beschreibt die  $L_p$  Norm des Bildes  $I$ .  $\mathcal{F}_c$  ist die zweidimensionale diskrete Kosinustransformierte (DCT) und  $\mathcal{F}_x(I_y)$  ist die eindimensionale schnelle Fouriertransformierte (FFT) der Bildzeile  $I_y$  in  $x$ -Richtung. Die Funktion  $\text{abslog}_b$  ist wie folgt definiert:

$$\text{abslog}_b(x) = \begin{cases} \log_b(x) & \text{für } x > 0 \\ \log_b(-x) & \text{für } x < 0 \\ 0 & \text{für } x = 0 \end{cases} \quad (\text{A.1})$$

Die spektralen Metriken werden durch den angenommenen Stützradius  $r_0$  der optischen Transferfunktion (OTF) parametrisiert, welcher experimentell für die verwendeten Optiken bestimmt werden muss. Unter der Annahme einer lateral isotropen PSF beträgt das Verhältnis zwischen PSF-Radius  $r_p$  und OTF-Stützradius  $r_p = \frac{\min(b(I), h(I))}{r_0}$  [57].  $r_{HP}$  ist ein weiterer Parameter, der experimentell bestimmt werden muss und anschaulich den Radius eines Hochpassfilters beschreibt.

### Gradientenbasierte Metriken

Brenner [8]:

$$B(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{x,y} (I_{x,y-1} - I_{x,y+1})^2 \quad (\text{A.2})$$

Squared Gradient:

$$SG(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{x,y} (I_{x,y+1} - I_{x,y})^2 \quad (\text{A.3})$$

Total Variation:

$$TV(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{x,y} \sqrt{(I_{x+1,y} - I_{x-1,y})^2 + (I_{x,y+1} - I_{x,y-1})^2} \quad (\text{A.4})$$

Tenengrad [84]:

$$TG(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{x,y} ((\mathcal{S}_x I_{x,y})^2 + (\mathcal{S}_y I_{x,y})^2) \quad (\text{A.5})$$

Hier sind  $\mathcal{S}_x$  und  $\mathcal{S}_y$  die Sobeloperatoren:

$$\mathcal{S}_x = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad \text{und} \quad \mathcal{S}_y = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \quad (\text{A.6})$$

Quadrierter Schar-Filter:

$$SG(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{x,y} ((\mathcal{G}_x I_{x,y})^2 + (\mathcal{G}_y I_{x,y})^2) \quad (\text{A.7})$$

Hier sind  $\mathcal{G}_x$  und  $\mathcal{G}_y$  die Scharoperatoren, welche gegenüber den Sobeloperatoren eine bessere Rotationssymmetrie aufweisen [60]:

$$\mathcal{G}_x = \begin{bmatrix} 47 & 0 & -47 \\ 162 & 0 & -162 \\ 47 & 0 & -47 \end{bmatrix} \quad \text{und} \quad \mathcal{G}_y = \begin{bmatrix} 47 & 162 & 47 \\ 0 & 0 & 0 \\ -47 & -162 & -47 \end{bmatrix} \quad (\text{A.8})$$

Absoluter Laplace-Filter[48]:

$$AL(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{x,y} |2I_{x,y} - I_{x-1,y} - I_{x+1,y}| + |2I_{x,y} - I_{x,y-1} - I_{x,y+1}| \quad (\text{A.9})$$

Quadrierter Laplace-Filter:

$$SL(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{x,y} (\mathcal{D}I_{x,y})^2 \quad (\text{A.10})$$

Hier ist  $\mathcal{D}$  der diskrete Laplace Operator:

$$\mathcal{D} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & -8 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \quad (\text{A.11})$$

### Korrelationsbasierte Metriken

Vollath F4 [79]:

$$V_4(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{x,y} I_{x,y} (I_{x+1,y} - I_{x+2,y}) \quad (\text{A.12})$$

Symmetrische Vollath F4 Funktion[79]:

$$\begin{aligned} MV_4(I) = & \frac{1}{n(I)} \left( \left| \sum_{x,y} I_{x,y} (I_{x+1,y} - I_{x+2,y}) \right| + \left| \sum_{x,y} I_{x,y} (I_{x-1,y} - I_{x-2,y}) \right| \right) \\ & + \frac{1}{n(I)} \left( \left| \sum_{x,y} I_{x,y} (I_{x,y+1} - I_{x,y+2}) \right| + \left| \sum_{x,y} I_{x,y} (I_{x,y-1} - I_{x,y-2}) \right| \right) \end{aligned} \quad (\text{A.13})$$

Vollath F5 [79]:

$$V_5(I) = \frac{1}{n(I)} \left( \sum_{x,y} I_{x,y} I_{x+1,y} - \frac{1}{n} \left( \sum_{x,y} I_{x,y} \right)^2 \right) \quad (\text{A.14})$$

### Statistische Metriken

Mittelwert:

$$MEAN(I) = \mu(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{x,y} I_{x,y} \quad (\text{A.15})$$

Quadratisches Mittel:

$$RMS(I) = \sqrt{\frac{1}{n(I)} \sum_{x,y} I_{x,y}^2} \quad (\text{A.16})$$

### Spektrale Metriken

Normierte DCT Shannon Entropie:

$$DCTS(I) = -\frac{2}{r_0^2} \sum_{x+y < r_0} \left| \frac{\mathcal{F}_c(I)_{x,y}}{L_2(\mathcal{F}_c(I))} \right| \text{abslog}_2 \left( \frac{\mathcal{F}_c(I)_{x,y}}{L_2(\mathcal{F}_c(I))} \right) \quad (\text{A.17})$$

Quadrierte FFT (*Neuentwicklung*):

$$F_{FFT}(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{1 < x < r_0, y} |\mathcal{F}_x(I_y)|^2 \quad (\text{A.18})$$

Quadrierte FFT mit Hochpassfilter (*Neuentwicklung*):

$$F_{HP-FFT}(I) = \frac{1}{n(I)} \sum_{r_{HP} < x < r_0, y} |\mathcal{F}_x(I_y)|^2 \quad (\text{A.19})$$

Kombinierte FFT mit Hochpassfilter (*Neuentwicklung*):

$$F_{K-FFT}(I) = \frac{1}{n^2(I)} \sum_{1 < x < r_0, y} |\mathcal{F}_x(I_y)| \cdot \sum_{r_{HP} < x < r_0, y} |\mathcal{F}_x(I_y)|^2 \quad (\text{A.20})$$

Weitere Beispiele spektraler Metriken sind das DCT-Verhältnis von hohen zu niedrigen Frequenzen [75] oder die spektrale Bayes-Entropy nach Kristan [39]. Da sich diese jedoch als weniger geeignet für die Lichtscheibenmikroskopie als die normierte DCT Shannon Entropie erwiesen haben [57], werden sie in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

## A.2. Eigenschaften der verwendeten Kamera

Vertikale Bildbreite [pxl]	<i>Area</i> Modus [Hz]	<i>Lightsheet</i> Modus [Hz]
2048	100	49
1024	200	99
512	400	196
256	801	384
128	1603	738
64	3206	1368
8	25655	5401

**Tabelle A.1.:** Maximale Bildrate in den Aufnahmemodi *Area* und *Lightsheet* in Abhängigkeit der vertikalen Bildbreite. Im Falle des *Area* Modus wird von einer aktiven Region ausgegangen, welche sich zu gleichen Teilen in der oberen und unteren Sensorhälfte befindet. Befindet sich die aktive Region vollständig in einer der beiden Sensorhälften, so halbiert sich die maximale Bildrate. Entnommen aus [38].

### A.3. Zemax Linsendaten

		Kommentar	Radius	Dicke	Glas	Halber Durchm..	Kegelschnitt	Par 0(nicht b..	Fokusslänge
OBJ	Standard		Unendlich	Unendlich		0.000	0.000		
STO	Standard		Unendlich	50.000		0.550	U	0.000	
2*	Ungerade ..		Unendlich	5.111	E	F_SILICA	12.700	U	0.000
3*	Standard	AX2505-B	Unendlich	260.000		12.700	U	0.000	
4	Paraxial	Achromat		200.000		0.538			200.000
5	Standard	Scan-Spiegel	Unendlich	125.000		0.788	0.000		
6	Paraxial	Relay 1		250.000		0.944			125.000
7	Paraxial	Relay 2		125.000		0.632			125.000
8	Standard	back focal pl..	Unendlich	5.000		0.788	0.000		
9	Paraxial	Objektiv		5.000		0.794			5.000
10	Standard	focal plane	Unendlich	5.000		6.245E-003	0.000		
IMA	Standard		Unendlich	-		0.781	0.000		

Abbildung A.1.: Zemax Linsendaten-Editor. **2** und **3**: Axicon-Linse.

### A.4. Optimierung der spektralen Fokusmetriken

$r_{HP,rel}$	FWHM	$h$	$r_{HP,rel}$	FWHM	$h$
0	3,88666	0,985202	0,13	3,25025	0,982124
0,01	3,7919	0,990239	0,14	3,24563	0,980966
0,02	3,70565	0,991247	0,15	3,24887	0,979609
0,03	3,61053	0,990767	0,16	3,25244	0,978398
0,04	3,5464	0,990246	0,17	3,25343	0,977242
0,05	3,47941	0,989539	0,18	3,26023	0,975907
0,06	3,42969	0,988797	0,19	3,27305	0,974386
0,07	3,38178	0,987973	0,2	3,28838	0,972903
0,08	3,35288	0,987141	0,21	3,30183	0,971917
0,09	3,32866	0,986355	0,22	3,33305	0,970084
0,1	3,301	0,985394	0,23	3,34685	0,968665
0,11	3,28351	0,98426	0,24	3,33419	0,967571
0,12	3,26289	0,983188	-	-	-

Tabelle A.2.: Messung von  $r_{HP,rel}$  an fluoreszierenden Nanopartikeln.

$r_{0,rel}$	$FWHM_{FFT}$	$h_{FFT}$	$FWHM_{DCTS}$	$h_{DCTS}$
1	3,95756	0,967062	26,8493	0,509659
0,75	3,93238	0,973277	13,1263	0,557373
0,5	3,90765	0,979528	7,73986	0,66249
0,4	3,89834	0,981946	6,89725	0,712385
0,35	3,89226	0,983122	-	-
0,3	3,88954	0,984217	6,36375	0,767347
0,29	3,88855	0,98442	-	-
0,28	3,88761	0,984623	-	-
0,27	3,88701	0,984836	-	-
0,26	3,88683	0,985022	-	-
0,25	3,88666	0,985202	6,16791	0,797531
0,24	3,88727	0,985372	6,14212	0,804002
0,23	3,88796	0,985535	6,11892	0,810549
0,22	3,88989	0,985699	6,0984	0,817147
0,21	3,89284	0,985833	6,08114	0,824237
0,2	3,89563	0,98597	6,06608	0,831469
0,19	3,90149	0,986074	6,05337	0,839134
0,18	3,90787	0,986168	6,0501	0,846488
0,17	3,91672	0,986229	6,05635	0,853392
0,16	3,92663	0,986275	6,0793	0,860134
0,15	3,94055	0,986274	6,10804	0,866223
0,14	3,96835	0,986236	6,17056	0,872145
0,13	3,99328	0,986143	6,23452	0,87786
0,12	4,02611	0,98599	6,30489	0,88295
0,11	4,06375	0,985748	6,40403	0,887597
0,1	4,13049	0,985349	6,49865	0,891547
0,09	4,19741	0,984826	6,63845	0,895052
0,08	4,26492	0,984201	6,81813	0,897512
0,07	4,36499	0,983265	7,06545	0,898879
0,06	4,47645	0,981793	7,48144	0,898438
0,05	4,59702	0,979694	7,96492	0,894957
0,04	4,72198	0,976259	8,82894	0,885841
0,03	4,90071	0,970932	10,3412	0,865198
0,02	5,0806	0,957833	13,4748	0,81144
0,01	5,46043	0,933095	24,3079	0,64202
0,007	5,64546	0,918398	28,9061	0,532788
0,004	5,70997	0,925195	34,5612	0,39867

**Tabelle A.3.:** Messung des Stützradius der OTF an fluoreszierenden Nanopartikeln.

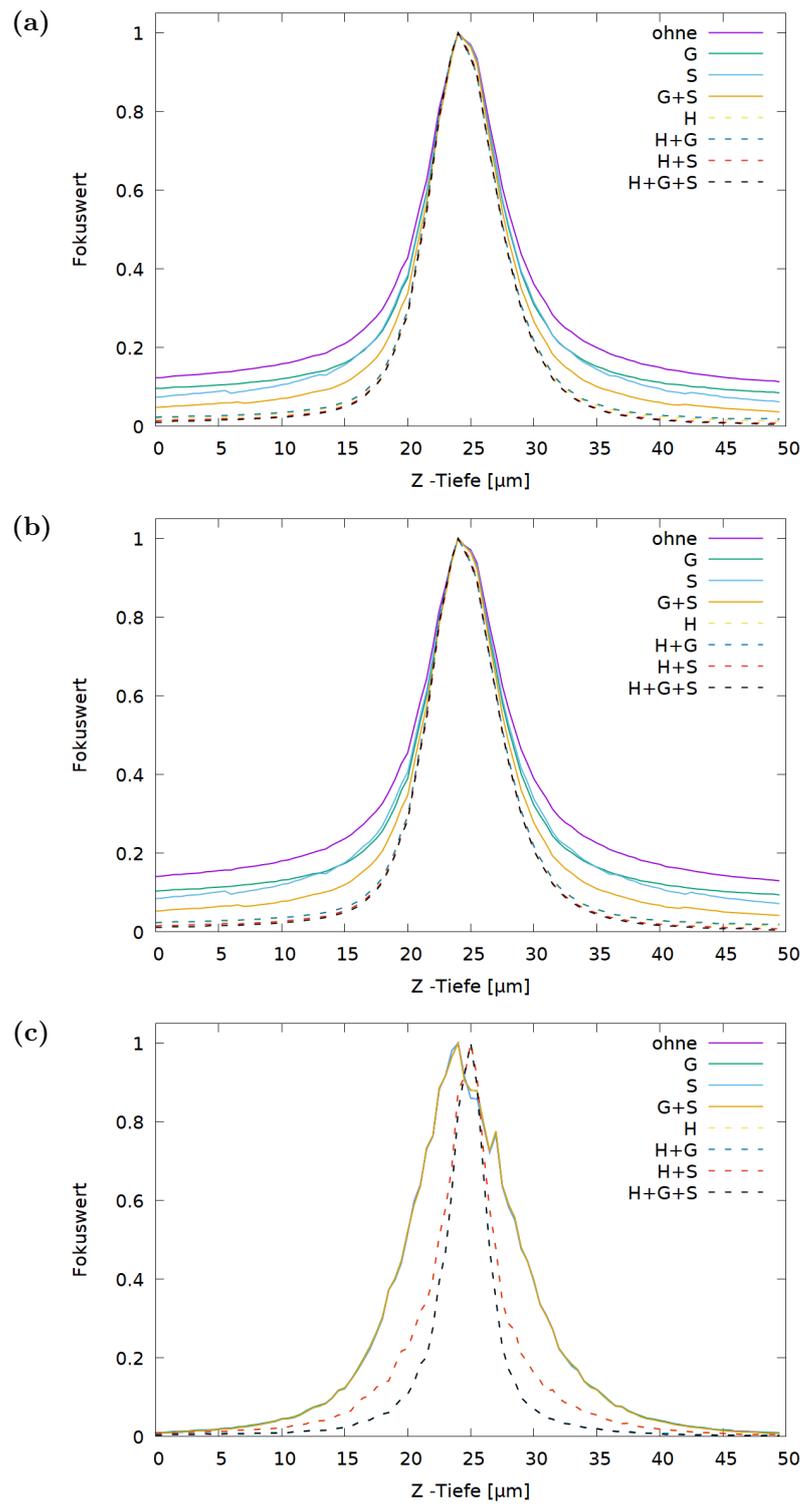
## A.5. Einfluss der Bildvorfilterung auf die Fokusmetriken

In den Tabellen dieses Abschnitts sind für die untersuchten Fokusmetriken charakteristische Werte zur Untersuchung der Fokusqualität aufgelistet. Dies sind *Max*: Z-Ebene mit dem höchsten Funktionswert. *CoM*: Schwerpunkt aller Werte oberhalb des Mittelwerts. *h*: normierte Höhe. *t*: Rechenzeit. FWHM: Halbwertsbreite. *Maxima*: Anzahl der Nebenmaxima.  $\frac{Max}{Nachbar}$ : relative Amplitude der Nebenmaxima im Vergleich zu den direkten Nachbarn.

### A.5.1. Fokusmetriken im Gehirn einer Zebrafischlarve (Starkes Bildsignal)

	Max [ $\mu m$ ]	CoM [ $\mu m$ ]	<i>h</i>	t [ms]	FWHM [ $\mu m$ ]	<i>Maxima</i>	$\frac{Max}{Nachbar}$
<b>Tenengrad</b>							
ohne	24	24,35	0,8874	199,8	7,898	0	0,00
G	24	24,32	0,9146	254,7	7,238	0	0,00
S	24	24,33	0,9385	192,5	7,325	0	0,00
G S	24	24,30	0,9633	253,5	6,790	0	0,00
H	24	24,34	0,9864	91,2	6,365	0	0,00
H G	24	24,37	0,9819	109,2	6,448	0	0,00
H S	24	24,34	0,9927	89,2	6,340	0	0,00
H G S	24	24,37	0,9945	103,9	6,369	0	0,00
<b>Scharr</b>							
ohne	24	24,36	0,8703	202,3	8,306	0	0,00
G	24	24,32	0,9064	257,1	7,396	0	0,00
S	24	24,35	0,9281	194,8	7,607	0	0,00
G S	24	24,31	0,9585	256,4	6,900	0	0,00
H	24	24,34	0,9840	90,5	6,382	0	0,00
H G	24	24,37	0,9811	109,3	6,447	0	0,00
H S	24	24,34	0,9917	88,5	6,347	0	0,00
H G S	24	24,37	0,9941	102,9	6,365	0	0,00
<b>Quadrierter Laplace-Filter</b>							
ohne	24	24,53	0,9907	174,0	9,033	1	1,13
G	24	24,52	0,9904	239,2	9,091	1	1,14
S	24	24,53	0,9919	176,6	9,020	1	1,13
G S	24	24,52	0,9917	238,6	9,076	1	1,14
H	25	24,42	0,9950	82,2	4,338	7	1,10
H G	25	24,44	0,9972	104,0	3,479	4	1,10
H S	25	24,42	0,9956	83,4	4,335	7	1,10
H G S	25	24,44	0,9983	98,5	3,475	4	1,12

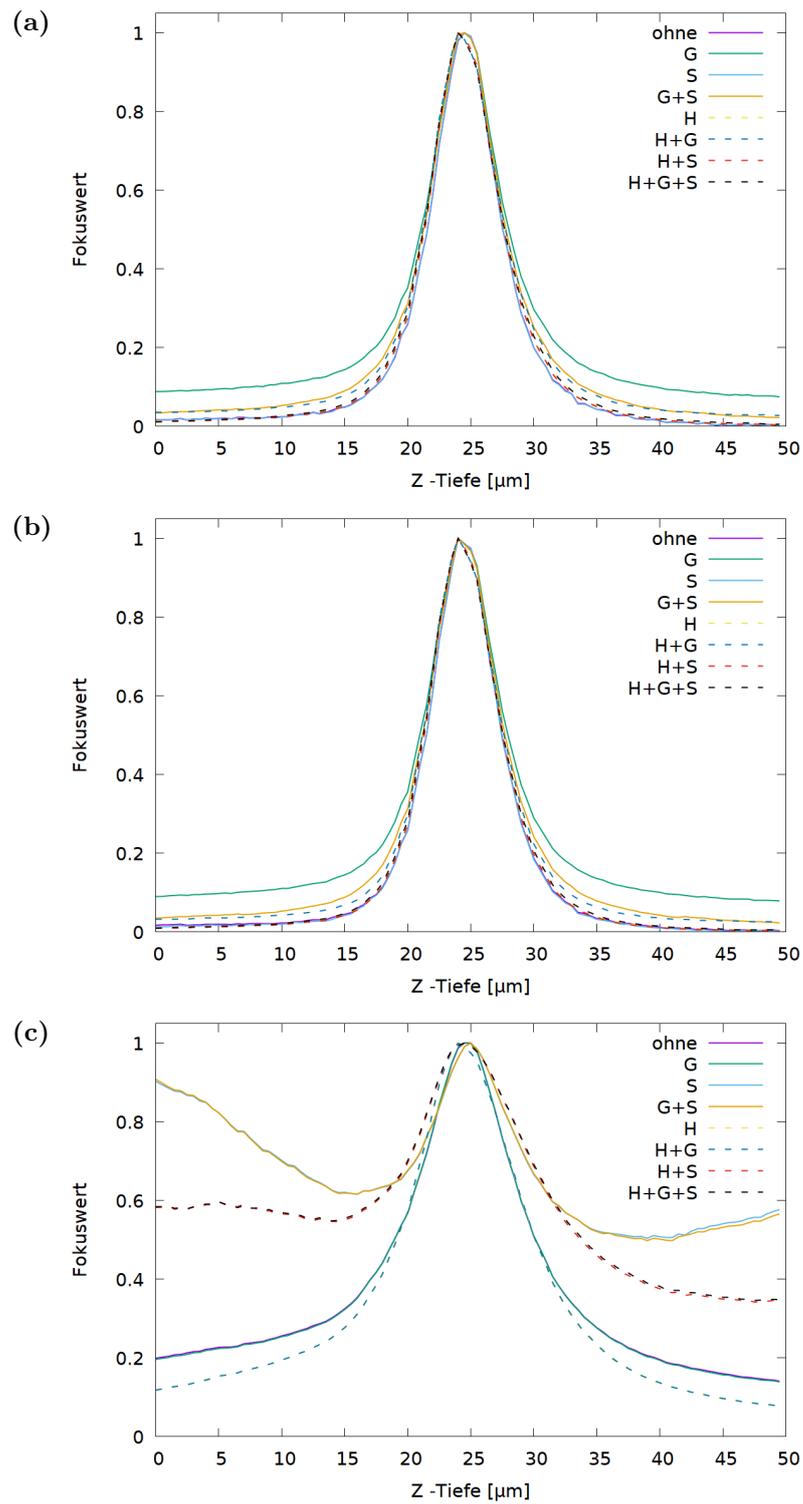
**Tabelle A.4.:** Vergleich der Fokusmetriken im Gehirn einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. Teil 1. **G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.



**Abbildung A.2.:** Optimierung der Fokusmetriken im Gehirn einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. **(a):** Tenengrad. **(b):** Scharr. **(c):** Quadrierter Laplace-Filter. **G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.

	Max [ $\mu\text{m}$ ]	CoM [ $\mu\text{m}$ ]	$h$	t [ms]	FWHM [ $\mu\text{m}$ ]	Maxima	$\frac{Max}{Nachbar}$
<b>Vollath F4</b>							
ohne	24,5	24,25	0,9988	49,7	6,096	15	1,27
G	24,5	24,33	0,9254	124,7	6,978	0	0,00
S	24,5	24,28	0,9977	63,4	6,099	13	1,23
G S	24,5	24,35	0,9785	124,7	6,559	0	0,00
H	24	24,42	0,9961	50,5	6,351	4	1,17
H G	24	24,45	0,9725	75,0	6,579	0	0,00
H S	24	24,43	0,9960	54,9	6,343	1	1,05
H G S	24	24,46	0,9942	69,2	6,457	0	0,00
<b>Vollath F4 Symmetrisch</b>							
ohne	24	24,16	0,9970	122,2	6,098	9	1,19
G	24	24,27	0,9213	194,8	7,011	0	0,00
S	24	24,18	0,9985	133,3	6,080	10	1,23
G S	24	24,28	0,9767	194,4	6,559	1	1,05
H	24	24,33	0,9966	58,1	6,279	3	1,15
H G	24	24,36	0,9745	81,9	6,495	0	0,00
H S	24	24,33	0,9975	61,7	6,270	2	1,06
H G S	24	24,37	0,9956	76,5	6,363	0	0,00
<b>DCT Shannon Entropie</b>							
ohne	24,5	23,30	0,8588	640,2	11,259	0	0,00
G	24,5	23,32	0,8612	704,6	11,263	0	0,00
S	25	16,98	0,4963	741,4	36,587	0	0,00
G S	25	16,94	0,5024	704,2	40,520	0	0,00
H	24	23,62	0,9227	197,9	11,000	0	0,00
H G	24	23,64	0,9227	219,2	11,072	0	0,00
H S	24,5	19,93	0,6576	198,9	29,405	0	0,00
H G S	24,5	19,99	0,6536	213,5	-18,997	0	0,00

**Tabelle A.5.:** Vergleich der Fokusmetriken im Gehirn einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. Teil 2. **G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.

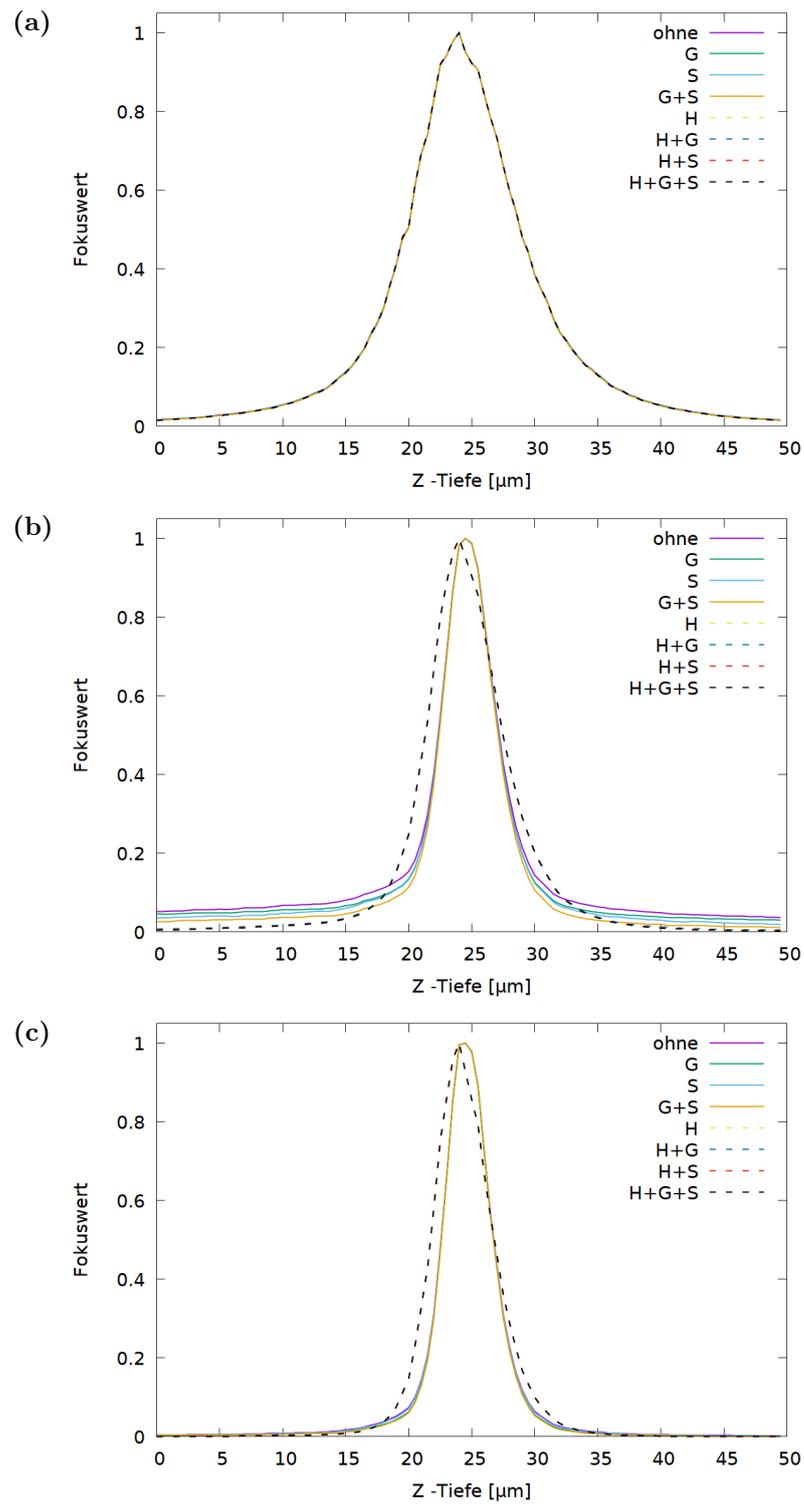


**Abbildung A.3.:** Optimierung der Fokusmetriken im Gehirn einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. **(a):** Vollath F4. **(b):** Vollath F4, symmetrisch. **(c):** Normierte DCTS Shannon Entropie.

**G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.

	Max [ $\mu\text{m}$ ]	CoM [ $\mu\text{m}$ ]	$h$	t [ms]	FWHM [ $\mu\text{m}$ ]	<i>Maxima</i>	$\frac{Max}{Nachbar}$
<b>Quadrierte FFT</b>							
ohne	24	24,57	0,9843	51,1	9,141	0	0,00
G	24	24,57	0,9844	126,0	9,145	0	0,00
S	24	24,57	0,9854	63,8	9,107	0	0,00
G S	24	24,57	0,9854	125,2	9,115	0	0,00
H	24	24,57	0,9849	52,1	9,154	0	0,00
H G	24	24,57	0,9846	77,0	9,183	0	0,00
H S	24	24,57	0,9855	56,9	9,130	0	0,00
H G S	24	24,57	0,9854	70,7	9,167	0	0,00
<b>FFT mit Hochpass</b>							
ohne	24,5	24,04	0,9627	50,6	4,864	0	0,00
G	24,5	24,02	0,9698	125,6	4,782	0	0,00
S	24,5	24,03	0,9805	63,8	4,771	0	0,00
G S	24,5	24,01	0,9883	125,1	4,698	0	0,00
H	24	24,54	0,9966	51,9	6,209	0	0,00
H G	24	24,54	0,9955	76,5	6,239	0	0,00
H S	24	24,54	0,9974	56,8	6,207	0	0,00
H G S	24	24,54	0,9976	70,4	6,230	0	0,00
<b>Kombinierte FFT</b>							
ohne	24,5	24,56	0,9982	52,5	4,204	0	0,00
G	24,5	24,56	0,9987	126,2	4,169	0	0,00
S	24,5	24,56	0,9988	64,7	4,199	0	0,00
G S	24,5	24,56	0,9992	126,1	4,157	0	0,00
H	24	24,44	0,9998	51,8	5,075	0	0,00
H G	24	24,44	0,9998	76,8	5,098	0	0,00
H S	24	24,44	0,9998	56,8	5,075	0	0,00
H G S	24	24,44	0,9999	70,8	5,097	0	0,00

**Tabelle A.6.:** Vergleich der Fokusmetriken im Gehirn einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. Teil 3. **G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.



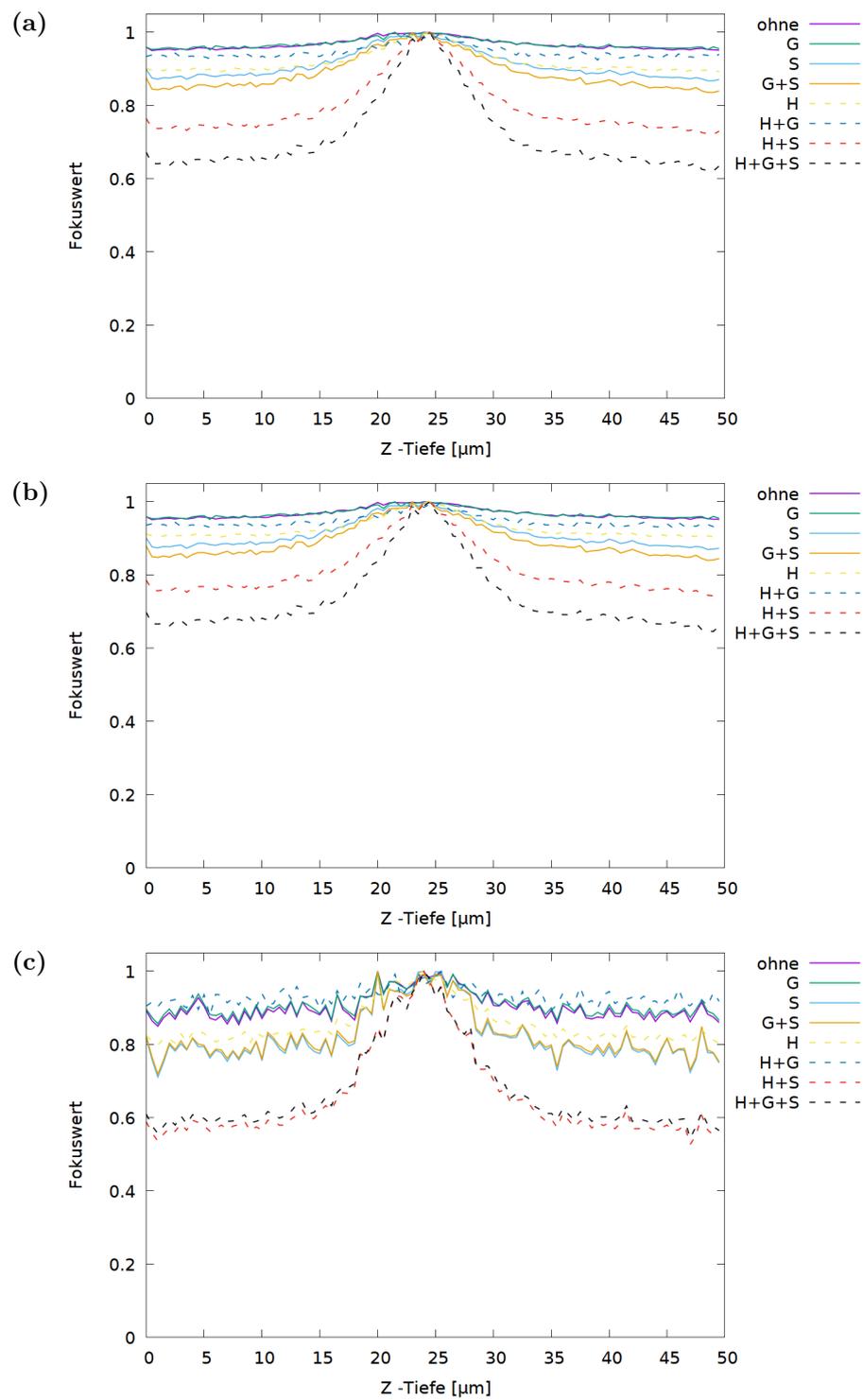
**Abbildung A.4.:** Optimierung der Fokusmetriken im Gehirn einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. (a): Quadrierte FFT. (b): FFT mit Hochpassfilter. (c): Kombinierte FFT.

**G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.

### A.5.2. Fokusmetriken im Rückenmark einer Zebrafischlarve (Schwachtes Bildsignal)

	Max [ $\mu\text{m}$ ]	CoM [ $\mu\text{m}$ ]	$h$	t [ms]	<i>Maxima</i>	FWHM [ $\mu\text{m}$ ]	$\frac{Max}{Nachbar}$
<b>Tenengrad</b>							
ohne	24	24,31	0,0501	200,8	0	-20,564	0,00
G	21,5	24,43	0,0484	256,2	0	-1792,524	0,00
S	24,5	23,97	0,1317	196,0	0	-69,634	0,00
G S	24,5	23,94	0,1654	258,4	0	-49,887	0,00
H	24,5	24,26	0,1081	89,8	0	245,954	0,00
H G	25,5	24,55	0,0764	109,1	0	-553,475	0,00
H S	24,5	24,03	0,2786	88,8	0	-531,802	0,00
H G S	24,5	24,06	0,3787	103,6	0	59,938	0,00
<b>Scharr</b>							
ohne	24	24,30	0,0490	202,2	0	-17,844	0,00
G	21,5	24,42	0,0477	257,1	0	3028,476	0,00
S	24,5	23,97	0,1297	197,3	0	-86,795	0,00
G S	24,5	23,94	0,1602	258,8	0	-40,890	0,00
H	24,5	24,27	0,0974	90,8	0	162,765	0,00
H G	25,5	24,54	0,0743	109,1	0	-805,491	0,00
H S	24,5	24,01	0,2570	89,1	0	-311,436	0,00
H G S	24,5	24,03	0,3540	103,8	0	61,539	0,00
<b>Quadrierter Laplace-Filter</b>							
ohne	20	24,58	0,1501	174,2	1	51,703	1,06
G	20	24,62	0,1425	239,2	1	53,675	1,06
S	24	24,47	0,2887	179,3	8	26,724	1,07
G S	20	24,43	0,2809	240,8	7	25,641	1,06
H	24	24,53	0,2013	82,2	0	101,948	0,00
H G	25,5	24,80	0,1222	104,0	1	685,406	1,06
H S	24	24,22	0,4732	84,6	7	34,857	1,07
H G S	24	24,21	0,4561	99,1	6	-20,098	1,06

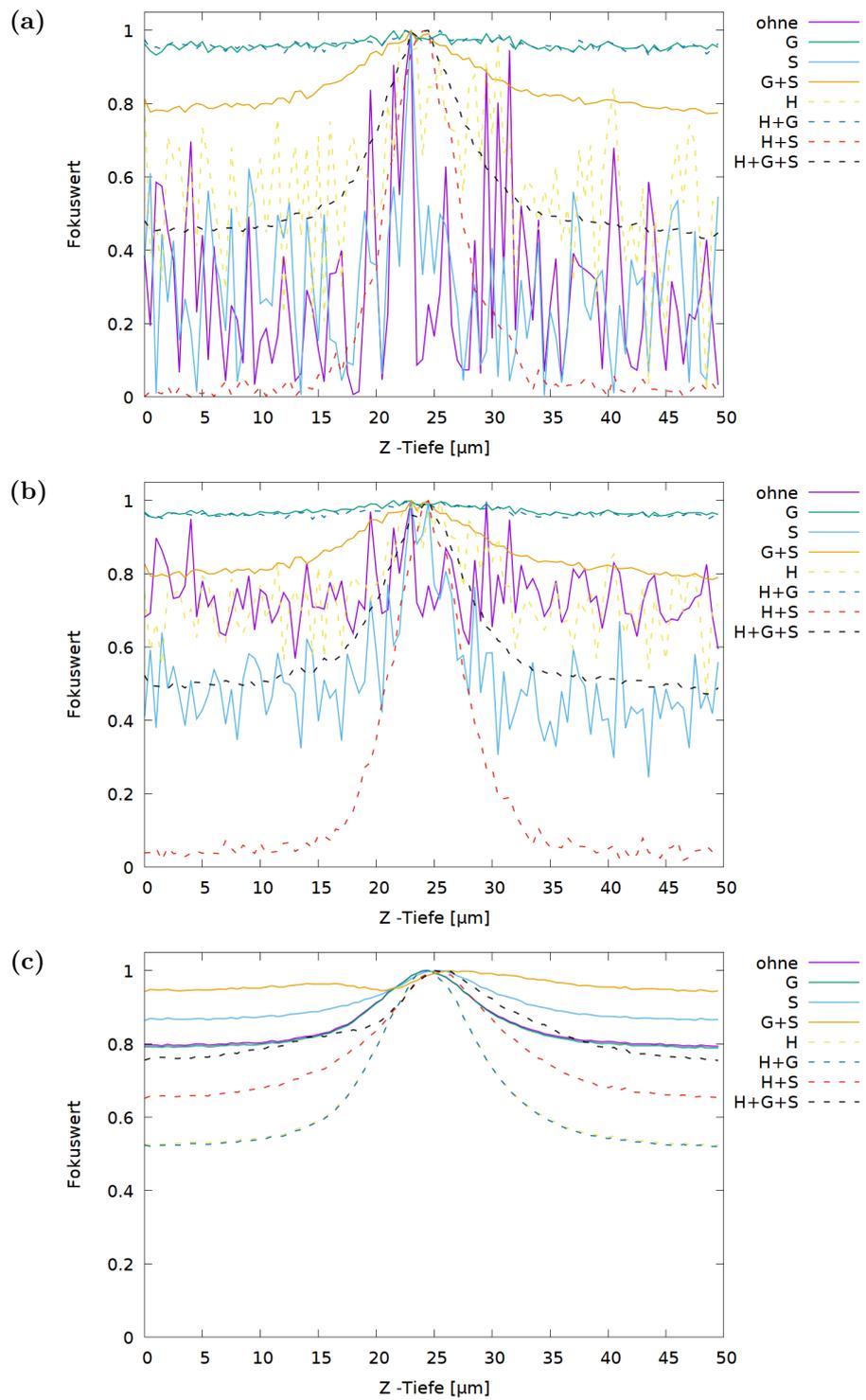
**Tabelle A.7.:** Vergleich der Fokusmetriken im Rückenmark einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. Teil 1. **G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.



**Abbildung A.5.:** Optimierung der Fokusmetriken im Rückenmark einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. **(a):** Tenengrad. **(b):** Scharr. **(c):** Quadrierter Laplace-Filter. **G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.

	Max [ $\mu\text{m}$ ]	CoM [ $\mu\text{m}$ ]	$h$	t [ms]	<i>Maxima</i>	FWHM [ $\mu\text{m}$ ]	$\frac{Max}{Nachbar}$
<b>Vollath F4</b>							
ohne	23	24,49	-	50,5	28	28,310	2,73
G	22,5	24,76	0,0672	125,4	0	4600,363	0,00
S	23	23,76	-	66,3	32	-42,542	2,60
G S	23	24,05	0,2269	127,6	0	76,408	0,00
H	22,5	24,29	-	50,7	36	25,842	1,56
H G	25,5	24,13	0,0684	75,4	0	11,267	0,00
H S	24,5	24,54	0,9996	56,1	23	6,846	2,68
H G S	24,5	24,15	0,5676	70,4	1	20,822	1,05
<b>Vollath F4 Symmetrisch</b>							
ohne	23	24,23	0,4309	122,9	28	30,846	1,16
G	21,5	24,60	0,0470	196,7	0	1249,947	0,00
S	23	23,72	0,7548	136,6	35	34,661	1,31
G S	23	23,99	0,2153	197,9	0	372,880	0,00
H	25,5	24,74	0,5259	57,4	31	45,877	1,15
H G	25,5	24,54	0,0532	82,0	0	-324,888	0,00
H S	24,5	24,65	0,9813	61,9	22	6,866	1,47
H G S	24,5	24,19	0,5272	76,4	1	42,783	1,06
<b>DCT Shannon Entropie</b>							
ohne	24,5	24,69	0,2062	640,4	0	621,117	0,00
G	24,5	24,70	0,2106	704,9	0	17,481	0,00
S	25,5	25,33	0,1360	1134,2	0	-114,266	0,00
G S	26,5	26,46	0,0567	706,5	0	-2324,883	0,00
H	24,5	24,76	0,4756	198,0	0	7,046	0,00
H G	24,5	24,77	0,4795	219,4	0	-47,479	0,00
H S	25	25,34	0,3483	210,1	0	49,500	0,00
H G S	26	25,69	0,2446	214,4	0	49,500	0,00

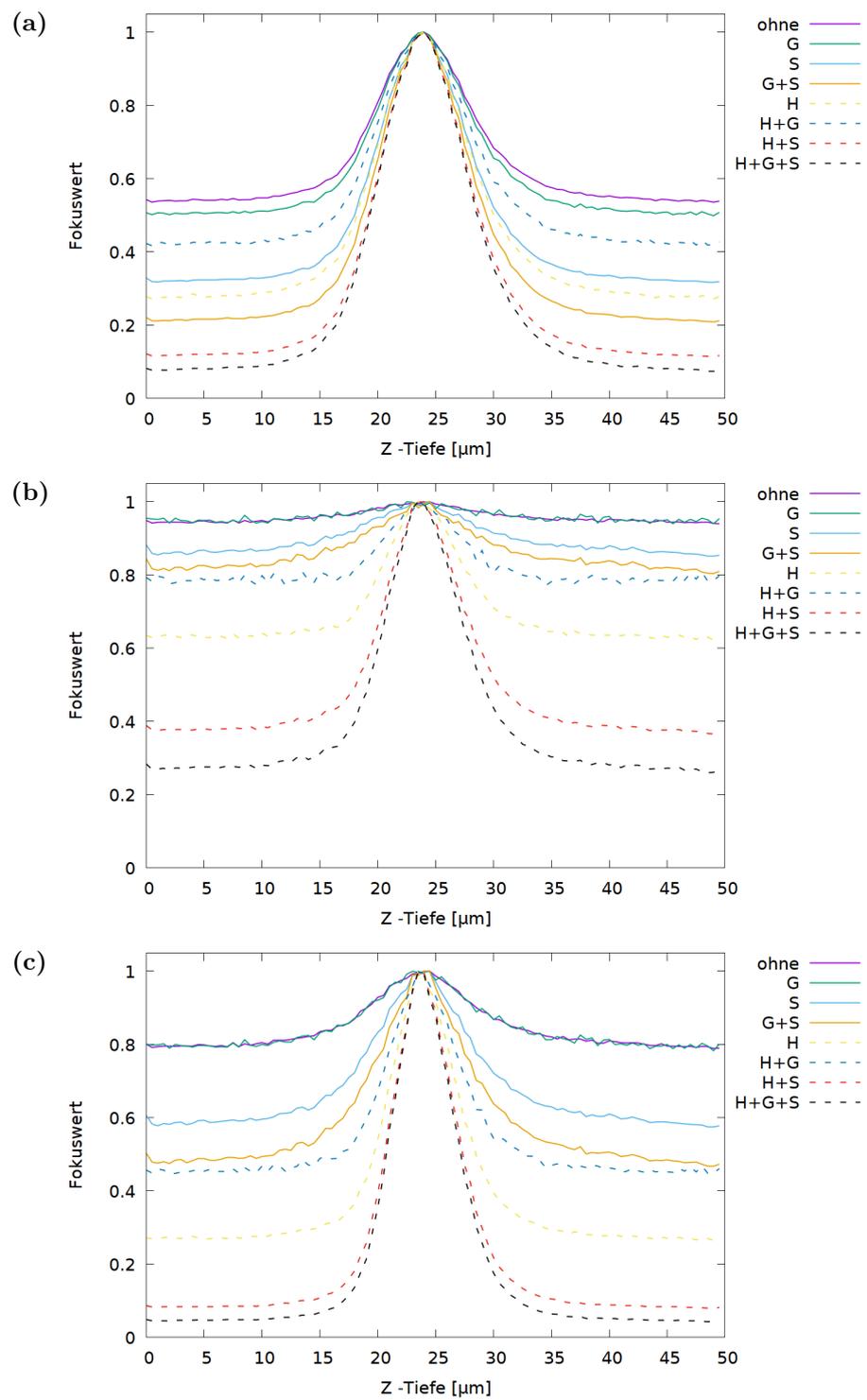
**Tabelle A.8.:** Vergleich der Fokusmetriken im Rückenmark einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. Teil 2. textbfG: Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.



**Abbildung A.6.:** Optimierung der Fokusmetriken im Rückenmark einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. **(a):** Vollath F4. **(b):** Vollath F4, symmetrisch. **(c):** Normierte DCTS Shannon Entropie. **G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.

	Max [ $\mu\text{m}$ ]	CoM [ $\mu\text{m}$ ]	$h$	t [ms]	<i>Maxima</i>	FWHM [ $\mu\text{m}$ ]	$\frac{Max}{Nachbar}$
<b>Quadrierte FFT</b>							
ohne	24	24,38	0,4640	50,8	0	228,376	0,00
G	24	24,40	0,5012	125,8	0	36,429	0,00
S	24	24,31	0,6833	65,9	0	12,608	0,00
G S	24	24,32	0,7906	127,4	0	10,732	0,00
H	24	24,37	0,7282	51,5	0	11,964	0,00
H G	24	24,40	0,5834	76,6	0	16,815	0,00
H S	24	24,32	0,8861	56,9	0	9,620	0,00
H G S	24	24,33	0,9247	71,2	1	9,323	1,07
<b>FFT mit Hochpass</b>							
ohne	24,5	24,33	0,0599	50,9	0	114,617	0,00
G	22,5	24,39	0,0602	124,9	0	-1726,346	0,00
S	24,5	24,07	0,1483	66,1	0	449,103	0,00
G S	24,5	24,00	0,1962	127,9	0	67,839	0,00
H	23,5	24,21	0,3765	51,8	0	-47,299	0,00
H G	23,5	24,50	0,2285	76,3	0	37,021	0,00
H S	24	24,19	0,6338	56,7	0	12,474	0,00
H G S	23,5	24,21	0,7401	71,1	1	9,989	1,05
<b>Kombinierte FFT</b>							
ohne	24	24,36	0,2107	51,3	0	77,411	0,00
G	23	24,39	0,2168	125,8	0	-187,621	0,00
S	24	24,21	0,4252	66,8	0	113,940	0,00
G S	24,5	24,18	0,5323	128,6	0	26,462	0,00
H	23,5	24,24	0,7349	52,1	0	8,910	0,00
H G	23,5	24,34	0,5534	76,5	0	23,239	0,00
H S	23,5	24,20	0,9207	57,2	0	6,849	0,00
H G S	23,5	24,19	0,9565	71,5	1	6,448	1,08

**Tabelle A.9.:** Vergleich der Fokusmetriken im Rückenmark einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. Teil 3. **G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.



**Abbildung A.7.:** Optimierung der Fokustrimetrien im Rückenmark einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. **(a):** Quadrierte FFT. **(b):** FFT mit Hochpassfilter. **(c):** Kombinierte FFT. **G:** Gaußfilter. **S:** Schwellwert. **H:** Herunterskalierung.

# Literaturverzeichnis

- [1] Akerboom, Jasper, Jonathan D Vélez Rivera, María M Rodríguez Guilbe, Elisa C Alfaro Malavé, Hector H Hernandez, Lin Tian, S Andrew Hires, Jonathan S Marvin, Loren L Looger und Eric R Schreiter: *Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design*. Journal of biological chemistry, 284(10):6455–6464, 2009.
- [2] Arlt, Jochen und Kishan Dholakia: *Generation of high-order Bessel beams by use of an axicon*. Optics Communications, 177(1-6):297–301, 2000.
- [3] Atkins, Peter William und De Paula, Julio: *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2013.
- [4] Baumgart, Eugen und Ulrich Kubitscheck: *Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection*. Optics Express, 20:21805–21814, August 2012.
- [5] Bergmann, Katharina, Paola Meza Santoscoy, Konstantinos Lygdas, Yulia Nikolaeva, Ryan B MacDonald, Vincent T Cunliffe und Anton Nikolaev: *Imaging neuronal activity in the optic tectum of late stage larval zebrafish*. Journal of developmental biology, 6(1):6, 2018.
- [6] Birey, Fikri und Adan Aguirre: *Age-dependent netrin-1 signaling regulates NG2+ glial cell spatial homeostasis in normal adult gray matter*. Journal of Neuroscience, 35(17):6946–6951, 2015.
- [7] Bourke, Paul: *Cross correlation*, 1996. <http://paulbourke.net/miscellaneous/correlate/>, besucht: 2020-08-01.
- [8] Brenner, John F, Brock S Dew, J Brian Horton, Thomas King, Peter W Neurath und William D Selles: *An automated microscope for cytologic research a preliminary evaluation*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 24(1):100–111, 1976.
- [9] Bürgers, Jana: *Realization of Two-Color Excitation and Detection in a Multiphoton Scanned Light-Sheet Microscope*. Diplomarbeit, Universität Bonn, 2016. Universität Bonn.

- [10] Budwig, R: *Refractive index matching methods for liquid flow investigations*. Experiments in fluids, 17(5):350–355, 1994.
- [11] Chalfie, Martin, Yuan Tu, Ghia Euskirchen, William W Ward und Douglas C Prasher: *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 263(5148):802–805, 1994.
- [12] Chen, Fei, Paul W Tillberg und Edward S Boyden: *Expansion microscopy*. Science, 347(6221):543–548, 2015.
- [13] Chmielewski, Aleksander K, Anders Kyrsting, Pierre Mahou, Matthew T Wayland, Leila Muresan, Jan Felix Evers und Clemens F Kaminski: *Fast imaging of live organisms with sculpted light sheets*. Scientific reports, 5:9385, 2015.
- [14] Cox, Guy: *Optical imaging techniques in cell biology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2012.
- [15] Cremer, Christoph: *Lichtmikroskopie unterhalb des Abbe-Limits. Lokalisationsmikroskopie*. Physik in unserer Zeit, 42(1):21–29, 2011.
- [16] Durnin, JJA: *Exact solutions for nondiffracting beams. I. The scalar theory*. JOSA A, 4(4):651–654, 1987.
- [17] Durnin, JJJM, JJ Miceli Jr und JH Eberly: *Diffraction-free beams*. Physical review letters, 58(15):1499, 1987.
- [18] Eichler, Jürgen, Lothar Dünkel und Bernd Eppich: *Die Strahlqualitaet von Lasern–Wie bestimmt man Beugungsmasszahl und Strahldurchmesser in der Praxis?* Laser Technik Journal, 1(2):63–66, 2004.
- [19] Fahrbach, Florian O, Vasily Gurichenkov, Kévin Alessandri, Pierre Nassoy und Alexander Rohrbach: *Light-sheet microscopy in thick media using scanned Bessel beams and two-photon fluorescence excitation*. Optics express, 21(11):13824–13839, 2013.
- [20] Fahrbach, Florian O, Fabian F Voigt, Benjamin Schmid, Fritjof Helmchen und Jan Huisken: *Rapid 3D light-sheet microscopy with a tunable lens*. Optics express, 21(18):21010–21026, 2013.
- [21] Gerlai, Robert: *A small fish with a big future: zebrafish in behavioral neuroscience*. Reviews in the Neurosciences, 22(1):3–4, 2011.

- [22] Groen, Frans CA, Ian T Young und Guido Ligthart: *A comparison of different focus functions for use in autofocus algorithms*. Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 6(2):81–91, 1985.
- [23] Guizar-Sicairos, Manuel, Samuel T Thurman und James R Fienup: *Efficient subpixel image registration algorithms*. Optics letters, 33(2):156–158, 2008.
- [24] Hassan, Yassin A und EE Dominguez-Ontiveros: *Flow visualization in a pebble bed reactor experiment using PIV and refractive index matching techniques*. Nuclear Engineering and Design, 238(11):3080–3085, 2008.
- [25] Hecht, Eugene und Karen Lippert: *Optik*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, Berlin, 7. Auflage, 2018.
- [26] Herman, RM und TA Wiggins: *Production and uses of diffractionless beams*. JOSA A, 8(6):932–942, 1991.
- [27] Howe, Kerstin, Matthew D Clark, Carlos F Torroja, James Torrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E Collins, Sean Humphray, Karen McLaren, Lucy Matthews *et al.*: *The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome*. Nature, 496(7446):498–503, 2013.
- [28] Hubert, Antoine, Fabrice Harms, Remy Juvénal, Pauline Treimany, Xavier Levecq, Vincent Lorientte, Georges Farkouh, François Rouyer und Alexandra Fragola: *Adaptive optics light-sheet microscopy based on direct wavefront sensing without any guide star*. Optics letters, 44(10):2514–2517, 2019.
- [29] Hughes, Ethan G, Shin H Kang, Masahiro Fukaya und Dwight E Bergles: *Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain*. Nature neuroscience, 16(6):668–676, 2013.
- [30] Huisken, Jan und Didier YR Stainier: *Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology*. Development, 136(12):1963–1975, 2009.
- [31] Huisken, Jan, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt und Ernst HK Stelzer: *Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy*. Science, 305(5686):1007–1009, 2004.
- [32] Jain, Aadhar, Allen HJ Yang und David Erickson: *Gel-based optical waveguides with live cell encapsulation and integrated microfluidics*. Optics letters, 37(9):1472–1474, 2012.

- [33] Kalueff, Allan V, Adam Michael Stewart und Robert Gerlai: *Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders*. Trends in pharmacological sciences, 35(2):63–75, 2014.
- [34] Keller, Philipp J und Hans Ulrich Dodt: *Light sheet microscopy of living or cleared specimens*. Current opinion in neurobiology, 22(1):138–143, 2012.
- [35] Keller, Philipp J, Annette D Schmidt, Joachim Wittbrodt und Ernst HK Stelzer: *Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy*. science, 322(5904):1065–1069, 2008.
- [36] Kimmel, Charles B, William W Ballard, Seth R Kimmel, Bonnie Ullmann und Thomas F Schilling: *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Developmental dynamics, 203(3):253–310, 1995.
- [37] Kirschbaum, Clemens: *Biopsychologie von A bis Z*. Springer-Verlag, Heidelberg, 2008.
- [38] K.K., Hamamatsu Photonics: *ORCA-Flash4.0 V3 Digital CMOS Camera C13440-20CU / C13440-20CU01 Instruction manual*, 2018. [https://www.hamamatsu.com/sp/sys/en/manual/C13440-20CU\\_IM\\_En.pdf](https://www.hamamatsu.com/sp/sys/en/manual/C13440-20CU_IM_En.pdf), besucht: 2020-02-10.
- [39] Kristan, Matej, Janez Perš, Matej Perše und Stanislav Kovačič: *A Bayes-spectral-entropy-based measure of camera focus using a discrete cosine transform*. Pattern Recognition Letters, 27(13):1431–1439, 2006.
- [40] Kubitscheck, Ulrich (Hrsg.): *Fluorescence microscopy*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2013.
- [41] Lüllmann-Rauch, Renate: *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2009.
- [42] Michalski, John Paul und Rashmi Kothary: *Oligodendrocytes in a nutshell*. Frontiers in cellular neuroscience, 9:340, 2015.
- [43] Michelson, Albert Abraham: *Studies in optics*. Courier Corporation, North Chelmsford, Massachusetts, 1995.
- [44] Milne, Graham, Gavin DM Jeffries und Daniel T Chiu: *Tunable generation of Bessel beams with a fluidic axicon*. Applied physics letters, 92(26):261101, 2008.

- [45] Müllenbroich, M Caroline, Ludovico Silvestri, Leonardo Onofri, Irene Costantini, Marcel van't Hoff, Leonardo Sacconi, Giulio Iannello und Francesco S Pavone: *Comprehensive optical and data management infrastructure for high-throughput light-sheet microscopy of whole mouse brains*. *Neurophotonics*, 2(4):041404, 2015.
- [46] Murphy, Douglas B: *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2002.
- [47] Nagarajan, Bhuvaneswari, Alexander Harder, Anna Japp, Felix Häberlein, Enrico Mingardo, Henning Kleinert, Öznur Yilmaz, Angelika Zoons, Birgit Rau, Andrea Christ *et al.*: *CNS myelin protein 36K regulates oligodendrocyte differentiation through Notch*. *Glia*, 2019.
- [48] Nayar, Shree K und Yasuo Nakagawa: *Shape from focus*. *IEEE Transactions on Pattern analysis and machine intelligence*, 16(8):824–831, 1994.
- [49] Osibote, OA, R Dendere, S Krishnan und TS Douglas: *Automated focusing in bright-field microscopy for tuberculosis detection*. *Journal of microscopy*, 240(2):155–163, 2010.
- [50] Osterhout, Donna J, Amy Wolven, Rebecca M Wolf, Marilyn D Resh und Moses V Chao: *Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase*. *The Journal of cell biology*, 145(6):1209–1218, 1999.
- [51] Pawley, James: *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer Science & Business Media, Heidelberg, 2010.
- [52] Pawlicki, Miłosz, Hazel A Collins, Robert G Denning und Harry L Anderson: *Zwei-photonenabsorption und das Design von Zweiphotonenfarbstoffen*. *Angewandte Chemie*, 121(18):3292–3316, 2009.
- [53] Peli, Eli: *Contrast in complex images*. *JOSA A*, 7(10):2032–2040, 1990.
- [54] Planchon, Thomas A, Liang Gao, Daniel E Milkie, Michael W Davidson, James A Galbraith, Catherine G Galbraith und Eric Betzig: *Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination*. *Nature methods*, 8(5):417, 2011.
- [55] Power, Rory M und Jan Huisken: *A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging*. *Nature methods*, 14(4):360, 2017.

- [56] Ritchie, Joseph Murdoch: *On the relation between fibre diameter and conduction velocity in myelinated nerve fibres*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences, 217(1206):29–35, 1982.
- [57] Royer, Loïc A, William C Lemon, Raghav K Chhetri, Yinan Wan, Michael Coleman, Eugene W Myers und Philipp J Keller: *Adaptive light-sheet microscopy for long-term, high-resolution imaging in living organisms*. Nature biotechnology, 34(12):1267, 2016.
- [58] Saleh, Bahaa EA und Malvin Carl Teich: *Grundlagen der Photonik*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008.
- [59] Santi, Peter A: *Light sheet fluorescence microscopy: a review*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 59(2):129–138, 2011.
- [60] Scharr, Hanno: *Optimale Operatoren in der digitalen Bildverarbeitung*. Dissertation, 2000.
- [61] Schneider, Marilyn B und Watt W Webb: *Measurement of submicron laser beam radii*. Applied Optics, 20(8):1382–1388, 1981.
- [62] Self, Sidney A: *Focusing of spherical Gaussian beams*. Applied optics, 22(5):658–661, 1983.
- [63] Shah, Gopi, Michael Weber und Jan Huiskens: *Light sheet microscopy*. Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications, 2017.
- [64] Sheppard, Colin JR und David M Shotton: *Confocal laser scanning microscopy*. BIOS Scientific Publishers, Milton Park, England, 1997.
- [65] Shi, Lingyan, Adrián Rodríguez-Contreras und Robert R Alfano: *Gaussian beam in two-photon fluorescence imaging of rat brain microvessel*. Journal of biomedical optics, 19(12):126006, 2014.
- [66] Silvestri, L, L Sacconi und FS Pavone: *Correcting spherical aberrations in confocal light sheet microscopy: a theoretical study*. Microscopy research and technique, 77(7):483–491, 2014.
- [67] So, Peter TC: *Two-photon Fluorescence Light Microscopy*. eLS, 2001.
- [68] So, Peter TC, Chen Y Dong, Barry R Masters und Keith M Berland: *Two-photon excitation fluorescence microscopy*. Annual review of biomedical engineering, 2(1):399–429, 2000.

- [69] Sobotta, Johannes und Ulrich Welsch: *Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*. Urban & Fischer, München, 2003.
- [70] Spassky, Nathalie, Christelle Olivier, Immaculada Cobos, Barbara LeBras, Cécile Goujet-Zalc, Salvador Martínez, Bernard Zalc und Jean Léon Thomas: *The early steps of oligodendrogenesis: insights from the study of the plp lineage in the brain of chicks and rodents*. *Developmental neuroscience*, 23(4-5):318–326, 2001.
- [71] Stelzer, Ernst HK: *Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology*. *Nature methods*, 12(1):23–26, 2015.
- [72] Sun, Yu, Stefan Duthaler und Bradley J Nelson: *Autofocusing algorithm selection in computer microscopy*. In: *2005 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*, Seiten 70–76. IEEE, 2005.
- [73] Theer, Patrick, Mazahir T Hasan und Winfried Denk: *Two-photon imaging to a depth of 1000  $\mu\text{m}$  in living brains by use of a Ti: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> regenerative amplifier*. *Optics letters*, 28(12):1022–1024, 2003.
- [74] Tian, Yibin: *Monte Carlo evaluations of ten focus measures*. In: *Digital Photography III*, Band 6502, Seite 65020C. International Society for Optics and Photonics, 2007.
- [75] Tian, Yibin, Kevin Shieh und Christine F Wildsoet: *Performance of focus measures in the presence of nondefocus aberrations*. *JOSA A*, 24(12):B165–B173, 2007.
- [76] Vilella, Albert J, Jessica Severin, Abel Ureta-Vidal, Li Heng, Richard Durbin und Ewan Birney: *EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates*. *Genome research*, 19(2):327–335, 2009.
- [77] Vogel, Helmut: *Gerthsen Physik*. Springer Verlag, Wiesbaden, 19. Aufl. Auflage, 1997.
- [78] Voie, Arne H, DH Burns und FA Spelman: *Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens*. *Journal of microscopy*, 170(3):229–236, 1993.
- [79] Vollath, D: *The influence of the scene parameters and of noise on the behaviour of automatic focusing algorithms*. *Journal of microscopy*, 151(2):133–146, 1988.
- [80] Wang, Qi, Bo Shui, Michael I Kotlikoff und Holger Sondermann: *Structural basis for calcium sensing by GCaMP2*. *Structure*, 16(12):1817–1827, 2008.

- 
- [81] Weisenburger, Siegfried, Robert Prevedel und Alipasha Vaziri: *Quantitative evaluation of two-photon calcium imaging modalities for high-speed volumetric calcium imaging in scattering brain tissue*. bioRxiv, Seite 115659, 2017.
- [82] Westheimer, Gerald: *The oscilloscopic view: retinal illuminance and contrast of point and line targets*. Vision Research, 25(8):1097–1103, 1985.
- [83] Wöhrle, Dieter, Michael W Tausch und Wolf Dieter Stohrer: *Photochemie: Konzepte, Methoden, Experimente*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2012.
- [84] Yeo, TTE, SH Ong, R Sinniah *et al.*: *Autofocusing for tissue microscopy*. Image and vision computing, 11(10):629–639, 1993.
- [85] Zuchero, J Bradley, Meng meng Fu, Steven A Sloan, Adiljan Ibrahim, Andrew Olson, Anita Zaremba, Jason C Dugas, Sophia Wienbar, Andrew V Caprariello, Christopher Kantor *et al.*: *CNS myelin wrapping is driven by actin disassembly*. Developmental cell, 34(2):152–167, 2015.

# Abbildungsverzeichnis

1.1. Durchlichtaufnahme einer 3 Tage alten Zebrafischlarve. . . . .	2
1.2. Evolution des Zebrafischgenoms. . . . .	2
1.3. Prinzip der Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie. . . . .	3
1.4. Prinzip der Fluoreszenz. . . . .	6
1.5. Prinzip der 2P-Absorption. . . . .	8
1.6. Erzeugung von Besselstrahlen durch ein Axicon. . . . .	10
2.1. Fotografie des Probenhalters. . . . .	16
2.2. Schematische Darstellung des Beleuchtungsstrahlengangs. . . . .	19
2.3. Schematische Darstellung der Detektion. . . . .	20
2.4. Schema des Bildsensors. . . . .	21
3.1. Gestreutes Licht eines Gaußstrahls in der Wand eines FEP-Röhrchens. . . . .	28
3.2. Radiale Strahlmitte. . . . .	29
3.3. Rauschlevel für ausgewählte Strahlarten. . . . .	31
3.4. X-Position der Strahlmitte. . . . .	32
3.5. Strahlverkipfung orthogonal zur Fokalebene des Detektionsobjektives. . . . .	33
3.6. $\omega_0(z)$ für verschiedene Z-Positionen. . . . .	34
3.7. Verschiebung der Strahlmitte bei unterschiedlichen Winkeln $\Phi$ . . . . .	35
3.8. $z_{min}(x)$ . . . . .	35
3.9. Verkipfung der Scanachsen gegen die Detektionsrichtung. . . . .	37
3.10. Auslenkung der Spiegelachsen. . . . .	38
3.11. Laserstrahl bei unterschiedlichen Spannungen am Scanspiegel. . . . .	39
3.12. Verschiebung des Strahls in Z-Richtung. . . . .	40
3.13. Winkel $\Theta$ zwischen der Bildebene und der Scanebene. . . . .	41
4.1. Verteilung der Laserintensität auf die Beleuchtungsarme L und R. . . . .	44
4.2. Gaußstrahlen bei 1P-Streuung und 2P-Fluoreszenz. . . . .	46
4.3. Profile eines fokussierten Gaußstrahls. . . . .	46
4.4. Berechnete Intensität eines Besselstrahls bei verschiedenen Vergrößerungen. . . . .	50

4.5. Theoretischer Vergleich zwischen Gauß- und Besselstrahlen. . . . .	51
4.6. Layout der Besselbeleuchtung in <i>Zemax</i> . . . . .	53
4.7. Besselstrahlen bei 1P-Streuung und 2P-Fluoreszenz. . . . .	54
4.8. Vergleich zwischen Bessel- und Gaußstrahlen. . . . .	55
4.9. Mit Gauß- und Besselstrahlen aufgenommene Nanopartikel. . . . .	57
4.10. Zellen im Rückenmark einer zwei Tage alten Zebrafischlarve. . . . .	58
4.11. Zellen im Gehirn einer fünf Tage alten Zebrafischlarve. . . . .	58
4.12. Nanopartikel bei unterschiedlichen Schlitzbreiten $s_B$ des <i>Rolling Shutter</i> . . . . .	60
4.13. Helligkeit und des Kontrast von Nanopartikeln . . . . .	60
4.14. Konventionelle und konfokale Abbildung in Zebrafischlarven. . . . .	62
4.15. Intensitätsprofile zu Abbildungen in Zebrafischlarven . . . . .	62
4.16. Seitenansicht von konventioneller und konfokaler Abbildung. . . . .	63
4.17. Querschnitte durch die gemittelten Punktspreizfunktionen. . . . .	64
5.1. Erzeugte Lichtscheiben bei unterschiedlichen Scangeschwindigkeiten. . . . .	67
5.2. Bestimmung der Verzögerung $d$ aus $\mathbf{i}$ . . . . .	69
5.3. Messungen zur Trägheit der Scanspiegel. . . . .	69
5.4. Messung der Aufnahmezeit in 3D. . . . .	71
5.5. Selektive Tiefenansteuerung. . . . .	72
5.6. Experiment im optischen Tektum einer Zebrafischlarve. . . . .	74
5.7. Übersichtsaufnahme des optischen Tektums. . . . .	74
5.8. Dreidimensionale Ansicht der Neuronenaktivität in sechs Z-Ebenen. . . . .	76
5.9. Neuronenantwort auf sechs Lichtpulse im linken Optischen Tektum. . . . .	77
5.10. Neuronenantwort auf sechs Lichtpulse im rechten Optischen Tektum. . . . .	78
5.11. Relative Helligkeit der Synapsen R1 und R2 als Funktion der Zeit. . . . .	79
5.12. Übersicht zur Neuronenaktivität im optischen Tektum einer Zebrafischlarve. . . . .	80
5.13. Zeitlicher Verlauf der Neuronenaktivität in einer Z-Ebene. . . . .	81
6.1. Mögliche Probleme bei Langzeitaufnahmen. . . . .	84
6.2. Darstellung der Probleme. . . . .	85
7.1. Verlust des Z-Fokus bei einer Langzeitmessung. . . . .	88
7.2. Modifizierte Fibonacci-Folge. . . . .	90
7.3. Ausschnitte aus einem Bildstapel von fluoreszierenden Nanopartikeln. . . . .	93
7.4. Einfluss der DC-Komponente auf die Fokusmetrik der quadrierten FFT. . . . .	94
7.5. Messung des Stützradius $r_{0,rel}$ der OTF <i>normierten DCT Shannon Entropie</i> . . . . .	96
7.6. Messung des Stützradius $r_{0,rel}$ der OTF der <i>quadrierten FFT</i> . . . . .	97

7.7. Messung des Hochpass-Radius an fluoreszierenden Nanopartikeln. . . . .	99
7.8. Vorauswahl der Fokusmetriken. . . . .	100
7.9. Fokusmetriken im Gehirn einer Zebrafischlarve. . . . .	106
7.10. Fokusmetriken in einer schwach leuchtenden biologischen Probe. . . . .	108
7.11. Gauß-Anpassung mit verschiedenen Startwerten. . . . .	111
7.12. Autofokussierung mit einem Fokusartefakt. . . . .	112
8.1. Desynchronisierung zwischen Laser und <i>Rolling Shutter</i> . . . . .	114
8.2. Prinzip der Synchronisierung des konfokalen Detektors. . . . .	117
8.3. Übersichtsaufnahme fluoreszierender Nanopartikel für die Synchronisierung. . . . .	118
8.4. Aufnahmen $A_{X,Y,m}$ von Nanopartikeln. . . . .	119
8.5. Rekonstruierte Bilder $B_{X,M,n}$ fluoreszierender Nanopartikel. . . . .	120
8.6. Korrektur der $B_{X,M,n}$ . . . . .	121
8.7. Rekonstruierte Bilder $B_{X,K,n}^{korr}$ fluoreszierender Nanopartikel. . . . .	121
8.8. Helligkeit und Fokus in den $B_{X,K,n}^{korr}$ der virtuellen Detektoren $D_n$ . . . . .	122
8.9. Übersichtsaufnahme im Gehirn einer Zebrafischlarve. . . . .	123
8.10. Aufnahmen $A_{X,Y,m}$ in einer Zebrafischlarve. . . . .	123
8.11. Rekonstruierte Bilder $B_{X,M,n}$ in einer Zebrafischlarve. . . . .	124
8.12. Rekonstruierte $B_{X,K,n}^{korr}$ in einer Zebrafischlarve. . . . .	124
8.13. Helligkeit und Fokuswert der $B_{X,K,n}^{korr}$ in einer Zebrafischlarve. . . . .	125
9.1. Mögliche Verkippungen der Lichtscheibe. . . . .	127
9.2. Berechnung der Strahlverkippung aus der Autofokussierung. . . . .	128
9.3. Datenfilterung zur Messung der Strahlverkippungen. . . . .	130
9.4. Quantifizierung der Rekonstruktionsgenauigkeit von $\Theta$ . . . . .	131
9.5. Messung der Strahlverkippungen $\Psi_{exp}$ und $\Phi_{exp}$ . . . . .	132
10.1. Generierung von Maximumintensitätsprojektionen aus einem Bildstapel. . . . .	134
10.2. Synthetische Bildverschiebung. . . . .	136
10.3. Evaluierung der Algorithmen zur Messung der Bildverschiebung. . . . .	137
10.4. Langzeitmessung im Rückenmark einer Zebrafischlarve. . . . .	137
10.5. Gemessene Verschiebungen der Probe bei einer Langzeitmessung . . . . .	138
10.6. Automatische Bewegungskorrektur. . . . .	140
11.1. Z-Projektion mit Bewegungskorrektur. . . . .	144
11.2. Y-Projektion mit Bewegungskorrektur. . . . .	144
11.3. Korrektur der Probenverschiebung. . . . .	145
11.4. Unkorrigierte Verschiebung der Z-Projektion. . . . .	145

11.5. Unkorrigierte Verschiebung der Y-Projektion. . . . .	146
11.6. Fokuskorrekturen bei einer Langzeitmessung. . . . .	146
11.7. Winkel $\Phi$ und $\Psi$ . . . . .	147
11.8. Mittlere Bildhelligkeit von $P_Z$ . . . . .	147
11.9. Zwei-Stufen Modell der Myelinisierung. . . . .	148
11.10 Z-Projektion im Rückenmark einer Zebrafischlarve mit Korrekturen. . . . .	149
11.11 Y-Projektion im Rückenmark einer Zebrafischlarve mit Korrekturen. . . . .	150
11.12 Z-Projektion der obersten 35 $\mu\text{m}$ und der untersten 45 $\mu\text{m}$ der Bildstapel. . . . .	151
11.13 Dreidimensionale Darstellung der Bildstapel. . . . .	152
11.14 Anzahl migrierter OPCs. . . . .	152
11.15 Vergrößerung der Migration einer Oligodendrozyten-Vorläuferzelle. . . . .	153
11.16 Vergrößerung einer Oligodendrozyten-Vorläuferzelle. . . . .	154
A.1. Zemax Linsendaten-Editor. . . . .	169
A.2. Fokusmetriken im Gehirn einer Zebrafischlarve (1-3). . . . .	172
A.3. Fokusmetriken im Gehirn einer Zebrafischlarve (4-6). . . . .	174
A.4. Fokusmetriken im Gehirn einer Zebrafischlarve (7-9). . . . .	176
A.5. Optimierte Fokusmetriken im Rückenmark einer Zebrafischlarve (1-3). . . . .	178
A.6. Fokusmetriken im Rückenmark einer Zebrafischlarve (4-6). . . . .	180
A.7. Fokusmetriken im Rückenmark einer Zebrafischlarve (7-9). . . . .	182

# Tabellenverzeichnis

3.1. Charakteristische Radien von Besselstrahlen. . . . .	30
3.2. Rechenzeit des Strahlanalyseprogramms ohne Gaußanpassung. . . . .	32
3.3. Bestimmung des Verkippungswinkels $\Phi$ aus $\omega_{min,z}(x)$ . . . . .	36
4.1. Strahlparameter des 2P-Gaußstrahls. . . . .	47
4.2. Parameter eines Besselstrahls bei verschiedenen Vergrößerungen. . . . .	51
4.3. Strahlparameter des 2P-Besselstrahls. . . . .	56
4.4. Halbwertsbreiten der PSF fluoreszierender Nanopartikel. . . . .	64
7.1. Charakteristische Werte der Graphen ausgewählter Fokusfunktionen. . . .	101
7.2. Optimale Bildvorfilterungen der Fokusmetriken. . . . .	104
7.3. Optimierte Fokusmetriken im Gehirn einer Zebrafischlarve. . . . .	105
7.4. Optimierte Fokusmetriken im Rückenmark einer Zebrafischlarve. . . . .	107
A.1. Maximale Bildrate der Kamera. . . . .	168
A.2. Messung von $r_{HP,rel}$ an fluoreszierenden Nanopartikeln. . . . .	169
A.3. Messung des Stützradius der OTF an fluoreszierenden Nanopartikeln. . .	170
A.4. Fokusmetriken im Gehirn einer Zebrafischlarve. Teil 1. . . . .	171
A.5. Fokusmetriken im Gehirn einer Zebrafischlarve. Teil 3. . . . .	173
A.6. Fokusmetriken im Gehirn einer Zebrafischlarve. Teil 2. . . . .	175
A.7. Fokusmetriken im Rückenmark einer Zebrafischlarve. Teil 1. . . . .	177
A.8. Fokusmetriken im Rückenmark einer Zebrafischlarve. Teil 2. . . . .	179
A.9. Fokusmetriken im Rückenmark einer Zebrafischlarve. Teil 3. . . . .	181

# Abkürzungsverzeichnis

<b>1P</b>	Ein-Photonen
<b>2P</b>	Zwei-Photonen
<b>DC</b>	Direct Current
<b>DSL</b>	Digitally Scanned Light Sheet Microscopy
<b>FEP</b>	Perfluorethylenpropylen
<b>FFT</b>	Schnelle Fouriertransformation
<b>FWHM</b>	Halbwertsbreite (engl.: <i>full width half maximum</i> )
<b>GFP</b>	grün fluoreszierendes Protein
<b>HDD</b>	Hard Disk Drive
<b>MTF</b>	Modulationstransferfunktion
<b>NA</b>	Numerische Apertur
<b>LSFM</b>	Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie
<b>OPC</b>	Oligodendrocyte progenitor cell
<b>OTF</b>	Optische Transferfunktion
<b>PIFOC</b>	Piezo Focus
<b>PSF</b>	Punktspreizfunktion
<b>sCMOS</b>	scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor
<b>SPIM</b>	Selective Plane Illumination Microscopy
<b>SSD</b>	Solid-State-Drive
<b>TIFF</b>	Tagged Image File Format
<b>UDP</b>	User Datagram Protocol
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem