



# Optimierungsstrategien für die Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN (Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Physik des  
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)  
angenommene

DISSERTATION

von  
M. Sc. Manuel Hüpfel

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 2023  
Referent: Prof. Dr. Gerd Ulrich Nienhaus  
Korreferent: Prof. Dr. Heinz Kalt



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung . . . . .	5
2. Theoretische Grundlagen . . . . .	7
2.1. Fluoreszenz . . . . .	7
2.2. Abbildungstheorie . . . . .	10
2.3. Digitale Signalverarbeitung . . . . .	13
2.4. Wavelet-Transformation . . . . .	21
2.5. Entwicklung der Lichtscheibenmikroskopie . . . . .	25
3. Materialien und Methoden . . . . .	29
3.1. Aufbau des verwendeten Lichtscheibenmikroskops . . . . .	29
3.1.1. Anregungspfad . . . . .	29
3.1.2. Probenpositionierung . . . . .	33
3.1.3. Detektionspfad . . . . .	34
3.1.4. Steuerungshardware und -software . . . . .	37
3.2. Datenmanagement . . . . .	39
3.3. Registrierung . . . . .	41
3.4. Visualisierung . . . . .	44
4. Strahlformung . . . . .	47
4.1. Ausgangssituation . . . . .	47
4.2. Strahlformung mit Lichtmodulatoren . . . . .	49
4.3. Charakterisierung der Strahlen . . . . .	56
4.3.1. Strahllänge . . . . .	56
4.3.2. Breite des Hauptmaximums . . . . .	56
4.3.3. Gesamtbreite der Anregung . . . . .	59
4.4. Auswirkungen auf die Bildqualität . . . . .	61
4.5. Diskussion . . . . .	68
5. Wavelet-basierte Hintergrundkorrektur . . . . .	71
5.1. WBNS Algorithmus . . . . .	71
5.2. Analyse anhand synthetischer Daten . . . . .	76
5.3. Vergleich zu Software-basierten Methoden . . . . .	78
5.4. Vergleich zu Hardware-basierten Methoden . . . . .	80
5.4.1. Konfokale Spaltdetektion . . . . .	80
5.4.2. STEDD . . . . .	82
5.5. Diskussion . . . . .	87

6.	2D+1D Approximation für Multi-view-Dekonvolution . . . . .	91
6.1.	Problemstellung . . . . .	91
6.2.	Fusion mittels 2D+1D Multi-view-Dekonvolution . . . . .	93
6.3.	Validierung an synthetischen Daten . . . . .	97
6.4.	Anwendung auf gemessene Bilddaten . . . . .	104
6.5.	Diskussion . . . . .	108
7.	Bildanalyse für spezielle, biologische Anwendungen . . . . .	111
7.1.	Software zur Analyse von Blutgefäßen . . . . .	111
7.2.	Untersuchung der Nanopartikelbeseitigung in Embryonen des Zebrafisches 114	
8.	Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	125
	Literatur . . . . .	127
A.	Publikationsliste . . . . .	137
B.	Betreute Abschlussarbeiten . . . . .	139
C.	Danksagungen . . . . .	141

# 1. Einleitung

Die Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie gewährt faszinierende Einblicke in den Aufbau und die Entwicklung lebender Organismen. Charakteristisch für diese minimalinvasive Methode ist die Entkopplung von Beleuchtungs- und Detektionspfad. Über ersteren wird eine dünne Lichtscheibe erzeugt, welche die Probe durchdringt und die fluoreszierenden Moleküle in einer Ebene zur Fluoreszenz anregt. Die Detektion des emittierten Lichtes erfolgt senkrecht zu dieser Ebene, wobei die Fokusebene des Detektionsobjektives mit der Lichtscheibe zusammenfällt. Indem die Probe schrittweise durch die Lichtscheibe hindurch bewegt wird, erhält man optische Schnitte durch dieselbe. Dies erlaubt nicht nur eine dreidimensionale Rekonstruktion der Probe, sondern minimiert durch die selektive Anregung auch die Bleichung der Fluorophore sowie sonstige phototoxische Effekte. In Kombination mit einer schnellen Weitfelddetektion ist es möglich, die Probe mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung über lange Zeiträume (mehrere Tage) hinweg zu beobachten.

Die Methode bietet sich daher insbesondere für die Untersuchung entwicklungsbiologischer Fragestellungen an. Beispielsweise kann die Proliferation und Migration der Zellen eines Fischembryos von der befruchteten Eizelle bis zum ersten Herzschlag und darüber hinaus verfolgt werden. Weiter lässt sich auch das Wachstum von Blutgefäßen oder des Nervensystems sowie die Aktivität von Makrophagen und vieles mehr beobachten. Auch Süßwasserpolyphen, Pflanzen, Fruchtfliegen, Fadenwürmer, Tumorsphäroide oder einzelne Zellen können mittels Lichtscheibenmikroskopie untersucht werden. Mithilfe genetischer Manipulationen oder durch gezielte Störungen der zu untersuchenden Systeme lassen sich neue Erkenntnisse über die verschiedenen biologischen Strukturen und Mechanismen gewinnen, welche dazu beitragen können, die Ursachen von Krankheiten zu verstehen und neue Therapien zu entwickeln. Doch auch davon abgesehen, dass die Lichtscheibenmikroskopie ein nützliches Werkzeug für die biologische und medizinische Forschung darstellt, zeigt sie den Menschen auf direkte und greifbare Weise die Schönheit und Komplexität der belebten Natur.

Damit die Lichtscheibenmikroskopie den immer weiter steigenden Ansprüchen bezüglich Datenqualität und Nutzerfreundlichkeit gerecht werden kann, besteht weiterhin Bedarf, die Methode zu optimieren und weiterzuentwickeln. Beispielsweise beeinträchtigen Hintergrundbeiträge sowie Detektorrauschen die Abbildung. Diese Beiträge sollten weitestgehend reduziert werden, um die korrekte Interpretation der Daten nicht zu gefährden. Bezüglich der Nutzerfreundlichkeit stellt insbesondere die zeitaufwendige Prozessierung der außergewöhnlich großen Datenmengen Anwender vor ernsthafte Herausforderungen. Vor allem bei Langzeitmessungen mit zwei oder mehr Farbkanälen oder Aufnahmen aus verschiedenen Winkeln (zur Verbesserung der Bildqualität) steigt die Datenmenge rasch auf einige Terabyte an, sodass selbst vergleichsweise einfache Rechenoperationen mehrere

Stunden in Anspruch nehmen können. Hier werden neben leistungsstarker Hardware auch effizient implementierte Algorithmen benötigt, welche die Anwendung vereinfachen und damit auch einen höheren Durchsatz von Proben ermöglichen.

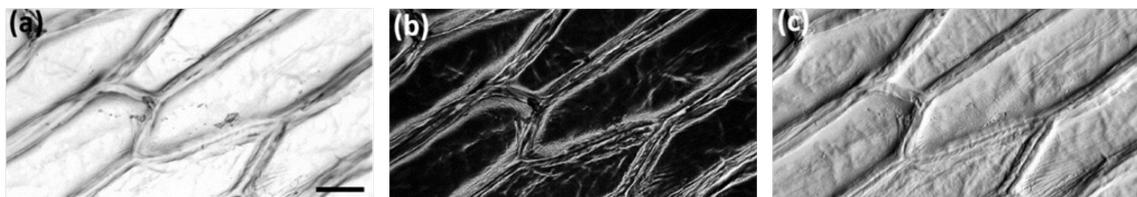
In dieser Arbeit werden verschiedene Optimierungsstrategien für die Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie vorgestellt und diskutiert. Die zum Verständnis der Arbeit notwendigen Grundlagen werden in Kapitel 2 eingeführt. Dort findet sich auch ein kurzer Ausblick auf die Historie der Lichtscheibenmikroskopie. In Kapitel 3 wird der Aufbau und die Funktionsweise des verwendeten Lichtscheibenmikroskops detailliert erklärt und die verwendeten Materialien und Geräte beschrieben. Außerdem werden die Methoden des Datenmanagements, der Bildregistrierung und Visualisierung erläutert. In Kapitel 4 wird gezeigt, wie sich Manipulationen des Strahlprofils im Beleuchtungspfad auf die Qualität der Abbildung auswirken. Kapitel 5 beschäftigt sich mit einem Algorithmus zur Korrektur von Hintergrundfluoreszenz und Detektorrauschen. Dieser wird quantitativ mit anderen Algorithmen sowie mit Hardware-basierten Methoden zur Hintergrundkorrektur verglichen. In Kapitel 6 wird gezeigt, dass mittels einer geschickten Approximation der Punktspreizfunktion der Prozess der Multi-view-Dekonvolution beschleunigt werden kann, ohne dabei starke Qualitätseinbußen hinnehmen zu müssen. In Kapitel 7 wird kurz auf zwei Projekte eingegangen, welche auch im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet wurden und die für zukünftige Arbeiten von Interesse sein könnten. Dies ist zum einen ein Plugin zur Analyse von Blutgefäßen in Fischembryonen und zum anderen ein Skript zur Analyse von Makrophagenbewegungen. Abschließend folgt eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse in Kapitel 8. Im Anhang finden sich die Listen der Publikationen und betreuten Abschlussarbeiten, die im Zusammenhang dieser Dissertation entstanden sind, sowie eine Danksagung.

## 2. Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die Grundlagen erläutert, welche für das Verständnis der weiteren Arbeit unverzichtbar sind. Dies umfasst die Grundlagen der Fluoreszenz, Abbildungstheorie, digitale Signalverarbeitung, einen kurzen Blick auf die historische Entwicklung der Lichtscheibenmikroskopie sowie eine Übersicht zur Biologie der Proben, die in dieser Arbeit betrachtet werden.

### 2.1. Fluoreszenz

Eine Abbildung zeigt, ganz gleich wie sie zustande gekommen sein mag, nur einen Teil der Wirklichkeit des abgebildeten Objekts. Es ist daher von entscheidender Bedeutung, die Abbildung korrekt zu interpretieren, was ein genaues Verständnis des Abbildungsprozesses voraussetzt. Insbesondere ist eine Abbildung durch die Entstehung des Kontrastes charakterisiert. Bei einem Hellfeldmikroskop zum Beispiel entsteht der Kontrast durch Absorption (Abbildung 2.1a). Die Probe wird von unten durchleuchtet. Dabei werden die verschiedenen Wellenlängen des Lichts von verschiedenen Teilen der Probe unterschiedlich stark absorbiert. Der Teil des Lichts, welcher die Probe durchdringen kann, gelangt dann zum Auge oder zum Kamerasensor. Genügt das natürliche Absorptionsverhalten nicht, können Präparate mithilfe von Farbstoffen angefärbt werden. Ein Beispiel ist die in der Histologie standardmäßig verwendete Hämatoxylin-Eosin-Färbung [1]. Wird die Probe stattdessen von oben beleuchtet und der reflektierte bzw. gestreute Teil des Lichts betrachtet, so spricht man von Dunkelfeldmikroskopie (Abbildung 2.1b). Daneben kann auch die Phasenverschiebung des Lichts (Abbildung 2.1c) oder eine Drehung der Polarisations Ebene, welche jeweils durch die Probe verursacht werden, zur Kontrastgewinnung genutzt werden, worauf hier nicht näher eingegangen wird [2].



**Abbildung 2.1.:** Zwiebelzellen abgebildet mit verschiedenen Methoden zur Kontrastgewinnung: (a) Hellfeldmikroskopie, (b) Dunkelfeldmikroskopie, (c) Phasenkontrastmikroskopie. Maßstabsleiste 100  $\mu\text{m}$ . Übernommen aus [3].

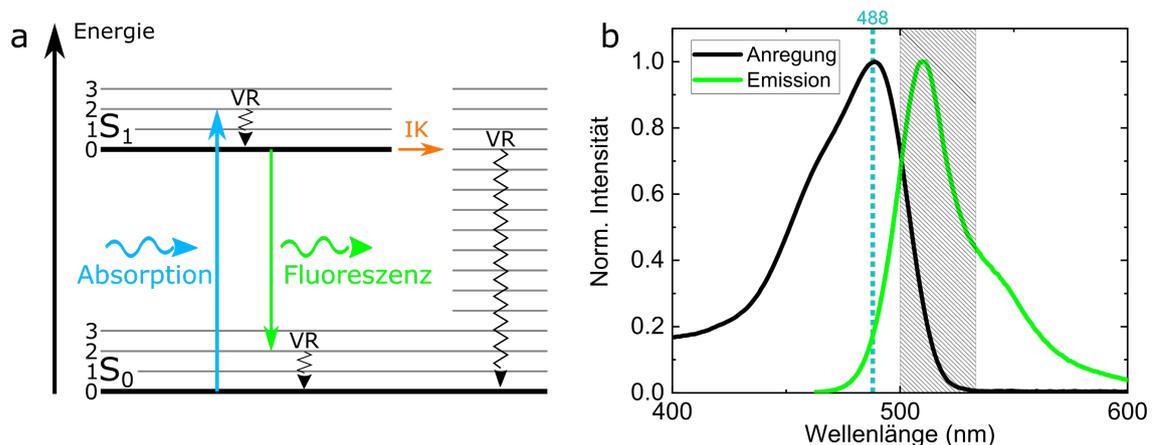
Ein mächtiges Werkzeug zur Kontrastgewinnung ist die Fluoreszenzmarkierung. Unter Fluoreszenz versteht man die spontane Emission von Licht eines Materials nach vorangegangener Anregung, welche meist durch die Absorption von Licht geschieht. Die Moleküle oder Nanokristalle, welche diese Eigenschaft besitzen, werden Fluorophore genannt und können mit einem Zwei-Zustands-Modell beschrieben werden. Die Prozesse lassen sich übersichtlich in einem Jablonski-Diagramm darstellen (Abbildung 2.2a). Das Diagramm zeigt den elektronischen Grundzustand  $S_0$  und den ersten angeregten Zustand  $S_1$  des Systems mit den dazugehörigen Vibrationszuständen (0,1,2,...). Trifft nun ein Photon auf das System, kann es absorbiert werden und ein Elektron in den angeregten Zustand heben. Dabei gilt Energieerhaltung, d.h. die Energie des Photons muss der Differenz der Energien der beiden Zustände entsprechen. Nach dem Franck-Condon-Prinzip hängt die Übergangswahrscheinlichkeit dabei vom Überlapp der Wellenfunktionen in den Vibrationsniveaus von  $S_0$  und  $S_1$  ab, welcher für Übergänge in schwingungsangeregte Zustände in der Regel größer ist. Von dort kehrt das Elektron jedoch schnell über vibronische Relaxation in den Schwingungsgrundzustand von  $S_1$  zurück (Kasha-Regel). Nach einer kurzen Verweildauer im angeregten Zustand - auch Lebensdauer genannt - kann das Elektron wieder unter Aussendung eines Photons (Fluoreszenz) in den Grundzustand fallen, wobei wiederum mit hoher Wahrscheinlichkeit schwingungsangeregte Zustände besetzt werden. Über vibronische Relaxation gelangt das Elektron anschließend in den Schwingungsgrundzustand von  $S_0$ . Die Relaxation aus dem  $S_1$ -Niveau kann aber auch nicht-strahlend durch Stöße mit anderen Molekülen erfolgen. Dabei findet zuerst eine innere Konversion in einen vibronisch angeregten Zustand von  $S_0$  statt, von wo aus eine vibronische Relaxation erfolgt. Die Energie wird in kinetische/thermische Energie umgewandelt.

Aus dieser Betrachtung ergibt sich bereits eine wichtige Konsequenz: Das emittierte Photon ist gegenüber dem absorbierten/anregenden Photon energieärmer, also rotverschoben. Dies wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Tatsächlich spielt dabei jedoch ein anderer Effekt eine weitaus bedeutendere Rolle. Die polaren Lösungsmittelmoleküle (z.B. Wassermoleküle), welche den Fluorophor umgeben, sind im  $S_0$ -Zustand energieabsenkend zum elektrischen Dipolmoment des Fluorophors ausgerichtet. Bei der Anregung ändert sich dieses jedoch schnell ( $10^{-15}$  s), sodass die Lösungsmittelmoleküle vorerst ihre ursprüngliche Orientierung behalten, welche nun energetisch ungünstig ist und den angeregten Zustand anhebt. Die Lebensdauer des angeregten Zustandes ist jedoch hinreichend lang ( $10^{-9}$  s), sodass eine Neuorientierung der Lösungsmittelmoleküle ( $10^{-11}$  s) stattfinden kann. Hierdurch wird der angeregte Zustand energetisch erniedrigt und  $S_0$  wird energetisch ungünstiger. Als Folge ist die Energiedifferenz der beiden Zustände bei der Absorption größer als bei der spontanen Emission, woraus wiederum eine Rotverschiebung der Fluoreszenz resultiert [4].

Diese Rotverschiebung ist von zentraler Bedeutung für die Kontrastgewinnung, da sie die Trennung zwischen Anregungslicht und Fluoreszenz mittels Farbfiltern ermöglicht. Abbildung 2.2b verdeutlicht dies anhand des verstärkt grün fluoreszierenden Proteins (engl. *enhanced green fluorescent protein*, EGFP): Die schwarze Linie stellt das Anregungsspektrum von EGFP dar. Die Wellenlänge des Lasers, welcher zur Anregung verwendet wird, sollte nach Möglichkeit dicht am Maximum dieses Spektrums liegen, was für 488 nm erfüllt ist. Die Fluoreszenz der Probe erzeugt das in Grün dargestellte Emissionsspektrum, dessen

Maximum gegenüber dem der Anregung rotverschoben ist. Daher kann für die Detektion ein Bandpassfilter (Transmission im schraffierten Bereich) verwendet werden, sodass ein Großteil der Fluoreszenzphotonen eingefangen wird, ohne dabei vom Anregungslaser überlagert zu werden. Die fluoreszierende Probe erscheint so als helles, selbstleuchtendes Objekt vor einem dunklen Hintergrund [2].

Fluorophore können den Zyklus von Anregung und Emission jedoch nicht beliebig oft durchlaufen - sie bleichen irgendwann aus. Grund hierfür sind photochemische Reaktionen des angeregten Zustandes z.B. mit Sauerstoff, wobei ein Komplex entsteht, der selbst nicht fluoreszieren kann. Im Mittel geschieht dies für fluoreszierende Proteine nach etwa  $10^5$  Anregungszyklen. Sofern keine neuen Fluorophore von der Probe gebildet werden, nimmt das Signal kontinuierlich ab und erlischt schließlich vollständig. Dies ist ein Grund, weshalb die eingestrahlte Leistung minimal eingestellt werden sollte. Der zweite Grund liegt in der phototoxischen Wirkung des Lichts gegenüber anderen Bestandteilen der Probe. Als Produkte photochemischer Reaktionen können reaktive Sauerstoffspezies die Zellen auf verschiedene Weise schädigen [5]. Auch die Markierung mit Farbstoffen selbst kann der Probe Schaden zufügen.



**Abbildung 2.2.:** Jablonski-Diagramm sowie Anregungs- und Emissionsspektrum von EGFP. (a) Vereinfachtes Jablonski-Diagramm mit den elektronischen Zuständen  $S_0$  und  $S_1$  sowie den Vibrationsniveaus 0,1,2,3. Eingezeichnet sind die Übergänge der Absorption und Fluoreszenz sowie der vibronischen Relaxation (VR) und der inneren Konversion (IK). (b) Anregungsspektrum (schwarz) und Emissionsspektrum (grün) von EGFP (Daten aus [6]). Die türkise, gestrichelte Linie entspricht der Anregungswellenlänge bei 488 nm. Der schraffierte Bereich markiert den verwendeten Bandpassfilter.

Neben dem hohen Kontrast zeichnen sich fluoreszierende Proteine und Farbstoffe dadurch aus, dass sie sich mit hoher Spezifität und Selektivität als Marker für verschiedenste Strukturen diverser Proben verwenden lassen. Hierzu existieren chemische sowie biotechnologische Verfahren. Eine weit verbreitete Methode ist die Immunmarkierung, bei welcher das Zielprotein (Antigen) mit einem spezifischen Antikörper in räumliche Nähe gebracht wird. Dieser ist mit einem Fluorophor gekoppelt und bindet nicht-kovalent an das

Antigen. Oftmals werden auch Sekundärantikörper in einem Zwischenschritt verwendet. Die Schwierigkeit besteht dabei, den Antikörper in die räumliche Nähe des Antigens zu bringen, da diese hierzu meist Zellmembranen durchdringen müssen. Daher eignet sich die Methode vor allem für fixierte Proben mit permeabilisierten Membranen [2, 7].

Besonders interessant ist jedoch die Beobachtung lebender Zellen oder Organismen. Zur Markierung dieser sind vor allem fluoreszierende Proteine nützlich, welche nicht notwendigerweise von außen eingebracht werden müssen, sondern vom Biosyntheseapparat der Zellen selbst produziert werden können. Hierzu muss lediglich der Bauplan des Proteins - die Desoxyribonukleinsäure (DNS) - in die Zelle eingeschleust werden. Dies erfolgt durch Mikroinjektion eines DNS-Konstrukts in die Eizelle kurz nach der Befruchtung. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit wird die fremde DNS in das Genom des Organismus eingebaut. Diese Tiere vererben das neue Gen auch an ihre Nachkommen. Die neu eingebaute DNS kodiert dabei beispielsweise für das zu beobachtende Protein, an welches zusätzlich das fluoreszierende Protein angehängt wird. Viele Proteine bleiben trotz des Anhängsels funktionsfähig [8, 9]. Jedoch sollte nicht vergessen werden, dass die Beobachtung der Zielstruktur auf indirekte Weise vorgenommen wird und die Markierung durchaus Einfluss auf das System haben kann. Fluorophore sollten klein gegenüber der markierten Struktur sein, um die natürlichen Abläufe nicht zu stören [7]. Durch die Spezifität und Selektivität der Methode ist es auch möglich, mehrere Strukturen mit unterschiedlichen Fluorophoren zu markieren und zu beobachten. Daher lassen sich nicht nur bloße Strukturen, sondern auch deren Funktion, Dynamik und Wechselwirkungen miteinander - insbesondere in lebenden Proben - studieren.

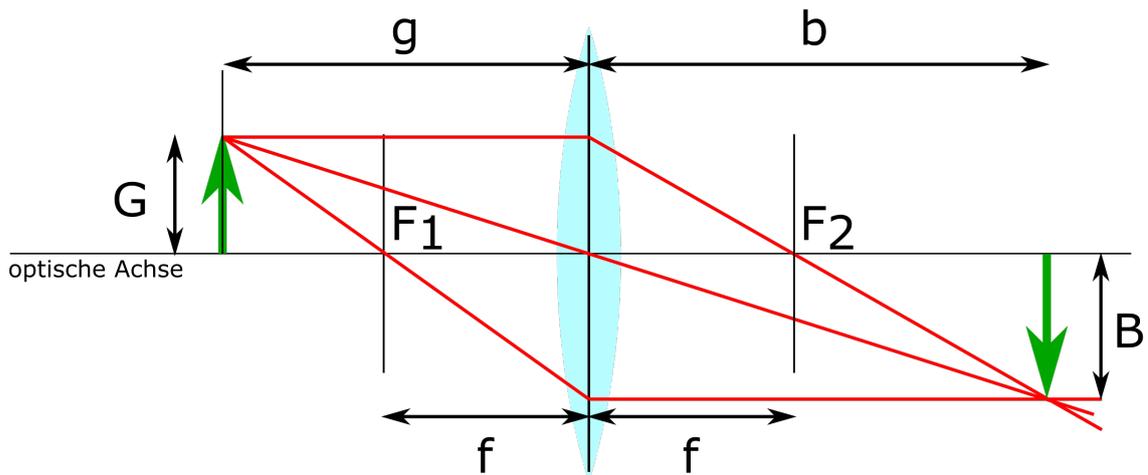
## 2.2. Abbildungstheorie

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Methode der Kontrastgewinnung als Charakteristikum einer Abbildung diskutiert. Weiter muss natürlich auch der Abbildungsprozess selbst verstanden werden. Das einfachste Modell zur Abbildungstheorie liefert die geometrische Optik. Darin wird das Licht mithilfe von Strahlen beschrieben, welche sich in einem homogenen Medium geradlinig ausbreiten und sich gegenseitig nicht beeinflussen. Das Fermatsche Prinzip besagt dabei, dass der Lichtstrahl zwischen zwei Punkten stets den Weg der extremalen Laufzeit wählt, woraus sich die Gesetze zur Reflexion (Einfallswinkel = Ausfallswinkel) und Brechung (Snelliussches Gesetz) ableiten lassen. Mithilfe dieses Modells lassen sich bereits grundlegende optische Bauteile wie Spiegel und Linsen berechnen. Diese stellen auch in modernen Mikroskopen die am zahlreichsten verwendeten Bauteile dar. Abbildung 2.3 zeigt den Strahlengang durch eine Sammellinse nach den Regeln der geometrischen Optik. Aus der Betrachtung des Strahlengangs lässt sich mithilfe der Strahlensätze die Linsengleichung herleiten [10]:

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{b} + \frac{1}{g}. \quad (2.1)$$

Hierbei stellt  $f$  die Brennweite der Linse,  $b$  die Bildweite und  $g$  die Gegenstandsweite dar. Nur wenn die Linsengleichung erfüllt ist, entsteht ein scharfes Bild. Wird das Bild mit einem größeren oder kleineren Abstand zur Linse als der Bildweite aufgenommen,

so ist es verschwommen. Man spricht dann von Defokussierung. Darüber hinaus zeigt die Konstruktion, dass die Abbildung an einer Linse auch eine Abbildung im mathematischen Sinne darstellt. Jedem Punkt der Gegenstandsebene wird ein Punkt in der Bildebene zugeordnet. Würde dies der Realität entsprechen, wären Bilder mit beliebig hoher Auflösung möglich. Man müsste einfach nur immer weiter vergrößern und könnte immer kleinere Details erkennen. Tatsächlich muss man aber feststellen, dass dem nicht so ist. Die Auflösung ist begrenzt. Dieser Umstand lässt sich, ebenso wie die Farbe und Polarisation des Lichtes, nur mithilfe der Wellenoptik erklären.



**Abbildung 2.3.:** Strahlengang für die Abbildung an einer Sammellinse. Vor einer dünnen Linse mit Brennweite  $f$  und den Brennpunkten  $F_1$  und  $F_2$  befindet sich im Abstand  $g$  (Gegenstandsweite) ein Objekt der Größe  $G$ . Auf der gegenüberliegenden Seite entsteht im Abstand  $b$  (Bildweite) ein Bild der Größe  $B$ .

Die Wellenoptik beschreibt Licht als elektromagnetische Wellen, die durch ihre Wellenlänge, Amplitude und Phase charakterisiert werden. Die Ausbreitung dieser Wellen ist durch die Wellengleichung bestimmt, welche sich aus den Maxwell-Gleichungen für elektromagnetische Felder ableiten lässt. Mit den Koordinaten von Raum und Zeit  $x, y, z$  und  $t$  sowie der Lichtgeschwindigkeit  $c$  und  $\Psi$  als Wellenfunktion ist die Wellengleichung gegeben durch:

$$\frac{1}{c^2} \frac{\partial}{\partial t^2} \Psi - \left( \frac{\partial}{\partial x^2} + \frac{\partial}{\partial y^2} + \frac{\partial}{\partial z^2} \right) \Psi = 0. \quad (2.2)$$

Die elektromagnetischen Wellen können sich gegenseitig durchdringen, wobei sich die Vektoren des elektrischen und magnetischen Feldes jeweils addieren. Auf diese Weise kommt es zur Interferenz der Wellen. Als Modell zur Ausbreitung kann das Huygenssche Prinzip verwendet werden, welches besagt, dass jeder Punkt, der von einer Welle erreicht wird, Ursprung einer kugelförmigen, sogenannten Elementarwelle ist. Die weitere Ausbreitung folgt dann aus der Interferenz dieser Elementarwellen. Damit lässt sich insbesondere die Beugung verstehen, welche eine wichtige Rolle in der Abbildungstheorie

spielt, denn sie führt zu dem oben erwähnten begrenzten Auflösungsvermögen. Betrachtet man einen selbstleuchtenden Punkt in der Fokalebene eines Objektivs, so geht von diesem eine Kugelwelle aus. Das Objektiv sammelt einen Teil dieser Kugelwelle ein (je nach numerischer Apertur) und leitet ihn in Form einer ebenen Welle weiter. Die Tubuslinse fokussiert diese ebene Welle dann auf einen Schirm. Dabei interferieren die Elementarwellen und erzeugen eine charakteristische Verteilung auf dem Schirm, welche Airy-Scheibchen genannt wird (Abbildung 2.4a). Unter der Auflösung versteht man im Allgemeinen den Abstand zweier solcher Airy-Scheibchen, bei welchem sie sich gerade noch voneinander unterscheiden lassen [10]. Ein mögliches und weitgehend anerkanntes Kriterium hierfür ist das Rayleigh-Kriterium. Demnach gelten zwei Airy-Scheibchen als ununterscheidbar, wenn das Maximum des einen in das erste Minimum des anderen fällt. Der Abstand  $d$  der punktförmigen Objekte ergibt sich dann zu:

$$d = \frac{0,61\lambda}{n \cdot \sin(\alpha)}, \quad (2.3)$$

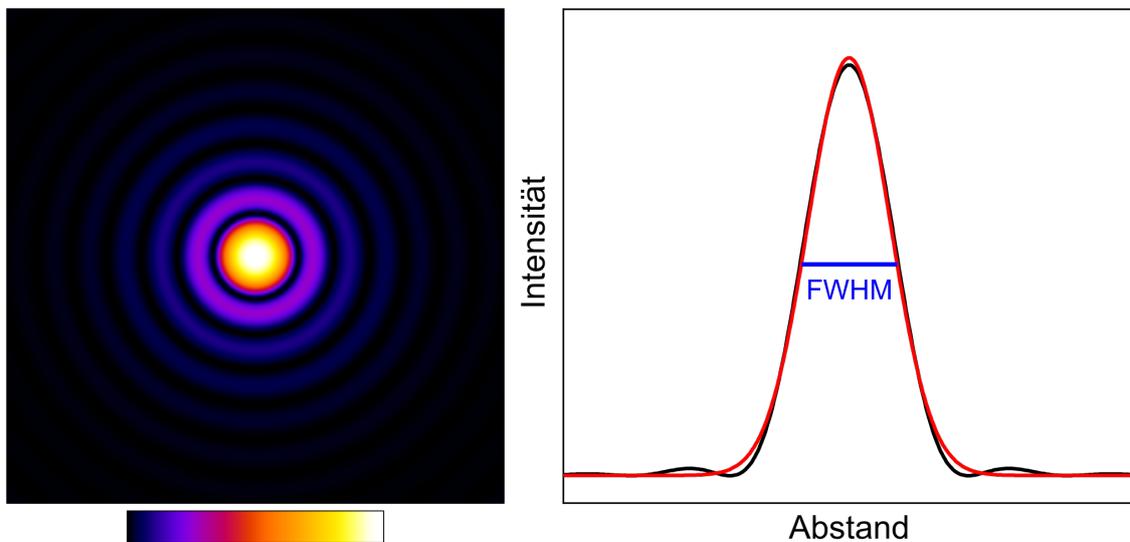
wobei  $\lambda$  die Wellenlänge des Lichts,  $\alpha$  der Öffnungswinkel des Objektivs und  $n$  der Brechungsindex des Mediums ist [11]. Dieses Kriterium hat allerdings einen subjektiven Charakter, da die Unterscheidbarkeit auch von dem Signal-Rausch-Verhältnis und ganz allgemein von der Sensitivität des Beobachters abhängt. Weiter ist die Definition der Auflösung über einen Abstand unpraktisch in der Anwendung: Es müssen beispielsweise Nanometerlineale aus DNS mit unterschiedlichen Längen nacheinander vermessen werden, um unter direkter Anwendung des Kriteriums die Auflösung zu bestimmen. Alternativ gibt man daher gerne die gemessene Halbwertsbreite (engl. *full width at half maximum*, FWHM) des Hauptmaximums des Beugungsscheibchens punktförmiger Objekte als Auflösung an. Hierfür eignen sich fluoreszierende Nanopartikel, deren Größe deutlich unter der erwarteten Auflösung liegt. Die nach dem Wellenmodell zu erwartenden Werte für punktförmige Emittoren sind für die laterale und axiale Richtung gegeben durch [11]:

$$\text{FWHM}_{lat} = \frac{0,51 \cdot \lambda}{n \cdot \sin(\alpha)}, \quad (2.4)$$

$$\text{FWHM}_{ax} = \frac{0,88 \cdot \lambda}{n - \sqrt{n^2 - n^2 \sin^2(\alpha)}}. \quad (2.5)$$

Zur Bestimmung der FWHM wird die Verteilung häufig durch eine Gaußsche Glockenkurve approximiert (Abbildung 2.4b). Treten starke Abweichungen von der idealen Form auf, führt dies jedoch zu großen Fehlern. Es sollte bedacht werden, dass auch Nanopartikel ein endliches Volumen besitzen und damit nicht punktförmig sind. Weiter wird die gemessene Auflösung durch optische Aberrationen, Rauschen und digitale Abtastung beeinflusst und kann daher signifikant von dem theoretischen Wert abweichen.

Nach den Vorstellungen des Wellenmodells wird also ein punktförmiges Objekt auf ein dreidimensionales Volumen mit charakteristischer Form abgebildet. Die Funktion, welche die Form der Punktabbildung beschreibt, wird Punktspreizfunktion (PSF) genannt. Komplexe Objekte können als eine Schar von Punkten angesehen werden. Bei einer Abbildung überlagern sich die PSF der einzelnen Punkte, wodurch das beugungsbegrenzte



**Abbildung 2.4.:** (a) Airy-Scheibchen mit logarithmischer Helligkeitsskala, erzeugt mit DeconvolutionLab2 [12]. (b) Profil des Airy-Scheibchens (lineare Skala) mit angepasster Gauß-Funktion.

Bild entsteht. Mathematisch ausgedrückt stellt die Abbildung  $f$  also eine Faltung oder Konvolution des Gegenstandes  $g$  mit der PSF  $h$  dar:

$$f = g * h = \int g(x - q)h(q)dq \quad \text{bzw.} \quad \hat{f} = \hat{g} \cdot \hat{h}. \quad (2.6)$$

Nach dem Faltungstheorem ist eine Faltung gleich dem Produkt der Fourier-Transformierten der Funktionen  $(\hat{g}, \hat{h})$ , was von großer Bedeutung bei der digitalen Signalverarbeitung ist. Der PSF kommt in diesem Modell der Abbildung eine zentrale Bedeutung zu: Sie beschreibt den Einfluss des abbildenden Systems auf das resultierende Bild. Ihre räumliche Ausdehnung ist, wie oben erwähnt, ein Maß für das Auflösungsvermögen und ihre Form lässt auf typische Abbildungsfehler, wie sphärische Abberation, Koma oder Astigmatismus schließen.

Das Modell der Wellenoptik genügt, um die für diese Arbeit wesentlichen Prozesse der optischen Abbildung zu verstehen. Jedoch reicht sie nicht aus, um alle beobachtbaren Phänomene des Lichts zu erklären. Eine den heutigen Kenntnissen nach vollständige Beschreibung liefert nur die Quantenelektrodynamik, welche nicht nur das Licht selbst, sondern auch seine Wechselwirkungen mit Materie beschreibt.

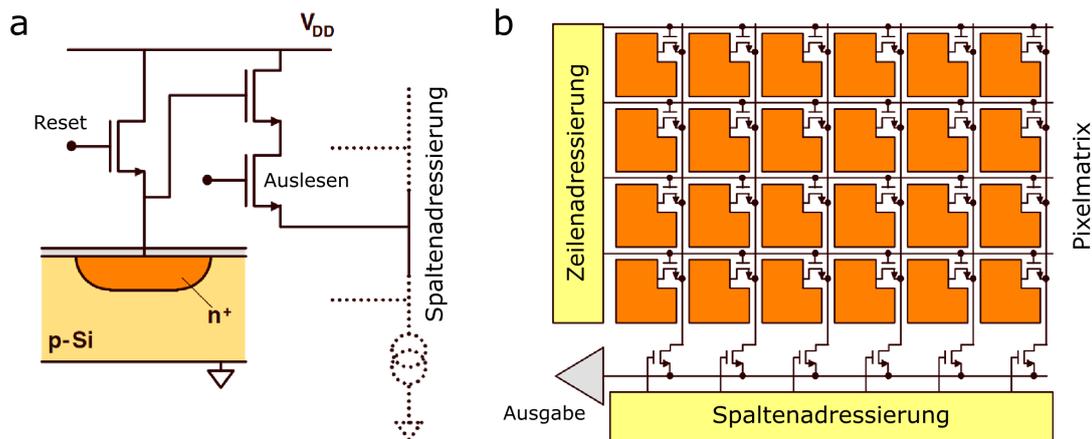
## 2.3. Digitale Signalverarbeitung

Als die ersten Mikroskopiker durch ihre Geräte blickten, waren ihre Augen das einzig verfügbare Detektorsystem. Ihre Beobachtungen konnten nur durch Zeichnungen oder Beschreibungen dokumentiert werden. Alfred Donné und Léon Foucault veröffentlichten

1845 die ersten Mikrofotografien, zu deren Erstellung sie das Verfahren der Daguerreotypie nutzten, bei welchem versilberte Metallplatten belichtet werden [13, 14]. In den folgenden Jahrzehnten konnten große Fortschritte in der Photo- und Polymerchemie sowie Optik erzielt werden, welche zur Entwicklung des photographischen Films und der analogen Fotografie führten. Jedoch waren die Möglichkeiten zur Analyse und Bearbeitung dieser Bilder sehr begrenzt und aufwendig, was sich mit dem Aufkommen moderner Digitalkameras änderte. Deren Sensoren arbeiten auf Halbleiterbasis, um ein elektrisches Signal zu erzeugen, welches proportional zur eingestrahlten Lichtmenge ist. Das Signal wird anschließend digitalisiert, wodurch es mithilfe von Computern prozessiert oder auf einem Speichermedium abgelegt werden kann.

Die am häufigsten verwendeten Sensortypen sind CCD-Sensoren (engl. *charge-coupled device*) und CMOS-Sensoren (engl. *complementary metal-oxide-semiconductor*), welche in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen haben [15]. Da in dieser Arbeit eine Kamera mit CMOS-Sensor verwendet wurde, werden CCD-Sensoren hier nicht näher betrachtet. Eine Übersicht zu CCD- und CMOS-Sensoren findet sich in den Referenzen [2, 16]. Ein einzelnes Bildelement, meist Pixel genannt, auf einem CMOS-Sensor besteht im Wesentlichen aus einer Photodiode und einigen Transistoren. Dies ist schematisch in Abbildung 2.5a dargestellt. Die Photodiode wird in Sperrrichtung betrieben und vor der Belichtung kapazitiv über „Reset“ aufgeladen. Einfallende Photonen erzeugen über den inneren photoelektrischen Effekt Elektron-Loch-Paare, wodurch die Spannung über der Diode proportional zur Intensität und Belichtungszeit abnimmt. Über die Verstärkerschaltung wird das Pixel adressiert und ausgelesen. Auf einem Sensor werden eine Vielzahl solcher Pixel in einer Matrix angeordnet (Abbildung 2.5b). Nach dem Auslesen wird das Signal direkt mit einem im Sensor verbauten Analog-Digital-Wandler digitalisiert. Diese Architektur bringt sowohl Vor- als auch Nachteile mit sich: CMOS-Sensoren zeichnen sich durch einen niedrigen Energieverbrauch und hohe Bildraten aus. Da jeder Pixel einzeln adressiert werden kann, wodurch die Pixel unabhängig voneinander sind, ist es möglich, nur einen Teil des Sensors selektiv auszulesen. Darüber hinaus verhindert das individuelle Auslesen den sogenannten *Blooming*-Effekt, bei welchem überschüssige Ladungen auf benachbarte Pixel übertragen werden, sodass bei Überbelichtung helle Flecken oder Streifen entstehen. Gleichzeitig führt es aber auch zu einem zeitlich konstanten Rauschmuster (engl. *fixed pattern noise*), welches sich auf Verschiedenheiten der einzelnen Verstärkerschaltungen zurückführen lässt. Zudem reduziert die Ausleseelektronik die lichtempfindliche Fläche und damit den sogenannten Füllfaktor. Mithilfe von Mikrolinsen, welche das einfallende Licht auf jedem Pixel fokussieren, kann der effektive Füllfaktor jedoch erhöht werden [17].

Solch ein Bildsensor produziert ein Bild, welches zweifach digitalisiert ist. Zum einen werden die Intensitätswerte der einzelnen Pixel in ganzzahliger Form ausgegeben. Zum anderen werden die Bilder in Form einer zweidimensionalen Matrix gespeichert, deren Indizierung den Ort in Form zweier ganzer Zahlen repräsentiert. Diese diskrete Darstellung von Ort und Intensität muss bei der Arbeit mit digitalen Bildern stets bedacht werden. Wie in Kapitel 2.2 erklärt, ist das optische Auflösungsvermögen begrenzt. In einem digitalen Bild existiert jedoch eine weitere Begrenzung der Auflösung in Form der Pixelgröße. Strukturen, welche kleiner als ein Pixel sind, können nicht aufgelöst werden. Die Pixelgröße



**Abbildung 2.5.:** (a) Schematisches Schaltbild eines aktiven CMOS-Pixelsensors mit integriertem Verstärker. (b) Architektur eines CMOS-Sensors. Übernommen aus [18].

bestimmt die Abtastfrequenz des räumlichen Signals. Damit die Digitalisierung keinen limitierenden Faktor für die Auflösung darstellt, sollte das Nyquist-Theorem erfüllt sein. Es besagt, dass ein Signal, welches keine höheren Frequenzen als  $f_{max}$  beinhaltet, vollständig bestimmt ist, wenn es mit einer Frequenz von  $2 \cdot f_{max}$  abgetastet wird [19]. Das heißt, dass die Pixelgröße höchstens die Hälfte des optischen Auflösungsvermögens betragen sollte. Bei einem Objektiv mit  $NA = 0,8$  und einer Vergrößerung von  $16\times$  beträgt die laterale Halbwertsbreite nach Gleichung (2.4)  $328 \text{ nm}$  für eine Emissionswellenlänge von  $515 \text{ nm}$  (z.B. EGFP). (Dies berücksichtigt allerdings keine optischen Aberrationen!) Ein Sensor, dessen Pixel eine physikalische Größe von  $6,5 \mu\text{m}$  aufweisen, ergibt eine Pixelgröße des Bildes von  $406 \text{ nm}$ . Unter dem Gesichtspunkt der Auflösung sollte also ein Sensor mit kleineren Pixeln oder ein zusätzliches Teleskop zur Vergrößerung des Bildes verwendet werden.

Jedoch ist die Auflösung nicht das einzige Kriterium für die Qualität einer Abbildung. In der Fluoreszenzmikroskopie müssen je nach Anwendung Kompromisse eingegangen werden: Kleinere Pixel sammeln weniger Photonen ein, was zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis führt (siehe unten). Dies könnte prinzipiell durch längere Belichtungszeiten ausgeglichen werden. Allerdings erhöhen sich dadurch Bleichung und Phototoxizität, während die Bildrate sinkt. Außerdem würde eine zusätzliche Vergrößerung das Sichtfeld verkleinern, was je nach Anwendung nicht akzeptabel ist. Für ein entsprechendes Sichtfeld mit optimaler Abtastung bräuchte man einen Sensor mit ungefähr 50 Megapixel, was derzeit nicht realisierbar ist [20]. Hinzu kommt, dass ein solcher Sensor riesige Datenmengen produzieren würde, die selbst mit der heute verfügbaren Rechenleistung nur schwer zu handhaben wären.

Die eben erwähnte Datenmenge hängt von der Anzahl der Pixel ab. Sie wird aber auch durch die Digitalisierung der Intensitätswerte beeinflusst. Je nach Sensortyp, Hersteller und Anwendung werden unterschiedliche Bittiefen genutzt. Die Bittiefe gibt die Anzahl der Bits an, welche zur Darstellung des Intensitätswerts eines Pixels gebraucht werden. Daraus

ergibt sich auch die Anzahl an unterscheidbaren Graustufen. Werden beispielsweise 16 Bit verwendet, so können Graustufen von 0 (schwarz) bis  $2^{16} - 1 = 65535$  (weiß) dargestellt werden. Ein Bild mit  $2048 \times 2048$  Pixeln benötigt dann 8,4 MB Speicherplatz. Häufig werden auch nur 8 Bit verwendet. Mit den genannten Bittiefen lassen sich jedoch nur natürliche bzw. ganze Zahlen darstellen. Für manche Operationen bei der Bildbearbeitung kann es notwendig oder sinnvoll sein, auch Gleitkommazahlen zu verwenden. Hierzu werden einfache oder doppelte Genauigkeit (engl. *single precision*, *double precision*) mit 32 oder 64 Bit verwendet, wodurch der benötigte Speicher zunimmt. Vor allem in der Lichtscheibenmikroskopie ist der Speicherplatz eine kritische Größe. Dreidimensionale Bilder werden in Form von Bildstapeln gespeichert. Diese Stapel enthalten einige hundert Einzelbilder - auch Scheiben genannt - und können so über 4 GB groß werden. Werden Langzeitexperimente mit mehreren Farbkanälen durchgeführt, so kann die Gesamtdatenmenge eines einzelnen Experiments in den zweistelligen TB-Bereich anwachsen. Dies stellt Algorithmen zur Datenauswertung vor ernste Herausforderungen.

Wie bereits in der Einleitung zu Kapitel 2.1 diskutiert, ist ein grundlegendes Verständnis des Abbildungsprozesses notwendig, um Bilder richtig interpretieren zu können. Im digitalen Zeitalter muss zusätzlich zur Entstehung des Bildes auch dessen Anzeige berücksichtigt werden. Die Zahlen der Matrix, welche die gemessenen Intensitätswerte darstellen, sind oft in höherer Bittiefe gespeichert als mit dem Anzeigegerät dargestellt werden kann. Daher werden diese zuvor mithilfe einer sogenannten Lookup-Tabelle (LUT) in Farben umgewandelt. Selbst wenn das Bild keine Farbinformationen enthält, ist es durchaus sinnvoll, Farben für die Darstellung zu verwenden, da die Anzahl der für den Menschen unterscheidbaren Graustufen in der Größenordnung  $10^2$  liegt, während über  $10^6$  Farben unterschieden werden können [21]. Weiter kann der Bereich der dargestellten Intensitätswerte durch Helligkeits- und Kontrasteinstellungen variiert werden. Die verwendete LUT muss bei der Interpretation der Bilddaten stets beachtet werden. Unglücklich gewählte Einstellungen können sonst schnell zu falschen Schlussfolgerungen führen.

Ein weiteres Phänomen, welches bereits erwähnt wurde, ist Rauschen. Darunter versteht man eine zufällige Variation der Intensitätswerte eines Bildes. Rauschen entsteht in mehreren Phasen des Abbildungsprozesses und kann in verschiedene Arten unterteilt werden:

Zunächst variiert die Anzahl der Photonen, die in einem gegebenen Zeitintervall auf den Detektor treffen, von Messung zu Messung. Grund hierfür ist, dass bei der spontanen Emission Photonen unabhängig voneinander zu zufälligen Zeitpunkten emittiert werden. Diese Art von Rauschen wird Schrot- oder Photonenrauschen genannt und folgt der Poisson-Verteilung mit einer mittleren Anzahl von Photonen  $N$  und einer Standardabweichung von  $\sqrt{N}$ . Das Signal-Rausch-Verhältnis lässt sich dann einfach ausdrücken als  $\frac{N}{\sqrt{N}}$  und verbessert sich mit zunehmender Anzahl detektierter Photonen (z.B. durch größere Pixel oder längere Belichtungszeiten) [22].

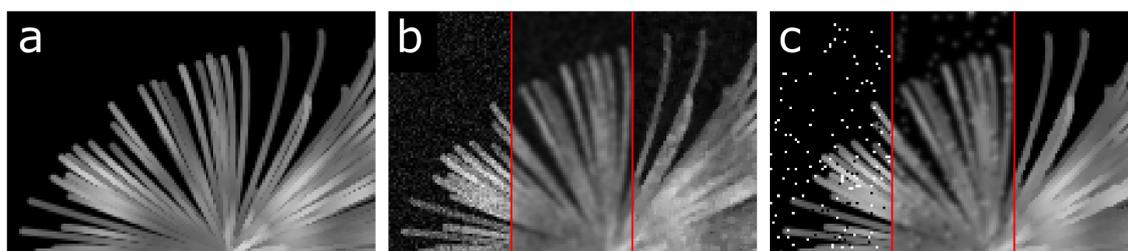
Eine weitere Rauschquelle stellt der Detektor selbst dar. Die Elektron-Loch-Paare, welche idealerweise nur durch einfallende Photonen erzeugt werden, entstehen auch durch thermische Anregung im Halbleitermaterial der Photodiode. Man spricht daher von

Dunkelrauschen, das auch ohne einfallendes Licht messbar ist. Wenn die einzelnen Pixel unabhängig voneinander sind, führt das zu einem mittleren Versatz des Pixelwerts - dem oben erwähnten *fixed pattern noise* - sowie einem jedem Pixel eigenen Verstärkungsfaktor. Die Mittelwerte von Versatz und Verstärkung können experimentell bestimmt und im Nachhinein subtrahiert bzw. als Korrekturfaktor verwendet werden. Die von Aufnahme zu Aufnahme fluktuierenden Abweichungen vom Mittelwert der Intensität können durch eine Gauß-Verteilung mit Mittelwert 0 beschrieben werden. Auch die Ausleseelektronik des Sensors ist fehlerbehaftet und trägt somit zu dieser Art des Rauschens bei. Schließlich wird bei der Digitalisierung des Signals das sogenannte Quantisierungsrauschen erzeugt, wenn die kontinuierlichen, analogen Werte auf eine diskrete, digitale Skala abgebildet werden.

Auch kommt es vor, dass einzelne Pixel aufgrund von Defekten stets schwarz oder weiß erscheinen. Man spricht in diesem Fall von toten oder heißen Pixeln. Das sich ergebende Bild erinnert an Salz und Pfeffer, weshalb auch der Begriff Salz-und-Pfeffer-Rauschen (engl. *salt and pepper noise*) verwendet wird [22].

Störende Bestandteile wie Rauschen können durch Anwendung von Filtern teilweise aus dem Bild entfernt werden. Auch ist es möglich, bestimmte Merkmale des Bildes mittels Filter hervorzuheben (z.B. zur Kantenerkennung). Korrekt angewendet können Filter wesentlich zur richtigen Interpretation des Bildes beitragen. Jedoch ist auch hier Vorsicht geboten. Die Anwendung eines Filters mit unpassenden Parametern kann zu falschen Schlussfolgerungen führen. Außerdem kann die Beurteilung der Wirkung eines Filters subjektiv ausfallen, je nach Erwartungshaltung des Betrachters. Bei der Anwendung eines Filters kann der Wert eines Pixels durch eine Linearkombination der Pixelwerte in einer bestimmten Umgebung bestimmt werden. Man spricht dann von einem linearen Filter. Dieser ist durch die Koeffizienten der Linearkombination und die Größe der Umgebung definiert und kann als Matrix, dem sog. Filter-Kern, dargestellt werden. Häufige Anwendung bei der Rauschunterdrückung findet der Gauß-Filter, bei welchem der Filter-Kern eine 2D-Gaußfunktion approximiert. Es existieren jedoch auch nichtlineare Filter, wie z.B. Rangordnungsfilter, welche die Werte der Pixel in einer Umgebung sortieren und einen Wert mit bestimmtem Rang (Minimum, Maximum, Median) auswählen [23]. Zur Visualisierung ist die Anwendung des Gauß- und Median-Filters in Abbildung 2.6 beispielhaft dargestellt. Die Abbildung verdeutlicht, dass sich ein Gauß-Filter gut zur Glättung von weißem Rauschen eignet, jedoch bei Salz-und-Pfeffer-Rauschen versagt. Für den Median-Filter verhält es sich umgekehrt. Die Auswahl eines Filters sollte daher stets wohl bedacht sein - nicht zuletzt, weil Filter unter Umständen auch die Energieerhaltung verletzen können.

Die Anwendung eines linearen Filters lässt sich mathematisch als eine Faltung diskreter Funktionen (Bild und Filter-Kern) ausdrücken, was in zweierlei Hinsicht interessant ist. Zum einen lassen sich lineare Filter dadurch unter Ausnutzung des Faltungstheorems im Fourier-Raum als Multiplikation schreiben, was sehr effiziente Implementierungen ermöglicht. Zum anderen kann damit der Abbildungsprozess in einem Mikroskop ebenfalls als linearer Filter verstanden werden, da sich dieser, wie in Kapitel 2.2 diskutiert, auch als Faltung beschreiben lässt. In diesem Fall ist der Filter-Kern durch die PSF gegeben. Folgend liegt es nahe zu fragen, ob sich Filter invertieren lassen, sodass aus dem Bild und



**Abbildung 2.6.:** (a) Das rauschfreie, synthetische Ground-Truth verkörpert Mikrotubuli einer Zelle. (b) Zu dem Ground-Truth (8 bit) wurde weißes Rauschen mit einer Standardabweichung von  $\sigma = 20$  addiert (links). In der Mitte wurde anschließend mit einem  $3 \times 3$  Gauß-Filter geglättet. Das rechte Drittel wurde hingegen mit einem  $3 \times 3$  Median-Filter bearbeitet. (c) Analog zu b für Salz-und-Pfeffer-Rauschen.

dem inversen Filter wieder das ursprüngliche Objekt rekonstruiert werden kann. Dieser Vorgang wird Entfaltung, Rückfaltung oder Dekonvolution genannt. Betrachtet man das einfache Modell aus Gleichung 2.6, lässt sich die Frage bejahen, da sich die Gleichung im Fourierraum durch eine Division umstellen lässt:

$$\hat{f} = \hat{g} \cdot \hat{h} \quad \Rightarrow \quad \hat{g} = \frac{\hat{f}}{\hat{h}} . \quad (2.7)$$

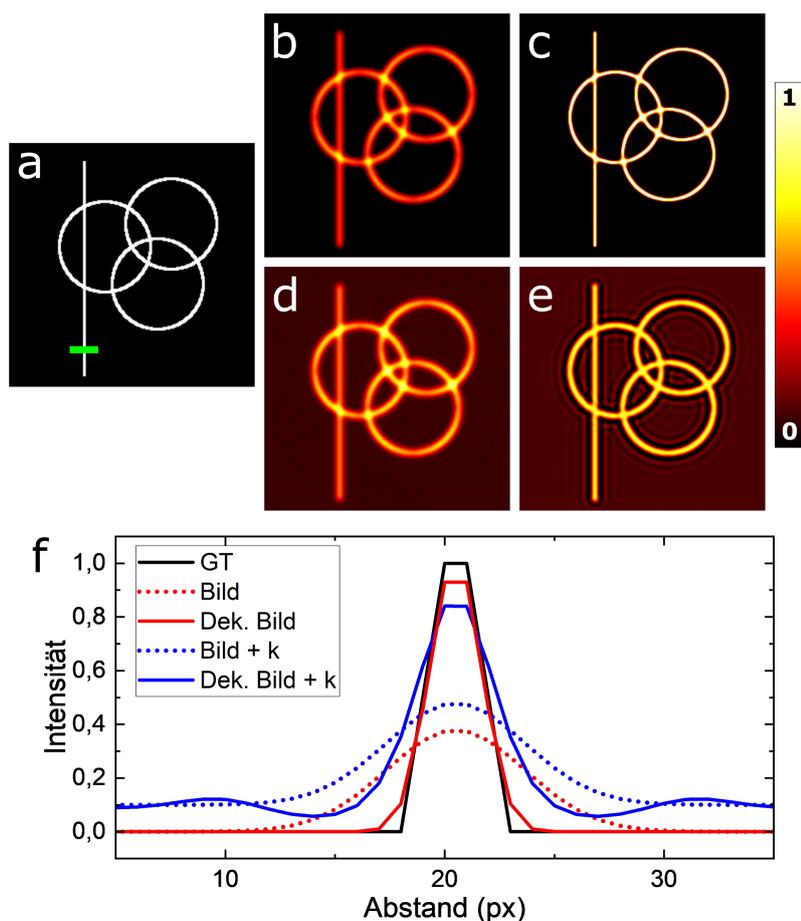
Diese Methode zur Dekonvolution wird inverses Filtern genannt. Dieser Ansatz bringt jedoch mehrere Probleme mit sich. Zuerst führen Nullstellen in  $\hat{h}$  zu Nulldivisionen, was sich jedoch bei numerischen Berechnungen umgehen lässt, indem man z.B. die Nullstellen auf Eins setzt. Weiter ist das Objekt  $g$  nicht notwendigerweise eindeutig, sodass mehrere Lösungen existieren können. Das größte Problem jedoch stellt das zuvor diskutierte Rauschen dar. Dieses beeinflusst den Abbildungsprozess durch einen zusätzlichen, additiven Term  $n$ :

$$f = g * h + n . \quad (2.8)$$

Eine vollständige und fehlerfreie Umkehr der Faltung wird dadurch unmöglich. Darüber hinaus wird der Rauschanteil beim inversen Filtern verstärkt, da i.A. die Fouriertransformierte der PSF zu hohen Frequenzen hin auf sehr kleine Werte abfällt, welche dann bei der Division große Intensitätswerte erzeugen. Um diesem Problem zu begegnen, wurden verschiedene Ansätze verfolgt und mehrere Algorithmen entwickelt. Einen guten Überblick dazu bietet Referenz [12]. Eine Methode, welche häufig verwendet wird und auch die Basis für Teile dieser Arbeit bildet, ist der Richardson-Lucy-Algorithmus [24, 25]. Dieser stellt eine iterative Methode der größten Plausibilität dar, um das abgebildete Objekt aus dem Bild zu rekonstruieren. Dabei wird die Annahme zugrunde gelegt, dass das Bild durch Poisson-Rauschen korrumpiert ist. Eine Iteration des Richardson-Lucy-Algorithmus lässt sich folgendermaßen schreiben:

$$g_{k+1} = g_k \cdot \left( \frac{f}{g_k * h} * h' \right). \quad (2.9)$$

Dabei ist  $g_k$  die Abschätzung des Objekts nach  $k$  Iterationen und  $h'$  die an allen Achsen gespiegelte PSF. Die Division und Multiplikation wird jeweils Pixel für Pixel ausgeführt. Für  $g_0$  wird meistens das gemessene Bild  $f$  verwendet. Ein einfaches Beispiel für die Faltung und Dekonvolution einer Struktur ist in Abbildung 2.7 gegeben. Anschaulich lässt sich die Dekonvolution als probabilistische Umsortierung von detektierten Photonen verstehen. Die PSF kann als Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Detektion der Photonen einer Punktquelle über den Pixeln des Sensors verstanden werden. Basierend darauf werden bei der Rückfaltung Photonen (bzw. Intensität) von einem Pixel auf den anderen übertragen. Diese Vorstellung macht einen wichtigen Aspekt deutlich: Die Rückfaltung ist energieerhaltend. Es wird keine Intensität erzeugt oder vernichtet. Damit dies jedoch gewährleistet ist, dürfen die Intensitätswerte des Bildes und der PSF keinen Versatz des Nullniveaus aufweisen. (Die Addition einer Konstanten würde bspw. ein Reservoir an Photonen bereitstellen, welches physikalisch nicht vorhanden ist. Dadurch entstehen Artefakte, welche sich im Bild als dunkle Umrandungen der abgebildeten Strukturen äußern [26] (Abbildung 2.7 e).) Dekonvolution führt zu einem höheren Kontrast und verbessert die Auflösung des Bildes mitunter deutlich. Der Grad der Verbesserung hängt dabei vom Signal-Rausch-Verhältnis, der Korrektheit der PSF sowie der Abtastrate ab und unterliegt Limitationen. Es handelt sich insbesondere nicht um ein Verfahren der sogenannten höchstauflösenden Mikroskopie, bei welcher die beugungsbedingte Auflösungsgrenze unterschritten wird, wenngleich auch dabei Dekonvolutionsalgorithmen angewendet werden können.



**Abbildung 2.7.:** (a) Ein rauschfreies, synthetisches Ground-Truth. (b) Faltung des Ground-Truth mit einer 2D-Gauß-Funktion (Standardabweichung  $\sigma = 3$  Pixel). (c) Richardson-Lucy-Dekonvolution des Bildes aus b (80 Iterationen). (d) Auf das Bild aus b wurde eine Konstante  $k = 0,1$  addiert. (e) Richardson-Lucy-Dekonvolution des Bildes aus d (80 Iterationen). Durch die logarithmische Darstellung der Intensität lassen sich die Artefakte deutlich erkennen. (f) Intensitätsprofile aller Bilder entlang der grünen Linie in a. Die Faltungen und Dekonvolutionen wurden mit der DeconvolutionLab2-Software berechnet [12].

Anhand der Bilder und Linienprofile in Abbildung 2.7 lässt sich leicht erkennen, dass das Bild nach der Dekonvolution eine größere Ähnlichkeit zum Ground-Truth aufweist als zuvor. Allerdings handelt es sich dabei zunächst um eine rein qualitative Analyse. Ein weiterer Vorteil digitaler Bilder besteht jedoch darin, dass sie sich auch quantitativ miteinander vergleichen lassen. Dies ist insbesondere dann möglich, wenn ein Referenzbild zur Verfügung steht. Als einfache Metrik kann beispielsweise die mittlere quadratische Abweichung (engl. *mean squared error*, MSE) verwendet werden, welche gegeben ist durch:

$$\text{MSE} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (f_i - g_i)^2, \quad (2.10)$$

wobei  $f_i$  und  $g_i$  die Pixel (Anzahl  $n$ ) des Referenz- und Testbildes darstellen [27]. Für identische Eingabebilder nimmt der MSE einen Wert von Null an. Der Vorteil dieser Metrik ist durch ihre einfache und schnelle Berechnung gegeben. Vergleicht man nun das Ground-Truth-Bild aus Abbildung 2.7 a mit dem Ergebnis der Faltung (Abbildung 2.7 b) erhält man einen MSE von 0,026. Nach Anwendung der Dekonvolution (Abbildung 2.7 c) beträgt der MSE 0,007, was bedeutet, dass die Rekonstruktion erfolgreich war. Der MSE zeigt auch die Addition einer Konstanten an. So liefert der Vergleich zwischen Abbildung 2.7 b und d einen MSE von 0,01. Dies spiegelt nicht unbedingt die Wahrnehmung eines menschlichen Betrachters wider und kann für bestimmte Anwendungen ein Problem darstellen (oder auch ein Vorteil sein).

Der Pearson-Korrelationskoeffizient (engl. *Pearson correlation coefficient*, PCC) ist ein weit verbreitetes Maß, um den Zusammenhang zweier Datensätze zu untersuchen und kann auch auf Bilddaten angewandt werden. Er ist gegeben durch:

$$\text{PCC} = \frac{\sum_{i=1}^n (f_i - \bar{f})(g_i - \bar{g})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (f_i - \bar{f})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (g_i - \bar{g})^2}}, \quad (2.11)$$

wobei  $\bar{f}$  und  $\bar{g}$  die Mittelwerte der einzelnen Bilder darstellen. Der PCC nimmt Werte zwischen  $-1$  und  $1$  an, wobei  $1$  einen vollständig positiven linearen Zusammenhang beschreibt.  $0$  bedeutet, dass kein linearer Zusammenhang besteht und  $-1$  beschreibt den vollständig negativen linearen Zusammenhang [27]. Vergleicht man nun erneut Abbildung 2.7 b und d anhand des PCC, erhält man einen Wert von  $1$ . Bezüglich der Dekonvolution steigt der PCC im Bezug auf das Ground-Truth von  $0,76$  auf  $0,93$  und bestätigt damit den Erfolg der Rekonstruktion. Beide Metriken können verwendet werden, um die Effektivität verschiedenster Verfahren der digitalen Bildbearbeitung zu bewerten (siehe Kapitel 5 und 6).

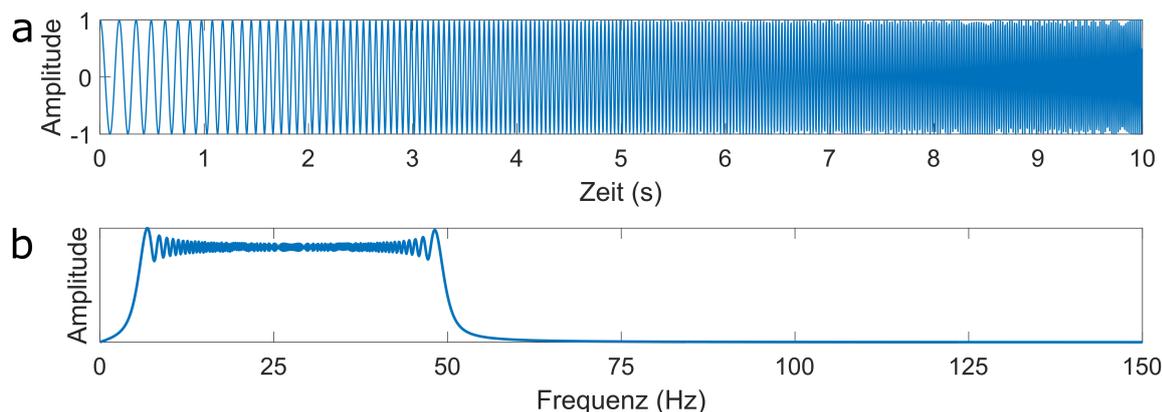
Die digitale Signalverarbeitung vereinfacht und erleichtert den Umgang mit Bilddaten ungemein. Darüber hinaus eröffnet sie vielzählige Möglichkeiten zur Korrektur und Analyse derselben, die ohne computergestützte Rechnungen undenkbar wären. Die hier genannten Methoden bilden dabei nur einen winzigen Ausschnitt aus dem breiten Spektrum an nützlichen Techniken auf dem Gebiet. Gleichzeitig eröffnen sich jedoch auch neue Fehlerquellen, welche nach Sorgfalt und Vorsicht des Anwenders verlangen.

## 2.4. Wavelet-Transformation

Signale übertragen Informationen mittels eines Trägers. In der Praxis besteht für den Empfänger jedoch häufig das Problem, dass das informationstragende Signal mit anderen Signalen und diversen Störungen überlagert ist. Bei der Identifizierung, Klassifizierung und Filterung von Signalen sind Frequenzanalysen ein hilfreiches Mittel. Beispielsweise kann das gemessene Signal in seine verschiedenenfrequenten Bestandteile zerlegt werden, damit das gewünschte Signal extrahiert und gegebenenfalls verstärkt werden kann. Für stationäre Signale, welche ihre statistischen Eigenschaften mit der Zeit nicht ändern, kann hierzu die Fouriertransformation verwendet werden,

$$\hat{f}(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-i\omega t} f(t) dt . \quad (2.12)$$

Die Fourier-Transformation stellt die Funktion in einer neuen Basis dar, welche durch Sinus- und Kosinusfunktionen verschiedener Frequenzen bzw. durch die komplexe Exponentialfunktion gebildet wird. Dadurch lässt sich dann beispielsweise das Amplitudenspektrum der im Signal auftretenden Frequenzen berechnen (Abbildung 2.8).



**Abbildung 2.8.:** (a) Ein nicht-stationäres, sinusförmiges Signal, dessen Frequenz innerhalb von 10 Sekunden linear von 5 auf 50 Hz ansteigt (Zirpe (engl. *chirp*)). Die Abtastfrequenz liegt bei 300 Hz. (b) Die Fourier-Transformierte des Signals zeigt Frequenzen zwischen 5 und 50 Hz. Die höchste darstellbare Frequenz entspricht der halben Abtastfrequenz. Zur Charakterisierung des Signals ist diese Analyse jedoch ungenügend.

Die Basisfunktionen der Fourier-Transformation sind allerdings zeitlich ins Unendliche ausgedehnt, wodurch sich keine explizite Aussage darüber machen lässt, zu welchem Zeitpunkt eine charakteristische Frequenz auftritt. So lässt sich anhand des Spektrums in Abbildung 2.8 nicht sagen, ob die Frequenz über die Zeit zu- oder abnimmt. Für ein stationäres Signal wäre dies unproblematisch, da ein kurzer Ausschnitt das gesamte Signal zu repräsentieren vermag. Jedoch hat man es wesentlich häufiger mit nicht-stationären Signalen zu tun. Ein Lösungsansatz hierfür bietet die Kurzzeit-Fourier-Transformation: Statt das Signal als Ganzes zu transformieren, wird es stückweise transformiert unter der Annahme, dass das Signal abschnittsweise als stationär betrachtet werden kann. Für das Beispiel in Abbildung 2.8 trifft dies zu, da für kurze Intervalle die Frequenz als näherungsweise konstant betrachtet werden kann. Die Kurzzeit-Fourier-Transformation  $\hat{f}_K$  lässt sich schreiben als:

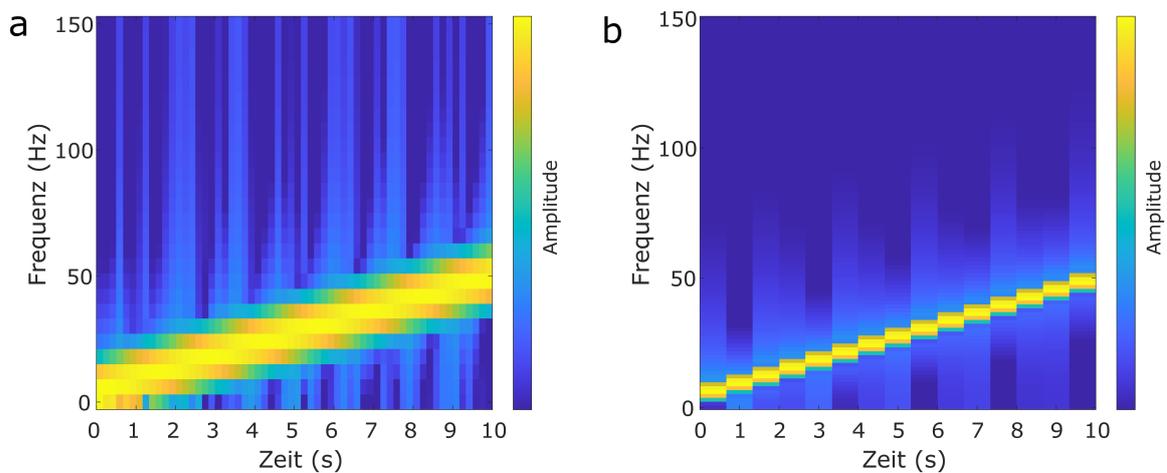
$$\hat{f}_K(\omega, \tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t)g(t - \tau)e^{-i\omega t} dt . \quad (2.13)$$

$g(t - \tau)$  ist hierbei die sog. Fensterfunktion, welche um die Zeit  $\tau$  verschoben wurde. Hierfür kann beispielsweise eine Rechteckfunktion oder eine Gauß-Funktion (in Kombination mit einer Rechteckfunktion) gewählt werden. Die Kurzzeit-Fourier-Transformation erlaubt

so eine Zeit-Frequenz-Analyse von nicht-stationären Signalen. Die Wahl der Breite der Fensterfunktion führt jedoch zu einem Dilemma: Ein schmales Fenster erlaubt eine hohe zeitliche Auflösung, aber nur eine niedrige Frequenzauflösung und umgekehrt (Abbildung 2.9). Dieser Umstand kann auch durch andere Verfahren nicht behoben werden. Es handelt sich um die Unschärferelation der Signalverarbeitung:

$$\Delta t \cdot \Delta f \geq \frac{1}{2}, \quad (2.14)$$

welche eine Analogie zur Heisenbergschen Unschärferelation in der Quantenmechanik darstellt [28].



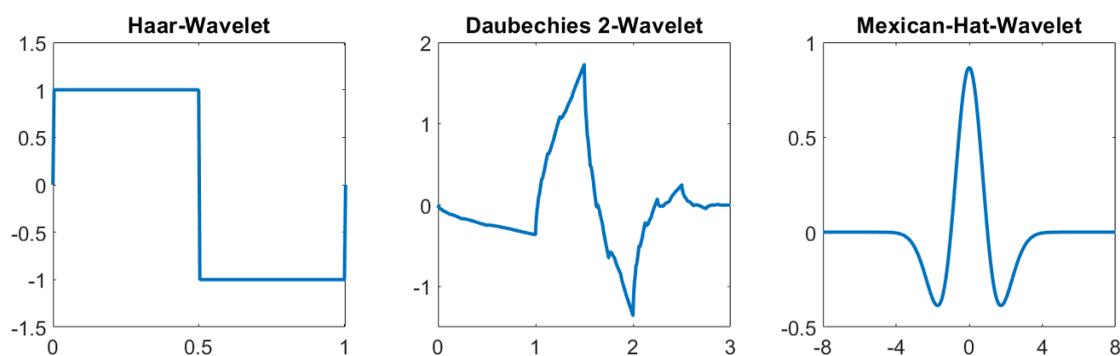
**Abbildung 2.9.:** (a) Kurzzeit-Fourier-Transformation des Signals aus Abbildung 2.8 mit einer Gauß-Fensterfunktion mit einer Breite von 0,167 s. (b) Analog zu a mit einer Fensterbreite von 0,67 s.

Doch auch wenn Zeit- und Frequenzauflösung nicht gleichzeitig beliebig hoch sein können, so wäre es durchaus vorteilhaft, bei hohen Frequenzen eine gute zeitliche Auflösung zu erreichen, da sich die Momentanfrequenzen aufgrund der kurzen Schwingungsdauern rasch ändern können. Umgekehrt ist bei niedrigen Frequenzen mit langen Schwingungsdauern eine hohe zeitliche Auflösung nicht von Bedeutung, wohingegen eine hohe Frequenzauflösung wünschenswert ist. Eine solche Analyse mit angepasster Zeit- und Frequenzauflösung kann mithilfe der Wavelet-Transformation durchgeführt werden.

Als Wavelet (dt. kleine Welle) werden in der Mathematik wellenförmige Funktionen bezeichnet, die nur in einem kleinen Intervall von Null verschieden sind. Die genaue Form ist dabei recht frei wählbar. Formal wird lediglich verlangt, dass es sich um eine quadratintegrale Funktion  $\psi(t)$  handelt, welche die Zulässigkeitsbedingung

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{|\hat{\psi}(\omega)|^2}{|\omega|} d\omega < \infty \quad (2.15)$$

erfüllt, woraus unter anderem folgt, dass ihr Mittelwert verschwindet. Einige Beispiele sind in Abbildung 2.10 dargestellt.



**Abbildung 2.10.:** Drei mögliche und häufig verwendete Wavelets.

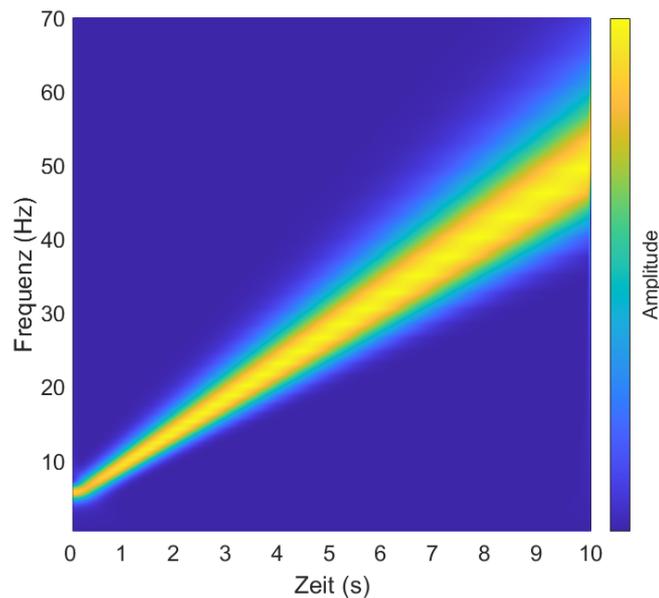
Zur Durchführung einer Wavelet-Transformation wird das Signal mit dem Wavelet auf verschiedenen Größenskalen verglichen. Hierzu wird das Mutter-Wavelet  $\psi(t)$  mit dem Skalierungsparameter  $a$  gestreckt und mit dem Translationsparameter  $b$  über das Signal bewegt. Durch die verschiedenen Skalierungen werden unterschiedliche Frequenzbereiche abgedeckt. Für alle Paare der Parameter  $a$  und  $b$  wird dann die Faltung zwischen Wavelet und Signal berechnet:

$$W(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int_{-\infty}^{+\infty} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right) f(t) dt . \quad (2.16)$$

Die Wavelet-Koeffizienten  $W(a, b)$  sind also ein Maß für die Übereinstimmung zwischen dem Signal und Wavelet. Graphisch dargestellt lässt sich dann leicht erkennen, welche Frequenzen zu welchen Zeiten im Signal vorhanden sind (Abbildung 2.11). Die Wahl des Wavelets hängt dabei hauptsächlich von der Anwendung ab und ob diese gegebenenfalls bestimmte, zusätzliche Eigenschaften erfordert. Ist dies nicht der Fall, bietet es sich im Allgemeinen an, ein Wavelet zu verwenden, das eine möglichst große Ähnlichkeit mit dem Signal aufweist.

Bisher wurde hier die kontinuierliche Wavelet-Transformation diskutiert. Diese ist nicht nur sehr rechenaufwändig, sondern produziert auch ein redundantes Ergebnis, da Wavelets, deren Skalierungsparameter nahe beieinander liegen, stark überlappen. In der Praxis, wo man ohnehin meist mit diskreten Signalen hantiert, bietet es sich daher an, nur bestimmte, diskrete Werte für  $a$  und  $b$  zuzulassen. Um die Redundanz klein zu halten, wird eine logarithmische Diskretisierung des Skalenparameters der Form  $a = 2^k$  mit  $k \in \mathbb{Z}$  gewählt. Gleichzeitig wird der Translationsparameter mit der Skalierung verknüpft:  $b = 2^k \cdot n$  mit  $n \in \mathbb{Z}$ . Dies ist eine sehr effiziente Wahl, da die Redundanz beseitigt wird und sich das Signal noch immer vollständig rekonstruieren lässt. Die Grundlage hierfür bildet die Multiskalenanalyse. Sie zeigt, dass durch die genannte Wahl der Parameter die Wavelets eine orthonormale Basis bilden [29].

Die diskrete Wavelet-Transformation ist über die Multiskalenanalyse auch eng mit der Filtertheorie verbunden. Dies führte zur Entwicklung der schnellen Wavelet-Transformation als effizienter Algorithmus zur Berechnung der Wavelet-Koeffizienten. Anstatt die Koeffizienten durch Anwendung der Definition in vielen einzelnen Faltungen zu berechnen,

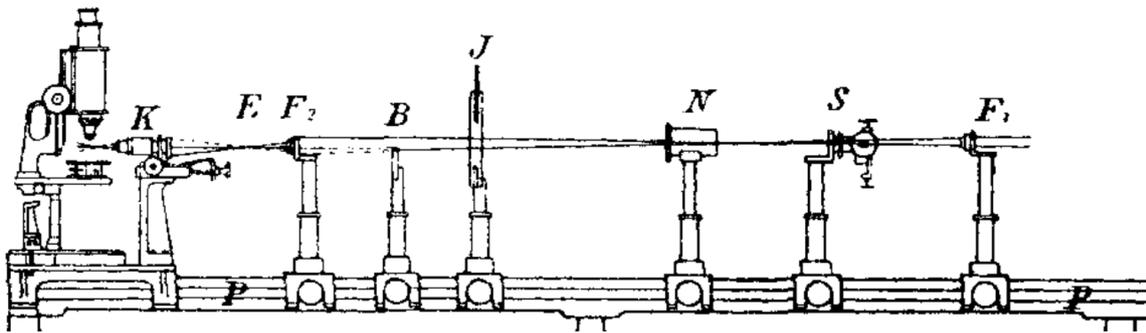


**Abbildung 2.11.:** Kontinuierliche Wavelet-Transformation des Signals aus Abbildung 2.8 unter Verwendung des Morse-Wavelets.

lassen sich diese hierarchisch durch die rekursive Anwendung von Filtern berechnen. Dieses Verfahren kann zudem abgebrochen werden, bevor die Koeffizienten unnötiger Frequenzbereiche ermittelt werden [29]. Durch die Entdeckung dieses schnellen Verfahrens haben Wavelets breite Anwendung in der Signalverarbeitung gefunden. So werden sie in Kompressionsverfahren, zur Rauschunterdrückung, zur Klassifikation sowie zur Lösung von Differentialgleichungen und vielem mehr genutzt [30–32]. Eine weitere Anwendung wird in Kapitel 5 beschrieben.

## 2.5. Entwicklung der Lichtscheibenmikroskopie

Die Lichtscheibenmikroskopie unterscheidet sich von anderen fluoreszenzmikroskopischen Verfahren vor allem durch die senkrechte Anordnung von Beleuchtungs- und Detektionspfad. Ihre erstmalige Anwendung fand diese Geometrie jedoch lange bevor die Fluoreszenzmarkierung als Methode der Kontrastgewinnung eingesetzt wurde. Im Jahr 1902 veröffentlichten Henry Siedentopf und Richard Adolf Zsigmondy einen Aufsatz über die „Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen“ [33]. Darin beschreiben sie die Vorteile der (zur Detektion) senkrechten Beleuchtung in ihrem Ultramikroskop (Abbildung 2.12) bei der Charakterisierung von Goldpartikeln in Rubingläsern. Den bedeutendsten Vorteil ihrer Methode veranschaulichen die beiden Wissenschaftler mit einer einfachen Alltagserfahrung: Fällt an einem sonnigen Tag das Licht durch einen Spalt in ein eher dunkles Zimmer, so werden unter seitlicher Betrachtung die Staubteilchen klar sichtbar [33]. Dies könnte als die Geburtsstunde der Lichtscheibenmikroskopie aufgefasst werden.



**Abbildung 2.12.:** Skizze des Aufbaus von Siedentopf und Zsigmondy. Übernommen aus [33].

Die Anwendung der senkrechten Beleuchtung im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie ließ allerdings noch einige Zeit auf sich warten. 1993 verwendeten Voie et al. [34] diese Technik bei dem Versuch, die dreidimensionale Struktur der Cochlea von Meerschweinchen zu rekonstruieren. Das verwendete Mikroskop unterschied sich konzeptionell nicht von heutigen Aufbauten. Lediglich eine Steuersoftware zur automatisierten Messung fehlte. Eine solche nutzten Huisken et al. [35] im Jahr 2004 und demonstrierten, wie nützlich die Methode zur Untersuchung dynamischer Prozesse wie der Entwicklung von Embryonen sein kann. Begründet ist dies durch die vergleichsweise hohe räumliche und zeitliche Auflösung bei gleichzeitig großem Sichtfeld und langen Aufnahmezeiträumen, die vor allem durch die geringe Phototoxizität und Bleichung ermöglicht werden. Darüber hinaus erhält man registrierte, optische Schnitte der Probe, welche eine dreidimensionale Rekonstruktion derselben erlauben. Punktrastermethoden sind schlichtweg zu langsam, um solche Entwicklungen zufriedenstellend beobachten zu können, und außerdem überstrapazieren sie die Probe mit zu hoher eingestrahelter Leistung. Die rekonstruierten Bilder erlaubten eine qualitative und quantitative Analyse von Zellpositionen, Migration und Zellteilung, wodurch sich typische Muster in der embryonalen Entwicklung identifizieren ließen [36]. Diese Umstände gaben den Anstoß für die rasante technische Entwicklung der Lichtscheibenmikroskopie. In den folgenden zwei Jahrzehnten wurden diverse Varianten gebaut und zahlreiche Verbesserungen und Erweiterungen eingeführt [37, 38]. Einige davon sollen hier hervorgehoben werden.

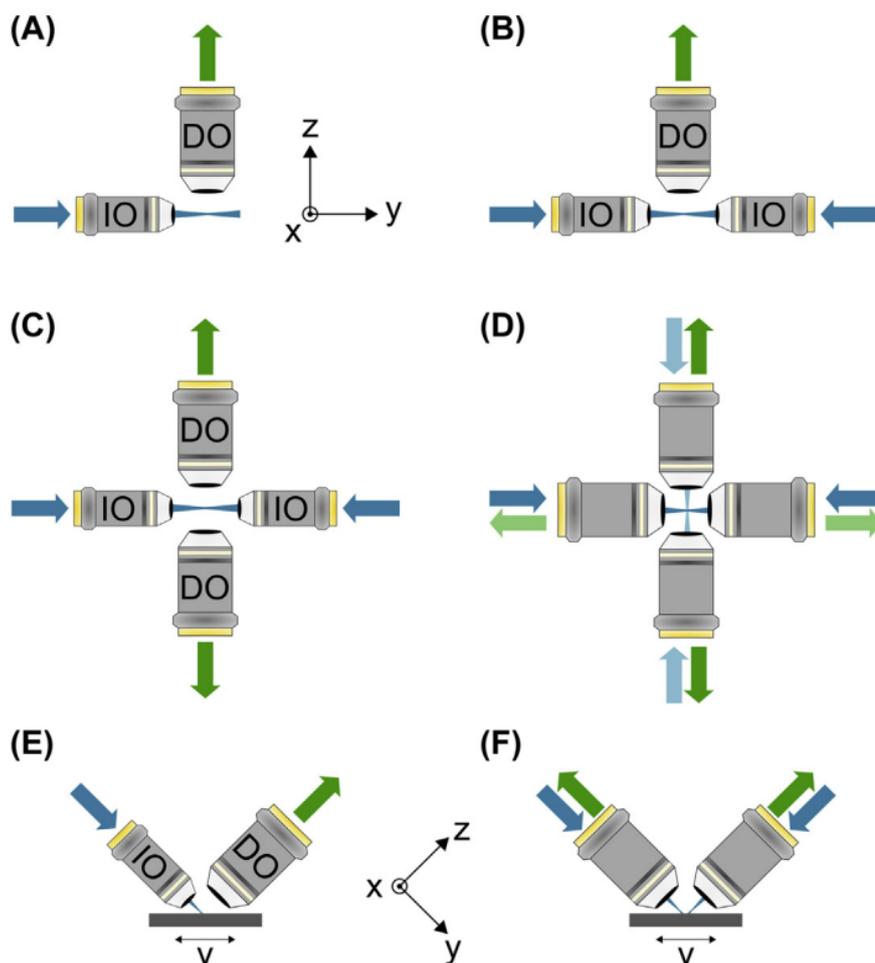
Die ersten Systeme nutzten Zylinderlinsen, um eine Lichtscheibe zu generieren. Diese fokussieren das einfallende Licht nur entlang einer Achse, sodass im Fokus eine dünne Scheibe gebildet wird. Alternativ kann jedoch auch ein fokussierter Laserstrahl mithilfe eines galvanometrischen Spiegels rasch durch die Probe gerastert werden. Dadurch ergeben sich eine Reihe von Vorteilen: Die Homogenität und Effizienz der Beleuchtung nehmen zu, und es werden keine Aperturen benötigt, wodurch Aberrationen reduziert werden [39]. Darüber hinaus besteht die Option, das Profil des Anregungsstrahls zu verändern, was die Eigenschaften der Lichtscheibe, insbesondere in Hinblick auf ihre Wechselwirkung mit der Probe, verändert. Beispielsweise können Besselstrahlen verwendet werden, um Streuartefakte zu reduzieren und höhere Eindringtiefen zu erreichen [40]. Dieses Thema wird ausführlich in Kapitel 4 behandelt. Etwas später synchronisierten Baumgart et al.

die Bewegung eines solchen, gerasterten Strahls mit dem zeilenweisen Ausleseschema (engl. *rolling shutter*) einer CMOS-Kamera. Dadurch kann der konfokale Effekt in einer Dimension genutzt werden, um Hintergrundfluoreszenz von außerhalb der Fokusebene zu blockieren, was die Bildqualität deutlich verbessert [41].

Allen Lichtscheibenmikroskopen gemein ist die senkrechte Geometrie zwischen Anregung und Detektion. Nichtsdestotrotz existiert eine große Vielfalt an verschiedenen Konstruktionen, welche dieses Prinzip umsetzen [42–44]. Einige Beispiele ohne Anspruch auf Vollständigkeit zeigt Abbildung 2.13. Die unterschiedlichen Bauweisen bringen ihre jeweiligen Vor- und Nachteile mit sich. Manche erfordern eine bestimmte Weise der Probenpräparation und -aufhängung (Einbettung in Gel, Abbildung 2.13 a-d), während andere konventionellere Methoden (z.B. Objektträger mit oder ohne Deckglas) erlauben (Abbildung 2.13 e,f). Manchmal wird die Probe von zwei Seiten beleuchtet, um eine homogenere Anregung zu erhalten (Abbildung 2.13 b,c,d). Welche Geometrie sich als optimal erweist, hängt maßgeblich von der biologischen Fragestellung ab. Auch die Eigenschaften und speziellen Anforderungen der Probe spielen eine wichtige Rolle. Nicht zuletzt sind mit zunehmender Komplexität auch ein höherer Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand verbunden. Letztendlich ist die Existenz der vielen verschiedenen Varianten auch dadurch begründet, dass stets eine gute Balance zwischen einer Vielzahl an Parametern gefunden werden muss.

Abbildung 2.13 c,d und f erzeugen auf den ersten Blick vermutlich etwas Verwirrung. Diese Konstruktionen zielen darauf ab, die Probe (ohne Rotation derselben) aus unterschiedlichen Winkeln abzubilden mit dem Ziel, zwei Probleme zu adressieren. Zum einen weisen unbearbeitete, dreidimensionale Aufnahmen eine Anisotropie bzgl. ihrer Auflösung auf. Diese ist entlang der optischen Achse deutlich schlechter als in lateraler Richtung. Zum anderen führen Streuung und Absorption von Licht sowohl im Beleuchtungs- als auch im Detektionspfad zu einer stetig abnehmenden Intensität des Signals und damit einer Abschwächung von Kontrast und Auflösung, insbesondere, wenn tiefere Schichten der Probe abgebildet werden. Eine geschickte Fusion der Aufnahmen ist in der Lage, die Anisotropien zu kompensieren. Dieses Verfahren wird *Multi-view* genannt und wurde noch vor dem Aufkommen der Lichtscheibenmikroskopie selbst eingeführt [45]. Die Algorithmen zur Fusion haben sich genau wie die Hardware in den folgenden Jahren rasch weiterentwickelt [46–49]. Obwohl mit *Multi-view*-Aufnahmen eine deutliche Steigerung der Bildqualität erreicht werden kann, muss auch hier ein Preis bezahlt werden: Die Aufnahmen aus verschiedenen Winkeln benötigen Zeit, führen ggf. zu einer höheren Leistungseinstrahlung, vergrößern die Datenmenge und erfordern eine aufwändige Nachbearbeitung (Fusion). Das Verfahren wird genauer in Kapitel 6 diskutiert.

Mittlerweile wurde die Lichtscheibenmikroskopie mit diversen anderen Ideen und Techniken kombiniert und erweitert. Mittels Zwei-Photonen-Anregung kann die Eindringtiefe erhöht werden [50]. Isotrope Auflösung lässt sich durch axiales Rastern des Beleuchtungs-Fokus erzielen [51]. Durch strukturierte Beleuchtung lassen sich Hintergrundbeiträge effektiv eliminieren [52]. Auch ist es möglich, Methoden der Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie (FCS) mit der Lichtscheibenmikroskopie zu vereinen, was eine quantitative Untersuchung biomolekularer Wechselwirkungen ermöglicht [53]. Anstelle sequentieller Messung mehrerer Farbkanäle ist es auch möglich, alle Farbkanäle in einer Messung



**Abbildung 2.13.:** Verschiedene, populäre Baueometrien für die Lichtscheibenmikroskopie. (B) zeigt die Variante, welche in dieser Arbeit verwendet wurde. Übernommen aus [42].

zu erfassen. Diese Technik nennt sich hyperspektrale Lichtscheibenmikroskopie [54, 55]. Darüber hinaus wurden Versuche unternommen, die Lichtscheibenmikroskopie mit dem STED-Prinzip zu verbinden [56–58]. Doch auch über die mikroskopische Analyse hinaus erweisen sich Lichtscheiben und orthogonale Geometrien als vorteilhaft und finden Anwendung in der Nanolithographie, als optische Pinzetten oder zum schnellen 3D-Mikrodruck [38, 59]. Für ein vollständigeres Bild sei auf diverse Übersichtsartikel verwiesen [36–38, 60–62].

## 3. Materialien und Methoden

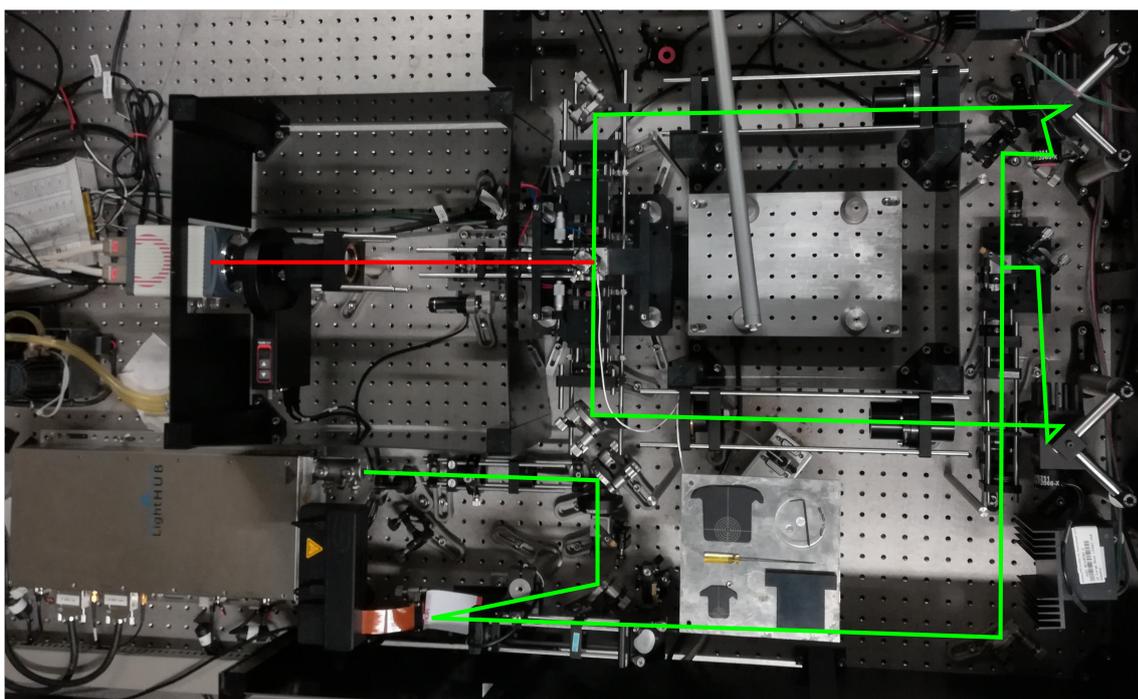
In diesem Kapitel wird der Aufbau und die Funktionsweise des verwendeten Lichtscheibenmikroskops detailliert erklärt. Außerdem wird auch auf die Steuerungshardware und -software sowie das Datenmanagement eingegangen. Der zur Bildregistrierung von Multi-view-Aufnahmen verwendete Algorithmus wird ebenfalls diskutiert. Abschließend werden noch die Methoden der Datenvisualisierung thematisiert.

### 3.1. Aufbau des verwendeten Lichtscheibenmikroskops

Die erste Version des verwendeten Lichtscheibenmikroskops wurde 2013 von Dr. Andrei Kobitski und Benjamin Schäfer aufgebaut [63]. Im Anschluss daran erweiterte Jonas Mertes das System und leistete wichtige Vorarbeiten im Bereich der Datenauswertung [64]. Yang Cui implementierte 2017 den Lichtmodulator sowie die konfokale Spaltdetektion (KSD) [65]. Seither wurden nur unwesentliche Änderungen am Aufbau vorgenommen, welche in der folgenden Beschreibung erwähnt werden. Zur Übersicht wird in Abbildung 3.1 eine Fotografie des Aufbaus gezeigt, wobei der Beleuchtungs- und Detektionspfad farblich markiert sind. In Abbildung 3.2 ist das Mikroskop mit allen Komponenten schematisch dargestellt. Der gesamte Aufbau steht auf einem optischen Tisch (*Melles Griot, Rochester, NY*) mit pneumatischer Nivellierung. Die Raumtemperatur wird durch eine Klimaanlage konstant gehalten, was die mechanische Stabilität der Optik erhöht. Es existieren zwei Varianten des Aufbaus: zum einen mit 16-facher Vergrößerung und einem Beobachtungsfeld von  $830\ \mu\text{m} \times 830\ \mu\text{m}$  und zum anderen mit 63-facher Vergrößerung und einem Beobachtungsfeld von  $176\ \mu\text{m} \times 176\ \mu\text{m}$ . Ein Wechsel zwischen den Varianten lässt sich mit einem Zeitaufwand von ungefähr zwei Stunden durchführen. Im Folgenden werden der Beleuchtungspfad, die Probenpositionierung, der Detektionspfad sowie die elektronische Steuerung im Einzelnen beschrieben und diskutiert.

#### 3.1.1. Anregungspfad

Verschiedene Fluorophore erfordern verschiedene Anregungswellenlängen. Daher verfügt das Mikroskop über ein Laser-Kombinationsmodul (*Laserage LightHUB, Omicron, Rodgau-Dudenhofen, Deutschland*), welches mit folgenden Festkörperlasern ausgestattet ist: Omicron LuxX (405 nm), Omicron LuxX (488 nm), Cobolt Jive (561 nm), Cobolt Mambo (594 nm), Omicron LuxX (642 nm). Innerhalb des Moduls werden alle Laser mittels Strahlteilern auf eine Achse ausgerichtet. Es ist auch möglich, zwei Laser gleichzeitig zu betreiben. Nachdem der Strahl aus dem Laser-Kombinationsmodul austritt, passiert er zunächst einen kontinuierlich einstellbaren Neutralsdichtefilter (*NDC-50C-2, Thorlabs GmbH, Dach-*

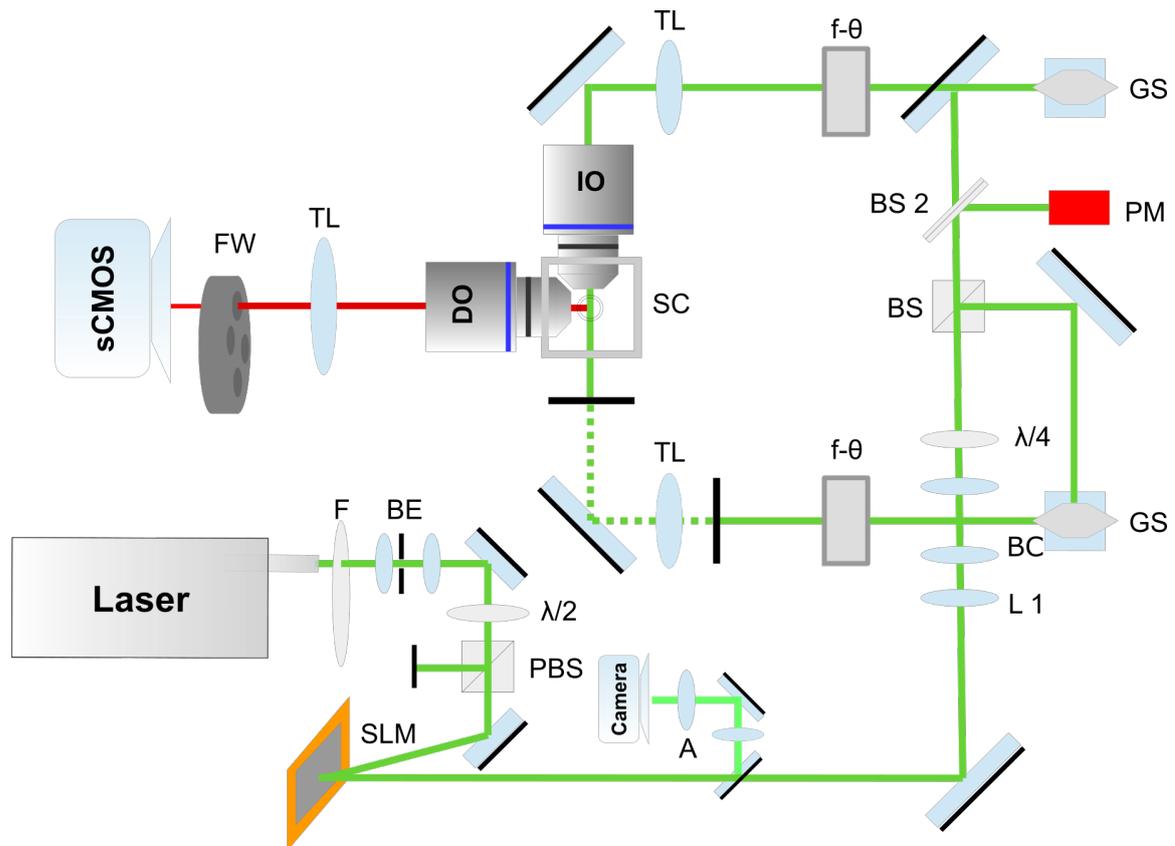


**Abbildung 3.1.:** Fotografie des Lichtscheibenmikroskops, Aufsicht von oben. Der Beleuchtungspfad ist in grün und der Detektionspfad in rot hervorgehoben.

au, Germany), welcher zur Leistungsregulierung beiträgt. Dahinter befindet sich ein Strahlaufweiter bestehend aus zwei Sammellinsen ( $AC254-010-A, f = 10 \text{ mm}$ , Thorlabs und  $AC254-080-A-ML, f = 80 \text{ mm}$ , Thorlabs). Der Strahldurchmesser wird also um einen Faktor 8 vergrößert. Dies ist notwendig, um den Bildschirm des Lichtmodulators möglichst großflächig zu beleuchten, was zu einer feineren und leistungseffizienten Modulation beiträgt. Eine Lochblende im Fokuspunkt des Strahlaufweiters sorgt für ein sauberes Strahlprofil.

Anschließend wird der Strahl an einem Spiegel reflektiert und läuft durch ein  $\frac{\lambda}{2}$ -Plättchen ( $AHWP05M-600$ , Thorlabs), welches die Polarisationsrichtung um einen einstellbaren Winkel dreht, und einen polarisierenden Strahlteiler ( $PBS201$ , Polarizing Beam Splitter, Thorlabs). Diese Anordnung dient zum einen der Leistungsregulierung und zum anderen stellt sie die Polarisation des Lichtes passend für den Lichtmodulator ein. Dieser verlangt p-polarisiertes Licht, was bedeutet, dass der Vektor des elektrischen Feldes parallel zur Einfallsebene ausgerichtet ist. Ein weiterer Spiegel lenkt den Strahl schließlich auf den Lichtmodulator.

Der räumliche Lichtmodulator (engl. *spatial light modulator*, SLM) (*LETO Phase-only SLM, Holoeye Photonics AG, Berlin, Deutschland*) ermöglicht eine flexible und präzise Manipulation der Phase des einfallenden Lichtes. Hierdurch können optische Bauteile wie Linsen, Gitter oder Blenden imitiert werden. Darüber hinaus lassen sich auch Aberrationen korrigieren und wesentlich kompliziertere Phasenmanipulationen realisieren. Der Mo-



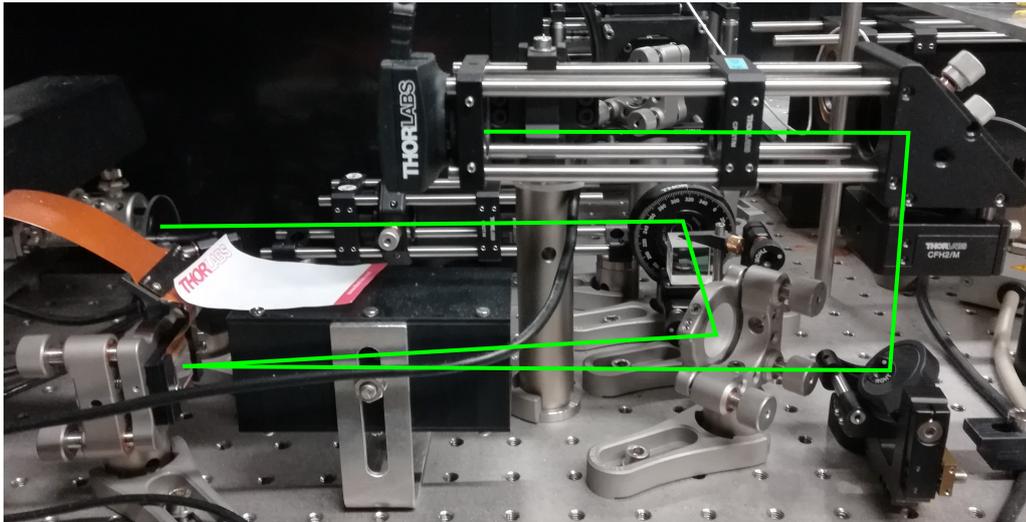
**Abbildung 3.2.:** Schematische Darstellung des Lichtscheibenmikroskops, Aufsicht von oben. Der Beleuchtungspfad ist in grün und der Detektionspfad in rot hervorgehoben. Die Abkürzungen werden in Tabelle 3.1 erklärt. Übernommen aus [66].

dulator besteht im Wesentlichen aus einem Siliziumsubstrat, auf dessen Oberfläche eine Matrix aus Elektroden (Pixel) aufgebracht ist. Darüber befindet sich ein Bragg-Spiegel und eine Flüssigkristallschicht. Diese wird schließlich von einer transparenten Elektrode und einer dünnen Glasplatte bedeckt. Wird nun eine Spannung zwischen einem Pixel und der transparenten Elektrode angelegt, richten sich die doppelbrechenden Flüssigkristalle nach dem elektrischen Feld aus, wodurch sich der Brechungsindex ändert. Das einfallende Licht, welches die Flüssigkristallschicht zweimal durchläuft, erfährt nun eine ortsabhängige Phasenverschiebung, die letztendlich zur gewünschten Modulation führt. Die Phasenmaske wird in Form eines 8 Bit Graustufenbildes vom Computer an den SLM übergeben. In dem hier beschriebenen Aufbau lassen sich dadurch verschiedene Strahlformen zur Probenbeleuchtung nutzen, worauf in Kapitel 4 eingegangen wird. Um die Resultate der Strahlformung erfassen zu können, kann der Beleuchtungspfad mithilfe eines klappbaren Spiegels umgelenkt werden (Abbildung 3.2 A). Zwei Linsen (AC60 und AC100, Thorlabs) verbreitern den Strahl und projizieren ihn auf eine CMOS-Kamera (DCC1545M-GL, Thorlabs). Eine Fotografie dieses Aufbaus mit hervorgehobenem Strahlengang ist in Abbildung 3.3 zu sehen.

**Tabelle 3.1.:** Erläuterung der Abkürzungen in Abbildung 3.2.

Abkürzung	Erläuterung
F	Neutraldichtefilter
BE	Strahlaufweiter (engl. <i>beam expander</i> )
$\lambda/2$	$\frac{\lambda}{2}$ -Plättchen
PBS	Polarisierender Strahlteiler (engl. <i>polarizing beam splitter</i> )
SLM	räumlicher Lichtmodulator (engl. <i>spatial light modulator</i> )
A	klappbarer Spiegel mit Strahlaufweiter und Kamera
L	Linse
BC	Strahlkompressor
$\lambda/4$	$\frac{\lambda}{4}$ -Plättchen
GS	galvanischer Spiegel (engl. <i>galvo scanner</i> )
BS	Strahlteiler (engl. <i>beam splitter</i> )
BS 2	Strahlteiler 2 (90:10) (BSF10-A, Thorlabs)
PM	Powermeter: Photodiode zur Leistungsmessung
f- $\theta$	F-Theta Linse
TL	Tubuslinse
IO	Beleuchtungsobjektiv (engl. <i>illumination objective</i> )
SC	Probenkammer (engl. <i>sample chamber</i> )
DO	Detektionsobjektiv
FW	Filterrad (engl. <i>filter wheel</i> )

Der durch den SLM fokussierte Strahl wird von einem Spiegel reflektiert und trifft auf eine Linse (*AC254-500-A-ML*,  $f=500\text{ mm}$ , Thorlabs), welche ihn kollimiert. Ein umgekehrter Strahlaufweiter (*AC254-050-A-ML*,  $f=50\text{ mm}$ , Thorlabs und *AC254-040-A-ML*,  $f=40\text{ mm}$ , Thorlabs) reduziert den Strahldurchmesser anschließend. Durch ein  $\frac{\lambda}{4}$ -Plättchen (*AQWP05M-600*, *Quarter-wave Plate*,  $400 - 800\text{ nm}$ , Thorlabs) wird aus der linearen wieder eine zirkulare Polarisation, sodass der folgende Strahlteiler (*BS016*, *Non-polarizing*, 50:50, Thorlabs) den Strahl in zwei Teile mit gleicher Intensität separieren kann. Durch die Aufteilung des Strahls kann die Probe von zwei gegenüberliegenden Seiten beleuchtet werden. Dies führt zu einer gleichmäßigeren Ausleuchtung der Probe, was vor allem bei stark absorbierenden Proben die Bildqualität steigert. Die Pfade der beiden Teilstrahlen sind bis zur Probenkammer baugleich. Der Strahl wird mit einigen Spiegeln zu einem galvanischen Spiegel (*GVS211/M*, Thorlabs) geführt, welcher eine periodische Schwenkbewegung durchführt. In Kombination mit einer F-Theta-Linse (*S4LFT4375*, *Sill Optics*, Wendelstein, Deutschland) wird der Strahl so parallel zur optischen Achse gerastert, wodurch eine Lichtscheibe entsteht. Schließlich wird der Strahl durch eine Tubuslinse (*200 mm Tube Lens*, Nikon, Tokio, Japan) und das Beleuchtungsobjektiv (*CFI LU Plan Fluor 5x/0.15A*, Nikon oder *CFI Plan Fluorite 10x/0.3W*, Nikon) in die Probenkammer hinein abgebildet. Das Beleuchtungsobjektiv ist in einen linearen Verschiebetisch (*CT1*, Thorlabs) eingeschraubt, sodass der Fokus des Strahls an eine bestimmte Position innerhalb des Beobachtungsfeldes bzw. der Probe bewegt werden kann. Für den Aufbau mit 16-facher Vergrößerung wird eine Probenkammer mit dünnen Glasfenstern benutzt und die Beleuchtungsobjektive



**Abbildung 3.3.:** Fotografie des Aufbaus zur Untersuchung des Strahlprofils, seitliche Ansicht. Die optische Achse ist in grün hervorgehoben.

(Luftimmersion) befinden sich außerhalb der Probenkammer. Bei 63-facher Vergrößerung ist der Arbeitsabstand der Beleuchtungsobjektive (Wasserimmersion) so klein, dass diese in die Probenkammer hineinragen. Diese wird mithilfe von Latex-Fingerlingen abgedichtet, was den Objektiven einen kleinen Bewegungsspielraum gibt. Der Aufbau verfügt außerdem über eine Photodiode zur Leistungsmessung (*S121C*, 400 - 1100 nm, Thorlabs), welche an verschiedenen Stellen im Strahlengang montiert werden kann. Hierzu kann auch ein weiterer Strahlteiler (*BSF10-A*, 90:10, Thorlabs) verwendet werden, welcher 10% der Leistung aus dem Strahlengang auskoppelt, sodass sich die Leistung auch während der Messung überwachen lässt.

#### 3.1.2. Probenpositionierung

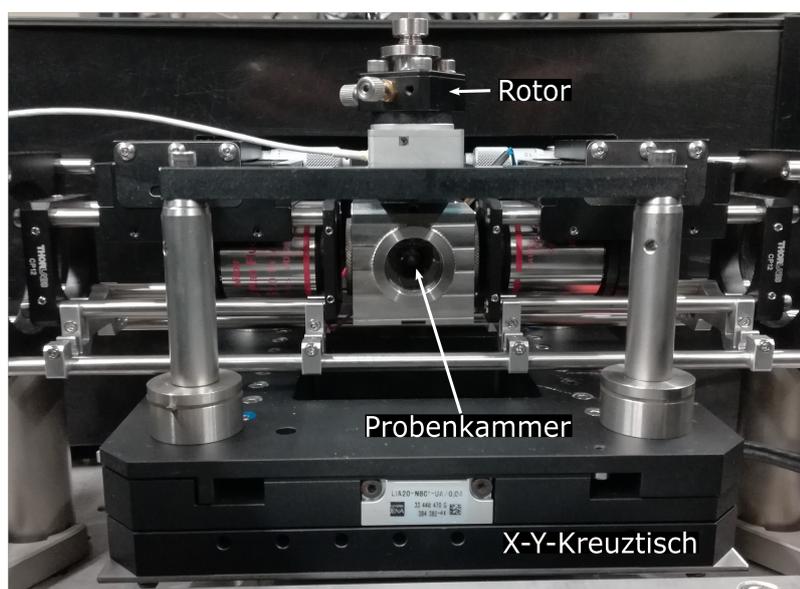
Dreidimensionale Mikroskopie erfordert eine äußerst präzise Kontrolle der Probenposition. Einerseits muss die Probe gut sichtbar im Beobachtungsfeld des Detektionsobjektivs positioniert werden, wozu diese um Bruchteile eines Millimeters verschiebbar sein muss. Andererseits soll die Probe während einer Messung in regelmäßigen, kleinen Schritten von wenigen Mikrometern wiederholt entlang der Detektionsachse bewegt werden. Insbesondere, wenn die Probe aus mehreren Winkeln und in mehreren Farbkanälen vermessen werden soll, müssen bestimmte Positionen exakt eingestellt werden können. Dies wird durch eine Konstruktion mit mehreren Komponenten gewährleistet.

Im Zentrum des optischen Tisches ist ein linearer Verschiebetisch montiert (*UZS80CC*, Newport Darmstadt, Deutschland), welcher mit einer Schrittgröße von 0,2  $\mu\text{m}$  auf einer Distanz von 4,5 mm eine Bewegung nach oben und unten erlaubt. Auf diesem Verschiebetisch steht ein X-Y-Kreuztisch (*M-686.D64*, Physik Instrumente, Karlsruhe, Deutschland), womit Bewegungen mit einer Schrittgröße von 0,3  $\mu\text{m}$  auf einer Länge von 25 mm sowohl nach links und rechts als auch vor und zurück realisiert werden können. In dem Kreuztisch sind vier Edelstahlpfosten verschraubt, auf welche eine H-förmige Halterung angebracht

### 3. Materialien und Methoden

werden kann. Auf dem mittleren Balken dieser Halterung befindet sich wiederum die Rotationsplattform (*SR2812s-20, SmarAct, Oldenburg, Deutschland*), in welche ein zylindrischer Stab aus Edelstahl als Probenhalter eingespannt werden kann. Der Rotor ermöglicht es, die Probe um die Aufhängungsachse herum mit einer Präzision von unter einem Mikrograd zu drehen. Der ganze Aufbau wird von mehreren Steuerungseinheiten (*C-867,PI; lineMotion Controller, PI; SMC100, Newport; MCS 3D, SmarAct*) kontrolliert.

Die Probe selbst wird in einem Kunststoff-Schlauch (*FEP-Schrumpfschlauch, Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg*) eingebettet, welcher am unteren Ende des Probenhalters befestigt wird, und von oben in die mit Wasser gefüllte Probenkammer eintaucht. Die Temperatur in der Probenkammer kann mithilfe eines Thermostats (*TC2200, Thorlabs*) eingestellt werden.

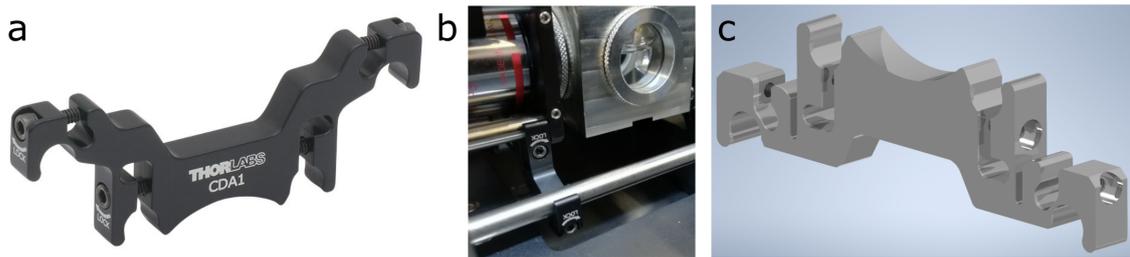


**Abbildung 3.4.:** Vorrichtung zur Probenpositionierung.

Der X-Y-Kreuztisch befindet sich direkt unterhalb der Halterung für die Beleuchtungsobjektive. Diese besteht aus zwei parallelen Stäben mit einem Abstand von 60 mm. Die Objektive werden mithilfe eines Adapters für Käfigsysteme (Abbildung 3.5a,b) auf den beiden Stäben montiert. Auf diese Weise könnte die von unten greifende Außenklammer des Adapters unter Umständen den Kreuztisch blockieren, was in der Praxis auch vorgekommen ist. Um dieses Problem zu lösen, ohne den Gesamtaufbau neu konfigurieren zu müssen, wurde das Design des Adapters modifiziert (Abbildung 3.5c). Der neue Adapter benötigt keinen Platz unterhalb der tragenden Stäbe und steht dem Kreuztisch nicht mehr im Weg.

#### 3.1.3. Detektionspfad

Der Detektionspfad stellt im Wesentlichen ein Weitfeldmikroskop dar. Somit kann das gesamte Beobachtungsfeld auf einmal abgebildet werden, ohne dieses abrastern zu müssen, wodurch hohe Bildraten ermöglicht werden. Das Fluoreszenzlicht der Probe wird vom Detektionsobjektiv (*CFI LWD Plan Fluorite 16x/0.8W, Nikon* oder *W Plan-Apochromat*



**Abbildung 3.5.:** 30 mm zu 60 mm Adapter für Käfigsysteme. (a) Die Variante von Thorlabs (Artikelnummer: CDA1). Bild übernommen aus [67]. (b) Der Adapter befestigt das Objektiv vor der Probenkammer. Die von unten greifende Außenklammer könnte den darunter befindlichen Kreuztisch blockieren. (c) Die modifizierte Variante mit umgekehrten, von oben greifenden Außenklammern löst das Problem. Bildschirmfoto aus der CAD-Software Autodesk.

63x/1,0W, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) eingefangen, welches fest in die Probenkammer eingepasst ist. Die Position der Fokusebene des Objektivs lässt sich mithilfe eines linearen Verschiebetisches (*M-462-X-SD*, Newport) und eines hochauflösenden Aktuators (*PZA12*, Newport) einstellen. Optimalerweise fällt die Fokusebene mit der Lichtscheibe zusammen. Hinter dem Objektiv befindet sich eine Tubuslinse (200 mm *Tube Lens*, Nikon oder (164,5 mm *Tube Lens*, Zeiss), welche das Licht auf den Kamerasensor fokussiert. Zuvor jedoch passiert es ein Filterrad (*FW102C*, Thorlabs) mit verschiedenen Farbfiltern, um das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht zu trennen. Tabelle 3.2 listet die einzelnen Farbfilter auf.

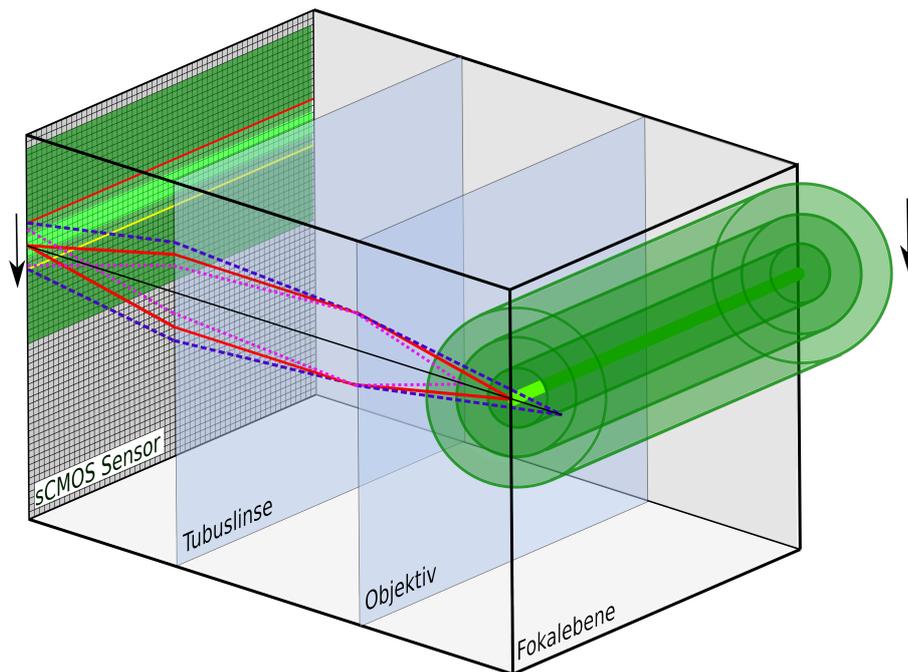
**Tabelle 3.2.:** Filter des Filterrads.

Anregungswellenlänge (nm)	Filter
405	BrightLine 460/80
488	BrightLine 525/50
561	BrightLine 641/75
594	BrightLine 665/150
642	EdgeBasic 664 LP

Schließlich wird zur Detektion des Lichts eine sCMOS-Kamera (*ORCA-Flash4.0 V2*, C11440-22CU, Hamamatsu Photonics GmbH, Herrsching, Deutschland) genutzt. Deren Sensor teilt sich in  $2048 \times 2048$  Pixel mit einer Größe von  $6,5 \mu\text{m} \times 6,5 \mu\text{m}$  auf. Insgesamt misst der Sensor  $13,312 \text{ mm} \times 13,312 \text{ mm}$ .

In konventionellen Weitfeldfluoreszenzmikroskopen wird ein und dasselbe Objektiv zur Beleuchtung der Probe wie zur Detektion der Fluoreszenz benutzt. Die Probe wird dabei vollständig durchleuchtet, und eine Tiefendiskriminierung ist nur sehr begrenzt möglich, da sehr starke Hintergrundfluoreszenz aus Bereichen außerhalb der Fokalebene den Detektor erreicht. Hierdurch motiviert erfand Marvin Minsky 1955 das Konfokalmikroskop

[68]. In einem solchen Mikroskop wird die Probe mit einem fokussierten Lichtstrahl angeregt. Unter Verwendung einer Lochblende, welche zur Fokalebene des Objektivs konjugiert ist, werden bei der Detektion des Fluoreszenzsignals die Hintergrundbeiträge abgeblockt. Mit diesem Verfahren wird die Probe Punkt für Punkt abgerastert und aus den Einzelmessungen anschließend ein Bild rekonstruiert. Konfokalmikroskope eignen sich daher für dreidimensionale Messungen und bieten einen hohen Kontrast. Nachteilig ist jedoch das langsame Rastern sowie die in Summe hohe Lichtexposition. Die Lichtscheibenmikroskopie besticht gerade dadurch, dass sie 3D Daten schnell und mit geringer Lichtdosis liefert, was durch die senkrechte Beleuchtung der Probe und damit einhergehenden Tiefendiskriminierung ermöglicht wird. Die Detektion allerdings funktioniert analog zur Weitfeldmikroskopie, und die Streuung des Lichts innerhalb der Probe führt zu Hintergrundbeiträgen. Diese sind zwar wesentlich geringer als bei der konventionellen Weitfeldmikroskopie, aber dennoch unerwünscht. Um diese zu unterdrücken, nutzten Fahrbach und Rohrbach wiederum das konfokale Prinzip, jedoch nur in einer Dimension, indem sie sequentiell gemessene Bilder (mit verschiedenen Positionen des Anregungsstrahls) mit spaltförmigen Masken belegten und anschließend fusionierten [69]. Baumgart und Kubitschek synchronisierten die Rasterbewegung des Anregungsstrahls mit dem zeilenweisen Ausleseschema einer sCMOS-Kamera [41]. Dadurch wird eine anschließende Fusion unnötig. Das Konzept wird in Abbildung 3.6 veranschaulicht.



**Abbildung 3.6.:** Schematische Darstellung der KSD. Das zur Anregung verwendete Hauptmaximum des Besselstrahls (rechts in hellgrün) mit seinem Ringsystem (dunkelgrün) wird von oben nach unten durch die Probe bewegt. Auf dem Kamerasensor (links) werden die Pixel reihenweise aktiviert (gelbe Linie auf dem sCMOS-Sensor), belichtet und wieder deaktiviert (rote Linie auf dem sCMOS-Sensor). Dies geschieht synchron mit der Bewegung des Anregungsstrahls. Das Fluoreszenzlicht aus der Fokalebene (rote, durchgezogene Linien, mittig) fällt in den aktiven Bereich des Sensors. Fluoreszenz von außerhalb der Fokalebene (pink und dunkelblau gestrichelte Linien) erreicht größtenteils nur inaktive Pixel.

Die hier verwendete Kamera kann in zwei Betriebsmodi genutzt werden: Zum einen können, wie oben bereits angesprochen, alle Pixel zeitgleich aktiviert werden. Zum anderen lassen sich die Pixel auch reihenweise nacheinander aktivieren. Hierdurch wird zwar die Bildrate begrenzt, jedoch ergibt sich auch der entscheidende Vorteil die KSD nutzen zu können. Die reihenweise Aktivierung der Pixel stellt nämlich einen virtuellen optischen Spalt dar, der über den Kamerasensor hinweg bewegt wird. Dies erzeugt einen konfokalen Effekt, welcher Fluoreszenzlicht, das aus Bereichen außerhalb der Fokalebene stammt, teilweise unterdrückt. Besonders effektiv ist die KSD bei Lichtscheiben, die durch das Rastern eines Laserstrahls erzeugt werden. Wird nämlich die Bewegung des virtuellen Spaltes mit der des galvanischen Spiegels synchronisiert, erhält man eine hohe Abbildungseffizienz bei gleichzeitiger Unterdrückung des Hintergrunds.

#### 3.1.4. Steuerungshardware und -software

Laser, SLM, galvanometrische Spiegel, Filterrad und Kamera - damit all diese Komponenten effektiv und gemeinsam funktionieren können und dabei den (veränderlichen)

Anforderungen der jeweiligen Anwendung gerecht werden, bedarf es einer ausgeklügelten elektronischen Steuerung. Dies erfolgt mithilfe eines Rechners (Supermicro X8DTG-QF Mainboard, 2× Intel Xeon E5620 CPU, Areca ARC-1880ix-12 SATA RAID-Controller, multi-funktionale Datenerfassungskarte (NI PCI-6733, National Instruments, Austin, TX)), an welchen die einzelnen Komponenten angeschlossen sind. Eine von Dr. Andrei Kobitski in C++ und CUDA programmierte Software namens „SPIMControl“ steuert diese mit einem hohen Automatisierungsgrad. So lassen sich Messungen mit verschiedenen Einstellungen (Probenposition inkl. Blickrichtung sowie Anregungswellenlänge) in zeitlicher Abfolge (ggf. mit Unterbrechungen) durchführen. „SPIMControl“ ist insgesamt ein umfangreiches Programm, dessen einzelne Funktionen hier nicht ausführlich diskutiert werden können und sollen. Es sei jedoch noch erwähnt, dass die Software komfortabel über eine graphische Benutzeroberfläche bedient wird. Außerdem zeigt sie dem Nutzer Maximumintensitätsprojektionen des gemessenen Bildstapels aus drei Raumrichtungen, welche in Echtzeit aktualisiert werden. In dem Rechner sind ein 100 GB großer Arbeitsspeicher, eine leistungsstarke CPU und eine Grafikkarte mit 8 GB Arbeitsspeicher verbaut, sodass er auch direkt zur Auswertung der Daten verwendet werden kann. Im Zuge dieser Arbeit wurde die SPIM-Control Software um zwei Funktionalitäten erweitert. Zum einen hat der Anwender nun die Option, eine Korrektur des Pixelversatzes sowie des Verstärkungsfaktors (engl. *offset and gain*) direkt nach der Messung, also noch bevor der Bildstapel auf der Festplatte gespeichert wird, vorzunehmen. Hierfür müssen diese Werte zuvor in einer Messung bestimmt werden. Ein Bild, welches den mittleren Pixelversatz bzw. den Verstärkungsfaktor für den gesamten Sensor darstellt, kann dann über die grafische Benutzeroberfläche eingelesen werden. Zum anderen wurde eine halb-automatische Probenpositionierung implementiert, welche die Vorbereitung von Multi-view-Aufnahmen (siehe Kapitel 6) erleichtert. In der ursprünglichen Version der Software musste die Position der Probe für jede Ansicht von Hand eingestellt werden, was mühselig und zeitaufwändig war - insbesondere, wenn beispielsweise acht Ansichten angefertigt werden sollten. Tatsächlich genügt es jedoch, wenn nur zwei Ansichten von Hand eingestellt werden. Sind die ersten zwei Positionen der Probe ( $P_1(x_1, z_1)$  und  $P_2(x_2, z_2)$ ) sowie der dazugehörige Rotationswinkel  $\alpha$  bekannt, so lässt sich der Mittelpunkt des Rotationskreises ( $M(x_m, z_m)$ ) durch Lösen des folgenden Gleichungssystems bestimmen:

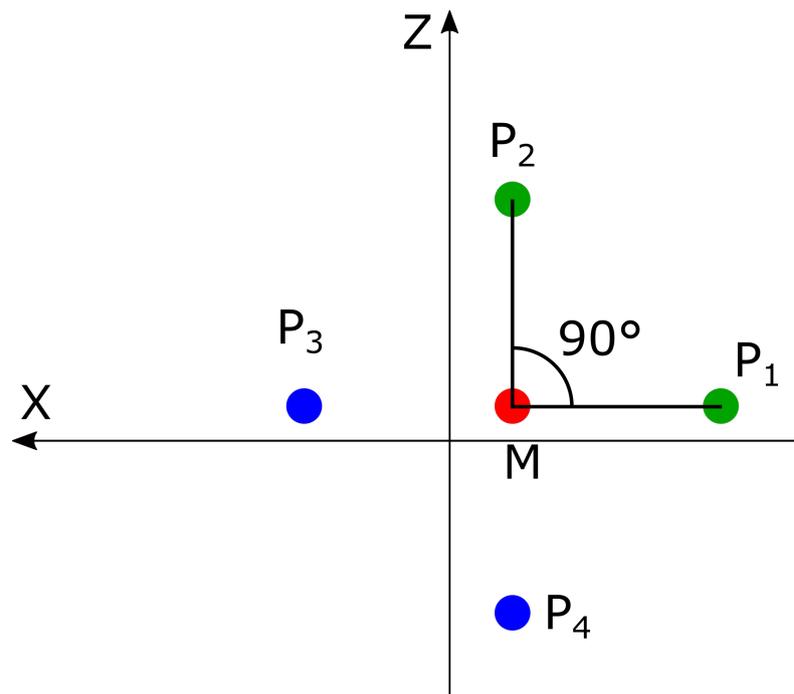
$$\begin{aligned}x_2 &= \cos(\alpha) * (x_1 - x_m) - \sin(\alpha) * (z_1 - z_m) + x_m , \\z_2 &= \sin(\alpha) * (x_1 - x_m) + \cos(\alpha) * (z_1 - z_m) + z_m .\end{aligned}\tag{3.1}$$

Die weiteren Positionen ( $P_3, P_4, \dots$ ) erhält man rekursiv mithilfe von:

$$\begin{aligned}x_n &= \cos(\alpha) * (x_{n-1} - x_m) - \sin(\alpha) * (z_{n-1} - z_m) + x_m , \\z_n &= \sin(\alpha) * (x_{n-1} - x_m) + \cos(\alpha) * (z_{n-1} - z_m) + z_m .\end{aligned}\tag{3.2}$$

Zur Veranschaulichung sind die Punkte in Abbildung 3.7 in ein Koordinatensystem eingetragen.

Die Software übernimmt die Einstellungen für die ersten beiden Positionen und trägt bei Bedarf die Koordinaten für alle weiteren Positionen automatisch ein. Die dadurch erreichte



**Abbildung 3.7.:** Koordinatensystem der semi-automatischen Probenpositionierung. Die von Hand eingestellten Positionen  $P_1$  und  $P_2$  (grün) und deren Rotationswinkel sind bekannt. Daraus ergibt sich der Mittelpunkt (rot) und schließlich die weiteren Positionen  $P_3$  und  $P_4$  (blau) nach den Gleichungen 3.1 und 3.2.

Zeiteinsparung ist besonders dann von Vorteil, wenn beispielsweise die Entwicklung eines Embryos im sehr frühen Stadium beobachtet werden soll, da bei langer Vorbereitung bereits erste Zellteilungen erfolgen, bevor die Messung gestartet werden kann. Doch auch bei fixierten Proben stellt diese Erweiterung eine willkommene Erleichterung für den Anwender dar.

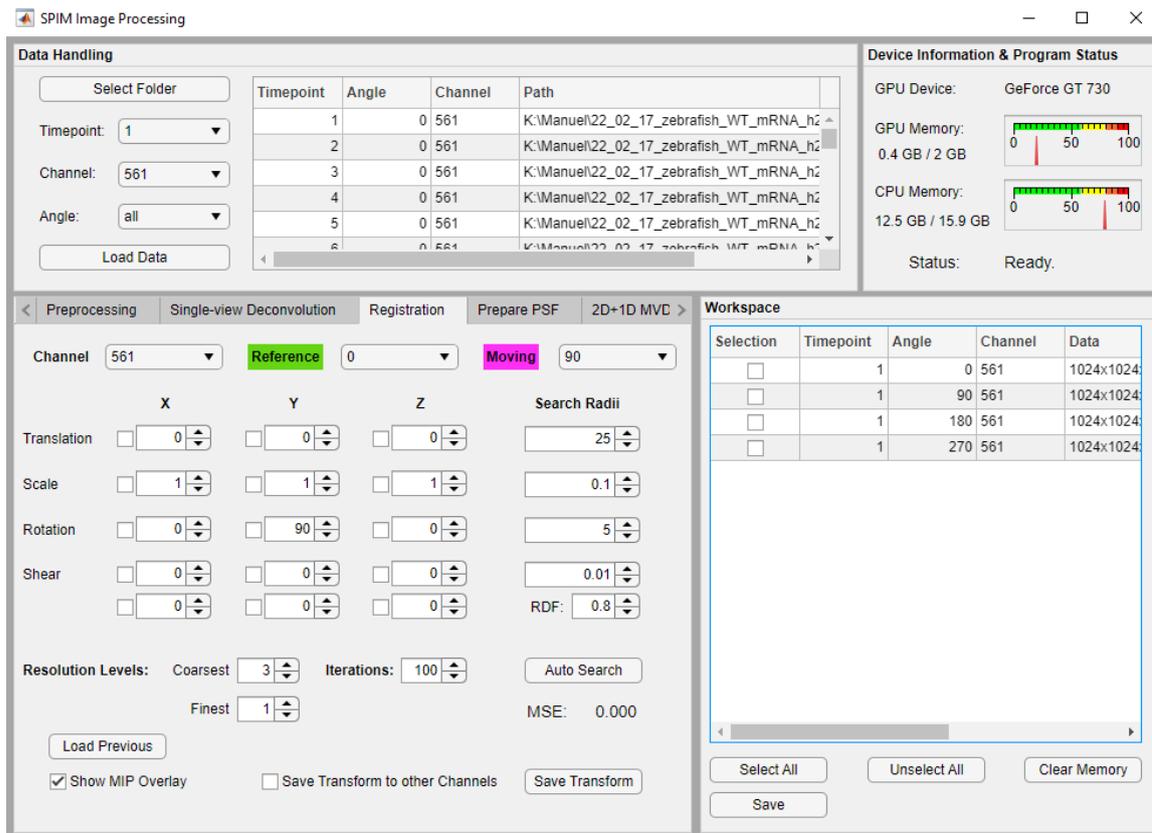
## 3.2. Datenmanagement

Digitale Lichtscheibenmikroskope produzieren beachtliche Datenmengen. Zudem müssen Experimente oft mehrfach wiederholt werden, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten. Ein professioneller und wohlbedachter Umgang mit den Daten ist daher unabdingbar. Dabei ist nicht nur die Absicherung gegen Datenverlust aufgrund von Hardware- oder Softwaredefekten zu beachten, sondern auch eine schnelle, übersichtliche und nachvollziehbare Verarbeitung der Daten. Der Rechner, welcher zur Steuerung des Mikroskops verwendet wird, ist mit einem 25 TB, Level 6 RAID-System (engl. *redundant array of independent disks*) ausgestattet. Dadurch wird die sichere Zwischenspeicherung der Daten direkt nach der Messung gewährleistet. Selbst bei einem Ausfall von zwei Festplatten zur gleichen Zeit können die Daten anhand von Prüfsummen wiederhergestellt werden. Die aufgenommenen Bilderstapel werden entweder im Tiff-Format (32-bit) oder ggf.

im BigTiff-Format (64-bit) gespeichert, je nachdem, ob ein Bildstapel die Begrenzung des Tiff-Formats einer maximalen Größe von 4 GB überschreitet oder nicht. Die Datenmenge, die bei einer Messung produziert wird, hängt von verschiedenen Parametern ab: Die Anzahl der Pixel eines Bildes, der Bilder in einem Stapel, der gemessenen Stapel je Zeiteinheit, die Dauer der Messung insgesamt und die Bittiefe der Bilder legen die Gesamtdatenmenge fest. Diese schwankt folglich zwischen einigen Gigabyte bis hin zu mehreren Terabyte. Nach einigen Messungen müssen die Daten daher von dem RAID-System auf ein anderes Speichermedium mit ausreichend großer Kapazität übertragen werden. Messdaten, welche zu wissenschaftlichen Publikationen führen, müssen schließlich mehrere Jahre zugänglich und sicher aufbewahrt werden. Hierfür steht Forschenden am KIT die Large Scale Data Facility (LSDF) mit dem LSDF Online Storage zur Verfügung [70]. Die dort hinterlegten Daten werden regelmäßig durch ein Backup gesichert und sind dem Nutzer über verschiedene Protokolle flexibel zugänglich. Daher ist es auch möglich, Daten zur weiteren Verarbeitung direkt von dort zu laden. Dies ist zwar unkompliziert für den Anwender, hat aber zwei Nachteile: Zum einen dauert das Laden der Daten etwas länger im Vergleich zum Lesen von einer SSD-Festplatte. Zum anderen besteht die Gefahr einer Verbindungsunterbrechung.

Die Bilddaten eines Lichtscheibenmikroskops sind in der Regel mehrdimensional und erfordern auch meist eine Nachbearbeitung in Form von Kamerakorrekturen, Hintergrundkorrektur, Dekonvolution, Registrierung, Multi-view Fusion und Weiteres. Um dabei nicht den Überblick zu verlieren und die Anwendung dieser Bearbeitungsschritte möglichst komfortabel zu gestalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Software mit grafischer Benutzeroberfläche entwickelt. Sie heißt „SPIM Image Processing“ und wurde in MATLAB mithilfe des MATLAB App Designers entwickelt. Abbildung 3.8 zeigt eine Bildschirmfotografie der Benutzeroberfläche.

Das Programm listet alle Bilder innerhalb eines Ordners sowie deren Zeitpunkt, Aufnahmewinkel und Farbkanal. Einzelne oder mehrere Bilder können dann zur Bearbeitung in den Arbeitsspeicher geladen werden. Die geladenen Bilder werden wiederum separat aufgelistet. Außerdem zeigt das Programm die Auslastung des Arbeits- und Grafikspeichers an. Die verschiedenen Bearbeitungsschritte sind auf eine Reihe von Registerkarten verteilt. Zur Visualisierung werden weitere Fenster geöffnet, welche Maximumintensitätsprojektionen oder 3D Renderings darstellen können. Werden einzelne oder mehrere Bilder bearbeitet und gespeichert, erstellt das Programm auch eine Textdatei, welche die Eingangsdaten benennt und alle Bearbeitungsschritte mit dazugehörigen Parametern auflistet. Auf diese Weise kann einfach nachvollzogen werden, was mit den Daten geschehen ist und Ergebnisse können leichter reproduziert werden. Der modulare Aufbau der Software ermöglicht die unkomplizierte Implementierung weiterer Funktionen, welche auch auf die bereits bestehenden zugreifen können. Hauptsächlich dient die Software der Multi-view Fusion, welche ausführlich in Kapitel 6 beschrieben wird. Ein notwendiger Vorbereitungsschritt dafür ist die Bildregistrierung, deren Funktionsweise im nächsten Abschnitt erklärt wird.



**Abbildung 3.8.:** Bildschirmfotografie der grafischen Benutzeroberfläche von „SPIM Image Processing“.

### 3.3. Registrierung

Bereits in Kapitel 2.5 wurde erwähnt, dass es zwei Umstände gibt, welche die Qualität dreidimensionaler Bilder beeinträchtigen: die anisotrope Auflösung einerseits sowie Absorption und Streuung andererseits. Dort wurde auch die Fusion von mehreren Aufnahmen der Probe aus verschiedenen Blickwinkeln (Ansichten) als mögliche Lösung genannt. In Kapitel 6 wird ein Algorithmus beschrieben, welcher mithilfe einer Approximation der PSF eine solche Fusion zeit- und speichereffizient ausführt. Dabei müssen die einzelnen Ansichten zunächst für die Fusion vorbereitet werden. Die Vorbereitung besteht zum einen aus einer Interpolation entlang der Detektionsachse, um eine isotrope Pixelgröße zu erhalten. Zum anderen liegen die Ansichten auch nach Korrektur des Rotationswinkels nicht exakt übereinander, sondern sind gegeneinander verschoben (Abbildung 3.9 links). Dies liegt in kleinen Fehlern begründet, welche bei der Positionierung der Probe nicht vollständig vermieden werden können. Die Korrektur dieser Fehler ist ein äußerst wichtiger Schritt in der Vorbereitung der Fusion, da Unzulänglichkeiten später zu Artefakten im fusionierten Bild führen können. Der Korrekturprozess heißt Bildregistrierung und findet breite Anwendung bei diversen Modalitäten, z.B. in der Medizin [71, 72]. Ziel ist es, für jede Ansicht eine Transformation  $T$  zu finden, welche zur größtmöglichen Übereinstimmung

zwischen dem Objektbild  $g$  und einer (beliebig ausgewählten) Referenzansicht  $f$  führt (Abbildung 3.9 rechts). Der Grad der Übereinstimmung wird dabei mithilfe einer geeigneten Metrik  $m$  bestimmt. Die Metrik sollte bei bestmöglicher Übereinstimmung ein Maximum oder ein Minimum aufweisen:

$$\min m(f, T(g)) \quad \text{bzw.} \quad \max m(f, T(g)) . \quad (3.3)$$

Auch wenn ein Mensch bei Betrachtung die gesuchte Transformation zwischen Objektbild und Referenz intuitiv erkennen kann, stellt die Automatisierung dieses Vorgangs eine Herausforderung dar. Denn bevor das eigentliche Problem der Optimierung gelöst werden kann, muss hierfür zunächst eine geeignete Metrik definiert werden. Dies gestaltet sich schwierig, da die zu registrierenden Ansichten zwar Abbildungen desselben Objekts sind, aber nicht dieselbe Intensitätsverteilung aufweisen. Wäre dies der Fall, würde die Fusion keinerlei Vorteile bringen. Es existieren verschiedene Metriken (Kreuzkorrelation, Transformation), welche ihre jeweiligen Vor- und Nachteile für bestimmte Anwendungen haben [71, 72]. Allerdings gibt es für keine dieser Metriken eine Garantie, dass sie in jedem Fall ihren Extremwert auch dort erreicht, wo die tatsächlich gesuchte Transformation liegt. In dieser Arbeit wurde der MSE (Gleichung 2.10) als Metrik verwendet, welcher sich schnell und direkt berechnen lässt und konzeptionell simpel ist.

Eine weitere Möglichkeit, das Problem der Metrik zu lösen, ist durch die Merkmalextraktion gegeben. Darunter versteht man die Identifikation bestimmter markanter Strukturen, welche in jedem der zu registrierenden Bilder aufzufinden sein müssen. Die Koordinaten dieser Strukturen können in jedem einzelnen Bild bestimmt werden. Daraus wird anschließend die benötigte Transformation berechnet. In der Fluoreszenzmikroskopie können hierfür fluoreszierende Kügelchen als Marker eingesetzt werden [48, 73]. Je nach Anwendung kann dies jedoch auch problematisch sein. So ist das Einbringen von Fremdkörpern in lebende Proben ein invasiver Prozess, der die Beobachtung verfälschen könnte. Im Falle, dass kein separater Farbkanal für die Marker genutzt werden kann, überlagert sich deren Fluoreszenz eventuell mit dem zu messenden Signal.

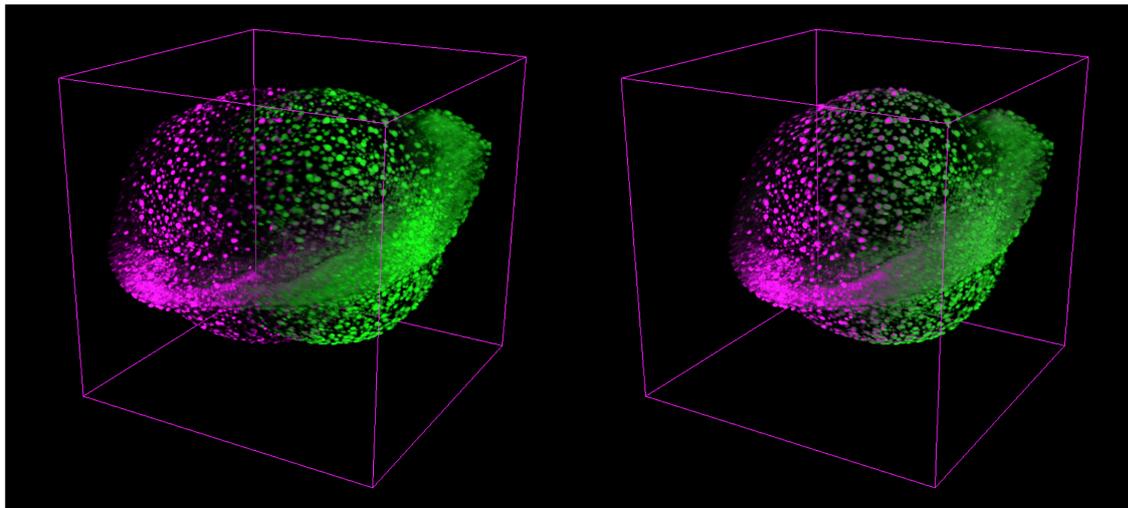
Neben der Metrik muss auch die Art der Transformation festgelegt werden. Dabei kommt es im Allgemeinen darauf an, ob die Bilder dieselbe Modalität besitzen und wie genau sie sich voneinander unterscheiden. Im Extremfall müssen hier sogar Deformationen der Probe in Betracht gezogen werden [74]. Die Bilder eines Multi-view Datensatzes in der Lichtscheibenmikroskopie werden in der Regel so schnell aufgenommen, dass solch komplizierte Deformationsmodelle nicht notwendig sind. Manchmal genügt schon eine reine Translation [75]. In dieser Arbeit stellt die Translation sicher auch den bedeutendsten Teil der Transformation dar. Dennoch können vollständige, dreidimensionale, affine Transformationen (also Translation, Rotation, Skalierung und Scherung) mit dem Registrierungsalgorithmus bestimmt werden. Tatsächlich kann der Anwender auswählen, welche Parameter der Transformation optimiert werden sollen. Dies lässt einen gewissen Spielraum für unterschiedliche Anwendungen offen.

Sind die Metrik sowie die Art der Transformation festgelegt, muss zum Schluss noch eine passende Optimierungsstrategie gewählt werden. Auch hierfür gibt es verschiedene Ansätze, von denen wiederum zahlreiche Varianten existieren. Die zwei bedeutendsten Strategien sind jedoch wohl die evolutionäre Suche (auch bekannt als Partikelschwarmop-

timierung) und gradientenbasierte Verfahren. Stellt man sich die Metrik als eine hügelige Landschaft vor, so ist das Ziel der Optimierung, das tiefste Tal ausgehend von einem zufälligen Startpunkt zu finden. Gradientenbasierte Verfahren berechnen die erste Ableitung der Metrik am Startpunkt und bestimmen so die Richtung des steilsten Abfalls. Anschließend wird ein Schritt mit definierter Länge in diese Richtung gegangen. Dieses Vorgehen wird dann einige Male wiederholt bis der Gradient gleich Null ist oder eine vorgegebene Anzahl an Wiederholungen erreicht ist. Dabei kann es unter Umständen sinnvoll sein, die Länge der Schritte nach und nach zu verringern. Gradientenverfahren können für bestimmte Probleme (glatte Metrik, keine lokalen Minima bzw. kein Bedarf an globaler Optimierung) sehr effizient sein. Im Allgemeinen jedoch haben sie zwei große Schwächen. Zum einen neigen sie dazu, in lokalen Minima hängen zu bleiben, was einer globalen Optimierung im Wege steht. Zum anderen muss der Gradient der Metrik berechnet werden, was in der Regel sehr rechenaufwändig ist und viel Zeit in Anspruch nehmen kann.

Evolutionäre Suchalgorithmen verzichten im Allgemeinen auf die Berechnung eines Gradienten. Hier wird lediglich der Wert der Metrik am Startpunkt bestimmt. Anschließend springt man zu einem zufälligen Punkt innerhalb eines bestimmten Umkreises und bestimmt dort ebenfalls den Wert der Metrik. Die beiden Werte werden miteinander verglichen: der kleinere wird beibehalten und der größere verworfen. Auch dieser Prozess wird mehrfach wiederholt und kann abgebrochen werden, wenn eine bestimmte Anzahl an Punkten getestet wurde, oder wenn nach einigen getesteten Punkten die Metrik keine kleineren Werte mehr annimmt. Für das Problem der Registrierung von Multi-view-Aufnahmen eignet sich diese Strategie gut, da durchaus lokale Minima der Metrik auftreten können (z.B. bei Abbildungen periodischer bzw. selbstähnlicher Strukturen, wie etwa Blutgefäße). Darüber hinaus lassen sich zufällige Transformationen sowie die dazugehörige Metrik äußerst zügig auf der Grafikkarte berechnen.

Der Algorithmus wurde zusätzlich durch die Anwendung mehrerer Auflösungsstufen verbessert. Dies bedeutet, dass die zu registrierenden Bilder zunächst mehrfach herunterskaliert werden. Dadurch sinkt die Speicherauslastung, Transformationen und Metriken lassen sich noch schneller berechnen, und schließlich wird die Metrik dadurch geglättet - enthält also weniger lokale Minima. Nach einigen Iterationen wechselt der Algorithmus zu einer höheren Skalierung, um eine präzise Registrierung zu ermöglichen. Es kann außerdem von Vorteil sein, die einzelnen Parameter der Transformation nacheinander statt simultan zu optimieren. Dies verkleinert den Raum der möglichen Transformationen, wodurch man ggf. schneller zum gewünschten Ergebnis gelangt. Besteht ein Multi-view-Datensatz aus einer zeitlichen Abfolge mehrerer Messungen, so unterscheiden sich die gesuchten Transformationen nur wenig von einem Zeitpunkt zum nächsten. Es bietet sich daher an, die Transformation des vorangegangenen Zeitpunktes als Ausgangspunkt zu wählen und den Umkreis in der Parameterlandschaft möglichst klein zu wählen. Auf diese Weise muss der Anwender lediglich die Registrierung des ersten Zeitpunktes genau prüfen und ggf. von Hand korrigieren. Alle folgenden Zeitpunkte erfahren nur sehr kleine Korrekturen. Da hierbei die Fehleranfälligkeit sehr gering ist, kann der Prozess vollautomatisch durchgeführt werden, was eine enorme Arbeitserleichterung darstellt.



**Abbildung 3.9.:** Links: Zwei Ansichten (grün und magenta) eines Zebrafärbling-Embryos (ca. 18 Stunden nach Befruchtung, Histon H2A markiert mit EGFP) vor Registrierung. Die Rotation der beiden Ansichten um  $90^\circ$  ist schon vor der Registrierung bekannt und wurde direkt korrigiert. Die Ansichten sind jedoch gegeneinander verschoben. Rechts: Die von der evolutionären Suche gefundene Transformation wurde auf das Objektbild (magenta) angewendet. Es ist zu erkennen, dass die Ansichten sowohl redundante als auch komplementäre Bildinformationen liefern. Die beiden Bilder können anschließend fusioniert werden. Die Abmessungen des Volumens betragen  $830 \mu\text{m} \times 830 \mu\text{m} \times 830 \mu\text{m}$ . Das Rendering wurde mit „3D Slicer“ erstellt.

## 3.4. Visualisierung

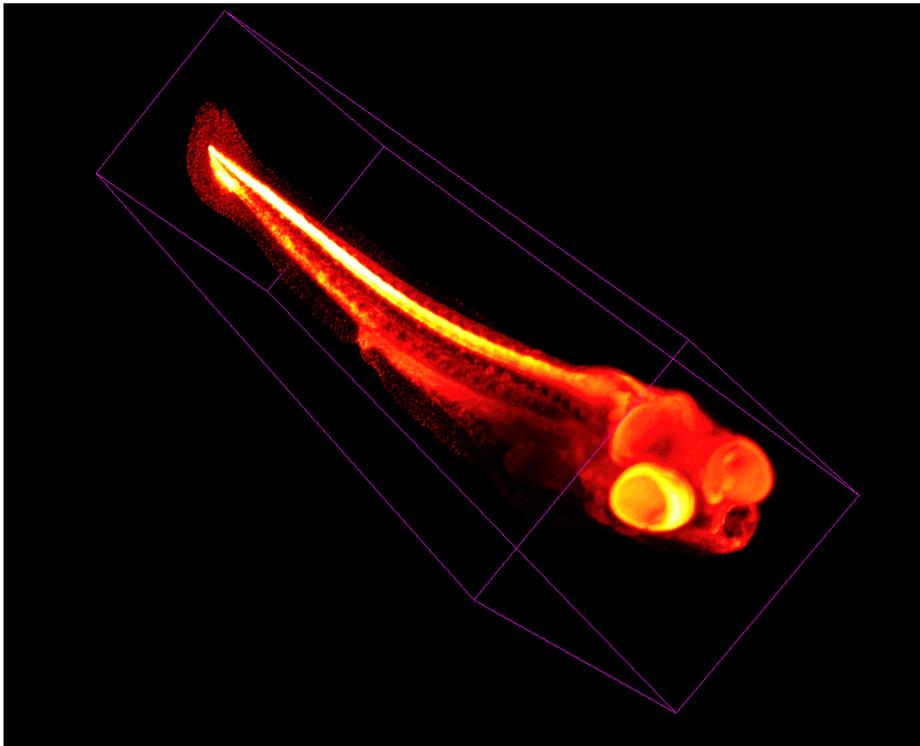
Die Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie eignet sich hervorragend, um dynamische Prozesse in lebenden Proben zu beobachten. Dies trägt maßgeblich dazu bei, ein tieferes Verständnis über das komplexe Zusammenspiel verschiedenster biologischer Einheiten zu entwickeln. Dabei zeichnet sich die Lichtscheibenmikroskopie als Methode vor allem dadurch aus, dass sie dreidimensionale Rekonstruktionen der Probe mit hoher zeitlicher Auflösung produziert, und dies dank geringer Phototoxizität auch über längere Zeiträume möglich ist. Die bei der Messung erhobenen Daten werden in Form von Bildstapeln gespeichert, welche in dieser Form zunächst wenig anschaulich sind. Erst durch eine verständliche Darstellung lassen sich die Daten interpretieren. Oft ist die visuelle Darstellung der erste Schritt, auf welchem die weitere Datenanalyse (wie z.B. Segmentierung, Längen-, Flächen-, oder Volumenvermessung, Einzelpartikelverfolgung, Kollokalisierung, etc.) aufbaut. Hinzu kommt, dass die Lichtscheibenmikroskopie erst durch eine anschauliche Darstellung der Messdaten ihre ganze Schönheit entfaltet. Zur Visualisierung der Daten stehen eine ganze Reihe von frei verfügbaren sowie kommerziellen Programmen zur Verfügung. Die in dieser Arbeit zur Visualisierung verwendeten Programme sollen hier kurz Erwähnung finden.

Ein in der Mikroskopie weit verbreitetes Programm ist ImageJ. Es ist mitsamt Quellcode frei zugänglich, und zahlreiche Menschen haben zur Entwicklung beigetragen. Es arbeitet plattformübergreifend und bietet viele Schnittstellen zur Einbindung in andere Programme [76, 77]. Die einfache Bedienung über die graphische Benutzeroberfläche ermöglicht einen schnellen ersten Eindruck der Daten. Die Steuersoftware des Mikroskops speichert neben den Bildstapeln auch eine Maximumintensitätsprojektion derselben. Bei Langzeitmessungen ist dies sehr nützlich, da aus der zeitlichen Abfolge der Projektionen (mithilfe von ImageJ oder auch anderen Programmen) ein Video erstellt werden kann, welches das gesamte Geschehen während der Messung kompakt visualisiert.

ImageJ verfügt auch über zahlreiche Plugins, welche für verschiedene Problemstellungen entwickelt wurden und der Allgemeinheit frei zur Verfügung stehen. Ein solches Plugin ist „3D Script“, welches von Benjamin Schmid entwickelt wurde und ein 3D Rendering inklusive einfacher Animationen wie Translation, Rotation, Zoom, Zeitschritte und Farbwechsel ermöglicht [78, 79]. ImageJ kann auch mit sogenannten virtuellen Bildstapeln arbeiten. Diese sind festplattenresident, müssen also nicht in den Arbeitsspeicher geladen werden. Auch „3D Script“ nutzt diese Option, was bei den großen Datenmengen, die in der Lichtscheibenmikroskopie anfallen, sehr willkommen ist. Durch die große Zahl an verfügbaren Plugins sowie der einfachen Macro-Programmiersprache lassen sich Bilddaten mit ImageJ übrigens nicht nur visualisieren, sondern auch umfassend auswerten.

Mitunter kommt es vor, dass die Probe wesentlich größer ist als das Beobachtungsfeld des Mikroskops. Insbesondere bei Fragestellungen der organismischen Biologie kann dies der Fall sein. Eine Lösung wäre die Verwendung eines Objektivs mit geringerer Vergrößerung, wodurch man allerdings auch ein geringeres Auflösungsvermögen in Kauf nehmen muss. Alternativ kann man die Probe auch schrittweise durch das Beobachtungsfeld schieben und Aufnahmen von verschiedenen Teilen der Probe machen. Verfügen diese über einen ausreichend großen Überlapp, können sie anschließend am Rechner wieder zusammengesetzt werden. Auch das kann mithilfe eines ImageJ-Plugins erledigt werden [80]. Ein Beispiel für dieses Verfahren ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

Ein weiteres nützliches Programm ist „3D Slicer“. Es ist wie ImageJ frei zugänglich und wurde zur Visualisierung und Prozessierung von dreidimensionalen medizinischen und biomedizinischen Bildern entwickelt [81, 82]. Es ermöglicht insbesondere ein schnelles und unkompliziertes 3D Rendering der Bildstapel sowie deren Export als Videodatei, wodurch sich die Veranschaulichungen speichern und mit anderen teilen lassen. Die Renderings in den Abbildungen 3.9 und 3.10 wurden mit „3D Slicer“ erstellt.



**Abbildung 3.10.:** Das 3D Rendering zeigt einen fixierten, etwa 4 Tage alten Zebraabürbling-Embryo, welcher mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert wurde. Die Abmessungen des Volumens betragen ca.  $1,26 \text{ mm} \times 1,06 \text{ mm} \times 3,88 \text{ mm}$ . Hierfür wurden 6 Beobachtungsfelder vermessen (jeweils eine Multi-view-fusion mit 4 Ansichten) und mit einem ImageJ-Plugin ([80]) zusammengesetzt. Das Rendering wurde mit „3D Slicer“ erstellt.

## 4. Strahlformung

In der Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie hängt die Bildqualität stark von der Intensitätsverteilung der Beleuchtung ab. Die Geometrie der Lichtscheibe nimmt wesentlichen Einfluss auf die axiale Auflösung, die optische Schichtdicke sowie auf Größe und Homogenität des Beobachtungsfeldes. Mittels holographischer Strahlformung lassen sich viele verschiedene Beleuchtungsmuster erzeugen. Im folgenden Kapitel werden einige dieser Muster vorgestellt, ihre charakteristischen Eigenschaften beschrieben und ihr Einfluss auf die Bildqualität untersucht. Die gewonnenen Daten geben eine Hilfestellung bei der anwendungsspezifischen Auswahl der Lichtscheibe.

### 4.1. Ausgangssituation

In den vergangenen Jahren hat die Lichtscheibenmikroskopie breite Anwendung in der biomedizinischen Bildgebung gefunden. Durch die selektive Anregung der Fluorophore werden Hintergrundbeiträge von außerhalb der Fokalebene sowie Photobleichung reduziert. Währenddessen ermöglicht die Weitfelddetektion hohe Bildraten, die um Größenordnungen höher liegen als bei anderen Verfahren, wie z.B. der Rasterkonfokalmikroskopie. Seit den ersten Anwendungen im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie wurden große Anstrengungen unternommen, um die Methode weiter zu verbessern [37, 60]. Hierbei spielt die Geometrie der Lichtscheibe eine entscheidende Rolle. Die ersten Lichtscheiben wurden mithilfe zylindrischer Linsen erzeugt, welche das Licht entlang einer Dimension senkrecht zur Ausbreitungsachse fokussieren [34, 35]. Später wurden Lichtscheiben verwendet, welche durch schnelles und wiederholtes Scannen eines Laserstrahls in einer Ebene erzeugt werden. Das Scannen ermöglicht eine höhere Lichteffizienz, eine homogenere Ausleuchtung und reduziert Aberrationen [39]. Außerdem kann die Scan-Bewegung mit dem zeilenweisen Ausleseschema einer sCMOS-Kamera kombiniert werden, was den Bildkontrast erheblich verbessert (siehe Kapitel 5.4.1) [41].

Im Idealfall wäre die Lichtscheibe mathematisch zweidimensional. Auf diese Weise würde man die maximale Selektivität der Anregung bzw. die minimale optische Schichtdicke erreichen. In Bezug auf gerasterte Strahlen entspräche dies einem delta-förmigen Strahlprofil über die gesamte Länge der Anregung. Aufgrund der Welleneigenschaften des Lichts kann eine solche Intensitätsverteilung nicht erreicht werden. Es ist aber trotzdem zulässig, nach der bestmöglichen Annäherung einer solchen „optischen Nadel“ zu fragen.

Am naheliegendsten sind wohl Gauß-Strahlen, welche auch zunächst Anwendung fanden [39]. Diese haben jedoch den Nachteil zu divergieren, sodass die Lichtscheibe an den Rändern des Beobachtungsfeldes dicker ist als in dessen Zentrum. Daher wurden Bessel-Strahlen vorgeschlagen, deren Profildurchmesser sich über einen gewissen Bereich

entlang der Propagationsachse nicht ändert [40, 69]. Ähnlich verhält es sich auch mit Airy-Strahlen, die ebenfalls in der Lichtscheibenmikroskopie eingesetzt wurden [83, 84]. Der Nachteil an diesen Strahlen sind prominente Nebenmaxima, welche Fluoreszenz außerhalb der Fokalebene erzeugen. Daher wurden Versuche unternommen, den Einfluss der Nebenmaxima zu begrenzen. Eine Möglichkeit hierzu bietet die zuvor erwähnte, konfokale Spaltdetektion [2, 69]. Licht von außerhalb der Fokalebene wird dabei nicht detektiert. Jedoch tragen die Nebenmaxima weiter zur Photobleichung bei, und der erreichbare Kontrast liegt immer noch unterhalb dem, der mit Gauß-Strahlen erzielt werden kann. Durch abschnittsweise Beschränkung des Winkelspektrums können die Nebenmaxima jedoch teilweise unterdrückt werden [85]. Auch eine Superposition zweier Bessel-Strahlen, genannt „Droplet“-Strahlen, vermag die Nebenmaxima abzuschwächen [86, 87]. Darüber hinaus haben Gitter-Lichtscheiben (engl. *lattice light sheets*), welche von einer Gruppe um Eric Betzig entwickelt wurden [88], in den vergangenen Jahren große Aufmerksamkeit erregt [89]. Sie versprechen eine höhere axiale Auflösung bei gleichzeitig großem Beobachtungsfeld und weniger Photobleichung [88]. Und die Suche nach weiteren geeigneten Strahlen ist noch nicht beendet: Die Familie der „Tricomi“-Strahlen stellt weitere Lösungen der Helmholtz-Gleichung dar, welche möglicherweise vorteilhaft bei der Erzeugung von Lichtscheiben sein könnten [90]. Im Bereich der photoakustischen Mikroskopie wurden neuerlich auch von der Anwendung einer „optischen Nadel“ berichtet, welche durch mehrere entlang der Propagationsachse verschobener Gauß-Strahlen erzeugt wurde [91].

Bei einer so großen Zahl an möglichen Beleuchtungsmustern fällt es schwer, den Überblick zu bewahren. Es bedarf also einer systematischen, vergleichenden Untersuchung der verschiedenen Strahlen, welche die Vor- und Nachteile erörtert und dadurch eine optimale Auswahl der Lichtscheibengeometrie für eine bestimmte Anwendung ermöglicht. Einige solcher Vergleiche wurden auch bereits unternommen [92–95]. Sie sind jedoch nicht ganz zufriedenstellend, da sie zum Teil vollständig auf Simulationen basieren [92] oder sich auf Gauß-Strahlen und Gitter-Lichtscheiben beschränken [93–95]. Interessant dabei ist aber, dass die Ergebnisse der verschiedenen Studien teilweise zu Widersprüchen führen: So stellten Remacha et al. [92] in ihren Simulationen fest, dass Gitter-Strahlen (in Bezug auf die Breite des Hauptmaximums sowie die optische Schnittdicke) ein wenig schlechter abschnitten als konventionelle (Gaußsche) Strahlen. Das steht in direktem Widerspruch zu Ref. [88], wo die Gitter-Strahlen als „ultra dünn“ bezeichnet werden. Dies motivierte Chang et al. [95] zu einer experimentellen Untersuchung, bei welcher sie feststellten, dass Gitter-Strahlen und Gauß-Strahlen nahezu identische optische Eigenschaften aufweisen. Eine erste Reaktion darauf gab es von Shi, Daugird und Legant (Ko-Autor von Ref. [88]), welche in ihren Simulationen und Messungen deutliche Verbesserungen in der axialen Auflösung und Gleichförmigkeit des Strahlprofils entlang der Propagationsachse durch Verwendung von Gitter-Strahlen gegenüber Gauß-Strahlen feststellten [94]. Schließlich bezog auch die Gruppe um Eric Betzig Stellung mit einer theoretischen und experimentellen Analyse von Gitter- und Gauß-Strahlen und erkannte wiederholt die Überlegenheit Ersterer gegenüber Letzterer [96]. Es gibt innerhalb der erwähnten Studien noch weitere Widersprüchlichkeiten, auf welche in Abschnitt 4.5 eingegangen wird.

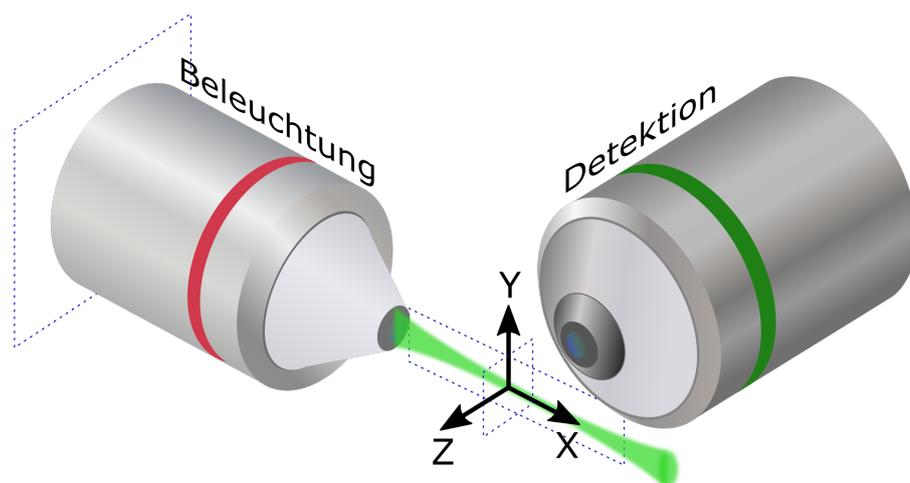
An dieser Stelle sollte bemerkt werden, dass bei den Vergleichsstudien zwischen Gauß- und Gitter-Strahlen die zelluläre und subzelluläre Bildgebung im Vordergrund steht. Dabei werden kleine Beobachtungsfelder im Bereich einiger 10  $\mu\text{m}$  Kantenlänge betrachtet, und die Auflösungen liegen nahe dem Beugungslimit (etwa 230 nm lateral und 370 nm axial [88]). Das in dieser Arbeit verwendete Mikroskop wurde für die organismische Bildgebung konzipiert und bildet bei 16-facher Vergrößerung ein Beobachtungsfeld von 830  $\mu\text{m} \times 830 \mu\text{m}$  (bzw. 176  $\mu\text{m} \times 176 \mu\text{m}$  bei 63-facher Vergrößerung) ab. Dies ist eine notwendige Bedingung zur Beobachtung ganzer Embryonen. Die hierzu erforderlichen Auflösungen sind weniger anspruchsvoll (etwa 2  $\mu\text{m}$  lateral und 8  $\mu\text{m}$  axial). Natürlich ist auch bei der Beobachtung von Organismen eine möglichst hohe Auflösung wünschenswert. Jedoch ist die Größe des Beobachtungsfeldes invers mit der erreichbaren Auflösung verbunden. In der Lichtscheibenmikroskopie gilt dies in doppeltem Maße. Bezogen auf das Detektionsobjektiv verhält es sich analog zur Weitfeldmikroskopie. Soll jedoch zusätzlich eine homogene Lichtscheibe senkrecht zur Detektion erzeugt werden, so wird ein Beleuchtungsobjektiv mit kleiner numerischer Apertur benötigt, was wiederum zu einer dickeren Lichtscheibe führt. Die Ergebnisse der folgenden Untersuchungen lassen sich also möglicherweise nicht direkt auf Systeme übertragen, welche für die zelluläre Bildgebung konzipiert sind.

Eine weitere Besonderheit des hier verwendeten Mikroskops ist die konfokale Spaltdetektion. Das in Kapitel 5.4.1 beschriebene Verfahren ermöglicht die Unterdrückung der Detektion von Fluoreszenz, die außerhalb der Fokusebene angeregt wurde. Dies bietet eine Möglichkeit, den negativen Einfluss der Nebenmaxima bestimmter Strahlen zu reduzieren [69]. Im folgenden Vergleich verschiedener Beleuchtungsstrahlen soll daher auch untersucht werden, wie das Verfahren der KSD mit bestimmten Strahlen zusammenwirkt.

## 4.2. Strahlformung mit Lichtmodulatoren

Zur Erzeugung der verschiedenen Anregungsstrahlen können optische Bauteile, wie zum Beispiel spezielle Linsen, Aperturen oder diffraktive optische Elemente benutzt werden. Möchte man jedoch flexibel zwischen verschiedenen Strahlen auswählen können, bieten räumliche Lichtmodulatoren (engl. *spatial light modulator*, SLM) großen Komfort. Aufbau und Funktionsweise des SLM wurden bereits in Kapitel 3 erläutert. Dort ist auch gezeigt, wo im Aufbau der SLM positioniert ist. Der Aufbau orientiert sich an jenem, welcher in Ref. [40] beschrieben ist. Auch manche der verwendeten Phasenmasken entsprechen im Wesentlichen denen aus Ref. [40]. Zur Erzeugung von Phasenmasken für Aufbauten unterschiedlicher Geometrien existiert auch hilfreiche Software [97]. Zudem lässt sich die aus der Phasenmaske resultierende Intensitätsverteilung entlang der Propagationsachse auch numerisch berechnen [98]. Das Koordinatensystem, welches in diesem Kapitel durchgehend verwendet wird, ist, wie in Abbildung 4.1 dargestellt, definiert.

Der hier verwendete SLM dient der Phasenmodulation (keine direkte Amplitudenmodulation möglich). Er besteht aus einem Flüssigkristallbildschirm mit 1920  $\times$  1080 Pixeln, welche eine Größe von 6,4  $\mu\text{m}$  haben. Die aktive Fläche hat also eine Kantenlänge von 12,5 mm  $\times$  7,1 mm. Auf diesen Bildschirm wird eine 8-bit Phasenmaske geladen, deren



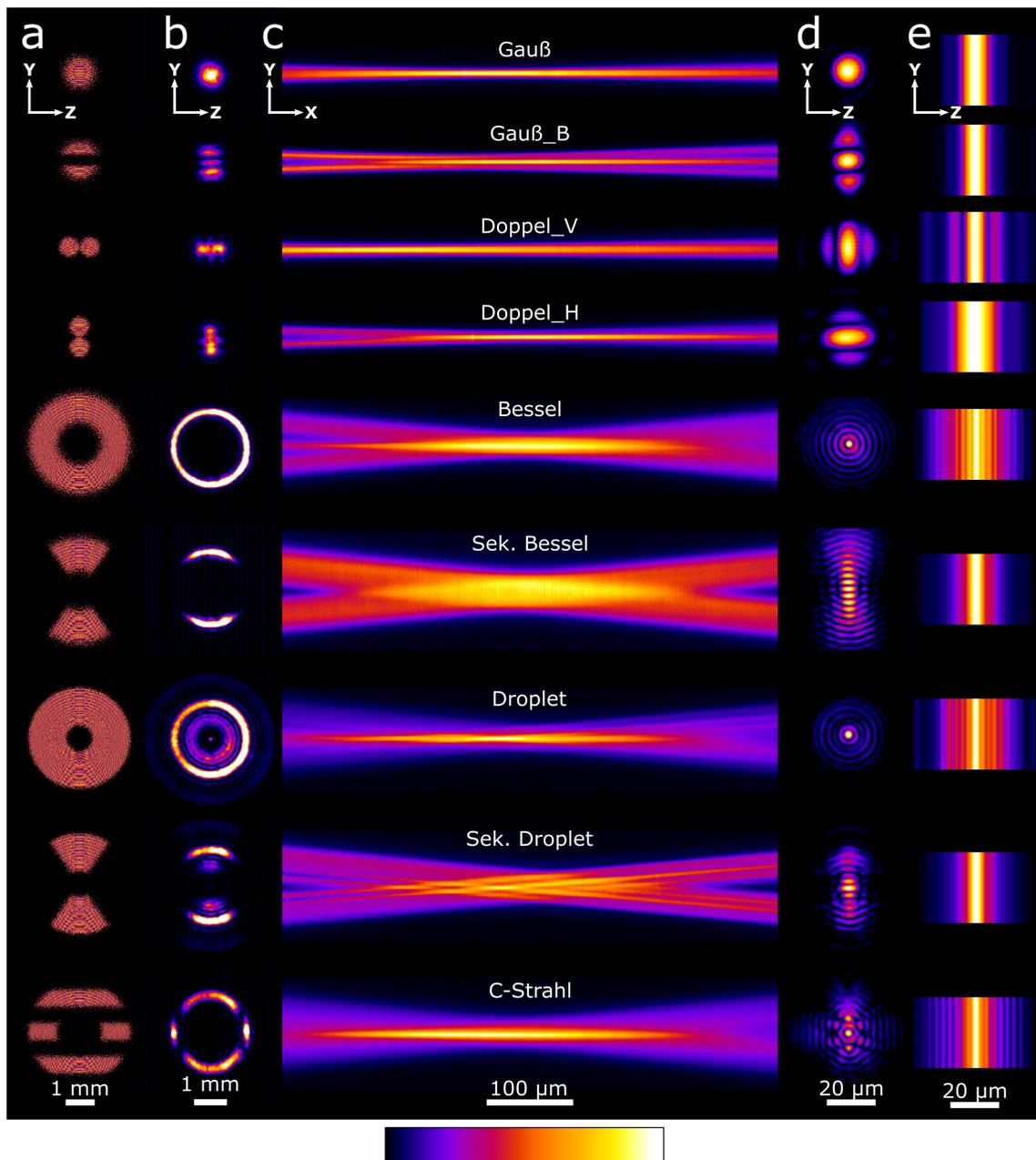
**Abbildung 4.1.:** Anordnung der Objektivlinse und Definition des verwendeten Koordinatensystems.

Werte eine Phasenverschiebung zwischen  $0$  und  $2\pi$  repräsentieren. Der maximale Graustufenwert, welcher eine Verschiebung von  $2\pi$  bewirkt, ist für jede Wellenlänge angepasst. Da sich zwischen den Pixeln des SLM kleine Spalten befinden (Füllfaktor 93%) wirkt er auf das reflektierte Licht wie ein rechteckiges Gitter. Die nullte Beugungsordnung ist dabei mit der gewünschten Intensitätsverteilung überlagert, was zu Hintergrundbeiträgen in der Beleuchtung führt. Durch Addieren eines Blaze-Gitters können diese einzelnen Beiträge getrennt werden [40]. Dessen Phase ist gegeben durch:

$$\phi_{\text{Blaze-Gitter}}(z) = e^{-\frac{2\pi izg}{\lambda}}, \quad (4.1)$$

wobei  $\lambda$  die Wellenlänge ist und  $g$  die Gitterkonstante darstellt, welche selbst wellenlängenabhängig ist. Zusätzlich zu dem addierten Blaze-Gitter wird das Phasenmuster mit einer binären Maske multipliziert, welche die Größe (und Form) des aktiven Bereichs auf dem SLM regelt. Abrupte Übergänge insbesondere an den Rändern der Phasenmaske führen zu hochfrequenten Beiträgen oder Undulationen der Intensität [40]. Da der SLM nur die Phase moduliert, ist eine direkte Apodisation der Intensität zu den Rändern hin nicht möglich. Indirekt kann dies jedoch durch eine Reduktion der Dichte aktiver Pixel erreicht werden. Dies führt zu den „verrauschten“ Rändern der Phasenmasken.

Im Folgenden werden die charakteristischen Eigenschaften der einzelnen Strahlen sowie die dazugehörigen Phasenmasken mit deren Parametern beschrieben und erläutert. Eine Übersicht zu den Strahlen findet sich in Abbildung 4.2. Dort sind die Phasenmasken zusammen mit den Intensitätsverteilungen in der Rückapertur des Beleuchtungsobjektivs sowie im Fokus des Strahls (stationär und im zeitlichen Mittel) dargestellt. Ebenso ist der Querschnitt der Strahlen entlang der Propagationsachse gezeigt.



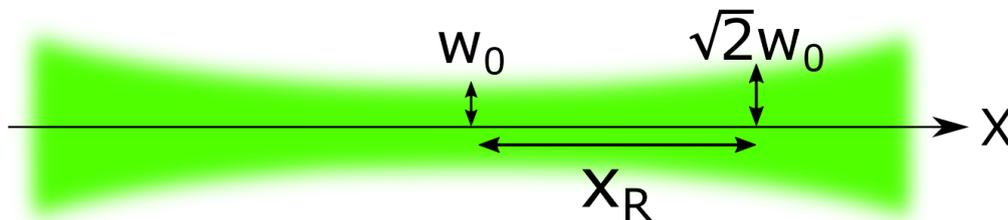
**Abbildung 4.2.:** Übersicht zu den verschiedenen Strahlen. (a) Die Phasenmasken der jeweiligen Strahlen, welche auf den SLM übertragen werden. (b) Intensitätsverteilung in der Rückapertur des Beleuchtungsobjektivs. (c) Querschnitt der Strahlen entlang der Propagationsachse und Benennung des Strahls. (d) Intensitätsverteilung der Strahlen in der Fokalebene des Beleuchtungsobjektivs. (e) Das aus der Scan-Bewegung in Y-Richtung resultierende zeitliche Mittel der Intensitätsverteilung aus d. Für die sektionierten Bessel- und Droplet-Strahlen ist jeweils ein Sektionswinkel von  $80^\circ$  gezeigt. Die Bilder in d und e sind mit einer logarithmischen Helligkeitsskala dargestellt.

#### 4. Strahlformung

Die Intensitätsverteilungen in der Rückapertur des Beleuchtungsobjektivs sind mit denen in der Bildebene durch eine Fouriertransformation in zwei Dimensionen verbunden. Analog zur Beugung an einem Mehrfachspalt lassen sich Verteilungen generieren, welche entweder wenige, breite Maxima oder eine größere Zahl an scharfen Maxima aufweisen. In zwei Dimensionen ergeben sich jedoch komplexere Muster, die nicht notwendigerweise radialsymmetrisch sind. Dies ist vor allem in Bezug auf die Anwendung der KSD interessant. Wird keine KSD verwendet, bestimmt das aus der Scan-Bewegung resultierende zeitliche Mittel des Strahls die Eigenschaften der Lichtscheibe. Anderenfalls erhält man nicht nur einen konfokalen Effekt entlang der Detektionsachse, sondern auch eine laterale Beschränkung der Detektion in Scan-Richtung. Da die Bewegung des Detektionsspalts mit der Bewegung des Strahls synchronisiert ist, hat die stationäre Intensitätsverteilung stärkeren Einfluss auf die Eigenschaften der Lichtscheibe.

#### Gauß-Strahlen

Gauß-Strahlen sind durch ihr transversales Intensitätsprofil charakterisiert, welches einer Normalverteilung folgt. Entlang der Propagationsachse ändert sich das Profil nur in Bezug auf seine Größe, schrumpft zunächst zusammen, erreicht eine minimale Ausdehnung im Fokus (Taille) und divergiert anschließend. Die Länge (Rayleigh-Länge  $x_R$ ) ist durch  $x_R = \frac{\pi \cdot n \cdot w_0^2}{\lambda}$  gegeben, wobei  $n$  der Brechungsindex des Mediums,  $\lambda$  die Wellenlänge des Lichts und  $w_0$  der Radius des Strahls im Fokus ist. Abbildung 4.3 stellt diesen Zusammenhang schematisch dar.



**Abbildung 4.3.:** Schematische Darstellung eines Gauß-Strahls. Eingezeichnet ist der Radius der Taille  $w_0$  sowie die Rayleigh-Länge  $x_R$  nach welcher sich die Taille um einen Faktor  $\sqrt{2}$  verbreitert hat.

Die Breite der Taille und die Länge des Strahls (auf welcher die Intensität einen gewissen Schwellwert nicht unterschreitet) hängen dabei von der numerischen Apertur ab:

$$x_R = \frac{\pi w_0}{NA} . \quad (4.2)$$

Zur Erzeugung eines Gauß-Strahls wird eine Phasenmaske  $\phi_{\text{Gauß-Strahl}}$  auf den SLM geladen, welche einer sphärischen Linse entspricht:

$$\phi_{\text{Gauß-Strahl}}(r) = e^{\frac{ikr^2}{2f}} . \quad (4.3)$$

Hierbei ist  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  der Wellenvektor und  $f$  die Brennweite der Linse, welche die Position des Fokus entlang der Propagationsachse bestimmt. Die numerische Apertur wird durch den Radius  $r_{max}$  der kreisförmigen, binären Maske  $A_{Gau\beta\text{-Strahl}}$  bestimmt:

$$A_{Gau\beta\text{-Strahl}}(r) = \Theta(r - r_{max}) . \quad (4.4)$$

$\Theta$  bezeichnet die Heaviside-Funktion. In dieser Arbeit wurde  $r_{max} = 0,6$  mm gewählt.

### Doppel-Strahlen

Doppel-Strahlen entstehen durch Interferenz zweier Strahlen, die mit einem Winkel relativ zur optischen Achse propagieren. Das transversale Profil verläuft in einer Richtung gaußförmig, während sich senkrecht dazu ein Streifenmuster aus Minima und Maxima ausbildet. Die Phasenmaske eines solchen Strahls entspricht der des Gauß-Strahls (Gleichung 4.3). Die Apertur besteht aber aus zwei exzentrischen Kreisscheiben mit einem gewissen Durchmesser (hier 0,35 mm) und Abstand (hier 0,7 mm). Der Abstand bestimmt den relativen Winkel zwischen den Strahlen. Ein größerer Abstand führt daher zu einem kürzeren Strahl, welcher mehr und schärfere Maxima im Fokus produziert. Auch der Durchmesser beeinflusst die Länge des Strahls. Ein größerer Durchmesser führt zu einer höheren, effektiven NA, wodurch ein kürzerer Strahl mit schmaleren Maxima entsteht. Diese Strahlen werden auch in Ref. [92] beschrieben.

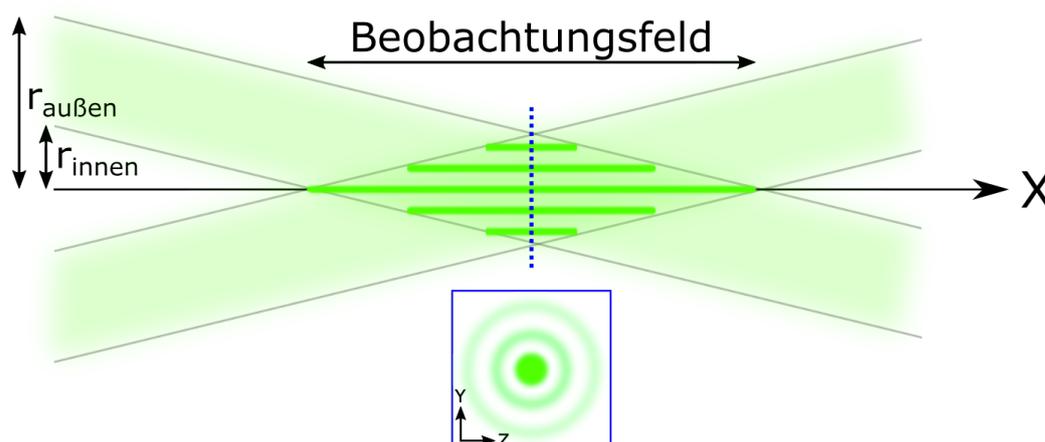
In dieser Arbeit werden 2 Orientierungen des Doppel-Strahls betrachtet. In der ersten Orientierung liegt die Hauptachse des ellipsenförmigen Maximums parallel zur Y-Achse und somit vertikal. Der Strahl wird daher als „Doppel\_V“ bezeichnet. Die zweite Orientierung ist um  $90^\circ$  gedreht und damit liegt die Hauptachse horizontal in der Y-Z-Ebene (senkrecht zur Y-Achse), weshalb diese Orientierung als „Doppel\_H“-Strahl bezeichnet wird. Die zeitlichen Mittel der beiden Orientierungen unterscheiden sich stark (Abbildung 4.2 e). Anhand des Vergleichs lässt sich erkennen, ob eine Verteilung mit einem scharfen Hauptmaximum, welches von Nebenmaxima begleitet wird, gegenüber einer breiten Verteilung ohne Nebenmaxima zu bevorzugen ist.

### Gauß\_B-Strahlen

Als Alternative zu den Doppel-Strahlen mit zwei kreisförmigen Aperturen kann auch einfach das Zentrum der Apertur des Gauß-Strahls mit einem Steg blockiert werden, was in einem ähnlichen Strahlprofil resultiert. Diese Art von Beleuchtungsstrahl wird in dieser Arbeit als „Gauß\_B“-Strahl (B für „blockiert“) bezeichnet. Analog zum Doppel-Strahl findet sich ein Streifenmuster in einer Richtung des Profils wieder. Die Länge, entlang welcher die beiden Teil-Strahlen interferieren, wird durch den Durchmesser der kreisförmigen Apertur (hier 0,7 mm) und die Breite des Steges (hier 0,2 mm), welcher das Zentrum blockiert, bestimmt. Dieser Strahl ist analog zu dem Ansatz, der in Ref. [99] verwendet wurde. Dort wurde jedoch kein gescannter Strahl verwendet, sondern eine Zylinderlinse, deren Zentrum mithilfe eines Steges blockiert wurde [99].

## Bessel-Strahlen

Bessel-Strahlen weisen ein transversales Intensitätsprofil auf, welches einer Bessel-Funktion erster Ordnung entspricht. Diese besitzt ein schmales, zentrales Maximum, welches von mehreren konzentrischen Ringen umgeben ist. Durch das scharfe Hauptmaximum soll eine dünne Lichtscheibe entstehen. Allerdings trägt auch das Ringsystem zur Anregung der Fluoreszenz bei. Ideale Bessel-Strahlen würden ihr Profil entlang der Propagationsachse bewahren - auch in Bezug auf dessen räumliche Ausdehnung. Sie werden daher als nichtbeugend bezeichnet. Doch dafür wäre eine unendliche Menge an Energie nötig. Reale Bessel-Strahlen zeigen diese Eigenschaft also nur entlang einer endlichen Länge und werden auch Bessel-Gauß-Strahlen genannt. Sie entstehen durch die Interferenz mehrerer Wellen, deren Wellenvektor in einem Winkel zur optischen Achse steht. Dies ist in Abbildung 4.4 veranschaulicht. Anhand der Abbildung lässt sich auch eine weitere Eigenschaft der Bessel-Strahlen verstehen: die Fähigkeit zur Selbst-Heilung. Da der Strahl durch die Interferenz mehrerer Wellen entsteht, deren Wellenvektor in einem Winkel zur optischen Achse steht, kann das Strahlprofil wiederhergestellt werden, wenn der Strahl durch ein Hindernis blockiert wird.



**Abbildung 4.4.:** Schematische Darstellung eines Bessel-Strahls. Die zur Abbildung nutzbare Länge (Beobachtungsfeld) ist eingezeichnet und der Querschnitt im Fokus.

Erzeugt werden können Bessel-Strahl mit der Hilfe von Axicon-Linsen, deren Phasenfunktion gegeben ist durch:

$$\phi_{\text{Bessel-Strahl}}(r) = e^{ikr \cdot \tan(\alpha) \cdot (n-1)} . \quad (4.5)$$

$n$  stellt dabei den Brechungsindex des Axicons dar, welcher hier auf  $n = 1,51$  (Glas) gesetzt wurde und  $\alpha$  beschreibt den Böschungswinkel des Kegels des Axicons (hier  $\alpha = 0,5671^\circ$ ). Mithilfe einer ringförmigen Apertur  $A_{\text{Bessel-Strahl}}$ , welche gegeben ist durch:

$$A_{\text{Bessel-Strahl}}(r) = \Theta(r - r_{\text{außen}}) \cdot \Theta(r - r_{\text{innen}}) , \quad (4.6)$$

lässt sich die Länge des Strahls sowie die Position entlang der Propagationsachse einstellen. Dies wird bei der Betrachtung von Abbildung 4.4 deutlich.  $r_{\text{innen}}$  bestimmt die Position des

ersten Schnittpunkts (links) und  $r_{\text{au\ss}en}$  die des zweiten (rechts). In dieser Arbeiten wurden  $r_{\text{au\ss}en} = 1,75$  mm und  $r_{\text{innen}} = 0,8$  mm verwendet, um die gewünschte Länge zu erhalten und sicherzustellen, dass das Zentrum des Bessel-Strahls mit dem Fokus des Gauß-Strahls zusammenfällt.

### Sektionierte Bessel-Strahlen

Wie oben bereits erwähnt, können die Nebenmaxima des Bessel-Strahls zu Fluoreszenzanregungen außerhalb der Fokalebene des Detektionsobjektives führen. Dies reduziert den Bildkontrast und trägt zur Bleichung der Fluorophore bei. Als mögliche Verbesserung wurden sektionierte Bessel-Strahlen vorgeschlagen, deren Winkelspektrum gegenüber Bessel-Strahlen eingeschränkt ist. Auf diese Weise, bleiben die Selbstheilung sowie die Eindringtiefe in streuende Medien weitestgehend erhalten, während gleichzeitig die optische Schnittdicke abnimmt [85]. Zur Erzeugung solcher Strahlen wird lediglich eine zusätzliche Apertur in Abhängigkeit von einem Sektionierungswinkels  $\beta$  mit der Phasenmaske des Bessel-Strahls multipliziert:

$$A_{\text{Sektionierung}}(\theta) = -\Theta(\theta + \frac{\pi}{2} - \beta) - \Theta(\theta + \frac{\pi}{2} + \beta) + \Theta(\theta - \frac{\pi}{2} - \beta) - \Theta(\theta - \frac{\pi}{2} + \beta) . \quad (4.7)$$

### Droplet-Strahlen

Eine andere Strategie, um den störenden Einfluss der Nebenmaxima des Bessel-Strahls zu reduzieren, besteht in der Überlagerung zweier Bessel-Strahlen mit unterschiedlichen Wellenvektoren [86, 87]. Dabei wird das Verhältnis des Betrags der Wellenvektoren so gewählt, dass eine möglichst geringe Intensität der Nebenmaxima erzielt wird. Zur Erzeugung wird auf die Phasenmaske des gewöhnlichen Bessel-Strahls (Wellenvektor  $k$ ) eine weitere addiert, deren Wellenvektor  $k_2$  gegeben ist durch  $k_2 = 0,57 \cdot k$ . Auch die Abmessung der Ringapertur wird entsprechend dieses Verhältnisses angepasst. Es wurden daher  $r_{\text{au\ss}en} = 0,9975$  mm und  $r_{\text{innen}} = 0,456$  mm verwendet.

### Sektionierte Droplet-Strahlen

Die beiden eben erwähnten Ansätze zur Reduktion der Nebenmaxima in Bessel-Strahlen (Sektionierung des Winkelspektrums, Überlagerung mit modifiziertem Bessel-Strahl) können natürlich auch kombiniert werden, wodurch eine noch bessere Unterdrückung der Nebenmaxima möglich sein sollte. Hierzu wird lediglich die Apertur (Gleichung 4.7) der sektionierten Bessel-Strahlen auf die Phasenmaske eines Droplet-Strahls angewandt.

### Gitter-Strahlen und C-Strahlen

Wie bereits erwähnt, erregte die Einführung von Gitter-Lichtscheiben große Aufmerksamkeit. Diese wurden im Jahr 2014 von einer Gruppe um Eric Betzig in einer Veröffentlichung beschrieben [88]. Die Gitter-Lichtscheiben tragen diesen Namen, da sie von zweidimensionalen optischen Gittern abgeleitet wurden. Die Lichtscheiben wurden als „ultra

dünn“ beschrieben und versprechen eine hohe axiale Auflösung bei gleichzeitig vernachlässigbarer Bleichung und geringen Hintergrundbeiträgen [88]. Um diese Strahlen zu erzeugen, werden nur sehr schmale Bänder in der Rückapertur des Beleuchtungsobjektivs ausgeleuchtet, woraus große Leistungsverluste resultieren [100]. Dies fällt insbesondere bei großen Beobachtungsfeldern ins Gewicht. Daher eignen sich Gitter-Lichtscheiben besser für die Beobachtung einzelner Zellen, wofür kleinere Beobachtungsfelder ausreichen [36]. Die Leistungsverluste können durch eine breitere Ausleuchtung der Rückapertur teilweise kompensiert werden. Die hier verwendete Approximation dieser Gitter-Lichtscheiben erzeugt „C“-förmige Ausleuchtungen in der Rückapertur, vergleichbar mit den Strahlen, die in Ref. [95] vorgestellt und diskutiert werden. Sie werden daher als C-Strahlen bezeichnet. Sie werden erzeugt, indem eine Apertur aus drei Spalten über die Phasenmaske des Bessel-Strahls gelegt wird. Die Spalten haben eine Breite  $b = 0,576$  mm und einen Abstand (der Mittellinien)  $d = 1,152$  mm. Eine breitere Ausleuchtung der Rückapertur führt jedoch wieder zu einer höheren, effektiven NA, sodass der resultierende Strahl verkürzt wird.

### 4.3. Charakterisierung der Strahlen

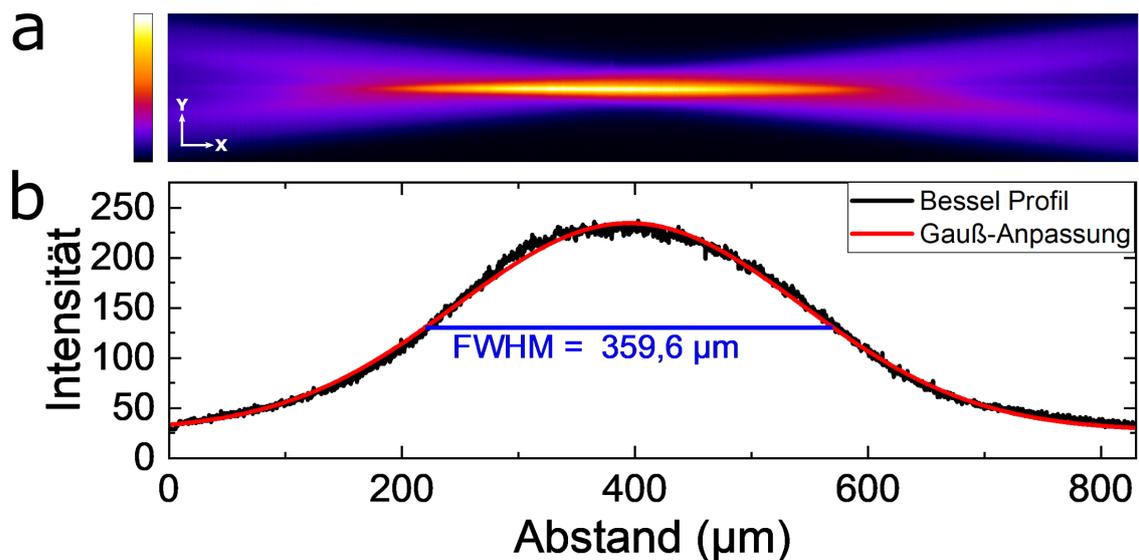
Die Beleuchtungsmuster lassen sich anhand bestimmter Eigenschaften, wie zum Beispiel ihrer Länge, der Breite ihres Hauptmaximums oder der räumlichen Ausdehnung entlang der Detektionsachse, unterscheiden. Im Folgenden werden diese Eigenschaften bestimmt, und die verschiedenen Strahlen werden anhand dieser miteinander verglichen.

#### 4.3.1. Strahllänge

Die eben erwähnten Eigenschaften der Strahlen sind im Allgemeinen voneinander abhängig. Daher sollten, um einen fairen Vergleich zwischen den Strahlen zu ermöglichen, diese alle ungefähr gleich lang sein. Die im vorangegangenen Abschnitt angegebenen Parameter der einzelnen Phasenmasken wurden dementsprechend so gewählt, dass sich für alle Strahlen in etwa die gleiche Länge ergibt. Zur Messung der Propagationslänge wurde der Strahlquerschnitt entlang der Propagationsachse über das Detektionsobjektiv abgebildet (Abbildung 4.2 c und Abbildung 4.5 a). Das Intensitätsprofil auf der optischen Achse des Strahls wurde anschließend mit einer Gauß-Funktion angepasst, deren Halbwertsbreite als Maß für die Strahllänge verwendet wird (Abbildung 4.5 b). Die mittlere Länge der hier verwendeten Strahlen beträgt  $360 \mu\text{m}$  mit einer Standardabweichung von  $\pm 20 \mu\text{m}$ . Dabei ist der C-Strahl der kürzeste mit einer Länge von  $330 \mu\text{m}$  und der Gauß\_B-Strahl der längste mit ungefähr  $390 \mu\text{m}$ .

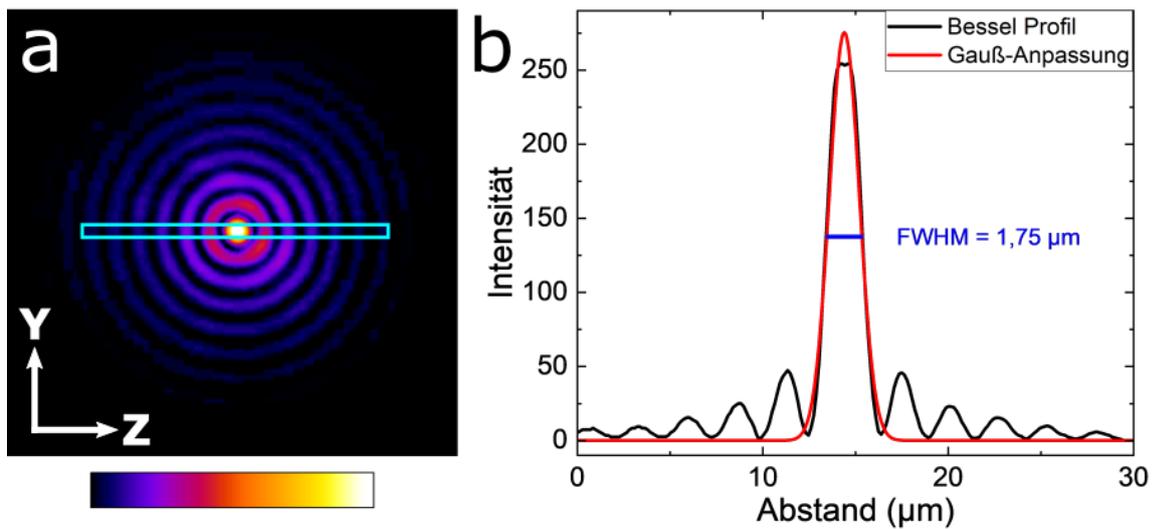
#### 4.3.2. Breite des Hauptmaximums

Jene Strahlen, welche durch Interferenz mehrerer Teilstrahlen entstehen (wie z.B. der Bessel-Strahl), weisen in der Regel ein zentrales Hauptmaximum auf. Dieses zentrale Maximum ist im Allgemeinen schmaler als das des Gauß-Strahls. Um das Ziel einer möglichst dünnen und langen Lichtscheibe zu erreichen, wird das scharfe Hauptmaximum in die Fokalebene des Detektionsobjektivs gelegt. Die Breite des Hauptmaximums eines Strahls

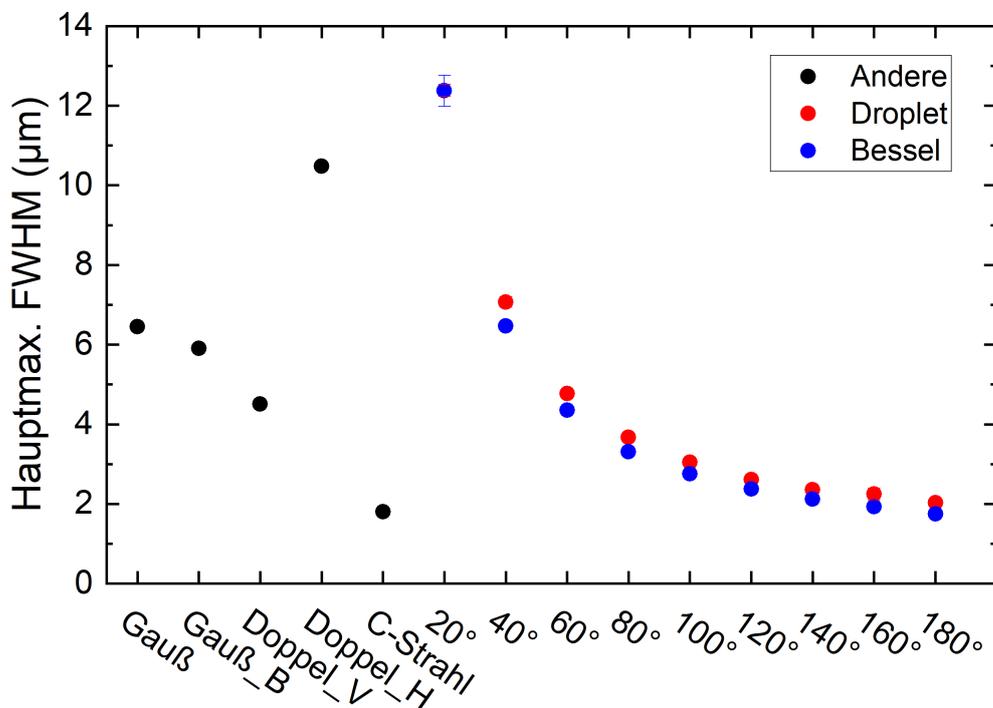


**Abbildung 4.5.:** Bestimmung der Strahllänge. (a) Querschnitt des Bessel-Strahls entlang der Propagationsachse. (b) Intensitätsprofil auf der Propagationsachse (gemittelt über 5 Pixel). An das Intensitätsprofil wurde eine Gauß-Funktion angepasst, deren FWHM als Länge des Strahls angegeben wird.

stellt daher eine interessante Metrik dar, insbesondere, wenn der Einfluss der Nebenmaxima durch Verfahren wie konfokale Spaltdetektion oder Dekonvolution korrigiert werden kann. Zur Bestimmung der Breite des Hauptmaximums wird ein Liniensprofil entlang der Detektionsachse an der Position des Fokus betrachtet. Die jeweiligen Profile (Abbildung 4.6 a) wurden mithilfe des Aufbaus gemessen, welcher in Kapitel 3.1.1 (Abbildung 3.3) beschrieben wird. Das Liniensprofil wird über eine 10 Pixel breite Linie, welche zentral durch das Hauptmaximum verläuft, gemittelt. Anschließend wird eine Gauß-Funktion angepasst, deren FWHM als Breite des Hauptmaximums angegeben wird (Abbildung 4.6 b). Dieser Prozess wurde für jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt und die Standardabweichung über die drei Messungen wird als Unsicherheit angegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Für die Bessel- und Droplet-Strahlen zeigt sich mit abnehmendem Sektionierungswinkel eine Verbreiterung der Hauptmaximums. Dies ist wenig überraschend, da mit abnehmendem Sektionierungswinkel auch die effektive numerische Apertur in Z-Richtung abnimmt. Die Breite des Hauptmaximums des C-Strahls liegt knapp unter der des (180°-) Bessel-Strahls. Die Droplet-Strahlen weisen gegenüber den Bessel-Strahlen eine leichte Verbreiterung des Hauptmaximums auf.



**Abbildung 4.6.:** Bestimmung der Breite des Hauptmaximums. Das Strahlprofil wird entlang der Scan-Achse (Y) gemittelt. Durch Einschränkung des gemittelten Bereichs (cyanfarbener Kasten) kann die effektive Breite im Falle konfokaler Spaltdetektion abgeschätzt werden. Aus der Verteilung der gemittelten Intensität wird anschließend die WSD berechnet.



**Abbildung 4.7.:** Breite des Hauptmaximums der Strahlen. Mittelwert und Standardabweichung der Halbwertsbreite einer an das Hauptmaximum angepassten Gauß-Funktion. Die Zahlenwerte sind im Koordinatensystem der Probe gegeben.

## 4.3.3. Gesamtbreite der Anregung

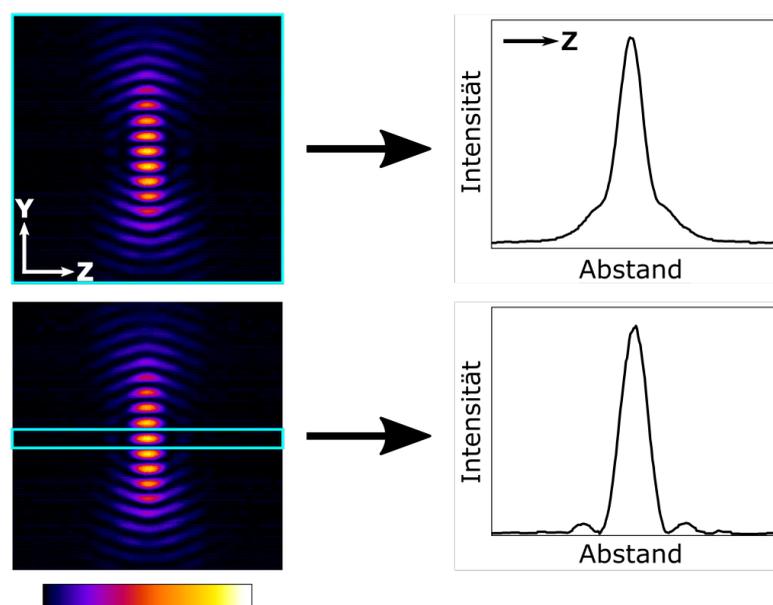
Es ist an und für sich leicht zu erkennen, dass die Dicke der Lichtscheibe eine bedeutende Größe ist. Es ist bezeichnend für die Lichtscheibenmikroskope, dass die Probe nicht vollständig durchleuchtet wird, wie etwa in einem Weitfeldmikroskop, sondern eben nur in einem kleinen Teilvolumen. Bereits in anderen Arbeiten, welche verschiedene Lichtscheiben verglichen haben, findet sich die Aussage, dass die optische Schnittdicke von der räumlichen Ausdehnung der Lichtscheibe entlang der Detektionsachse abhängt [92, 95]. Dabei wurden jedoch Metriken verwendet, die möglicherweise nicht die tatsächliche räumliche Verteilung der Anregungsintensität widerspiegeln. In den Referenzen [92] und [94] wird jene Breite angegeben, welche 63% der Intensität einschließt. Hierbei stellen die 63 % einen willkürlichen Schwellwert dar, und die Form der Verteilung wird nicht berücksichtigt. Diese Problematik wird auch in Ref. [94] erkannt, jedoch wird die Metrik trotzdem verwendet. In Referenz [95] wird die Halbwertsbreite einer an die mittlere Intensitätsverteilung angepasste Gauß-Funktion als Breite der Lichtscheibe angegeben. Dies kann in bestimmten Fällen ausreichen. Bei stark ausgeprägten Nebenmaxima erscheint die Methode jedoch nicht zufriedenstellend.

Die gewichtete Standardabweichung (engl. *weighted standard deviation*, WSD) stellt im Vergleich ein einfaches Maß der Breite einer Verteilung dar:

$$\text{WSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n I(z_i)(z_i - \bar{z})^2}{\sum_{i=1}^n I(z_i)}}. \quad (4.8)$$

Dabei ist  $z_i$  die Ortskoordinate des  $i$ -ten Pixels entlang der Detektionsachse und  $\bar{z}$  der gewichtete Mittelwert. Als Gewicht wird die entlang der Scan-Richtung gemittelte Intensität  $I(z_i)$  (in anderen Worten die zeitlich gemittelte Intensitätsverteilung auf der Detektionsachse) verwendet. Es wird also kein willkürlicher Schwellwert benötigt, beliebig geformte Verteilungen können analysiert werden, und das Ergebnis stellt ein Maß für die Breite in der Einheit Meter dar. Das Verfahren zur Bestimmung der gemittelten Intensitätsverteilung mit und ohne KSD ist anschaulich in Abbildung 4.8 dargestellt.

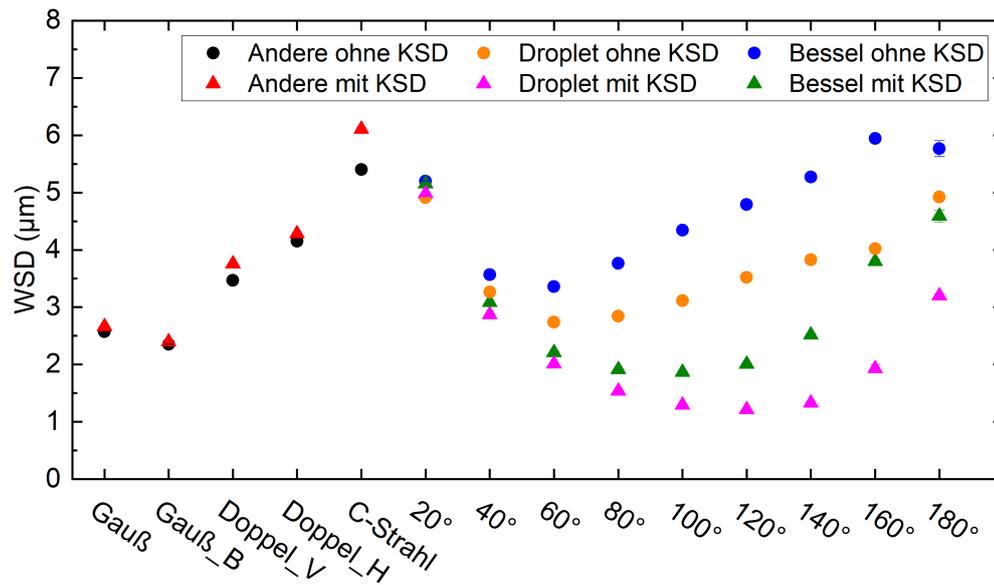
Der untere Teil von Abbildung 4.8 stellt eine Abschätzung der effektiven Breite der Anregung bei Verwendung der KSD dar. Selbstverständlich ändert sich das Strahlprofil nicht durch KSD, und die Anregung von undetektierter Fluoreszenz führt weiterhin zu Photobleichung, jedoch kann auf diese Weise untersucht werden, ob bestimmte Strahlformen besonders effektiv in Kombination mit KSD zusammenwirken. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Die Zahlenwerte geben dabei gut wieder, was bei bloßer Betrachtung der Strahlprofile zu erwarten wäre. Qualitativ reduziert KSD die Breite für alle Strahlen. Quantitativ erscheint sie jedoch besonders effektiv, wenn sie mit sektionierten Bessel- oder Droplet-Strahlen (im Bereich zwischen  $100^\circ$  und  $140^\circ$ ) verwendet wird. Dabei zeigt sich auch, dass die Reduktion der Intensität der Nebenmaxima bei Droplet-Strahlen zu einer geringeren räumlichen Ausdehnung gegenüber Bessel-Strahlen führt. Die Werte der WSD für sektionierte Bessel-Strahlen mit und ohne KSD stehen in guter Übereinstimmung mit denen, die von Fahrbach et al. [85] für die optische



**Abbildung 4.8.:** Veranschaulichung zur Berechnung der gewichteten Standardabweichung (WSD) nach Gleichung 4.8. Das Strahlprofil wird entlang der Scan-Achse (Y) gemittelt. Durch Einschränkung des gemittelten Bereichs (cyanfarbener Kasten) kann die effektive Breite im Falle konfokaler Spaltdetektion abgeschätzt werden. Aus der Verteilung der gemittelten Intensität wird anschließend die WSD berechnet.

Schnittdicke basierend auf Simulationen angegeben werden. Ohne KSD ergibt sich die schmalste Anregung bei Verwendung von Gauß- und Gauß\_B-Strahlen, da sie keinerlei Verbreiterung durch Nebenmaxima erfahren.

Die in Abbildung 4.9 dargestellten Werte wurden anhand der gemessenen Intensitätsverteilung im Fokus des Strahls bestimmt. Jedoch ist diese entlang der Propagationsachse nicht zwangsläufig konstant. Beispielsweise divergiert der Gauß-Strahl, wodurch die Breite der Anregung zunimmt. Um diesen Umstand nicht unbeachtet zu lassen, wurde die WSD an verschiedenen Stellen entlang der Propagationsachse anhand numerisch propagierter Strahlen berechnet. Hierzu wurde ein ImageJ-Plugin benutzt, welches die Intensitätsverteilung des Strahls auf Basis der Phasenmaske berechnet [98]. Die WSD wurde dann analog zu den experimentellen Daten in einem Bereich von  $\pm 50 \mu\text{m}$  um den Fokus berechnet. Die Standardabweichung der Werte gibt an, wie stark die WSD entlang der Propagationsachse schwankt. Die Resultate sind in Abbildung 4.10 dargestellt und stimmen gut mit den experimentellen Werten überein. Die Unterschiede zwischen den Strahlen sind bedeutender als die Variationen, die entlang der Propagationsachse zu erkennen sind.



**Abbildung 4.9.:** Mittelwert und Standardabweichung (kleiner als die Markierungen) der WSD im Fokus der jeweiligen Strahlen ohne und mit konfokaler Spaltdetektion. Die Zahlenwerte sind im Koordinatensystem der Probe gegeben.

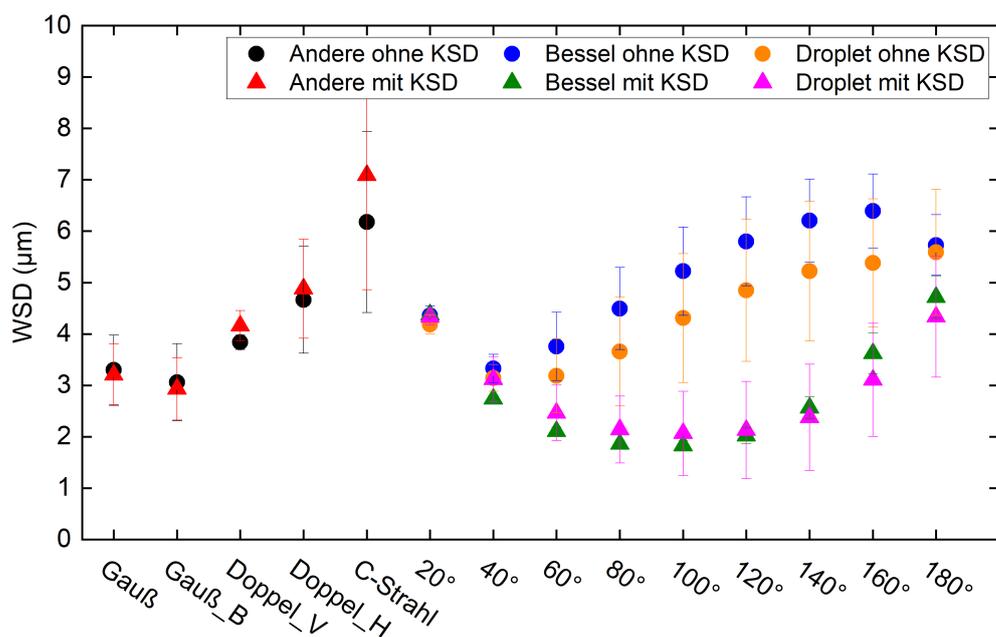
#### 4.4. Auswirkungen auf die Bildqualität

Nach sorgfältiger Bestimmung der geometrischen Strahleigenschaften sollte deren Auswirkungen auf die Bildqualität untersucht werden. Hierzu wurden im Folgenden fluoreszierende Polystyrol-Kügelchen verwendet, welche eine Standardprobe zur Charakterisierung von Fluoreszenzmikroskopen darstellen. Außerdem wurde der erreichbare Kontrast in einer biologischen Probe analysiert und ein kurzer Blick auf die Absorptions- und Streueigenschaften der Strahlen geworfen.

##### Fluoreszierende Polystyrol-Kügelchen

Eine Probe von fluoreszierenden Polystyrol-Kügelchen (Durchmesser 100 nm) wurde, genau wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben, präpariert und in die Rotorplattform des Mikroskops eingespannt. Anschließend wurde für jeden Beleuchtungsstrahl ein Bildstapel mit 300 Bildern in einem Abstand von 1 µm aufgenommen. Dies erfolgte je einmal mit und einmal ohne konfokale Spaltdetektion. Für Messungen ohne KSD wurde eine Belichtungszeit von 200 ms gewählt. Messungen mit KSD wurden mit einer Belichtungszeit von 2 ms und einer Aufnahmezeit pro Bild von 200 ms angefertigt, was einer Spaltbreite von 8,3 µm entspricht. Die eingestrahlte Leistung wurde für alle Strahlen auf 440 µW eingestellt.

Zur Auswertung der Daten (in ImageJ) wurde zunächst eine Maximumintensitätsprojektion der Bildstapels berechnet, in welcher nach lokalen Maxima der Intensität gesucht wurde, um die X- und Y-Koordinaten der Kügelchen zu bestimmen. Anschließend wurde das

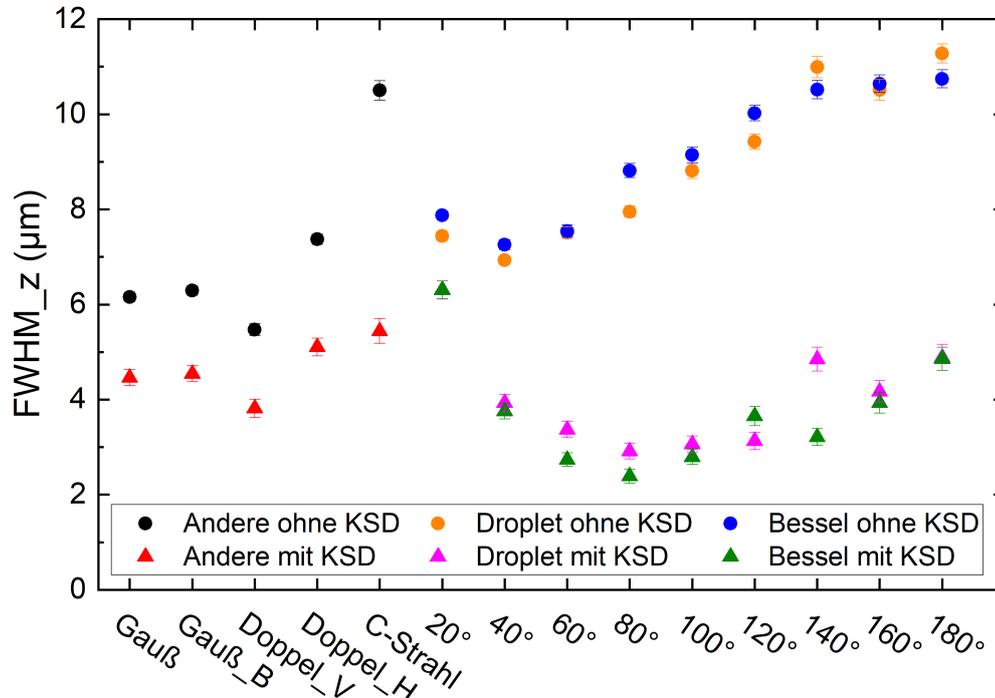


**Abbildung 4.10.:** Mittelwert und Standardabweichung der WSD numerisch propagierter Strahlen (Simulation), gemittelt entlang der Propagationsachse  $\pm 50 \mu\text{m}$  um den Fokus ohne und mit konfokaler Spaltdetektion. Auf diese Weise werden Variationen entlang der Propagationsachse berücksichtigt. Die Zahlenwerte sind im Koordinatensystem der Probe gegeben.

axiale Intensitätsprofil jedes Kügelchens erzeugt, welches über ein  $3 \times 3$  Pixel großes Feld gemittelt wird. Daran wird eine Gauß-Funktion angepasst, deren Halbwertsbreite als axiale Auflösung angegeben wird. Die Werte aller Kügelchen werden gemittelt, und der Standardfehler dient zur Abschätzung der Unsicherheit. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Hier zeigt sich, dass die axiale Auflösung stark mit der Gesamtbreite der Anregung (WSD, Abbildung 4.9 und 4.10) korreliert. Remacha et al. [92] haben bereits bemerkt, dass eine fehlende Unterscheidung zwischen der Breite des Hauptmaximums und der Gesamtbreite der Anregung zu Verwirrung führen kann, wenn beispielsweise Bessel-Strahlen oder Gitter-Strahlen als „ultra dünn“ beschrieben wurden [101, 102]. Dabei sind nur die zentralen Maxima sehr dünn, während die zusätzliche Anregung durch Nebenmaxima die effektive Breite vergrößert.

Es bestätigt sich, dass KSD zu einer Verbesserung der axialen Auflösung führt, wobei der Effekt bei Strahlen mit ausgeprägten Nebenmaxima besonders deutlich ist. Die beste gemessene axiale Auflösung wurde unter Verwendung von KSD mit sektionierten Bessel- oder Droplet-Strahlen mit einem Sektionswinkel um  $80^\circ$  erzielt. Wenn keine KSD benutzt werden kann, so führt die Verwendung des Doppel-Strahls zur bestmöglichen Auflösung. Der Vergleich der beiden Orientierungen des Doppel-Strahls zeigt, dass die schwachen Nebenmaxima auf der Detektionsachse des Doppel\_V-Strahls die axiale Auflösung nur

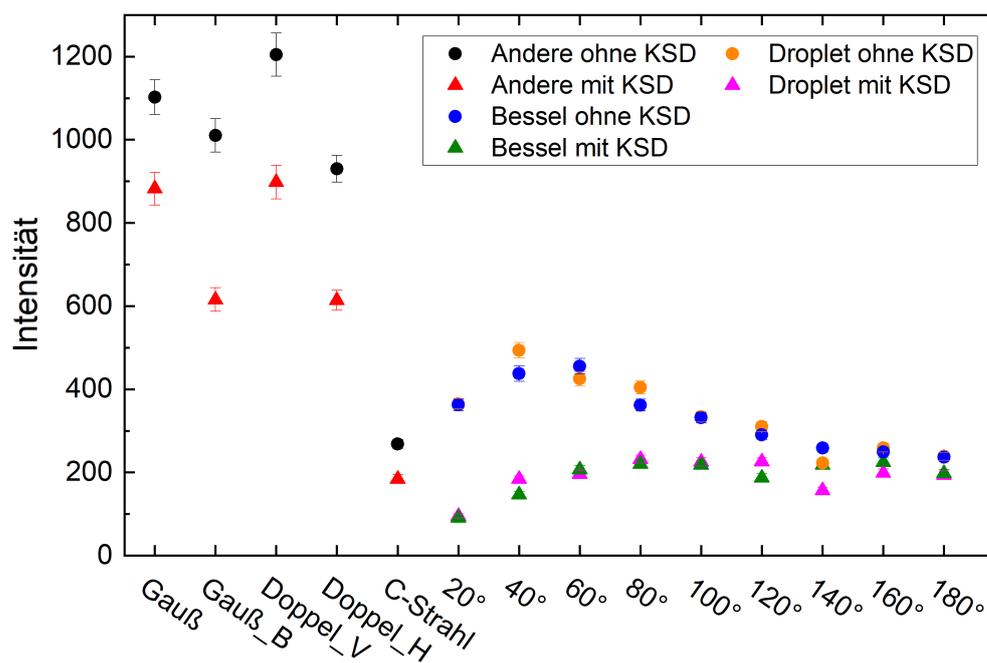
wenig beeinträchtigen, während das breite Hauptmaximum des Doppel\_H-Strahls die Auflösung verschlechtert.



**Abbildung 4.11.:** Mittelwert und Standardfehler der scheinbaren Größe fluoreszierender Kügelchen mit einem Durchmesser von 100 nm entlang der Detektionsachse (Z) ohne und mit konfokaler Spaltdetektion. Die Zahlenwerte sind im Koordinatensystem der Probe gegeben.

Zusätzlich zur FWHM der angepassten Gauß-Funktion wird auch das Maximum der Intensität ermittelt. Auch hierbei wird über alle Kügelchen gemittelt und der Standardfehler berechnet. Da alle Messungen mit derselben eingestrahlenen Leistung durchgeführt wurden, dient die gemessene Helligkeit als Maß für die Energieeffizienz der verschiedenen Strahlen. Zusätzlich ist die Helligkeit bestimmend für das Signal-Rausch-Verhältnis und darüber auch mit der Photobleichung verbunden. Strahlen, welche Bilder mit helleren Kügelchen erzeugen, erreichen dasselbe Signal-Rausch-Verhältnis mit einer kleiner eingestrahlenen Gesamtleistung und infolgedessen reduzierter Bleichung. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 4.12 zusammengefasst.

Hier ist zunächst anzumerken, dass die Bilder nicht auf ihre mittlere Intensität normiert wurden. Da diese zum größten Teil aus dunkeln Pixeln bestehen, wird der Mittelwert vom Detektorrauschen dominiert. Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass durch die Anwendung von KSD nicht nur der Hintergrund, sondern auch ein Teil des Signals unterdrückt wird. Mit weiter abnehmender Spaltbreite nähert man sich schließlich dem Extremfall eines vollständig geschlossenen Spalts, durch welchen gar kein Licht mehr hindurchdringt. Ohne KSD produziert der Doppel-Strahl in vertikaler Ausrichtung (Doppel\_V) die hellsten



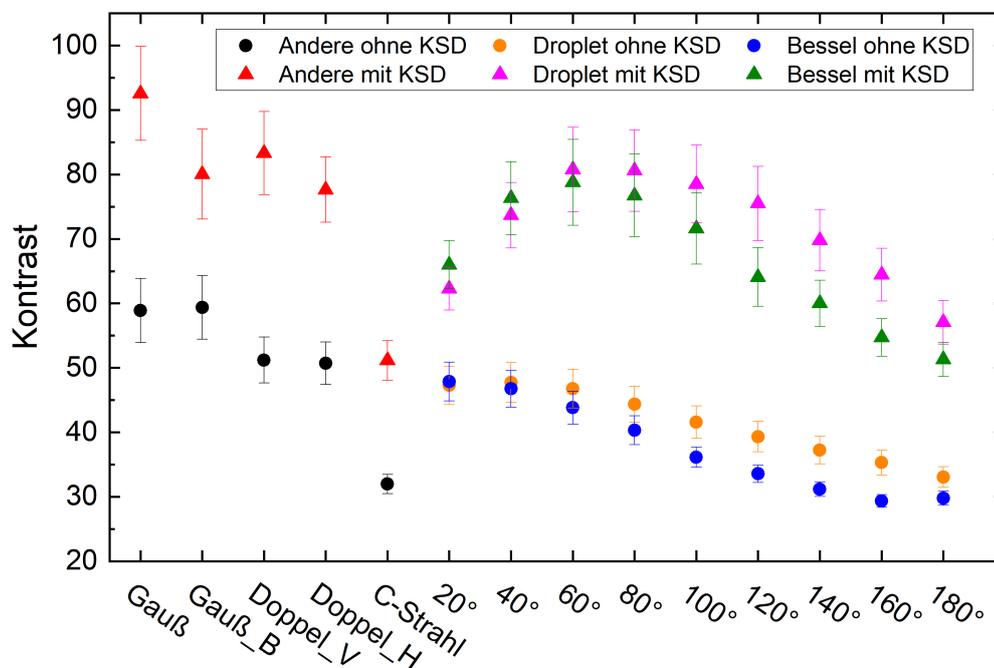
**Abbildung 4.12.:** Mittelwert und Standardfehler des Spitzenwerts der scheinbaren Helligkeit fluoreszierender Kügelchen ohne und mit konfokaler Spaltdetektion.

Signale. Das ist zu erwarten, da er ein schmales Hauptmaximum aufweist und die beiden Nebenmaxima nur wenig Energie tragen. Da die Hauptachse des elliptischen Hauptmaximums entlang der Scan-Achse ausgerichtet ist, erreicht der Strahl auch im zeitlichen Mittel hohe Spitzenwerte in der Anregungsintensität. Bei Anwendung der KSD zeigt sich ein Maximum der beobachteten Helligkeit in Bezug auf den Sektionswinkel bei Bessel- und Droplet-Strahlen, welches grob im Bereich zwischen 80° und 140° liegt. In diesem Bereich liegt auch die minimale Ausdehnung der Strahlen (KSD einbezogen) entlang der Detektionsachse.

### Kontrast in biologischer Probe

Kleine fluoreszierende Kügelchen sind eine äußerst nützliche und interessante Referenzprobe. Jedoch stellen sie auch einen sehr speziellen Fall dar, bei welchem die Signale einzelner Emittter im Wesentlichen nicht überlappen. Durch die großen Abstände (welche zur Charakterisierung der Auflösung gewünscht sind) ergeben sich nur sehr schwache Hintergrundbeiträge. Hinzu kommt, dass die Kügelchen zu klein sind, um das Anregungslicht zu streuen, was in biologischen Proben jedoch von großer Bedeutung ist. Daher sollte auch die Auswirkung der Strahlen auf den Kontrast anhand eines Embryos des Zebrafisches untersucht werden. Der Embryo der transgenen Linie Tg(h2az2a:h2az2a-mCherry) (fluoreszenzmarkierte Zellkerne) wurde hierfür 12 Stunden nach der Befruchtung mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung fixiert. Da die Fixierung die Fluoreszenz der Markerproteine beeinträchtigen kann, wurde der Embryo immunhistochemisch markiert (anti-RFP, anti-Alexa 561). Die weitere Präparation der Probe erfolgte, wie in Kapitel 6 beschrieben.

In diesem Entwicklungsstadium formen sich erste Zellcluster, aus denen später der Schwanz und der Kopf hervorgehen [103]. Die markierten Zellkerne haben einen Durchmesser von etwa  $5\ \mu\text{m}$  und erzeugen aufgrund ihrer räumlichen Nähe zueinander einen ausgeprägten Hintergrund. Es wurden Bildstapel von je 300 Bildern mit einem Abstand von  $1\ \mu\text{m}$  mit und ohne KSD für die verschiedenen Beleuchtungsmuster aufgenommen. Die eingestrahlte Gesamtleistung lag für alle Strahlen bei  $200\ \mu\text{W}$ . Für Messungen ohne KSD wurde eine Belichtungszeit von  $200\ \text{ms}$  gewählt. Messungen mit KSD wurden mit einer Belichtungszeit von  $1\ \text{ms}$  und einer Aufnahmezeit pro Bild von  $100\ \text{ms}$  angefertigt, was ebenfalls einer Spaltbreite von  $8,3\ \mu\text{m}$  entspricht. Zur Bestimmung des Kontrasts wurden die Bildstapel zunächst auf den Mittelwert der Intensität normiert. Anschließend wurde die Standardabweichung innerhalb einer ausgewählten Bildregion für 20 aufeinanderfolgende Bilder des Stapels berechnet. Die gemittelten Werte mit Standardfehler als Unsicherheit sind in Abbildung 4.13 dargestellt.



**Abbildung 4.13.:** Mittelwert und Standardfehler des durch die verschiedenen Strahlen erreichten Kontrasts ohne und mit konfokaler Spaltdetektion. Als Probe dient ein Embryo des Zebrafährblings. Der Kontrast wird angegeben als Standardabweichung der Intensitätswerte innerhalb eines bestimmten Beobachtungsbereichs. Vor der Analyse werden alle Bilder auf den Mittelwert ihrer Intensität normiert.

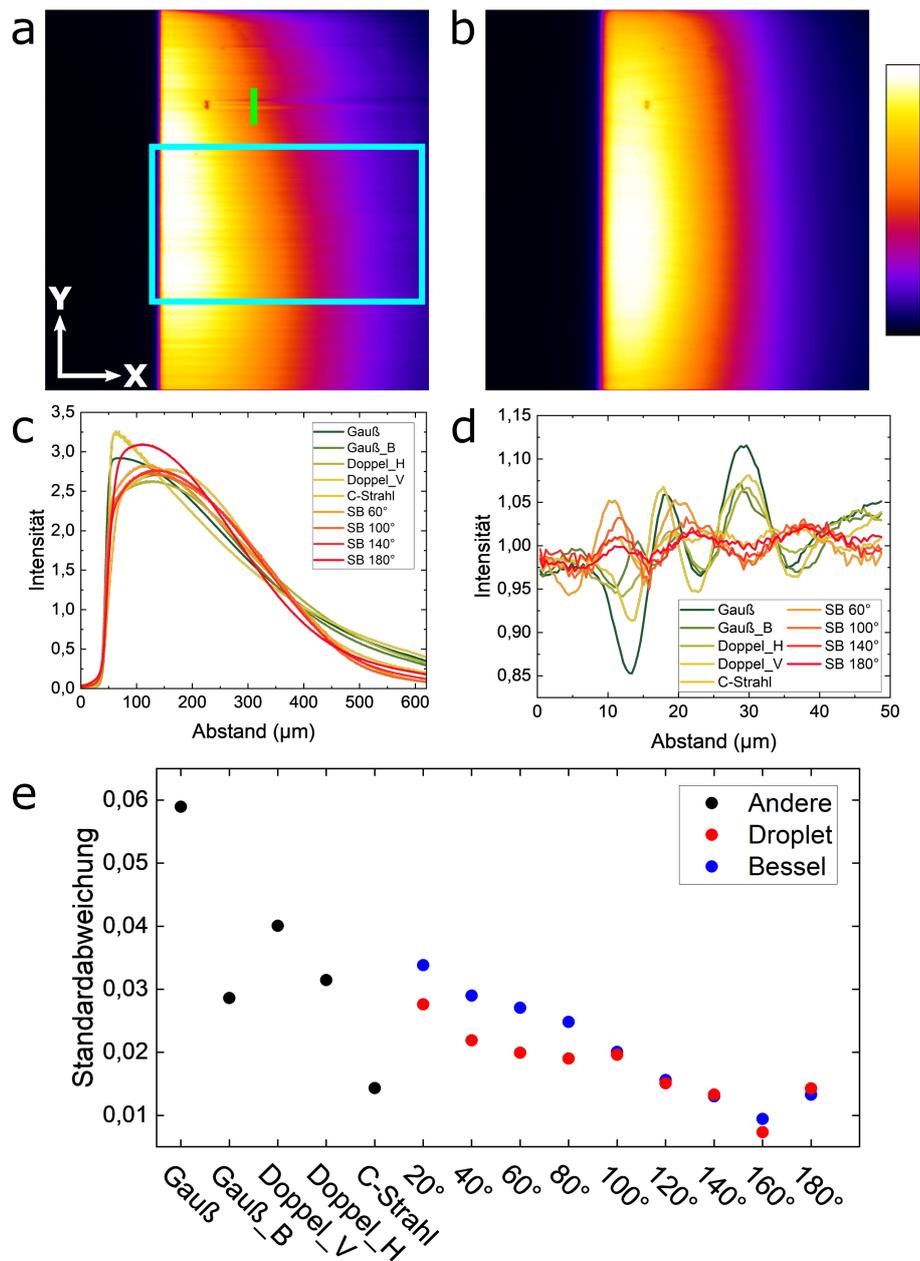
Der höchste Kontrast ohne KSD ergibt sich bei Verwendung des Gauß- oder Gauß\_B-Strahls. Diese Strahlen haben keine Nebenmaxima, welche Fluoreszenz außerhalb der Fokalebene des Detektionsobjektivs anregen würden. Allgemein gilt: Je ausgeprägter die Nebenmaxima der Strahlen, desto mehr nimmt der Kontrast ab. Mithilfe der KSD lässt sich der Kontrast für alle Strahlen deutlich steigern. Die am stärksten ausgeprägte Verbesserung

lässt sich mit sektionierten Bessel- oder Droplet-Strahlen mit einem Sektionswinkel um  $80^\circ$  erzielen, was auch schon anhand der axialen Auflösung beobachtet wurde (Abbildung 4.11). Dies ist durch die laterale Detektionsbegrenzung der KSD gegeben, welche die durch die breiteren Nebenmaxima angeregte Fluoreszenz dieser Strahlen nicht detektiert. So entsteht eine wirkungsvolle Kombination aus einem schmalen Hauptmaximum, der teilweisen Unterdrückung der Nebenmaxima durch Sektionierung des Winkelspektrums und KSD.

#### Eindringtiefe

Einige der hier betrachteten Strahlen besitzen selbst-heilende Eigenschaften. Diese bergen Vorteile in bestimmten Situationen. Beispielsweise produzieren Gauß-Strahlen mit unter starken Streifenartefakten, wenn stark streuende oder absorbierende Hindernisse ihre Propagation blockieren [104]. Diese können durch Verwendung von Bessel-Strahlen stark reduziert werden, da sich der Strahl hinter dem Hindernis neu formiert [40].

Um diesen Aspekt ebenfalls in Betracht zu ziehen, wurde eine fluoreszierende Farbstofflösung (Alexa Fluor™ 568, Sigma Aldrich) mit 1,5% (Massenanteil) Agarose (Type VII, A6560, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) präpariert. Die Konzentration des Farbstoffes wurde so eingestellt, dass die optische Dichte über  $400\ \mu\text{m}$  um 1 verringert wird. Für alle Strahlen wurde konstant eine Leistung von  $1,3\ \mu\text{W}$  eingestrahlt und Bilder unter Verwendung von KSD aufgenommen. In der Probe war eine kleine Verunreinigung (Staubteilchen) zu finden, welche hier als streuendes Objekt dient. Die Bilder, welche mit dem Gauß- und Bessel-Strahl aufgenommen wurden, sind in Abbildung 4.14 a und b dargestellt. Darin sind die Streifenartefakte des Gauß-Strahls deutlich zu erkennen, während sie für den Bessel-Strahl nahezu vollständig verschwunden sind. Die Eindringtiefen in Bezug auf Absorption (Abbildung 4.14 c) weist, wie zu erwarten war, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Strahlen auf. Absorption ist eine homogene Eigenschaft des Mediums und hängt daher nicht von dem Strahlprofil ab. Um einen genaueren Blick auf die Streuung zu werfen, wurden die Linienprofile über den Streifenartefakten erfasst (Abbildung 4.14 d). Als Maß für die Streuung kann die Standardabweichung der Linienprofile, welche zuvor auf ihren Mittelwert normiert wurden, verwendet werden (Abbildung 4.14 e). Hier zeigt sich, dass Strahlen mit einem breiten Winkelspektrum (Bessel-, Droplet- und C-Strahlen) weniger stark ausgeprägte Streifen produzieren. Je kleiner der Sektionierungswinkel wird, desto mehr geht die Fähigkeit zur Selbst-Heilung verloren. Für bestimmte, stark streuende Proben kann diese Fähigkeit gegebenenfalls vorteilhaft sein, auch wenn sie mit einer breiteren Ausleuchtung der Probe einher geht.



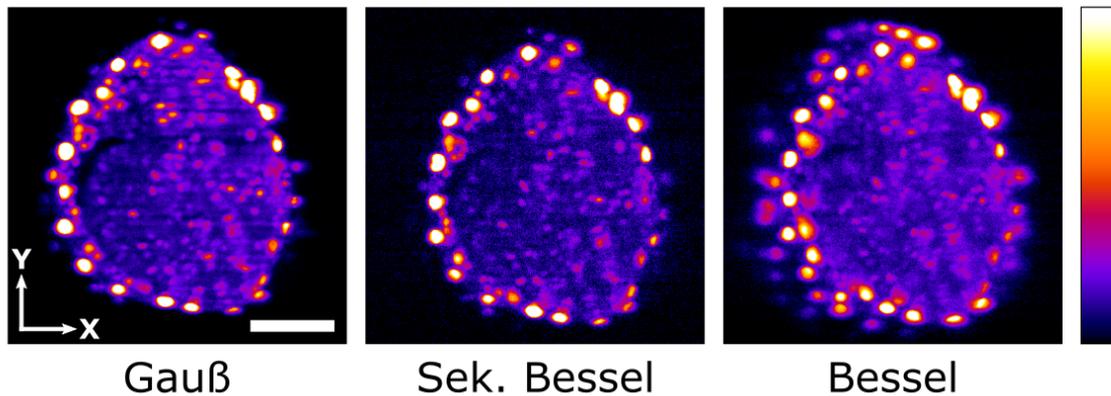
**Abbildung 4.14.:** Absorption und Streuung verschiedener Strahlen. (a) Bild einer Farbstofflösung (Gauß-Strahl mit KSD). Im oberen Drittel des Bildes ist ein Hindernis zu erkennen, an welchem der Strahl gestreut wird, woraufhin Streifenartefakte entstehen. (b) Gleiches Bild wie in a, allerdings mit einem Bessel-Strahl. Hier sind die Streifenartefakte nahezu nicht zu erkennen. (c) Intensitätsprofil entlang der Propagationsachse (X) gemittelt über das cyanfarbene Rechteck in a. Das Profil zeigt das Produkt der Strahlintensität und der Absorption der Farbstofflösung. (d) Intensitätsprofil entlang der grünen Linie in a für ausgewählte Strahlen normiert auf den Mittelwert. (e) Standardabweichung der Intensitätsprofil aus d für verschiedene Strahlen. Ein hoher Wert deutet auf stark ausgeprägte Streifenartefakte, während ein niedriger Wert für eine homogenere Ausleuchtung steht.

### 4.5. Diskussion

Die Eigenschaften des Beleuchtungsstrahls haben eine entscheidende Bedeutung für die Bildqualität in der Lichtscheibenmikroskopie. Diese Einsicht wurde auch von der hier durchgeführten Betrachtung bestätigt. Ziel des Vergleichs war es, belastbare Daten zu produzieren, welche für eine bestimmte Anwendung die Auswahl der optimalen Lichtscheibe ermöglichen. Hierzu wurden zunächst die wesentlichen Charakteristika der Strahlen, wie ihre Länge, die Breite des Hauptmaximums sowie die gesamte Breite der Anregung bestimmt und miteinander verglichen. Für Letztere wurde die gewichtete Standardabweichung als geeignete Metrik vorgeschlagen, welche die gesamte Intensitätsverteilung berücksichtigt und ohne willkürliche Schwellwerte auskommt. Darauf folgend wurde anhand unterschiedlicher Proben untersucht, wie sich die einzelnen Strahlen auf den Abbildungsprozess auswirken. Anhand von fluoreszierenden Kügelchen wurde die axiale Auflösung und Leistungseffizienz der Strahlen untersucht. Ein Zebraäbrblingsembryo wurde als biologische Probe verwendet, und der mit verschiedenen Lichtscheiben erreichbare Kontrast wurde bestimmt. Zuletzt wurden auch die Streueigenschaften der Strahlen betrachtet. Es konnte festgestellt werden, dass die axiale Auflösung, sowie der Kontrast mit der Gesamtbreite der Anregung korrelieren. Die Verwendung von konfokaler Spaltdetektion, insbesondere in Kombination mit speziellen Strahlen wie sektionierten Bessel- oder Droplet-Strahlen, kann die axiale Auflösung und den Kontrast verbessern. Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass Strahlen mit selbst-heilenden Eigenschaften Vorteile für stark streuende Proben bieten können.

Dies wird auch bei direkter Betrachtung der Bilder deutlich. In Abbildung 4.15 sind exemplarisch Aufnahmen gezeigt, welche mit 3 verschiedenen Strahlen angefertigt wurden. Dabei wurde KSD verwendet. Der Gauß-Strahl bietet einen hohen Kontrast, was besonders im Vergleich zum Bessel-Strahl deutlich wird. Bei Verwendung des Bessel-Strahls lassen sich nämlich weitere Zellkerne erkennen, was auf eine größere, optische Schnittdicke und niedrigeren Kontrast hinweist. Andererseits lässt der Gauß-Strahl Streuartefakte in Form von horizontalen Streifen im Bild erkennen. Diese verschwinden bei Verwendung des Bessel-Strahls aufgrund seiner selbst-heilenden Eigenschaften. Der sektionierte Bessel-Strahl stellt einen Kompromiss zwischen den beiden anderen dar. Das resultierende Bild weist einen etwas niedrigeren Kontrast im Vergleich zu dem Bild auf, welches mit dem Gauß-Strahl aufgenommen wurde. Gleichzeitig lassen sich aber keine Streifenartefakte erkennen.

Eine Lichtscheibe, die unter allen Umständen die besten Ergebnisse liefert, konnte jedoch auch in dieser Untersuchung nicht identifiziert werden. Doch für Anwendungen im Bereich der organismischen Bildgebung scheinen Gauß-Strahlen aufgrund guter axialer Auflösung, hoher Leistungseffizienz und Bildkontrast eine gute Wahl darzustellen. Darüber hinaus sind sie sehr einfach und kostengünstig zu implementieren. Ihr größter Nachteil besteht in den stark ausgeprägten Streifenartefakten hinter streuenden Objekten. Um dies in den Griff zu bekommen, können jedoch andere Methoden, wie beidseitige Beleuchtung, Multi-view Dekonvolution oder andere Korrekturalgorithmen angewendet werden [104, 105].



**Abbildung 4.15.:** Einzelne Scheiben aus den 3D Bildstapeln, welche unter Verwendung des Gauß-Strahls, des sektionierten Bessel-Strahls ( $80^\circ$ ) und des Bessel-Strahls aufgenommen wurden. Dabei wurde KSD angewendet. Die Aufnahmen sind in logarithmischer Intensitätsskala dargestellt. Maßstabsleiste  $100\ \mu\text{m}$ .

In der Einleitung zu diesem Kapitel wurde darauf hingewiesen, dass diverse Studien zu diesem Thema gewisse Widersprüche produzierten. Diese sollen hier nicht unkommentiert bleiben. Beispielsweise wird in Ref. [96] behauptet, dass räumlich getrennte Nanopartikel, deren Größe unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegt, nicht geeignet sind, um die Auflösung zu charakterisieren. Die Begründung lautet, dass die damit festgestellte Auflösung in anderen Proben nicht erreicht werden kann, da bei dicht gepackten Strukturen höhere Raumfrequenzen im Rauschen verloren gehen können. Stattdessen wurden dort biologische Proben (genauer das endoplasmatische Retikulum der LLC-PK1 Zellen aus der Niere von Schweinen) verwendet und deren Raumfrequenzen analysiert, um die Auflösung abzuschätzen [96]. In vielen anderen Studien werden jedoch Nanopartikel zur Charakterisierung der Auflösung verwendet [95, 106–109]. Dies stellt strenggenommen keinen Widerspruch dar, jedoch lassen sich die Ergebnisse der verschiedenen Studien dadurch nur schwer miteinander vergleichen.

In dieser Arbeit wurde beim Vergleich der Lichtscheiben und ihrer Abbildungseigenschaften auf eine Dekonvolution verzichtet. Ist die PSF bekannt und das Signal-Rauschen-Verhältnis hinreichend groß, ermöglicht das Verfahren eine akkurate Bildrekonstruktion. Allerdings benötigen Dekonvolutionsalgorithmen auch benutzerdefinierte Parameter (Anzahl der Iterationen, Regularisierungsparameter) deren optimale Wahl durchaus auch von der Geometrie der Lichtscheibe abhängen können [94]. In anderen Studien wurde ebenfalls auf Dekonvolution verzichtet [94, 95]. In Ref. [96] hingegen findet sich die Aussage, dass jedes Mikroskop einen Tiefpassfilter darstellt, weshalb Dekonvolution ohnehin immer notwendig sei, um diesen Filterprozess zu kompensieren. Weiter wird hervorgehoben, dass Dekonvolution insbesondere bei der Verwendung von Gitterstrahlen wichtig sei, da die Nebenmaxima zu „Geisterbildern“ führen. Diese Effekte werden jedoch durch Dekonvolution beseitigt. Daher wird argumentiert, dass die Nebenmaxima wertvolle,

hochfrequente Informationen liefern, statt unerwünschten Hintergrund [96]. Auch bei der Einführung der Gitter-Strahlen wurde erwähnt, dass eine Dekonvolution angewendet wurde [88]. Die Bedeutung derselben zur Korrektur von „Geisterbildern“ und der Einfluss der Nebenmaxima wurde jedoch nicht diskutiert.

Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte wurde die Lichtscheibenmikroskopie stetig weiterentwickelt und um viele unterschiedliche, Hardware- und Software-basierte Techniken erweitert, welche die Methode verbessern und neue Anwendungen ermöglichen. Um den Anforderungen der vielfältigen Proben zu genügen, wurden unterschiedliche Designs entwickelt, die ihre jeweiligen Vor- und Nachteile haben. Dies gilt auch für die verschiedenen Geometrien der Lichtscheibe. Um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, müssen stets die individuellen Anforderungen und Gegebenheiten berücksichtigt werden.

## 5. Wavelet-basierte Hintergrundkorrektur

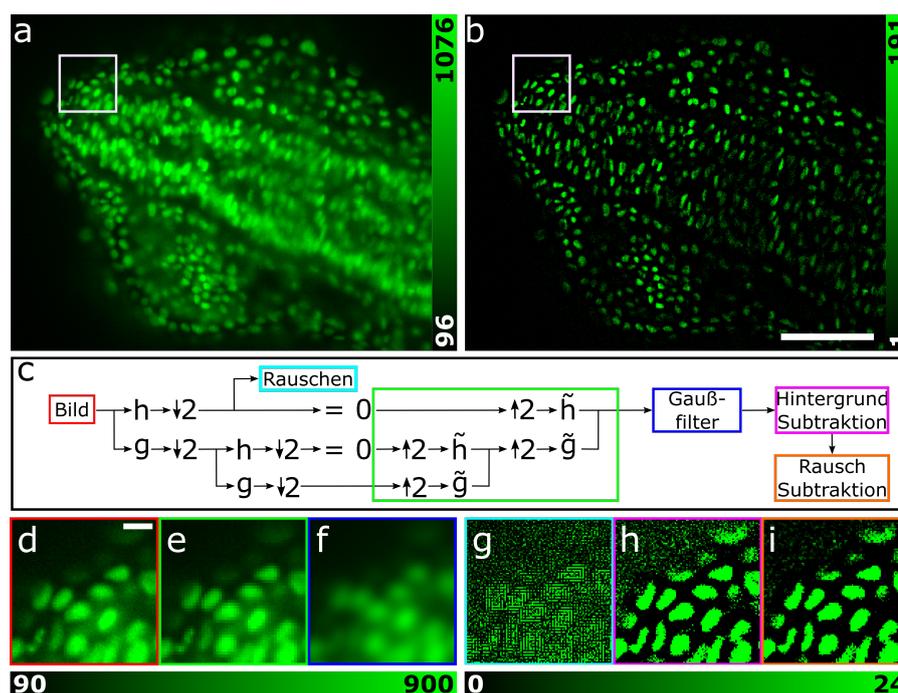
Fluoreszenzmikroskopische Abbildungen beinhalten neben dem gewünschten Signal auch Hintergrundbeiträge, welche von angeregten Fluorophoren außerhalb der Fokusebene und von Streulicht herrühren. Darüber hinaus wird das Bild mit dem Rauschen des Detektorsystems überlagert. Dies erschwert die anschließende Analyse sowohl für Fachpersonal als auch für ein automatisiertes Computerprogramm. Im Folgenden wird ein Algorithmus beschrieben, welcher die unerwünschten Komponenten effektiv aus dem gemessenen Bild entfernt. Die Methode wird anhand realer und synthetischer Bilddaten mit anderen Software- und Hardware-basierten Verfahren zur Hintergrundkorrektur verglichen.

Die in diesem Kapitel vorgestellte Arbeit wurde bereits in einer Fachzeitschrift veröffentlicht [66]. Die Ko-Autoren haben folgende Beiträge geleistet: Weichun Zhang hat die Messungen am STED-Mikroskop durchgeführt. Andrei Kobitski schrieb den Code für die Matlab-Implementierung. G. Ulrich Nienhaus hat die Arbeit betreut und zur Konzeption, Diskussion und Interpretation der Ergebnisse sowie der Textgestaltung beigetragen.

### 5.1. WBNS Algorithmus

Nach den Entwicklungen der vergangenen Jahrzehnte ist die Fluoreszenzmikroskopie als Werkzeug der Lebenswissenschaften nicht mehr wegzudenken. Hochauflösende Verfahren haben sich als potente Werkzeuge erwiesen und geben neue Einblicke in biologische Prozesse auf subzellulärer Ebene [110–112]. Es stehen verschiedene Methoden zur Bildgebung zur Verfügung, und die richtige Entscheidung diesbezüglich zu treffen, kann sich durchaus schwierig gestalten, weisen die Methoden doch mitunter große Unterschiede in Sachen räumlicher und zeitlicher Auflösung, Signal-Rausch-Verhältnis, Probenbeeinträchtigung, Komplexität und Kosten auf. Die grundlegende Abbildungstheorie ist jedoch allen optischen Mikroskopieverfahren gemein. Wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben, lässt sich eine fluoreszenzmikroskopische Abbildung idealerweise als Faltung der markierten Struktur mit der Punktspizfunktion des abbildenden Systems beschreiben. In der Realität kommen jedoch noch weitere Komponenten hinzu: Zum einen werden meist auch Fluorophore außerhalb der Fokalebene angeregt, deren Emissionslicht (auch mit konfokaler Detektion) nicht vollständig unterdrückt werden kann. Außerdem lässt sich auch die Detektion von Streulicht nicht gänzlich verhindern. Diese Komponente ist typischerweise durch eine niedrige Raumfrequenz charakterisiert. Zum anderen tragen elektronische Detektorsysteme Rauschen bei, welches von Pixel zu Pixel variiert und daher durch hohe Raumfrequenzen charakterisiert ist. All diese Komponenten überlagern sich und bilden so das Roh-Bild (Abbildung 5.1 a).

Die verschiedenen Frequenzen treten dabei an unterschiedlichen Orten im Bild auf, womit das Bild ein nicht-stationäres Signal darstellt. Mithilfe der Wavelet-Transformation lässt sich ein solches Signal in seine Frequenzanteile zerlegen (Kapitel 2.4). So können der hochfrequente Teil des Rauschens sowie der niederfrequente Teil des Hintergrunds extrahiert und anschließend vom ursprünglichen Bild subtrahiert werden (Abbildung 5.1 b). Der verwendete Algorithmus ist schematisch in Abbildung 5.1 c dargestellt und wird im Folgenden Wavelet-basierte Hintergrund- und Rauschsubtraktion (engl. *Wavelet-based Background and Noise Subtraction*, WBNS) genannt. Wird nur der Hintergrund, nicht aber das Rauschen subtrahiert, wird die Abkürzung WBS verwendet.



**Abbildung 5.1.:** Anwendung des WBNS Algorithmus auf ein fluoreszenzmikroskopisches Bild. (a) Das Eingabebild aus einem 3D Stapel, gemessen mit einem DSLM, zeigt Zellkerne im Kopf eines Zebrafisch Embryos markiert mit EGFP. Die Daten wurden übernommen aus [113]. (b) Ergebnis nach Anwendung von WBNS, Maßstabsleiste 100  $\mu\text{m}$ . (c) Vereinfachtes Flussdiagramm des WBNS Algorithmus. (d)-(i) Vergrößerte Bildausschnitte (weiße Kästen in a und b) an verschiedenen Stellen des Algorithmus: (d) Eingabebild, Maßstabsleiste 8  $\mu\text{m}$ , (e) extrahierter Hintergrund vor und (f) nach Anwendung des Gaußfilters, (g) extrahiertes Rauschen, (h) Ergebnis nach Subtraktion des Hintergrunds und (i) nach zusätzlicher Subtraktion des Rauschens. (g)-(i) sind mit verstärktem Kontrast dargestellt, um die Auswirkungen auf das Rauschen zu verdeutlichen. Übernommen aus [66].

WBNS basiert auf der diskreten Wavelet-Transformation, welche das Bild in mehrere, auf logarithmischer Skala separierte Level aufspaltet. Als kurze und verständliche Einführung zur Wavelet-Transformation und deren Implementierung als Filterbank werden die Referenzen [29, 114, 115] empfohlen. Gemäß des Schemas in Abbildung 5.1 c wird das Haar-Wavelet benutzt, um das Eingangsbild in Detailkoeffizienten, welche die hochfrequenten Kom-

ponenten beinhalten, und die Approximationskoeffizienten, mit den niederfrequenten Anteilen, zu zerlegen. Dies geschieht durch die Anwendung von Hochpass- (h) und Tiefpassfiltern (g), wodurch sich die Zahl der Pixel in beiden Dimensionen implizit halbiert. Das durch den Tiefpass gefilterte Bild dient dann als Eingangsbild für das nächste Level und der gesamte Prozess wird für  $m \leq \log_2(n)$  Level wiederholt, wobei  $n$  die Bildgröße in Pixel symbolisiert. An dieser Stelle kommt ein benutzerdefinierter Parameter  $R$  ins Spiel, welcher die Raumfrequenz bestimmt, bei welcher die Trennung zwischen nützlicher Bildinformation und Hintergrund vollzogen wird und damit die Anzahl der zu berechnenden Level auf  $m = \lceil \log_2(R) \rceil$  festlegt. Im Allgemeinen wird für die Wahl von  $R$  die FWHM der PSF in Einheiten von Pixeln empfohlen. Dies stellt ein Maß für die Auflösung des Bildes dar. Die Empfehlung rührt daher, dass in der Fluoreszenzmikroskopie häufig Strukturen betrachtet werden, deren Größe nahe der Auflösungsgrenze liegt. Wenn dies nicht der Fall ist, kann  $R$  jedoch auch größer gewählt werden, sodass niedrigere Raumfrequenzen nicht fälschlicherweise dem Hintergrund zugeteilt werden. Nachdem das Eingangsbild zerlegt wurde, wird ein Hintergrundbild erzeugt, welches nur niedrige Raumfrequenzen enthält, indem die Detailkoeffizienten in allen Leveln auf Null gesetzt werden und schließlich die inverse Wavelet-Transformation berechnet wird. Dieses Hintergrundbild enthält jedoch unphysikalische Unstetigkeiten und wird daher mit einem Gauß-Filter mit Standardabweichung  $\sigma = 2^m$  geglättet (entsprechend des charakteristischen Längenmaßes des Hintergrundes). Es kann dann vom ursprünglichen Eingangsbild subtrahiert werden. Zur Rauschkorrektur werden die Detailkoeffizienten des ersten Levels der Zerlegung verwendet. Sie enthalten die hochfrequenten Komponenten, die im Wesentlichen vom Detektorrauschen stammen. Für Bilder mit niedriger Auflösung bzw. sehr hoher Abtastung können jedoch auch weitere, tiefere Level miteinbezogen werden. Indem die Approximationskoeffizienten auf Eins gesetzt werden und die Rücktransformation durchgeführt wird, entsteht ein Bild, welches nur das hochfrequente Rauschen enthält und wiederum von dem hintergrundkorrigierten Eingangsbild abgezogen werden kann. Abbildung 5.1 c zeigt das Verfahren exemplarisch für zwei Level. Zur Veranschaulichung der einzelnen Schritte sind in Abbildung 5.1 d-i die jeweiligen vergrößerten Bildausschnitte dargestellt. Ein ausführlicheres und detailliertes Flussdiagramm des WBNS Algorithmus ist in Abbildung 5.2 gezeigt.

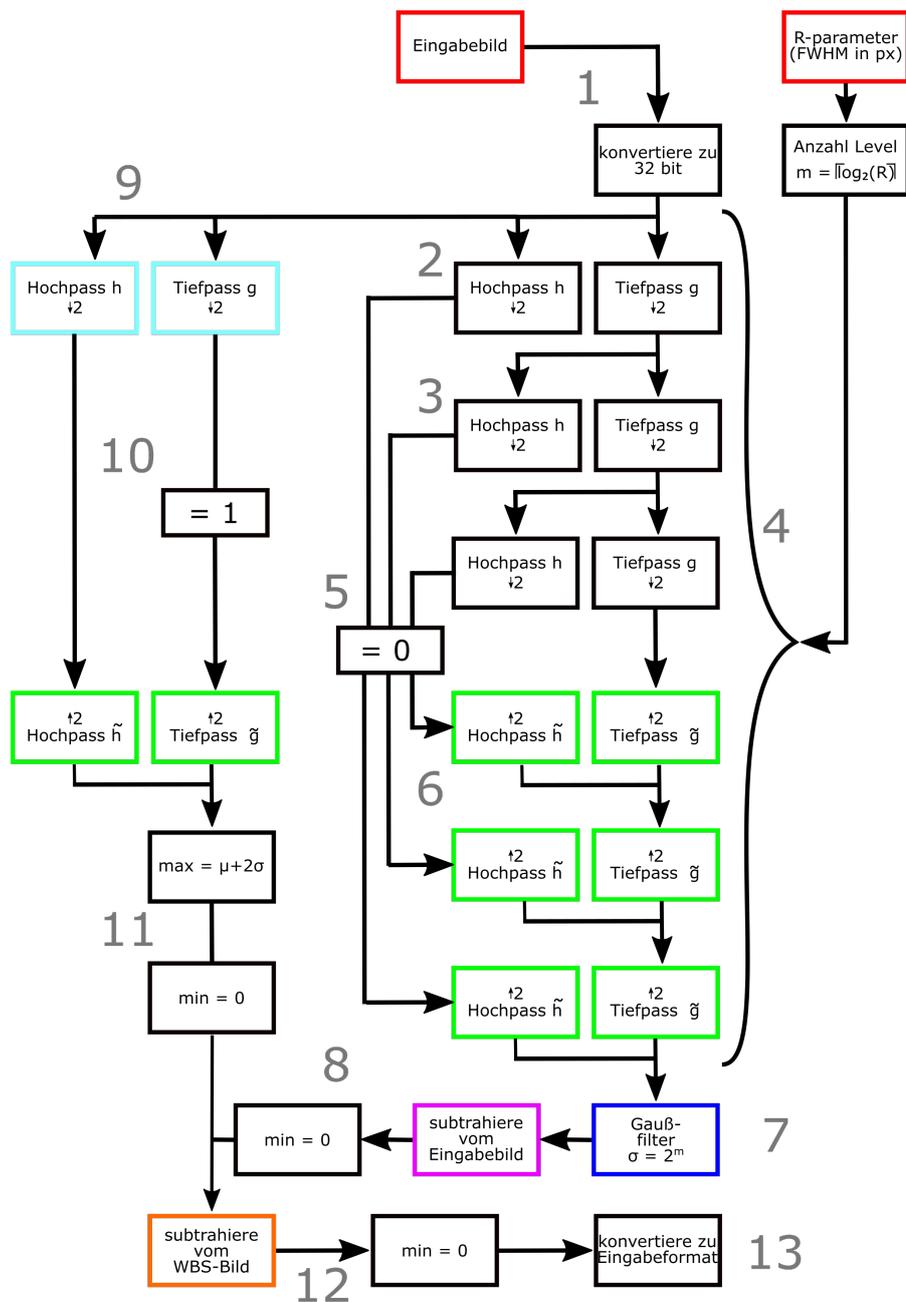


Abbildung 5.2.: Flussdiagramm des WBS/WBNS Algorithmus. Übernommen aus [66].

Die folgende Auflistung erklärt nochmals, passend zu Abbildung 5.2 und Schritt für Schritt, die Funktionsweise der Methode:

1. Das Eingabebild wird eingelesen und auf einfache Genauigkeit (32-bit) konvertiert. Für 3D Stapel werden die einzelnen Scheiben separat prozessiert. Es wird der R-Parameter (FWHM der PSF in Pixeln) sowie ggf. die Anzahl der Level, welche als Rauschen behandelt werden, vom Nutzer abgefragt.

2. Das Bild wird mittels der diskreten Haar-Wavelet-Transformation zerlegt. Die Anwendung eines durch das Haar-Wavelet definierten Hochpassfilters mit anschließender Unterabtastung (Faktor 2) liefert die sog. Detailkoeffizienten des ersten Levels, welche die hohen Frequenzanteile repräsentieren. Durch einen entsprechenden Tiefpassfilter mit Unterabtastung (Faktor 2) erhält man die sog. Approximationskoeffizienten.
3. Details und Approximation des zweiten Levels ergeben sich aus wiederholter Anwendung des Verfahrens auf die Approximation des ersten Levels.
4. Dieser Prozess kann iterativ  $\log_2(n)$  mal (gerundet auf die nächstkleinere Ganzzahl) wiederholt werden, wobei  $n$  die Breite/Höhe des Eingabebildes in Pixeln darstellt. Nach  $\log_2(R)$  (gerundet auf die nächstgrößere Ganzzahl) Wiederholungen liegt das Frequenzband der Details im Bereich des Fluoreszenzsignals, und der Prozess wird abgebrochen.
5. Werden nun alle Detailkoeffizienten auf 0 gesetzt, verbleiben für die folgende Rekonstruktion nur die niederfrequenten Anteile der letzten Approximation.
6. Das niederfrequente Hintergrundbild wird anhand der modifizierten Koeffizienten rekonstruiert. Dies geschieht unter Umkehr der Zerlegung, also der Anwendung der entsprechenden konjugierten Filter auf die Koeffizienten.
7. Um unphysikalische Diskontinuitäten, welche durch das Haar-Wavelet entstehen, zu glätten, wird ein Gaußfilter mit einer Standardabweichung von  $2^m$  auf die Rekonstruktion angewendet.  $m$  stellt dabei die Anzahl der verwendeten Level dar.
8. Der so extrahierte Hintergrund wird vom Eingabebild subtrahiert. Pixel mit negativen Intensitätswerten, welche aufgrund des Gaußfilters auftreten können, werden auf 0 gesetzt.
9. Die Koeffizienten des ersten Levels (Schritt 2) werden zur Rekonstruktion des hochfrequenten Rauschens benutzt.
10. Die Approximationskoeffizienten des ersten Levels werden auf 1 gesetzt, was einen flachen Hintergrund generiert. Die Rekonstruktion enthält damit nur Frequenzen, die einer charakteristischen Länge kleiner der PSF entsprechen.
11. Um mögliche Ausreißer, welche in hellen Regionen des Bildes auftreten können, zu korrigieren, werden Pixel, deren Intensität um mehr als zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert liegt, auf diese Schwelle herabgesetzt. Negative Einträge werden auf 0 gesetzt.
12. Das Rauschen wird vom hintergrundkorrigierten Bild subtrahiert. Eventuelle negative Werte werden auf 0 gesetzt.
13. Bevor das Ergebnis ausgegeben wird, werden die Intensitätswerte wieder auf die Genauigkeit des Eingabebildes zurückkonvertiert.

Natürlich stellt sich hier die Frage, weshalb das Haar-Wavelet zur Transformation benutzt wurde. Schließlich existiert eine große Zahl an verschiedenen Wavelets, und darüber hinaus wurde die Wavelet-Transformation selbst bereits weiterentwickelt. So gehen beispielsweise Curvelets oder Contourlets besser mit scharfen Kanten oder Rundungen um und eignen sich daher hervorragend für Bilder mit sehr hoher Abtastung, wie beispielsweise Photographien [116, 117]. Bei biologischen Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie ist das normalerweise nicht der Fall. Überabtastung wird in der Regel vermieden, da es das Signal-Rausch-Verhältnis absenkt. Das Haar-Wavelet wiederum bietet einen kleinen

„Support“ von nur 2 Pixeln, wodurch sich die typischen Längenskalen des Rauschens (ein oder zwei Pixel) von denen des Signals (3-5 Pixel, als Kompromiss zwischen Auflösung und Signal-Rausch-Verhältnis) und denen des Hintergrundes (mehr als 5 Pixel) gut auftrennen lassen. Weitere Vorteile der Haar-Wavelets sind seine konzeptionelle Einfachheit, die geringe Rechenlast sowie seine Speichereffizienz.

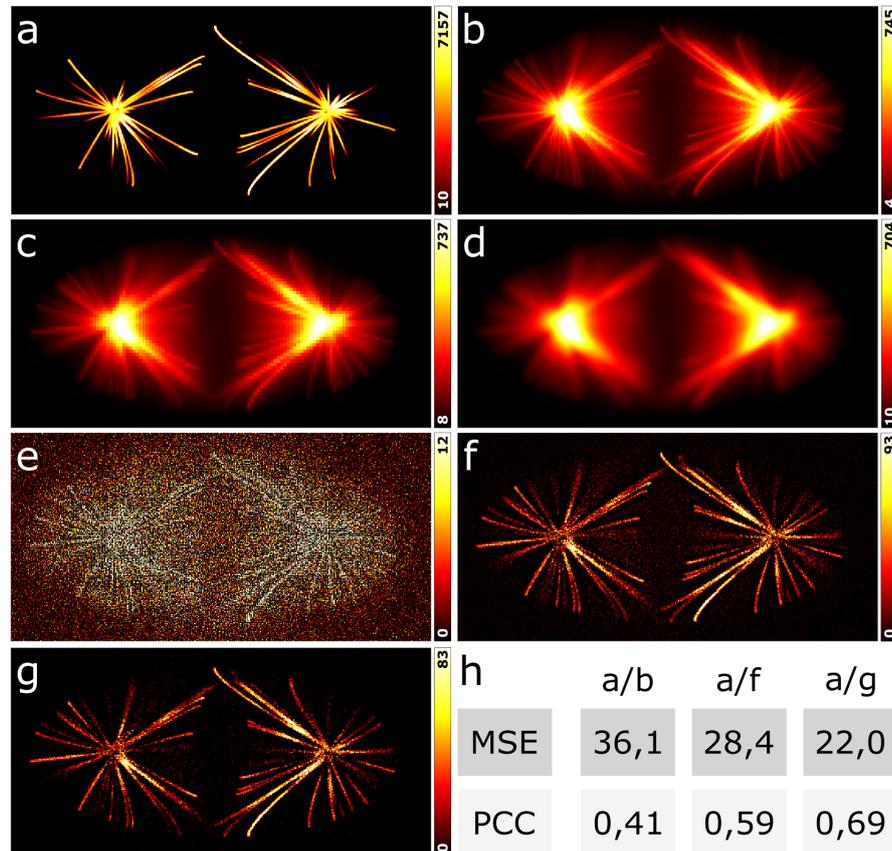
Der WBNS Algorithmus wurde in Python 3.7 mithilfe des lizenzfreien Pakets „PyWavelets“ implementiert [118]. Außerdem wurde ein anwendungsfreundlicher ImageJ-Makro sowie eine MATLAB-Funktion in MATLAB R2019b (The MathWorks, Natick, MA) erstellt. Die Implementierungen sind frei verfügbar unter Referenz [119].

### 5.2. Analyse anhand synthetischer Daten

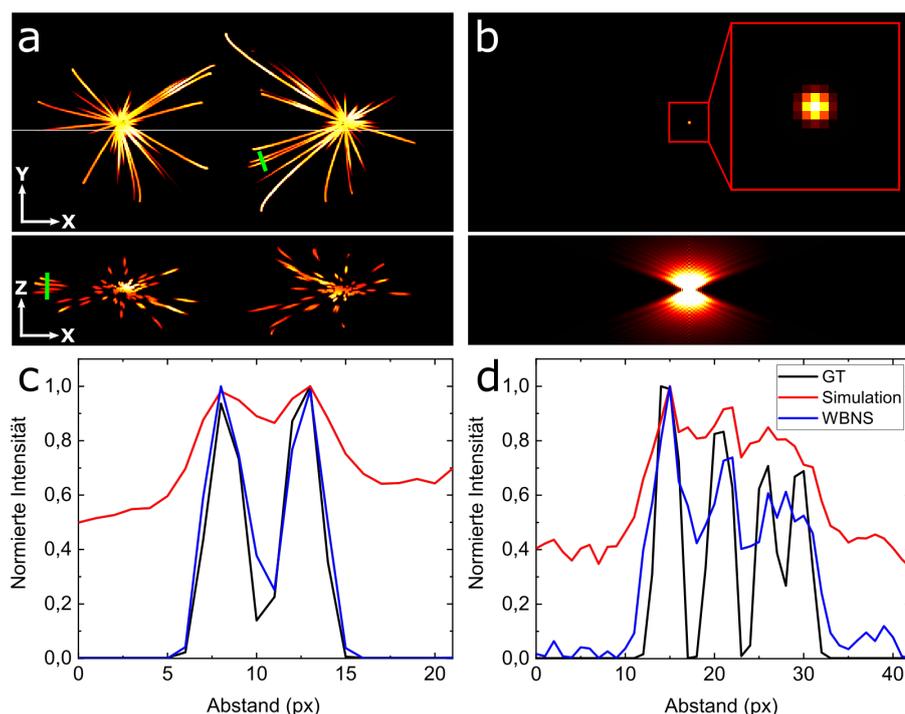
Zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Algorithmen bieten sich im Allgemeinen synthetische Daten an. Dies hat den einfachen Vorteil, dass ein Ground-Truth existiert, man also vollständige Kenntnis über Eingangs-, Ausgangs- und Zieldaten hat. Es besteht dann die Möglichkeit zur quantitativen Analyse und Verifikation. Auch zur Untersuchung der Wirkweise des WBNS Algorithmus werden synthetische Daten in Form eines 3D Ground-Truth-Bildes ( $512 \times 256 \times 128$  Pixel) verwendet. Der Datensatz soll Mikrotubuli in einer Zelle darstellen und stammt aus Referenz [12]. Eine repräsentative Scheibe aus dem Stapel ist in Abbildung 5.3 a zu sehen. Aus diesem Ground-Truth lässt sich ein Pseudo-Mikroskopie-Bild erzeugen, indem es mit einer realistischen 3D PSF (Abbildung 5.4 b) gefaltet wird. Zusätzlich wird Poisson- und weißes Rauschen hinzugefügt. All dies lässt sich mit der DeconvolutionLab2-Software machen [12]. Die Abbildungen 5.4 c und d lassen den durch die Faltung entstandenen Hintergrund deutlich werden.

Das synthetische Bild wird als Eingabebild genutzt und der WBNS Algorithmus Scheibe für Scheibe darauf angewendet. Der mit  $R = 4$  passend zur verwendeten PSF extrahierte Hintergrund vor und nach Anwendung des Gauß-Filters ist in Abbildung 5.3 c und d gezeigt. Das aus dem ersten Level der Zerlegung extrahierte Rauschen ist in Abbildung 5.3 e dargestellt. Es ist möglich, dass das rekonstruierte Rauschen negative Intensitätswerte enthält. Dies ist ebenso möglich nach der Subtraktion von Hintergrund bzw. Rauschen, wenn für einzelne Pixel der Hintergrund größer als der ursprüngliche Rohwert der Intensität abgeschätzt wird. Daher werden eventuelle negative Werte auf Null gesetzt. Es hat sich auch gezeigt, dass das Rauschbild teilweise Ausreißer enthält, weshalb die Werte auf ein Maximum von  $\mu + 2\sigma$  (Mittelwert plus 2 Standardabweichungen) festgelegt wird. Das Ergebnis nach Hintergrund und ohne Rauschkorrektur, also das Ergebnis des WBS Algorithmus, ist in Abbildung 5.3 f zu sehen - das Ergebnis mit Rauschkorrektur (WBNS) in Feld g. Es zeigt sich, dass WBS und WBNS die feinen Strukturen des Ground-Truths von dem Hintergrund trennen und freizulegen vermag. Zur quantitativen Analyse wurden die einzelnen 3D Bilder auf dieselbe mittlere Intensität normiert und anschließend der MSE sowie der PCC [27] zwischen dem Ground-Truth, des simulierten Mikroskopiebildes und der Ergebnisse berechnet (Abbildung 5.3 h). Dies offenbart, dass die mit WBS prozessierten Bilder im Vergleich zum unbehandelten Bild, deutlich näher an dem Ground-Truth-Bild

liegen. Die Anwendung von WBNS verstärkt die Ähnlichkeit zwischen Ergebnis und Ground-Truth weiter.



**Abbildung 5.3.:** WBNS Algorithmus angewandt auf simulierte Daten. (a) Einzelne Scheibe aus einem 3D Stapel ( $512 \times 256 \times 128$  Pixel) des Ground-Truths. (b) Dieselbe Scheibe nach Faltung mit einer synthetischen PSF (laterale FWHM = 3 Pixel) und Addition von Gaußschem (Mittelwert  $\mu = 0$ , Standardabweichung  $\sigma = 1$ ) und Poissonschem (Mittelwert  $\lambda = 1$ ) Rauschen. (c) Hintergrundabschätzung ( $R = 4$  Pixel) vor und (d) nach Anwendung des Gaußfilters mit  $\sigma = 2^m$ , wobei  $m$  die Anzahl der Level beschreibt. (e) Abschätzung des Rauschens aus dem ersten Level der Zerlegung. (f) Ergebnis nach Anwendung von WBS und (g) WBNS. (h) MSE und PCC berechnet zwischen dem Ground-Truth (a) und dem simulierten Bild (b), nach Anwendung von WBS (f) und WBNS (g). Übernommen aus [66].

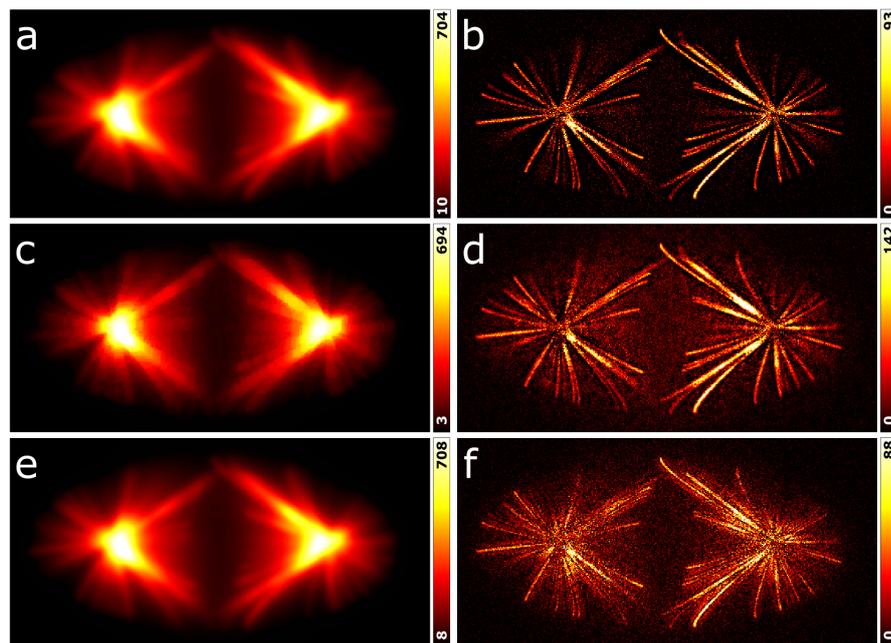


**Abbildung 5.4.:** Erstellung simulierter Daten. (a) Schnitte durch das dreidimensionale Ground Truth; oben: laterale Ansicht; unten: axiale Ansicht als Schnitt durch die weiße Linie (oben). (b) Laterale (oben) und axiale Ansicht (unten) der 3D Weitfeld-PSF, welche zur Faltung des Ground Truth benutzt wurde. Die laterale Ausdehnung der PSF führt mit 3 Pixeln nur zu einer geringen Verbreiterung der gefalteten Strukturen in lateraler Richtung. Jedoch generiert die 3D Faltung einen starken Hintergrund durch Beiträge von außerhalb der Fokalebene. (c) Laterale und (d) axiale Linienprofile entlang der grünen Linien in (a) gemittelt über 5 Pixel und auf das Maximum normiert. Das Ground-Truth (schwarz), das simulierte Bild (rot) und nach Prozessierung mit WBNS (blau). WBNS entfernt zwar effektiv den Hintergrund, führt aber nicht zu einer verbesserten Auflösung im Sinne einer Dekonvolution. Verändert übernommen aus [66].

### 5.3. Vergleich zu Software-basierten Methoden

Das Hintergrundproblem in der Fluoreszenzmikroskopie ist sicherlich kein neuartiges, und so wurden bereits andere Methoden vorgeschlagen diesen rechnerisch aus dem Bild zu entfernen. Von daher ist es interessant, die Ergebnisse des WBS Algorithmus mit jenen zu vergleichen. Hierfür wurden der „Rolling-Ball“-Algorithmus (RBA) [120] und die „Difference of Gaussian“-Methode (DoG) [121] ausgewählt. Beim Rolling-Ball-Algorithmus stellt man sich die Intensitätswerte des Bildes als eine Landschaft vor, in welcher hohe Werte Berge bilden und niedrige Werte entsprechend Täler. Lässt man nun eine Kugel mit definiertem Radius über diese Fläche rollen, so kann diese nicht in die Täler, deren Öffnung kleiner als ihr Durchmesser ist, eindringen. Diese Täler entsprechen dabei dem Signal. Die vom Mittelpunkt der Kugel beschriebene Oberfläche entspricht einer Art

Tiefpass-gelilterter Version des Eingabebildes, welches als Abschätzung des Hintergrundes dient. Der Radius der Kugel muss vom Anwender gewählt werden. Die DoG-Methode schätzt den Hintergrund schlicht dadurch ab, dass das Eingabebild mit einem Gauß-Filter geglättet wird. Das gefilterte Bild wird dann zur Korrektur von dem Eingabebild subtrahiert. Um die drei Methoden zu vergleichen, wurden diese auf das simulierte Mikroskopiebild angewendet. In Abbildung 5.5 werden links die Abschätzungen der Hintergründe und rechts die korrigierten Eingabebilder dargestellt. Da der RBA und die DoG-Methode das Rauschen nicht aus dem Bild entfernen, wurde, um einen fairen Vergleich zu ermöglichen, nur WBS angewandt.



**Abbildung 5.5.:** WBS Algorithmus im Vergleich mit RBA und DoG. (a) Hintergrundabschätzung durch WBS ( $R = 4$  Pixel). (b) Bild nach Korrektur durch WBS. (c) Hintergrundabschätzung durch RBA. (d) Bild nach Korrektur durch RBA (Ballradius 4 Pixel). (e) Hintergrundabschätzung durch DoG. (f) Bild nach Korrektur durch DoG (Standardabweichung 4 Pixel). Übernommen aus [66].

Es zeigt sich, dass alle drei Methoden effektiv den Hintergrund aus dem Bild entfernen. Erst die quantitative Analyse (Tabelle 5.1) mittels Vergleich zum Ground-Truth zeigt, dass WBS besser abschneidet als die beiden anderen Verfahren. Natürlich erreicht man noch bessere Ergebnisse, wenn man die Rauschkorrektur nicht auslässt und WBNS verwendet.

**Tabelle 5.1.:** Vergleich zwischen Ground-Truth und den verschiedenen Software-Methoden anhand von MSE und PCC.

	GT / RBA	GT / DoG	GT / WBS	GT / WBNS
MSE	34,7	34,3	29,6	22,0
PCC	0,50	0,48	0,57	0,69

### 5.4. Vergleich zu Hardware-basierten Methoden

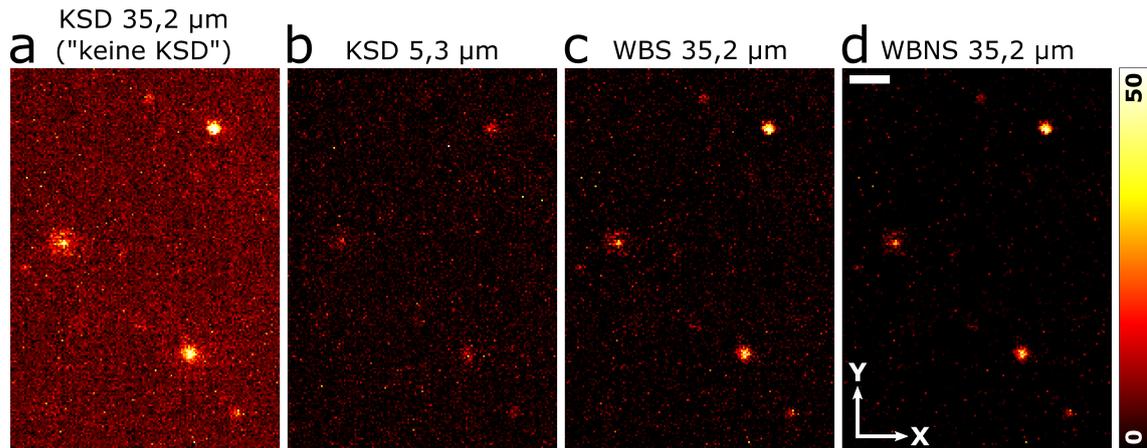
Im vorherigen Abschnitt wurden Methoden zur Hintergrundkorrektur vorgestellt, die auf Grundlage der digitalen Signalverarbeitung beruhen. Es existieren jedoch auch Hardware-basierte Techniken, welche versuchen, die Detektion des Hintergrundes zu vermeiden oder diesen separat zu messen, sodass er später subtrahiert werden kann. Es bietet sich daher an, einen Vergleich zwischen diesen Techniken und dem WBNS Algorithmus anzustellen. Dies soll im Folgenden unternommen werden.

#### 5.4.1. Konfokale Spaltdetektion

In Kapitel 3.1.3 wurde die KSD als ein Hardware-basiertes Verfahren zur Hintergrundunterdrückung eingeführt. Mit dieser Technik sollte der WBNS Algorithmus verglichen werden. Hierzu wurde eine Suspension von 100 nm (Durchmesser) großen, rot-fluoreszierenden Polystyrol-Kügelchen (F8801, FluoSpheres, Invitrogen, Eugene, OR, Anregungs- und Emissionswellenlänge: 580/605 nm) in einem Verhältnis von  $1:10^5$  mit Wasser verdünnt. Die Probe wurde 10 min lang in ein Ultraschallbad getaucht, um eine gleichmäßige Verteilung der Kügelchen zu erreichen. Anschließend wurde mit einer wässrigen Lösung von 1,5% (Massenanteil) Agarose (Type VII, A6560, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) weiter verdünnt, bis die Konzentration der Latex-Kügelchen so gering war, dass diese als getrennte Punkte in den mikroskopischen Aufnahmen erschienen. Nach wiederholtem Eintauchen in das Ultraschallbad für weitere 10 min wurde die Lösung mithilfe einer Spritze in einen Perfluorethylenpropylen-Schlauch (Thomafluid HighTech Tubing, Außen-/Innendurchmesser 1,5/1,1 mm, Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland) gesaugt. Nachdem das Gel abgekühlt und vollständig polymerisiert war, wurde ein Teil (ca. 2 mm) wieder aus dem Schlauch herausgedrückt, sodass dieser Teil ohne etwaige Aberrationen des FEP-Schlauches abgebildet werden kann. Der Schlauch wurde dann auf einem Edelstahlstab montiert und von oben in die mit Wasser gefüllte Probenkammer des Mikroskops eingehängt.

Das verwendete Lichtscheibenmikroskop mit KSD ist detailliert in Kapitel 3 beschrieben. Für die Aufnahmen wurde ein Besselstrahl zur Anregung verwendet und 100 Scheiben mit einer Schrittgröße von 500 nm und einer Bildrate von 10 Hz aufgenommen. Jede Scheibe besteht aus  $2048 \times 2048$  Pixel und deckt ein Beobachtungsfeld von  $176 \mu\text{m} \times 176 \mu\text{m}$  ab. Von jeder Aufnahme wurde ein zuvor ohne Beleuchtung gemessenes Dunkelbild subtrahiert, um den Kamerahintergrund zu korrigieren.

Zunächst wurde ein Bildstapel mit einem sehr breiten Spalt ( $35,2 \mu\text{m}$ ;  $w_{\text{Spalt}} \gg w_{\text{Strahl}}$ ) gemessen, sodass kein konfokaler Effekt auftritt und hinreichend Hintergrund den Kamerasensor erreicht. Der zweite Stapel wurde mit einem schmalen Spalt ( $5,3 \mu\text{m}$ ;  $w_{\text{Spalt}} \approx w_{\text{Strahl}}$ ) aufgenommen, wodurch der Hintergrund unterdrückt wird. Dies zeigt sich deutlich in Abbildung 5.6 a und b. Außerdem wurde der erste Stapel (ohne KSD) mit WBS und WBNS prozessiert, um die Ergebnisse (Abbildung 5.6 c,d) vergleichen zu können. Sowohl KSD als auch WBS/WBNS unterdrücken effektiv den Hintergrund, wobei bei der KSD auch ein Teil des Signals abgeschwächt erscheint.



**Abbildung 5.6.:** WBNS im Vergleich zu KSD. Die Bildausschnitte ( $153 \times 219$  Pixel,  $86 \text{ nm}$  Pixelgröße) zeigen  $100 \text{ nm}$  große, fluoreszierende Nanopartikel eingebettet in Agarosegel. (a) Eine große Spaltbreite ( $35,2 \mu\text{m}$ ) führt zu unzulänglicher Unterdrückung des Hintergrundes. (b) Mit einem kleineren Spalt ( $5,3 \mu\text{m}$ ) kann der Hintergrund effektiv unterdrückt werden. (c) Das Bild aus (a) nach Anwendung von WBS und (d) WBNS ( $R=5,5$  Pixel). Maßstabsleiste  $2 \mu\text{m}$ . Übernommen aus [66].

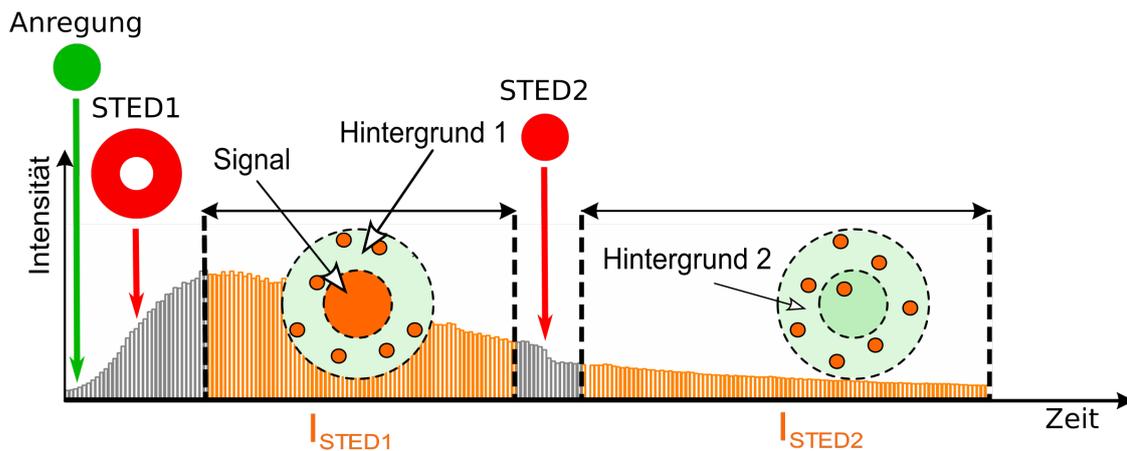
Zur quantitativen Analyse der Messungen wurde die scheinbare Größe der Latex-Kügelchen bestimmt. Diese ist in der Regel größer, wenn Hintergrund und Rauschen im Bild präsent sind. Hierzu wurden lokale Intensitätsmaxima segmentiert und auf Grundlage von Helligkeit und Größe vorsortiert, um Aggregate bzw. Ausreißer im Rauschen auszuschließen. Die Halbwertsbreiten der Intensitätsprofile von ungefähr 70 Kügelchen wurden durch ihr jeweiliges Zentrum entlang aller drei Raumrichtungen bestimmt und in einem kumulativen Histogramm aufgetragen, um den Mittelwert und die Standardabweichung des Ensembles mithilfe einer Anpassung (Gauß-Verteilung) zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 dargestellt. Die Daten zeigen, dass die Ausdehnung der Kügelchen durch KSD zurückgeht. Dies gilt insbesondere für die axiale Richtung mit einer um mehr als 12% reduzierten Halbwertsbreite. Für WBS/WBNS gehen die Werte noch etwas weiter zurück, was auf eine wirkungsvolle Unterdrückung des Hintergrundes schließen lässt.

**Tabelle 5.2.:** Scheinbare räumliche Ausdehnung 100 nm großer, fluoreszierender Kügelchen, gemessen mit zwei verschiedenen Spaltbreiten sowie bei Anwendung von WBS bzw. WBNS. Die letzte Spalte (N) gibt die Anzahl der analysierten Kügelchen an.

	FWHM x / nm	FWHM y / nm	FWHM z / nm	N
Spaltbreite 35,2 $\mu\text{m}$	530 $\pm$ 80	520 $\pm$ 70	2450 $\pm$ 380	77
Spaltbreite 5,3 $\mu\text{m}$	480 $\pm$ 110	500 $\pm$ 120	2150 $\pm$ 560	66
WBS 35,2 $\mu\text{m}$	440 $\pm$ 80	460 $\pm$ 70	2090 $\pm$ 330	63
WBNS 35,2 $\mu\text{m}$	440 $\pm$ 80	460 $\pm$ 70	2040 $\pm$ 340	63

#### 5.4.2. STEDD

Konfokale Mikroskope sind ein fester Bestandteil der modernen Lebenswissenschaften. Manche Fragestellungen, insbesondere auf subzellulärer Ebene, erfordern jedoch Auflösungen, die unterhalb der Beugungsgrenze liegen. Verfahren wie die Elektronen-, Rastertunnel- oder Rasterkraftmikroskopie sind jedoch für In-vivo-Experimente ungeeignet. Lange galt das Beugungslimit als unüberwindbare Hürde, und tatsächlich ist es bis heute gültig. Jedoch wurden in den letzten Jahrzehnten gleich mehrere Techniken entwickelt, welche die Beugungsbegrenzung geschickt umgehen [122]. Eine dieser Methoden ist die STED-Mikroskopie (engl. *stimulated emission depletion*), welche 1994 von Hell und Wichmann vorgeschlagen [123] und etwa später experimentell realisiert wurde [124]. Bei dieser Methode werden die Fluorophore in der Peripherie der Anregung mithilfe eines zweiten Laserpulses durch stimulierte Emission wieder abgeregt, bevor diese über spontane Emission Fluoreszenzlicht emittieren. Die Verbesserung der Auflösung beruht also auf der Verkleinerung des Beobachtungsvolumens. Dies ist auch bei der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) vorteilhaft, einer Methode zur Untersuchung der Diffusionseigenschaften fluoreszierender Teilchen. Hierbei werden die Intensitätsfluktuationen, welche durch Diffusion der Teilchen durch das Beobachtungsvolumen entstehen, mittels Autokorrelation analysiert. Durch ein verkleinertes Beobachtungsvolumen lassen sich auch Lösungen mit höheren Fluorophor-Konzentrationen (wie sie häufig bei biologischen Proben vorkommen) untersuchen [125, 126]. Durch unvollständige Abregung und Wiederanregung (durch den leistungsstarken Abregungspuls) entsteht jedoch Hintergrundfluoreszenz. Diese verringert effektiv das Signal und führt zu einer kleineren relativen Fluktuation der Intensität, was letztlich in einer Überschätzung der Fluorophorkonzentration resultiert [127]. Dies motivierte die Entwicklung der STEDD-Mikroskopie (engl. *stimulated emission double depletion*), deren Funktionsweise in Abbildung 5.7 veranschaulicht wird. Im Vergleich zur herkömmlichen STED-Methode wird nach der Messung des Signals (inkl. Hintergrund) dieses durch einen zweiten Gauß-förmigen Abregungspuls abgeschaltet. Übrig bleibt danach lediglich die Hintergrundfluoreszenz der peripheren Umgebung, welche ebenfalls gemessen und mit einem Gewichtungsfaktor  $\gamma$  zur Korrektur verwendet wird:  $I_{\text{Signal}} = I_{\text{STED1}} - \gamma I_{\text{STED2}}$ . Diese Hintergrundkorrektur lässt sich auf FCS-Messungen und STED-Aufnahmen gleichermaßen anwenden [127]. Insbesondere bei Strukturen mit einer hohen Fluorophordichte hat sich die Methode als nützlich erwiesen [128]. Eine ausführlichere Beschreibung findet sich in Referenz [129].



**Abbildung 5.7.:** Schematische Darstellung der Funktionsweise der STEDD-Mikroskopie. Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität über der Zeit. Auf den Gauß-förmigen Anregungspuls folgt der erste Torus-förmige STED-Puls, welcher effektiv das Beobachtungsvolumen verkleinert. Anschließend wird die Summe aus Signal und Hintergrund 1 gemessen. Der zweite STED-Puls (ebenfalls Gauß-förmig) löscht das Signal aus, sodass anschließend der Hintergrund 2 gemessen werden kann, welcher von der ersten Messung subtrahiert wird. Übernommen aus [130].

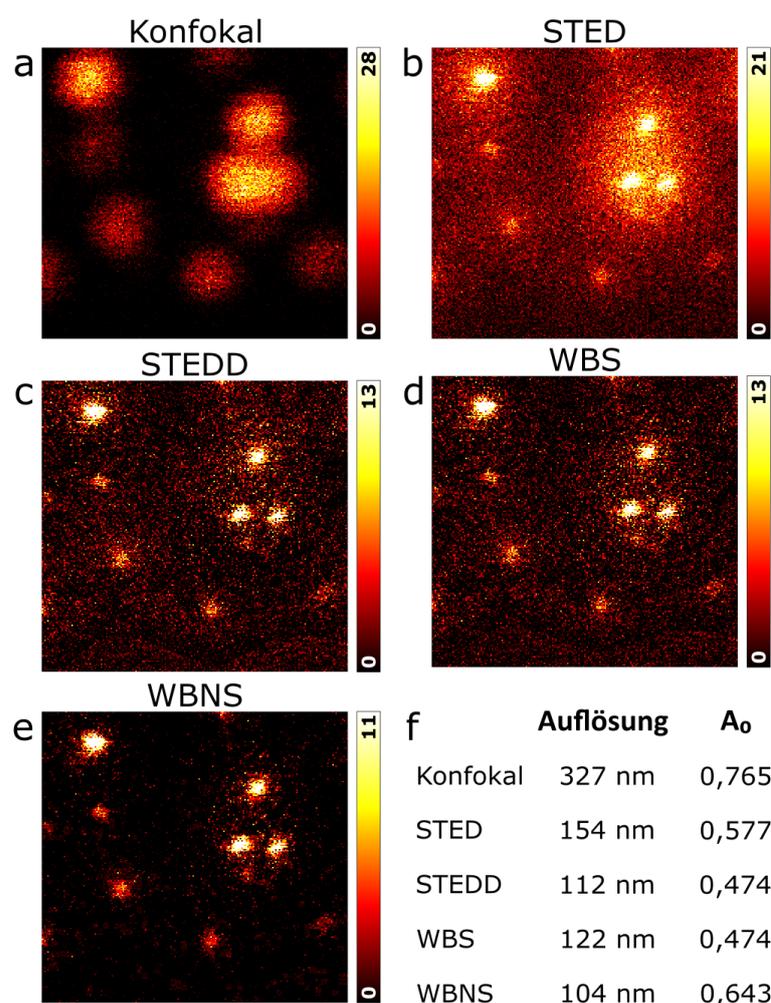
Auch zu dieser Methode bietet sich ein Vergleich des WBNS-Algorithmus an. Hierfür wurde zunächst eine Probe 40 nm (Durchmesser) großer, dunkelrot-fluoreszierender Polystyrol-Kügelchen (F8789, FluoSpheres, Invitrogen, Anregungs- und Emissionsmaxima: 660/680 nm) in einem Kammerobjektträger (Dicke: 0,16 – 0,19 mm) mit acht fest verbauten Kammern (155409, Nunc Lab-Tek II, Thermo Scientific, Waltham, MA) vorbereitet. Die Kammer wurde zunächst 20 min lang mit einer wässrigen Lösung aus  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  Poly-L-Lysin (PLL, P6282, Sigma-Aldrich) inkubiert. Die Beschichtung des Glases mit dem positiv geladenen PLL sorgt für eine Oberfläche, auf der die negativ geladenen (carboxylierten) Polystyrol-Kügelchen gut haften können. Die Ausgangslösung der Polystyrol-Kügelchen wurde um einen Faktor 50.000 in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, 14040091, Thermo Scientific) verdünnt, für 10 min in ein Ultraschallbad getaucht und schließlich in eine Kammer des Objektträgers gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde die Kammer 3-mal mit PBS ausgewaschen, um ungebundene Kügelchen zu entfernen. Abschließend wurde die Kammer mit PBS gefüllt und bei  $4^\circ\text{C}$  bis zur Messung gelagert.

Das verwendete Mikroskop ist im Detail in Referenz [127] beschrieben. Es wurden sowohl konfokale als auch STEDD Bilder ( $604 \times 604$  Pixel,  $30 \mu\text{s}$  und respektive  $100 \mu\text{s}$  Pixelverweilzeit) von der Probe aufgenommen. Zur Fluoreszenzanregung wurde ein Pikosekundenlaser verwendet, welcher Pulse mit einer Wellenlänge von 640 nm, einer Pulsfrequenz von 80 MHz und einer Leistung von  $16 \mu\text{W}$  erzeugt. Für die STEDD-Messung folgen auf die Anregung zwei Abregungs-Pulse: Zum einen der STED-1-Puls mit einer Wellenlänge von 736 nm und einer Leistung von 39 mW, welcher von einem Titan-Saphir-Laser erzeugt wurde und mithilfe einer Phasenmaske in eine Torus-Form gebracht wurde. Zum anderen der Gauß-förmige STED-2-Puls, welcher um 3 ns (gegenüber STED 1) verzögert ist und

eine Leistung von 3,9 mW besitzt.

Praktischerweise lassen sich aus einer STEDD-Messung sowohl ein reguläres STED-Bild, als auch das hintergrundkorrigierte STEDD-Bild erzeugen. Für das STED-Bild wird dabei nur das Zeitintervall zwischen dem STED-1-Puls und dem STED-2-Puls zur Konstruktion des Bildes genutzt. Ein Hintergrundbild wird aus der Messung des Zeitintervalls nach dem STED-2-Puls erstellt, welches zur Korrektur des STED-Bildes verwendet wird. Hierfür wurde ein Gewichtungsfaktor  $\gamma = 2$  verwendet, welcher nach der in Referenz [130] vorgestellten Methode ermittelt wurde. Um das im Hintergrundbild enthaltene Rauschen herauszufiltern, wurde ein Gauß-Filter mit einer Standardabweichung von  $\sigma = 15$  Pixel vor der Subtraktion angewandt.

Die Bildausschnitte in Abbildung 5.8 zeigen die Ergebnisse der Messungen. Die bedeutend bessere Auflösung des STED- bzw. STEDD-Bildes gegenüber der konfokalmikroskopischen Aufnahme ist ebenso deutlich zu erkennen wie die effektive Reduktion des Hintergrundes bei Anwendung der STEDD-Methode (Abbildung 5.8 a-c). Die Ergebnisse nach Anwendung von WBS bzw. WBNS ( $R = 7$ , erstes Level zur Rauschfilterung) auf das STED-Bild sind in Abbildung 5.8 d und e zu sehen. Die Ähnlichkeit zwischen dem mit WBS prozessierten Bild und dem STEDD-Bild ist bemerkenswert. Bei Anwendung von WBNS zeigt sich wenig überraschend eine starke Reduktion des hochfrequenten Rauschens.



**Abbildung 5.8.:** WBNS im Vergleich zu STEDD. Die Bildausschnitte ( $219 \times 210$  Pixel, 10 nm Pixelgröße) zeigen 40 nm große, fluoreszierende Nanopartikel. (a) Konfokalmikroskopische Aufnahme (b) STED-Bild (c) STEDD-Bild (d) Das STED-Bild nach Prozessierung mit WBS ( $R=7$  Pixel) (e) STED-Bild nach Anwendung von WBNS (f) Auflösung und  $A_0$ -Parameter (korreliert mit dem Signal-Rausch-Verhältnis) bestimmt mittels Dekorrelationsanalyse. Übernommen aus [66].

Um auch hier nicht mit einer qualitativen Analyse zu verbleiben, wurde die Auflösung der Bilder mithilfe der Dekorrelationsanalyse bestimmt [131]. Dies ist eine Methode zur Bewertung der Auflösung einzelner Bilder auf der Grundlage der partiellen Phasenaufkorrelation. Ursprünglich für die höchstauflösende Mikroskopie entwickelt, lässt sich die Methode auf eine Vielzahl von Bildgebungsverfahren, einschließlich beugungsbegrenzter Techniken, anwenden. Die Dekorrelationsanalyse schätzt die höchste Frequenz des Bildes mit ausreichend hohem Signal-Rausch-Verhältnis ab, ohne dabei von nutzerdefinierten Parametern oder willkürlich gewähltem Schwellenwert abzuhängen. Das Verfahren besteht im Wesentlichen aus zwei Schritten.

Zuerst wird die Fourier-Transformation des Bildes berechnet, nachdem eine Apodisa-

tion der Kanten durchgeführt wurde, um hochfrequente Artefakte zu vermeiden. Die Fourier-Transformation wird anschließend normiert. Das Eingangsbild wird dann mit seiner normierten Version im Fourier-Raum kreuzkorreliert (PCC), woraus sich ein Wert zwischen 0 und 1 ergibt.

Als zweites wird die Operation wiederholt, jedoch wird die normierte Fourier-Transformation zusätzlich durch eine binäre kreisförmige Maske mit Radius  $r \in [0, 1]$  gefiltert. Durch wiederholte Berechnung erhält man die Dekorrelationsfunktion, eine Funktion des Wertes der Kreuzkorrelation in Abhängigkeit des Radius.

Durch Verringern des Radius der Maske wird mehr und mehr Rauschen entfernt, während das Signal aufgrund seiner begrenzten Frequenz-Bandbreite erhalten bleibt. Würde das Bild nur Rauschen enthalten, fiel die Dekorrelationsfunktion linear mit dem Radius der Maske ab. Enthält das Bild jedoch ein Signal bildet die Funktion ein Maximum aus. Die Position des Maximums  $r_0$  hängt mit der Verteilung der Raumfrequenzen des Eingangsbildes zusammen, während die Amplitude des Maximums  $A_0$  mit dem Signal-Rauschen-Verhältnis desselben korreliert. Es sollte jedoch bemerkt werden, dass nicht abschließend geklärt ist, ob der Parameter  $A_0$  als zuverlässige Metrik dafür dienen kann.

Um schließlich die Auflösung des Bildes abzuschätzen, wird das Eingangsbild dann mehrfach einem Hochpassfiltern (zunehmend starke Filterung) unterzogen, um die Energie der niedrigen Frequenzen zu dämpfen. Für jedes gefilterte Bild wird eine Dekorrelationsfunktion berechnet und die Koordinaten des Maximums extrahiert. Wenn die Hochpassfilterung zu viel Signal entfernt, wird die Dekorrelationsfunktion kein lokales Maximum mehr aufweisen. Das Inverse der Grenzfrequenz des stärksten Filters, welcher noch ein Maximum in der Dekorrelationsfunktion aufweist, gilt als Maß für die Auflösung [131].

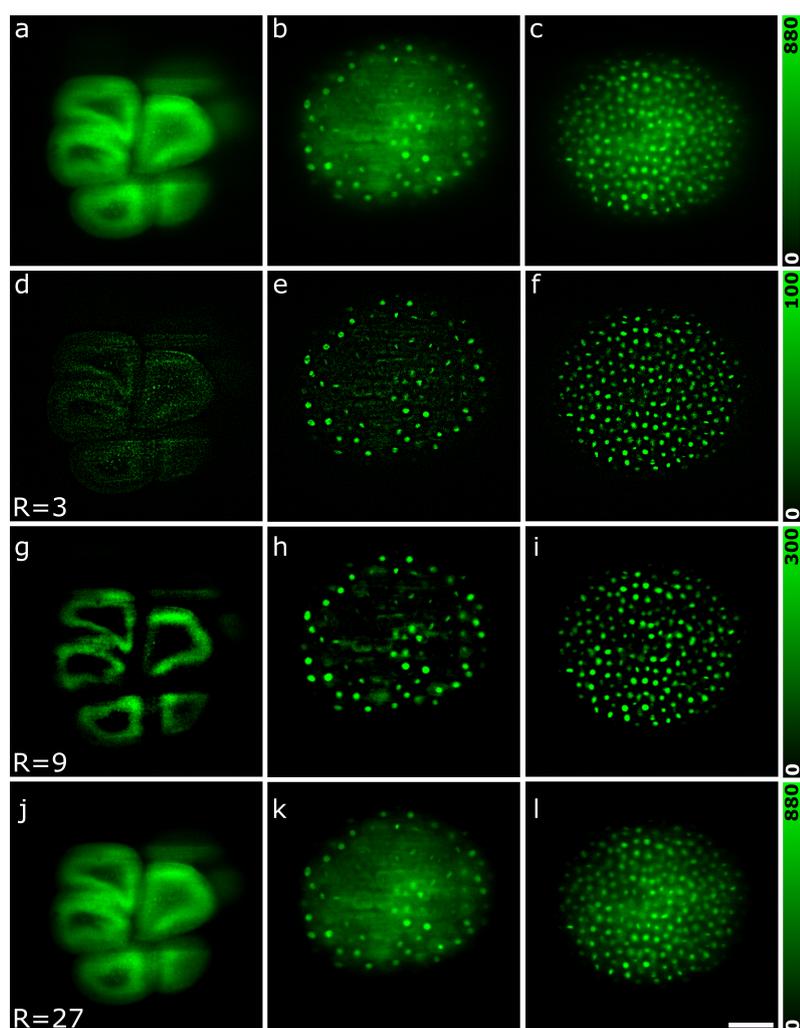
Die Ergebnisse sind in der kleinen Tabelle in Abbildung 5.8 f zusammengefasst. Erwartungsgemäß zeigt sich, dass das STED-Bild gegenüber dem Konfokalbild eine etwa zweimal bessere Auflösung besitzt. Die Anwendung der STEDD-Technik führt zu einer weiteren Verbesserung der ermittelten Auflösung. Dies liegt darin begründet, dass niedrige Raumfrequenzen unterdrückt sind. Nach Anwendung von WBS bzw. WBNS auf das STED-Bild ergeben sich Werte für die Auflösung, welche nahe an denen des STEDD-Bildes liegen.

In der Abfolge Konfokal, STED, STEDD nimmt  $A_0$  ab. Dies ergibt durchaus Sinn, da auch die Anzahl der Photonen in dieser Abfolge abnimmt. Die meisten Photonen werden bei der konfokalmikroskopischen Aufnahme gemessen. Bei STED nimmt die Zahl aufgrund der Fluoreszenzabregung durch stimulierte Emission ab. Dies ist der Preis für die höhere Auflösung. Bei STEDD hat man noch weniger Photonen, da zusätzlich zur Abregung noch der Hintergrund subtrahiert wird. Für STEDD und WBS erhält man (zufälligerweise) genau denselben Zahlenwert für  $A_0$ . WBNS liefert allerdings einen größeren Wert, was zu erwarten war, da das hochfrequente Rauschen gegenüber den anderen Modalitäten reduziert wird. Allgemein zeigt der Vergleich eine große Ähnlichkeit zwischen STEDD und WBS in Bezug auf die erhaltenen Ergebnisse.

## 5.5. Diskussion

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sind durch unerwünschte Beiträge wie Hintergrund und Rauschen mitunter stark beeinträchtigt. Dies erschwert die Interpretation und weitergehende Analysen und kann schlimmstenfalls zu falschen Schlussfolgerungen führen. Aus diesem Grund wurden beträchtliche Anstrengungen unternommen, diese Beiträge zu unterdrücken, sei es durch raffinierte, Hardware-basierte Techniken oder durch die Entwicklung von Algorithmen zur Nachbearbeitung der Bilddaten. In diesem Kapitel wurde ein Algorithmus vorgestellt, welcher auf Grundlage der Wavelet-Transformation die verschiedenen Bestandteile (Hintergrund, Signal, Rauschen) auftrennt. Aus dieser Auftrennung können anschließend zwei Bilder rekonstruiert werden: Zum einen ein Bild, welches nur den niederfrequenten Hintergrund enthält und zum anderen eines, welches nur das hochfrequente Rauschen beinhaltet. Diese können vom Eingangsbild subtrahiert werden, um für die jeweiligen Beiträge zu korrigieren. WBNS nutzt Informationen, welche a priori bekannt sind, um die genannte Auftrennung zu vollziehen. Das Mikroskop selbst wirkt als Tiefpass-Filter, der nur Frequenzen bis zu einer bestimmten Grenze (Beugungslimit) hindurch lässt. Darüberliegende Beiträge müssen also vom Detektorsystem stammen und werden als Rauschen klassifiziert.

In Bezug auf die Hintergrundbeiträge gestaltet sich die Auftrennung etwas schwieriger, da hier keine eindeutige Grenzfrequenz existiert. Meistens betrachtet man jedoch biologische Strukturen, deren Raumfrequenzen innerhalb eines schmalen Frequenzbandes zu finden sind. Zudem besteht oft Interesse an Strukturen, deren Größe nahe an der Auflösungsgrenze des Mikroskops oder gar darunter liegt. Daher empfiehlt es sich häufig, den Parameter  $R$  gleich der Bildauflösung zu wählen. Im Falle, dass deutlich größere Strukturen betrachtet werden, muss der Parameter angepasst werden, wodurch vermieden wird, dass Signalbestandteile dem Hintergrund zugerechnet werden. Dabei muss in Kauf genommen werden, dass die Hintergrundkorrektur nur unvollständig erfolgen kann. Dieser Umstand wird in Abbildung 5.9 illustriert. Dargestellt sind Aufnahmen eines Zebrafisch-Embryos zu verschiedenen Zeitpunkten in seiner frühen Entwicklung. Das Signal ändert dabei seinen charakteristischen Frequenzbereich. Daher wurde WBNS mit verschiedenen gewählten  $R$  angewandt. Es wird anschaulich, dass die Hintergrundkorrektur weniger effektiv ist, wenn man niederfrequente Signale bewahren möchte. Es sollte jedoch nochmals bemerkt werden, dass es sich bei diesem Beispiel um einen sehr speziellen Fall handelt, und dass häufig  $R$  gleich der Auflösungsgrenze gewählt werden kann.



**Abbildung 5.9.:** Variationen des R-Parameters und deren Wirkung auf Abbildungen mit breiter Frequenzverteilung. Dargestellt sind einzelne Scheiben aus einem 3D Stapel. Diese zeigen einen transgenen Zebrafisch-Embryo, welcher ein Fusionsprotein aus Histon H2A und EGFP exprimiert, zu verschiedenen Zeiten seiner Entwicklung. (a) Im 16-Zell-Stadium (ca. 1,5 h nach der Befruchtung) befindet sich das Fusionsprotein im Zellplasma. (b) Zwischen dem 256-Zell-Stadium und dem 1024-Zell-Stadium (ca. 2 h nach der Befruchtung) wandert es in die Zellkerne, wo es (c) fortan (2,9 h nach der Befruchtung) größtenteils verbleibt. (d,e,f) Bilder der oberen Reihe prozessiert mit WBNS ( $R = 3$ ). Niederfrequente Strukturen (d) werden entfernt. (g,h,i) Bilder der oberen Reihe prozessiert mit WBNS ( $R = 9$ ). Die Grenze zwischen Signal und Hintergrund liegt bei niedrigeren Frequenzen, woraus eine korrekte Trennung folgt. (j,k,l) Bilder der oberen Reihe prozessiert mit WBNS ( $R = 27$ ). Niederfrequente Strukturen bleiben zwar erhalten, aber eine effektive Entfernung des Hintergrundes ist nicht mehr möglich. Maßstabsleiste 100  $\mu\text{m}$ . Übernommen aus [66].

Während der letzten Jahre haben sogenannte Deep-Learning-Algorithmen große Popularität erreicht. Auch im Bereich der Bildbearbeitung und Wiederherstellung, einschließlich der Hintergrundkorrektur, finden solche Algorithmen Anwendung [132–135]. Diese

Algorithmen erfordern Training mit geeigneten, meist großen Bilddatensätzen, welche die gewünschten Strukturen enthalten. Dabei kann es sich um echte Mikroskopiedaten oder synthetische Datensätze handeln [133]. Die Leistungsfähigkeit eines Deep-Learning-Algorithmus hängt stark von der Qualität der Trainingsdaten ab. Einmal trainiert arbeiten die abgeleiteten Modelle schnell und effizient. Wird jedoch eine Problemstellung vorgelegt, die von den Trainingsdaten abweicht, so scheitern diese Algorithmen teilweise oder total. WBNS hat als klassischer Algorithmus höhere Ansprüche auf Allgemeingültigkeit. Es ist ein konzeptionell einfacher, wenngleich effektiver Algorithmus, dessen Wirkweise vollständig nachvollzogen werden kann, was ein klarer Vorteil gegenüber Deep-Learning-Ansätzen ist.

Der Vergleich mit Software- und Hardware-basierten Methoden liefert gute Indizien für die breite Anwendbarkeit von WBNS. Hardware-basierte Techniken haben zwar den Vorteil, dass sie keine Nachbearbeitung der Daten erfordern. Demgegenüber steht bei Software-Methoden wie WBNS, dass diese auch auf bereits gemessene Daten angewandt werden können und eine Neuauswertung ermöglichen.

Es sei auch erwähnt, dass WBNS, anders als beispielsweise Dekonvolutionsalgorithmen, nicht energierhaltend ist. Die Intensität des Bildes (und damit die Gesamtenergie) wird durch die Subtraktion von Hintergrund und Rauschen deutlich verringert. Dies ist im Wesentlichen unproblematisch, sollte jedoch bedacht werden, wenn man WBNS mit anderen Verfahren kombinieren möchte.

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel ein Algorithmus zur Hintergrund- und Rauschkorrektur von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen verschiedener Modalitäten vorgestellt. Die Leistungsfähigkeit des WBNS-Algorithmus wurde anhand synthetischer Daten sowie im Vergleich mit etablierten Software- und Hardware-basierten Verfahren erprobt. Die Software ist einfach anzuwenden und verlangt nur einen benutzerdefinierten Parameter. Mittlerweile hat WBNS auch Anwendung in weiteren Arbeiten gefunden. So entfernten Riegerova et al. [136] mithilfe von WBNS intrazelluläres Signal bei der Quantifizierung des membrangebundenen Amyloid- $\beta$ -Precursor-Proteins. Akalestou-Clocher et al. [137] verwendeten WBNS im Rahmen einer Software zur Objekt-basierten Kolokalisation fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen.



## 6. 2D+1D Approximation für Multi-view-Dekonvolution

Multi-view Dekonvolution ist ein Verfahren zur Fusion mehrerer Bilder, welche alle dasselbe Objekt zeigen, jedoch aus verschiedenen Blickwinkeln aufgenommen wurden mit dem Ziel isotroper Auflösung und verbessertem, homogenem Kontrast. Hauptsächlich findet es Anwendung in der Lichtscheibenmikroskopie, ist aber nicht zwangsläufig darauf beschränkt. Auch wenn das Verfahren gute Ergebnisse liefert, so nehmen die aufwändigen Rechenoperationen trotz leistungsfähiger Hardware viel Zeit in Anspruch. Im Folgenden wird eine Approximation einer dreidimensionalen Multi-view Dekonvolution vorgestellt, welche die Rotationssymmetrie der Punktspreizfunktion ausnutzt. Dabei arbeitet der Algorithmus zunächst nur in zwei Dimensionen senkrecht zur Rotationsachse und anschließend in einer Dimension parallel zu dieser. Das Verfahren wurde an synthetischen und realen Bilddaten erprobt und charakterisiert.

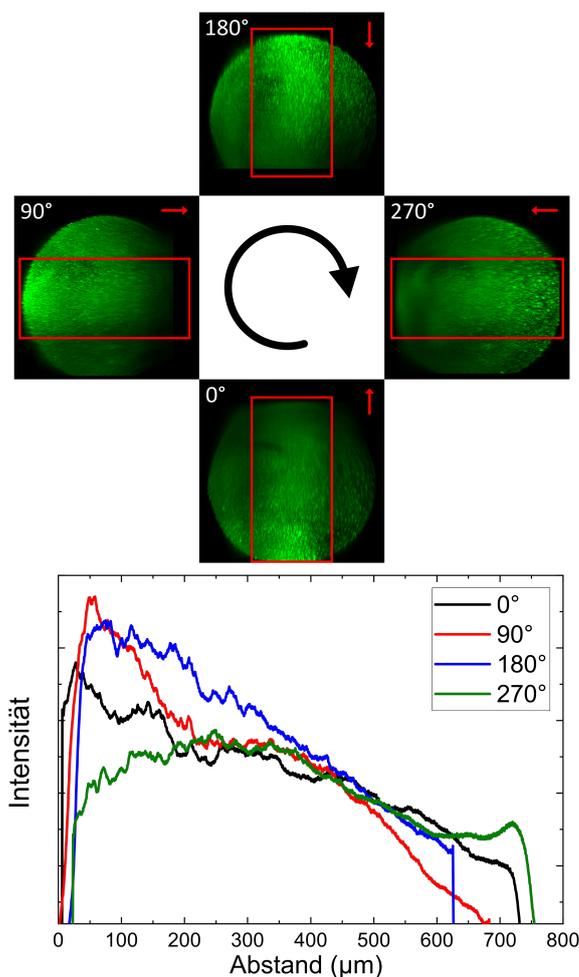
Die in diesem Kapitel vorgestellte Arbeit wurde bereits in einer Fachzeitschrift veröffentlicht [138]. Die Ko-Autoren haben folgende Beiträge geleistet: Manuel F. Merino schrieb einige der Matlab-Funktionen und gab hilfreiche Diskussionsbeiträge. Johannes Bennemann unterstützte bei der Programmierung. Takamiya Masanari und Sepand Rastegar stellten die Zebraabärling-Embryonen zur Verfügung. Anja Tursch und Thomas Holstein stellten die Hydren zur Verfügung. G. Ulrich Nienhaus hat die Arbeit betreut und zur Konzeption, Diskussion und Interpretation der Ergebnisse sowie der Textgestaltung beigetragen.

### 6.1. Problemstellung

Innerhalb der vergangen drei Jahrzehnte hat die Lichtscheibenmikroskopie eine große Blüte erlebt. Sie ist das Mittel der Wahl, wenn es darum geht, dreidimensionale Aufnahmen von sich entwickelnden Organismen über lange Zeiträume hinweg mit guter räumlicher und zeitlicher Auflösung zu erstellen [113, 139, 140]. Die charakteristische, zueinander senkrechte Anordnung von Beleuchtungs- und Detektionspfad erlaubt eine selektive Anregung der Fluorophore [36, 37], was zu reduzierter Photobleichung und Phototoxizität führt. Dies ist der Hauptvorteil verglichen mit anderen fluoreszenzmikroskopischen Verfahren.

Wie bereits in Kapitel 2.5 angesprochen, weisen die Rohdaten zweierlei Mängel auf: Zum einen ist die Auflösung entlang der optischen Achse der Detektion bis zu dreimal niedriger als senkrecht zu dieser. Die außerordentliche Achse fällt insbesondere bei der Betrachtung von Renderings unangenehm auf. Zum anderen führen Streuung und Absorption, sowohl in Beleuchtungs- als auch im Detektionspfad zu Inhomogenitäten in Bezug auf Intensität,

Kontrast und Auflösung [35]. Vor allem in tieferen Schichten wird das Problem dominant. Ein Beispiel für dieses Phänomen ist in Abbildung 6.1 gegeben. Daran wird deutlich, wie schwerwiegend das Problem tatsächlich ist: Die Intensität reduziert sich auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes.



**Abbildung 6.1.:** Abschwächung der Intensität in einem Multi-view-Datensatz. Zu sehen ist ein sich entwickelnder Embryo eines Zebraabälblings bei circa 100% Umwachsung des Dotters. In diesem Stadium ist die Zelldichte auf dem kugelförmigen Dotter weitestgehend homogen. Oben: Maximumintensitätsprojektionen entlang der Rotationsachse der vier Ansichten. Die Abschwächung der Intensität lässt sich bereits deutlich an den Bildern erkennen. Unten: Gemittelte Intensität innerhalb der roten Rechtecke als Funktion des Abstandes zur Probenoberfläche. Die Richtung zunehmender Probtiefe wird durch die roten Pfeile angegeben. Übernommen aus [138].

Um dieses Problem zu lösen, wurden verschiedene Techniken entwickelt. Dazu zählen ausgeklügelte Strahlformen und beidseitige Beleuchtung [69, 85, 88, 105] ebenso wie Methoden der digitalen Bildverarbeitung: Dekonvolution, Multi-view Fusion und Multi-view Dekonvolution (MVD) [20, 47, 48]. Die Methoden werden primär in der Lichtscheibenmi-

kroskopie angewandt, können jedoch auch auf Daten anderer Mikroskopiertechniken wie beispielsweise Multiphotonenmikroskopie angewandt werden [141].

Entsprechende Mikroskope sind meist so konstruiert, dass die Probe in einer Art Rotor eingespannt wird, sodass diese rasch aus unterschiedlichen Winkeln abgebildet werden kann. Dies ist wichtig, um strukturelle Veränderungen (z.B. Zellteilung/-migration) zwischen zwei Aufnahmen zu minimieren. Die Aufnahmen sind dabei, obwohl sie dasselbe Objekt zeigen, in keinsten Weise redundant: Eine Rotation um beispielsweise  $90^\circ$  führt zu einer Permutation der Achsen, wodurch benachbarte Strukturen, die vormals in axialer Richtung schlecht aufgelöst waren, nun besser voneinander unterschieden werden können. Außerdem sind manche Teile der Probe aufgrund starker Streuung und Absorption in einer Aufnahme überhaupt nicht zu sehen, während sie nach der Rotation deutlich zu erkennen sind.

Zur Fusion der einzelnen Aufnahmen wird ein Algorithmus verwendet, der ein Ausgabebild mit maximalem Informationsgehalt, also optimalem Kontrast und isotroper, bestmöglicher Auflösung produziert. MVD ist eine besonders elegante Methode, um eine solche Fusion zu bewerkstelligen. Häufig wird sie auf Grundlage des Richardson-Lucy-Algorithmus [24, 25] aufgebaut und berücksichtigt alle Einzelaufnahmen mit ihren jeweiligen Punktspreizfunktionen. Bemerkenswert ist dabei, dass das mathematisch inkorrekt gestellte Problem der Dekonvolution durch die Verfügbarkeit mehrerer Aufnahmen desselben Objekts an Eindeutigkeit gewinnt.

Die hierfür notwendigen Rechenoperationen sind jedoch komplex und sehr zeitaufwendig. Dies gilt insbesondere, wenn Langzeitmessungen bei entwicklungsbiologischen Fragestellungen durchgeführt werden, da hierbei beachtliche Datenmengen (von bis zu mehreren Terabyte pro Stunde) generiert werden können. Es ist daher von großer Wichtigkeit, die Prozessierung solcher Datenmengen maximal zu beschleunigen. Hierzu wurden auch bereits einige Anstrengungen unternommen. So erzielten Guo et al. [142] Beschleunigungen durch Manipulationen der Punktspreizfunktion im Dekonvolutionsalgorithmus, Nutzung von Grafikkarten sowie maschinelles Lernen.

Eine Möglichkeit hierzu besteht darin, die MVD nur in zwei Dimensionen (2D) wirken zu lassen, wodurch der Rechenaufwand deutlich reduziert wird [49]. Die Vernachlässigung einer Dimension führt aber unausweichlich zu Qualitätseinbußen beim Ergebnis. Im Folgenden wird eine Approximation der 3D MVD vorgestellt, womit sich große Datensätze schnell und effizient prozessieren lassen. Gleichzeitig führt diese Approximation zu einer deutlichen Verbesserung der Qualität gegenüber dem reinen 2D Ansatz. Auf diesem aufbauend wird eine zusätzliche eindimensionale (1D) Dekonvolution entlang der Rotationsachse durchgeführt, welche einen äußerst geringen Rechenaufwand erfordert. Das Verfahren wird daher „2D+1D MVD“ genannt.

## 6.2. Fusion mittels 2D+1D Multi-view-Dekonvolution

Multi-view-Datensätze bestehen aus einer kleinen Zahl von Bildern derselben Probe, die aus unterschiedlichen Winkeln aufgenommen wurden. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Ansichten bezüglich des Bildinhaltes und der Auflösung (Abbildung 6.2 a). Die Anzahl der Ansichten stellt einen Kompromiss zwischen Bildqualität, Messdauer,

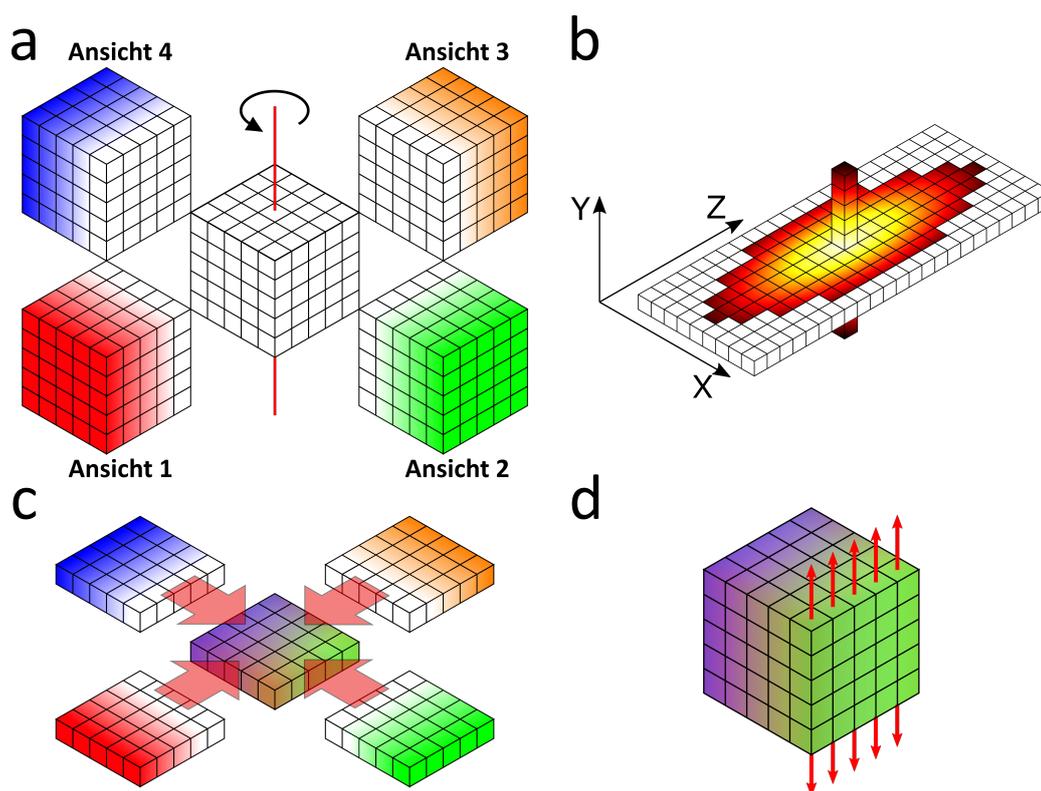
Datengröße und Rechenzeit dar. Werden beispielsweise nur zwei Ansichten ( $0^\circ$  und  $180^\circ$ ) gewählt, so kann die schlechtere Auflösung entlang der optischen Achse (die ja für beide Ansichten zusammenfällt) nicht durch die Fusion kompensiert werden. Hierfür müssen andere Winkel oder eine größere Zahl an Ansichten gewählt werden. Werden jedoch mehr und mehr Ansichten gewählt, steigen der Mess- und Rechenaufwand, während die einzelnen Ansichten an Redundanz gewinnen und keine weitere Verbesserung der Bildqualität erreicht werden kann. Für diese Arbeit wurden vier Ansichten gewählt, da so alle Teile der Probe in mindestens zwei (um  $90^\circ$  rotierten) Aufnahmen erscheinen.

Nach der Messung werden die Bilder zunächst auf isotrope Pixelgrößen entlang der Detektionsachse interpoliert, um sie für die Registrierung vorzubereiten. Diese sorgt dafür, dass kleinste Fehler bei der Probenpositionierung ausgeglichen werden und alle Ansichten in ein gemeinsames Koordinatensystem eingebettet werden. Dies ist ein wichtiger Schritt, da Fehler bei der Registrierung zu Artefakten in der Fusion (Doppeldarstellungen, Verzerrungen) führen. In dieser Arbeit wird ein eigens implementierter, evolutionärer Suchalgorithmus [143] genutzt, um die affine Transformation jeder Ansicht zu finden, die zu dem bestmöglichen Überlapp zwischen den abgebildeten Strukturen führt. Für eine genauere Beschreibung sei auf Kapitel 3.3 verwiesen. Der Algorithmus dient zur Automatisierung der Registrierung. Die Resultate werden dennoch vorsichtig überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Zur MVD wird eine 3D PSF benötigt. Hier wird angenommen, dass diese für alle Ansichten konstant ist, was in der Praxis meist eine Approximation darstellt. Die PSF wird bei der 2D+1D MVD durch eine 2D PSF senkrecht zur Rotationsachse und eine 1D PSF parallel zu dieser angenähert (Abbildung 6.2 b). Die 1D PSF ist dabei durch die Intensitätsverteilung entlang der zentralen Linie (bzw. der Rotationsachse) der 3D PSF gegeben. Da die MVD nur in 2D durchgeführt wird, verringert sich der Rechenaufwand gegenüber 3D und führt zu kürzeren Rechenzeiten.

MVD zielt auf gute isotrope Auflösung und höchstmöglichen Kontrast ab. Die Bildqualität einer Struktur variiert mitunter stark zwischen den verschiedenen Ansichten. Im Fusionsprozess sollte darauf geachtet werden, dass Ansichten mit schlechter Qualität keinen negativen Einfluss auf das Gesamtergebnis haben. Aus diesem Grund werden die Ansichten bei der Fusion in jedem Pixel bezüglich ihrer Qualität gewichtet. Als Metrik dient die lokale Entropie als Maß für den lokalen Kontrast [46]. Somit tragen Pixel aus Bereichen mit hohem Kontrast stärker zum Endergebnis bei als solche mit geringerem. Detaillierte Informationen dazu folgen weiter unten.

Nachdem die 2D MVD erfolgt ist (Abbildung 6.2 c), erhält man ein Bild mit nahezu isotroper Auflösung. Bei der Abbildung im Mikroskop wurden die Strukturen jedoch mit einer 3D PSF gefaltet, wodurch die Intensität auch entlang der dritten Dimension umverteilt wurde. Entlang ebendieser Achse wirkt daher nachfolgend die 1D Dekonvolution (Abbildung 6.2 d) und korrigiert diese Umverteilung.



**Abbildung 6.2.:** Schema der Datenverarbeitung bei 2D+1D MVD. (a) Aufnahme eines Multi-view Datensatzes. Die Probe wird aus mehreren (hier vier) Winkeln nach schrittweiser Rotation um die vertikale Achse (rote Linie). Licht aus den Bereichen nahe der Kamera ist weniger von Streuung und Absorption betroffen (angedeutet durch die Farbintensität). Die Auflösung entlang der Detektionsachse ist in jeder Aufnahme schlechter als in lateraler Richtung. Die Bilder werden in axialer Richtung interpoliert, um isotrope Pixelgrößen zu erhalten. (b) Die 3D PSF wird durch eine horizontale 2D PSF und eine zur Rotationsachse parallele 1D PSF approximiert. (c) Die 2D MVD wird schichtenweise, von oben nach unten, auf den Datensatz angewandt. (d) Abschließend wird die 1D Dekonvolution durchgeführt (rote Pfeile). Übernommen aus [138].

Der 2D+1D MVD Algorithmus wurde in MATLAB 2020b (The MathWorks, Natick, MA) implementiert. MATLAB bietet den komfortablen Vorteil, dass bestimmte Funktionen (inkl. der schnellen Fouriertransformation) auf die Programmierschnittstelle CUDA (engl. *Compute Unified Device Architecture*) von Nvidia zugreifen können, ohne dass CUDA-Code geschrieben werden muss. Dadurch lassen sich parallelisierbare Rechnungen auch tatsächlich parallel auf Grafikkarten ausführen, was zu einer entscheidenden Verkürzung der Rechenzeit führt. Dies ist für die MVD besonders wichtig, da sie auf dem Dekonvolutionsalgorithmus von Richardson und Lucy aufbaut [24, 25]. Eine Iteration lässt sich, wie in Gleichung 2.9 angegeben, schreiben. Für eine Iteration der MVD wird reihum je einmal über alle Ansichten iteriert, sodass bei vier Ansichten bereits 8 Faltungen berechnet werden müssen, wobei zumeist eine Iteration nicht genügt, um ein akzeptables Resultat zu generieren. Die geschickte Implementierung der Faltungen als Multiplikationen im Fourierraum gepaart mit der parallelisierten Arbeitsweise der Grafikkarte ermöglicht

äußerst schnelle Berechnungen. Die Berechnungen für diese Arbeit wurden an einem Rechner mit guter Hardwareausstattung durchgeführt (Intel Core i7-8700K 3,7 GHz CPU mit 32 GB RAM und Nvidia Quadro RTX 6000 Grafikkarte mit 24 GB Arbeitsspeicher und 4608 Kernen). Die Implementierung lässt sich jedoch auch auf handelsüblichen Rechnern (Intel Core i7-2600 3.4 GHz CPU mit 16 GB RAM und Nvidia GeForce GTX 760 mit 2 GB Arbeitsspeicher) ausführen. Lediglich die Rechenzeit wird entsprechend ansteigen.

Zwei MATLAB-Funktionen bilden das Grundgerüst der Software: *Multi-viewdeconv\_rl.m* führt die 2D MVD aus und *deconv1d.m* wird zur nachfolgenden 1D Dekonvolution aufgerufen. Vorbereitend werden mithilfe der Funktionen *psf2d.m* und *psf1d.m* die 2D und 1D PSF aus der zentralen Ebene und Vertikalen extrahiert. Hierbei kann entweder ein Satz von 3D PSF (je eine pro Ansicht) oder eine einzelne 3D PSF (für alle Ansichten identisch) eingegeben werden. Die Ausgaben werden dann an die beiden Hauptfunktionen übergeben.

Die Implementierung der 2D MVD orientiert sich stark an der bayesschen MVD aus Ref. [48]. Der dort vorgestellte Ansatz modelliert die PSF und die gemessenen Ansichten als Wahrscheinlichkeitsverteilungen und beschreibt deren Abhängigkeit voneinander mithilfe bedingter Wahrscheinlichkeiten. Bei der Berechnung einer Iteration wird Information aus allen Ansichten einbezogen, indem die PSF (genauer  $h'$ ; siehe Gleichung 2.9) entsprechend dieser Abhängigkeiten modifiziert wird. Dadurch kann die Anzahl der benötigten Iterationen reduziert und eine schnellere Konvergenz erreicht werden. Für eine detaillierte Beschreibung dieser Modifikationen sei auf Ref. [48] verwiesen.

*Multi-viewdeconv\_rl.m* nimmt folgende Eingabewerte entgegen: Ein Strukturen-Array, welches die registrierten Ansichten enthält, ein Array mit 2D PSF (eine je Ansicht) und die Anzahl der zu durchlaufenden Iterationen (Nutzerdefiniert). Des Weiteren kann der Nutzer eine Modifikation der PSF wählen. Entsprechend der on Ref. [48] verwendeten Bezeichnungen besteht die Wahl zwischen „Optimization I“ („opt1“ im Code), welche die verschiedenen PSF miteinander faltet, und „Optimization II“ („opt2“ im Code), welche das Produkt der einzelnen optischen Transferfunktionen als PSF nutzt, und der Option keine Modifikation zu verwenden. In dieser Arbeit wurde stets „Optimization II“ verwendet.

Schließlich hat der Anwender die Wahl zwischen zwei Methoden zur pixelweisen Gewichtung der einzelnen Ansichten: Intensität oder lokale Entropie [46, 144]. Die Gewichtung soll dazu dienen, dass nur die Teile einer Ansicht zur Fusion beitragen, die einen hohen Informationsgehalt haben. Die Hälfte der Probe, welche dem Objektiv zugewandt ist, leidet weniger stark an Streuung und Absorption, wodurch die detektierten Intensitäten (im Vergleich zur anderen Hälfte) höher sind. Bei der Gewichtung nach Intensität wird das Gewicht eines Pixels durch den relativen Anteil der Intensität bezüglich der Summe über alle Ansichten gegeben.

Alternativ kann auch die lokale Entropie als Gewicht verwendet werden. Diese wird über die lokale Varianz  $\sigma^2$  der Intensität benachbarter Pixel berechnet. Sie ist ein Maß dafür, wie stark die Intensitätswerte in der Umgebung schwanken, und spiegelt so den Bildkontrast wider. Die Größe der Umgebung wird vom Anwender definiert. Sie sollte hinreichend groß sein, um eine gute Statistik zu erzielen, jedoch auch klein genug, um die Lokalität der Größe zu erhalten. Die lokale Entropie  $H$  wird dann folgendermaßen

berechnet:  $H = \frac{1}{2} \ln(2\pi e\sigma^2)$ , wobei  $e$  die Eulersche Zahl ist. Auch diese Berechnung wird auf dem Grafikprozessor durchgeführt, und das Gewicht eines Pixels wird wieder als relativer Anteil der lokalen Entropie bezüglich der Summe über alle Ansichten gegeben (Funktion *weight.m*) [144]. In dieser Arbeit wurde stets die lokale Entropie mit einer  $11 \times 11$  Pixel großen Umgebung zur Gewichtung verwendet.

Die Funktion *binmask.m* erzeugt eine zweidimensionale, binäre Maske, welche den Bildinhalt beschreibt. Sie ist überall dort gleich Eins, wo zumindest eine Ansicht zur Fusion beiträgt und gleich Null, wenn alle Ansichten gleich Null sind, was durch das Auffüllen mit Nullen vor der Registrierung der Fall sein kann. Diese Maske wird in einfache Genauigkeit umgewandelt und mit einem Gauß-Filter (Standardabweichung 20 Pixel) geglättet, um Randartefakte durch die Fouriertransformationen zu reduzieren.

Wenn alle Eingaben getätigt sind, bestimmt die Funktion *Multi-viewdeconv\_rl.m* die Abmessungen der Ansichten und der PSF sowie den verfügbaren Grafikspeicher. Nach Abschätzung des benötigten Grafikspeichers werden die Ansichten in mehrere Stapel mit Scheiben senkrecht zur Rotationsachse aufgeteilt, welche parallel prozessiert werden können. So wird eine optimale Ausnutzung der verfügbaren Ressourcen gewährleistet, während gleichzeitig ein Überlaufen des Grafikspeichers vermieden wird. Dann wird die eigentliche MVD ausgeführt. Als initiale Abschätzung dient eine Mittelung über alle Ansichten. In jeder Iteration werden nacheinander die einzelnen Ansichten verwendet, um eine neue Abschätzung zu erhalten. Vor Ausführung der Division (Gleichung 2.9) werden Nulleinträge im Nenner durch Einsen ersetzt, um eine Nulldivision mit undefiniertem Resultat zu vermeiden. Wenn die gewählte Zahl an Iterationen durchlaufen ist, wird das Ergebnis der Fusion von der Grafikkarte auf den Arbeitsspeicher des Prozessors übertragen und von der Funktion zurückgegeben.

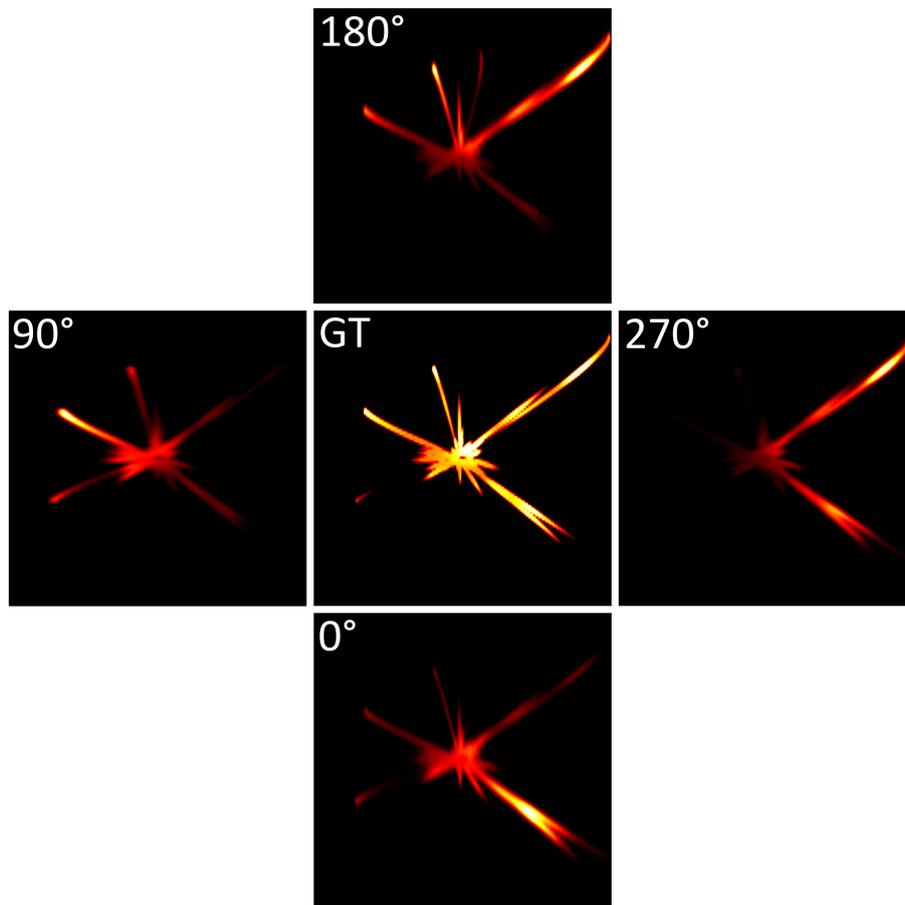
Anschließend kann die 1D Dekonvolution unter Aufruf der Funktion *deconv1d.m* ausgeführt werden. Als Eingabedaten wird neben einem 3D Array (das Ergebnis der MVD) und der 1D PSF wiederum die vom Nutzer festgelegte Anzahl der Iterationen entgegengenommen. Ähnlich der Funktion *binmask.m* wird nun *blend1d.m* zur Apodisierung der Ränder (Standardabweichung 5 Pixel) verwendet. Wieder wird das Volumen entsprechend des verfügbaren Speichers in Blöcke aufgeteilt, welche nacheinander auf der Grafikkarte bearbeitet werden. Die Funktion gibt wieder das entfaltete Bild zurück.

Alle MATLAB Funktionen sind frei verfügbar auf Github zu finden [119]. Dort wird auch eine Applikation mit grafischer Nutzeroberfläche zur Verfügung gestellt, welche ohne MATLAB-Lizenz auf jedem Desktop-Computer mit einer Nvidia Grafikkarte und ausreichend Arbeitsspeicher genutzt werden kann.

## 6.3. Validierung an synthetischen Daten

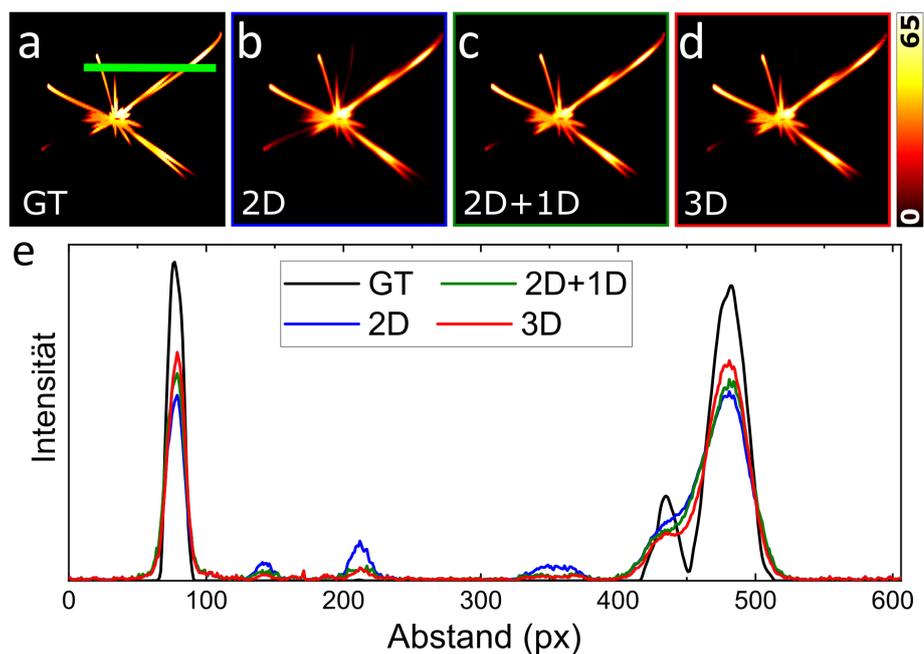
Vergleichende Metriken zur Beurteilung der Bildqualität wie beispielsweise MSE oder PCC stellen nützliche Werkzeuge zur quantitativen Analyse in der digitalen Bildverarbeitung dar. Voraussetzung dafür ist jedoch das Vorhandensein eines Ground-Truths, welches

als Referenz dient. Ein solches steht bei mikroskopischen Verfahren in der Regel nicht zur Verfügung. Einen Ausweg bieten synthetisch erzeugte Bilddaten, bei welchen der Abbildungsprozess am Rechner simuliert wird. Zur Charakterisierung der 2D+1D MVD wurde daher ein solch synthetischer Multi-view-Datensatz erzeugt. Als Ground-Truth wurde wieder das 3D Mikrotubuli-Bild aus Referenz [12] verwendet, das diesen Zweck auch schon in Kapitel 5 erfüllte. Hier wurde allerdings nur eine Hälfte des Datensatzes benutzt, die auf ein Volumen von  $1024 \times 1024 \times 1024$  Voxel skaliert und interpoliert wurde. Zur Simulation der Multi-view Aufnahme (Abbildung 6.3) wurde zuerst die Intensität entlang der optischen Achse mit zunehmender Tiefe reduziert, um Streuung und Absorption zu berücksichtigen. Dies geschieht normalerweise auch entlang des Beleuchtungspfad. Da im hier verwendeten Aufbau jedoch beidseitige Beleuchtung verwendet wird, kann der Effekt vernachlässigt werden und ist nicht in der Simulation enthalten. Außerdem wurde eine Faltung mit einer PSF durchgeführt, welche aus einer Messung von Latex-Kügelchen stammt, um den anisotrope Abbildungsprozess eines Mikroskops zu imitieren. Zuletzt wurde Poisson- und weißes Rauschen (Mittelwert  $\mu = 0$  und Varianz  $\sigma^2 = 1,6 \cdot 10^{-5}$ , MATLAB-Funktion *imnoise*) addiert, womit Photonen- und Detektorrauschen miteinbezogen werden. Der simulierte Datensatz weist keinen Positionierungsfehler auf, wodurch eine Registrierung entfällt. Dies ist vorteilhaft, da Fehler in der Registrierung zu Unsicherheiten führen, welche eine Charakterisierung der Fusion erschweren.

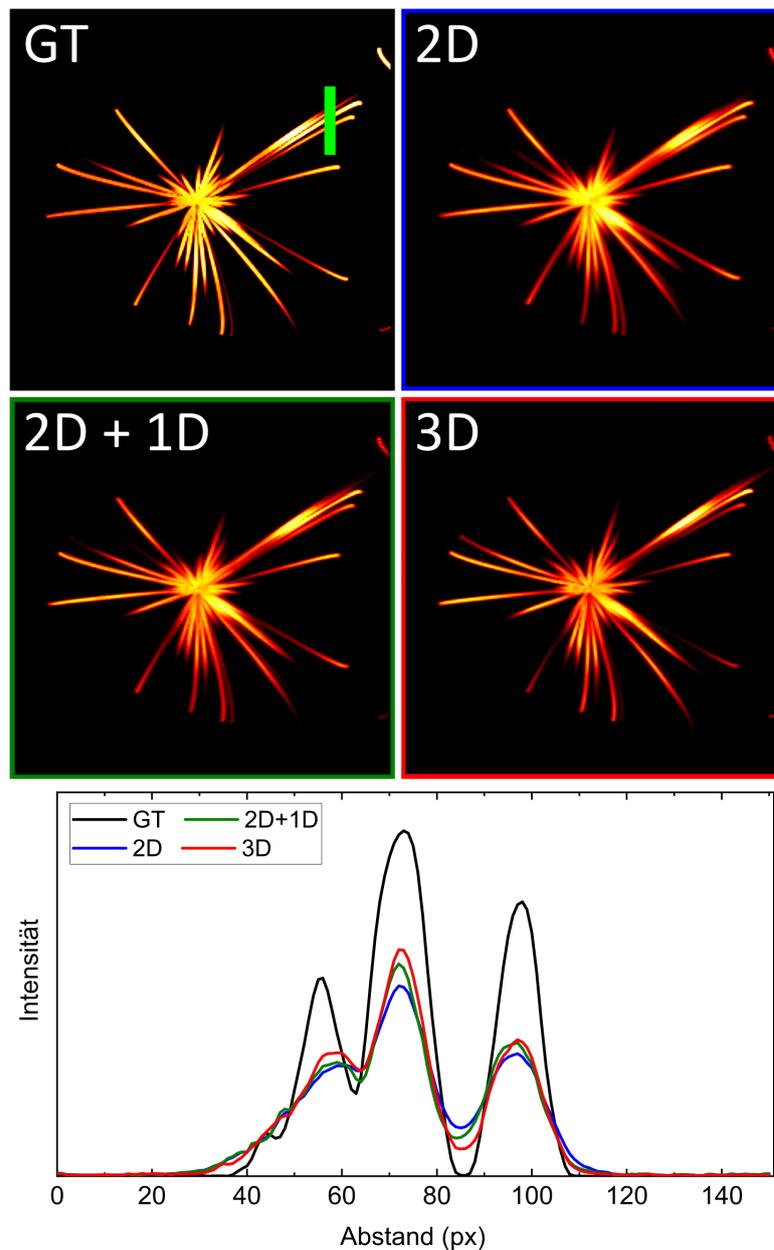


**Abbildung 6.3.:** Synthetischer Multi-view-Datensatz. Gezeigt sind einzelne Schnitte senkrecht zur Rotationsachse mit dem Ground-Truth in der Mitte umgeben von den vier einzelnen Ansichten. Der Einfluss der Faltung und Intensitätsabschwächung ist gut sichtbar. Letztere ist analog zu der gemessenen in Abbildung 6.1. Übernommen aus [138].

Der synthetische Multi-view-Datensatz wurde mit drei verschiedenen Methoden fusioniert: 2D, 2D+1D und 3D MVD. Währenddessen wurde die Rechenzeit und anschließend die Qualität der Fusion analysiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 6.4 (senkrecht zur Rotationsachse) und 6.5 (parallel zur Rotationsachse) dargestellt. Der Vorteil der zusätzlichen 1D Dekonvolution lässt sich bereits mit bloßem Auge erkennen: Beispielsweise zeigt Abbildung 6.4 b eine Linie, die sich vom Zentrum in Richtung 8 Uhr erstreckt. In der 2D+1D und 3D MVD ist diese Linie jedoch unterbrochen. Die Linie scheint also aufgrund der Verbreiterung von Strukturen im Abbildungsprozess aus benachbarten Ebenen entstanden zu sein, welche unter Vernachlässigung der dritten Dimension nicht zufriedenstellend rückgängig gemacht werden kann. Die Linienprofile (Abbildung 6.4 e) untermauern diese Schlussfolgerung und unterstreichen die Ähnlichkeit zwischen 2D+1D und 3D MVD.



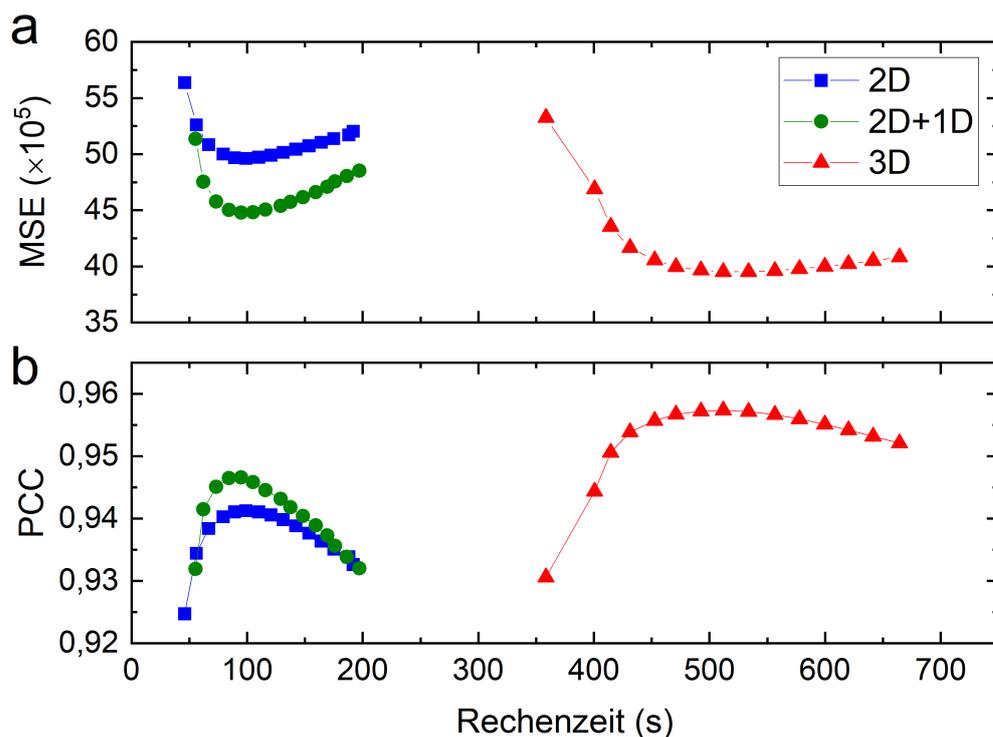
**Abbildung 6.4.:** MVD angewandt auf simulierte Daten. (a) Einzelne Scheibe des 3D Ground-Truths senkrecht zur Rotationsachse. Entsprechend die Resultate der (b) 2D, (c) 2D+1D und (d) 3D MVD. (e) Intensitätsprofile (gemittelt über 10 Pixel) entlang der grünen Linie in (a). Die 2D MVD (blau) zeigt im Bereich von 100 bis 400 Pixel Beiträge aus benachbarten Ebenen. 3D und 2D+1D MVD (rot und grün) sind hingegen in der Lage die Intensität richtig umzuverteilen und liefern eine bessere Abschätzung des Ground-Truths. Übernommen aus [138].



**Abbildung 6.5.:** MVD angewandt auf simulierte Daten. Oben: Einzelne Scheiben aus den Bildstapel des Ground-Truths bzw. fusioniert mit 2D, 2D+1D und 3D MVD. Die Rotationsachse liegt vertikal im Bild. Unten: Intensitätsprofile (gemittelt über 10 Pixel) entlang der grünen Linie in der Scheibe des Ground-Truth (parallel zur Rotationsachse). Übernommen aus [138].

Um bei diesem Vergleich unvoreingenommen bezüglich der Anzahl an Iterationen zu sein, wurde die optimale Anzahl für jede Methode separat anhand von MSE und PCC bestimmt und für den obigen Vergleich verwendet. Die Werte von 1 bis 15 Iterationen sind in Abbildung 6.6 gegen die Rechenzeit aufgetragen. Die Daten zeigen für die 2D+1D MVD eine deutliche Verbesserung gegenüber der 2D MVD bei nahezu gleichbleibender

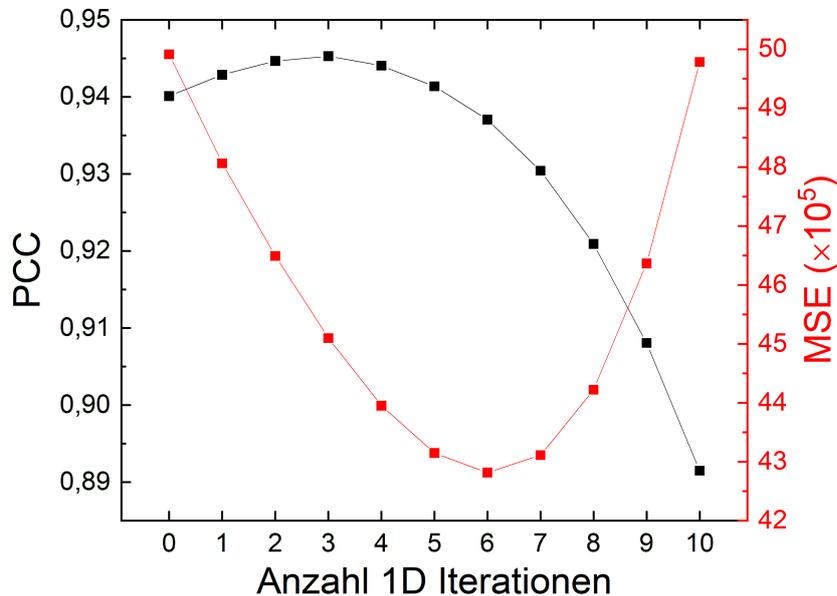
Rechenzeit. Die 3D MVD liefert qualitativ bessere Ergebnisse, ist jedoch auch bedeutend (Faktor 5) langsamer. Interessanterweise werden bei der 3D MVD mehr Iterationen benötigt, um das Optimum zu erreichen. Die Rechenzeiten beinhalten die Berechnung der Gewichtung der einzelnen Ansichten sowie den Transfer zwischen Grafikkarte und Prozessor. 2D+1D MVD scheint also einen guten Kompromiss zwischen Genauigkeit der Rekonstruktion und erforderlichem Zeitaufwand darzustellen.



**Abbildung 6.6.:** MSE und PCC in Abhängigkeit von der Anzahl der Iteration sowie der benötigten Rechenzeit. (a) MSE und (b) PCC für 15 Iterationen der 2D (blau), 3D (rot) und 2D+1D (grün) MVD für simulierte Daten. Die Rechenzeit beinhaltet die Berechnung der Gewichtung der einzelnen Ansichten sowie den Datentransfer zwischen CPU und GPU. Sowohl 2D als auch 2D+1D MVD benötigen nur etwa ein Fünftel der Zeit im Vergleich zu 3D MVD. In Anbetracht des vernachlässigbar kleinen Zeitaufwandes (von 2D+1D gegenüber 2D) zeigt sich eine deutliche Verbesserung beider Metriken. Übernommen aus [138].

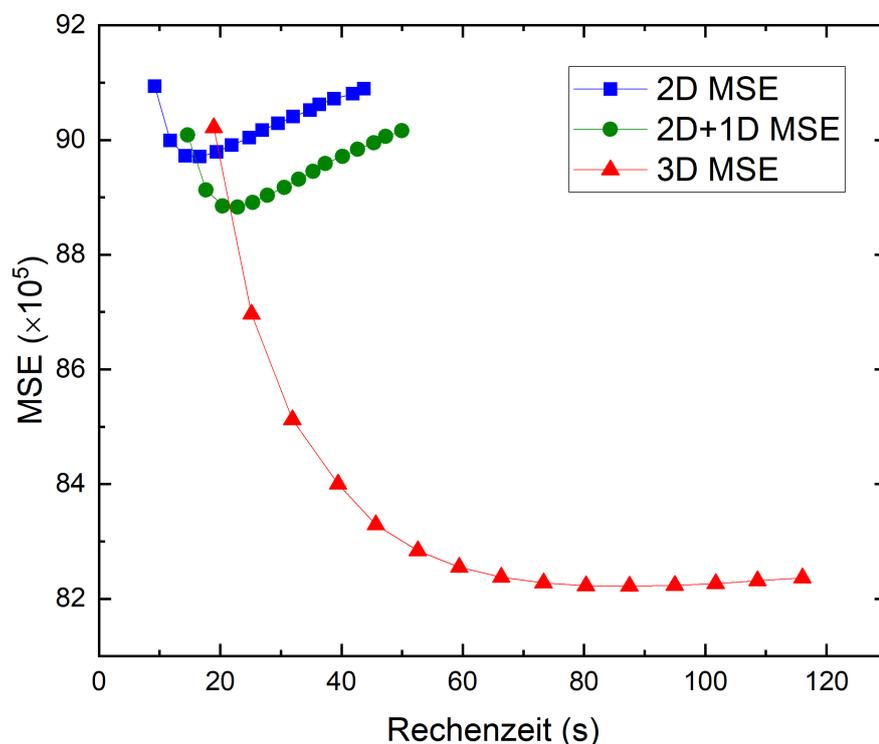
Bei der 2D+1D MVD wurde die optimale Anzahl an 1D Iterationen auf die gleiche Weise ermittelt. MSE und PCC liefern hier aber uneindeutige Ergebnisse (Abbildung 6.7). Es werden drei bzw. sechs Iterationen als Optimum angezeigt. Letztendlich wurden stets drei Iterationen verwendet, da es sich im Allgemeinen empfiehlt, den Algorithmus möglichst früh abubrechen. Dies reduziert zum einen etwaige Artefakte und zum anderen die Rechenzeit. Außerdem sollte darauf hingewiesen werden, dass die optimale Anzahl an

Iterationen auch vom Signal-Rausch-Verhältnis abhängig ist und daher im Allgemeinen von Datensatz zu Datensatz verschieden ist.



**Abbildung 6.7.:** Pearson Korrelationskoeffizient (PCC) und mittlere quadratische Abweichung (MSE) als Funktion der 1D Iterationen. Übernommen aus [138].

Wenn 2D+1D MVD einen guten Kompromiss zwischen Qualität und Zeitaufwand darstellt, eignet es sich dann auch als ebenso guter Kompromiss für die Rückfaltung einzelner „Single-view“ (SV) 3D Bilder? Da hier weniger Daten zu verarbeiten sind, ist zu erwarten, dass die Beschleunigung weniger stark ins Gewicht fällt. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Rückfaltung einer einzelnen Ansicht des synthetischen Datensatzes betrachtet. Wieder wurden die drei Ansätze (2D, 2D+1D, 3D) angewandt, die Rechenzeit gemessen und der MSE in Bezug auf das Ground-Truth je Iteration berechnet (Abbildung 6.8). Dabei stellt sich heraus, dass der 2D+1D Ansatz nur noch etwa dreimal schneller als eine 3D Dekonvolution ist, verglichen mit einer 5-fach kürzeren Rechenzeit bei MVD. Auch der Zugewinn an Qualität fällt verglichen mit den Ergebnissen der MVD-Analyse eher schwach aus: Der MSE nimmt lediglich um etwa 8% ab. Der 3D Ansatz erzielt hier deutlich bessere Ergebnisse und erreicht nach nur 2 Iterationen eine höhere Übereinstimmung mit dem Ground-Truth. Daher kann die 2D+1D Approximation nicht für einfache (SV) Dekonvolutionen empfohlen werden.



**Abbildung 6.8.:** Bildqualität, gemessen als mittlere quadratische Abweichung zum Ground-Truth, aufgetragen gegen die Rechenzeit für die Dekonvolution einer einzelnen Ansicht (Single-view). Übernommen aus [138].

#### 6.4. Anwendung auf gemessene Bilddaten

Synthetische Daten ermöglichen eine quantitative Analyse von Bildverarbeitungsalgorithmen anhand objektiver Vergleichskriterien. Jedoch sollen solche Algorithmen auch bei realen Messdaten zur Anwendung kommen und sollten daher auch an solchen getestet werden. Eine einfache Methode zur Charakterisierung eines Fluoreszenzmikroskops ist durch die Messung fluoreszierender Polystyrol-Kügelchen gegeben. Die Messdaten geben Auskunft und Hinweise über Auflösungsvermögen, optische Aberrationen und Homogenität. Auch für den Vergleich zwischen 2D, 2D+1D und 3D MVD sollen im Folgenden Polystyrol-Kügelchen verwendet werden.

Wie in Kapitel 5.4.1 beschrieben, wurde hierfür eine Probe rot fluoreszierender Polystyrol-Kügelchen (F8801, FluoSpheres, Invitrogen, Eugene, OR, Anregungs- und Emissionsmaxima: 580/605 nm) in einem FEP-Schlauch (Durchmesser 2,34 mm, Wandstärke 0,23 mm, Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland) präpariert. Diesmal wurde das Agarose-Gel jedoch nicht aus dem Schlauch herausgedrückt, um die gleichen Bedingungen

herzustellen, welche auch bei den Messungen an biologischen Proben (siehe unten) gelten. Die Kügelchen mit einem Durchmesser von 100 nm wurden in vier Ansichten (um je 90° rotiert) abgebildet. Nach Interpolation und Auffüllung mit Nullen messen die Volumen  $1024 \times 1024 \times 1024$  Voxel mit einer Voxel-Kantenlänge von 806 nm. Diese wurden mithilfe des evolutionären Suchalgorithmus registriert und mit den drei Fusionsansätzen vereint. Die Ergebnisse werden in Bezug auf die Bildauflösung untersucht und eine einzelne Ansicht (SV) dient als Referenz. Die Bildauflösung wird durch die scheinbare räumliche Ausdehnung der Kügelchen wiedergegeben. Um sie zu bestimmen, werden zunächst die lokalen Intensitätsmaxima gesucht und die Koordinaten von deren Zentren erfasst. Für jedes gefundene Kügelchen wird dann die Halbwertsbreite (FWHM) entlang aller drei Raumdimensionen ermittelt. Für jede Raumrichtung separat werden die Werte in einem kumulativen Histogramm aufgetragen und mit der kumulativen Normalverteilung angepasst, um Mittelwert und Standardfehler zu bestimmen, welche in Tabelle 6.1 angegeben sind.

**Tabelle 6.1.:** Mittelwerte und Standardfehler der räumlichen Ausdehnung von 100 nm großen, fluoreszierenden Kügelchen nach verschiedenen MVD-Verfahren.

	FWHM x / $\mu\text{m}$	FWHM y / $\mu\text{m}$	FWHM z / $\mu\text{m}$	Anz. Kügelchen
SV	$2,01 \pm 0,15$	$2,07 \pm 0,21$	$9,94 \pm 0,50$	37
2D MVD	$1,99 \pm 0,20$	$2,67 \pm 0,12$	$2,29 \pm 0,09$	35
2D+1D MVD	$1,95 \pm 0,16$	$1,78 \pm 0,11$	$2,26 \pm 0,11$	36
3D MVD	$1,57 \pm 0,14$	$1,48 \pm 0,06$	$2,22 \pm 0,17$	35

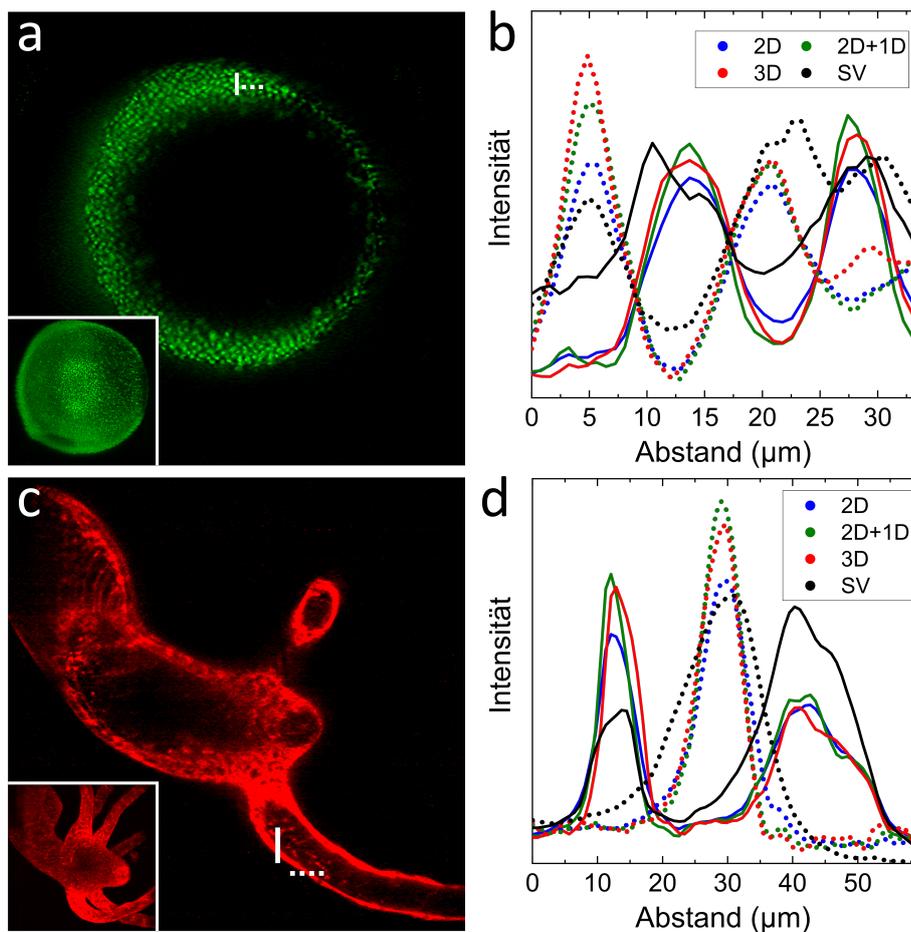
Im Gegensatz zur einzelnen Ansicht sind alle drei Modalitäten der MVD annähernd isotrop aufgelöst. Entlang der Rotationsachse (y-Achse) zeigt die 2D MVD gegenüber des SV eine leichte Verbreiterung, welche sich auf einen kleinen Fehler (kleiner als ein Pixel) bei der Registrierung zurückführen lässt. Auf derselben Achse zeigt sich auch deutlich der Effekt der 1D Dekonvolution, wodurch die 2D+1D MVD Werte nahe derer der 3D MVD liefert. Dies bestätigt die Erkenntnisse, welche sich aus der Analyse synthetischer Daten ergeben haben.

Abschließend sollen die drei Modalitäten auf Messdaten angewandt werden, wie sie für biologische Fragestellungen relevant seien könnten. Zu diesem Zweck wurde je ein Multi-view Datensatz eines Zebrafisch-Embryos und einer Hydra aufgenommen.

Ein transgener Zebrafisch-Embryo der Linie *kca66Tg* mit eingefügter EGFP-Markierung (Tg(h2az2a:h2az2a-EGFP)), welche die Zellkerne sichtbar macht [145], wurde während des 8- oder 16-Zell-Stadiums ohne Entfernung des Chorions in eine 38 °C warme, wässrige Lösung von 1,5% (Massenanteil) Agarose (Type VII, A6560, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) pipettiert. Anschließend wurde der Embryo mit einer Spritze in den FEP-Schlauch gesaugt. Nach Abkühlung und Polymerisation des Agarosegels wurde der Schlauch an einem Edelstahl-Stab befestigt, welcher in die Rotationsplattform des Mikroskops eingespannt werden kann. Während der Entwicklung des Embryos wurden fortwährend (bis zu einer Dauer von 20 Stunden) Ansichten aus 4 Winkeln (90°-Schritte) aufgenommen. Für die Abbildungen von Hydren wurden transgene Tiere der Art *Hydra vulgaris* verwendet,

deren Endoderm mit EGFP und Ectoderm mit dem rot fluoreszierenden Protein (RFP) mittel eines Aktinpromotors markiert sind. Diese „inversen Wassermelonen“ wurden dankenswerterweise von Prof. Robert Steele's Labor (UC Irvine) bereitgestellt. Die Tiere werden in künstlichem Medium (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM KCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 6,8) bei 18 °C gehalten und zwei bis drei Mal wöchentlich mit frisch geschlüpften *Artemia salina nauplii* gefüttert. 48 Stunden vor den Messungen wurde die Fütterung ausgesetzt. Die Probenpräparation wurde analog zu den Zebrabärblingen durchgeführt. Da sich die Tiere auch während der Messung in erheblichem Maße bewegen, wurde nur ein Farbkanal verwendet, um eine schnellere Messung zu ermöglichen, wodurch Bewegungsartefakte minimiert werden können.

Die Abbildungen wurden an dem in Kapitel 3 beschriebenen Mikroskop mit beidseitiger Besselstrahl-Beleuchtung aufgenommen. Für die Anregung von EGFP und RFP wurden Laser mit 488 nm und 561 nm Wellenlänge verwendet. Die Fluoreszenz wurde mit dem 16× Objektiv eingesammelt. Die 3D Bildstapel enthalten 400 Scheiben mit einem Abstand von je 2 µm, die mit einer Bildrate von 10 s<sup>-1</sup>. Die 1024 × 1024 Pixel (2 × 2-Binning) decken ein Beobachtungsfeld von 825 µm × 825 µm ab. Direkt nach der Aufnahme wird ein zuvor gemessenes Dunkelbild von jeder Scheibe subtrahiert, um den Kamerahintergrund zu korrigieren. Nach Interpolation und Auffüllung mit Nullen messen die Volumen auch hier 1024 × 1024 × 1024 Voxel mit einer Voxel-Kantenlänge von 806 nm. Vor der Fusion durch MVD werden die Ansichten mithilfe des evolutionären Suchalgorithmus registriert. Auch hier wurden alle drei Varianten angewandt und anschließend die Ergebnisse anhand einfacher Intensitätsprofile verglichen, was in Abbildung 6.9 dargestellt ist.



**Abbildung 6.9.:** Anwendung an biologischen Proben. (a) Einzelne Scheibe eines Stapels, welche einen sich entwickelnden Zebrafärbling-Embryo zeigt (etwa 90% Umwachsung des Dotters). Die Zellkerne sind mit EGFP markiert. Zur Fusion der 4 Ansichten wurde 2D+1D MVD verwendet (5 und 3 Iterationen). Unten links ist eine Maximumintensitätsprojektion des gesamten Stapels zu sehen. (b) Intensitätsprofile (gemittelt über 10 Pixel) für 2D, 2D+1D, 3D MVD und eine einzelne Ansicht über einige Zellkerne (durchgezogene und gestrichelte Linie in a). (c) Ectoderm einer Hydra markiert mit RFP. Zur Fusion der 4 Ansichten wurde 2D+1D MVD verwendet (5 und 3 Iterationen). (d) Intensitätsprofile (gemittelt über 10 Pixel) für 2D, 2D+1D, 3D MVD und eine einzelne Ansicht über das Ectoderm (durchgezogene und gestrichelte Linie in c). Übernommen aus [138].

Anhand der Intensitätsprofile lässt sich für beide Proben erkennen, dass das Ergebnis der 2D+1D MVD stark dem der 3D MVD folgt, während die 2D MVD mehr von der 3D MVD abweicht. Dies gilt sowohl parallel (gestrichelte Linien), als auch senkrecht (durchgezogene Linien) zur Rotationsachse. Auch die optimale Anzahl an Iterationen, die hier durch genaue visuelle Betrachtung ermittelt wurde, deckt sich mit den Resultaten der Simulationen (Abbildung 6.6). Die besten Ergebnisse wurden mit 5 Iterationen für die 2D MVD, zusätzlich 3 Iterationen der 1D Dekonvolution für 2D+1D MVD und 8 Iterationen für die 3D MVD erreicht.

### 6.5. Diskussion

Bei Experimenten im Bereich der Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie werden enorm große Datenmengen produziert, was die Datenverarbeitung sehr zeitaufwändig macht und nach einem effizienten Umgang mit den verfügbaren Speicherressourcen verlangt. Durch Multi-view Aufnahmen wird dieses Problem weiter verschärft, da die Datenmenge mit der Anzahl der Ansichten zunimmt. In diesem Kapitel wurde eine Approximation der Multi-view Dekonvolution vorgestellt, welche eine schnelle Prozessierung der dreidimensionalen Daten ermöglicht. Aufbauend auf der 2D MVD, welche die Ansichten in Ebenen senkrecht zur Rotationsachse fusioniert, wurde eine 1D Dekonvolution entlang der Rotationsachse hinzugefügt, um in Bezug auf die Bildqualität näher an die Ergebnisse der 3D MVD heranzurücken. Es konnte gezeigt werden, dass die Auswirkungen dieses zusätzlichen Schrittes auf die Rechenzeit vernachlässigbar sind, während sich die Bildqualität merklich verbessert. Das Verfahren bietet sich daher vor allem für die Auswertung von Experimenten an, die über lange Zeitspannen laufen, wie etwa bei entwicklungsbiologischen Fragestellungen.

Im Widerspruch zu den hier präsentierten Ergebnissen berichteten Schmid und Huiskens zuvor, dass es keinen Unterschied zwischen 2D MVD und 3D MVD gäbe [49]. Für deren Simulationen wurde eine kleine, zentrierte Kugel als Ground-Truth gewählt. Eine solche einfache und symmetrische Struktur könnte jedoch möglicherweise die Unterschiede verdeckt haben. Hinzu kommt, dass die Abschwächung der Intensität entlang der Detektionsachse bei Schmid und Huiskens nicht berücksichtigt wurde. Diese hat jedoch einen großen Einfluss auf die 3D Bildgebung und ist mitunter der Grund, weshalb MVD zur Rekonstruktion benötigt wird. Außerdem geben die Autoren an, dass mithilfe eines Streaming-Ansatzes die 2D MVD in Echtzeit durchgeführt werden kann [49]. Hierbei werden das Einlesen der Daten, deren Prozessierung und das Abspeichern der Ergebnisse parallel durchgeführt. Damit dies möglich ist, müssen die einzelnen Ansichten bereits registriert auf der Festplatte abgelegt sein. Dies mag für einige spezielle Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie-Aufbauten der Fall sein, wenn die notwendige Transformation aufgrund entsprechender Kalibration des Mikroskops bekannt und zeitlich unveränderlich ist, sodass diese direkt nach Aufnahme einer Ansicht auf dieselbe angewandt werden kann, bevor sie auf der Festplatte abgelegt wird [49, 146, 147]. Dies ist aber im Allgemeinen nicht der Fall. Da zur Registrierung die Daten ebenfalls von der Festplatte gelesen werden müssen, ergibt sich kein Zeitvorteil, die Daten zum Streamen vorher auf diese zu schreiben. Um jedoch alle Eventualitäten abzudecken, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Varianten implementiert: Die erste wie oben beschrieben ohne Streaming und eine zweite mit Streaming, bei der angenommen wird, dass die Daten bereits registriert auf der Festplatte liegen.

Für ein optimales Ergebnis (bei jeglicher Art der Dekonvolution) wäre eine höhere Abtastung des Fluoreszenzsignals natürlich wünschenswert. Jedoch existiert eine Reihe von Einschränkungen bei der Aufnahme von lebenden Proben, die es zu beachten gilt: Erstens wird ein großes Beobachtungsfeld (hier etwa  $830\ \mu\text{m} \times 830\ \mu\text{m}$ ) benötigt, um den gesamten Organismus ins Bild zu bekommen. Zweitens muss die Datenmenge, insbesondere bei Langzeitmessungen, für leistungsstarke Rechner handhabbar bleiben. Es sei angemerkt, dass die Vergrößerung des Mikroskops (inkl. Binning) so gewählt ist, dass

die Pixelgröße in der Bildebene (806 nm) etwa der Hälfte der PSF entspricht, sodass das Abtast-Theorem erfüllt ist. Drittens besteht ein offensichtlicher Kompromiss zwischen Signal-Rausch-Verhältnis und Pixelgröße. Eine Aufteilung des Bildes in kleinere Pixel würde eine längere Belichtungszeit erfordern, um dasselbe Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Dies sollte generell zwecks Photobleichung vermieden werden, insbesondere jedoch bei lebenden Proben, welche unter weiteren Formen der Phototoxizität leiden könnten.



## 7. Bildanalyse für spezielle, biologische Anwendungen

In den vorangegangenen Kapiteln wurden Methoden zur Verbesserung der Qualität von Aufnahmen im Bereich der Lichtscheibenmikroskopie diskutiert. Doch die Produktion hochwertiger Bilder ist in der Regel ein Mittel, um qualitative und quantitative Fragen bezüglich einer bestimmten Probe zu beantworten. Dazu müssen aus den Bildern bestimmte, anwendungsspezifische Parameter extrahiert werden. Vor allem bei großen Datensätzen und schwer zugänglichen Größen leisten Algorithmen hierbei Hilfestellung. In diesem Kapitel sollen zwei spezielle, biologische Anwendungen präsentiert werden. Dabei werden auch die Hintergründe der Anwendungen erläutert und gegebenenfalls vorläufige Ergebnisse vorgestellt.

### 7.1. Software zur Analyse von Blutgefäßen

Das Blutgefäßsystem übernimmt in Wirbeltieren mehrere, äußerst wichtige Aufgaben: Es versorgt das Gewebe mit Sauerstoff, Wasser und anderen Nährstoffen. Abfallprodukte des Stoffwechsels können über die Blutbahn zu den Ausscheidungsorganen befördert werden. Darüber hinaus reguliert es Temperatur und pH-Wert und spielt eine wichtige Rolle in der Immunabwehr. Werden diese Aufgaben nicht ordnungsgemäß erfüllt, so hat dies schwerwiegende Folgen, wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Bluthochdruck und vieles mehr. Diese werden häufig durch fortschreitende Atherosklerose, also Ablagerungen an den Gefäßinnenwänden, verursacht oder begünstigt [148]. Wenig überraschend ist es also, dass die Wissenschaft an einem besseren Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen, welche das Wachstum und die Funktion der Blutgefäße bestimmen, interessiert ist [149–151].

Das gesamte Blutgefäßsystem mit dem Herzen, den Arterien und Venen bildet eine komplexe und hochgradig geordnete, dreidimensionale Struktur, welche sich bei größeren Säugetieren oder dem Menschen über mehrere Größenskalen erstreckt. Während größere Blutgefäße wie die Aorta (Durchmesser beim Menschen ca. 2,5 cm [148]) aus drei Schichten (Endothel, glatte Muskulatur, Bindegewebe) aufgebaut sind, bestehen Kapillaren nur aus Endothelzellen und einer Basallamina. Sie sind der Hauptort des Stoffaustauschs zwischen Blut und Gewebe und haben einen Durchmesser von etwa 7  $\mu\text{m}$  [152]. Dabei ist das System nicht starr, sondern kann flexibel auf sich ändernde Anforderungen reagieren. Bei physiologischen Prozessen wie Wachstum oder Wundheilung werden Signalmoleküle ausgeschüttet, die die Bildung neuer Gefäße ausgehend vom bestehenden System anregen. Dieser Prozess wird Angiogenese genannt und wird auch durch maligne Tumore mit

großem Nährstoffbedarf ausgelöst. Und auch bei zunehmender Verstopfung eines bestehenden Gefäßes, wird die Bildung sogenannter Kollateralarterien induziert [152]. Und auch kurzfristig reagiert das System auf veränderte Anforderungen, wie einen erhöhten Metabolismus (z.B. durch erhöhte physische Aktivität oder eine Entzündung) durch Aufweitung der Gefäße [151].

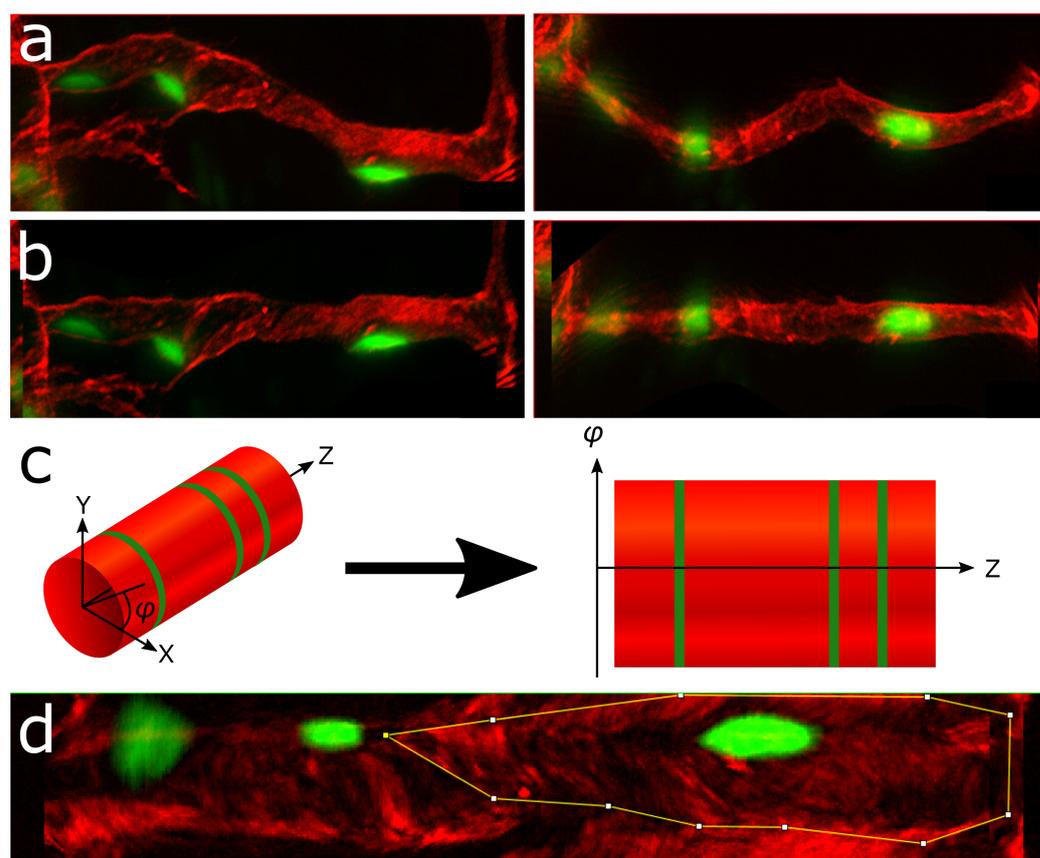
Wer solch dynamische Prozesse studieren möchte, benötigt eine geeignete Probe und ein passendes mikroskopisches Verfahren. Die Larven des Zebrafisches eignen sich als Modellorganismen zur Untersuchung von Blutgefäßen. Dies ist durch ihre geringe Größe, einfache Geometrie und rasche Entwicklung begründet. Aufgrund ihrer Transparenz erlauben sie die direkte Beobachtung ihrer Blutgefäße und auch deren Entwicklung [153]. Mithilfe der Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie lassen sich dreidimensionale Strukturen über längere Zeiträume hinweg mit hoher zeitlicher Auflösung abbilden, wodurch sie sich auch hervorragend zur Untersuchung von Blutgefäßen eignen [154]. Darüber hinaus sollte auch Analysen wie die Bestimmung von Länge oder Durchmesser der Gefäße im dreidimensionalen Raum erfolgen, da Werte, welche anhand von Maximumintensitätsprojektionen ermittelt werden, von den tatsächlichen Werten abweichen können [154].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ImageJ-Plugin entwickelt, welches die quantitative Analyse der Geometrie von Blutgefäßen in 3D erleichtert. Ausgehend von einem 3D Bild des zu vermessenden Gefäßes und einigen Parametern, die vom Nutzer in kleinen Eingabefenstern abgefragt werden, wird das Bild transformiert und grundlegende Maße des Gefäßes ermittelt. Darüber hinaus wird eine Zylinderprojektion erstellt, anhand derer gegebenenfalls einzelne Endothelzellen vom Nutzer segmentiert und ebenfalls vermessen werden können. Die Software geht davon aus, dass das Bild auf das zu untersuchende Gefäß zugeschnitten ist und so rotiert wurde, dass die Gefäßachse mit der z-Achse übereinstimmt und in der x-y-Ebene die Querschnitte durch das Gefäß zu sehen sind. Das Hauptproblem bei der Vermessung von Blutgefäßen liegt in deren Krümmung. Für die Bestimmung des Durchmessers mag dies zwar keine bedeutende Rolle spielen, jedoch wirkt sie sich stark auf die Längenmessung aus. Denn die Bestimmung der Länge anhand einer Projektion berücksichtigt nicht die euklidische Norm in drei Dimensionen und führt so zu verfälschten Ergebnissen. Die hier verwendete Strategie besteht darin, die Koordinaten aller Punkte im Zentrum des Gefäßes zu bestimmen. Damit kann dann die Länge korrekt berechnet werden.

Das Programm bietet hierzu zwei Varianten: Eine automatische Variante und eine, die auf Nutzereingaben basiert. Bei der automatischen Variante wird ein Kreis an jeden Querschnitt (x-y-Ebene) angepasst. Hierzu wird eine von ImageJ bereitgestellte Funktion genutzt (`run("Fit Circle to Image")`). Anschließend können die x- und y-Koordinaten des Kreismittelpunktes ausgelesen werden. Aufgrund von Rauschen oder nicht zum Gefäß gehörigen Bildbestandteilen kann es dabei zu Fehlern in der Kreisanpassung in einzelnen Querschnitten entlang des Gefäßes kommen. Daher wird ein gleitender Durchschnitt entlang der z-Achse berechnet. Anschließend wird der Abstand des Kreismittelpunktes zum Ursprung (Bildmittelpunkt) berechnet. Das Verfahren funktioniert sehr gut für Gefäße, die keine Abzweigungen aufweisen. Diese führen dazu, dass die Kreisanpassung

versagt. Hier sollte die zweite Variante angewandt werden. Zur manuellen Bestimmung der Koordinaten der Gefäßmitte werden zwei Projektionen erstellt, die eine Seitenansicht (y-z-Projektion) und eine Aufsicht (x-z-Projektion) auf das Gefäß ermöglichen. Der Nutzer wird dazu aufgefordert, in diese Ansichten mehrere Punkte entlang der Gefäßmitte einzuzichnen. Diese Punkte werden anschließend mittels Spline-Interpolation zu einer durchgehenden Linie erweitert und wieder können, wie bei der automatischen Variante, die Abstände des Gefäßmittelpunkte zum Ursprung (Bildmittelpunkt) berechnet werden. Die Projektionen eines Gefäßes vor und nach der Begradigung sind in Abbildung 7.1 zu sehen. Ein ähnliches Verfahren wurde auch bereits in einer anderen Arbeit verwendet [150].

Anhand der zuvor bestimmten Koordinaten werden die einzelnen Querschnitte durch eine Translation in die Bildmitte geschoben, sodass ein begradigtes Gefäß dargestellt werden kann. Diese Transformation ist natürlich nicht längenerhaltend und dient nur der Visualisierung. Zur Bestimmung der Gefäßlänge werden die euklidischen Normen in drei Dimensionen zwischen den zuvor bestimmten Gefäßmittelpunkten berechnet und aufsummiert. Um den mittleren Radius der Gefäßes zu bestimmen, wird eine radiale Projektion erstellt. Das heißt, für jeden Abstand  $r$  vom Zentrum des Gefäßes wird die mittlere Intensität über alle Azimuthwinkel  $\theta$  berechnet. Diese Projektion ist in Abbildung 7.1 (unten rechts) gezeigt. Die Werte werden dann entlang des Gefäßes gemittelt und die Verteilung mit einer Gauß-Funktion angepasst. Die Position des Maximums gibt den mittleren Radius des Gefäßes an und die Standardabweichung beschreibt die Variation des Radius über die Länge des Gefäßes. Über den Radius und die Länge des Gefäßes lassen sich auch die Oberfläche und das Volumen desselben berechnen. Die Werte werden von der Software ausgegeben. Schließlich produziert das Plugin noch die eine Zylinderprojektion des Gefäßes. Hierzu wird die mittlere Intensität in radialer Richtung über die gesamte Länge und alle Azimuthwinkel des Gefäßes bestimmt. Die Winkelauflösung  $\alpha$  der Projektion wird vom Nutzer festgelegt. Die Berechnung der Bogenlänge erfolgt mithilfe des zuvor ermittelten Radius  $r$ :  $l = \frac{\alpha \cdot 2\pi \cdot r}{360^\circ}$ . Der Nutzer kann von Hand die Umrisse einer beliebigen Anzahl von Zellen nachzeichnen und erhält deren Fläche sowie den Anteil jeder Zelle an der Gesamtoberfläche des Gefäßes. Das hier vorgestellte ImageJ-Plugin erleichtert die quantitative Analyse von Blutgefäßen erheblich und erlaubt die korrekte Vermessung von Länge, Oberfläche und Volumen unter Berücksichtigung ihrer Krümmung. Durch die Wahl zwischen automatisierter oder nutzerbasierter Begradigung bietet das Plugin einen guten Kompromiss zwischen Nutzerfreundlichkeit und Zuverlässigkeit.



**Abbildung 7.1.:** Ausgabe des Plugins zur Analyse von Blutgefäßen. (a) Maximumintensitätsprojektionen entlang zweier Raumachsen vor der Begradigung. (b) Ergebnis nach manueller Begradigung (durch nachzeichnen der Krümmung des Gefäßes). (c) Schematische Darstellung der Zylinderprojektion. (d) Zylindrische Projektion des begradigten Gefäßes. Zusätzlich zur Zylinderprojektion wird eine radiale Projektion des begradigten Gefäßes (nicht dargestellt) erstellt. Die Projektionen werden zur Bestimmung des Radius, der Gefäßoberfläche und des Gefäßvolumens benutzt. Darüber hinaus können manuell Zellen segmentiert und vermessen werden (siehe d). Die in diesem Beispiel verwendete transgene Linie enthält zwei Markierungen Tg(fli1an:eGFP) (Zellkerne, grün) und Tg(kdrl:mCherry) (Endothelzellen, rot).

## 7.2. Untersuchung der Nanopartikelbeseitigung in Embryonen des Zebraäbrlings

Ein Ansatz zur Diagnose und Therapie onkologischer Erkrankungen besteht darin, das maligne Gewebe gezielt mithilfe von Nanopartikeln zu erkennen bzw. zu zerstören. Die Partikel werden dabei in ihrer Größe (1 – 200 nm), Form und Oberflächenbeschaffenheit angepasst, um eine höchstmögliche Akkumulation im gewünschten Gewebe zu erreichen. Tatsächlich erreicht aber häufig nur ein sehr kleiner Teil (in der Größenordnung einiger Promille) den Tumor [155]. Ein Grund hierfür sind effiziente Beseitigungsmechanismen,

welche Fremdkörper rasch aus dem Blutkreislauf filtern und die Zirkulationszeit verkürzen [156]. Hauptverantwortlich für die schnelle Beseitigung sind Makrophagen und endotheliale Fresszellen [157]. Makrophagen sind Zellen des Immunsystems, welche in allen Gewebetypen zu finden sind. Diese Zellen haben einen Durchmesser von 10 – 15 µm und nehmen unterschiedliche Formen von kugelförmig bis lang gestreckt an. Ihre Aufgabe ist die Beseitigung von Mikroorganismen wie Bakterien oder Viren, aber auch toten oder apoptotischen Zellen. Diese werden durch Phagozytose aufgenommen und zersetzt. Dabei bilden Makrophagen eine heterogene Gruppe mit unterschiedlichen Funktionen [158]. Endothelzellen kleiden die Innenwände der Blutgefäße aus. Dort agieren sie als Diffusionsbarriere und nehmen weitere vielfältige Aufgaben wahr. So nehmen sie beispielsweise Einfluss auf die Blutgerinnung, die Gefäßweite und den Blutdruck [152]. Darüber hinaus beteiligen sie sich auch maßgeblich an der Beseitigung von Nanopartikeln aus dem Blut [159]. Das Schicksal von Nanopartikeln in Organismen ist jedoch nicht nur hinsichtlich möglicher Therapien oder diagnostischer Verfahren interessant. Nanopartikel (insbesondere Nanoplastik) sind zunehmend in der Umwelt aufzufinden und werden wegen ihrer Eigenschaften auch Konsumgütern zugesetzt [160]. Auch daher ist es von Interesse, deren Einwirkung auf Organismen besser zu verstehen und mögliche Schädigungen zu erkennen.

Die genauen Mechanismen, welche die Interaktionen zwischen Nanopartikeln, Makrophagen und endothelialen Fresszellen auf zellulärer Ebene bestimmen, sind jedoch größtenteils unverstanden [157]. Mithilfe der Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie lassen sich In-vivo-Experimente durchführen, in welchen sich ebendiese Interaktionen teilweise beobachten lassen. Um nämlich die Bewegungen der Makrophagen in drei Dimensionen zu verfolgen, müssen Bilder in schneller zeitlicher Abfolge über lange Zeiträume aufgenommen werden, ohne dabei die Fluorophore zu bleichen oder die Probe in sonstiger Weise zu schädigen. Natürlich werden für solche Experimente auch passende Proben benötigt. Die Embryonen des Zebrafischblings (*Danio rerio*) stellen einen geeigneten Modellorganismus für derartige Experimente dar. Neben ihrer hohen Transparenz zeichnen sie sich durch eine einfache Geometrie, einen kurzen Reproduktionszyklus (z.B. im Vergleich zu Mäusen) und eine rasche embryonale Entwicklung außerhalb des Muttertiers aus. Darüber hinaus sind sie kostengünstig im Unterhalt und haben nur geringe Platzansprüche [161]. Für die Experimente wurden 3 bzw. 4 Tage alte Zebrafischbling-Embryonen der transgenen Linie Tg(kdrl:mCherry) und Tg(mpeg1:EGFP) verwendet. Diese weisen zwei verschiedene Fluoreszenzmarkierungen auf: Zum einen wurde ein Rezeptor für vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren in der Membran der Endothelzellen mit dem fluoreszierenden Protein mCherry fusioniert (Tg(kdrl:mCherry)). Zum anderen exprimieren die Makrophagen das porenformende Transmembranprotein Perforin-2, welches mit dem fluoreszierenden Protein EGFP fusioniert wurde.

Mit der Kombination aus schneller, dreidimensionaler Mikroskopie und einem lebenden Modellorganismus lassen sich sehr viele spannende Fragestellungen untersuchen. Im Vordergrund steht dabei die Beobachtung dynamischer Prozesse, welche mit anderen Mikroskopieverfahren nur schwer oder gar nicht zugänglich sind. Aus biologischer Perspektive ist die Beobachtung der Vorgänge im lebendigen Organismus im Vergleich zu

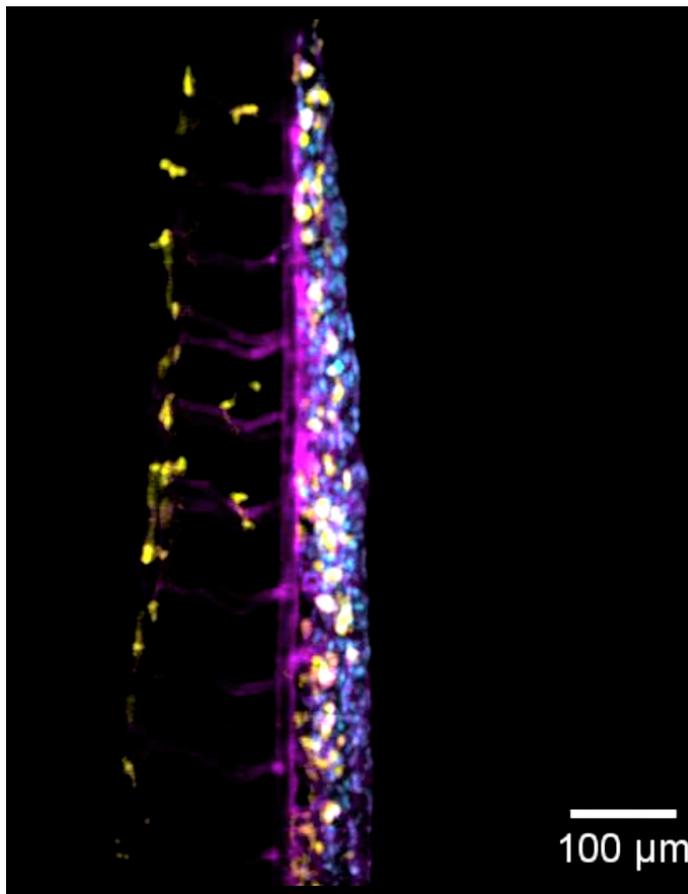
In-vitro-Experimenten mit isolierten Zellen sehr bereichernd, da diese hier mit ihrer natürlichen Umgebung wechselwirken können, was das Verhalten stark beeinflussen kann. In diesem frühen Stadium der Entwicklung sind die Organe der Embryonen noch nicht vollständig ausgebildet. Es ist jedoch bekannt, dass die Kaudalvene in dieser Phase die Aufgaben der Leber teilweise übernimmt und daher als Modell für das Geschehen in der adulten Leber verwendet werden kann [159]. Für dieses Projekt wurde daher zunächst das Verhalten der Makrophagen im Bereich der Kaudalvene im ungestörten Zustand beobachtet und beschrieben. In den anschließenden Experimenten wurden gezielt Störungen (Injektion von Nanopartikeln) an dem System vorgenommen, um dann eine mögliche Veränderung zu beobachten. Konkret wurde untersucht, ob Makrophagen ihre Bewegungsmuster infolge der Nanopartikelinjektion verändern. Im Folgenden werden das experimentelle Vorgehen, die Datenanalyse sowie erste Ergebnisse beschrieben.

Die oben beschriebenen Embryonen befinden sich stets in E3 Medium. Dieses besteht aus entmineralisiertem Wasser mit 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 10 mM HEPES, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,86 mM MgCl<sub>2</sub>. Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,2 eingestellt. Die Embryonen wurden mit einer wässrigen Lösung von 1-Phenyl-2-thiourea (PTU, Endkonzentration 200 µM) behandelt, um die Pigmentbildung zu inhibieren. Als Nanopartikel wurden carboxylat-modifizierte, dunkelrot fluoreszierende Polystyrol-Kügelchen (F8789, FluoSpheres, Invitrogen, Eugene, OR, Anregungs- und Emissionsmaxima: 660/680 nm) mit einem Durchmesser von 40 nm verwendet. Diese wurden zunächst in destilliertem Wasser suspendiert (50 mg mL<sup>-1</sup>), um daraus folgende Injektionslösung herzustellen: 1,7 µL Nanopartikellösung, 5 µL Phenolrotlösung (Sigma Aldrich, P0290) und 18,3 µL destilliertes Wasser. Die Endkonzentration der Nanopartikel liegt demnach bei 0,034 mg mL<sup>-1</sup>. Das Phenolrot dient dabei der Kontrastgewinnung während des Injektionsvorgangs zum Zweck der Erfolgskontrolle unter einem Hellfeldmikroskop. Von der Injektionslösung wurden 10 nL durch eine gezogene Glasnadel („thin-wall, with filament“, Durchmesser 1 mm; World Precision Instruments) von Hand in die Kardinalvene (*Vena cardinalis communis*) eingespritzt. Zur Injektion werden die Embryonen durch Zugabe von Tricain Methansulfonat 0,016 mg mL<sup>-1</sup> anästhesiert und in Agarose (0,8% Massenanteil) immobilisiert. Nach erfolgreicher Injektion werden die Embryonen aus dem Agarosegel befreit und in eine 38 °C warme, wässrige Lösung von 1,5% (Massenanteil) Agarose (Type VII, A6560, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) und Tricain-Methansulfonat (0,012 mg mL<sup>-1</sup>) gegeben. Anschließend wird die Probe mit einer Spritze in einen FEP-Schlauch (Durchmesser 2,34 mm, Wandstärke 0,23 mm, Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland) gezogen, welcher darauffolgend an einem Edelstahlstab befestigt wird. Dieser wird in die Rotationsplattform des Mikroskops gespannt. Der Schlauch mit der Probe ragt nach unten in die Probenkammer hinein, welche mit E3 Medium und Tricain-Methansulfonat (0,012 mg mL<sup>-1</sup>) gefüllt ist.

Die Bilder wurden mit dem in Kapitel 3 beschriebenen Lichtscheibenmikroskop aufgenommen. Die Probe wurde beidseitig mit Gaußstrahlen beleuchtet. Zur Anregung der Makrophagen (Tg(mpeg1:EGFP)) und Blutgefäße (Tg(kdrl:mCherry)) wurden Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm (80 µW Gesamtleistung) und 561 nm (13,2 µW Gesamtleistung) verwendet. Die Nanopartikel wurden von einem Laser mit einer Wellenlänge von 642 nm (326 µW Gesamtleistung) angeregt. Die Fluoreszenz wurde mit dem 16× Objektiv

eingesammelt. Die einzelnen Farbkanäle wurden sequenziell über einen Zeitraum von bis zu 20 Stunden vermessen. Die 3D Bildstapel der Zeitreihe enthalten je nach räumlicher Lage der Probe zwischen 80 - 150 Scheiben mit einem Abstand von  $2\ \mu\text{m}$ , welche mit einer Bildrate von  $25\ \text{s}^{-1}$  aufgenommen wurden. Die Aufnahmen wurden unter Verwendung der konfokalen Spaltdetektion mit einer Belichtungszeit von  $0,5\ \text{ms}$  angefertigt, was einer Spaltbreite von  $8,5\ \mu\text{m}$  entspricht. Zur Reduktion der Datenmenge sowie zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wird ein  $2 \times 2$ -Pixelbinning verwendet, d.h., die Bildscheiben haben eine Größe von  $1024 \times 1024$  Pixeln und decken ein Beobachtungsfeld von  $825\ \mu\text{m} \times 825\ \mu\text{m}$  ab. Die Bilddaten werden nach der Messung lokal zwischengespeichert und später auf den LSDF Online Storage übertragen.

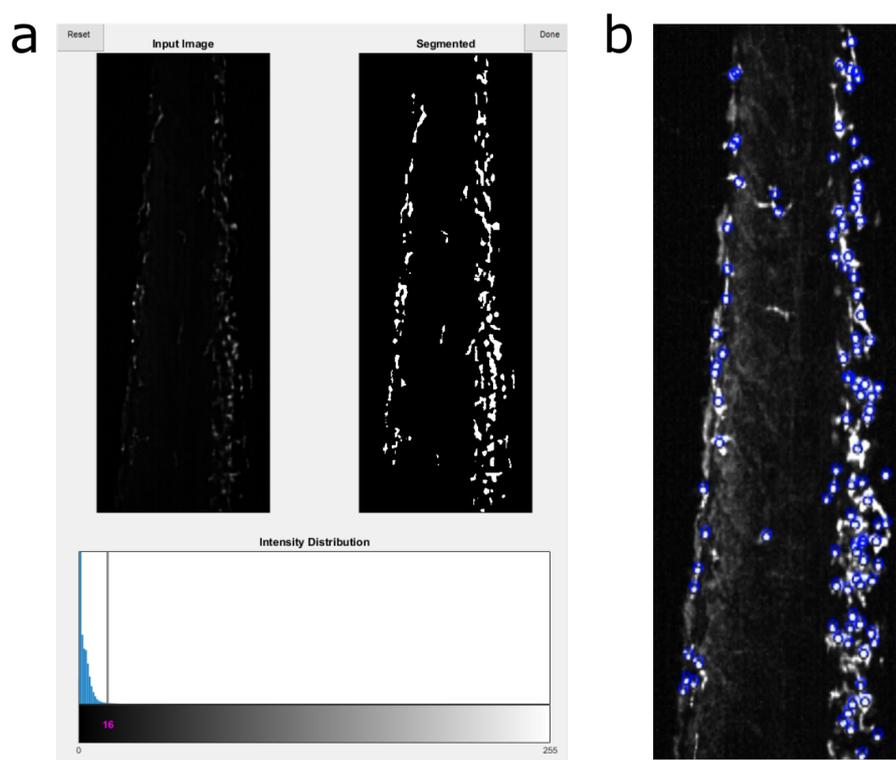
Die Datenanalyse beginnt mit einer kompakten Visualisierung der Langzeitmessung. Hierzu werden die Maximumintensitätsprojektionen der drei Farbkanäle übereinandergelegt und ein Video über die gesamte Messdauer erstellt. Auf diese Weise kann frühzeitig festgestellt werden, ob unerwartete Probleme während der Messung aufgetaucht sind. Außerdem lassen sich erste qualitative Beobachtungen machen. So lässt sich beispielsweise erkennen, dass sich die Makrophagen bevorzugt im Bereich der Kaudalvene sowie des dorsalen, longitudinalen Anastomosengefäßes aufhalten. Es ist ebenfalls leicht zu erkennen, dass die Nanopartikel im Bereich der Kaudalvene akkumulieren. Abbildung 7.2 zeigt einen Zeitpunkt aus einem solchen Video.



**Abbildung 7.2.:** Maximumintensitätsprojektion eines 3D Bildstapels mit drei Farbkanälen. Die Makrophagen sind in gelb, die Nanopartikel in cyan und die Blutgefäße in magenta dargestellt.

Um auch quantitative Aussage über das Bewegungsverhalten der Makrophagen treffen zu können, müssen aus den Bilddaten die Ortskoordinaten aller Makrophagen extrahiert und daraus deren Trajektorien rekonstruiert werden. Für die Bearbeitung dieser Aufgabe wurde ein MATLAB-Skript verwendet, welches auf den LSDF Online Storage zugreift und die einzelnen Zeitpunkte des Makrophagenkanals nacheinander segmentiert. Dies stellt aufgrund der Datenmenge eine gewisse Herausforderung dar. Zur Beschleunigung des Prozesses wird daher zunächst vom Nutzer ein Beobachtungsbereich abgefragt, welcher anhand des ersten Zeitpunktes bestimmt und dann für alle weiteren übernommen wird. Das Programm nimmt ebenfalls ein Bild entgegen, welches den Kamerahintergrund definiert, und das von allen Bildern subtrahiert wird. Zuletzt muss noch eine Punktspreizfunktion eingegeben werden. Diese wird zur Dekonvolution der Bilder verwendet, was eine robustere Binarisierung anhand eines Intensitätsschwellwertes ermöglicht. Der Schwellwert wird vom Nutzer anhand eines Zeitpunktes eingestellt und für alle weiteren übernommen. Dabei hilft eine Gegenüberstellung von Maximumintensitätsprojektion und Ergebnis der Binarisierung (Abbildung 7.3a). Das binäre Bild wird mittels morphologischer Operationen (Matlab-Funktion *bwmorph3* „clean“ und „fill“) von isolierten Ereignissen (Rauschen) bereinigt. Mit der Matlab-Funktion *bwlabeln* unterscheidet dann getrennte Objekte

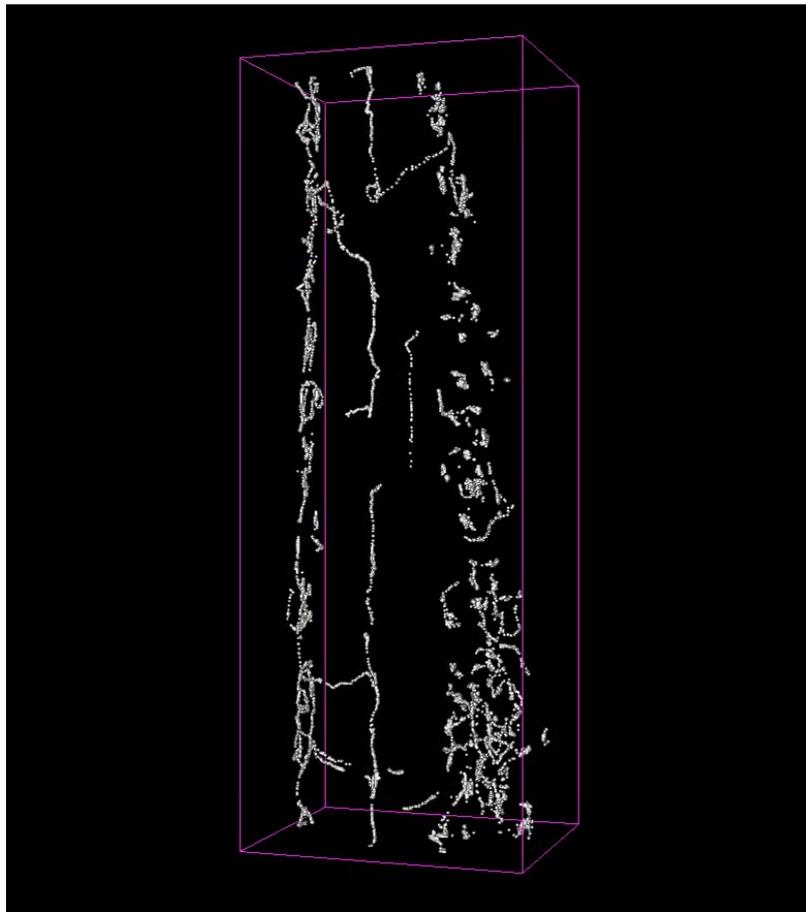
(Makrophagen) und kennzeichnet diese. Von jedem Objekt werden die Koordinaten des Intensitätsschwerpunktes sowie die integrierte Helligkeit und Größe (Anzahl der Voxel) bestimmt. Zur Überprüfung aller Zeitpunkte gibt das Programm ein Video aus, welches die Maximumintensitätsprojektion der Bilder mit den extrahierten Koordinaten überlagert (Abbildung 7.3b). Zudem wird die Liste der Zeitpunkte mit den extrahierten Koordinaten und Parametern ausgegeben und abgespeichert.



**Abbildung 7.3.:** (a) Maximumintensitätsprojektion eines 3D Bildstapels (links) und Resultat der Binarisierung (rechts) bei einem vom Nutzer anhand des Intensitätshistogramms (unten) eingestellten Schwellwertes. (b) Überlagerung der Maximumintensitätsprojektion eines Zeitpunktes mit den Schwerpunktskoordinaten der segmentierten Objekte.

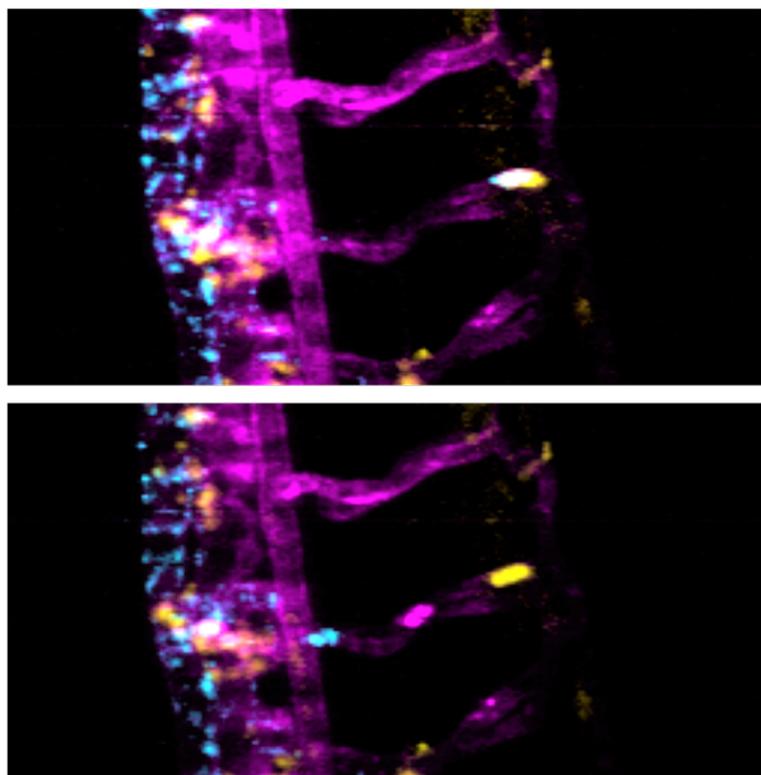
Diese einfache Form der intensitätsbasierten Segmentierung funktioniert gut für diese Anwendung, da die Makrophagen sich deutlich vom Hintergrund (durch Autofluoreszenz) abheben. Dennoch erscheinen nicht alle Makrophagen gleich hell, sodass auch bei einem umsichtig gewählten Schwellwert manche Makrophagen nicht erkannt werden. Eine mögliche Verbesserung ließe sich durch eine Segmentierung erreichen, die nicht allein auf der Bildintensität beruht. Beispielsweise könnte der Gradient der Intensität genutzt werden, welcher an den Rändern von Objekten räumlich korreliert ist [162]. Das entscheidende Problem kann allerdings auch dadurch nicht behoben werden. Dieses ist dadurch gegeben, dass zwei Makrophagen, die sich in großer räumlicher Nähe zueinander befinden, nicht voneinander getrennt werden können und somit als ein geschlossenes Objekt erkannt werden.

Die durch das Segmentierungsprogramm erstellte Liste mit den extrahierten Koordinaten und Parametern wird in ein weiteres Matlab-Skript eingelesen. Dieses konvertiert zunächst die Einheiten der Koordinaten von Pixeln zu Mikrometern. Anschließend werden Eingabeparameter für die Partikelverfolgung abgefragt, die maximale Verschiebung zwischen aufeinanderfolgenden Zeitpunkten, die Mindestlänge der Trajektorien und die Anzahl der räumlichen Dimensionen. Diese werden an eine Funktion „track.m“ übergeben, welche die aus den Koordinaten der Makrophagen zu den einzelnen Zeitpunkten zusammenhängende Trajektorien konstruiert [163]. Die resultierenden Trajektorien werden von dem Programm mit verschiedenen Farben in einer dreidimensionalen Darstellung visualisiert. Dadurch lässt sich leicht erkennen, ob bei der Rekonstruktion der Pfade grobe Fehler gemacht wurden. Anschließend werden für alle Trajektorien verschiedene Kennzahlen berechnet. Dazu gehören die Anzahl an Trajektorien, die Pfadlänge (sowohl in zeitlich als auch räumlich), die Momentangeschwindigkeit zu jedem Zeitpunkt sowie die Durchschnittsgeschwindigkeit und der Mäander-Index. Letzterer ist definiert als das Verhältnis zwischen Abstand des Start- und Endpunktes einer Trajektorie zu ihrer Pfadlänge [164]. Dadurch wird also die Geradlinigkeit einer Trajektorie charakterisiert, wobei ein Wert von 1 einer vollständig geraden Strecke entspricht. Ein Beispiel für auf diese Weise rekonstruierte, dreidimensionale Trajektorien ist in Abbildung 7.4 gegeben. Hier lässt sich erkennen, dass die Makrophagen im Bereich der Kaudalvene (in der Abbildung rechts) eher ortsgebunden sind, da die Pfade ungerichtet und dicht gepackt erscheinen. Der Mäander-Index für diese Pfade ist kleiner als 0,3. Entlang des dorsalen, longitudinalen Anastomosengefäßes (im Bild links) erscheinen die Pfade etwas mehr in Richtung des Blutgefäßes ausgerichtet zu sein. Besonders stark ausgerichtete Pfade liegen lateral vor. Dort befinden sich die in diesem Stadium noch schwach ausgeprägten parachordalen Gefäße. Hier nimmt der Mäander-Index Werte um 0,6 an.



**Abbildung 7.4.:** 3D Rendering der Makrophagentrajektorien. Rechts befindet sich die Kaudalvene, links das dorsale, longitudinale Anastomosengefäß. Dazwischen sind stark gerichtete Pfade entlang der parachordalen Gefäße zu erkennen.

Bei den gerichteten Pfaden handelt es sich nicht um Makrophagen, welche im Blutstrom mitschwimmen. Die Flussgeschwindigkeit des Blutes ist so groß, dass wesentlich höhere Bildraten benötigt werden, um ein im Blut schwimmendes Objekt zu verfolgen. Tatsächlich wandern die Makrophagen jedoch entlang dieser Gefäße. Dieses Verhalten wurde bereits in anderen Studien beobachtet und scheint den primären Modus der Migration darzustellen [165]. Solche Beobachtungen unterstreichen nochmals die Wichtigkeit von In-vivo-Experimenten, da solch ein Verhalten bei isolierten Makrophagen nicht beobachtbar ist. Eine weitere interessante Beobachtung, die im Rahmen dieser Experimente gemacht werden konnte, ist ein mögliches Zusammenspiel zwischen Makrophagen und endothelialen Fresszellen. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 7.5 gezeigt. Dort ist ein Makrophage zu erkennen, welcher scheinbar ein mit Nanopartikeln gefülltes extrazelluläres Vesikel einer Endothelzelle aufgenommen hat. Möglicherweise bilden die Endothelzellen nach Einverleibung der Nanopartikel solche Vesikel und geben sie an Makrophagen weiter. Eine frühere Studie hat ebenfalls Evidenzen für einen solchen Transfer gefunden [166].



**Abbildung 7.5.:** Maximumintensitätsprojektion zweier aufeinanderfolgender Zeitpunkte. Die Makrophagen sind in gelb, die Nanopartikel in cyan und die Blutgefäße in magenta dargestellt. Oben: Im rechten Teil des Bildes lässt sich eine weiße Struktur, also eine Überlagerung aus allen Farbkanälen, erkennen. Dies ist ein Makrophage, der möglicherweise ein mit Nanopartikeln gefülltes extrazelluläres Vesikel einer Endothelzelle aufgenommen hat. Unten: Im darauffolgenden Bild schwimmt der Makrophage mit der Blutströmung davon. Aufgrund der sequenziellen Aufnahme der Farbkanäle wird die Bewegung ersichtlich. Zuerst wurde der Makrophagenkanal aufgenommen, dann die Blutgefäße und schließlich die Nanopartikel.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Trajektorien der Makrophagen unter verschiedenen Umständen in je drei Individuen untersucht. Zum einen wurden Embryonen ohne Injektion von Nanopartikeln betrachtet, um das (mit Ausnahme der Messung selbst) ungestörte Verhalten zu beobachten. Als Nächstes wurden den Embryonen eine Phenolrotlösung ohne Nanopartikel gespritzt. Dies ist notwendig, um eine Reaktion auf die Nanopartikel von einer möglichen Reaktion auf den Injektionsvorgang selbst zu unterscheiden. Schließlich wurden auch Nanopartikel mit injiziert. In Bezug auf das Makrophagenverhalten (Anzahl, bevorzugte Aufenthaltsorte, Bewegungsgeschwindigkeit) konnten dabei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Einer weiteren Gruppe wurde 10 min vor der Injektion mit Nanopartikeln eine Dextransulfatlösung (Dextransulfat Natriumsalz, Sigma-Aldrich, Endkonzentration  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) gespritzt. Dies blockiert die Aufnahme der Nanopartikel durch Endothelzellen [159]. Dadurch erhöht sich die Last auf den Makrophagen. Allerdings zeigt sich dies ebenfalls nicht in den Parametern ihrer Bewegungspfade. Allerdings besteht

bei diesen Analysen noch Potential zur Verbesserung, und weitere Parameter müssen für eine aussagekräftige Studie betrachtet werden.

Die verwendeten Verfahren zur Segmentierung und zur Rekonstruktion der Trajektorien führen in bestimmten Fällen zu Fehlern. Wandert ein Makrophage beispielsweise tiefer in die Probe hinein, nimmt die gemessene Intensität der Fluoreszenz aufgrund von Streuung und Absorption auf dem Weg zum Kamerasensor ab, wodurch sie unter den Schwellwert der Segmentierung fallen könnte. Wie zuvor erwähnt, können auch Makrophagen in großer räumlicher Nähe zueinander gegebenenfalls nicht korrekt voneinander getrennt werden. Und selbst wenn sie korrekt getrennt werden können, ist es möglich, dass kombinatorische Fehler bei der Rekonstruktion der Pfade auftreten. Ganz allgemein stellt die quantitative Analyse großer Datenmengen eine herausfordernde Aufgabe dar. Die Verfahren zur Extraktion bestimmter Kenngrößen müssen gut an die jeweilige Fragestellung angepasst werden und bei der Interpretation der Ergebnisse ist große Vorsicht geboten. Werden diese Bedingungen erfüllt, bietet sich jedoch großes Potential, um neue Erkenntnisse auf Basis belastbarer Daten zu gewinnen.



## 8. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Ansätze untersucht, welche die Bildqualität und Datenanalyse im Bereich der dreidimensionalen Fluoreszenzmikroskopie - insbesondere der Lichtscheibenmikroskopie - optimieren sollen. Zum einen wurde untersucht, wie die Bildqualität von unterschiedlichen Beleuchtungsmustern beeinflusst wird. Zum anderen wurden Methoden der Bilddatenverarbeitung entwickelt, welche Korrekturen an den gemessenen Bildern vornehmen oder die Information mehrerer Bilder mit reduziertem Zeitaufwand fusionieren.

Die Eigenschaften des Beleuchtungsstrahls sind entscheidend für die Bildqualität in der Lichtscheibenmikroskopie. Unterschiedliche Strahlen wurden in Bezug auf Länge, Breite des Hauptmaximums und insgesamt Breite der Anregung verglichen und ihre Auswirkungen auf den Abbildungsprozess anhand unterschiedlicher Proben untersucht. Dadurch konnte eine Datengrundlage erstellt werden, auf welcher die Auswahl der Lichtscheibe für bestimmte Anwendungen erfolgen kann. Gauß-Strahlen bieten für die organismische Bildgebung eine gute Auflösung, Leistungseffizienz und hohen Kontrast, sind jedoch anfällig für Streifenartefakte, welche sich durch Techniken wie der beidseitigen Beleuchtung oder Multi-view Dekonvolution jedoch kompensieren lassen.

Um dem Problem unerwünschter Hintergrund- und Rauschbeiträge in fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen zu begegnen, wurde ein Algorithmus entwickelt, welcher basierend auf den Prinzipien der Wavelet-Transformation das Eingabebild in Komponenten unterschiedlicher Raumfrequenzen zerlegt. Anhand der Breite der Punktspreizfunktion werden das gewünschte Signal und der Hintergrund unterschieden, dessen Intensitätsverteilung aus der Zerlegung rekonstruiert werden kann. Bezüglich des Rauschens wird analog verfahren. Die rekonstruierten Bilder können dann vom Eingabebild subtrahiert werden. Die Leistungsfähigkeit des Algorithmus wurde anhand von synthetischen Daten evaluiert. Im Vergleich mit anderen Software- und Hardware-basierten Methoden zur Hintergrundkorrektur erzielte der entwickelte Algorithmus gute Ergebnisse.

Mittels Multi-view Dekonvolution lassen sich Bilder fusionieren, welche dasselbe Objekt aus unterschiedlichen Blickrichtungen zeigen, um so Kontrast und Auflösung zu verbessern. Jedoch benötigt das rechenaufwändige Verfahren viel Zeit - insbesondere, wenn hunderte oder tausende solcher Fusionen im Rahmen von Langzeitmessungen zu berechnen sind. Durch eine Approximation der Punktspreizfunktion konnte das Verfahren im Rahmen dieser Arbeit beschleunigt werden. Die Anwendung der 2D+1D Multi-view Dekonvolution auf synthetische sowie experimentelle Daten zeigte eine Verbesserung der Bildqualität gegenüber einer reinen zweidimensionalen Approximation bei vernachlässigbar verlängerter Rechenzeit.

Darüber hinaus wurden Bildanalysen im Hinblick auf spezielle biologische Fragestellungen durchgeführt. Ziele waren die Vermessung von Blutgefäßen einerseits sowie die Verfolgung und Charakterisierung der Makrophagenbewegungen als Antwort auf Injektion von Nanopartikeln andererseits.

Durch die in dieser Arbeit entwickelten Methoden konnte die Qualität und Geschwindigkeit der Verarbeitung dreidimensionaler Daten verbessert werden. Mithilfe von speziell entwickelten Softwarelösungen konnte der Automatisierungsgrad mehrerer Prozesse erhöht werden, wodurch eine schnellere, zuverlässigere und bequemere Durchführung der Messungen und Auswertungen ermöglicht wurde. Die Lichtscheibenfluoreszenzmikroskopie ist eine faszinierende Methode, deren großes Potential noch lange nicht ausgeschöpft ist. Durch die fortlaufende Verbesserung besonders im Bereich der Prozessierung und des Managements der großen Datenmengen wird die Technik hoffentlich weiter wachsende Verbreitung und zunehmende Anwendung finden, um interessante biologische Fragestellungen zu beantworten und den Fortschritt biomedizinischer Verfahren voranzutreiben.

# Literatur

1. Rosai, J. Why microscopy will remain a cornerstone of surgical pathology. *Lab. Invest.* **87**, 403–408 (2007).
2. Kubitscheck, U. *Fluorescence microscopy: from principles to biological applications* 2. Aufl. (John Wiley & Sons, 2017).
3. Lee, D., Ryu, S., Kim, U., Jung, D. & Joo, C. Color-coded LED microscopy for multi-contrast and quantitative phase-gradient imaging. *Biomed. Opt. Express* **6**, 4912–4922 (2015).
4. Sauer, M., Hofkens, J. & Enderlein, J. *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from ensemble to single molecules* (John Wiley & Sons, 2010).
5. Icha, J., Weber, M., Waters, J. C. & Norden, C. Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *BioEssays* **39**, 1700003 (2017).
6. <https://www.fpbases.org/protein/egfp/>. letzter Zugriff: 07.03.2022.
7. Suzuki, T., Matsuzaki, T., Hagiwara, H., Aoki, T. & Takata, K. Recent advances in fluorescent labeling techniques for fluorescence microscopy. *Acta. Histochem. Cytochem.* **40**, 131–137 (2007).
8. Higashijima, S.-i. Transgenic zebrafish expressing fluorescent proteins in central nervous system neurons. *Dev. Growth Diff.* **50**, 407–413 (2008).
9. Stuart, G. W., McMurray, J. V. & Westerfield, M. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* **103**, 403–412 (1988).
10. Saleh, B. E. & Teich, M. C. *Optik und Photonik* 3. Aufl. (John Wiley & Sons, 2020).
11. Amos, B., McConnell, G. & Wilson, T. *Confocal Microscopy in Comprehensive Biophysics* (Hrsg. Egelman, E. H.) (Elsevier, Amsterdam, 2012).
12. Sage, D. *et al.* DeconvolutionLab2: An open-source software for deconvolution microscopy. *Methods* **115**, 28–41 (2017).
13. Tobin, W. Alfred Donné and Léon Foucault: The First Applications of Electricity and Photography to Medical Illustration. *J. Vis. Commun. Med.* **29**, 6–13 (2006).
14. Michel, K. *Die wissenschaftliche und angewandte Photographie: Band 10: Die Mikrophotographie* (Springer-Verlag, 1962).
15. Gouveia, L. C. P. & Choubey, B. Advances on CMOS image sensors. *Sens. Rev.* **36**, 231–239 (2016).
16. Murphy, D. B. & Davidson, M. W. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging* (John Wiley & Sons, 2002).

17. Bigas, M., Cabruja, E., Forest, J. & Salvi, J. Review of CMOS image sensors. *Microelectron. J.* **37**, 433–451 (2006).
18. Theuwissen, A. J. CMOS image sensors: State-of-the-art. *Solid-State Electron.* **52**, 1401–1406 (2008).
19. Shannon, C. E. Communication in the presence of noise. *Proc. IRE* **37**, 10–21 (1949).
20. Becker, K. *et al.* Deconvolution of light sheet microscopy recordings. *Sci. Rep.* **9**, 17625 (2019).
21. Neitz, J., Carroll, J. & Neitz, M. Color vision: Almost reason enough for having eyes. *Opt. Photonics News* **12**, 26–33 (2001).
22. Bovik, A. C. *The essential guide to image processing* (Academic Press, 2009).
23. Solomon, C. & Breckon, T. *Fundamentals of Digital Image Processing: A practical approach with examples in Matlab* (John Wiley & Sons, 2011).
24. Richardson, W. Bayesian-based iterative method of image restoration. *J. Opt. Soc. Am.* **62**, 55–59 (1972).
25. Lucy, L. An iterative technique for the rectification of observed distributions. *Astron. J.* **79**, 745–754 (1974).
26. Zeng, G. L. Gibbs artifact reduction by nonnegativity constraint. *J. Nucl. Med. Technol.* **39**, 213–219 (2011).
27. De Freitas Zampolo, R. & Seara, R. *A comparison of image quality metric performances under practical conditions.* in *IEEE Int. Conf. Image Processing 3* (IEEE), 1192–1195.
28. Gabor, D. Theory of communication. *Proc. Inst. Electr. Eng.* **93**, 429–457 (1946).
29. Mallat, S. G. A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **11**, 674–693 (1989).
30. Grgic, S., Grgic, M. & Zovko-Cihlar, B. Performance analysis of image compression using wavelets. *IEEE Trans. Ind. Electron.* **48**, 682–695 (2001).
31. Masquelin, A. H., Cheney, N., Kinsey, C. M. & Bates, J. H. Wavelet decomposition facilitates training on small datasets for medical image classification by deep learning. *Histochem. Cell Biol.* **155**, 309–317 (2021).
32. Chen, C. & Hsiao, C. Haar wavelet method for solving lumped and distributed-parameter systems. *IEE Proc. Control Theory Appl.* **144**, 87–94 (1997).
33. Siedentopf, H. & Zsigmondy, R. A. Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser. *Ann. Phys.* **315**, 1–39 (1902).
34. Voie, A. H., Burns, D. & Spelman, F. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *J. Microsc.* **170**, 229–236 (1993).
35. Huisken, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J. & Stelzer, E. H. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* **305**, 1007–1009 (2004).

- 
36. Wan, Y., McDole, K. & Keller, P. J. Light-sheet microscopy and its potential for understanding developmental processes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **35**, 655–681 (2019).
  37. Santi, P. A. Light sheet fluorescence microscopy: a review. *J. Histochem. Cytochem.* **59**, 129–138 (2011).
  38. Mondal, P. P. A perspective on light sheet microscopy and imaging: Applications across the breadth of applied physics and biophysics. *Appl. Phys. Lett.* **119**, 160502 (2021).
  39. Keller, P. J., Schmidt, A. D., Wittbrodt, J. & Stelzer, E. H. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science* **322**, 1065–1069 (2008).
  40. Fahrbach, F. O., Simon, P. & Rohrbach, A. Microscopy with self-reconstructing beams. *Nat. Photonics* **4**, 780–785 (2010).
  41. Baumgart, E. & Kubitscheck, U. Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection. *Opt. Express* **20**, 21805–21814 (2012).
  42. Kromm, D., Thumberger, T. & Wittbrodt, J. Chapter 5 - An eye on light-sheet microscopy in *The Zebrafish* (Hrsg. Detrich, H. W., Westerfield, M. & Zon, L. I.) 105–123 (Academic Press, 2016).
  43. Albert-Smet, I. *et al.* Applications of light-sheet microscopy in microdevices. *Front. Neuroanat.* **13**, 1 (2019).
  44. Peng, X., Huang, X., Du, K., Liu, H. & Chen, L. High spatiotemporal resolution and low photo-toxicity fluorescence imaging in live cells and in vivo. *Biochem. Soc. Trans.* **47**, 1635–1650 (2019).
  45. Shaw, P., Agard, D., Hiraoka, Y. & Sedat, J. Tilted view reconstruction in optical microscopy. Three-dimensional reconstruction of *Drosophila melanogaster* embryo nuclei. *Biophys. J.* **55**, 101–110 (1989).
  46. Preibisch, S., Rohlfing, T., Hasak, M. P. & Tomancak, P. Mosaicing of single plane illumination microscopy images using groupwise registration and fast content-based image fusion. *Proc. SPIE* **6914**, 69140E (2008).
  47. Rubio-Guivernau, J. L. *et al.* Wavelet-based image fusion in multi-view three-dimensional microscopy. *Bioinformatics* **28**, 238–245 (2012).
  48. Preibisch, S. *et al.* Efficient Bayesian-based multiview deconvolution. *Nat. Methods* **11**, 645–648 (2014).
  49. Schmid, B. & Huisken, J. Real-time multi-view deconvolution. *Bioinformatics* **31**, 3398–3400 (2015).
  50. Truong, T. V., Supatto, W., Koos, D. S., Choi, J. M. & Fraser, S. E. Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy. *Nat. Methods* **8**, 757–760 (2011).
  51. Dean, K. M., Roudot, P., Welf, E. S., Danuser, G. & Fiolka, R. Deconvolution-free subcellular imaging with axially swept light sheet microscopy. *Biophys. J.* **108**, 2807–2815 (2015).

52. Keller, P. J. *et al.* Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet–based structured-illumination microscopy. *Nat. Methods* **7**, 637–642 (2010).
53. Wohland, T., Shi, X., Sankaran, J. & Stelzer, E. H. Single plane illumination fluorescence correlation spectroscopy (SPIM-FCS) probes inhomogeneous three-dimensional environments. *Opt. Express* **18**, 10627–10641 (2010).
54. Jahr, W., Schmid, B., Schmied, C., Fahrbach, F. O. & Huisken, J. Hyperspectral light sheet microscopy. *Nat. Commun.* **6**, 7990 (2015).
55. Hedde, P. N., Cinco, R., Malacrida, L., Kamaid, A. & Gratton, E. Phasor-based hyperspectral snapshot microscopy allows fast imaging of live, three-dimensional tissues for biomedical applications. *Commun. Biol.* **4**, 721 (2021).
56. Friedrich, M., Gan, Q., Ermolayev, V. & Harms, G. S. STED-SPIM: Stimulated Emission Depletion Improves Sheet Illumination Microscopy Resolution. *Biophys. J.* **100**, L43–L45 (2011).
57. Gohn-Kreuz, C. & Rohrbach, A. Light-sheet generation in inhomogeneous media using self-reconstructing beams and the STED-principle. *Opt. Express* **24**, 5855–5865 (2016).
58. Köbele, L. & Rohrbach, A. A shape-switch-block method for confocal light-sheet microscopy with sectioned Bessel beams and stimulated emission depletion. *Commun. Phys.* **3**, 201 (2020).
59. Hahn, V. *et al.* Light-sheet 3D microprinting via two-colour two-step absorption. *Nat. Photonics* **16**, 784–791 (2022).
60. Olarte, O. E., Andilla, J., Gualda, E. J. & Loza-Alvarez, P. Light-sheet microscopy: a tutorial. *Adv. Opt. Photon.* **10**, 111–179 (2018).
61. Power, R. M. & Huisken, J. A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging. *Nat. Methods* **14**, 360–373 (2017).
62. Girkin, J. M. & Carvalho, M. T. The light-sheet microscopy revolution. *J. Opt.* **20**, 053002 (2018).
63. Schäfer, B. *Weiterentwicklung der Lichtscheibenmikroskopie zur vierdimensionalen Abbildung lebender Zellen und Organismen* Diplomarbeit (Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2013).
64. Mertes, J. *Methoden zur Auflösungsverbesserung und Bildgebung von Transportmechanismen am Lichtscheibenmikroskop* Diplomarbeit (Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2014).
65. Cui, Y. *Implementation of a Spatial Light Modulator to Enable Gaussian and Bessel Beam Illumination on a Digital Scanned Laser Light Sheet Microscope* Masterarbeit (Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2017).
66. Hüpfel, M., Kobitski, A. Y., Zhang, W. & Nienhaus, G. U. Wavelet-based background and noise subtraction for fluorescence microscopy images. *Biomed. Opt. Express* **12**, 969–980 (2021).

- 
67. <https://www.thorlabs.com/thorproduct.cfm?partnumber=CDA1>. letzter Zugriff: 17.03.2023.
  68. Minsky, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* **10**, 128–138 (1988).
  69. Fahrbach, F. O. & Rohrbach, A. Propagation stability of self-reconstructing Bessel beams enables contrast-enhanced imaging in thick media. *Nat. Commun.* **3**, 632 (2012).
  70. <https://www.scc.kit.edu/forschung/11843.php>. letzter Zugriff: 18.03.2023.
  71. Oliveira, F. P. & Tavares, J. M. R. Medical image registration: a review. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* **17**, 73–93 (2014).
  72. Brown, L. G. A Survey of Image Registration Techniques. *ACM Comput. Surv.* **24**, 325–376 (1992).
  73. Temerinac-Ott, M. *et al.* Multiview Deblurring for 3-D Images from Light-Sheet-Based Fluorescence Microscopy. *IEEE Trans. Image Process.* **21**, 1863–1873 (2012).
  74. Wang, M. & Li, P. A review of deformation models in medical image registration. *J. Med. Biol. Eng.* **39**, 1–17 (2019).
  75. Swoger, J., Verveer, P., Greger, K., Huisken, J. & Stelzer, E. H. Multi-view image fusion improves resolution in three-dimensional microscopy. *Opt. Express* **15**, 8029–8042 (2007).
  76. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
  77. <https://imagej.net/software/fiji/>. letzter Zugriff: 04.04.2023.
  78. Schmid, B. *et al.* 3Dscript: animating 3D/4D microscopy data using a natural-language-based syntax. *Nat. Methods* **16**, 278–280 (2019).
  79. <https://bene51.github.io/3Dscript/>. letzter Zugriff: 04.04.2023.
  80. Preibisch, S., Saalfeld, S. & Tomancak, P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics* **25**, 1463–1465 (2009).
  81. Fedorov, A. *et al.* 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magn. Reson. Imaging* **30**, 1323–1341 (2012).
  82. <https://www.slicer.org>. letzter Zugriff: 04.04.2023.
  83. Vettenburg, T. *et al.* Light-sheet microscopy using an Airy beam. *Nat. Methods* **11**, 541–544 (2014).
  84. Kafian, H., Lalenejad, M., Moradi-Mehr, S., Birgani, S. A. & Abdollahpour, D. Light-sheet fluorescence microscopy with scanning non-diffracting beams. *Sci. Rep.* **10**, 8501 (2020).
  85. Fahrbach, F. O., Gurchenkov, V., Alessandri, K., Nassoy, P. & Rohrbach, A. Self-reconstructing sectioned Bessel beams offer submicron optical sectioning for large fields of view in light-sheet microscopy. *Opt. Express* **21**, 11425–11440 (2013).

86. Antonacci, G., Domenico, G. D., Silvestri, S., DelRe, E. & Ruocco, G. Diffraction-free light droplets for axially-resolved volume imaging. *Sci. Rep.* **7**, 17 (2017).
87. Di Domenico, G., Ruocco, G., Colosi, C., DelRe, E. & Antonacci, G. Cancellation of Bessel beam side lobes for high-contrast light sheet microscopy. *Sci. Rep.* **8**, 17178 (2018).
88. Chen, B.-C. *et al.* Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science* **346**, 1257998 (2014).
89. Mimori-Kiyosue, Y. Imaging mitotic processes in three dimensions with lattice light-sheet microscopy. *Chromosome Res.* **29**, 37–50 (2021).
90. Zhu, J., Zhu, K., Ding, N. & Wang, T. Tricomi beams and nondiffracting sheet beams. *Results Phys.* **28**, 104627 (2021).
91. Cao, R. *et al.* Optical-resolution photoacoustic microscopy with a needle-shaped beam. *Nat. Photon.* **17**, 89–95 (2023).
92. Remacha, E., Friedrich, L., Vermot, J. & Fahrbach, F. O. How to define and optimize axial resolution in light-sheet microscopy: a simulation-based approach. *Biomed. Opt. Express* **11**, 8–26 (2020).
93. Stockhausen, A. *et al.* Hard-wired lattice light-sheet microscopy for imaging of expanded samples. *Opt. Express* **28**, 15587–15600 (2020).
94. Shi, Y., Daugird, T. A. & Legant, W. R. A quantitative analysis of various patterns applied in lattice light sheet microscopy. *Nat. Commun.* **13**, 4607 (2022).
95. Chang, B.-J., Dean, K. M. & Fiolka, R. Systematic and quantitative comparison of lattice and Gaussian light-sheets. *Opt. Express* **28**, 27052–27077 (2020).
96. Liu, G. *et al.* Characterization, comparison, and optimization of lattice light sheets. *Sci. Adv.* **9**, eade6623 (2023).
97. Aakhte, M., Akhlaghi, E. A. & Müller, H.-A. J. SSPIM: a beam shaping toolbox for structured selective plane illumination microscopy. *Sci. Rep.* **8**, 10067 (2018).
98. Piedrahita-Quintero, P., Castañeda, R. & Garcia-Sucerquia, J. Numerical wave propagation in ImageJ. *Appl. Opt.* **54**, 6410–6415 (2015).
99. Mohan, K., Purnapatra, S. B. & Mondal, P. P. Three Dimensional Fluorescence Imaging Using Multiple Light-Sheet Microscopy. *PLOS ONE* **9**, 1–8 (2014).
100. Chang, B.-J. *et al.* Universal light-sheet generation with field synthesis. *Nat. Methods* **16**, 235–238 (2019).
101. Zhao, T. *et al.* Multicolor 4D fluorescence microscopy using ultrathin Bessel light sheets. *Sci. Rep.* **6**, 26159 (2016).
102. Gao, L. Optimization of the excitation light sheet in selective plane illumination microscopy. *Biomed. Opt. Express* **6**, 881–890 (2015).
103. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, 253–310 (1995).

- 
104. Ricci, P. *et al.* Removing striping artifacts in light-sheet fluorescence microscopy: a review. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **168**, 52–65 (2022).
  105. Huisken, J. & Stainier, D. Y. Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM). *Opt. Lett.* **32**, 2608–2610 (2007).
  106. Li, M. & Huang, Z.-L. Rethinking resolution estimation in fluorescence microscopy: from theoretical resolution criteria to super-resolution microscopy. *Sci. China Life Sci.* **63**, 1776–1785 (2020).
  107. Licea-Rodriguez, J. *et al.* Multicolor fluorescence microscopy using static light sheets and a single-channel detection. *J. Biomed. Opt.* **24**, 016501 (2019).
  108. Koho, S. *et al.* Fourier ring correlation simplifies image restoration in fluorescence microscopy. *Nat. Commun.* **10**, 3103 (2019).
  109. Valm, A. M. *et al.* Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. *Nature* **546**, 162–167 (2017).
  110. Bates, M., Huang, B., Dempsey, G. T. & Zhuang, X. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* **317**, 1749–1753 (2007).
  111. Sahl, S. J., Hell, S. W. & Jakobs, S. Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 685–701 (2017).
  112. Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. Where do we stand with super-resolution optical microscopy? *J. Mol. Biol.* **428**, 308–322 (2016).
  113. Kobitski, A. Y. *et al.* An ensemble-averaged, cell density-based digital model of zebrafish embryo development derived from light-sheet microscopy data with single-cell resolution. *Sci. Rep.* **5**, 8601 (2015).
  114. Alsberg, B. K., Woodward, A. M. & Kell, D. B. An introduction to wavelet transforms for chemometricians: a time-frequency approach. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **37**, 215–239 (1997).
  115. Walczak, B. & Massart, D. Noise suppression and signal compression using the wavelet packet transform. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **36**, 81–94 (1997).
  116. Do, M. & Vetterli, M. The contourlet transform: an efficient directional multiresolution image representation. *IEEE Trans. Image Process.* **14**, 2091–2106 (2005).
  117. Starck, J.-L., Candes, E. & Donoho, D. The curvelet transform for image denoising. *IEEE Trans. Image Process.* **11**, 670–684 (2002).
  118. Lee, G., Gommers, R., Waselewski, F., Wohlfahrt, K. & O’Leary, A. PyWavelets: A Python package for wavelet analysis. *J. Open Source Softw.* **4**, 1237 (2019).
  119. <https://github.com/NienhausLabKIT/HuepfelM/>. letzter Zugriff: 02.01.2023.
  120. Sternberg, S. R. Biomedical image processing. *Computer* **16**, 22–34 (1983).
  121. Kruizinga, P. & Petkov, N. Computational model of dot-pattern selective cells. *Biol. Cybern.* **83**, 313–325 (2000).

122. Khater, I. M., Nabi, I. R. & Hamarneh, G. A Review of Super-Resolution Single-Molecule Localization Microscopy Cluster Analysis and Quantification Methods. *Patterns* **1**, 100038 (2020).
123. Hell, S. W. & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 780–782 (1994).
124. Klar, T. A. & Hell, S. W. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* **24**, 954–956 (1999).
125. Eggeling, C. *et al.* Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**, 1159–1162 (2009).
126. Hedde, P. N. *et al.* Stimulated emission depletion-based raster image correlation spectroscopy reveals biomolecular dynamics in live cells. *Nat. Commun.* **4**, 2093 (2013).
127. Gao, P., Prunsche, B., Zhou, L., Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. Background suppression in fluorescence nanoscopy with stimulated emission double depletion. *Nat. Photonics* **11**, 163–169 (2017).
128. Zhang, W., Noa, A., Nienhaus, K., Hilbert, L. & Nienhaus, G. U. Super-resolution imaging of densely packed DNA in nuclei of zebrafish embryos using stimulated emission double depletion microscopy. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **52**, 414001 (2019).
129. Prunsche, B. *Höchstaufgelöste optische Nanoskopie und Fluktuationsspektroskopie zur Untersuchung biophysikalischer Prozesse* Diss. (Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe, 2018).
130. Gao, P. & Nienhaus, G. U. Precise background subtraction in stimulated emission double depletion nanoscopy. *Opt. Lett.* **42**, 831–834 (2017).
131. Descloux, A. C., Grussmayer, K. S. & Radenovic, A. Parameter-free image resolution estimation based on decorrelation analysis. *Nat. Methods* **16**, 918–924 (2019).
132. Bai, C. *et al.* Imaging Enhancement of Light-Sheet Fluorescence Microscopy via Deep Learning. *IEEE Photonics Technol. Lett.* **31**, 1803–1806 (2019).
133. Weigert, M. *et al.* Content-aware image restoration: pushing the limits of fluorescence microscopy. *Nat. Methods* **15**, 1090–1097 (2018).
134. Yang, L., Zhang, Y., Guldner, I. H., Zhang, S. & Chen, D. Z. *Fast background removal in 3D fluorescence microscopy images using one-class learning* in *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention* (2015), 292–299.
135. Zhang, X. *et al.* Deep learning optical-sectioning method. *Opt. Express* **26**, 30762–30772 (2018).
136. Riegerova, P. *et al.* Expression and localization of A $\beta$ PP in SH-SY5Y cells depends on differentiation state. *J. Alzheimer's Dis.* **82**, 485–491 (2021).
137. Akalestou-Clocher, A., Kalamara, V., Topalis, P. & Garinis, G. A. SpotitPy: a semi-automated tool for object-based co-localization of fluorescent labels in microscopy images. *BMC Bioinform.* **23**, 439 (2022).

- 
138. Hüpfel, M. *et al.* Two plus one is almost three: a fast approximation for multi-view deconvolution. *Biomed. Opt. Express* **13**, 147–158 (2022).
  139. LeGoff, L. & Lecuit, T. Mechanical forces and growth in animal tissues. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, a019232 (2016).
  140. Weber, M. & Huisken, J. Light sheet microscopy for real-time developmental biology. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 566–572 (2011).
  141. Kapsokalyvas, D. *et al.* Multiview deconvolution approximation multiphoton microscopy of tissues and zebrafish larvae. *Sci. Rep.* **11**, 10160 (2021).
  142. Guo, M. *et al.* Rapid image deconvolution and multiview fusion for optical microscopy. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1337–1346 (2020).
  143. Styner, M., Brechbuhler, C., Szckely, G. & Gerig, G. Parametric estimate of intensity inhomogeneities applied to MRI. *IEEE Trans. Med. Imaging* **19**, 153–165 (2000).
  144. Mukherjee, D. & Ratnaparkhi, M. V. On the functional relationship between entropy and variance with related applications. *Commun. Stat. - Theory Methods* **15**, 291–311 (1986).
  145. Pauls, S., Geldmacher-Voss, B. & Campos-Ortega, J. A. A zebrafish histone variant H2A. F/Z and a transgenic H2A. F/Z: GFP fusion protein for in vivo studies of embryonic development. *Dev. Genes Evol.* **211**, 603–610 (2001).
  146. Krzic, U., Gunther, S., Saunders, T. E., Streichan, S. J. & Hufnagel, L. Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging. *Nat. Methods* **9**, 730–733 (2012).
  147. Schmid, B. *et al.* High-speed panoramic light-sheet microscopy reveals global endodermal cell dynamics. *Nat. Commun.* **4**, 2207 (2013).
  148. Liepsch, D. *Biofluidmechanik : Grundlagen und Anwendungen* (Springer Berlin Heidelberg, 2022).
  149. Conway, E. M., Collen, D. & Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc. Res.* **49**, 507–521 (2001).
  150. Kondrychyn, I. *et al.* Marcksl1 modulates endothelial cell mechanoreponse to haemodynamic forces to control blood vessel shape and size. *Nat. Commun.* **11**, 5476 (2020).
  151. Klems, A. *et al.* The GEF Trio controls endothelial cell size and arterial remodeling downstream of Vegf signaling in both zebrafish and cell models. *Nat. Commun.* **11**, 5319 (2020).
  152. Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. *Taschenlehrbuch Histologie* (Thieme, 2019).
  153. Chávez, M. N., Aedo, G., Fierro, F. A., Allende, M. L. & Egaña, J. T. Zebrafish as an emerging model organism to study angiogenesis in development and regeneration. *Front. Physiol.* **7**, 56 (2016).
  154. Qin, X. *et al.* In-vivo 3D imaging of Zebrafish's intersegmental vessel development by a bi-directional light-sheet illumination microscope. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **557**, 8–13 (2021).

155. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 16014 (2016).
156. Dal, N.-J. K. *et al.* Zebrafish embryos allow prediction of nanoparticle circulation times in mice and facilitate quantification of nanoparticle–cell interactions. *Small* **16**, 1906719 (2020).
157. Hayashi, Y. *et al.* Differential nanoparticle sequestration by macrophages and scavenger endothelial cells visualized in vivo in real-time and at ultrastructural resolution. *ACS Nano* **14**, 1665–1681 (2020).
158. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and molecular immunology* (Elsevier, Saunders, 2012).
159. Campbell, F. *et al.* Directing nanoparticle biodistribution through evasion and exploitation of Stab2-dependent nanoparticle uptake. *ACS Nano* **12**, 2138–2150 (2018).
160. <https://nanopartikel.info/basics/querschnittsthemen/nanoplastik-in-der-umwelt/>. letzter Zugriff: 15.04.2023.
161. Jeevanandam, J., San Chan, Y. & Danquah, M. K. Zebrafish as a model organism to study nanomaterial toxicity. *Emerg. Sci. J.* **3**, 195–208 (2019).
162. Silberberg, M. & Grecco, H. E. Robust and unbiased estimation of the background distribution for automated quantitative imaging. *J. Opt. Soc. Am. A* **40**, C8–C15 (2023).
163. Crocker, J. C. & Grier, D. G. Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *J. Colloid Interface Sci.* **179**, 298–310 (1996).
164. Lau, D. *et al.* Intravital imaging of adoptive T-cell morphology, mobility and trafficking following immune checkpoint inhibition in a mouse melanoma model. *Front. Immunol.* **11**, 1514 (2020).
165. Kaveh, A. *et al.* Live imaging of heart injury in larval zebrafish reveals a multi-stage model of neutrophil and macrophage migration. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 579943 (2020).
166. Rességuier, J. *et al.* Biodistribution of surfactant-free poly (lactic-acid) nanoparticles and uptake by endothelial cells and phagocytes in zebrafish: Evidence for endothelium to macrophage transfer. *J. Control. Release* **331**, 228–245 (2021).

## A. Publikationsliste

- Manuel Hüpfel, Andrei Yu. Kobitski, Weichun Zhang and G. Ulrich Nienhaus Wavelet-based background and noise subtraction for fluorescence microscopy images. *Biomed. Opt. Express* **12**, 969-980 (2021)
- Manuel Hüpfel, Manuel Fernández Merino, Johannes Bennemann, Masanari Takamiya, Sepand Rastegar, Anja Tursch, Thomas W. Holstein and G. Ulrich Nienhaus Two plus one is almost three: A fast approximation for multi-view deconvolution. *Biomed. Opt. Express* **13**, 147-158 (2022)
- Manuel Hüpfel and G. Ulrich Nienhaus Beam shaping in light-sheet microscopy: an experimental comparison. *in preparation*



## B. Betreute Abschlussarbeiten

- Jan Niclas Heiden:  
**Verbesserung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses eines Lichtscheibenmikroskops mit konfokaler Spaltdetektion durch sektionierte Bessel-Strahlen**  
Bachelorarbeit, 2019
- Johannes Bennemann:  
**Beschleunigung der Dekonvolution und Registrierung von Bilddaten eines Lichtscheibenmikroskops mit Grafikprozessoren**  
Bachelorarbeit, 2020
- Manuel Fernández Merino:  
**GPU-enhanced multiview deconvolution for rapid processing of light-sheet microscopy images**  
Masterarbeit, 2020
- Jonas Funk:  
**Manipulation des Rückprojektors in Dekonvolutionsalgorithmen und deren Anwendung in der Lichtscheibenmikroskopie**  
Bachelorarbeit, 2021



## C. Danksagungen

Während meiner Promotion war es mir möglich, viele außergewöhnliche Dinge zu sehen, zu lernen und zu tun, was ich als großes Privileg empfinde und wofür ich zutiefst dankbar bin. Diese Erfahrungen werden mir mein Leben lang eine Quelle der Inspiration bleiben. Viele Menschen haben direkt oder indirekt dazu beigetragen. Ihnen gebührt mein herzlichster Dank.

**Prof. Dr. Gerd Ulrich Nienhaus.** Durch Ihre Arbeit haben Sie den Rahmen für diese Dissertation geschaffen. Die Mittel und Strukturen, welche ihre Arbeitsgruppe bieten, stellen eine unverzichtbare Grundlage für diese sowie viele andere Arbeiten dar. Ich danke Ihnen für Ihren unermüdlichen Einsatz für meine Projekte, ihre fachliche Kompetenz und den stets ehrlichen und freundlichen Umgang.

**Prof. Dr. Heinz Kalt.** Vielen Dank, dass Sie die Aufgabe des Zweitgutachters für diese Arbeit übernommen haben. Außerdem danke ich Ihnen für die Organisation des Optics & Photonics Seminars, welches eine Bereicherung für mich war.

**Dr. Andrei Yu Kobitski.** Herzlichsten Dank für das tolle Mikroskop, die komfortable Steuersoftware, die gute Zusammenarbeit, die Hilfe bei etlichen technischen Problemen sowie die hilfreichen Diskussionen.

**Dr. Karin Nienhaus.** Deine Tür steht im wahrsten Sinne des Wortes stets jedem offen, der eine Frage oder ein Problem hat. Danke für viele gute Antworten und Ratschläge, nette Gespräche sowie das sorgfältige Korrekturlesen vieler Texte.

**Manuel F. Merino, Johannes Bennemann, Jan Heiden, Jonas Funk.** Probleme lassen sich leichter und schneller lösen, wenn man nicht alleine damit beschäftigt ist. Vielen Dank für die freundschaftliche Zusammenarbeit und eure wertvollen Beiträge.

**Dr. Rui Ma und Dr. Jens Lackner.** Thank you Rui for sharing your office with me and helping with so many little problems that I encountered when beginning my work. Danke Jens, dass ich dich immer stören durfte, wenn ich etwas Ablenkung oder eine zweite Meinung brauchte.

**Dr. Takamiya Masanari und Anja Tursch.** Ich danke euch für die faszinierenden Proben und die freundliche Kollaboration.

**AG Nienhaus & APH.** Auch an interessanter Arbeit kann man die Lust verlieren, wenn man keine netten Kollegen hat. Ich danke allen Beschäftigten der AG Nienhaus für den

freundlichen Umgang und die große Hilfsbereitschaft. Ferner gilt mein Dank auch den anderen Mitarbeitern des APH, insbesondere dem Sekretariat und der elektronischen sowie feinmechanischen Werkstatt.

**Robert Lepple.** Höflichkeit, Integrität, Disziplin, Durchhaltevermögen und ein unbezwingbarer Geist sind die Grundsätze des Taekwondo, welche ich in deiner Schule gelernt habe und die maßgeblich zu meinen Erfolgen beitragen. 감사합니다.

**Monika und Edwin Hüpfel.** Für eure bedingungslose Unterstützung und harte Arbeit, die mir so viele Dinge in meinem Leben ermöglicht hat, bin ich euch unendlich dankbar. Bessere Eltern hätte ich mir nicht wünschen können.

**Dimitrina Kamenova.** Danke, dass du an meiner Seite bist und mein Leben so viel glücklicher und sorgloser machst. Обичам те, моето мишленце.

Des Weiteren danke ich all meinen Studienkolleginnen und -kollegen sowie meinem Taekwondo-Team für die Begleitung und Unterstützung auf meinem Weg.