

Friedrich Walter Schenk

Hochdurchsatz-Mikroskopie von Mikrotiterplatten auf Basis einer kontinuierlichen Objektbewegung



Hochdurchsatz-Mikroskopie von Mikrotiterplatten auf Basis einer kontinuierlichen Objektbewegung

High-throughput microscopy of microtiter plates based on a continuous object movement

Von der Fakultät für Maschinenwesen
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Ingenieurwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Friedrich Walter Schenk

Berichter:

Univ.-Prof. Dr.-Ing. Robert Heinrich Schmitt
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Marc van Zandvoort

Tag der mündlichen Prüfung: 23. September 2016

ERGEBNISSE AUS DER PRODUKTIONSTECHNIK

Friedrich Walter Schenk

Hochdurchsatz-Mikroskopie von Mikrotiterplatten
auf Basis einer kontinuierlichen Objektbewegung

Herausgeber:

Prof. Dr.-Ing. Dr.-Ing. E. h. Dr. h. c. Dr. h. c. F. Klocke

Prof. Dr.-Ing. Dipl.-Wirt. Ing. G. Schuh

Prof. Dr.-Ing. C. Brecher

Prof. Dr.-Ing. R. H. Schmitt

Band 32/2016



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Friedrich Walter Schenk:

Hochdurchsatz-Mikroskopie von Mikrotiterplatten auf Basis einer kontinuierlichen Objektbewegung

1. Auflage, 2016

Apprimus Verlag, Aachen, 2016
Wissenschaftsverlag des Instituts für Industriekommunikation und Fachmedien
an der RWTH Aachen
Steinbachstr. 25, 52074 Aachen
Internet: www.apprimus-verlag.de, E-Mail: info@apprimus-verlag.de

ISBN 978-3-86359-475-6

D 82 (Diss. RWTH Aachen University, 2016)

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Produktionsmesstechnik am Fraunhofer-Institut für Produktionstechnologie IPT in Aachen. Hier hatte ich die Möglichkeit, fünf Jahre lang interdisziplinär zu arbeiten und zu forschen. Einerseits promovierte ich als Diplom-Ingenieur der Elektro- und Informationstechnik innerhalb der Fakultät für Maschinenwesen, andererseits bearbeitete ich vor allem Themen im Bereich des *Life Sciences Engineering*. So entstand auch die Forschungsidee zur vorliegenden Arbeit aus einem interdisziplinären Projekt heraus, das die Entwicklung der *StemCellFactory* zum Ziel hatte, der weltweit ersten Anlage zur vollautomatisierten Produktion induziert pluripotenter Stammzellen.

Für die Betreuung der Promotion danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.-Ing. Robert Schmitt vom Lehrstuhl für Fertigungsmesstechnik und Qualitätsmanagement am WZL der RWTH Aachen. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Marc van Zandvoort für die Übernahme des Koreferats danken. Er veranstaltete im Jahr 2013 die Mikroskopiekonferenz *Focus on Microscopy* (FOM 2013) in Maastricht, auf der ich meine ersten Ergebnisse zum Promotionsthema vorstellen durfte.

Dass ich ein neues Forschungsfeld zur Hochdurchsatzmikroskopie innerhalb meiner Abteilung am Fraunhofer IPT aufbauen konnte, habe ich auch meinem Oberingenieur Herrn Dipl.-Phys. Niels König zu verdanken, der sich für die Beschaffung eines Labormikroskops aus eigenen Mitteln eingesetzt hat.

Ausschlaggebend für den Erfolg meiner Tätigkeit war neben den bereitgestellten und selbst eingeworbenen Mitteln vor allem die geleistete Arbeit. Hierbei wurde ich tatkräftig von mehreren Studenten unterstützt. Ein besonderer Dank gebührt Herrn Daniel Hardt, der mir in der Endphase der Entwicklungsarbeiten zur Seite stand.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Meine Eltern haben mich und meine vier Geschwister stets unterstützt und gefördert. Am allermeisten bin ich meiner lieben Ehefrau Mareike dankbar. Sie hat nicht nur beim Korrekturlesen dieser Arbeit unermüdlichen Einsatz gezeigt, sondern musste auch an den vielen Feierabenden und Wochenenden, die meiner Promotion zum Opfer gefallen sind, auf mich verzichten. In dieser Zeit hat sie sich allein um unsere beiden Söhne Valentin und Clemens gekümmert. Nun, da diese Arbeit erfolgreich abgeschlossen ist, freue ich mich, wieder mehr für meine Familie da sein zu können.

Aachen, im September 2016

Friedrich Walter Schenk

Zusammenfassung

Die schnelle Mikroskopie großflächiger Proben ist eine praxisrelevante Herausforderung, die in verschiedensten Anwendungen auftritt. Ganz speziell in Bezug auf großflächige unebene Zellkulturgefäße wie Mikrotiterplatten existiert bisher keine schnelle Mikroskopierlösung. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Frage, ob großflächige unebene Proben zur Durchsatzsteigerung aus der Bewegung heraus mikroskopiert werden können ohne Beeinträchtigung der Bildqualität gegenüber herkömmlichen Verfahren.

Die im Rahmen der Arbeit entwickelte Lösung zur Hochdurchsatz-Mikroskopie besteht darin, das Objekt nicht im Stillstand, sondern aus der Bewegung heraus zu mikroskopieren und damit die Positionierzeit zwischen den Einzelaufnahmen erheblich zu reduzieren. Die einzelnen Aufnahmen entstehen in einer deutlich schnelleren Abfolge als beim inkrementellen Scanning, wodurch eine signifikante Durchsatzsteigerung insbesondere beim Mikroskopieren großer Objekte erzielt wird.

Es ist entscheidend für die Akzeptanz dieses beschleunigten Scanverfahrens in der Praxis, dass sich damit eine identische Bildqualität wie bei herkömmlichen, langsamer arbeitenden Verfahren erzielen lässt. Durch einen kontinuierlichen Scanprozess ergeben sich mehrere Effekte, die einen negativen Einfluss auf die Bildqualität haben können und zu Bewegungs- und Fokusunschärfe führen. Um Bewegungsunschärfe zu vermeiden, muss bei schnellen Aufnahmescans die Belichtungszeit entsprechend kurz ausfallen. Zur Vermeidung von Fokusunschärfe ist wegen der geringen Schärfentiefe in der mikroskopischen Abbildung zudem die exakte Einhaltung des Fokusbands zwischen Objektiv und Probe erforderlich. Insbesondere bei Zellkulturgefäßen aus spritzgegossenem Kunststoff ist der Boden aufgrund von Fertigungstoleranzen relativ uneben. Ein Scan mit konstantem Fokus kommt daher selbst bei kleinen Vergrößerungen nicht in Frage. Die erforderliche Fokuskorrektur muss eine hohe Dynamik aufweisen, um beim kontinuierlichen Scanprozess das Objekt bei jeder Aufnahme im Fokus zu halten.

Auf die Vermeidung von Bewegungs- und Fokusunschärfe wird bei dem entwickelten Verfahren besonderer Wert gelegt. Bewegungsunschärfe beim kontinuierlichen Scannen wird durch sehr kurze Belichtungszeiten einer Blitzbeleuchtung wirkungsvoll unterdrückt. Fokusunschärfe während eines solchen Scanvorgangs kann bei Standard-Zellkulturgefäßen mit den üblichen Fertigungstoleranzen durch ein im Rahmen der Arbeit entwickeltes Autofokussystem in Grenzen gehalten werden. Dabei erfolgt die Fokussmessung auf Basis der kurzkohärenten Interferometrie und die Fokuskorrektur durch einen dynamischen und hochgenauen Piezotisch. Damit können Proben in Mikrotiterplatten trotz schwankender Plattenbodendicke während der Bewegung korrekt fokussiert werden. An diesem Punkt scheitern viele Hardware-Fokussverfahren aus dem Stand der Technik. Die Frage, ob sich Objekte aus der Bewegung heraus mikroskopieren lassen ohne Einbußen der Bildqualität gegenüber herkömmlichen Verfahren, die ein stillstehendes Objekt erfordern, lässt sich mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit bejahen.

Summary

Rapid microscopy of large-area samples is a practical challenge which occurs in a variety of applications. Especially for large-area cell culture vessels, such as microtiter plates, no high-throughput microscopy solution is available. The present work addresses the question whether large uneven samples can be microscopically examined while being moved continuously to increase the throughput without compromising image quality compared to conventional methods.

The solution for high-throughput microscopy developed within this work features image acquisition of moving instead of stationary objects which reduces the positioning time between the single exposures considerably. The individual images are captured much faster than with incremental scanning which results in a significant increase in throughput especially when imaging large objects under a microscope.

Crucial for the acceptance of this accelerated scanning procedure in practice is that an image quality identical to conventional, slow-working methods is achievable. Several effects caused by a continuous scanning process may have a negative impact on the image quality and lead to motion and focus blur. To avoid motion blur, the exposure time has to be short for rapid image scans. To avoid focus blur, the exact focal distance between the lens and the sample has to be kept due to the small depth of field in microscopic imaging. Particularly for cell culture vessels made of plastic, the bottom is relatively uneven due to manufacturing tolerances in the injection molding process. Hence, scanning with constant focus is out of question, even at low magnifications. The required focus correction system needs to be highly dynamic to keep the object in focus in every shot during the continuous scan.

In the developed method, special emphasis is put on avoiding motion and focus blur. Motion blur during the continuous scan is suppressed effectively by very short exposure times of a flash illumination. Due to a self-developed autofocus system focus blur is kept within bounds when scanning standard cell culture vessels with the typical manufacturing tolerances. Focus measurement is based on short-coherence interferometry and focus correction on a dynamic and highly precise piezo stage. This allows to correctly focus samples in microtiter plates during a continuous scan despite the fluctuating plate bottom thickness. At this point many state of the art hardware-based focus measurement methods fail. The question whether objects on the move can be examined microscopically without sacrificing image quality compared to conventional methods which require a stationary object can be answered in the affirmative.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Forschungsfragen und Ziele der Arbeit	4
1.2	Aufbau der Arbeit	5
2	Grundlagen	7
2.1	Zellkultur	7
2.2	Messobjekt Mikrotiterplatte	8
2.3	Phasenkontrastmikroskopie	10
2.3.1	Meniskuseffektproblematik	10
2.4	Fokus- und Bewegungsunschärfe	11
2.5	Autofokus	13
2.5.1	Software-Autofokus	16
2.5.2	Hardware-Autofokus	18
2.6	Kurzkohärente Interferometrie	19
3	Mikroskopische Aufnahme- und hochdurchsatzfähige Fokusmessverfahren	25
3.1	Inkrementelles Scanning	25
3.1.1	Grenzen des Verfahrens bei der Zellkulturmikroskopie	27
3.2	Kontinuierliches Scanning	28
3.3	Hochdurchsatzfähige Fokusmessverfahren	31
3.3.1	Schnelle Software-Fokusmessverfahren	31
3.3.2	Schnelle Hardware-Fokusmessverfahren	34
3.4	Fazit zum Stand der Technik	39
4	Schnelles Mikroskopieren aus der Bewegung	41
4.1	Hochdurchsatz-Mikroskopieverfahren	41
4.1.1	Hardwarebasierte Synchronisation der Komponenten	43
4.1.2	Zeitoptimierte Aufnahme von Mikrotiterplatten	44
4.2	Optischer Sensor	46
4.2.1	Beleuchtung	47
4.2.2	Kamera	49
4.3	Schnelle Fokussmessung	59
4.3.1	Kurzkohärenzinterferometer	60
4.3.2	Einkopplung in Mikroskop	63
4.3.3	Interferometerdimensionierung	66
4.3.4	Berechnung der Fokusslage	68
4.3.5	Autofokusstrategie	73
4.3.6	Vergleich mit Software-Fokusmessverfahren	76

4.4	Schnelle Fokuskorrektur	77
4.4.1	Schrittmotor-Objektivantrieb	78
4.4.2	Piezo z-Tisch	79
4.5	Softwarearchitektur	82
4.5.1	Ablaufsteuerung	83
4.5.2	Implementierung	87
4.6	Bildvorverarbeitung	88
4.6.1	<i>Stitching</i>	88
4.6.2	<i>Shading</i> -Korrektur	91
4.6.3	Histogrammnormalisierung und Bittiefenreduktion	93
4.7	Fazit zum schnellen Mikroskopieren	94
5	Validierung des Verfahrens	95
5.1	Vermeidung von Bewegungsunschärfe	96
5.1.1	Charakterisierung der Blitzbeleuchtung	98
5.1.2	Kameraempfindlichkeit	103
5.1.3	Bildschärfe bei verschiedenen Aufnahmeszenarien	105
5.2	Vermeidung von Fokusunschärfe	108
5.2.1	Fokusbildmessung	108
5.2.2	Charakterisierung des Messobjekts	112
5.2.3	Fokuskorrektur	116
5.3	Charakterisierung des Scanvorgangs	121
5.3.1	Positionier- und Triggergenauigkeit	121
5.3.2	<i>Stitching</i> -Algorithmus	126
5.3.3	Einfluss der <i>Shading</i> -Korrektur	127
5.4	Quantifizierung des Zeitbedarfs	128
5.4.1	Fokusscan	129
5.5	Fazit der Validierung	130
6	Zusammenfassung und Ausblick	133
6.1	Ausblick	135
6.1.1	Schnelles Fluoreszenz-Scanning	136
6.1.2	Fokuskorrektur mittels fokusvariabler Linse	136
6.1.3	Kompensation des Meniskuseffekts	137
	Abkürzungsverzeichnis	139
	Symbolverzeichnis	141
	Literaturverzeichnis	145
	Verzeichnis der betreuten studentischen Arbeiten	159
	Anhang: Darstellung der Bilddaten	161

1 Einleitung

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops lassen sich Objekte vergrößert darstellen. In der Biologie, der Medizin und der Materialwissenschaft ist das Mikroskop ein unverzichtbares Hilfsmittel. Viele wissenschaftliche Fortschritte und Erkenntnisse wären ohne die Mikroskopie nicht denkbar gewesen. Auch wenn das Mikroskop von seiner Erfindung vor über 400 Jahren bis heute bereits eine beachtliche Entwicklung vollzogen hat, geht der technische Fortschritt ungebremst weiter. Eine Entwicklungsrichtung besteht in der Sichtbarmachung immer kleinerer Details. In diesem Zusammenhang wurde für die supraaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie (engl. *superresolution*) erst kürzlich im Jahre 2014 der Nobelpreis für Chemie verliehen [138]. Der technische Fortschritt hat zu einer Vielfalt an Mikroskopietechniken geführt, von denen viele erst in den letzten Jahren entwickelt wurden [94].

Diese rasante Entwicklung verdankt die Mikroskopie vor allem Fortschritten aus anderen Technologiefeldern. Bei den Beleuchtungsquellen hat die Laser- und neuerdings auch die LED-Technologie großen Anteil an der Weiterentwicklung. Die digitale Revolution der letzten Jahrzehnte hat ebenfalls nachhaltigen Einfluss auf die Mikroskopie genommen. Moderne Bildsensorik und Computertechnik haben zur digitalen Mikroskopie geführt [152]. Heutzutage werden von einem Mikroskop erzeugte Bilder zur Anzeige, Weiterverarbeitung und Speicherung fast immer digitalisiert. Bei der Auswertung der Bilddaten spielt die digitale Bildverarbeitung die zentrale Rolle. Das fängt bei Bildverbesserungen für die Darstellung an und geht bis zur vollautomatischen Extraktion qualitativer und quantitativer Informationen. Dank der Fortschritte der Computer- und Speichertechnologie ist es möglich, große Bilddatenmengen zu analysieren und zu speichern.

Bei der Mikroskopie reicht es oft nicht nur, winzige Objekte wie einzelne Zellen vergrößert und kontrastreich darzustellen, sondern häufig sollen mikroskopische Details in einem makroskopischen Zusammenhang deutlich werden. Dann geht es darum, großflächige Objekte in mikroskopischer Auflösung in einem akzeptablen zeitlichen Rahmen zu erfassen. Dies betrifft alle Bereiche, in denen Mikroskopie zum Einsatz kommt, sowohl im technischen als auch im biologisch-medizinischen Bereich. Bei technischen Anwendungen stehen häufig Aufgaben der Qualitätskontrolle im Vordergrund, beispielsweise von hochintegrierten Halbleiterbauelementen auf sogenannten *Wafern*. Im Bereich der Biologie liegen großflächige Objekte unter anderem durch Zellverbände vor, die als Zellrasen kultiviert eine ausgedehnte Fläche bilden. Diese muss ebenfalls vollständig mikroskopiert werden, um zum Beispiel das Wachstumsverhalten verlässlich analysieren zu können.

Mikroskopische Analysen in der Zellkultur, bei der Zellen außerhalb des menschlichen Körpers in speziellen Gefäßen kultiviert werden, gehen aber noch viel weiter. Unter dem Begriff des bildbasierten *High-Content Screenings* versteht man eine Sammlung an analytischen Methoden, um unter Einsatz von automatisierter Mikroskopie, Bildverarbeitungsalgorithmen und Visualisierungsformen quantitative Daten von Zellpopulationen zu erheben [29].

Typischerweise werden dabei hochdurchsatzfähige Zellkulturgefäße wie Mikrotiterplatten mit einer Vielzahl an einzelnen Reaktionskammern, sogenannten *Wells*, fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Untersucht werden vorrangig zelluläre und molekulare Dynamiken, Funktionen und Strukturen in speziellen Tests (engl. *Assays*). In diesem Zusammenhang ist auch der Begriff der bildbasierten Zytometrie geläufig, in Anlehnung an die weit verbreitete Durchflusszytometrie zur Untersuchung von Zellen [168]. *High-Content Screenings* zeichnen sich zudem durch einen hohen Einsatz von Automatisierungstechnik aus, wie eine roboterbasierte Handhabung der Probengefäße. In der Pharmaindustrie kommen sie vor allem im Rahmen des Wirkstoff-*Screenings* zum Einsatz [190]. Im akademischen Bereich dienen *High-Content Screening*-Technologien der Erforschung von biologischen Zusammenhängen im Rahmen der Systembiologie [145]. In allen Anwendungsgebieten von *High-Content Screenings* werden umfangreiche Messdaten benötigt, weswegen zahlreiche großflächige Mikrotiterplatten mikroskopiert werden müssen. Eine Hauptherausforderung ist damit der Probendurchsatz.

Im Bereich der biologischen Forschung, zum Beispiel der Hirnforschung, müssen ebenfalls größere Areale mikroskopiert werden, um Zusammenhänge im Kontext des umgebenden Gewebes zu erkennen [31]. Dies gilt genauso bei der Beurteilung von Gewebeschnitten in der Pathologie, wo viele relativ große Objektträger (engl. *Slides*) vollflächig mikroskopiert werden müssen. Derartige Gewebeschnitte werden zunehmend mittels spezieller *Slide*-Scanner digitalisiert. Die Pathologie durchläuft gerade einen Strukturwandel von der manuellen Diagnostik mit analogem Mikroskop hin zur digitalen Diagnostik am Computer [71, 98]. Durch die Entwicklung hin zur digitalen Pathologie werden Arbeitsabläufe erleichtert und optimiert. Daten können weltweit geteilt und anderen Experten zur Verfügung gestellt werden. Die medizinische Versorgung kann durch diese Effizienzsteigerung nachhaltig verbessert werden [194]. Im Rahmen der digitalen Pathologie werden unzählige oft großflächige Gewebeschnitte mikroskopiert und zu hochaufgelösten digitalen Bildern zusammengesetzt. Der Mikroskopie- und Datenspeicherungsaufwand ist dabei sehr hoch. Kommerziell erhältliche *Slide*-Scanner sind für einen hohen Probendurchsatz ausgelegt, aber erst eine signifikante Steigerung der mikroskopischen Aufnahmegeschwindigkeit würde der Entwicklung zum Durchbruch verhelfen.

Beim Mikroskopieren großflächiger Proben ergibt sich, unabhängig von der Anwendung, immer die gleiche Herausforderung: Die Vergrößerungsleistung des Mikroskops führt dazu, dass nur ein kleiner Ausschnitt des Objekts auf dem Kamerasensor abgebildet werden kann. Je höher die Vergrößerung, desto kleiner ist das Sichtfeld, also der Ausschnitt, den die Kamera erfasst. Große zusammenhängende Objekte können daher nur vollständig mikroskopiert werden, indem viele Aufnahmen zu einem großen Bild zusammengefügt werden. Die mikroskopische Gesamtaufnahme ist aufgrund der Vielzahl benötigter Einzelaufnahmen und der damit verbundenen Probenpositionierungsvorgänge üblicherweise ein zeitaufwendiger Prozess. Viele Anwendungen würden von einer Technologie profitieren, mit der großflächige Objekte in kurzer Zeit mikroskopiert werden können.

Die technischen Rahmenbedingungen für eine Hochdurchsatz-Mikroskopielösung sind der Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit. Das Anwendungsbeispiel stammt aus dem Bereich der Zellkultur. Mit den Zellkulturgefäßen, genauer gesagt den Mikrotiterplatten, liegen großflächige Objekte vor, die in kurzer Zeit mikroskopiert werden müssen. Besonders hohe Anforderungen an den Probendurchsatz ergeben sich vor allem bei automatisierten

Zellkulturprozessen, die auf eine Zellproduktion im großen Stil ausgelegt sind. In solchen vollautomatisierten Bioproduktionsanlagen besteht oft die Notwendigkeit, täglich hunderte von Mikrotiterplatten zur Prozesssteuerung und Qualitätskontrolle zu mikroskopieren, wie in [177] beschrieben ist.

Das gilt auch für die *StemCellFactory*¹, eine vollautomatisierte Forschungsanlage zur Erzeugung induziert pluripotenter Stammzellen (iPS-Zellen) und daraus abgeleiteter Zellprodukte für Wirkstoffscreenings, in der eine hochdurchsatzfähige automatisierte Mikroskopierlösung benötigt wird [115]. Im Rahmen des gleichlautenden Forschungsprojekts ist die vorliegende Technologie entwickelt worden. Abbildung 1.1 zeigt das Mikroskopiesystem, das innerhalb der *StemCellFactory* zum Einsatz kommt. In dieser Anlage wird das Mikroskop vollautomatisiert mit Mikrotiterplatten beladen.



Abbildung 1.1: Hochdurchsatz-Mikroskopiesystem in der *StemCellFactory*

Der Probedurchsatz kommerziell verfügbarer Mikroskopielösungen kann die Anforderungen dieser Anlage bei Weitem nicht erfüllen. Denn bei all diesen Systemen ist für jede einzelne Aufnahme ein separater Positioniervorgang erforderlich. Dadurch ergibt sich ein großer Gesamtzeitbedarf vor allem bei hohen Vergrößerungen. Eine besondere Schwierigkeit beim Mikroskopieren von Mikrotiterplatten ergibt sich zudem aus der Tatsache, dass die darin wachsenden Zellen nicht auf einer Höhe liegen. Die Probenebene variiert aufgrund von Fertigungstoleranzen der Mikrotiterplatten erheblich. Die damit einhergehende Notwendigkeit zum ständigen Nachfokussieren ist eines der größten Hindernisse für die Beschleunigung des mikroskopischen Aufnahmevorgangs.

¹Projektwebseite: www.stemcellfactory.de.

1.1 Forschungsfragen und Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese untersucht werden, ob sich großflächige unebene Objekte deutlich schneller mikroskopieren lassen, indem der Aufnahmevorgang während einer kontinuierlichen Objektbewegung erfolgt. Damit lässt sich die zentrale Forschungsfrage ableiten, die durch die Arbeit beantwortet werden soll:

Lassen sich großflächige unebene Objekte zur Durchsatzsteigerung aus der Bewegung heraus mikroskopieren ohne Beeinträchtigung der Bildqualität gegenüber herkömmlichen Verfahren?

Daraus ergeben sich weitere untergeordnete Fragen, die es zu beantworten gilt:

1. Können dabei Bewegungs- und Fokusunschärfe bei Standard-Zellkulturgefäßen mit den üblichen Fertigungstoleranzen vermieden werden?
2. Ist es möglich, die Fokuspositionen ebenfalls während der Objektbewegung zu messen und damit auch den Autofokusvorgang zu beschleunigen?

Mit der Beantwortung dieser Fragen und der Lösung der damit verbundenen Herausforderungen beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Sie beschreibt ein Verfahren zur Hochdurchsatz-Lichtmikroskopie auf Basis einer kontinuierlichen Objektbewegung. Das Anwendungsbeispiel, anhand dessen die Leistungsfähigkeit des entwickelten Verfahrens demonstriert wird, ist das schnelle Mikroskopieren von Mikrotiterplatten. Damit liegt die primäre Anwendung im Bereich der Zellbiologie beziehungsweise der Zellkultur. Trotz der biologischen Anwendung handelt es sich um eine ingenieurwissenschaftliche Arbeit. Dementsprechend sollte sich die naturwissenschaftlich-biologische Leserschaft, die als Anwender stark von dem neuartigen Verfahren profitieren kann, von technischen Ausführungen und Details nicht abschrecken lassen. Wer sich lediglich als Anwender für das Verfahren interessiert, kann sich auf die Lektüre von Abschnitt 4.1 sowie Kapitel 6 beschränken, um die Vorzüge des Verfahrens zu begreifen. Die wesentlichen Erkenntnisse der Arbeit sind zudem in kompakterer Form als *Open Access*-Veröffentlichung² in *Scientific Reports* frei zugänglich.

Das im Rahmen der Arbeit entwickelte Verfahren ist in weiteren Veröffentlichungen mit biologischem Kontext in [172–175, 179] erschienen. Das Aufnahmeprinzip lässt sich mit Standardverfahren wie der Hellfeld- und Phasenkontrastmikroskopie im Auf- und Durchlicht anwenden. Das Hauptaugenmerk dieser Dissertationsschrift ist auf die Hochdurchsatz-Phasenkontrastmikroskopie gerichtet, mit deren Hilfe lebende Zellen kontrastreich ohne Fluoreszenzfärbung und damit ohne zusätzliche Beeinträchtigung mikroskopiert werden können. Im Bereich der Stammzellforschung hat das schonende Phasenkontrastverfahren eine große Bedeutung [87]. Die Zellmorphologie lässt sich damit deutlich besser beurteilen als im Hellfeldverfahren [35].

²<http://www.nature.com/articles/srep34038>