

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. November 2005 (03.11.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/103791 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G02B 21/16**,
21/36, G01N 21/64

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **OLSCHEWSKI**,
Frank [DE/DE]; Mühlweg 9, 69118 Heidelberg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/051282

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. März 2005 (18.03.2005)

(74) Anwalt: **REICHERT, Werner F.**; Leica Microsystems
AG, Corporate Patents + Trademarks Department, Ernst-
Leitz-Strasse 17-37, 35578 Wetzlar (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

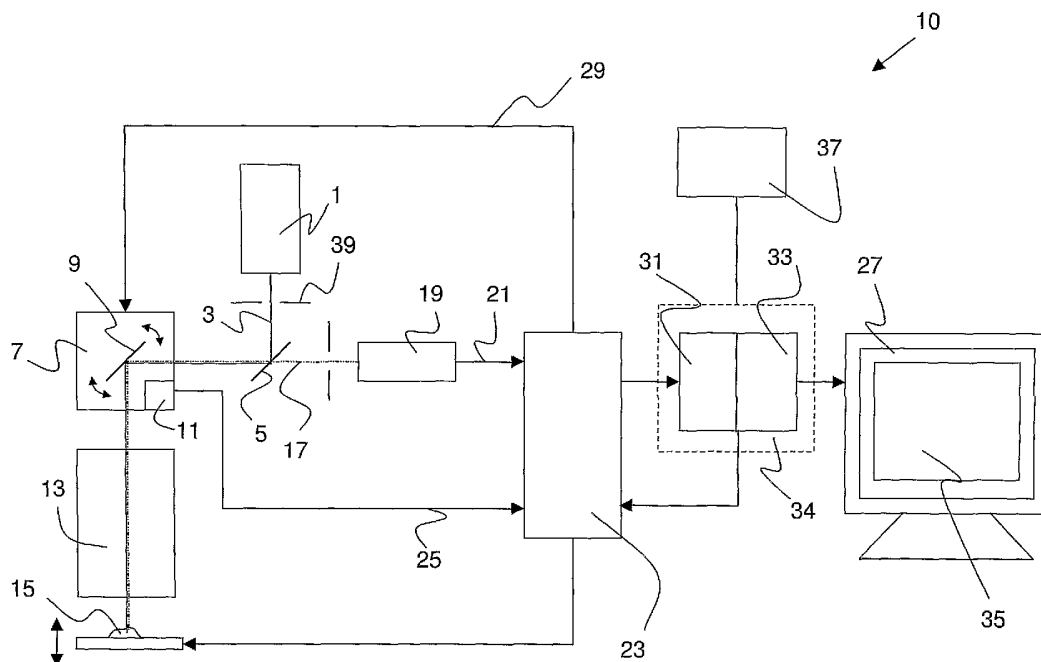
(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 020 064.5 24. April 2004 (24.04.2004) DE

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR CAPTURING STATIC AND FUNCTIONAL DATA

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR AUFNAHME STATISCHER UND FUNKTIONALER DATEN



(57) Abstract: A model reservoir (31) which is used to store an expected model of an object (15) is provided in a device, in particular in a microscope (10), which is used to capture static and functional data of an object (15). In order to visualise an image (35) of the object (15), image data of the object is sorted in a sorting device (33) according to the selected model such that the image (35) of the object (15) can be visualised.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/103791 A1



(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO Patent (BW,

GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für den folgenden Bestimmungsstaat US
 — Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** In einer Vorrichtung insbesondere in einem Mikroskop (10) zur Aufnahme statischer und funktionaler Daten eines Objekts (15) wird ein Modellspeicher (31) zum Ablegen eines erwarteten Modells des Objekts (15) vorgesehen. Zur Visualisierung eines Bildes (35) des Objekts (15) werden Bilddaten des Objekts in einer Sortiereinrichtung (33) in Abhängigkeit von dem gewählten Modell so sortiert, dass ein Bild (35) des Objekts (15) visualisiert werden kann.

**Vorrichtung und Verfahren zur Aufnahme statischer und funktionaler
Daten**

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung insbesondere in einem Mikroskop zur Aufnahme statischer und funktionaler Daten eines Objekts nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 sowie ein Verfahren zur Aufnahme statischer und funktionaler Daten eines Objekts gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 10.

Bei der Untersuchung von Objekten mit Hilfe eines Mikroskops besteht oftmals das Bedürfnis, die dreidimensionale Ausgestaltung der Oberfläche des Objektes zu rekonstruieren. Hierzu kann beispielsweise die konfokale Scanmikroskopie eingesetzt werden. Dabei wird eine Probe mit dem Fokus eines Lichtstrahls punktweise in einer Ebene abgetastet, sodass ein Bild, allerdings mit geringer Tiefenschärfe, dieser Ebene erhalten wird. Durch die Aufnahme einer Mehrzahl von verschiedenen Ebenen und durch eine entsprechende Bildverarbeitung kann das Objekt dann dreidimensional dargestellt werden. Ein derartiges konfokale Scanmikroskopieverfahren ist beispielsweise aus der US 6,128,077 bekannt.

Bei der mikroskopischen Untersuchung von Objekten ist es oftmals erforderlich, bestimmte Teile oder Eigenschaften des Objektes durch Färbung zu kennzeichnen. Damit kann beispielsweise die Struktur und damit die Morphologie in Zellen und Geweben differenziert und kontrastreich sichtbar gemacht werden. Wie aus der US 6,055,097 bekannt ist, können hierzu in eine Probe Farbstoffe eingebracht werden, die sich zum einen an spezifische Bereiche des Objektes anlagern und die zum andern unter geeigneten Beleuchtungsbedingungen abhängig vom eingesetzten Farbstoff in unterschiedlichen Farben fluoreszieren, sodass mit der Bestrahlung die Lokalisierung der Farbstoffe

in der Probe möglich wird. Zur Erzeugung eines räumlichen Bildes kann dann eine Anzahl von Bildern in unterschiedlichen Fokusebenen aufgenommen werden. Jedes dieser Bilder enthält Bildinformationen, die unmittelbar aus der Fokusebene stammen, ebenso wie solche Bildinformationen, die aus Raumabschnitten des Objektes stammen, die außerhalb der Fokusebene liegen. Zur Ermittlung eines scharfen Bildes ist es erforderlich, die nicht aus der Fokusebene stammenden Bildanteile zu eliminieren. Insbesondere bei der Untersuchung lebender Objekte, wie etwa lebender Zellen, können nach dem Einfärben des Objektes bzw. dem Einbringen von Farbstoffen in das Objekt Informationen über Teilbereiche des Objektes durch Anregung dieser Farbstoffe gewonnen werden. Die meisten Farbstoffe lagern sich jeweils nur an spezifischen Teilen des Objekts an. Zum Beispiel ist es möglich, den Zellkern mit einem ersten Farbstoff und das Cytoskelett mit einem zweiten Farbstoff zu markieren. Die beiden Objektbereiche können dann nach der Anregung durch unterschiedliche Fluoreszenzfarben voneinander getrennt und lokalisiert werden.

Außer den Farbstoffen zur Kennzeichnung bestimmter statischer Bereiche eines Objekts sind auch Farbstoffe bekannt, mit denen bestimmte funktionelle Vorgänge in dem Objekt sichtbar gemacht werden können. Diese Farbstoffe ändern die Intensität oder die Wellenlänge und damit die Farbe des fluoreszierten Lichts, wenn bestimmte funktionelle Vorgänge in den Objektbereichen ablaufen, in denen die Farbstoffe eingebracht sind. Speziell können die funktionellen Vorgänge der Fluss von Ionen oder etwa die Präsenz eines Proteins in der Nähe des markierten Bereichs sein. Am meisten haben sich solche Farbstoffe bewährt, die beim Ablauf funktioneller Vorgänge im Objekt ihre Fluoreszenzfarbe ändern, aber auch Intensitätsändernde sind vielfach in Benutzung.

Die beiden Kennzeichnungsmöglichkeiten eines Objekts können nun miteinander kombiniert werden, so dass sowohl die Markierung statischer Strukturen des Objekts wie auch die Kennzeichnung bestimmter funktioneller Abläufe im Objekt erfolgt. Hierzu wird das Objekt mit verschiedenen Farbstoffen gekennzeichnet. Die einen kennzeichnen dabei die statischen Eigenschaften des Ob-

jekts. Andere Farbstoffe reagieren durch Änderung ihrer Farbe oder Intensität auf bestimmte physiologische, sogenannte funktionelle Vorgänge im Objekt und werden an solchen Stellen des Objekts angelagert, an denen derartige funktionelle Vorgänge vorstatten gehen. Diese Kennzeichnung erlaubt nun im

5 Prinzip die gleichzeitige Beobachtung statischer Eigenschaften des Objekts und die Lokalisierung und Auswertung funktioneller Vorgänge. In der Praxis ist man allerdings mit dem Problem konfrontiert, dass mit der Anregung des Objektes eine Überlagerung/Mischung von Fluoreszenzfarben sichtbar wird, wobei die Farben nicht mehr getrennt oder den statischen Eigenschaften oder

10 funktionellen Vorgängen direkt zugeordnet werden können. Derartige Mischungen lassen sich vom Auge selber nicht gut trennen. So können sich im Fluoreszenzbild beispielsweise Variationen wiederfinden, die im Orangen ablaufen, während gleichzeitig eine Struktur im Grünen und eine andere im Roten vorliegt. Für das menschliche Auge ist es äußerst schwierig, aus diesem

15 Farbgemenge eindeutige Zuordnungen zu treffen. Somit ist es kaum möglich Analysen durchzuführen, die einen Rückschluss auf die ablaufenden funktionellen Vorgänge und die gekennzeichneten statischen Strukturen erlauben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur gleichzeitigen Aufnahme statischer und funktionaler Daten eines Objekts bereitzustellen, mit dem es möglich ist, eine Zuordnung der ermittelten Daten zu statischen Strukturen und funktionellen Vorgängen in einem Objekt zu gewährleisten.

20

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch eine Vorrichtung zur Aufnahme statischer und funktionaler Daten eines Objekts mit Merkmalen gemäß Anspruch 1 sowie durch ein Verfahren zur Aufnahme statischer und funktionaler Daten eines Objekts mit den Merkmalen den gemäß Anspruch 10 gelöst.

25

Erfindungsgemäß wird eine Vorrichtung insbesondere Mikroskop bereitgestellt, die einen Modellspeicher zum Speichern eines erwarteten Modells des Objekts aufweist. Weiterhin ist eine „Sortiereinrichtung“ vorgesehen, die es

30 ermöglicht, die vom Objekt kommenden Daten in Abhängigkeit von dem gespeicherten Modell zu sortieren. Aus diesen so sortierten Daten kann dann

eine Visualisierung des Objektes erzeugt werden. Somit kann die erfasste Mischung von Fluoreszenzfarben numerisch getrennt werden.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden zur Erzeugung eines Bildes des Objekts mit einer Erfassungseinheit Objektdaten aufgenommen. In einem Mo-
5 dellspeicher ist ein Modell hinterlegt, welches zum erwarteten Objektbild korrespondiert. Die Daten werden in Abhängigkeit von dem hinterlegten Modell sortiert. Aus den sortierten Daten kann dann eine Visualisierung erzeugt werden.

Der Vorteil der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des erfindungsgemäßen
10 Verfahrens besteht nun gerade darin gleichzeitig statische und funktionale Daten von einem Objekt, insbesondere einem lebenden Objekt erfassen zu können. Ganz allgemein wird es damit möglich, die funktionellen Daten besser lokalisieren zu können, d. h. den Ablauf der Funktion lokal besser zuordnen zu können. Insbesondere bei der Untersuchung lebender biologischer Objekte ist
15 dies von großem Vorteil. In der Biologie werden hierbei in der Regel spezielle Farbstoffe in die Probe eingebracht, die sich dann z. B. über Antikörperkoppelung an bestimmten statischen Bestandteilen der Zelle fixieren, etwa am Cytoskelett, ER und andere. Diese Farbstoffe werden so gewählt, dass sie sehr statisch sind, d. h. sich im wesentlichen nicht verändern und damit eine sehr
20 genaue Kennzeichnung statischer morphologischer Strukturen des Objekts erzeugen.

Funktionelle Informationen über Vorgänge im Objekt sind an die Physiologie des zu untersuchenden Objekts gekoppelt. Um diese erkennen zu können, werden spezielle Farbstoffe eingesetzt, die ihre spektralen Eigenschaften oder
25 ihre Intensität beim Ablauf der Vorgänge ändern. Diese Farbstoffe werden an eine in dem Objekt vorkommende Substanz gekoppelt, sodass diese messbar wird. Generell sind also die Eigenschaften dieser Farbstoffe dynamisch.

Insbesondere in einem Konfokalmikroskop lässt sich die Erfindung vorteilhaft einsetzen. Sie kann aber ohne weiteres auch in anderen Fluoreszenzmikro-
30 skopen mit spektraler Detektion verwendet werden. Oft ist hierbei eine ent-

sprechende Anzahl von Filtern, SP-Modulen, Meta-Modulen oder weiteren Komponenten erforderlich.

Die Information, die aus einem solchen Objekt gewonnen werden kann lässt sich als Intensitätsvektor $\vec{I}$ darstellen:

$$5 \quad \vec{I} = \begin{pmatrix} I_1 \\ \vdots \\ I_n \end{pmatrix}$$

Ebenso ist eine kompatible spektrale Darstellung der Form

$$\vec{I}(\lambda) = I(\lambda_{start} + n\Delta\lambda) = I_n \text{ möglich.}$$

Werden von dem Objekt Daten erfasst, die auf reinen Farbstoffen basieren, die zur Kennzeichnung morphologischer Strukturen dienen, also statische Bereiche des Objekt repräsentieren, so erhält man die entsprechenden Farbstoffspektren

10

$$\vec{I} = I_0 \vec{\varepsilon}_i.$$

Entsprechend ergibt sich für die Messung eines Gemisches solcher Farbstoffe die Superposition

$$15 \quad \vec{I} = \sum a_i \vec{\varepsilon}_i,$$

wobei die a_i die Dichte des Farbstoffs an der jeweiligen Stelle widerspiegeln.

Bei der Messung funktionaler Farbstoffe, die nur Intensitätsvariationen aufweisen ergibt sich als Messergebnis eine Intensität von

$$\vec{I} = I_{stoff} \vec{\varepsilon}_i,$$

wobei I_{stoff} zur Weiterverarbeitung, etwa der Berechnung der Ionenkonzentration herangezogen werden kann.

Als funktionale Farbstoffe können allerdings auch solche gewählt werden, die Spektralvariationen aufweisen. In diesem Fall ergibt sich die Intensität zu

$$5 \quad \vec{I} = I_0(\alpha \vec{r}_1 + \beta \vec{r}_2)$$

wobei $\vec{r}_1, \vec{r}_2$ die begrenzende Randspektren – also die puren Ausprägungen der spektralen Lichtverteilung in physiologischen Extremsituationen – sind und der Vektor (α, β) zur weiteren Verarbeitung, etwa zur Berechnung der Ionenkonzentration herangezogen werden kann.

- 10 In der Praxis nun schließen sich die Intensitätsvariation und die Spektralvariation gegenseitig aus. Beide können jedoch jeweils mit den Methoden zur statischen Kennzeichnung des Objekts kombiniert werden.

- Erfindungsgemäß wird nun zur Erzeugung einer Visualisierung eines Objekts die Fluoreszenz des Objektes erfasst, also eine Menge von Vektoren I_i aufgenommen. In dem Modellspeicher wird ein Modell hinterlegt, das dem Benutzer ermöglicht, die gemessenen I_i zu erklären. Dieses Modell ergibt sich aus dem an sich bekannten eingesetzten Farbstoffen. Wird für die statischen Farbstoffe ein Gemisch angenommen, so kann grundsätzlich aus zwei Modellen gewählt werden:

$$20 \quad (1) \vec{I} = \sum_i a_i \vec{\varepsilon}_i + I_{stoff} \vec{\varepsilon} \quad \text{statisches Farbstoffgemisch mit Intensitätsvariation}$$

$$(2) \vec{I} = \sum_i a_i \vec{\varepsilon}_i + \alpha \vec{r}_1 + \beta \vec{r}_2 \quad \text{statisches Farbstoffgemisch mit Spektralvariation}$$

die sich durch die Anzahl und Art der verwendeten Statischen und dynamischen Farbstoffen unterscheiden (freie Parameter). Basierend auf den Model-

len (1) oder (2) lassen sich nun die von dem Objekt gewonnen Daten in der Sortiereinrichtung so sortieren, dass eine Visualisierung erzeugt werden kann, die letztlich als ortsabhängige Farbkodierung darstellbar ist und beispielsweise an einem Monitor ausgegeben werden kann.

- 5 Die Messdaten könne bei der Durchführung des Verfahrens durch einen geeigneten Fit mit dem jeweils gewählten Modell in Einklang gebracht werden. Insbesondere können mit dem Fit neue Bilder aus den Komponenten $(a_i, (\alpha, \beta), I_{stiff})$ erzeugt werden.

- 10 Selbstverständlich lassen sich mit diesem Verfahren die gewonnen Daten so sortieren, dass statischen und funktionalen Bildanteile jeweils separat oder zusammen angezeigt werden können. Beispielsweise kann zunächst nur die morphologische Struktur des Objekts auf einem Monitor angezeigt werden. Auch können die Bereiche, in denen funktionelle Daten lokalisiert wurden separat oder zusätzlich angezeigt werden. Auch Überlagerungen sind ebenso
15 möglich wie spezielle an die Natur von funktionalen Daten angepasste Analysemethoden. Beispiele hierzu sind die Analyse der Ausbreitungsgeschwindigkeit molekularer Ionenaktivität nach Richtungen und Geschwindigkeiten.

- Die Sortiereinrichtung kann in einer Recheneinheit, insbesondere einem PC angeordnet sein. Ebenso kann die Sortiereinrichtung als Software in dem PC
20 verwirklicht werden. Die Daten können in der Sortiereinrichtung durch einen Fit mit dem Modell in Einklang gebracht werden.

- Weitere Vorteile und vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung sind Gegenstand der nachfolgenden Figuren sowie deren Beschreibungen, bei deren Darstellung zugunsten der Übersichtlichkeit auf eine maßstabsgetreue Wiedergabe verzichtet wurde.
25

Es zeigen im Einzelnen:

Fig. 1. schematisch ein erfindungsgemäßes Mikroskop

Fig. 2 schematisch den Verfahrensablauf zur Erzeugung eines Bildes des Objekts

Grundsätzlich können alle Fluoreszenzmikroskope mit spektraler Detektion für
5 das Verfahren verwendet werden. Oft ist hierbei eine entsprechende Anzahl
von Filtern, SP-Modulen oder weiteren Komponenten erforderlich. Besonders
geeignet ist, wie in Figur 1 schematisch gezeigt, ein erfindungsgemäßes kon-
fokales Scanmikroskop 10. Ein von einem Beleuchtungssystem 1 kommender
10 Lichtstrahl 3 wird von einem Strahlteiler 5 zur Strahlableitenrichtung 7 reflek-
tiert, die von einer Steuer- und Erfassungseinheit 23 über eine Leitung 29 ge-
steuert wird und die einen kardanisch aufgehängten Scanspiegel 9 beinhaltet,
der den Strahl durch eine Mikroskopoptik 13 hindurch über bzw. in das Innere
des Objektes 15 führt. Der Lichtstrahl 3 wird bei nicht transparenten Objekten
15 über die Objektoberfläche geführt. Bei biologischen Objekten 15 (Präpara-
ten) oder transparenten Objekten kann der Lichtstrahl 3 auch durch die Ober-
fläche des Objektes 15 hindurch geführt werden. Damit ist es möglich, dass
verschiedene Fokusebenen des Objekts nacheinander durch den Lichtstrahl 3
abgetastet werden. Da biologische Objekte zur Kennzeichnung bestimmter
20 Objektbereiche mit Farbstoffen versehen werden können, lässt sich für jeden
Rasterpunkt aus der Anregung der Farbstoffe und dem damit emittierten Fluoreszenzlicht ein dreidimensionales Bild des Objekts 15 erzeugen. Der vom
Beleuchtungssystem 1 kommende Lichtstrahl 3 ist als durchgezogene Linie
dargestellt. Das vom Objekt 15 ausgehende Fluoreszenzlicht 17 gelangt durch
die Mikroskopoptik 13 und über die Strahlableitenrichtung 7 zum Strahlteiler
25 5, passiert diesen und trifft auf den Detektor 19, der als Photomultiplier ausge-
führt ist. Das vom Objekt 15 ausgehende Fluoreszenzlicht 17 ist in der Abbil-
dung als gestrichelte Linie dargestellt.

Im Detektor 19 werden elektrische, zur Leistung des vom Objekt ausgehenden
Lichtes 17 proportionale Detektionssignale 21 erzeugt und an die Steuer- und
30 Erfassungseinheit 23 weitergegeben. Die in der Strahlableitenrichtung 7 mit
Hilfe eines induktiv oder kapazitiv arbeitenden Positionssensors 11 erfassten
Positionssignale 25 können ebenfalls an die Steuer- und Erfassungseinheit 23

übergeben werden. Die eingehenden, Analogsignale werden in der Steuer- und Erfassungseinheit 23 zunächst digitalisiert.

In einem Modellspeicher 31 wird ein Modell hinterlegt, das auf den verwendeten Farbstoffen beruht und entsprechend auf die erwartete Objektstruktur abgestimmt ist. Insbesondere kann im Modellspeicher 31 ein Modell hinterlegt werden, das ein statisches Farbstoffgemisch mit Intensitätsvariation insbesondere der Form $\vec{I} = \sum_i a_i \vec{e}_i + I_{\text{stoff}} \vec{e}$ aufweist.

Wird ein statisches Farbstoffgemisch mit Spektralvariation erwartet, so kann insbesondere ein Modell der Form $\vec{I} = \sum_i a_i \vec{e}_i + \alpha \vec{r}_1 + \beta \vec{r}_2$ hinterlegt werden. Die Messdaten können mit dem Modell durch einen Fit in Einklang gebracht werden, wobei neue Bilder insbesondere der Form $(a_i, (\alpha, \beta), I_{\text{stoff}})$ erzeugt werden. Der Modellspeicher 31 kann in einer Recheneinheit, etwa einem PC 34 integriert oder separat vorgesehen werden.

Fig. 2 zeigt schematisch den Verfahrensablauf zur Erzeugung einer Visualisierung gemäß der Erfindung. Im Schritt 39 wird aus dem Modellspeicher 31 eines von hinterlegten Modellen ausgewählt oder ein Modell abgelegt. Das Modell kann aus Informationen bereitgestellt werden, die dem Benutzer schon bei der Experimentplanung zur Verfügung stehen. So weiß der Benutzer, welche Farbstoffe in das Objekt eingebracht worden sind und kann ein entsprechendes Modell wählen. So können beispielsweise zwei statische Farbstoffe und ein physiologischer, d. h. funktioneller Farbstoff in das Objekt eingebracht werden. Die zu den Farbstoffen gehörenden Daten können dabei in einer Farbstoff-Datenbank 39 (Fig. 1) hinterlegt sein. Damit ist eine einfache Experimentplanung möglich, denn Daten wie die zugehörigen Spektren der Farbstoffe und die zu erwartenden Intensitäten sind dann bekannt.

Im Schritt 41 erfolgt die Aufnahme der Objektdaten, aus denen dann im Schritt 43 gleichzeitig oder darauffolgend die Zuordnung entsprechend dem hinterlegten Modell erfolgt. Bei dieser Sortierung werden die aufgenommenen Objektdaten so sortiert, dass eine Trennung so erfolgt, dass sie jeweils funktionalen

oder statischen Werten zugeordnet werden können. Sobald diese Trennung erfolgt ist, dann im Schritt 45 die Anzeige des Bildes des Objekt getrennt nach funktionalen und statischen Bereichen oder einer Mischung daraus erfolgen.

Wie in Fig. 1 gezeigt kann dieses Objektbild auf dem Display 27 ausgegeben werden.

Fig. 2. zeigt schematisch den erfindungsgemäßen Verfahrensablauf im Überblick. . Vom Benutzer werden im Schritt 46 Farbstoffe vorgegeben, die für das beabsichtigte Experiment benutzt werden sollen. Entsprechend den bereits bekannten Verfahren werden dieses vorgegebenen Farbstoffe zur Systemparametrisierung des Konfokalmikroskops genutzt, woraufhin im ersten Verfahrenszweig 49 im Schritt 47 die Datenaufnahme erfolgt. Erfindungsgemäß werden die im Schritt 46 vorgegebenen Farbstoffe zusätzlich zur Selektion eines Modells benutzt. Dies erfolgt im Schritt 48 im zweiten Verfahrenszweig 51. Dabei erfolgt zusammen mit der Auswahl des Modells auch die Festlegung der Anzahl der Farbstoffe sowie deren exakte Identifikation. Das Modell wird zur Übersetzung der aus der Datenaufnahme 47 ermittelten Rohdaten in Parameterbilder übersetzt, welche durch die statischen und dynamischen Anteile der Farbstoffe bestimmt werden. Der Mechanismus für diese Tätigkeit besteht in einem mathematischen Fit, der im Schritt 50 ausgeführt wird. Dabei wird aus dem Modell eine Menge an Parameterbildern hergeleitet, die entweder funktionale oder strukturelle Informationen beinhalten. Für die Anzeige hat der Benutzer dann die Möglichkeit sowohl die Rohdaten als auch die abgeleiteten Parameterbilder auszuwählen, was im Schritt 54 erfolgt. Die Anzeige, insbesondere die Ausgabe an einen Bildschirm erfolgt dann im Schritt 52.

Bezugszeichenliste

	1	Beleuchtungssystem
	3	Lichtstrahl
	5	Strahlteiler
5	7	Strahlablenkeinrichtung
	9	Scanspiegel
	10	Scanmikroskop
	11	Positionssensor
	13	Mikroskopoptik
10	15	Objekt
	17	vom Objekt ausgehendes Licht
	19	Detektor
	21	Detektionssignale
	23	Steuer- und Erfassungseinheit
15	25	Positionssignale
	27	Display
	29	Leitung
	31	Modellspeicher
	33	Sortiereinrichtung
20	34	PC
	35	Objektbild

- 37 Farbstoff Datenbank
- 38 Signalauswerteeinrichtung
- 41 Objektdatenaufnahme
- 43 Sortierung
- 5 45 Datenausgabe
- 46 Farbstoffe vorgeben
- 47 Datenaufnahme
- 48 Modellselektion
- 49 erster Verfahrenszweig
- 10 50 FIT
- 51 Verfahrenszweig
- 52 Anzeige
- 54 Selektion der Anzeige

15

20

Patentansprüche

1. Vorrichtung, insbesondere Mikroskop (10), zur Aufnahme statischer und funktionaler Daten eines Objekts (15) mit einer Erfassungseinheit
5 (23) zur Aufnahme von Objektdaten, dadurch gekennzeichnet, dass ein Modellspeicher (31) zur Speicherung eines erwarteten Modells des Objekts (15) und eine Sortiereinrichtung (33) zum Sortieren der Daten in Abhängigkeit von dem gespeicherten Modell vorgesehen.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass der Modellspeicher (31) in einer Recheneinheit, insbesondere einem PC (34)
10 angeordnet ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, dass die Sortiereinrichtung (33) in einer Recheneinheit, insbesondere einem PC
15 (34) angeordnet ist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, dass in der Sortiereinrichtung (33) eine Software zum Sortieren der Objektdaten vorgesehen ist.
20
5. Vorrichtung nach Anspruch 4 dadurch gekennzeichnet, dass die Daten in der Sortiereinrichtung (33) durch einen Fit mit dem Modell in Einklang gebracht werden.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1-5 dadurch gekennzeichnet, dass im Modellspeicher (31) ein Modell hinterlegt ist, das ein statisches Farbstoffgemisch mit Intensitätsvariation insbesondere der Form
- $$\vec{I} = \sum_i a_i \vec{\varepsilon}_i + I_{\text{stoff}} \vec{\varepsilon} \text{ aufweist.}$$
- 5 7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1-5 dadurch gekennzeichnet, dass im Modellspeicher ein Modell hinterlegt ist, das ein statisches Farbstoffgemisch mit Spektralvariation insbesondere der Form
- $$\vec{I} = \sum_i a_i \vec{\varepsilon}_i + \alpha \vec{r}_1 + \beta \vec{r}_2 \text{ aufweist.}$$
- 10 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1-7 dadurch gekennzeichnet, dass eine Farbstoffdatenbank (37) vorgesehen ist.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 dadurch gekennzeichnet, dass in der Farbstoffdatenbank Daten über Farbstoffe, insbesondere
- 15 Daten über den Spektralbereich und die Intensität des Farbstoffs gespeichert sind.
10. Verfahren zur Erzeugung eines Bildes (35) eines Objekts (15) insbesondere in einem Mikroskop (10) wobei mit einer Datenaufnahmeeinrichtung (23) Objektdaten aufgenommen werden, dadurch gekennzeichnet, dass ein auf das Objekt (15) bezogenes Modell vorgegeben wird, die Objektdaten in Abhängigkeit von dem Modell sortiert werden
- 20 und aus den sortierten Daten eine Visualisierung (35) erzeugt wird.
- 25 11. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass ein Modell gewählt wird, das ein statisches Farbstoffgemisch mit Intensitätsvariation insbesondere der Form $\vec{I} = \sum_i a_i \vec{\varepsilon}_i + I_{\text{stoff}} \vec{\varepsilon}$ aufweist.

12. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass ein Modell gewählt wird, das ein statisches Farbstoffgemisch mit Spektralvariation insbesondere der Form $\vec{I} = \sum_i a_i \vec{e}_i + \alpha \vec{r}_1 + \beta \vec{r}_2$ aufweist.
- 5 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12 dadurch gekennzeichnet, dass die Messdaten mit dem Model durch einen Fit in Einklang gebracht werden.
- 10 14. Verfahren nach Anspruch 13 dadurch gekennzeichnet, dass durch den Fit neue Bilder insbesondere der Form $(a_i, (\alpha, \beta), I_{stoff})$ erzeugt werden.
- 15 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14 dadurch gekennzeichnet, dass auf Veranlassung des Benutzers die strukturellen Bereiche oder die funktionellen Bereiche alleine angezeigt werden.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14 dadurch gekennzeichnet, dass auf Veranlassung des Benutzers die strukturellen Bereiche und die funktionellen Bereiche zusammen angezeigt werden.

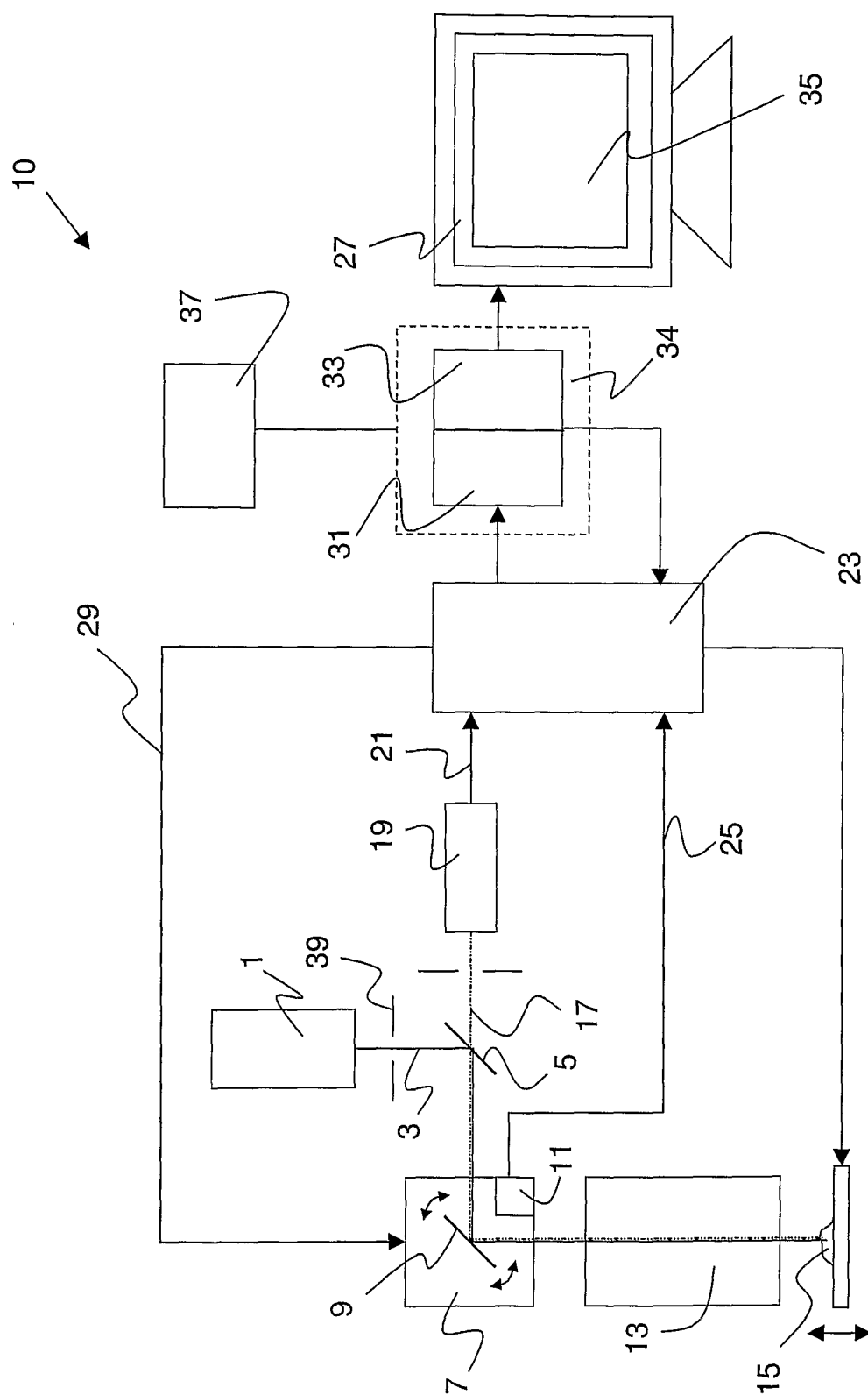


Fig. 1

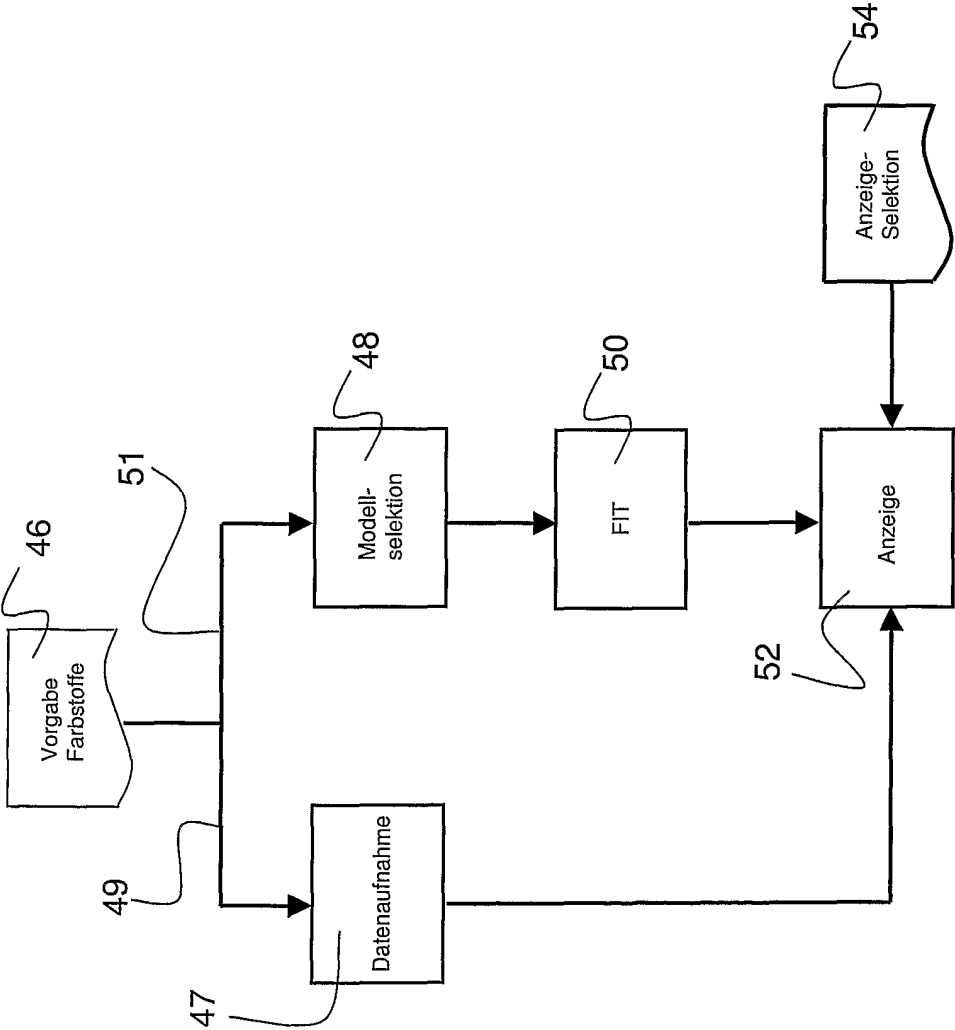


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/051282

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G02B21/16 G02B21/36 G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G02B G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DICKINSON M E ET AL: "Sensitive imaging of spectrally overlapping fluorochromes using the LSM 510 META" PROCEEDINGS OF THE SPIE, SPIE, BELLINGHAM, VA, US, vol. 4620, 2002, pages 123-136, XP002290909 ISSN: 0277-786X page 125, paragraph 2.1 - page 128, paragraph 2.5 page 129, paragraph 3.2 - page 130 figures 1,6,7 ----- -/--	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 June 2005

Date of mailing of the international search report

22/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

von Hentig, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/051282

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DICKINSON M E ET AL: "Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy" BIOTECHNIQUES, vol. 31, no. 6, December 2001 (2001-12), pages 1272-1279, XP002331002 ISSN: 0736-6205 page 1274, right-hand column - page 1278, left-hand column figures 1,2 -----	1-16
X	ZIMMERMANN, B.: "Going new ways in confocal multifluorescence imaging" G.I.T. LABORATORY JOURNAL - BIOFORUM INTERNATIONAL, 'Online! vol. 3, no. 1, April 2002 (2002-04), pages 8-11, XP002331003 DARMSTADT Retrieved from the Internet: URL: http://www.prontor.de/C1256D18002CC306/0/B4C081B2F72A04C9C1256D59003351B8/\$file/40-042_e.pdf > 'retrieved on 2005-06-07! page 10 - page 11; figures 2-5 -----	1-16
X	LANSFORD R ET AL: "RESOLUTION OF MULTIPLE GREEN FLUORESCENT PROTEIN COLOR VARIANTS AND DYES USING TWO-PHOTON MICROSCOPY AND IMAGING SPECTROSCOPY" JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS, SPIE, BELLINGHAM, WA, US, vol. 6, no. 3, July 2001 (2001-07), pages 311-318, XP001117891 ISSN: 1083-3668 page 311, paragraph 2.1 - page 317, paragraph 3.3 figures 2,4 -----	1-16
A	DEMANDOLX D ET AL: "MULTICOLOUR ANALYSIS AND LOCAL IMAGE CORRELATION IN CONFOCAL MICROSCOPY" JOURNAL OF MICROSCOPY, OXFORD, GB, vol. 185, no. PART 1, January 1997 (1997-01), pages 21-36, XP001040729 ISSN: 0022-2720 page 21, left-hand column - page 22, left-hand column -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/051282

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G02B21/16 G02B21/36 G01N21/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G02B G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DICKINSON M E ET AL: "Sensitive imaging of spectrally overlapping fluorochromes using the LSM 510 META" PROCEEDINGS OF THE SPIE, SPIE, BELLINGHAM, VA, US, Bd. 4620, 2002, Seiten 123-136, XP002290909 ISSN: 0277-786X Seite 125, Absatz 2.1 - Seite 128, Absatz 2.5 Seite 129, Absatz 3.2 - Seite 130 Abbildungen 1,6,7 ----- -/-	1-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Juni 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/06/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

von Hentig, R

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DICKINSON M E ET AL: "Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy" BIOTECHNIQUES, Bd. 31, Nr. 6, Dezember 2001 (2001-12), Seiten 1272-1279, XP002331002 ISSN: 0736-6205 Seite 1274, rechte Spalte - Seite 1278, linke Spalte Abbildungen 1,2	1-16
X	ZIMMERMANN, B.: "Going new ways in confocal multifluorescence imaging" G.I.T. LABORATORY JOURNAL - BIOFORUM INTERNATIONAL, 'Online! Bd. 3, Nr. 1, April 2002 (2002-04), Seiten 8-11, XP002331003 DARMSTADT Gefunden im Internet: URL: http://www.prontor.de/C1256D18002CC306/0/B4C081B2F72A04C9C1256D59003351B8/\$file/40-042_e.pdf > 'gefunden am 2005-06-07! Seite 10 - Seite 11; Abbildungen 2-5	1-16
X	LANSFORD R ET AL: "RESOLUTION OF MULTIPLE GREEN FLUORESCENT PROTEIN COLOR VARIANTS AND DYES USING TWO-PHOTON MICROSCOPY AND IMAGING SPECTROSCOPY" JOURNAL OF BIOMEDICAL OPTICS, SPIE, BELLINGHAM, WA, US, Bd. 6, Nr. 3, Juli 2001 (2001-07), Seiten 311-318, XP001117891 ISSN: 1083-3668 Seite 311, Absatz 2.1 - Seite 317, Absatz 3.3 Abbildungen 2,4	1-16
A	DEMANDOLX D ET AL: "MULTICOLOUR ANALYSIS AND LOCAL IMAGE CORRELATION IN CONFOCAL MICROSCOPY" JOURNAL OF MICROSCOPY, OXFORD, GB, Bd. 185, Nr. PART 1, Januar 1997 (1997-01), Seiten 21-36, XP001040729 ISSN: 0022-2720 Seite 21, linke Spalte - Seite 22, linke Spalte	1-16