## Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

> vorgelegt von Dipl.-Phys. Rainer Kaufmann aus Aalen

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 2011

# Entwicklung quantitativer Analysemethoden in der Lokalisationsmikroskopie

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer Prof. Dr. Rasmus Schröder

#### Entwicklung quantitativer Analysemethoden in der Lokalisationsmikroskopie

Um biologische Systeme auf dem Niveau einzelner Proteine und kleiner Proteinkomplexe besser untersuchen und verstehen zu können, ist eine Auflösung weit unterhalb der Grenze der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie erforderlich. In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden entwickelt, um die Beugungsgrenze zu überwinden. Eine dieser Methoden stellt die Lokalisationsmikroskopie dar, welche eine Strukturauflösung in Zellen bis in den Bereich von 20 nm ermöglicht.

Die vorliegende Arbeit beschreibt neue Methoden für quantitative Analysen basierend auf der Lokalisationsmikroskopie. Neben der erhöhten Strukturauflösung wird hierbei die zusätzliche Information der einzeln detektierten Moleküle genutzt. Die Kombination der Visualisierung von Strukturen im Bereich <100 nm mit statistischen Analysen der Proteinverteilung auf diesen Strukturen eröffnet neue Möglichkeiten biologische und biophysikalische Fragestellungen zu untersuchen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Algorithmen werden vorgestellt und auf verschiedene aktuelle biologische Fragestellungen angewandt. Hierzu zählen die Analyse der Verteilung von Her2/neu-Proteinen in Brustkrebszellen, eine quantitative Untersuchung von Tight Junction-Netzwerken sowie Distanzanalysen von Splicing-Faktoren im Bezug auf den transkribierten DNA-Strang, um einen tieferen Einblick in die Faltung der mRNA zu erhalten. Außerdem wurde eine detaillierte Untersuchung des Einflusses des Einbettmediums auf die Lokalisationsmessungen mit unterschiedlichen konventionellen Farbstoffen durchgeführt.

#### Development of Quantitative Analysis Methods in Localization Microscopy

For a better understanding of biological systems on the scale of single proteins, a resolution far beyond the limits of conventional fluorescence microscopy is required. In recent years, various methods have been developed to overcome the diffraction limit. One of these, localization microscopy, provides a structural resolution down to the 20 nm range.

The present thesis describes novel methods for quantitative analyses based on localization microscopy. Besides enhanced structural resolution, additional information from individually detected molecules is used. The combination of the visualisation of structures <100 nm and statistical analyses of the distribution of proteins on these structures opens up new possibilities for the investigation of biological and biophysical questions.

The algorithms developed in the context of the present thesis are introduced; they were applied to various current biological questions, which include the analysis of the distribution of Her2/neu proteins in breast cancer cells, a quantitative investigation of tight junction networks and a distance analysis of splicing factors relating to the transcribed DNA strand which allows for a deeper insight into the folding of mRNA. Furthermore, a detailed investigation of the influence of the embedding medium on localization microscopy measurements with different standard fluorophores was performed.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung			1				
2	Grundlagen 3							
	2.1	Optisc	he Bildgebung	3				
		2.1.1	Geometrische Optik	3				
		2.1.2	Beugung	4				
	2.2	Fluore	szenzmikroskopie	8				
		2.2.1	Fluoreszenz	8				
		2.2.2	Reversibles Photobleichen und Einzelmolekül-Blinken	9				
		2.2.3	Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie	12				
		2.2.4	Weiterentwicklungen zur Auflösungserhöhung	13				
	2.3	Lokalis	sationsmikroskopie	16				
		2.3.1	Separation der Fluoreszenzsignale der einzelnen Moleküle	16				
		2.3.2	Positionsbestimmung der einzelnen Moleküle zur Rekonstruktion des					
			Lokalisationsbildes	17				
		2.3.3	Kombination von SMI- und Lokalisationsmikroskopie	20				
3	Mik	roskopa	ufbau und Datenauswertung	23				
	3.1	Aufba	u des Vertico-SMI	23				
		3.1.1	Strahlengang	23				
		3.1.2	SMI-Modus	25				
		3.1.3	SPDM-Modus	25				
	3.2	Algori	thmen zur Positionsbestimmung der einzelnen Moleküle	25				
		3.2.1	Positionsbestimmung mit dem Algorithmus SPDM	25				
		3.2.2	Positionsbestimmung mit dem Algorithmus fastSPDM	28				
	3.3	3 Visualisierung und weitere Analyse von Lokalisationsdaten						
		3.3.1	Grundlegende Algorithmen zur Visualisierung von Lokalisationsdaten .	29				
		3.3.2	Bestehende Algorithmen zur weiteren Auswertung von Lokalisationsdaten	30				
4	Entwickelte Algorithmen zur Datenanalyse 31							
	4.1	Visual	isierung von Lokalisationsdaten	31				
		4.1.1	Visualisierung basierend auf den Abständen zum nächsten Nachbarn	32				
		4.1.2	Visualisierung über Farbkodierung der lokalen Punktdichte	36				
	4.2	Korrek	tur des mechanischen Drifts	38				
		4.2.1	Korrektur anhand von Referenzobjekten	38				
		4.2.2	Korrektur ohne Referenzobjekte	40				
	4.3	Analys	se von Protein-Clustern	42				
		4.3.1	Identifikation von Clustern im Lokalisationsbild	42				

		4.3.2	Analyse der einzelnen Cluster im Lokalisationsbild und Automatisierung	
			für viele Datensätze	44
		4.3.3	Analyse von sehr kleinen Clustern	48
	4.4	Analy	se von Maschenstrukturen	51
		4.4.1	Vorauswahl des Bereichs zur Markierung und Auswertung einer Teil-	
			menge von Maschen	51
		4.4.2	Analyse der Größe und Punktdichte einzelner Maschen	51
	4.5	Distar	nzanalyse von Proteinen entlang einer definierten Struktur	55
		4.5.1	Funktionsweise des Algorithmus CELFana	55
		4.5.2	Resultate des Algorithmus CELFana	57
		4.5.3	Vergleich zur konventionellen Weitfeldfluoreszenzaufnahme	58
	4.6	3D-Re	ekonstruktion von 2D-SPDM-Messungen kombiniert mit SMI-Aufnahmen	60
		4.6.1	Hintergrundkorrektur der Phasen-Rasterung	60
		4.6.2	Bestimmung der Positionen der detektierten Strukturen und ihre Aus-	
			dehnung in axialer Richtung	62
		4.6.3	Rekonstruktion der dreidimensionalen Molekülverteilung	64
5	Anw	/endung	g auf biologische Fragestellungen	65
	5.1	Auswi	irkung des Einbettmediums auf das reversible Bleichen der Fluorophore	
		bei SF	PDM	65
		5.1.1	Quantitativer Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von Alexa488 bei SPDM-Messungen in verschiedenen Einhettmedien	66
		5.1.2	Quantitativer Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von GFP bei SPDM-	00
		0.1.2	Messungen in verschiedenen Einbettmedien	72
		5.1.3	Einfluss des Alters der Einbettmedien auf die Fluoreszenzeigenschaften	-
			von Alexa488 und GFP bei SPDM-Messungen	73
		5.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Vergleichen der Einbettmedien	78
	5.2	Unter	suchung autofluoreszenter photoschaltbarer Moleküle in unmarkierten Zel-	
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	80	
		5.2.1	SPDM-Messungen an unmarkierten biologischen Strukturen	81
		5.2.2	Photoaktivierbare Moleküle in der Zelle als zusätzliche Information im	
			Lokalisationsbild	86
	5.3	Analy	se von Her2/neu-Protein-Clustern in der Membran verschiedener Brust-	
		krebsz	zellen	88
		5.3.1	Präparation der Proben	89
		5.3.2	Lokalisations messungen und statistische Analysen $\hfill\hfill$	90
		5.3.3	$\label{eq:second} Zwei-Farben-3D-Lokalisationsmikroskopie \ von \ Her 2/neu-\ und \ Her 3-Protein \ Second \ Protein \ Second \$	n-
			Clustern	98
	5.4	Strukt	turanalyse von Tight Junction-Netzwerken anhand von Claudin-Proteinen	103
		5.4.1	Präparation der Proben	103
		5.4.2	Lokalisations messungen und Strukturanalyse $\hfill \ldots \hfill \ldots \h$	104
	5.5	Analy	se von Splicing-Faktoren CELF1 im Bezug auf den transkribierten DNA-	
		Strang	g	110
		5.5.1	Präparation der Proben	110
		5.5.2	Distanz- und Cluster-Analyse der Zwei-Farben-Lokalisationsmessungen	111

6	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick											
	6.1 Zusammenfassung	. 119										
	6.2 Diskussion	. 120										
	6.3 Ausblick	. 126										
7	Anhang											
	Literaturverzeichnis	. 129										

## 1 Einleitung

Die Mikroskopie stellt seit jeher eine der wichtigsten Methoden zur Untersuchung von biologischen Systemen und Prozessen dar. Dabei verlagert sich der Fokus mehr und mehr von dem Bereich einzelner Zellen zur Analyse von kleinen subzellulären Strukturen, bis hin zu einzelnen Proteinen. Die Auflösung der Lichtmikroskopie ist nach Abbe [Abbe, 1873] und Rayleigh [Rayleigh, 1879] aufgrund der Wellennatur des Lichts auf ungefähr die Hälfte der verwendeten Wellenlänge begrenzt. Für ein konventionelles Lichtmikroskop bedeutet dies, dass keine Strukturen aufgelöst werden können, die kleiner sind als ca. 200 nm in lateraler und ca. 600 nm in axialer Richtung.

Da viele biologische Strukturen jedoch deutlich kleiner sind, wurden Mitte des 20. Jahrhunderts Methoden wie die Elektronenmikroskopie entwickelt. Da hier die Wellenlänge sehr viel kürzer ist als bei der Lichtmikroskopie, können sogar Strukturen von nur 1 nm Ausdehnung detektiert werden. Trotz der hohen Strukturauflösung birgt die Elektronenmikroskopie aber auch einige Nachteile für biologische Anwendungen. So kann eine Aufnahme nur an fixierten (unbelebten) Präparaten durchgeführt werden, die zudem noch sehr dünn sein müssen. Auch die Markierung bestimmter Strukturen ist weit weniger spezifisch, verglichen mit den verfügbaren Methoden der Lichtmikroskopie.

In den letzten Jahren wurden neue Methoden der Lichtmikrokopie und speziell der Fluoreszenzmikroskopie entwickelt, die eine Strukturauflösung bis weit unterhalb der Auflösungsgrenze nach Abbe und Rayleigh ermöglichen. Auf diese Weise können hochaufgelöste biologische Aufnahmen mit einer minimalinvasiven Technik von fixierten aber auch lebenden Zellen realisiert werden. Methoden wie die Strukturierte Beleuchtung (SIM) [Heintzmann und Cremer, 1998, Gustafsson, 2000] erreichen eine um den Faktor zwei verbesserte Auflösung (bei der Ausnutzung nicht linearer Effekte auch mehr [Heintzmann et al., 2002, Gustafsson, 2005]). Mithilfe der STED-Mikrokopie [Klar et al., 2000] oder der Lokalisationsmikrokopie (PALM, FPALM, STORM, dSTROM, SPDM, GSDIM, ... [Betzig et al., 2006, Hess et al., 2006, Rust et al., 2006, Heilemann et al., 2008, Lemmer et al., 2008, Fölling et al., 2008]) können sogar intrazelluläre Strukturen, die kleiner als 20 nm sind, aufgelöst werden.

Neben der Möglichkeit biologische Strukturen weit unterhalb der Beugungsgrenze lichtmikroskopisch zu untersuchen, haben vor allem aber auch die Forschritte in der Kameratechnik und Datenverarbeitung dazu beigetragen, biologische Prozesse quantitativer zu beschreiben und zu verstehen. Bei den Experimenten liefern schnelle CCD (charge coupled device)- und CMOS (complementary metal oxide semiconductor)-Kameras große Datenmengen, aus welchen mit moderner Bildverarbeitung und anderen Datenverarbeitungsroutinen die relevanten Informationen extrahiert werden können. Die Verbindung dieser Methoden mit der hochauflösenden Lichtmikroskopie eröffnet quantitative Analysen von Proteinverteilungen und anderer biologischer Strukturen auf dem Niveau einzelner Moleküle.

Seit den ersten Arbeiten zur Lokalisationsmikrokopie aus dem Jahre 2006, welche die Verwendung von speziellen photoaktivierbaren oder photoschaltbaren Fluorophoren beschreiben, hat eine rasche Entwicklung auf diesem Gebiet der hochauflösenden Lichtmikroskopie stattgefunden. Einer der bedeutendsten Schritte war hierbei die Entwicklung von Methoden, die es ermöglichen konventionelle fluoreszente Farbstoffe für die Lokalisationsmikrokopie zu verwenden [Heilemann et al., 2008, Lemmer et al., 2008, Fölling et al., 2008]. Nach der Realisierung von Mehr-Farben-Ansätzen zur Untersuchung der relativen Anordnung unterschiedlicher Proteintypen und Strukturen [Shroff et al., 2007, Bates et al., 2007, Bock et al., 2007, Gunkel et al., 2009], wurden verschiedene Methoden entwickelt, um dreidimensionale Lokalisationsaufnahmen zu ermöglichen [Huang et al., 2008, Juette et al., 2008, Lemmer et al., 2008, Pavani et al., 2009, Shtengel et al., 2009]. Sogar erste Ansätze für die Anwendung an lebenden Zellen konnten gezeigt werden [Hess et al., 2007, Manley et al., 2008]. Bei der hochaufgelösten Darstellung von Strukturen in lebenden Zellen erreicht man jedoch nur eine maximale Zeitauflösung im Bereich von 10 Sekunden. Dies beschränkt die Methode auf Objekte, welche sich sehr langsam bewegen.

Neben der hohen Strukturauflösung bietet die Lokalisationsmikrokopie aufgrund der Detektion von Einzelmolekülsignalen zusätzlich die Möglichkeit die erhaltenen Positionsinformation für weitere Analysen zu nutzen. Obwohl hieraus, zusätzlich zu der genaueren Darstellung der Strukturen, wichtige biologische Erkenntnisse gewonnen werden können, wurde diese Einzelmolekülinformation bisher nur wenig genutzt [Baddeley et al., 2009b].

Die vorliegende Arbeit beschreibt neue Methoden zur weiteren, quantitativen Analyse von Lokalisationsdaten und die Anwendung auf aktuelle biologische Fragestellungen. Hierbei wird neben der erhöhten Strukturauflösung vor allem die Einzelmolekülinformation für statistische und zusätzliche strukturelle Analysen genutzt. Diese Methoden erlauben, weit mehr Informationen aus den Daten zu extrahieren als die erhöhte Strukturauflösung alleine imstande wäre. Alle neu entwickelten Methoden und Algorithmen werden in Kapitel 4 vorgestellt. Beispiele für ihre Anwendungen, die es ermöglichen, einen Einblick in bisher unbekannte biologische Sachverhalte zu erlangen, sind in Kapitel 5 aufgeführt. Außerdem wurde eine ausführliche Analyse der Abhängigkeit des reversiblen Bleichvorgangs unterschiedlicher Fluorophore von ihrer Mikroumgebung im Bezug auf die Lokalisationsmikrokopie durchgeführt, um die Effizienz der Datenaufnahme zur erhöhen.

## 2 Grundlagen

In diesem Kapitel sollen die Konzepte, welche die Grundlagen der vorliegenden Arbeit bilden, kurz vorgestellt und erläutert werden. Hierbei handelt es sich um die Theorie zur optischen Bildgebung sowie um die Grundlagen der Fluoreszenz, der Fluoreszenzmikroskopie und der Lokalisationsmikroskopie.

## 2.1 Optische Bildgebung

Im Folgenden werden verschiedene Theorien erläutert, die anhand von unterschiedlichen Voraussetzungen beschreiben, wie die optische Abbildung eines Objekts zustande kommt.

## 2.1.1 Geometrische Optik

In der geometrischen Optik wird Licht als Strahlenbündel betrachtet, dessen Richtung durch die Normale zur Wellenfront einer elektromagnetischen Welle definiert ist. Objekte, die im Strahlengang stehen, werden nach einfachen geometrischen Regeln auf die Bildebene abgebildet. Diese Beschreibung der optischen Abbildung kann herangezogen werden, solange die Ausdehnung der Objekte, die das Strahlenbündel passiert, deutlich größer ist als die Wellenlänge.



#### Abbildung 2.1:

**Eigenschaften einer Linse im Strahlengang. A**: Biegung der Lichtstrahlen durch eine dünne Linse, wobei g der Objektabstand, b der Bildabstand und  $\gamma$  und  $\beta$  Einfalls- und Ausfallswinkel der Strahlen sind. **B**: Bildentstehung bei einer dünnen Linse. G und B geben die Objekt- bzw. Bildgröße an, F die Position des Brennpunktes der Linse. Mod. nach [Saleh und Teich, 2007].

Abbildung 2.1 zeigt schematisch die Bildenstehung nach der geometrischen Optik durch eine dünne Linse im Strahlengang. Diese macht sich den Übergang der Lichtstrahlen zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes zunutze. Strahlen, die parallel auf eine Linse einfallen werden derart gebrochen, dass alle auf Punkte in der Brennebene abgebildet werden, unabhängig vom Winkel zur optischen Achse.

Der Zusammenhang zwischen der Brennweite f, dem Objektabstand g und dem Bildabstand b ist definiert als: 1/f = 1/g + 1/b, woraus die Beziehung für die Gegenstandsgröße G und die Bildgröße B folgt: B/G = b/g.

#### 2.1.2 Beugung

Trifft Licht auf ein Hindernis und entspricht seine weitere Ausbreitung nicht den Vorhersagen der geometrischen Optik, so beschreibt man dieses Phänomen als Beugung des Lichts. In vielen Bereichen der optischen Bildgebung, wie beispielsweise der hochauflösenden Lichtmikroskopie, reicht die Beschreibung durch die geometrische Optik nicht mehr aus, da das Auflösungsvermögen eines Mikroskopiesystems durch die Beugung des Lichts aufgrund seiner Wellennatur bestimmt ist.

#### Beugung an einer kreisförmigen Öffnung

Im Folgenden soll am Beispiel einer kreisförmigen Öffnung die Beugung des Lichts betrachtet werden. Nach dem Prinzip von Huygens und Fresnel kann jeder Punkt der Öffnung als Ursprung einer Kugelwelle angenommen werden, die sich im weiteren Verlauf wieder überlagern. Die daraus resultierende Interferenz ist abhängig von dem Abstand nach der Blende, bei dem sie beobachtet wird (vergl. Abb. 2.2). Für sehr kleine Abstände stellt das Interferenzmuster fast eine Projektion der Blende dar. In diesem Bereich überwiegen die evaneszenten Wellen, die von Strukturen kleiner als die Wellenlänge des Lichts generiert werden [Gu, 2000]. Dieses Phänomen wird beispielsweise in der optischen Rasternahfeldmikroskopie genutzt [Novotny et al., 1995]. Da das evaneszente Wellenfeld exponentiell abfällt können im Fernfeld nur Strukturen, die größer als die Wellenlänge des Lichts sind, beobachtet werden. Hier kann das Interferenzmuster durch die Fraunhoferbeugung beschrieben werden.

Für die meisten optischen Systeme mit Beugungseffekten ist die Ausbreitungsrichtung des Lichts nahe der optischen Achse der verwendeten Komponenten und es kann deshalb die paraxiale Näherung herangezogen werden. Im Fernfeld kann zudem die Fraunhofer-Näherung angenommen werden, woraus folgt, dass das Interferenzmuster der Fouriertransformierten der einfallenden Welle entspricht.

Trifft also eine Welle  $U_1(r)$  mit  $r = \sqrt{x^2 + y^2}$ , auf eine kreisförmige Öffnung mit einem Radius a, so generiert diese eine Welle:

$$U_2(r) = \frac{i\pi a^2}{\lambda z} exp(-\frac{i2\pi}{\lambda}z) \left(\frac{2J_1\left(\frac{2\pi ar}{\lambda z}\right)}{\frac{2\pi ar}{\lambda z}}\right).$$

Hierbei ist z der Abstand von der Blende und  $J_1$  die einfache Besselfunktion erster Ordnung [Gu, 2000]. Aus dem Betragsquadrat der komplexwertigen Amplitude der Welle  $U_2(r)$ erhält man für die Intensität des Beugungsmusters:

$$I(r) = I_0 \left( \frac{2J_1\left(\frac{2\pi ar}{\lambda z}\right)}{\frac{2\pi ar}{\lambda z}} \right)^2,$$

wobei  $I_0 = [\pi a^2/(\lambda z)]^2 I_i$  die maximale Intensität mit der Intensität  $I_i$  des einfallenden Lichts ist [Saleh und Teich, 2007]. Das radialsymetrische Begungsmuster wird als Airy-Muster bezeichnet, dessen innerstes Scheibchen als Airy-Einheit mit dem Radius 1,22  $\lambda z/2a$  definiert ist.



#### Abbildung 2.2:

**Fresnel- und Fraunhofer-Beugung.** Wenn der Abstand  $z_0$  zum Schirm sehr klein ist, entspricht das Beugungsmuster fast einer Projektion der Blende [Gu, 2000]. Wird der Abstand vergrößert, werden die Interferenzstreifen mehr ausgeprägt (Fresnelbeugung). Ist der Abstand viel größer als die Öffnung b der Blende und die Wellenlänge  $\lambda$ , ändert sich die Struktur des Beugungsmusters nicht mehr, nur noch seine Größe (Fraunhoferbeugung). Mod. nach [Demtröder, 2006].

#### Punktbildfunktion und Auflösung

Für den Fall der Beugung an einer Linse betrachtet man das Lichtfeld in der Brennebene f der Linse. Führt man eine axiale Koordinate u ein [Gu, 2000]:

$$u = \frac{2\pi}{\lambda} a^2 \left(\frac{1}{f} - \frac{1}{z}\right) \approx \frac{2\pi}{\lambda} \Delta z \frac{a^2}{f^2},$$

so kann die Intensitätsverteilung des Beugungsmusters einer Linse in der Brennebene in lateraler und axialer Richtung wie folgt dargestellt werden:

$$I(r) = I_0 \left(\frac{2J_1\left(\frac{2\pi ar}{\lambda f}\right)}{\frac{2\pi ar}{\lambda f}}\right)^2, \qquad \qquad I(u) = \frac{\pi^2 a^4}{\lambda^2 f^2} \left(\frac{\sin(u/4)}{u/4}\right)^2.$$

Man kann sich ein Objekt zusammengesetzt aus vielen punktförmigen Lichtquellen vorstellen, die entweder Licht reflektieren oder es selbst emittieren, wie es beispielsweise in der Fluoreszenzmikroskopie der Fall ist. Betrachtet man die obigen Formeln zur Beschreibung der Intensitätsverteilung auf einem Schirm, nachdem das Licht eine Linse passiert hat, so wird deutlich, dass die einzelnen Punkte aus dem Objektraum auf dem Schirm mit diesen Beugungsmustern verschmiert dargestellt werden. Die Funktion, mit der ein punktförmiges Objekt durch ein Linsensystem abgebildet wird, bezeichnet man als Punktbildfunktion (*PSF, point spread* function). Die Intensitätsverteilung  $I_{Bild}(x_2, y_2)$  der Abbildung einer Fluorophorverteilung  $P_{Fl}(x_1, y_1)$  durch ein optisches System kann beschrieben werden durch:

$$I_{Bild}(x_2, y_2) = PSF \otimes P_{Fl}(x_1, y_1).$$

Daraus folgt, dass zwei benachbarte Punkte im Bild nicht mehr unterschieden werden können, wenn der Überlapp ihrer beiden Airy-Scheibchen zu groß, bzw. ihr Abstand zu klein ist. Dies definiert das Auflösungsvermögen eines optischen Systems. Um dieses zu bestimmen gibt es verschiedene Kriterien. Hiefür wird die numerische Apertur NA eingeführt, die definiert ist als: NA =  $n \sin \alpha \approx na/f$ , wobei n der Brechungsindex des Mediums und  $\alpha$  der halbe Öffnungswinkel des in die Linse einfallenden Lichtes ist.

![](_page_15_Figure_5.jpeg)

#### Abbildung 2.3:

**Punktbildfunktion (PSF) einer Kreisblende. A**: PSF eines Punktes, abgebildet durch eine kreisförmige Öffnung. Die Intensität ist normiert und farbkodiert dargestellt. **B**: Punktbildfunktionen zweier benachbarter Punkte im Abstand des Rayleigh-Kriteriums. Mod. nach [Kaufmann, 2008].

#### Abbe-Kriterium

Nach dem Abbe-Kriterium [Abbe, 1873] kann der genaue Abstand D zwischen zwei Objekten dann aufgelöst werden, wenn die 0. und 1. Ordnung des Beugungsmusters aufgefangen werden kann. Daraus folgt die Bedingung:

$$D = \frac{\lambda}{2NA}.$$

#### **Rayleigh-Kriterium**

Das Rayleigh-Kriterium [Rayleigh, 1879] besagt, dass zwei Objekte gerade noch unterschieden werden können, wenn das Maximum des einen Airy-Scheibchen in das erste Minimum des anderen fällt (s. Abb. 2.3B). Hier lautet die Bedingung:

$$D = 0,61\frac{\lambda}{NA}.$$

#### Sparrow-Kriterium

Sparrow definiert das Auflösungskriterium [Sparrow, 1916] durch den Abstand zweier Objekte, bei dem der Sattelpunkt der beiden Punktbildfunktionen (vergl. Abb. 2.3B) gerade verschwindet. Dieses Kriterium eignet sich für gleich helle Objekte und ergibt:

$$D = 0,47\frac{\lambda}{NA}.$$

#### **Optische Transferfunktion**

Es wurde bereits erwähnt, dass die Intensitätsverteilung in der Brennebene einer Linse der Fouriertransformierten des abgebildeten Objekts entspricht. Man kann sich die optische Bildgebung also durch die Übertragung von Fourierkomponenten durch ein optisches System vorstellen. Aufgrund der endlichen räumlichen Ausdehnung wirkt dieses als Tiefpassfilter, der nur Raumfrequenzen bis zu einer maximalen Frequenz durchlässt. Die numerische Apertur einer Linse oder eines Linsensystems bestimmt den Raumwinkel, der bei der Bildgebung abgedeckt werden kann. Dieser wird durch die optische Transferfunktion (OTF) beschrieben, welche die Fouriertransformierte der PSF darstellt. Strukturelle Details des Objekts, deren Raumfrequenzen höher sind als der von der OTF abgedeckte Bereich, werden somit nicht übertragen und können im Bild nicht rekonstruiert werden.

Für die Bildverarbeitung bietet die Betrachtungsweise der optischen Abbildung im Fourierraum den Vorteil, dass hier aus einer Faltung eine Multiplikation wird:

$$FT\Big[I_{Bild}(x_2, y_2)\Big] = OTF \cdot FT\Big[P_{Fl}(x_1, y_1)\Big].$$

## 2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Verwendung von fluoreszierenden Molekülen zur Markierung und Beobachtung von biologischen Strukturen. Dadurch kann auf sehr spezifische Art und Weise ein bestimmtes Protein oder eine Struktur untersucht werden. Im Folgenden sollen grundlegende Prinzipien der Fluoreszenz und verschiedener entsprechender Mikroskopieverfahren erläutert werden.

## 2.2.1 Fluoreszenz

Fluoreszierende Moleküle können durch Einstrahlung von Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs vom Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt werden, von welchem sie durch die Abgabe von Fluoreszenzlicht in den Grundzustand zurückkehren. Durch die Absorption eines Photons mit ausreichender Energie  $h\nu_A$  wird das Molekül von seinem Grundzustand S<sub>0</sub> in einen höhergelegenen Zustand S<sub>1</sub> oder S<sub>2</sub> gehoben. Zunächst findet ein herunter Kaskadieren vom angeregten Zustand in den vibronisch am niedrigsten gelegenen Zustand statt. Von hier aus beobachtet man einen optischen Übergang in ein vibronisch angeregtes Niveau des Grundzustands S<sub>0</sub>. Dieser Übergang findet innerhalb von Nanosekunden unter Aussendung von Photonen  $h\nu_F$  im sichtbaren Bereich statt und wird als Fluoreszenz bezeichnet. Der gesamte Zyklus ist in Abbildung 2.4 in einem Jabłoński-Diagramm gezeigt und kann folgendermaßen zusammengefasst werden:

$$|E_0, V_0\rangle \xrightarrow{Anregung} |E_i, V_j\rangle \rightsquigarrow |E_i, V_0\rangle \xrightarrow{Fluoreszenz} |E_0, V_k\rangle \rightsquigarrow |E_0, V_0\rangle$$

wobei  $E_0$  den Grundzustand,  $V_0$  den vibronisch niedrigst gelegenen Zustand,  $E_i$  einen angeregten Zustand und  $V_j$  und  $V_k$  vibronisch angeregte Zustände darstellen.

Abbildung 2.4: Jabłoński-Thermschema zur Fluoreszenz. Darstellung des Fluoreszenzzyklus zwischen Grundzustand und angeregten Singulettzuständen der sowie Phosphoreszenz mit zugehörigen Lebensdauern. Aus [Kaufmann, 2008].

![](_page_17_Figure_8.jpeg)

Die internen strahlungsfreien Übergänge führen dazu, dass das Energieniveau, von dem das Molekül in seinen Grundzustand zurückkehrt, niedriger gelegen ist als jenes, auf welches es von dem Photon bei der Anregung gehoben wurde. Dies hat zur Folge, dass das emittierte Fluoreszenzphoton weniger Energie besitzt als das Photon der Anregung und somit eine längere Wellenlänge aufweist (Stokes-Shift).

Das Fluoreszenzverhalten eines Moleküls ist abhängig von dessen Mikroumgebung. Hierzu zählt neben anderen Einflüssen, wie beispielsweise der Sauerstoffkonzentration, vor allem der

pH-Wert [McAnaney et al., 2005, Sinnecker et al., 2005]. Dieser stellt einerseits einen kritischen Parameter für biologische Messungen in der Fluoreszenzmikroskopie dar, da er innerhalb einer Zelle ortsabhängig variabel sein kann. Andererseits bietet diese Eigenschaft jedoch auch die Möglichkeit, das Fluoreszenzverhalten eines Fluorophores gezielt zu beeinflussen. Die in Abbildung 2.5 dargestellten Absorbtions- und Emissionskurven des gelb fluoreszierenden Proteins YFP zeigen die starke Abhängigkeit vom pH-Wert. Andere Farbstoffe, wie beispielsweise einige Rhodamin-Derivate, zeigen eine deutlich geringere Abhängigkeit vom pH-Wert.

![](_page_18_Figure_2.jpeg)

#### Abbildung 2.5:

**Absorptions- und Emissionsspektrum von YFP abhängig vom pH-Wert. A**: Absorptionskurve von YFP für verschiedene pH-Werte. **B**: Emissionskurve von YFP dargestellt für eine Anregung mit 480nm. Aus [McAnaney et al., 2005].

#### 2.2.2 Reversibles Photobleichen und Einzelmolekül-Blinken

Im Folgenden werden unterschiedliche Prozesse beschrieben, bei denen die Fluoreszenzemission der Farbstoffmoleküle aufgrund von Übergängen in nicht fluoreszierende Zustände kurzzeitig unterbrochen wird. Diese Unterbrechung kann von einigen Mikrosekunden bis hin zu einigen hundert Sekunden reichen.

#### **Triplett-Blinken**

Fast alle Fluorophore zeigen bei einer Anregung mit hoher Lichtintensität ein "Blinken" der einzelnen Moleküle [Lakowicz, 2006]. Dieses wird auf die Interkombination (*intersystem crossing, ISC*) in einen Triplettzustand des Fluorophores zurückgeführt [Vogel et al., 1995]. Aufgrund des langsamen Zerfalls des angeregten Triplettzustandes in den Singulettgrundzustand ist die Verweildauer des Fluorophores im Triplettzustand im Bereich von Mikro- bis Millise-kunden. Da die Fluoreszenzlebensdauer sich im Bereich von Nanosekunden abspielt, kann das Dreizustandsmodell auf zwei Zustände reduziert werden, um das Triplett-Blinken der Fluorophore zu beschreiben [Martyński et al., 2005]:

$$\mathbf{M}_{\text{hell}} \xrightarrow[k_{dunkel}]{k_{dunkel}} \mathbf{M}_{\text{dunkel}}.$$

 $k_{hell}$  und  $k_{dunkel}$  geben die Übergangsraten zwischen dem fluoreszierenden Zustand des Moleküls M<sub>hell</sub> und nichtfluoreszierenden Zustand M<sub>dunkel</sub> an.

#### "Blinken" aufgrund eines langlebigen Dunkelzustands

Neben dem Triplett-Blinken der Fluorophore wurde auch der Übergang in einen Dunkelzustand beschrieben, in dem die Moleküle einige Millisekunden bis einige hundert Sekunden verweilen [Dickson et al., 1997, McAnaney et al., 2005, Schuster et al., 2005, Sinnecker et al., 2005]. Es wurde gezeigt, dass es sich bei diesen langlebigen Dunkelzuständen, aufgrund der geringen Temperaturabhängigkeit ihrer Lebensdauern, nicht um einen Triplettzustand handeln kann, sondern um einen anderen unbekannten Dunkelzustand des Fluorophors, der über einen Triplettzustand bevölkert wird [Zondervan et al., 2003, Kasper, 2009]. Man geht von zwei möglichen Prozessen aus, die das Fluorophor aus dem Triplettzustand in einen langlebigen Dunkelzustand überführen können. Im einen Fall gibt das Farbstoffmolekül ein Elektron an einen Quencher in der Umgebung ab (Oxidation) und es entsteht ein nicht fluoreszierendes Radikalkation. Dieses kann durch eine Reduktion wieder in den Grundzustand zurückkehren. Es ist aber auch möglich, dass auf das Fluorophor im Triplettzustand ein Elektron übertragen wird, so dass eine Reduktion zu einem Anion stattfindet. Von diesem Dunkelzustand kann das Farbstoffmolekül über eine Oxidation in den Grundzustand überführt werden [Kasper, 2009].

#### Abbildung 2.6:

Modell eines Vierzustandssystems. Neben dem Fluoreszenzzyklus ist in grau das Triplett-Blinken über den Triplettzustand  $T_1$  eingezeichnet. Dieser dient als Ausgangspunkt zur Überführung des Moleküls in einen langlebigen Dunkelzustand (violette Pfeile). In rot ist das irreversible Photobleichen dargestellt. Nach [Zondervan et al., 2003, Kasper, 2009].

![](_page_19_Figure_7.jpeg)

Abbildung 2.6 zeigt ein erweitertes Jabłoński-Diagramm, welches neben dem Fluoreszenzzyklus auch das Triplett-Blinken über den energetisch am tiefsten gelegenen Triplettzustand  $T_1$  darstellt.  $k_{isc}$  und  $k_T$  geben die Übergangsraten des angeregten Singulettzustandes  $S_1$  über Interkombination (ICS) in den Triplettzustand sowie die Rekombination von diesem in den Grundzustand  $S_0$  des Farbstoffmoleküls an.

Zusätzlich ist der Übergang vom Triplettzustand in einen langlebigen, unbekannten Dunkelzustand abgebildet (violette Pfeile). Hier entspricht  $k_{\pm e}$  der Übergangsrate durch Oxidation oder Reduktion des Fluorophors vom Triplettzustand in einen langlebigen Dunkelzustand.  $k_D$ ist die Übergangsrate für die Rekombination in den Grundzustand des Moleküls.

Der Dunkelzustand ist aber auch der Ausgangspunkt für die irreversible Photozerstörung des

Fluorophors  $(D \rightarrow B_{ibl})$ , besonders im Fall des hochreaktiven Radikalanions als Dunkelzustand [Christ et al., 2001, Kasper, 2009].

![](_page_20_Figure_2.jpeg)

Zeit [min]

## Abbildung 2.8:

Regeneration reversibel gebleichter Fluoreszenzproteine. Die Anregung der YFP-Moleküle erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einer hohen Intensität (einige kW/cm<sup>2</sup>). Die Anzahl der "blinkenden" Moleküle (Verweildauern im Dunkelzustand im Bereich von einigen Sekunden) ist gegen die Zeit aufgetragen. Die grauen Bereiche symbolisieren Zeitintervalle, in denen keine Bestrahlung der Fluorophore stattfand. Aus [Kaufmann, 2008].

250

Die Verweildauer der Fluorophore in einem langlebigen Dunkelzustand kann, wie oben schon erwähnt, sehr unterschiedlich sein. Abbildung 2.7 zeigt die Regeneration von Fluoreszenzproteinen aus einem reversibel gebleichten Zustand mit einer Lebensdauer von einigen zehn Sekunden. Es wurde gezeigt, dass ein Großteil der gebleichten Moleküle wieder in den fluoreszierenden Zustand zurückkehrt, wenn die Fluorophore eine Zeit lang nicht bestrahlt werden. Auch die zusätzliche Bestrahlung der Fluorophore mit einer anderen Wellenlänge als die Anregungswellenlänge beeinflusst drastisch das reversible Bleichverhalten der Farbstoffmoleküle [Sinnecker et al., 2005].

Andere Messungen haben gezeigt, dass auch bei einer Bestrahlung mit sehr hohen Anregungsintensitäten, eine Regeneration der gebleichten Fluorophore stattfindet [Kaufmann, 2008]. In Abbildung 2.8 ist die Anzahl von "blinkenden" YFP-Molekülen über die Zeit der Messung dargestellt. Dieses "Blinken" ist auf die stochastische Rekombination der Fluorophore von einem langlebigen Dunkelzustand (einige zehn Sekunden) in den Grundzustand zurückzuführen. Die Anzahl der "blinkenden" Moleküle fällt während der Bestrahlung exponentiell ab, was auf einen Bleichvorgang der Fluorophore hindeutet. Nach einem Zeitintervall ohne Bestrahlung (graue Bereiche) werden wieder deutlich mehr "blinkende" Moleküle detektiert. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen von [Sinnecker et al., 2005] (s. Abb. 2.7) und zeigt zudem, dass tatsächlich die Anzahl der Farbstoffmoleküle nach einer Regenerationsphase zugenommen hat, während die Fluoreszenzintensität eines einzelnen Moleküls im fluoreszierenden Zustand konstant bleibt.

#### 2.2.3 Konventionelle Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie nutzt den Stokes-Shift für die Trennung des emittierten Fluoreszenzlicht der Farbstoffmoleküle vom Anregungslicht. So können sehr spezifisch bestimmte Proteine und andere biologische Strukturen mit Fluorophoren markiert und mikroskopisch untersucht werden. Die Markierung erfolgt meist über eine Immunfärbung durch Antikörper, an die ein fluoreszenter Farbstoff gekoppelt ist, oder über ein Fusionsprotein, bei dem ein fluoreszierendes Protein koexprimiert wird.

Die einfachste Realisierung eines Fluoreszenzmikroskops ist ein Weitfeldaufbau. Hierbei wird eine nicht fokussierende Beleuchtung verwendet, was dazu führt, dass entlang der axialen Richtung des Mikroskops alle Ebenen gleichzeitig zur Fluoreszenz angeregt werden. Dadurch wird nicht nur Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene des Objektivs detektiert, woraus ein erhöhtes Hintergrundsignal folgt.

Eine Unterdrückung des Hintergrundsignals aus Ebenen außerhalb des Fokus bietet die TIRF-Mikroskopie (*total internal reflection fluorescence microscopy*). Durch Totalreflektion am Deckglas entsteht auf dessen Innenseite ein exponentiell abfallendes elektromagnetisches Feld. Auf diese Weise werden nur Moleküle zur Fluoreszenz angeregt, die sich in einem dünnen Bereich hinter dem Deckglas befinden.

Eine weitere Methode, optische Schnitte des Präparats zu erhalten, stellt die konfokale Fluoreszenzmikroskopie dar. Die Anregung ist hierbei beugunsbegrenzt fokussiert, so dass die zu untersuchende Struktur abgerastert werden muss. Der konfokale Strahlengang ermöglicht optische Information, die nicht aus der Fokusebene stammt, mithilfe einer Blende vor dem Detektor zu blocken. Diese Technik erlaubt weit ausgedehnte Strukturen dreidimensional aufzunehmen.

#### 2.2.4 Weiterentwicklungen zur Auflösungserhöhung

Grundsätzlich existieren verschiedene Ansätze, die Auflösung bei der Fluoreszenzmikroskopie zu erhöhen. Entsprechend den in Kapitel 2.1.2 aufgeführten Auflösungkriterien besteht einerseits die Möglichkeit die Wellenlänge zu verkürzen, wie beispielsweise in der Röntgen- oder auch der Elektronenmikrokopie. Andererseits führt eine Erhöhung der numerischen Apertur ebenfalls zu einer Steigerung der optischen Auflösung.

In den letzten Jahren wurden aber auch Methoden der Fluoreszenzmikroskopie entwickelt, welche die in Kapitel 2.1.2 erwähnten Auflösungskriterien "umgehen". Die wichtigsten Prinzipien hierzu sollen im Folgenden vorgestellt werden.

#### STED-Mikroskopie

Eine Methode, die Auflösung über die von Abbe und Rayleigh postulierten Grenzen zu erhöhen, stellt das Prinzip von STED (*stimulated emission depletion*) [Klar et al., 2000] dar. Es basiert auf sättigbaren, reversiblen optischen Übergängen zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen eines Fluorophors. Bei der STED-Mikrokopie wird ein rasterndes Verfahren ähnlich wie bei der konfokalen Mikrokopie verwendet. Zusätzlich wird allerdings über stimulierte Emission ein Großteil der Fluorophore im Anregungsvolumen wieder gebleicht. Hierfür wird eine "donutförmige" Intensitätsverteilung verwendet, die im Zentrum ein Minimum aufweist. Die Anzahl der Fluorophore, die im fluoreszenten Zustand bleiben, hängt von der Intensität des Lasers für die stimulierte Emission ab. So kann erreicht werden, dass das Volumen der fluoreszierenden Moleküle deutlich kleiner ist als die PSF des Systems. Das Abbe-Kriterium kann für die STED-Mikroskopie entsprechend erweitert werden [Westphal und Hell, 2005]:

$$\Delta d \ge \frac{\lambda}{2n\sin\alpha\sqrt{1+\frac{I}{I_{sat}}}}$$

 $I_{sat}$  ist die sog. Sättigungsintensität, d.h. ein Schwellwert, bei dem die Wahrscheinlichkeit für die Fluoreszenz eines Moleküls um 50% verringert ist.

#### Strukturierte Beleuchtung

Eine weitere Methode, die Auflösung in der Fluoreszenzmikroskopie zu erhöhen, ist die strukturierte Beleuchtung (*structured illumination microscopy, SIM*) [Heintzmann und Cremer, 1998, Gustafsson, 2000]. Hier wird keine homogene Beleuchtung, sondern ein periodisches Muster zur Anregung der Fluorophore verwendet. Das Fluoreszenzlicht, welches vom Objektiv aufgefangen wird, entspricht der Multiplikation der Strukturen des Präparats mit dem Anregungsmuster. Auf diese Weise können höhere Raumfrequenzen vom Objektiv übertragen werden, d.h. die OTF wird erweitert. Da auch das Anregungsmuster beugungsbegrenzt ist, kann die Auflösung im Fall der linearen strukturierten Beleuchtung maximal um einen Faktor zwei verbessert werden.

#### SMI-Mikroskopie

SMI (*spatially modulated illumination*) [Albrecht et al., 2002, Failla et al., 2002, Baddeley et al., 2007] stellt einen speziellen Fall der strukturierten Beleuchtung in axialer Richtung dar. Hierbei wird nicht die optische Auflösung erhöht, vielmehr erlaubt diese Methode eine präzise Größen- und Abstandsbestimmung unterhalb der Auflösungsgrenze.

#### Intensitätsmodulation durch das stehende Laserwellenfeld

Das Intensitätsprofil I(z) ist abhängig von der Wellenlänge des Anregungslichts  $\lambda_{exc}$ , dem Brechungsindex n des Mediums im Objektraum, der Phasendiffernz  $\Delta \phi$  und dem Winkel  $\theta$ , unter dem die beiden interferierenden Strahlen aufeinander treffen. Nach [Schneider, 1999] ergibt sich eine Intensitätsverteilung von:

$$I(z) = I_0 \cos^2(k_z z + \frac{\Delta \phi}{2})$$

mit  $k_z = 2\pi n \cos(\theta) / \lambda_{exc}$ . Für den Abstand der äquidistanten Intensitätsmaxima folgt:

$$d = \frac{\lambda_{exc}}{2n\cos(\theta)}$$

In Abbildung 2.9A ist ein simulierter axialer Intensitätsverlauf gezeigt. Dieser wurde für eine Anregungswellenlänge  $\lambda_{exc}$  von 488 nm, einer Numerischen Apertur *NA* von 1,4 und einem Brechungsindex *n* von 1,5 gerechnet [Reymann, 2007]. Die Einhüllende ist die PSF eines konventionellen Epi-Fluoreszenzmikroskops. Die OTF eines SMI-Mikroskops ist in Abbildung 2.9B dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die konventionelle OTF im Frequenzraum nach  $k' = \pm 2k_z$  erweitert ist. Diese Bereiche erlauben zusätzliche Information über das Objekt in axialer Richtung zu erhalten. Die Bereiche, in denen die OTF Null ist, haben zur Folge, dass an diesen Stellen keine Raumfrequenzen übertragen werden können. Dies führt dazu, dass bei der Datenanalyse Vorkenntnisse über die Objekte einfließen müssen. Hierbei handelt es sich typischerweise um die Form bzw. ein Modell der Fluorophorverteilung auf den Strukturen. Außerdem folgt hieraus auch die Forderung, dass die zu untersuchenden Strukturen als optisch isolierte Objekte vorliegen müssen, um eine Mehrdeutigkeit bei der Datenanalyse zu vermeiden [Reymann, 2007].

![](_page_23_Figure_7.jpeg)

#### Abbildung 2.9:

**PSF und OTF eines SMI-Mikroskops. A**: simulierte Detektions-PSF eines für  $\lambda_{exc} = 488$  nm, NA = 1,4 und n = 1,5. Die gestrichelte Linie ist die Einhüllende der PSF eines konventionellen Weitfeldmikroskops. **B**: schematische Darstellung der entsprechenden OTF. Aus [Reymann, 2007].

#### Datenerfassung und Analyse

Eine SMI-Messung besteht typischerweise aus einer Phasen-Rasterung und/oder einer Objekt-Rasterung. Die Phase des stehenden Wellenfeldes wird über einen Spiegel auf einem Piezoaktuator im Interferometer des SMI-Aufbaus verändert. Die Objekt-Rasterung erfolgt über einen zweiten Piezoaktuator für die Positionierung des Präparats in axialer Richtung.

Das detektierte Fluoreszenzsignal stellt eine axiale Intensitätsverteilung (*axial intensity distribution*, AID) des Objekts dar. Der Modulationskontrast C der AID eines Objekts ist definiert durch:

$$C = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max}}$$

Anhand eines Modells über die Form des Objekts bzw. die Fluorophorverteilung innerhalb der Struktur kann aus dem Modulationskontrast die Objektgröße bestimmt werden. Die relative Position eines Objekts kann direkt aus der Phaseninformation  $\Phi(x, y)$  abgelesen werden:

$$P = \frac{\Phi(x, y)}{2\pi} \cdot \lambda sw,$$

wobei  $\lambda sw$  der Wellenlänge des stehenden Wellenfelds in dem Präparat entspricht.

![](_page_24_Figure_8.jpeg)

#### Abbildung 2.10:

Simulierte und reale AID einer fluoreszenten Mikrosphäre (Bead) mit einem Durchmesser von 100 nm. A: Simulation einer AID für ein Objekt mit 100 nm axialer Ausdehnung. Der Modulationskontrast  $C = 1 - A_1/A_2 = 0,70$  wird aus dem Verhältnis der inneren und der äußeren Einhüllenden bestimmt. B: AID eines 100 nm Beads aus einer realen Messung. In schwarz sind die diskreten Messwerte dargestellt, in blau das Ergebnis der Anpassung einer Modellfunktion. Diese liefert einen Modulationskontrast von r = 0, 69. Aus [Reymann, 2007].

#### Lokalisationsmikroskopie

Eine der wichtigsten Methoden zur Erhöhung der Auflösung in der Fluoreszenzmikroskopie ist die Lokalisationsmikroskopie. Sie wird im nachfolgenden Abschnitt ausführlich erläutert.

## 2.3 Lokalisationsmikroskopie

Die Lokalisationsmikroskopie beruht auf der einzelnen Detektion der Fluorophore zur genauen Bestimmung derer Positionen, aus denen ein hochaufgelöstes Bild rekonstruiert werden kann. Im Folgenden werden verschiedene Methoden aufgeführt, die es ermöglichen, einzelne Moleküle optisch voneinander zu separieren. Es wird gezeigt, wie die aus den Positionsbestimmungen gewonnen Informationen genutzt werden können, um daraus ein Bild zu generieren, dessen effektive optische Auflösung weit unterhalb der Auflösungsgrenze nach Abbe und Rayleigh liegt.

#### 2.3.1 Separation der Fluoreszenzsignale der einzelnen Moleküle

Das fundamentale Konzept der Lokalisationsmikroskopie beruht auf der Trennung der Fluoreszenzsignale der einzelnen Farbstoffmoleküle, um deren Positionen zu bestimmen. Dass die Positionsbestimmung eines einzelnen Moleküls oder einer anderen punktförmigen Quelle deutlich genauer als die optische Auflösung des verwendeten Systems durchgeführt werden kann, wurde schon früh gezeigt [Burns et al., 1985, Betzig, 1995, Bornfleth et al., 1998].

Für die Rekonstruktion von komplexen Strukturen ist es notwendig, eine ausreichende Anzahl von Molekülpositionen zu bestimmen, d.h. es müssen sehr viele einzelne Fluorophore getrennt von einander detektiert werden. Dies kann erreicht werden durch ein "Schalten" der Farbstoffmoleküle zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen, die vom Aufnahmesystem differenziert werden können. Hierzu existieren diverse Methoden. Im Folgenden wird versucht, diese in drei unterschiedliche Gruppen aufzuteilen. Es gilt allerdings zu beachten, dass es hierbei auch zu Überschneidungen kommen kann und einige Methoden zu mehreren Gruppen zugeordnet werden können.

#### PALM - Photoaktivierung der Fluorophore

Photoaktivierbare Farbstoffmoleküle, wie beispielsweise PAGFP (photoactivatable green fluorescent protein), können durch Licht einer bestimmten Wellenlänge "aktiviert", d.h. in einen Zustand überführt werden, in dem das Fluorophor durch eine andere Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Derartige Farbstoffmoleküle werden von PALM (photoactivated localization microscopy) [Betzig et al., 2006] und FPALM (fluorescence photoactivation localization microscopy) [Hess et al., 2006] für die Separation der einzelnen Fluorophore verwendet. Bei diesen Methoden der Lokalisationsmikroskopie werden die biologischen Präparate mit den oben erwähnten photoaktivierbaren Farbstoffmolekülen markiert. Für die Lokalisationsmessung wird ein Laser mit einer Wellenlänge entsprechend dem Anregungsspektrum der Fluorophore verwendet. Zu Beginn der Messung sind (im Idealfall) alle Moleküle im nicht aktivierten Zustand und es ist somit keine Fluoreszenz der Farbstoffmoleküle zu beobachten. Die Aktivierung erfolgt über einen zweiten Laser mit einer anderen Wellenlänge. Über dessen Intensität kann die Anzahl der aktivierten Fluorophore pro Zeitintervall reguliert werden. Diese wird so angepasst, dass sich für die Aufnahmezeit eines Bildes nur so wenige Farbstoffmoleküle im aktivierten Zustand (in dem sie zur Fluoreszenz angeregt werden können) befinden, so dass kein Überlapp der Punktbildfunktionen der einzelnen Moleküle stattfindet.

#### STORM, dSTORM - Photoschalten der Fluorophore

STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) [Rust et al., 2006] und dSTROM (direct stochastic optical reconstruction microscopy) [Heilemann et al., 2008] nutzen reversible Übergänge zwischen einem "dunklen" und einem "hellen" Zustand der Farbstoffmoleküle. Das Prinzip ist ähnlich wie bei der oben beschriebenen Lokalisationsmikroskopie mit photoaktivierbaren Farbstoffen. Auch bei STORM/dSTROM werden die Fluorophore mit einem zusätzlichen Laser mit einer anderen Wellenlänge als für die Fluoreszenzanregung benötigt wird, bestrahlt, um sie zwischen einem nicht fluoreszierenden und einem fluoreszierenden Zustand zu schalten. Der Unterschied der beiden Methoden ist, dass STROM/dSTROM hierbei einen reversiblen Prozess nutzt, so dass ein Fluorophor sehr oft detektiert werden kann.

#### SPDM, GSDIM, RPM, dSTORM - Photoschalten von konventionellen Fluorophoren

Neben den oben aufgeführten Methoden der Lokalisationsmikroskopie, die meist spezielle Farbstoffmoleküle und eine zusätzliche Laserwellenlänge zum Aktivieren bzw. Schalten der Fluorophore erfordern, existiert eine weitere Gruppe, die konventionelle Fluorophore nutzt und meist nur eine Laserwellenlänge benötigt. Hier werden reversible langlebige Dunkelzustände (s. Kapitel 2.2.2) genutzt, um die Fluoreszenzsignale der Moleküle voneinander zu trennen.

Durch eine geeignet hohe Intensität des Anregungslichts (einige  $kW/cm^2$  bis einige hundert  $kW/cm^2$ ) erfolgt ein Übergang der Fluorophore in einen langlebigen Dunkelzustand. Die Anzahl der Moleküle, die in diesen Dunkelzustand überführt werden, und deren Lebensdauer können durch die Laserintensität, die Mikroumgebung (Einbettmedium) oder auch durch zusätzliche Laserwellenlängen (s. Kapitel 2.2.2) beeinflusst werden. Die beiden Methoden SPDM (*spectral precision distance / position determination microscopy*) [Lemmer et al., 2008] und RPM (*reversible photobleaching microscopy*) [Baddeley et al., 2009a] nutzen für die Fluoreszenzanregung sowie für das reversible Bleichen der Fluorophore nur eine Wellenlänge. dSTORM und GSDIM (*ground state depletion imaging microscopy*) [Fölling et al., 2008] hingegen verwenden eine zusätzliche Laserlinie mit niedriger Intensität, um den Vorgang des reversiblen Bleichens weiter zu beeinflussen. Die Rückkehr in den Grundzustand erfolgt stochastisch, so dass die Fluoreszenzsignale der einzelnen Moleküle zeitlich und somit auch optisch voneinander getrennt werden können.

## 2.3.2 Positionsbestimmung der einzelnen Moleküle zur Rekonstruktion des Lokalisationsbildes

An die jeweiligen Punktbildfunktionen der einzelnen separierten Moleküle im Bild wird eine Modellfunktion angepasst, um deren Zentren und somit die Positionen der Fluorophore zu bestimmen. Führt man diese Prozedur für genügend viele Moleküle durch, so kann man aus den erhaltenen Positionsinformationen ein neues Bild generieren, dessen effektive optische Auflösung nur noch von der Lokalisationsgenauigkeit der Molekülpositionen und deren Dichte abhängig ist. Ein detailliertes Protokoll zur Lokalisationsmikroskopie am Beispiel von photoaktivierbaren Farbstoffen wird in [Gould et al., 2009] beschrieben.

![](_page_27_Figure_1.jpeg)

#### Abbildung 2.11:

**Prinzip der Lokalisationsmikroskopie (SPDM).** Oben links ist ein konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild von YFP-markierten Membranausläufern einer Zelle dargestellt. Rechts daneben ist schematisch der Datenstapel einer SPDM-Aufnahme gezeigt. In gelb ist ein kleiner Bereich eines Einzelbilds aus dem Datenstapel markiert, in dem die Signale von vier Fluorophoren zu sehen sind. Darunter befindet sich derselbe Bildausschnitt. Hier ist die Intensität zusätzlich in der z-Richtung aufgetragen, um die Anpassung einer Modellfunktion (2D-Gauß-Verteilung) zu verdeutlichen. Hieraus erhält man die Positionen der Moleküle, welche in ein neues Bild eingetragen werden. Die Ungenauigkeit der Positionsbestimmung (Lokalisationsgenauigkeit) kann dadurch visualisiert werden, indem die Molekülpositionen in dem neuen Bild mit einer Gauß-Verteilung gefaltet werden, deren Standardabweichung der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit entspricht. Führt man diese Prozedur für alle detektierten Einzelmolekülsignale durch, so erhält man ein Lokalisationsbild, wie es unten rechts dargestellt ist. Darüber ist in einem Histogramm die Lokalisationsgenauigkeit der detektierten Moleküle aufgetragen. Mod. nach [Kaufmann et al., 2009].

#### Lokalisationsgenauigkeit

Die Genauigkeit, mit der die Position eines einzelnen Farbstoffmoleküls bestimmt werden kann, hängt hauptsächlich von der Anzahl der detektierten Photonen N ab [Bobroff, 1986, Thomson et al., 2002, Bornfleth et al., 1998]. Die theoretisch erreichbare Lokalisationsgenauigkeit, welche abhängig ist von der Größe der PSF, der Zahl der detektierten Photonen, der Pixelgröße des Detektors sowie des Hintergrundrauschens auf jedem Pixel, kann nach [Thomson et al., 2002] wie folgt hergeleitet werden.

Ausgehend davon, dass jedes detektierte Photon eines Moleküls ein Maß für dessen Position angibt, kann diese durch den Mittelwert über alle Positionen der detektierten Photonen bestimmt werden. Daraus ergibt sich unter der Annahme von reinem Photonenrauschen für N detektierte Photonen mit der Standardabweichung s der PSF der Fehler des Mittelwerts zu:

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2}{N}$$

Durch die Pixelierung bzw. die endliche Größe a eines Pixels des Detektors erhält man eine zusätzliche Ungenauigkeit, da man nicht weiß, an welcher Position auf dem Pixel das Photon aufgetroffen ist:

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N}.$$

Um das Hintergrundrauschen b zu berücksichtigen, das durch emittierte Photonen anderer fluoreszierender Moleküle verursacht wird, erweitert man die obige Gleichung wie folgt:

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} = \sigma_{\rm xy}^2.$$

Mit dieser Gleichung kann die theoretisch zu erwartende Lokalisationsgenauigkeit  $\sigma_{xy}$  für einen zweidimensionalen Detektor bestimmt werden.

#### Anpassung einer Modellfunktion

Zur Positionsbestimmung anhand der Anpassung einer Modellfunktion an die Intensitätsverteilung eines Einzelmolekülsignals verwendet man typischerweise nicht die PSF, sondern die wesentlich einfachere zweidimensionale Gauß-Verteilung:

$$I(x,y) = I_0 \cdot exp\left[-\frac{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}{2s^2}\right] + b.$$

Die Anpassung erfolgt entweder über die Methode der kleinsten Quadrate (z.B. dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus) oder über die Maximum-Likelihood-Methode. Die Lokalisationsgenauigkeit ergibt sich entweder direkt aus dem Fehler der Position aus der Anpassung der Modellfunktion oder kann aus der Anzahl der detektierten Photonen N für ein Einzelmole-külsignal aus der oben aufgeführten Gleichung für die theoretisch erreichbare Lokalisationsgenauigkeit bestimmt werden.

#### Rekonstruktion des Lokalisationsbildes

Um ein Lokalisationsbild aus den gewonnen Positionen der einzelnen detektierten Molekülen zu erhalten, werden diese in ein neues Bild eingetragen. Die effektive optische Auflösung bei der Lokalisationsmikroskopie hängt von der Lokalisationsgenauigkeit und der Dichte der detektierten Moleküle ab. Da die Lokalisationsgenauigkeit die Standardabweichung der Molekülposition darstellt, muss diese in eine Halbwertsbreite umgerechnet werden, um mit einer PSF verglichen werden zu können. Daraus ergibt sich für die mittlere effektive optische Auflösung basierend auf der mittleren Lokalisationsgenauigkeit  $\bar{\sigma}_{xy}$ :  $D_{\text{eff}}^{\sigma_{\text{xy}}} = 2\sqrt{2ln2} \cdot \bar{\sigma}_{\text{xy}} \approx 2.35 \bar{\sigma}_{\text{xy}}.$ 

Neben der Lokalisationsgenauigkeit muss auch die Punktdichte im Bild berücksichtigt werden. Nach dem Abtasttheorem [Shannon, 1949] muss der Abstand der Datenpunkte mindestens halb so klein sein, wie die Größe der Struktur, die dargestellt werden soll. Hieraus erhält man die mittlere effektive optische Auflösung, basierend auf dem mittleren Abstand zur nächsten benachbarten Molekülposition  $\bar{d}_{NN}$ :

 $D_{\rm eff}^{\bar{d}_{\rm NN}} = 2\bar{d}_{\rm NN}.$ 

Die effektive Auflösung eines Lokalisationsbilds ist durch den größeren der beiden Faktoren bestimmt:

$$D_{\text{eff}} = \begin{cases} 2,35\bar{\sigma}_{\text{xy}}, & \text{wenn } 2,35\bar{\sigma}_{\text{xy}} \ge 2\bar{d}_{\text{NN}}, \\ 2\bar{d}_{\text{NN}}, & \text{wenn } 2,35\bar{\sigma}_{\text{xy}} < 2\bar{d}_{\text{NN}}. \end{cases}$$

Zur Visualisierung der effektiven optischen Auflösung, die durch die Lokalisationsaufnahme erreicht wurde, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine detailliere Übersicht hierzu bietet [Baddeley et al., 2010]. Die gängigste Methode nutzt die Faltung der Molekülpositionen mit einer Gauß-Verteilung, welche eine Standardabweichung besitzt, die der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit entspricht.

## 2.3.3 Kombination von SMI- und Lokalisationsmikroskopie

Die Methoden der Lokalisationsmikroskopie, welche konventionelle Fluorophore verwenden, bieten die Möglichkeit einer Kombination mit anderen hochauflösenden Verfahren, die auf

![](_page_29_Figure_9.jpeg)

## Abbildung 2.12:

**3D-Rekonstruktion einer kombinierten Aufnahme von SMI- und Lokalisationsmikroskopie.** Links ist das zweidimensionale Lokalisationsbild einer Membranstruktur dargestellt. Auf der rechten Seite ist ein Ausschnitt des linken Bildes in der dreidimensionalen Rekonstruktion der axialen und lateralen Positionsinformation der Kombination von SMI- und Lokalisationsmikroskopie gezeigt. Aus [Kaufmann, 2008], mod. nach [Lemmer et al., 2008] einer Weitfeldbeleuchtung beruhen. So kann beispielsweise die in Kapitel 2.2.4 beschriebene SMI-Mikrokopie genutzt werden, um die axiale Ausdehnung und Position von kleinen Strukturen zu bestimmen. Diese Information kann mit der lateralen Positionsinformation der Lokalisationsmikroskopie zusammengeführt werden, um ein hochaufgelöstes dreidimensionales Bild der aufgenommen Struktur zur rekonstruieren.

In Abbildung 2.13 ist schematisch die Kombination von SMI- und Lokalisationsmikroskopie veranschaulicht. Wie in Kapitel 2.2.4 bereits ausgeführt, kann mithilfe einer Objekt- oder Phasen-Rasterung die axiale Information der untersuchten Struktur ermittelt werden. Dadurch ist es möglich, jeder lateralen Einzelmolekülposition, die mithilfe der Lokalisationsmikroskopie bestimmt wurde, eine axiale Komponente zuzuordnen. Die Ungenauigkeit dieser Komponente ergibt sich aus der axialen Ausdehnung der Struktur. Aus dieser 3D-Information kann die räumliche Anordnung der detektierten Moleküle rekonstruiert werden. Dies ist beispielhaft für eine Membranstruktur in Abbildung 2.12 gezeigt.

![](_page_30_Figure_3.jpeg)

#### Abbildung 2.13:

Kombination von SMI- und Lokalisationsmikrokopie. Mithilfe einer Objekt-Rasterung (Verschieben des Präparats in axialer Richtung durch das stehende Wellenfeld) und/oder einer Phasen-Rasterung (Verschieben des Wellenfelds in axialer Richtung über das Präparat) wird die axiale Ausdehnung und Position der Struktur bestimmt. Diese Information wird mit der lateralen Positionsinformation der darauffolgenden Lokalisationsmessung kombiniert. Hieraus kann ein hochaufgelöstes dreidimensionales Bild, wie es beispielhaft in Abbildung 2.12 gezeigt ist, rekonstruiert werden. Aus [Kaufmann, 2008].

## 3 Mikroskopaufbau und Datenauswertung

Im Folgenden wird der Mikroskopaufbau beschrieben, der für die experimentellen Messungen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Hierbei handelt es sich um das Vertico-SMI [Reymann, 2007], das neben SMI-Messungen zusätzlich auch Lokalisationsmessungen (SPDM) ermöglicht. Zudem werden die wichtigsten bereits existierenden Programme und Algorithmen zur Datenauswertung vorgestellt.

## 3.1 Aufbau des Vertico-SMI

Das Vertico-SMI stellt eine Weiterentwicklung zur Optimierung für biologische Messungen an lebenden Zellen des gewöhnlichen Aufbaus eines SMI-Mikroskops [Spöri, 2004] dar. Aufgrund der Weitfeldbeleuchtung kann es auch für die Lokalisationsmikroskopie eingesetzt werden [Lemmer, 2009].

Die Software zur Geräteansteuerung und Datenakquisition ist sowohl für SMI- als auch für Lokalisationsaufnahmen in Python<sup>1</sup> implementiert [Baddeley, 2007].

## 3.1.1 Strahlengang

Am Aufbau des Vertico-SMI stehen zwei Laser<sup>2</sup> mit den Wellenlängen 488 nm und 568 nm zur Verfügung. Sie werden über einen Strahlteiler DS1<sup>3</sup> zusammengeführt und über einen Kollimator um den Faktor 2,5 aufgeweitet. Die Spiegel S1 bis S4 dienen zur Strahlführung in den vertikalen SMI-Aufbau. Die Blenden B1 bis B3 werden zur Beseitigung von Beugungseffekten vorangegangener Aperturen verwendet. Ein nicht polarisierender Strahlteiler BS<sup>4</sup> teilt den ankommenden Laserstrahl im Verhältnis 50:50. Über die Linse L1 und den dichroitischen Spiegel DS2<sup>5</sup> wird der eine Strahl in die hintere Fokusebende des Objektivs O1<sup>6</sup> fokussiert. Der zweite Strahl wird über die Linse L2 in die hintere Fokusebene des Objektivs O2<sup>6</sup> fokussiert. Auf diese Weise kann ein stehendes Laserfeld zwischen den beiden sich gegenüberstehenden Objektiven erreicht werden. Über einen Spiegel an einem Piezoaktuator PS<sup>7</sup> im oberen Arm des Interferometers kann die Phase des Wellenfeldes eingestellt werden. Das Präparat wird zwischen den beiden Objektiven über Schrittmotoren<sup>8</sup> platziert. Ein weiterer Piezoaktuator<sup>9</sup> ermöglicht die genaue Positionierung der Probe in axialer Richtung. Das emittierte Fluoreszenzlicht passiert

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Python Software Foundation, http://www.python.org

 $<sup>^2 \</sup>mathrm{Sapphire}$  HP 488, Sapphire 568, Coherent, Dieburg

 $<sup>^3\</sup>mathrm{F33\text{-}492}$  AHF Analysentechnik, Tübingen

 $<sup>^{4}</sup>$ NT32-505, Edmund Optics, Karlsruhe

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>F52-489, AHF Analysentechnik, Tübingen

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>HCX PL APO, 63x, NA=0,7-1,4, Leica, Wetzlar

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup>P-753.1CD, Physik Instrumente, Karlsruhe

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup>M-505.4DG (x-Achse), M-112.1DG (y-Achse), M-110.1DG (z-Achse), Physik Instrumente, Karlsruhe

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup>P-621.ZCD, Physik Instrumente, Karlsruhe

![](_page_33_Figure_1.jpeg)

#### Abbildung 3.1:

Schematischer Aufbau des Vertico-SMI. Die beiden Laserlinien werden über den dichroitischen Strahlteiler DS1 zusammengeführt und durch einen Kollimator aufgeweitet. Die Probe wird über das Objektiv O1 kollimiert beleuchtet. Der Strahlteiler BS ermöglicht die Strahlführung zum zweiten Objektiv O2, um ein stehendes Wellenfeld zwischen den Objektiven für die SMI-Mikroskopie zu erzeugen. Für die Lokalisationsmikroskopie kann eine zusätzliche Linse LL in den Strahlengang eingebracht werden, um die Intensität in der Objektebene entsprechend anzupassen. Das Fluoreszenzlicht gelangt durch den Strahlteiler BS2 zur CCD-Kamera und wird durch einen Filter BF zusätzlich aufgereinigt. Mod. nach [Kaufmann, 2008].

den dichroitischen Spiegel DS2<sup>1</sup> und wird von einem Blocking-Filter BF<sup>2</sup> zusätzlich vom Anregungslicht des Lasers getrennt. Bandpassfilter<sup>34</sup> ermöglichen außerdem die Unterdrückung der Autofluoreszenz der Zelle oder anderer fluoreszenter Moleküle mit unterschiedlichem Emissionsspektrum. Die Tubuslinse TL<sup>5</sup> fokussiert das Fluoreszenzlicht auf den CCD-Chip einer sehr sensitiven und schnellen Kamera<sup>6</sup> mit einer Auflösung von 1376 × 1040 Pixeln, deren Kantenlänge 64,5 µm beträgt. Durch die 63x Vergrößerung des Objektivs ergibt sich eine Pixelgröße von 102 nm im Objektraum. Um die Intensität des Anregungslichts in der Objektebene für Lokalisationsaufnahmen anzupassen, kann eine langbrennweitige (50 cm) Linse LL in den Strahlengang eingebracht werden.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>F52-489, AHF Analysentechnik, Tübingen

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>F54-568, AHF Analysentechnik, Tübingen

 $<sup>^3\</sup>mathrm{XF3003},$  Laser Components GmbH, Olching

 $<sup>^4\</sup>mathrm{F37\text{-}609},\,\mathrm{AHF}$ Analysentechnik, Tübingen

 $<sup>{}^{5}11020</sup>$  515 073 010, 1.0x, Brennweite f=200mm, Leica, Wetzlar

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>SensiCam QE, PCO Imaging, Kehlheim

## 3.1.2 SMI-Modus

Der SMI-Aufbau ermöglicht die Realisierung eines stehenden Wellenfelds durch die Interferenz der Laserstrahlen gleicher Intensität und Polarisation. Dieses kann nach dem in Kapitel 2.2.4 beschriebenen SMI-Prinzip verwendet werden, um Informationen über die axiale Position und Ausdehnung von kleinen isolierten Strukturen im Präparat zu erhalten.

Die in Python implementierte Software zur Mikroskopsteuerung [Baddeley, 2007] ermöglicht die Aufnahme von Phasen- und Objekt-Rasterungen um daraus mit weiteren Algorithmen (s. [Baddeley, 2007] und Kapitel 4.6) Objektgröße und Ausdehnung zu bestimmen.

## 3.1.3 SPDM-Modus

Wird das Vertico-SMI für die in Kapitel 2.3 vorgestellte Lokalisationsmikroskopie eingesetzt, so erfolgt die Beleuchtung nur über das obere Objektiv O1. Eine zusätzliche langbrennweitige Linse LL im Beleuchtungsstrahlengang ermöglicht die Anpassung der Anregungsintensität im Objektraum, um die erforderlichen Bedingungen für den reversiblen Bleichvorgang der Fluorophore zu schaffen. Mit der in Python implementierten Aufnahmesoftware [Baddeley, 2007] wird, abhängig vom Präparat, ein Datenstapel von 300 bis mehreren tausend Einzelbildern mit einer Rate von 5 fps bis 20 fps und einer Integrationszeit zwischen wenigen ms bis 150 ms aufgenommen. Die Datenauswertung zur Rekonstruktion eines Lokalisationsbildes aus den Rohdaten und weitere Analysen erfolgen mithilfe in MATLAB<sup>1</sup> implementierten Algorithmen (s. Kapitel 3.2 und 4).

## 3.2 Algorithmen zur Positionsbestimmung der einzelnen Moleküle

Zur Bestimmung der Molekülpositionen aus den Rohdaten existieren in der Arbeitsgruppe zwei unterschiedliche Methoden. Der Algorithmus SPDM [Lemmer, 2009] basiert auf der iterativen Anpassung einer Modellfunktion an die Einzelmolekülsignale über einen Levenberg-Marquardt-Algorithmus zur Bestimmung der Positionen. Der erst kürzlich entwickelter Algorithmus fastSPDM [Grüll et al., 2011] nutzt die Maximum-Likelihood-Methode. Ist der Hintergrund gleich Null, kann das Problem der Likelihood-Maximierung analytisch gelöst werden. Dieser Algorithmus bietet bei gleicher Genauigkeit einen Geschwindigkeitsvorteil von einem Faktor 100 gegenüber der iterativen Anpassung einer Modellfunktion über die Methode der kleinsten Quadrate.

## 3.2.1 Positionsbestimmung mit dem Algorithmus SPDM

Der Algorithmus SPDM stellt eine typische, jedoch rechen- und zeitintensive Methode zur Bestimmung der Positionen der Einzelmolekülsignale dar. Der Vorteil gegenüber anderen Methoden liegt darin, dass die Lokalisationsgenauigkeit direkt aus der Anpassung der Modellfunktion gewonnen wird und nicht anhand von anderen Parametern abgeschätzt werden muss.

## Aufbereitung der Rohdaten

Im ersten Schritt des Algorithmus SPDM wird die Signalstärke  $I_{\text{count}}$  unter Berücksichtigung des Verstärkungsfaktors der Kamera  $c_{\text{conv}}$  in die entsprechende Anzahl der detektierten Photonen  $I_{\text{ph}}$  für jedes Pixel an der Position (x, y, n) umgerechnet, wobei n der Bildnummer aus

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>The MathWorks, Natick, USA

den N aufgenommenen Einzelbildern entspricht:

$$I_{\rm ph}(x, y, n) = c_{\rm conv} \cdot I_{\rm count}(x, y, n) , \quad n = 1 \dots N.$$

Für Rohdaten, die ein hohes Hintergrundsignal aufweisen (typisch für Messungen an biologischen Präparaten), wird ein Differenzdatenstapel erzeugt. Dies geschieht durch die Subtraktion des jeweiligen nachfolgenden Bildes von jedem Einzelbild im Datenstapel:

$$I_{\text{diff}}(x, y, n) = I_{\text{ph}}(x, y, n) - I_{\text{ph}}(x, y, n+1) , \quad n = 1 \dots N - 1.$$

Auf diese Weise werden die Hintergrundsignale aus den Daten entfernt und es bleiben lediglich die Signale der kurz aufleuchtenden einzelnen Farbstoffmoleküle zurück. Durch die Subtraktion der Einzelbilder wird jedoch das Rauschen auf den Pixeln um den Faktor  $\sqrt{2}$  erhöht.

#### Segmentierung der Daten

Der zweite Schritt des Algorithmus SPDM besteht aus der Segmentierung der Einzelmolekülsignale im Datenstapel. Hierfür wird eine modifizierte Version des Algorithmus ofind [Baddeley, 2007] verwendet, der auf dem clean-Algorithmus aus der Radioastronomie beruht [Högbom, 1974, Clark, 1980]. Durch einen Bandpassfilter werden die Strukturen in den Einzelbildern entfernt, die kleiner sind als solche, die vom System übertragen werden können (Rauschen) und Strukturen aus dem Hintergrund, die deutlich größer sind als ein Signal eines einzelnen Moleküls:

$$I_{\rm bp} = I_{\rm diff} \otimes g(\sigma_{\rm r}) - I_{\rm diff} \otimes g(\sigma_{\rm h}).$$

 $g(\sigma_{\rm r})$  und  $g(\sigma_{\rm h})$  sind Gauß-Kernel mit einer Standardabweichung, die der Größe der jeweiligen zu filternden Struktur (Rauschen bzw. Hintergrund) entspricht.

Zur groben Positionsbestimmung werden die Maximalwerte in den Einzelbildern inkrementell ermittelt (weitere Details hierzu s. [Baddeley, 2007], [Lemmer, 2009] und [Gunkel, 2011]).

#### Positionsbestimmung durch Anpassen einer Modellfunktion

Nach der Segmentierung der Daten erfolgt im dritten Schritt die eigentliche Positionsbestimmung der einzelnen Moleküle. An den zuvor ermittelten Positionen wird eine ROI (*region of interest*) von  $15 \times 15$  Pixeln aus den entsprechenden Einzelbildern des Datenstapels extrahiert. An das hierin enthaltene Einzelmolekülsignal wird eine zweidimensionale Gauß-Verteilung mit einem zusätzlichen Hintergrundgradienten als Modellfunktion angepasst (s. hierzu auch Abb. 3.2):

$$f(x, y, \mathbf{p}) = p_1 \cdot exp \left[ -\left(\frac{(x - p_2)^2}{2p_4^2} + \frac{(y - p_3)^2}{2p_5^2}\right) \right] + p_6 + p_7 \cdot (x - p_2) + p_8 \cdot (y - p_3).$$

Die Parameter  $p_1 \dots p_8$  werden durch einen Levenberg-Marquardt-Algorithmus optimiert. Die Startparameter werden wie folgt gewählt:


#### Abbildung 3.2:

**Anpassung einer Modellfunktion. A**: aufbereitetes Einzelmolekülsignal. **B**: entsprechende 2D-Gauß-Verteilung als Modellfunktion zur Anpassung an die Daten. Die Pixelgröße beträgt hier 65 nm. Aus [Gunkel, 2011].

$$p_{1} = max(I_{\text{ROI}}) - min(I_{\text{ROI}}),$$

$$p_{2} = \{x \mid I_{\text{ROI}}(x, y) = max(I_{\text{ROI}}(x, y))\},$$

$$p_{3} = \{y \mid I_{\text{ROI}}(x, y) = max(I_{\text{ROI}}(x, y))\},$$

$$p_{4} = p_{5} = \frac{1}{2,35} \cdot \frac{\lambda}{2\text{NA}} \cdot \frac{1}{\text{Pixel}},$$

$$p_{6} = min(I_{\text{ROI}}),$$

$$p_{7} = p_{8} = 0,01,$$

wobei  $\lambda$  der Wellenlänge des Fluoreszenzlichts, NA der numerischen Apertur und Pixel der effektiven Pixelgröße der Kamera entspricht.

Nach der Bestimmung der optimierten Parameter  $\mathbf{p}$  werden diese im Bezug auf folgende Kriterien hin gefiltert:

- alle Parameter besitzen reale, nicht unendliche Werte,
- die Amplitude  $p_1$  ist 7 mal höher als das Hintergrundrauschen,
- die Standardabweichungen der Modellfunktion  $p_4$  und  $p_5$  sind kleiner als 150 nm,
- die Abweichung von  $p_4$  und  $p_5$  beträgt weniger als 40%,
- die Lokalisationsgenauigkeit  $(p_4 + p_5)/2$  ist kleiner als ein festgelegter Wert (typischerweise 55 nm).

Werden alle Kriterien erfüllt, so wird aus der Quanteneffizienz der Kamera und den Parametern  $\mathbf{p}$  die Anzahl der detektierten Photonen abgeschätzt und alle Ergebnisse in eine Tabelle eingetragen. Weitere Ausführungen hierzu sind in [Lemmer, 2009] und [Gunkel, 2011] dargestellt.

#### 3.2.2 Positionsbestimmung mit dem Algorithmus fastSPDM

Für den Fall einer zweidimensionalen Gauß-Verteilung ohne zusätzlichen Hintergrund als Modellfunktion, existiert eine analytische Lösung der Likelihood-Maximierung [Anthony und Garnick, 2009]. Dadurch entfällt die rechenintensive iterative Anpassung der Modellfunktion an die Daten. Der Algorithmus fastSPDM nutzt diese Methode zur Bestimmung der Positionen der Einzelmolekülsignale einer Lokalisationsmessung und bietet dadurch einen enormen Geschwindigkeitsvorteil gegenüber dem Algorithmus SPDM. Eine detaillierte Beschreibung kann in [Grüll et al., 2011] nachgelesen werden.

#### Auffinden der Einzelmolekülsignale

Der erste Schritt des Algorithmus fastSPDM besteht aus dem Auffinden der Signale der einzelnen Moleküle. Dies geschieht durch einen Vergleich des Hintergrunds  $I_H$  mit jedem Pixelwert. Der Hintergrund  $I_H$  wird folgendermaßen bestimmt:

$$I_H(x, y, n) = I_H(x, y, n-1) + \frac{1}{H} \cdot (\min[I(x, y, n) - I_H(x, y, n-1), \sigma_H(x, y, n)]),$$

wobei H dem inversen Glättungsfaktor, I(x, y, n) dem Pixelwert an der Stelle (x, y) im Einzelbild der Bildnummer n und  $\sigma_H = \sqrt{I_H}$  der Breite des Poisson verteilten Hintergrundrauschens entspricht.

Das Maximum eines Einzelmolekülsignals muss mehr als  $4\sigma_H$  betragen, damit es für die weitere Positionsbestimmung ausgewählt wird. Diese geschieht innerhalb einer quadratischen ROI von 7 × 7 Pixeln um das lokale Maximum des Signals, von dem zuerst der Hintergrund  $I_H$  abgezogen wird.

#### Erstellen einer runden ROI um die Einzelmolekülsignale

Im zweiten Schritt werden zusätzlich zur Subtraktion des Hintergrunds  $I_H$  zunächst alle Pixel um  $2\sigma_H$  reduziert. Alle negativen Werte werden auf Null gesetzt. Dies führt zu einer Unterdrückung der stark von Rauschen behafteten Pixel am Rand und somit zu einer runden ROI, was eine präzisere Positionsbestimmung des Einzelmolekülsignals ermöglicht [Grüll et al., 2011].

Ein optionaler dritter Schritt kann genutzt werden, um zwei überlappende Signale voneinander zu trennen. Hierbei wird die ROI ausgehend vom Zentrum zu den Rändern hin abgetastet und falls ein lokales Minimum gefunden wird, werden alle weiteren Pixel auf Null gesetzt.

#### Positionsbestimmung

Im letzten Schritt wird die Position  $\vec{\mu}$  des Einzelmolekülsignals sowie die zugehörige Lokalisationsgenauigkeit  $\sigma_{xy}$  berechnet:

$$\begin{split} \vec{\mu} &= \sum_{i} \frac{I_{i}}{I_{\text{ges}}} \vec{x}_{i}, \\ \sigma_{\text{x}} &= \sqrt{\frac{1}{12I_{\text{ges}}} \sum_{i} \left(\frac{x_{i} - \mu_{x}}{I_{\text{ges}}}\right)^{2} (I_{i} + I_{H})}, \end{split}$$

wobei  $I_i$  der Pixelwert des i-ten Pixels in der ROI ist und  $I_{\text{ges}}$  die gesamte Intensität des Signals, die durch die Summe über alle Pixelwerte  $I_i$  in der ROI abgeschätzt werden kann.

# 3.3 Visualisierung und weitere Analyse von Lokalisationsdaten

In der Arbeitsgruppe existieren verschiedene Algorithmen zur Darstellung von Lokalisationsdaten [Lemmer, 2009]. Außerdem sind grundlegende Algorithmen zur weiteren Auswertung von Lokalisationsdaten vorhanden. Im Folgenden sollen die wichtigsten vorgestellt und kurz erläutert werden. Detaillierte Beschreibungen dieser Algorithmen befinden sich in [Lemmer, 2009] und [Gunkel, 2011].

### 3.3.1 Grundlegende Algorithmen zur Visualisierung von Lokalisationsdaten

Die Visualisierung der Positionsinformation, die aus einer Lokalisationsmessung gewonnen wird, ist der wichtigste Schritt in der Weiterverarbeitung und Verifizierung der Daten. Hierzu sind unterschiedliche Algorithmen vorhanden. In Abbildung 3.3 sind beispielhaft die Lokalisationsbilder der entsprechenden Methoden gezeigt.



#### Abbildung 3.3:

**Unterschiedliche Visualisierungsmöglichkeiten von Lokalisationsdaten. A**: Positionsbild erzeugt mit Orte2Bild. **B**: Visualisierung der lokalen Punktdichte innerhalb eines Radius von 100 nm um jede Molekülposition mit Nachbarlabel. **C**: Darstellung der Lokalisationsgenauigkeit durch den Algorithmus Orte2StdBild.

#### Darstellung der Positionen (Orte2Bild)

Die einfachste und anschaulichste Darstellung von einzelnen Molekülpositionen besteht in dem Eintragen dieser als Punkte in ein "leeres" Bild. Der Algorithmus Orte2Bild erstellt ein Lokalisationsbild mit der gewünschten Pixelgröße, in welchem jede detektierte Molekülposition

einem Punkt (Pixel) zugeordnet wird. Der Wert eines Pixels im Bild entspricht der Summe von Positionen, die in diesen Pixel fallen. In Abbildung 3.3A ist beispielhaft ein derartiges Lokalisationsbild gezeigt.

# Darstellung der Positionen unter Berücksichtigung der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit (Orte2StdBild)

Der Algorithmus Orte2StdBild ermöglicht eine Darstellung der einzelnen Positionen der detektierten Moleküle unter Einbeziehung ihrer jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit. Wie bei dem Algorithmus Orte2Bild werden die einzelnen Positionen in ein Bild eingetragen. Zusätzlich wird allerdings jede Molekülposition mit einer zweidimensionalen Gauß-Verteilung gefaltet, deren Standardabweichung der Lokalisationsgenauigkeit der jeweiligen Molekülposition entspricht (s. Abb. 3.3C).

### Darstellung der lokalen Punktdichte in vorgegebenem Radius (Nachbarlabel)

In Kapitel 2.3.2 wurde bereits erwähnt, dass neben der Lokalisationsgenauigkeit die Punktdichte der Signalpositionen eine entscheidende Rolle spielt. Mithilfe des Algorithmus Nachbarlabel kann ein Lokalisationsbild erstellt werden, welches die lokale Punktdichte in einem vorgegebenen Radius widerspiegelt. Basierend auf dem Algorithmus Orte2Bild wird ein Positionsbild generiert, das als Grundlage für die Bestimmung der Punktdichte dient. Diese erfolgt durch die Faltung des Positionsbildes mit einer binären Kreisfläche eines bestimmten Radius. Durch die pixelweise Multiplikation des gefalteten Bildes mit dem ursprünglichen Bild erhält man ein Lokalisationsbild, dessen Pixelwerte die Zahl von Molekülpositionen in einem vorgegebenen Radius um die jeweiligen Position angeben (s. Abb. 3.3B).

### 3.3.2 Bestehende Algorithmen zur weiteren Auswertung von Lokalisationsdaten

In der Arbeitsgruppe existieren weitere Algorithmen zur Analyse von Lokalisationsdaten, die im Rahmen verschiedener Doktor- und Diplomarbeiten [Lemmer, 2009, Gunkel, 2011, Ruckelshausen, 2011, Paech, 2011] sowie in der vorliegenden Arbeit entwickelt wurden.

Eine der grundlegendsten Analysen von Lokalisationsdaten stellt die Distanzanalyse dar. Der Algorithmus SPDMDistanzen [Lemmer, 2009] ermöglicht die Bestimmung aller Distanzen zwischen den einzelnen Molekülpositionen, die in einem Lokalisationsbild auftreten. Er kann sowohl auf Positionsdaten als auch auf Lokalisationsbilder, die mit dem Algorithmus Orte2Bild erstellt wurden, angewendet werden.

Analog zu SPDMDistanzen existiert der Algorithmus NNDistanzen, der für jede Molekülposition, basierend auf einem Positionsbild, den Abstand zum nächsten Nachbarn bestimmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Algorithmus NNDistanzen weiterentwickelt (NNOrte), so dass die Nächsten-Nachbarn-Distanzen basierend auf den Positionsdaten bestimmt werden können, um Artefakte der Pixelierung eines Bildes zu vermeiden und um jeder Molekülposition eindeutig den Abstand zum nächsten Nachbarn zuordnen zu können.

# 4 Entwickelte Algorithmen zur Datenanalyse

In Kapitel 3.2.1 wurde bereits der Algorithmus SPDM vorgestellt, der es ermöglicht, Positionsdaten und weitere Informationen der detektierten Einzelmolekülsignale aus den aufgenommenen Rohdaten zu erhalten. Auch grundlegende Methoden zur Darstellung dieser Lokalisationsdaten wurden beschrieben. In diesem Kapitel werden die wichtigsten Algorithmen zur Datenauswertung, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden, näher erläutert. Hierbei handelt es sich einerseits um weitere Methoden zur Visualisierung von Daten der Lokalisationsmikroskopie. Der Schwerpunkt lag andererseits jedoch auf der Entwicklung von Algorithmen zu weiteren Analysen basierend auf der Positionsinformation der einzelnen detektierten Molekülen, die bei der Lokalisationsmikroskopie zur Verfügung steht. Alle Algorithmen wurden in MATLAB implementiert und können über die Kommandozeile mit den entsprechenden Befehlen aufgerufen werden. Für Algorithmen mit vielen Eingabeparametern wurden zusätzlich grafische Benutzeroberflächen (*graphical user interfaces*, GUIs) für eine übersichtlichere Handhabung angelegt.

### 4.1 Visualisierung von Lokalisationsdaten

Bei den unterschiedlichen Verfahren zur Darstellung von Lokalisationsdaten stellt sich stets die Frage, wie die effektive optische Auflösung (Strukturauflösung) des Systems in den resultierenden Bildern wiedergeben wird. Wie in Kapitel 3.3.1 und 2.3.2 bereits beschrieben, gibt es Methoden, welche die Lokalisationsgenauigkeit der detektierten Moleküle als Maß für die effektive Auflösung abbilden. Da jedoch ein Lokalisationsbild aus sehr vielen einzelnen Punkten zusammengesetzt ist, wird die Strukturauflösung auch durch die Punktdichte bestimmt. Das Abtasttheorem [Shannon, 1949] legt fest, dass um eine Struktur der Größe d auflösen zu können, ein mittlerer Abstand der Punkte von d/2 oder weniger vorliegen muss. Um also ein Lokalisationsbild zu erstellen, das die Strukturauflösung wiedergibt, die durch die zugrunde liegenden Daten bestimmt ist, muss sowohl die Lokalisationsgenauigkeit als auch die Punktdichte der detektierten Moleküle berücksichtigt werden.

In Kapitel 3.3.1 wurde bereits eine Methode zur Darstellung von Lokalisationsdaten beschrieben, die eine Gauß-Verteilung mit einer Standardabweichung, die der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit  $\sigma_{Lok}$  entspricht, über jede detektierte Molekülposition setzt. Dies spiegelt die gängigste Methode zur Repräsentation der effektiven optischen Auflösung des generierten Lokalisationsbildes wider. Für ein einzelnes Molekül im Bild entspricht diese Darstellung dem, was man theoretisch in einem Mikroskop mit vergleichbarer Auflösung (gegeben durch die PSF des Systems) beobachten würde. Betrachtet man jedoch alle detektierten Moleküle, so entspricht die effektive optische Auflösung in dieser Darstellung nicht mehr der tatsächlichen Strukturauflösung, falls die Dichte der einzelnen Punkte nicht hoch genug ist. Andererseits wird bei einer sehr hohen Punktdichte die Strukturauflösung im Lokalisationsbild um den Faktor  $\sqrt{2}$  verschlechtert dargestellt. Dies beruht auf der zweimaligen Faltung der zugrunde liegenden Struktur mit einer Gauß-Verteilung deren Standardabweichung der Lokalisationsgenauigkeit entspricht. Die erste Faltung entsteht durch die Bestimmung der Positionen der detektierten Moleküle mit einer bestimmten Ungenauigkeit (= Lokalisationsgenauigkeit). Die zweite Faltung ist die eines jeden Positionspunktes im Bild mit der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit (vergl. Abb. 4.1A,B,F).

#### 4.1.1 Visualisierung basierend auf den Abständen zum nächsten Nachbarn

Um die Punktdichte im Lokalisationsbild als Maß für die Strukturauflösung darzustellen, wurde der Algorithmus Orte2NNBild entwickelt, der auf einem ähnlichen Prinzip beruht wie die in Kapitel 3.3.1 beschriebene Methode für die Lokalisationsgenauigkeit. Es wird ebenfalls jede Position im Bild durch eine Gauß-Verteilung repräsentiert, deren Standardabweichung nun aber dem Abstand zum nächsten benachbarten Molekül entspricht. Der Abstand zum nächsten Nachbarn  $n_i$  des Punktes  $x_i$  ist im metrischen Raum der Menge aller detektierten Punkte X durch eine Abstandsfunktion d(x, y) mit  $x, y \in X$  definiert:

$$d_{NN_i} = d(n_i, x_i) \le d(x, x_i) \quad \forall x \in X \setminus n_i.$$

Das Lokalisationsbild  $B_{LM}$  wird folgendermaßen erstellt:

$$B_{LM} = \sum_{i=1}^{N} g(x_i, d_{NNi})$$

wobei N die Gesamtzahl der detektierten Moleküle ist und  $g(x, \sigma)$  eine zweidimensionale Gauß-Verteilung an der Position x mit einer Standardabweichung von  $\sigma$  darstellt.

Auf diese Weise wird die lokale effektive optische Auflösung im Bild der jeweiligen lokalen Punktdichte angepasst. Bei Aufnahmen mit hoher Punktdichte entspricht die im Lokalisationsbild dargestellte Strukturauflösung tatsächlich der Information, die in den Lokalisationsdaten enthalten ist. In diesem Fall ist die Standardabweichung der Gauß-Verteilung wegen des geringen Abstandes zum nächsten Nachbarn  $\bar{d}_{NN}$  deutlich kleiner als die Verteilung der Molekülpositionen um die eigentliche Struktur aufgrund der Ungenauigkeit der Positionsbestimmung  $\bar{\sigma}_{Lok}$ .

In Abbildung 4.1 sind Simulationen für eine Lokalisationsmessung gezeigt, in welcher Punkte auf zwei parallel verlaufenden Geraden mit einem Abstand von 40 nm mit einer Lokalisationsgenauigkeit von 10 nm detektiert wurden (Anordnung nach [Baddeley et al., 2010]). Die Lokalisationsdaten wurden mit unterschiedlichen Verfahren visualisiert (Abb. 4.1B-E). Projektionen der Intensitätsverteilung in den jeweiligen Bildern entlang der Geraden sind in Abbildung 4.1F aufgetragen. Die gestrichelte graue Kurve entspricht hier der theoretisch zu erwartenden Verteilung, wie sie im Lokalisationsbild A dargestellt ist. Die farbigen Kurven spiegeln die Strukturauflösung in den Lokalisationsbildern wider, die mit unterschiedlichen Methoden aus demselben Datensatz generiert wurden. Vergleicht man die Kurven mit der theoretischen Verteilung, so kann man erkennen, dass im Fall der Darstellung über die Gauß-Verteilung mit der Breite der Lokalisationsgenauigkeit die Auflösung im Bild drastisch verringert wird (blaue Kurve in Abb. 4.1F). Die Kurven, die sich aus der Visualisierung über die Nächsten-Nachbarn-Distanzen ergeben, stimmen hingegen sehr gut mit der theoretischen Verteilung überein.



#### Abbildung 4.1:

Vergleich unterschiedlicher Visualisierungen an simulierten Lokalisationsdaten. Auf zwei parallel verlaufenden Geraden mit einem Abstand von 40 nm wurde eine Lokalisaitonsmessung mit einer Lokalisationsgenauigkeit von 10 nm simuliert. Maßstab: 40 nm. A: theoretisch zu erwartende Verteilung. B: Darstellung jeder Position durch eine Gauß-Verteilung mit der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit als Standardabweichung. C: Darstellung jeder Position durch eine Gauß-Verteilung mit dem jeweiligen Abstand zum nächsten benachbarten Punkt als Standardabweichung. D: Darstellung jeder Position durch eine Gauß-Verteilung mit dem jeweiligen mittleren Abstand zu den nächsten 4 benachbarten Punkten als Standardabweichung. E: Darstellung ebenfalls basierend auf dem mittleren Abstand zu den nächsten 4 benachbarten Punkten, jedoch sind alle Punkte, die einem mittleren Abstand zu den nächsten 4 Nachbarn kleiner als der Median aller Abstandsmittelwerte aufweisen, mit einer Gauß-Verteilung mit einer Standardabweichung, die dem Median entspricht gefaltet. F: Projektion entlang der Geraden für die unterschiedlichen Lokalisationsbilder (A-E). Die Kurven wurden auf ihr Integral normiert. Die gestrichelte graue Kurve spiegelt die theoretisch zu erwartenden Verteilung wider, die farbigen Kurven die Verteilungen der verschiedenen Darstellungsmöglichkeiten.

Abbildung 4.2 zeigt für die unterschiedlichen Methoden zur Visualisierung von Lokalisationsdaten jeweils zwei Beispiele experimenteller Daten von Lokalisationsmessungen an fluoreszenzmarkierten biologischen Strukturen. In den unteren Bildern ist jeweils der mittlere Abstand zum nächsten benachbarten Molekül deutlich kleiner als die mittlere Lokalisationsgenauigkeit ( $\bar{d}_{NN} \ll \bar{\sigma}_{Lok}$ ). Vergleicht man das durch die Lokalisationsgenauigkeit visualisierte Bild (4.2A) mit dem, basierend auf den Abständen zum nächsten benachbarten Molekül (4.2B), so ist im ersten Fall eine Verringerung der Strukturauflösung im Lokalisationsbild zu beobachten. In den oberen Bildern von Abbildung 4.2 liegt der umgekehrte Sachverhalt vor. In diesem Beispiel ist der mittlere Abstand zum nächsten benachbarten Molekül deutlich größer als die mittlere Lokalisationsgenauigkeit ( $\bar{d}_{NN} >> \bar{\sigma}_{Lok}$ ). Betrachtet man nun Bereiche der Struktur, an welchen die lokale Punktdichte sehr gering ist (in den Bildern durch Pfeile markiert), so stellt man fest, dass in der Darstellung über die Lokalisationsgenauigkeit die einzelnen Moleküle auch hier gut zu sehen sind. Die Gesamtstruktur kann in diesen Bereichen aufgrund des Abtasttheorems jedoch nur sehr ungenau aus den Datenpunkten rekonstruiert werden. Die Strukturauflösung wird folglich in dieser Darstellung nicht korrekt wiedergegeben. Außerdem wird der Betrachter dazu verleitet, in Bereichen zu geringer Punktdichten Strukturen zu erkennen, die unterhalb der tatsächlichen Auflösung liegen und somit nur zufällig erzeugte Muster sind. Verwendet man den Abstand zum nächsten Nachbarn eines jeden Moleküls für die Visualisierung, so wird die Struktur in Bereichen mit niedriger Punktdichte entsprechend



#### Abbildung 4.2:

Vergleich unterschiedlicher Visualisierungen von experimentellen Lokalisationsdaten. Die oberen Bilder zeigen jeweils Lokalisationsaufnahmen von YFP-gefärbten Membranausläufern, die unteren YFP-markierte Tight Junction-Proteine. Der Maßstab beträgt für alle Bilder 500 nm. Pfeile kennzeichnen Regionen mit geringer Punktdichte. A: Darstellung jeder Position durch eine Gauß-Verteilung mit der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit als Standardabweichung. B: Darstellung jeder Position durch eine Gauß-Verteilung mit dem jeweiligen Abstand zum nächsten benachbarten Punkt als Standardabweichung. C: Darstellung jeder Position durch eine Gauß-Verteilung mit dem jeweiligen mittleren Abstand zu den nächsten 4 benachbarten Punkten als Standardabweichung. D: Darstellung wie in C, jedoch sind alle Punkte mit einem mittleren Abstand zu den nächsten 4 Nachbarn kleiner als der Median aller Abstandsmittelwerte mit einer Gauß-Verteilung mit einer Standardabweichung, die dem Median entspricht, visualisiert.

dunkel dargestellt. Dies ermöglicht dem Betrachter direkt die tatsächliche Strukturauflösung, die durch die Lokalisationsdaten gegeben ist, aus den Bildern abzulesen. Strukturelle Details im Lokalisationsbild werden so weit verschmiert, wie es die lokale Punktdichte erfordert.

#### Visualisierung basierend auf dem mittleren Abstand zu den nächsten 4 Nachbarn

Die oben beschriebene Methode zur Visualisierung von Lokalisationsdaten, basierend auf den Abständen zum nächsten Nachbarn, ist sehr sensitiv gegenüber Punkten, deren Positionen zufällig nahe beieinander liegen. Im Lokalisationsbild machen sich diese Punktpaare durch einzelne, sehr hell dargestellte Punkte bemerkbar. Um diesen Effekt zu verringern, wurde der Algorithmus Orte2NNBild weiterentwickelt, so dass er für die Darstellung den mittleren Abstand zu den nächsten 4 benachbarten Molekülen berücksichtigt. Außerdem wird jeder Molekülposition vor der Faltung mit der jeweiligen Gauß-Verteilung ein Intensitätswert zugeordnet, welcher der Zahl der detektierten Photonen für dieses Molekül entspricht. Das Prinzip des Algorithmus Orte2NN4Bild wird im Folgenden kurz dargestellt.

Die nächsten 4 Nachbarn  $n_i^k$  mit k = 1, ..., 4 eines Punktes  $x_i$  sind definiert durch:

$$0 \le d(n_i^j, x_i) \le d(n_i^{j+1}, x_i) \qquad j = 1, ..., 3$$
$$d(n_i^j, x_i) \le d(x, x_i) \qquad \forall x \in X \setminus \{n_i^1, ..., n_i^4\}.$$

Um das Lokalisationsbild  $B_{LM}$  zu erstellen, wird zu<br/>erst für jeden Punkt  $x_i$  der Mittelwert der Abstände zu den nächsten 4 Nachbarn  $\bar{d}^4_{NNi}$  berechnet. Das Bild ergibt sich dann aus:

$$B_{LM} = \sum_{i=1}^{N} g(x_i, \bar{d}^4_{NNi}) \cdot N_{Phi}.$$

 $N_{Phi}$  ist hierbei die Zahl der detektierten Photonen für das Molekül an der Position  $x_i$  und N die Gesamtzahl der detektierten Moleküle.

Auf diese Weise wird ein Lokalisationsbild generiert, in welchem die Helligkeit zum einen auf der Moleküldichte und zum anderen auf der Intensität der einzelnen Moleküle beruht. Diese Visualisierung ist anlog zur Darstellung der Intensität in einem konventionellen Weitfeldfluoreszenzbild.

Beide Methoden, die auf den Nächsten-Nachbarn-Distanzen beruhen, führen zur gleichen Strukturauflösung im Lokalisationsbild, die mit der theoretisch zu erwartenden übereinstimmt (s. Abb. 4.1F). Vergleicht man die Abbildungen 4.2B und C miteinander, so erscheinen die Strukturen in Bild C, das basierend auf dem mittleren Abstand zu den nächsten 4 Nachbarn der jeweiligen Moleküle erstellt wurde, zusammenhängender und kontrastreicher gegenüber unspezifischen Signalen im Hintergrund.

In Abbildung 4.2D sind die Molekülpositionen ebenfalls mit einer Gauß-Verteilung gefaltet, deren Standardabweichung dem mittleren Abstand zu den nächsten 4 Nachbarn entspricht. In diesem Fall wurden jedoch alle Positionen, die einen kleineren mittleren Abstand zu den nächsten 4 Nachbarn aufweisen als der Median der Distanzverteilung der Mittelwerte für alle Positionen, mit einer Gauß-Verteilung gefaltet, deren Standardabweichung dem Median entspricht. Als Grenze wurde der Median gewählt, da dieser näher am Maximum der Distanzverteilung liegt und robuster gegenüber Ausreißern ist. Auf diese Weise wird ein Lokalisationsbild generiert, das bei einer korrekten und verlustfreien Darstellung der Strukturauflösung (s. Abb. 4.1F), noch zusammenhängender und weniger "gepunktet" wirkt.

#### 4.1.2 Visualisierung über Farbkodierung der lokalen Punktdichte

Eine Möglichkeit, sowohl die Lokalisationsgenauigkeit als auch die lokale Dichte der detektierten Moleküle in einem Bild darzustellen, bietet eine farbliche Kodierung der einzelnen Positionspunkte. In Abbildung 4.3 ist am Beispiel von GFP-markierten H2B-Proteinen diese Methode zur Visualisierung von Lokalisationsdaten gezeigt. Hier wurde jede einzelne Position durch eine Gauß-Verteilung mit einer Standardabweichung, die der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit entspricht, in das Bild eingetragen. Zusätzlich wurde die lokale Dichte in einem bestimmten Radius um jede Molekülposition bestimmt und dem Bild als Farbkodierung übergeben. Auf diese Art und Weise kann anschaulich die Punktdichte im Lokalisationsbild illustriert werden und beispielsweise zu Vergleichen verschiedener Aufnahmen verwendet werden, wie in Abbildung 4.3C,D für einen Interphase- und einen Metaphasezellkern.

Die lokale Dichte ist bei dieser Methode abhängig von dem vorgegebenen Radius. Einerseits bietet dies die Möglichkeit, gezielt Strukturen einer gewissen Größe im Lokalisationsbild hervorzuheben (vergl. Abb. 4.3C,E). Andererseits birgt diese Abhängigkeit aber auch das Risiko, dass bei "falsch" eingestelltem Radius die eigentlichen Strukturen in der Darstellung unterdrückt werden oder bei einer zufälligen Verteilung von Punkten der Eindruck einer Struktur erweckt wird. Eine von Vorgaben unabhängige Möglichkeit der Visualisierung der lokalen Punktdichte bietet die Methode, die auf den Abständen zu den nächsten benachbarten Molekülpositionen beruht. Das daraus generierte Bild kann ebenfalls über eine Farbkodierung mit dem Lokalisationsbild, basierend auf der Lokalisationsgenauigkeit, verknüpft werden. In Abbildung 4.3F wurde für denselben Datensatz wie für die Bilder in Abbildung 4.3C,E die lokale Punktdichte über den mittleren Abstand zu den nächsten 4 benachbarten Punkten einer jeden Molekülposition bestimmt. In diesem Bild sind ähnliche Strukturen wie in Abbildung 4.3C zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die Größe der detektierten Strukturen im Bereich von 100 nm liegt. Allerdings scheint die Dichte innerhalb eines Bereiches von 100 nm nicht homogen zu sein, was sich in der Darstellung über die Nächsten-Nachbarn-Distanzen durch eine lokal erhöhte Dichte bemerkbar macht. Diese Dichteschwankungen unterhalb von 100 nm sind in Abbildung 4.3C nicht erkennbar. Die Strukturauflösung der Dichtedarstellung ist hier durch die Vorgabe des Radius definiert.

Es wäre auch möglich die lokale Dichte nicht farblich, sondern in Grauwerten darzustellen. Dies würde eine Verwendung der Methode für Mehr-Farben-Aufnahmen ermöglichen. Da jedoch gerade die Farbkodierung eine anschauliche Visualisierung der Punktdichte ermöglicht, wäre für Mehr-Farben-Aufnahmen der in Kapitel 4.1.1 vorgestellte Algorithmus zu bevorzugen.



#### Abbildung 4.3:

Visualisierung der lokalen Punktdichte über eine Farbkodierung. A: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild GFP-markierter H2B-Proteine eines Interphasezellkerns. B: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild GFP-gefärbter H2B-Proteine eines Metaphasezellkerns. C und D: zugehörige Lokalisationsbilder zu den Ausschnitten in A und B. Die lokale Punktdichte wurde in einem Radius von 100 nm um jede Molekülposition bestimmt und farblich kodiert. E: Lokalisationsbild desselben Datensatzes wie C. Die lokale Dichte wurde hier in einem Radius von 1 µm betrachtet. F: Bestimmung der lokalen Punktdichte über den mittleren Abstand zu den nächsten 4 Nachbarn eines jeden detektierten Moleküls. Der Maßstab in allen Bildern beträgt 2 µm.

# 4.2 Korrektur des mechanischen Drifts

Eine nicht zu vernachlässigende Fehlerquelle bei der Lokalisationsmikroskopie ist der mechanische Drift des Präparats während der Messung. In einem Zeitraum von 30 s bis 30 min für eine komplette Aufnahme spielen Effekte wie die thermische Ausdehnung von Komponenten des Aufbaus oder ein Drift des Verschiebetisches relativ zum Objektiv und der Kamera eine wichtige Rolle. Schon ein Drift um wenige 10 nm führt zu einem "Verschmieren" der Strukturen im Lokalisationsbild und kann eine Aufnahme dadurch unbrauchbar machen.

Ein stabiler Aufbau des Mikroskops kann dem vorbeugen. So würde beispielsweise eine feste Kopplung von Probenhalter, Objektiv und Kamera einer relativen Driftbewegung des Präparats zum Objektiv vorbeugen. Da dies einige Einschränkungen mit sich bringt und deshalb bei den meisten Aufbauten für die Lokalisationsmikroskopie eine solche Kopplung nicht vorhanden ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Methoden entwickelt, die es ermöglichen, mechanische Drifts während einer Lokalisationsmessung zu korrigieren.

#### 4.2.1 Korrektur anhand von Referenzobjekten

Eine Möglichkeit der Driftkorrektur besteht in der Verwendung von fluoreszenten Referenzobjekten. Hierzu eignen sich fluoreszierende Mikrosphären (*"Beads"*), die bei einer Größe von 100 nm genügend klein sind, aber trotzdem ausreichend Fluorophore besitzen, so dass ihre Position bei hohen Anregungsintensitäten über lange Zeit sehr präzise bestimmt werden kann, bevor sie ausbleichen. Bei lokalisationsmikroskopischen Messungen an biologischen Objekten werden diese Beads zugegeben, um in jedem Einzelbild der Aufnahme einige Referenzobjekte zur Bestimmung des mechanischen Drifts des Präparats zu erhalten. Das Prinzip beruht darauf, dass durch die Positionsbestimmung der Beads genau verfolgt werden kann, wie sich das Präparat relativ zum Objektiv verschoben hat. Kennt man die Verschiebung, kann diese zur Korrektur der Daten verwendet werden und jede detektierte Molekülposition entsprechend korrigiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Algorithmus entwickelt, der anhand von fluoreszierenden Beads auf dem Präparat den mechanischen Drift während der Lokalisationsmessung bestimmt und die Lokalisationsdaten entsprechend korrigiert. Der Algorithmus zur Bestimmung des Drifts wurde von Daniel Paech im Rahmen seiner von mir betreuten Diplomarbeit [Paech, 2011] entwickelt. Hierbei werden in jedem Einzelbild des Lokalisationsdatenstapels die Positionen der darin enthaltenen Beads mithilfe des in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Algorithmus SPDM bestimmt und mit den Positionen aus dem vorangegangenen Bild verglichen. Aus dem Mittelwert des Versatzes aller Positionen, wird der Versatz des Präparats bestimmt. Eine Interpolation des Driftverlaufs der Positionen ermöglicht eine Korrektur für die Punkte aus einem Bild, für das keine Beadposition bestimmt werden konnte. Zusätzlich werden die Daten geglättet, um statistische Schwankungen zu unterdrücken, die beispielsweise durch Beads verursacht werden können, die nur sporadisch über den Lokalisationsdatenstapel hinweg detektiert wurden. Weitere Details zu diesem Teil des Algorithmus sind in der Diplomarbeit von Daniel Paech genauer erläutert. Der zweite Teil der Driftkorrektur nutzt die Daten, die aus den Positionsbestimmungen der Beads gewonnen wurden, um die Positionen der einzelnen Moleküle entsprechend zu korrigieren.



#### Abbildung 4.4:

**Analyse des mechanischen Drifts anhand fluoreszenter Beads. A**: Drift in x- und y-Richtung bestimmt anhand von 24 Beads. Die farbigen Kurven stellen die gemittelten Positionsmessungen der Beads in jedem Einzelbild relativ zu den jeweiligen Positionen der Beads im ersten Bild des Datenstapels dar. Die graue und schwarze Kurve zeigt das Ergebnis einer Glättung, um statistische Schwankungen zu unterdrücken. Diese geglätteten Daten wurden zur Korrektur des mechanischen Drifts von 56 andern Beads derselben Aufnahme verwendet. B zeigt den mittleren Versatz dieser Beads nach der Korrektur. Die Standardabweichung beider Verteilungen beträgt weniger als 1 nm.

In Abbildung 4.4A ist der mechanische Drift einer Lokalisationsmessung an einem Präparat mit fluoreszenten Beads gezeigt. Hierfür wurden 100 nm große Beads in Ethanol verdünnt und durch Antrocken an einem Deckglas angeheftet. Der mechanische Drift in diesem Beispiel entspricht einem typischen Drift, der während der Lokalisationsmessung auftreten kann. In x-Richtung beträgt der Versatz zwischen erstem und letztem Bild ungefähr 35 nm, in y-Richtung nur 5 nm. Nach einer Glättung zur Unterdrückung der statistischen Schwankungen zeigt sich, dass das Driftverhalten in beide Richtungen sehr linear ist. Die Bestimmung des Drifts wurde anhand von 24 Beads der Aufnahme durchgeführt. Die geglätteten Daten der Driftanalyse wurden zur Korrektur von 56 anderen Beads derselben Aufnahme verwendet. Abbildung 4.4B zeigt das Ergebnis einer Driftanalyse der korrigierten Lokalisationsdaten. Hier wird deutlich, dass ein solcher mechanischer Drift sehr genau korrigiert werden kann. Die Standardabweichung der beiden Positionsverteilungen in Abbildung 4.4B beträgt weniger als 1 nm.

Die Anzahl der benötigten Referenzobjekte zur Korrektur des mechanischen Drifts des Präparats hängt von dem Driftverhalten und der gewünschten Genauigkeit der Korrektur ab. Ist der Drift für beide Raumrichtungen sehr linear, so reicht sogar ein Bead im Gesichtsfeld der Messung für eine Korrektur mit einer Genauigkeit von ca. 10 nm (s. [Paech, 2011]). Für den Fall eines komplexeren Driftverhaltens zeigen die Analysen von Daniel Paech für eine unterschiedliche Anzahl von Referenzobjekten, dass weniger als 10 ausreichen, um den mechanischen Drift des Präparats mit einer Genauigkeit von besser als 2 nm zu korrigieren.

#### 4.2.2 Korrektur ohne Referenzobjekte

Die Bestimmung und Korrektur des mechanischen Drifts des Präparats anhand von Referenzobjekten ist nur dann möglich, wenn diese an den Stellen in dem Präparat platziert werden können, an denen die Aufnahmen durchgeführt werden sollen. Dies stellt vor allem bei Aufnahmen weit innerhalb der Zellen (z.B. im Zellkern) oder solchen, die zwischen verschiedene Zellen gemacht werden, ein Problem dar.

Um auch bei Präparaten ohne Referenzobjekte den mechanischen Drift während der Messung korrigieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Algorithmus findDrift entwickelt, der den mechanischen Drift durch eine Autokorrelation von Lokalisationsbildern von Teilmengen des Datenstapels bestimmt.

Dem Algorithmus wird vorgegeben, aus wie vielen Einzelbildern des Rohdatenstapels jeweils ein Lokalisationsbild erzeugt werden soll, d.h. in wie viele Teile der Datenstapel geteilt werden soll. Die Teilmenge des Datenstapels, aus dem jeweils ein Lokalisationsbild erzeugt wird, sollte groß genug sein, dass die Strukturen eindeutig durch die Molekülpositionen, die in dieser Teilmenge detektiert wurden, dargestellt werden können. Gleichzeitig müssen aber genügend Lokalisationsbilder erstellt werden können, um ausreichend Datenpunkte zur Bestimmung des mechanischen Drifts zu erhalten. Auch die Pixelgröße der Lokalisationsbilder wird dem Algorithmus vorgegeben. Eine kleine Pixelgröße lässt eine genauere Bestimmung des Drifts zu, benötigt aber auch mehr Rechenaufwand.



#### Abbildung 4.5:

**Bestimmung und Korrektur des mechanischen Drifts ohne Referenzobjekte. A**: Bestimmung des mechanischen Drifts in x- und y-Richtung durch Autokorrelation von Lokalisationsbildern aus Teilmengen des Rohdatenstapels. Die Kreise stellen die Messdaten des Drifts dar, die Geraden eine Anpassung einer linearen Funktion. B: Visualisierung des mechanischen Drifts des Präparats durch eine Farbkodierung, die angibt, zu welchem Zeitpunkt ein Molekül detektiert wurde. C: gleicher Ausschnitt wie **B**, jedoch nach der Korrektur des mechanischen Drifts anhand der Daten aus **A**.

Die Positionen in den Lokalisationsbildern werden mit einer Gauß-Verteilung mit einer Standardabweichung von 50 nm gefaltet. Dadurch wird im Bild eine zusammenhängende Struktur erzeugt und statistische Schwankungen der Punktdichte zwischen den Lokalisationsbildern fallen weniger ins Gewicht. Die Funktion findshift der MATLAB-Toolbox DIPimage wird zur Bestimmung des Versatzes zweier Lokalisationsbilder verwendet. Dieser Versatz wird jeweils zwischen dem Bild aus der ersten Teilmenge des Datensatzes zu allen anderen Bildern ermittelt. An die sich daraus ergebenden Datenpunkte wird für x- und y-Richtung jeweils eine lineare Kurve angepasst die für die Korrektur der Lokalisationsdaten verwendet wird.

In Abbildung 4.5 ist ein Beispiel für die Bestimmung und Korrektur des mechanischen Drifts anhand von YFP-markierten Claudin-Proteinen gezeigt. Der Drift während der Lokalisationsmessung ist in Abbildung 4.5B durch eine Farbkodierung im Lokalisationsbild visualisiert. Jedem Molekül im Bild wird eine Farbe zugeordnet, die widerspiegelt, wann es während der Messung detektiert wurde. Die durch den Drift des Präparats verschobenen Punkte über die Zeit der Messungen hinweg führen somit zu einer "Regenbogen-Färbung" der Strukturen im Lokalisationsbild. Das Ergebnis der Bestimmung des Drifts über den Algorithmus findDrift ist in Abbildung 4.5A gezeigt. Die Kreise repräsentieren die Daten der Driftbestimmung über die Autokorrelation der einzelnen Lokalisationsbilder, die Geraden eine Anpassung einer linearen Kurve für x- und y-Richtung. Das Ergebnis der Driftkorrektur ist in Abbildung 4.5C zu sehen. Die Strukturen sind nun deutlich feiner und die einzelnen Punkte im Bild gleichmäßig auf den Strukturen verteilt.

# 4.3 Analyse von Protein-Clustern

Viele biologische Fragestellungen beinhalten die Untersuchung von Protein-Cluster, da diese eine bedeutende Rolle bei der jeweiligen Funktionsweise der Proteine spielen. Die Lokalisationsmikroskopie eignet sich in besonderer Weise zur Analyse solcher Komplexe. Einerseits bietet sie eine sehr hohe Strukturauflösung, um mehr über die Morphologie zu erfahren, andererseits stellt sie Informationen über die einzelnen Moleküle, die in den Strukturen detektiert wurden zur Verfügung, die für weitere statistische Analysen genutzt werden können. Die Kombination aus hoher Strukturauflösung und Analysen auf dem Einzelmolekülniveau ermöglicht eine sehr präzise Charakterisierung der Protein-Cluster.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Algorithmen clusters\_v3 und autoclusters entwickelt. Der Algorithmus autoclusters liest automatisiert eine komplette Messreihe von Lokalisationsdaten ein und verwendet den Algorithmus clusters\_v3, um Signal-Cluster in den Bildern ausfindig zu machen und sie zu charakterisieren. Für eine einfache und übersichtliche Handhabung existiert eine graphische Benutzeroberfläche und die wichtigsten Ergebnisse der Analysen werden automatisch in unterschiedlichen Diagrammen dargestellt.

Für Untersuchungen von sehr kleinen Clustern, die nur anhand von geringen Abweichungen der Distanzverteilung der Molekülpositionen im Lokalisationsbild von einer zufälligen Punktverteilung verifiziert werden können, wurde der Algorithmus autoDistAna entwickelt. Dieser ermöglicht einen Vergleich mit simulierten Daten für eine vorgegebene Cluster-Größe bei einer bestimmten Detektionseffizienz des Systems.

#### 4.3.1 Identifikation von Clustern im Lokalisationsbild

Die erste Stufe des Algorithmus clusters\_v3 besteht aus der Identifikation der Cluster im Lokalisationsbild. Über die Bestimmung der lokalen Dichte im Bild und das Anlegen eines Schwellwertes ist es möglich, die einzelnen Punkte zu klassifizieren.

Zur Bestimmung der lokalen Punktdichte werden zwei unterschiedliche Verfahren herangezogen, die sich gegenseitig ergänzen, bzw. kontrollieren sollen. Das erste basiert auf dem Nachbarlabel-Algorithmus, bei dem in einem vorgegebenen Radius um jeden Punkt die Anzahl benachbarter Punkte ermittelt werden. Diese Methode ist sehr intuitiv, jedoch ist das Ergebnis abhängig von dem vorgegebenen Radius. Deshalb wurde eine zweite Methode implementiert, die auf dem Abstand zum nächsten benachbarten Molekül beruht. In diesem Fall wird kein Parameter benötigt, der vorgegeben werden muss und das Ergebnis ist somit alleine durch die Lokalisationsdaten bestimmt (s. hierzu auch Kapitel 4.1.2).

#### Cluster-Identifikation basierend auf der Anzahl der Nachbarn innerhalb eines bestimmten Radius

Mit dem Algorithmus Nachbarlabel wird, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, ein Bild erzeugt, in dem ein Pixel einer Molekülposition entspricht und der Wert des Pixels  $p_i$  angibt, wie viele Punkte innerhalb eines vorgegebenen Radius um diese Position liegen. Die Klassifizierung der Punkte erfolgt über einen Schwellwert  $p_{th}$ , der eine Mindestzahl von benachbarten Punkten vorgibt. Ein Punkt  $p_i$  wird als zugehörig zu einem Cluster definiert, wenn gilt:  $p_i > p_{th}$ . Auf diese Weise wird ein Cluster nicht nur anhand der lokalen Dichte identifiziert, es kann zusätzlich eine Mindestanzahl von Punkten für einen Cluster festgelegt werden. Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben werden jedoch Strukturen der Größe des vorgegebenen Radius hervorgehoben.



#### Abbildung 4.6:

**Algorithmus zur Cluster-Identifikation. A**: Lokalisationsbild von Alexa594-markierten Splicing-Faktoren auf Lampenbürstenchromosomen. **B** zeigt das Ergebnis des im Text beschriebenen Algorithmus zur Cluster-Identifikation für einen Radius von 30 nm um jedes detektierte Molekül und einem Schwellwert von 3 Nachbarn innerhalb dieses Radius. Die einzelnen Molekülpositionen sind durch schwarze Punkte dargestellt, die durch den Algorithmus gefundenen Cluster sind orange markiert.

#### Cluster-Identifikation basierend auf dem Abstand zum nächsten Nachbarn

Eine andere Möglichkeit zur Identifikation von Clustern nutzt die in Kapitel 4.1.1 beschriebene Methode zur Bestimmung der lokalen Dichte über den Abstand zum nächsten Nachbarn. Dazu wird dieser für jeden Punkt  $p_i$  bestimmt und in eine lokale Dichte umgerechnet:  $D_i = 1/d_{NN_i}^2$ . Um die Lokalisationsgenauigkeit zu berücksichtigen und zufällig entstandene Punktepaare weniger zu gewichten, werden alle Punkte normalverteilt um ihre ursprüngliche Position entsprechend ihrer Lokalisationsgenauigkeit neu angeordnet. Danach wird wieder der Abstand zum nächsten Nachbarn eines jeden Moleküls bestimmt und daraus die lokale Dichte berechnet. Dieser Vorgang wird viele Male wiederholt und am Ende über alle erhaltenen Daten gemittelt. Ein Punkt wird als zu einem Cluster zugehörig definiert, wenn an seiner Position die lokale Dichte  $D_i$  größer ist als ein vorgegebener Schwellwert  $D_{th}$ .

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Methode, die es zusätzlich ermöglicht eine Mindestanzahl von Punkten für einen Cluster festzulegen, kann hier nur die minimale Punktdichte vorgegeben werden.

Vereinigt man beide Methoden zur Cluster-Identifikation, so können mithilfe der ersten genaue Vorgaben gemacht werden, was als Cluster definiert werden soll. Die zweite Methode ermöglicht eine Kontrolle der ersten hinsichtlich der gefundenen Strukturen und der Wahl der Parameter.

Nachdem die Klassifizierung der Punkte erfolgt ist, werden die Punkte innerhalb eines Clusters durch eine morphologische Schließung zu einem zusammenhängenden Objekt geformt. Diese "Maske" erlaubt nun die einzelnen Cluster individuell zu analysieren und charakteristische Parameter, wie Größe und Morphologie, aber auch die Anzahl der sich darin befindlichen Punkte und bei größeren Clustern sogar die Verteilung der Punkte innerhalb der Cluster, zu bestimmen.

Abbildung 4.6 zeigt anhand eines Beispiels das Ergebnis des oben beschriebenen Algorithmus zur Identifikation von Clustern in einem Lokalisationsbild. Die Aufnahme wurde an mit Alexa594-markierten Splicing-Faktoren auf Lampenbürstenchromosomen durchgeführt, welche sich "klumpenförmig" um den DNA-Strang anordnen. Das Lokalisationsbild in Abbildung 4.6A wurde mit dem in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Algorithmus Orte2NN4Bild erstellt. Die Helligkeitsinformation im Bild spiegelt somit die lokale Punktdichte wider. Vergleicht man es mit dem Ergebnis des Algorithmus zur Cluster-Identifikation (Abb. 4.6B), so erkennt man deutlich, dass an den Stellen hoher lokaler Punktdichte (bei geeigneter Parameterwahl) die Protein-Cluster eindeutig identifiziert werden.

### 4.3.2 Analyse der einzelnen Cluster im Lokalisationsbild und Automatisierung für viele Datensätze

Für die weitere Analyse der Cluster verwendet der Algorithmus clusters\_v3 die Funktion dip\_measure aus der MATLAB-Toolbox DIPimage. Diese ermöglicht die Bestimmung der Position eines Clusters, dessen Fläche, die längste Achse und die Länge der dazu senkrechten Achse sowie, mit der Information über die einzelnen Molekülpositionen im Lokalisationsbild, die Anzahl von detektierten Signalen in einem Cluster.

#### Abbildung 4.7:

Grafische Benutzeroberfläche zur Cluster-Analyse. Alle Parameter, die zur Cluster-Analyse benötigt werden, können über diese Oberfläche eingestellt werden. Auf der rechten Seite wird das Verzeichnis und der Dateiname der auszuwertenden Daten eingegeben. Darunter befindet sich eine Statusanzeige, die dem Benutzer mitteilt, welche Datei gerade ausgewertet wird und, ob Probleme bei einer Auswertung aufgetreten sind.

🥠 autoclusters	
Cluster Analysis	
Data Analysis	Directory Settings
Pixelsize [nm]: 10	select Data Directory
Radius (pixel): 6	H:VerbB2'SKBr3'EXR_A488\Auswertung
min. Neighbours: 5	Filename:orte ☑ save Data
min. Density [1/µm²]; 530	Status running Evaluation of File No. 13 of 31 Errors (the following Files were not evaluated):
delete Clusters larger than: 100	03,
compare to random Data 🛛 🔽	]
Distance Analysis of the individual Points	3
max. Distance for all Distances [nm]:	500 run analysis
max. Distance for NN-Distances [nm]:	200

Für einen Vergleich der Ergebnisse aus den Lokalisationsdaten mit einer zufälligen Verteilung von Punkten wird ein Datensatz mit der gleichen Anzahl von Punkten und einer mittleren Dichte, die den tatsächlichen Daten entspricht, generiert. Auf dieser simulierten Zufallsverteilung von Punkten wird derselbe Algorithmus mit den gleichen Parametern wie für die Daten aus den Lokalisationsmessungen angewandt und ebenfalls die oben beschriebenen Größen bestimmt. Auf diese Weise kann einerseits die Güte der Paramterwahl für die Cluster-Identifikation überprüft werden, indem man das Verhältnis der gefundenen Cluster in den Lokalisationsdaten zu denen in der zufälligen Verteilung von Punkten betrachtet. Andererseits bietet die simulierte Punktverteilung die Möglichkeit, direkte Unterschiede der Daten einer Lokalisationsmessung zu einer homogenen Zufallsverteilung zu zeigen.

Zusätzlich zu der Cluster-Analyse werden unterschiedliche Distanzanalysen an den Lokalisationsdaten durchgeführt. Die in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Algorithmen SPDMDistanzen und NNOrte werden zur Bestimmung aller Distanzen, die im Lokalisationsbild vorkommen sowie der Nächsten-Nachbarn-Distanzen, verwendet. Dies geschieht sowohl für die Punkte des gesamten Datensatzes als auch getrennt für diejenigen Punkte, die innerhalb von Clustern liegen bzw. nur die, die sich außerhalb der Cluster befinden. Die Analyse der Verteilung der Signale im Bild kann dadurch getrennt für Strukturen und einzelne Signale erfolgen.

Statistische Analysen erfordern eine genügend große Datenmenge, um signifikante Aussagen machen zu können. Aus diesem Grund wurde eine Automatisierung (autoclusters) für den Algorithmus clusters\_v3 entwickelt, die es ermöglicht, eine komplette Messreihe von Lokalisationsdaten zu verarbeiten. In Abbildung 4.7 ist die grafische Benutzeroberfläche gezeigt. Hier können alle Parameter für die Cluster-Analyse dem Algorithmus übergeben werden. Auch das Auswählen des Verzeichnisses und der Dateinamen der auszuwertenden Lokalisationsdatensätze erfolgt über diese Oberfläche. Während die Auswertung läuft, wird dem Benutzer mitgeteilt, ob bei einem Datensatz ein Problem aufgetreten ist. Der entsprechende Datensatz fließt dann nicht in das Gesamtergebnis mit ein.

Nachdem alle angegebenen Datensätze ausgewertet wurden, werden die Ergebnisse der Auswertungen und die Eingabeparamter des Algorithmus zur Cluster-Identifikation automatisch gespeichert. Die wichtigsten Ergebnisse der Analysen werden grafisch dargestellt. Abbildungen 4.8 und 4.9 zeigen die Ausgabefenster des Algorithmus. Es wird sowohl ein Histogramm über die Größe der Cluster in Form des Durchmessers als auch der Anzahl von enthaltenen Punkten dargestellt. Auch die Punktdichte innerhalb der Cluster und der Abstand zum nächsten benachbarten Cluster sind entsprechend abgebildet. Die Distanzanalysen für alle Punkte, die in den Lokalisationsaufnahmen enthalten sind und diejenigen, die getrennt für Punkte innerhalb und außerhalb der Cluster durchgeführt wurden, werden ebenfalls automatisch in Histogrammen veranschaulicht (Abb. 4.8). Hier wird auch der prozentuale Anteil der Punkte, die sich innerhalb der vom Algorithmus identifizierten Cluster befinden, bestimmt. In allen Diagrammen ist auch der direkte Vergleich zu den simulierten homogenen Zufallsverteilungen von Punkten zu finden.





Ausgabefenster 1 und 2 der Cluster-Analyse. Links sind Histogramme über alle Distanzen, die in den Lokalisationsbildern vorhanden sind, gezeigt. Auch die Distanzen der zufällig verteilten Punkte sind zum Vergleich dazu aufgetragen. Die Histogramme auf der rechten Seite zeigen die Nächsten-Nachbarn-Distanzen der Lokalisationsdaten und der simulierten Zufallsverteilung. Die mittleren Histogramme stellen die gleichen Analysen dar, wie die oberen, jedoch nur für Signale, die innerhalb der Cluster detektiert wurden. In den Histogrammen der unteren Reihe sind nur Distanzen von Molekülen außerhalb der Cluster eingetragen. Alle Histogramme sind auf die jeweilige Gesamtzahl der Distanzen normiert.



#### Abbildung 4.9:

Ausgabefenster 3 der Cluster-Analyse. In der oberen Reihe ist die Cluster-Größe in Form der Punkte innerhalb eines Clusters (links) und als Durchmesser der Cluster (rechts) in Histogrammen aufgetragen. Links unten ist die Punktdichte innerhalb jedes Clusters dargestellt. Das rechte Histogramm in der unteren Reihe zeigt die Abstände zwischen den einzelnen Clustern. In allen Diagrammen sind auch die Ergebnisse der Analysen für die simulierte Zufallsverteilung eingetragen (hellblau). Diese sind, wie die Ergebnisse der Mikroskopiedaten, auf die Gesamtzahl der Cluster in den Lokalisationsdaten normiert. Werden keine oder nur sehr wenige Cluster in den Zufallsdaten identifiziert, so ist deren Verteilung in den Histogramme entsprechend schwach zu erkennen.

#### 4.3.3 Analyse von sehr kleinen Clustern

Im Folgenden wird der Algorithmus autoDistAna vorgestellt, der zur Untersuchung von sehr kleinen Clustern entwickelt wurde. Hierbei handelt es sich um Clustern, die nur aufgrund von geringen Unterschieden in der Verteilung der Distanzen zwischen den einzelnen Molekülpositionen und der Distanzverteilung von zufällig angeordneten Punkten nachweisbar sind. Dieser Algorithmus ermöglicht einen Vergleich zu simulierten Daten von Clustern einer bestimmten Größe. Hierbei wird die Gesamtdetektionseffizienz des Systems (Markierungseffizienz der zu untersuchenden Proteine und Detektionseffizienz des Mikroskopiesystems) sowie dessen Lokalisationsgenauigkeit berücksichtigt. Wie beim Algorithmus autoclusters kann auch hier eine komplette Messreihe von Lokalisationsdaten automatisch eingelesen werden.

#### Vergleich der Distanzverteilung der Lokalisationsdaten mit der einer entsprechenden Zufallsverteilung von Punkten und simulierten Clustern

Im ersten Schritt des Algorithmus autoDistAna werden die Distanzen zwischen den einzelnen Molekülpositionen sowie die Abstände zu dem nächsten benachbarten Molekül in den Lokalisationsbildern bestimmt. Für einen Vergleich mit einer zufälligen Anordnung von Signalen wird eine Punktverteilung simuliert, wobei die mittlere Punktdichte sowie die Gesamtzahl der Punkte den Lokalisationsdaten der jeweiligen Messung entspricht. Außerdem wird zu jedem Datensatz eine simulierte Verteilung von Signal-Clustern mit einer vorgebenden Größe für eine bestimmte Detektionseffizienz erzeugt. Für alle Simulationsdatensätze werden die gleichen Distanzanalysen wie für die Messdaten durchgeführt. Die Verteilung der Distanzen wird mit der Verteilung der Distanzen in den Messdaten verglichen. Dies erfolgt über die Varianz der Differenz der kumulativen Distanzverteilungen der beiden Datensätze.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des Algorithmus und die resultierenden Ergebnisse beispielhaft an Lokalisationsmessungen von CD95-Proteinen<sup>1</sup> in HeLa-Zellen, die über Fab-Fragmente mit Alexa488 markiert wurden<sup>2</sup>, gezeigt. Da die biologische Hypothese im Falle der Existenz von CD95-Clustern von Akkumulationen bestehend aus drei oder sechs Proteinen ausgeht, wurden die Parameter des Algorithmus im Folgenden dementsprechend gewählt.

Im zweiten Schritt des Algorithmus wird für die simulierten Cluster der Wert für die Detektionseffizienz um 0,5% erhöht. Für die neu generierten Daten wird wiederum eine Distanzanalyse durchgeführt und die Varianz der Differenz zu der Verteilung der Messdaten bestimmt. Ist die Varianz kleiner als für die simulierten Daten mit den vorgegebenen Parametern, so wird im nächsten Schritt der Wert für die Detektionseffizienz für die Simulationen weiter erhöht. Ist die Varianz größer als zuvor, wir der Wert für die Detektionseffizienz so lange um 0,5% verringert, bis auch in dieser Richtung das Minimum der Varianz gefunden wurde. Um dieses Minimum noch genauer zu bestimmen, wird nochmals die gleiche Prozedur für Schritte von 0,1% durchlaufen. Auf diese iterative Weise wird der Wert für die Detektionseffizienz bestimmt, bei dem die Distanzverteilung der simulierten Daten für eine feste Cluster-Größe am besten mit der Verteilung der Messdaten übereinstimmt.

Der Algorithmus autoDistAna ermöglicht außerdem ein mehrfaches Durchlaufen der Prozedur zur Bestimmung der Detektionseffizienz für eine vorgegebene Cluster-Größe für unterschiedliche Startparameter. Hierfür wird der Startwert für die Detektionseffizienz jeweils leicht vari-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Membranprotein, das eine entscheidende Rolle bei der Apoptose der Zelle und der Therapie von Krebs spielt [Trauth et al., 1989]

 $<sup>^2 \</sup>mathrm{Probenpräparation:}$ Dr. Nicolai Fricker, Dr. Olga Shatnyeva, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

iert, um so ein gemitteltes Ergebnis zu erhalten, das möglichst unabhängig von der Wahl des Startparameters ist.

Für die Analyse von sehr kleinen Signal-Clustern in Lokalisationsbildern bietet der Algorithmus autoDistAna die Möglichkeit einer genaueren Charakterisierung durch einen Vergleich mit simulierten Daten. Durch Variation von Cluster-Größe und Detektionseffizienz für die Simulationen können mithilfe des hier beschriebenen Algorithmus die Werte bestimmt werden, für die eine bestmögliche Übereinstimmung der Distanzverteilung mit den Messdaten vorliegt. Bei bekannter Cluster-Größe kann die Gesamtdetektionseffizenz des Systems bestimmt wer-



#### Abbildung 4.10:

**Vergleich der Distanzverteilungen. A**: Verteilung aller Distanzen bis 250 nm der Molekülpositionen in den Lokalisationsdaten (blau) und die der entsprechenden simulierten Zufallsverteilung von Punkten (türkis). B: Vergleich der Distanzverteilungen für die Abstände zum nächsten benachbarten Punkt. C: Vergleich der Distanzverteilung mit den simulierten Clustern für eine Größe von 3 (grün) bzw. 6 Punkten (gelb). Die vom Algorithmus autoDistAna ermittelten Werte für die gesamte Detektionseffizienz des Systems ergaben 7,5% für den Fall der 3er-Cluster und 4,6% für die 6er-Cluster. D: Analyse der Nächsten-Nachbarn-Distanzen für die simulierten Cluster-Verteilungen. den. Umgekehrt ist es möglich die Größe der Cluster genauer zu bestimmen.

In Abbildung 4.10 sind die Ergebnisse des Algorithmus autoDistAna beispielhaft für die oben beschriebenen Lokalisationsmessungen an den CD95-Proteinen gezeigt. Betrachtet man die Verteilung der Distanzen im Vergleich zu einer Zufallsverteilung von Punkten mit der gleichen mittleren Punktdichte, so fällt eine leichte Erhöhung der relativen Anzahl von kleinen Distanzen in den Lokalisationsdaten gegenüber den simulierten Zufallsdaten auf (s. Abb. 4.10A). Dies kann ein Indiz für sehr kleine Cluster in den Lokalisationsbildern sein. Auch bei der Analyse der Abstände zur nächsten benachbarten Molekülposition (s. Abb. 4.10B) ist eine Verschiebung der Distanzverteilung bei den Messdaten gegenüber den Zufallsdaten zu kleineren Werten hin zu erkennen. In Abbildung 4.10C,D sind die gleichen Distanzanalysen für die simulierten Cluster für eine Cluster-Größe von 3 bzw. 6 Punkten und den vom Algorithmus autoDistAna ermittelten Wert für die gesamte Detektionseffizienz des Systems aufgetragen. Hier ist zu erkennen, dass deren Distanzverteilungen besser mit der Verteilung der Messdaten übereinstimmen als die Distanzverteilung der zufällig verteilten Punkte. Aus den Diagrammen ist zu entnehmen, dass das Ergebnis der Cluster bestehend aus 3 Punkten bei einer Detektionseffizienz von 7,5% etwas besser mit der Distanzverteilung der gemessenen Daten überstimmt als es bei den 6er-Clustern der Fall ist.

# 4.4 Analyse von Maschenstrukturen

Für die Analyse von maschenartigen Strukturen in Lokalisationsdaten wurde der Algorithmus maschenana entwickelt, der den Umfang der Maschen, das Verhältnis von längster und dazu senkrechter Achse, die Punktdichte auf den zugehörigen Strängen sowie die Punktdichte im Inneren der Maschen bestimmt. Jede Masche, die ausgewertet werden soll, muss manuell markiert werden. Der Algorithmus führt dann die Analysen automatisch für alle ausgewählten Maschen durch. Eine Abfrage nach der Auswertung jeder Masche ermöglicht dem Benutzer eine Einteilung in verschiedene Gruppen entsprechend des Erfolgs der Strukturerkennung. Der Algorithmus ist konzipiert für die Analyse einer großen Zahl von Maschen in einem Lokalisationsbild. Dessen Aufbau und Ablauf werden im Folgenden erklärt.

# 4.4.1 Vorauswahl des Bereichs zur Markierung und Auswertung einer Teilmenge von Maschen

Dem Algorithmus maschenana werden zwei Lokalisationsbilder, die mit einer sehr kleinen Pixelgröße (typischer Weise 2 nm) erstellt wurden, übergeben. Das eine sollte mit dem in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Algorithmus Orte2NN4Bild erstellt werden, um die vorhandenen Strukturen im Bild bestmöglich wiederzugeben. Das andere, das die Positionen der detektierten Moleküle enthält, wird mit dem in Kapitel 3.3.1 vorgestellten Algorithmus Orte2Bild erstellt. Um die Auswertung übersichtlich und benutzerfreundlich zu gestalten, erfolgt die Auswertung der einzelnen Maschen nicht auf dem gesamten Datensatz, sondern dem Algorithmus wird ein weiteres Bild übergeben, das ebenfalls mit Orte2NN4Bild, jedoch mit einer deutlich größeren Pixelgröße (typischer Weise 20 nm) generiert wurde. Dieses wird verwendet, um einen Überblick über den gesamten Bereich der Aufnahme zu erhalten. Anhand dieses Bildes kann eine Region ausgewählt werden, in der nun ein Teil der gesamten Maschen für die folgende Auswertung markiert werden kann. Dazu wird vom Algorithmus die Position und Größe dieser Region in die Koordinaten des Bildes mit der geringeren Pixelgröße übersetzt und dort entnommen. Das Ergebnis ist ein Bild, das einen Ausschnitt des Gesamtbildes mit einer geringeren Pixelgröße darstellt, die es erlaubt auch sehr kleine Strukturen im Lokalisationsbild zu erkennen. Da nur ein kleiner Bruchteil des Lokalisationsdatensatzes für die Analyse der einzelnen Maschen verarbeitet werden muss, wird zudem auch die Rechenzeit, die für die einzelnen Analysen benötigt wird, verkürzt. Nachdem die Maschen in einer dieser Regionen ausgewertet wurden, erscheint erneut das Übersichtsbild. Hier sind nun die Maschen markiert, die im vorherigen Schritt analysiert wurden und es kann eine neue Region gewählt werden, um die nächste Untermenge von Maschen für den Algorithmus auszuwählen.

#### 4.4.2 Analyse der Größe und Punktdichte einzelner Maschen

Die Auswahl der Maschen, die untersucht werden sollen, erfolgt über das Anklicken per Maus der entsprechenden Strukturen im Bild. Die Auswertung der einzelnen Maschen wird sequenziell in verschiedenen Schritten durchgeführt.

# Bestimmung der radialen Intensitätsverteilung zur groben Abschätzung der Maschengröße

Im ersten Schritt wird ausgehend von der Position  $r_0$ , die vom Benutzer für die jeweilige Masche vorgegeben wird, die radiale Intensitätsverteilung im Lokalisationsbild bestimmt. Hierfür



#### Abbildung 4.11:

Übersichtsbild zur Auswahl eines Bereiches im Gesamtbild zur Maschenanalyse. Die roten Punkte markieren Maschen, die durch vorangegangene Messungen schon ausgewertet wurden. Das weiße Rechteck zeigt den Bereich, der für die einzelnen Analysen ausgewählt werden kann. Das weiße Kreuz markiert die Masche, die beispielhaft in Abbildung 4.12 analysiert wurde.

werden Ringe mit  $r_0$  als Mittelpunkt und einer Dicke von  $\Delta r$  verwendet. Ein Ring mit einem Radius  $r_i$  enthält somit alle Pixel mit einem Abstand von  $r_0$  zwischen  $r_i - \Delta r/2$  und  $r_i + \Delta r/2$ . Die Intensität  $I(r_i)$  eines Rings ergibt sich aus der Summe über die Intensität aller Pixel innerhalb des Rings und wird auf die Anzahl der Pixel im Ring normiert. Führt man dies Ring für Ring durch, erhält man die radiale Intensitätsverteilung um den Ausgangspunkt  $r_0$ .

Nachdem das Ergebnis geglättet wurde, um lokale und statistische Schwankungen zu unterdrücken, wird die Position des ersten Maximums der Verteilung über den ersten Nulldurchgang der ersten Ableitung bestimmt. Die Position des Maximums spiegelt den mittleren Radius  $r_{rad}$ der Masche wider. Die Genauigkeit der Größenbestimmung hängt hierbei einerseits von der Abweichung der Masche von einer Kreisform ab, andererseits von der Genauigkeit, mit der der Benutzer die Position für den Ursprungspunkt der radialen Intensitätsverteilung in das Zentrum der Masche setzt.

#### Bestimmung des genauen Umfangs einer Masche durch Verwendung eines Kantenfilters

Um den Umfang einer Masche genauer zu bestimmen, wird um den vom Benutzer gewählten Ausgangspunkt  $r_0$  eine quadratische Region gewählt. Die Kantenlänge dieser Region entspricht dreimal dem Radius  $r_{rad}$ , der aus der Analyse der radialen Intensitätsverteilung hervorgeht. Über ein Schwellwertverfahren kombiniert mit einem Kantenfilter kann hierdurch die Form der Masche sehr detailliert nachverfolgt werden. Für die Kantendetektion wird ein *Canny-Edge*-Filter verwendet. Dieser faltet das Bild zuerst mit einer Gauß-Verteilung, um Rauschen zu unterdrücken. Es wurde eine Standardabweichung von 5 Pixel gewählt, um so Strukturen, die unterhalb der Strukturauflösung des Bildes liegen, zu unterdrücken. Die Kantendetektion erfolgt beim *Canny-Edge*-Filter über Sobeloperatoren in x- und y-Richtung:

$$S_x = \frac{1}{8} \begin{pmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \qquad S_y = \frac{1}{8} \begin{pmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{pmatrix}.$$

Bedingt durch das Schwellwertverfahren ergibt sich eine systematische Unterschätzung der Ausdehnung der Masche. Um diesen Effekt zu kompensieren, werden die Abstände der einzel-



#### Abbildung 4.12:

Verschiedene Schritte der Maschenanalyse. Im Diagramm links oben ist die radiale Intensitätsverteilung für die Masche in den Lokalisationsbildern auf der linken Seite gezeigt. Das blaue Kreuz im Bild markiert den Ausgangspunkt, der vom Benutzer gewählt wurde. Im Diagramm links unten ist die erste Ableitung der radialen Intensitätsverteilung aufgetragen. Der erste Nulldurchgang markiert die Position des ersten Maximums. Im Lokalisationsbild ist die lokale Dichte in Graustufen dargestellt, die einzelnen Molekülpositionen als rote Punkte. Die gelben Pfeile im oberen Bild markieren beispielhaft für einige Punkte den Unterschied zwischen der tatsächlichen Form der Masche und der roten Kurve, die sich aus der Anwendung des Kantenfilters ergibt. Im Diagramm rechts oben ist die Verteilung der Distanzen der Molekülpositionen zu der von der Kantendetektion generierten Kurve dargestellt. Die häufigste Distanz wird aus dem ersten Nulldurchgang der ersten Ableitung der Verteilung (s. Diagramm rechts unten) bestimmt und damit die Form der Kurve korrigiert. Das Ergebnis ist in dem Bild links unten gezeigt. Hier markieren die roten Punkte die Positionen der Moleküle, die sich auf den Strängen dieser Masche befinden. Aus [Kaufmann et al., 2011c]. nen Punkte auf der Masche zu dem Verlauf der aus dem Kantenfilter hervorgegangenen Kurve bestimmt. Die Verteilung der Distanzen wird geglättet, um lokale und statistische Schwankungen zu minimieren und die Position des Maximums bestimmt. Unter der Annahme einer kreisförmigen Struktur wird der mittlere Radius aus dem Umfang der Masche berechnet. Mithilfe des Abstandes zu den Punkten auf der Struktur wird der Faktor bestimmt, um welchen die Form des Kantenfilters gestreckt werden muss, um der tatsächlichen Form der Struktur zu entsprechen. Dadurch erhält man eine Kurve, die der Morphologie der Masche im Lokalisationsbild folgt und eine genaue Bestimmung des Umfangs der Masche ermöglicht. Der Fehler ist nun hauptsächlich von der Strukturauflösung der Lokalisationsaufnahme abhängig. Der Algorithmus bestimmt außerdem das Verhältnis der kürzesten Achse der Masche zu der dazu senkrechten maximalen Achse (Feret-Durchmesser).

#### Bestimmung der Punktdichte auf und innerhalb einer Masche

Im dritten Schritt der Maschenauswertung wird mithilfe der Kurve aus dem zweiten Schritt, welche die Form der Masche wiedergibt, und dem Positionsbild die mittlere Punktdichte auf der Masche bestimmt. Hierfür wird zuerst die Kurve, welche die Form angibt, mit einem Kreis, dessen Durchmesser der Dicke des Strangs der Masche entspricht, gefaltet. Für eine hohe Punktdichte ist die Ausdehnung des Strangs durch die Lokalisationsgenauigkeit bestimmt. Deshalb wird als Radius für den Kreis die zweifache mittlere Lokalisationsgenauigkeit verwendet. Aus der Faltung wird eine binäre Maske erstellt, um die Anzahl der Punkte im Positionsbild zu ermitteln, die innerhalb dieser Maske und somit auf der entsprechenden Masche liegen.

Auf ähnliche Weise wird die Punktdichte innerhalb der Masche bestimmt. Die Kurve, welche die Kontur der Masche beschreibt, wird mit einer größeren Maske als zuvor gefaltet, um alle Punkte, die auf dem Strang der Masche liegen, auszuschließen. Nun wird, analog zur Punktdichte auf der Masche, die Punktdichte innerhalb der Masche bestimmt.

#### Manuelle Überprüfung der Güte der einzelnen Maschenanalyse

Im letzte Schritt der Analyse einer Masche kann der Benutzer beurteilen, wie erfolgreich der Algorithmus diese durchgeführt hat. Dadurch können die Ergebnisse in drei Gruppen eingeteilt werden:

- Gruppe 1: Die Strukturerkennung mithilfe des Kantenfilters war erfolgreich ⇒ der Umfang, das Verhältnis von längster Achse zu der dazu senkrechten Achse und die mittlere Punktdichte können in das Gesamtergebnis übernommen werden.
- Gruppe 2: Die Strukturerkennung mithilfe des Kantenfilters war nicht erfolgreich, die Maschengröße konnte jedoch durch die radiale Intensitätsverteilung bestimmt werden ⇒ nur der Umfang der Masche, der sich aus der radialen Intensitätsverteilung ergibt, wird in das Gesamtergebnis übernommen.
- Gruppe 3: Weder die Bestimmung der Maschengröße durch den Kantenfilter noch durch die radiale Intensitätsverteilung war erfolgreich ⇒ nichts aus der Analyse dieser Masche wird in das Gesamtergebnis übernommen.

# 4.5 Distanzanalyse von Proteinen entlang einer definierten Struktur

Um die Abstände von einzelnen Molekülen und Protein-Clustern zu und entlang einer bestimmten Struktur zu bestimmen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Algorithmus CELFana entwickelt. Dieser ermöglicht nicht nur eine Analyse der Distanzen zweier verschiedener Proteintypen zueinander, sondern auch die Abhängigkeit der Abstände im Bezug auf die relative Position entlang einer Struktur, welche durch eine der beiden Proteinsorten definiert ist.

# 4.5.1 Funktionsweise des Algorithmus CELFana

Dem Algorithmus CELFana werden die beiden Positionstabellen der Lokalisationsmessungen übergeben, welche die jeweiligen Positionsinformationen der beiden Proteintypen enthalten. Außerdem muss von dem Benutzer eine Pixelgröße gewählt werden, da die Festlegung des Polygonzuges, entlang dessen die Abstände bestimmt werden, manuell anhand eines Lokalisationsbildes erfolgt. Der Benutzer kann wählen, ob die Distanzanalyse basierend auf den Positionen der einzelnen detektierten Moleküle oder auf den Positionen von Protein-Clustern durchgeführt werden soll.

Die weitere Funktionsweise des Algorithmus CELFana wird beispielhaft anhand von Lokalisationsmessungen an Lampenbürstenchromosomen, bei welchen die RNA-Polymerase II mit Alexa488 und Splicing-Faktoren CELF1 mit Alexa594 markiert waren (s. Abb. 4.13A). Die RNA-Polymerase II ist hierbei um den DNA-Strang angeordnet und stellt die Struktur dar, zu welcher die Distanzen der CELF1-Moleküle in Abhängigkeit ihrer Position entlang der Struktur bestimmt werden sollen.

#### Festlegen eines Polygonzuges entlang dessen die Distanzanalyse durchgeführt werden soll

Im ersten Schritt des Algorithmus CELFana wird der Polygonzug festgelegt, welcher den Verlauf des DNA-Strangs beschreibt und auch Start- und Endpunkt für die Distanzanalyse definiert. Der Polygonzug wird manuell an die Struktur im Lokalisationsbild angepasst. In Abbildung 4.13A ist anhand einer Beispielaufnahme gezeigt, wie der Polygonzug (weiße Linie) entlang der grün dargestellten RNA-Polymerase II zwischen Start- und Endpunkt (weiße Kreuze) gesetzt wurde.

# Abstands- und Positionsbestimmung einzelner Molekülpositionen entlang des Polygonzuges

Der zweite Schritt besteht darin, dass von jeder Molekülposition der Splicing-Faktoren der kleinste Abstand zu dem Polygonzug, welcher den Verlauf des DNA-Strangs widerspiegelt, bestimmt wird (s. Abb. 4.13C). Das Verfahren ist analog zu dem in Kapitel 3.3.2 vorgestellten Algorithmus NNOrte, mit dem Unterschied, dass nur Distanzen zwischen den unterschiedlichen Proteintypen betrachtet werden.

Die relative Position entlang des Polygonzuges, an dem sich das jeweilige Molekül befindet, wird wie folgt bestimmt: die beiden Schwerpunkte der Polygonzughälften vor und nach dem Punkt, der dem betrachteten Molekül am nächsten ist und somit auch Ausgangspunkt der Distanzmessung war, wird verglichen mit der Position des Startpunktes. Diejenige Polygonzughälfte, deren Schwerpunkt am nächsten zu dem Startpunkt liegt, entspricht der bis zu dem betrachteten Molekül zurückgelegten Strecke entlang des gesamten Polygonzuges.



#### Abbildung 4.13:

Bestimmung der Abstände und relativen Positionen einzelner Moleküle entlang einer bestimmten Struktur. A: Zwei-Farben-Lokalisationsbild von Alexa488-markierter RNA-Polymerase II (grün) und Splicing-Faktoren CELF1 markiert mit Alexa594 (rot). Start- und Endpunkt für die Distanzanalyse sind mit weißen Kreuzen markiert. Der Polygonzug, zu dem und entlang dessen die Abstände der CELF1-Proteine untersucht werden sollen, ist in weiß gekennzeichnet. B: vergrößertes Bild des Ausschnitts markiert in A. C: gleicher Bereich wie in B, jedoch sind hier nur der Polygonzug (weiß) und die Positionen der detektierten CELF1-Proteine (rot) dargestellt. Die gelben Pfeile repräsentieren beispielhaft die Distanzbestimmungen der einzelnen Positionen relativ zu dem Polygonzug.

Auf diese Weise kann jeder Position der CELF1-Moleküle eine Distanz zum DNA-Strang und eine relative Position entlang dessen zugeordnet werden.

#### Abstands- und Positionsbestimmung von Protein-Clustern entlang des Polygonzuges

Alternativ zu der Analyse der Distanzen der einzelnen Molekülpositionen kann auch eine Cluster-Analyse der CELF1-Moleküle durchgeführt werden. Hierbei wird der in Kapitel 4.3 vorgestellte Algorithmus clusters\_v3 zur Identifikation der Protein-Cluster im Lokalisationsbild und ihrer Analyse verwendet. Dieser stellt unter anderem die Positionen der Cluster für die weiterführende Analyse bereit. Basierend darauf werden analog zur oben beschriebenen Methode die Abstände und relativen Positionen der Cluster entlang der Struktur des DNA-Strangs bestimmt.



1µm

#### Abbildung 4.14:

**Bestimmung der Abstände und relativen Positionen von Protein-Clustern entlang einer bestimmten Struktur. A**: Ergebnis des Algorithmus clusters\_v3 mit einem Schwellwert für die lokale Punktdichte von 1800 Punkten/μm<sup>2</sup>, angewandt auf dieselbe Aufnahme wie in Abbildung 4.13. Die einzelnen Molekülpositionen der CELF1-Proteine sind als schwarze Punkte im Bild dargestellt. Die vom Algorithmus identifizierten Cluster sind orange markiert. Die grüne Linie repräsentiert den an die Struktur der RNA-Polymerase II angepassten Polygonzug. **B**: vergrößertes Bild des Ausschnitts markiert in **A**. Die blauen Pfeile stellen beispielhaft die Distanzmessungen der jeweiligen Cluster-Positionen zu dem Polygonzug dar.

#### 4.5.2 Resultate des Algorithmus CELFana

Führt man die Distanzanalyse basierend auf den Positionen der einzelnen detektierten Molekülen durch, so erhält man als Resultat zu jeder Molekülposition die Distanz zum Polygonzug sowie die relative Position entlang des Polygonzuges. Stellt man dies, wie Abbildung 4.15A gezeigt, graphisch dar, so kann die Abhängigkeit der Distanz der CELF1-Proteine zu der Struktur des DNA-Strangs in Abhängigkeit zur relativen Position entlang der Struktur abgebildet werden. Hierbei empfiehlt sich eine Mittelung der Werte in einem bestimmten Intervall auf der Abszisse, um eine Überschaubarkeit der Datenpunkte im Diagramm zu erhalten.

Bezieht man zusätzlich eine Cluster-Analyse mit ein, so kann nicht nur eine analoge Distanzuntersuchung basierend auf den Positionen der Protein-Cluster erfolgen, sondern weitere Informationen gewonnen werden. Die Resultate der Cluster-Analyse (Details hierzu s. Kapitel 4.3) können kombiniert werden mit den Distanz- und Positionsinformationen, die der Algorithmus CELFana liefert. Auf diese Weise ist es möglich, alle Größen der Cluster-Analyse der CELF1-Proteine abhängig von der relativen Position entlang der Struktur des DNA-Strangs



#### Abbildung 4.15:

**Resultate der Distanzanalysen. A**: die Distanzen zum Polygonzug der einzelnen Positionen der detektierten CELF1-Proteine aus der Aufnahme in Abbildung 4.13 sind gegen die Position entlang des Polygonzuges relativ zur Startposition in grau aufgetragen. Das Ergebnis der Distanzanalyse der Cluster-Positionen ist in orange dargestellt. In **B** ist der Cluster-Durchmesser abhängig von der relativen Position entlang des Polygonzuges gezeigt. Es wurde jeweils über die Werte in einem Intervall von 500 nm bzw. 1 µm gemittelt. Die Fehlerbalken stellen die Fehler der Mittelwerte dar.

darzustellen. In Abbildung 4.15B ist dies beispielhaft für den Durchmesser der CELF1-Cluster aus der SPDM-Aufnahme aus Abbildung 4.13 gezeigt.

#### 4.5.3 Vergleich zur konventionellen Weitfeldfluoreszenzaufnahme

Um einen direkten Vergleich der Distanzanalysen basierend auf lokalisationsmikroskopischen Messungen zu denen eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops zu haben, wurde eine Modifikation des Algorithmus CELFana vorgenommen, um diesen auf die Daten eines Weitfeldfluoreszenzmikroskops anzupassen.

#### Abbildung 4.16:

Resultat der Distanzanalyse anhand des konventionellen Weitfeldfluoreszenzbildes. Die Distanzen der Verteilung der CELF1-Proteine sind gegen die relativen Positionen entlang des Polygonzuges, der die Struktur des DNA-Strangs beschreibt, aufgetragen. Es wurde jeweils über die Werte in einem Intervall von 800 nm gemittel. Die Fehlerbalken stellen die Fehler der Mittelwerte dar.



Dem daraus hervorgegangenen Algorithmus CELFana\_wf werden, mit Ausnahme der Positionstabellen, die gleichen Parameter übergeben wie im Falle von CELFana. Anstelle der Positionen aus den Lokalisationsaufnahmen basiert die Analyse auf den konventionellen Weitfeldfluoreszenzbildern. Es wird ebenfalls als erstes manuell ein Polygonzug an die Struktur des DNA-Strangs angepasst (s. Abb. 4.17A). Da nun keine Positionsinformation der einzelnen Moleküle vorliegt, muss die Distanz der Verteilung der CELF1-Proteine zu der Struktur des des DNA-Strangs auf eine andere Weise bestimmt werden. Hierzu wird zunächst ein Kantenfilter (*Canny-Edge*-Filter) auf das Fluoreszenzbild der CELF1-Proteine angewandt. Die Parameter (Größe und Schwellwert) werden hierbei so eingestellt, dass die Distanz zwischen den beiden detektierten Kanten gerade der Halbwertsbreite der Struktur im Bild entspricht.

Im nächsten Schritt werden die Distanzen zwischen dem Polygonzug und den Linien des Kantenfilters bestimmt (s. Abb. 4.17C). Wie bei der auf den Lokalisationsdaten basierten Analyse, wird auch hier jeder Distanz eine relative Position entlang des Polygonzuges zugeordnet. Die Ergebnisse für das Beispielbild (Abb. 4.17A) sind in Abbildung 4.16 dargestellt.



#### Abbildung 4.17:

**Distanzbestimmung anhand der Weitfeldfluoreszenzaufnahmen. A**: konventionelles Zwei-Farben-Weitfeldfluoreszenzbild von Alexa488-markierter RNA-Polymerase II (grün) und Splicing-Faktoren CELF1 markiert mit Alexa594 (rot). Start- und Endpunkt für die Distanzanalyse sind mit weißen Kreuzen markiert. Der Polygonzug, zu dem und entlang dessen die Abstände der Verteilung der CELF1-Proteine untersucht werden sollen, ist ebenfalls in weiß gekennzeichnet. **B**: vergrößertes Bild des Ausschnitts markiert in **A**. Die weißen Linien repräsentieren den Polygonzug (Mitte) sowie das Ergebnis des Kantenfilters. **C**: gleicher Bereich wie in **B**, jedoch sind nur der Polygonzug (grün) und die Linien des Kantenfilters (rot) dargestellt. Die gelben Pfeile repräsentieren beispielhaft die Distanzbestimmungen der einzelnen Pixel der Kanten relativ zum Polygonzug.

# 4.6 3D-Rekonstruktion von 2D-SPDM-Messungen kombiniert mit SMI-Aufnahmen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Algorithmen entwickelt, die eine schnelle Rekonstruktion von 3D-Strukturen, aufgenommen durch eine Kombination von SMI- und Lokalisationsmikroskopie (s. Kapitel 2.3.3), ermöglichen. Der Algorithmus **zrecon** nutzt die Information der Phasen-Rasterung der SMI-Aufnahme, um anhand des Modulationskontrasts die axiale Ausdehnung der Strukturen zu bestimmen. Der Phasenunterschied zwischen verschiedenen Objekten lässt sich zur Bestimmung ihres relativen axialen Abstandes verwenden. Für die Analyse von SMI-Daten wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden entwickelt [Schneider, 1999, Albrecht, 2002, Failla et al., 2003, Spöri, 2004, Wagner, 2004, Baddeley, 2007]. Der Algorithmus **zrecon** stützt die Größen- und Positionsbestimmung der Objekte auf einen von Dr. Paul Lemmer vorgeschlagenen Ansatz. Hierbei wird eine Fouriertransformation entlang der Zeitdimension des Datenstapels der Phasen-Rasterung durchgeführt, welche eine sehr schnelle Bestimmung des Modulationskontrasts sowie der Phasen für das gesamte Bild erlaubt.

Zur Korrektur von Phasensprüngen im Bild, das die axiale Position der Moleküle angibt, wurde der Algorithmus **corrphase** entwickelt. Dieser erlaubt eine manuelle Korrektur anhand eines Lokalisationsbildes mit farbkodierter Phasen- bzw. axialer Positionsinformation der Molekülpositionen.

Mit dem Algorithmus **phase3d** kann ein dreidimensionaler Datensatz erzeugt werden, in welchem alle Molekülpositionen entsprechend ihrer räumlicher Koordinaten eingetragen werden. Die Positionen werden mit einer 3D-Gauß-Verteilung gefaltet, deren Standardabweichung in x- und y-Richtung der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit in der lateralen Ebene sowie in der z-Richtung der axialen Ausdehnung der Strukturen entspricht.

Für die im Folgenden gezeigten Beispielbilder zur Rekonstruktion von dreidimensionalen Datensätzen wurden Aufnahmen von feinen Membranausläufern von Krebszellen (Cal-51), deren Plasmamembran mit YFP gefärbt war, verwendet.

### 4.6.1 Hintergrundkorrektur der Phasen-Rasterung

Im ersten Schritt des Algorithmus **zrecon** wird der Hintergrund im Datenstapel der SMI-Phasen-Rasterung bestimmt. Eine präzise Korrektur des Hintergrunds ist von entscheidender Bedeutung bei der Bestimmung der axialen Ausdehnung der Objekte anhand des Modulationskontrasts.

Um die Strukturen in der Aufnahme vom Hintergrund zu trennen, wird auf die Mittelwertsprojektion der Phasen-Rasterung (s. Abb. 4.18A) ein Kantenfilter angewendet, ein sog. *PLUS Edge Detection Filter*<sup>1</sup>, der eine Kombination aus Laplace-Filter und einem Filter für die Richtung der zweiten Ableitung im Gradienten darstellt. Hierbei wird eine Gauß-Verteilung mit einer Größe von 20 Pixeln, einem Mittelwert von 0 und einer Standardabweichung von 3 Pixeln als Eingabeparameter übergeben. Das Resultat dieses Kantenfilters ist für eine Beispielaufnahme in Abbildung 4.18B gezeigt. Über ein Schwellwertverfahren, das gegebenenfalls auf den jeweiligen Datensatz angepasst werden muss, kann nun eine Segmentierung der Strukturen im Bild vorgenommen werden (s. Abb. 4.18C). Eine Kombination von morphologischem Schließen und einer Faltung mit einer Gauß-Verteilung dieser Maske führt zu kohärenteren

 $<sup>^1{\</sup>tt MATLAB}\mbox{-Routine plus_filt2D},$ Sergei Koptenko, Resonant Medical, Montreal, Kanada



#### Abbildung 4.18:

Hintergrundkorrektur für Phasen-Rasterung der SMI-Aufnahme. A: Mittelwertsprojektion der Phasen-Rasterung. B: Ergebnis des Kantenfilters auf Bild A. C: Anwendung eines Schwellwertverfahrens auf Bild B. D: Ergebnis der Ellimination der Strukturen in der Aufnahme mithilfe der Maske aus C. E: weiter prozessiertes Bild (Details s. Text), das zur Korrektur des Hintergrunds verwendet wird. F: Resultat der Hintergrundkorrektur des Ausgangsbildes in A mithilfe des Hintergrundbildes in E.

Strukturen. Jedes Einzelbild im Datenstapel der Phasen-Rasterung wird nun pixelweise mit der Maske multipliziert. Dadurch entsteht ein Bild, auf dem die Strukturen fehlen und nur noch der Hintergrund zu erkennen ist (s. Abb. 4.18D). Um die so entstandenen "Löcher" im Bild zu füllen, wird erneut eine Kombination einer morphologischen Schließung mit der Faltung des Bildes mit einer Gauß-Verteilung durchgeführt. Abbildung 4.18E zeigt beispielhaft das Resultat dieser Operationen. Dieses kann nun für die Subtraktion des Hintergrunds im jeweiligen Einzelbild verwendet werden (vergl. korrigiertes Bild in Abb. 4.18F mit Ausgansbild in Abb. 4.18A).

Diese Art der Hintergrundkorrektur bietet neben einer präzisen Segmentierung der Strukturen in der Aufnahme auch eine automatische Anpassung der Hintergrundkorrektur auf das Photobleichen der Fluorophore während der Aufnahme, da die Korrektur für jedes Einzelbild des Datenstapels individuell durchgeführt wird.

# 4.6.2 Bestimmung der Positionen der detektierten Strukturen und ihre Ausdehnung in axialer Richtung

Der zweite Schritt des Algorithmus **zrecon** stellt die eigentliche Positions- und Größenbestimmung der Strukturen in axialer Richtung dar. Hierfür wird eine in der Dissertation von Dr. Paul Lemmer [Lemmer, 2009] vorgeschlagenen Methode verwendet, die auf der Fouriertransformation entlang der Zeit der Phasen-Rasterung basiert.

Am Hintergrund-korrigierten Datenstapel der Phasen-Rasterung bestehend aus N Einzelbildern wird eine Fouriertransformation entlang der Zeit durchgeführt. Das Bild der mittleren Ebene des transformierten Datenstapels repräsentiert die konstanten Anteile K(x, y) der Intensitätsmodulation (s. Abb. 4.19A). Im Abstand von  $\pm n/\lambda_{sw}$  erhält man die Bilder, welche die zugehörigen Amplituden A(x, y) (s. Abb. 4.19B) und Phasen  $\Phi(x, y)$  (s. Abb. 4.19D) enthalten.  $\lambda_{sw}$  ist hierbei die Wellenlänge des stehenden Wellenfeldes zwischen den beiden Objektiven des SMI-Mikroskops. Die Phaseninformation kann somit direkt abgelesen und in



#### Abbildung 4.19:

Bestimmung der axialen Positionen und Ausdehnung der Strukturen anhand der Phasen-Rasterung der SMI-Aufnahme. A: konstanter Anteil K der Intensitätsmodulation. B: Amplituden der Intensitätsmodulation. C: den Molekülpositionen aus Lokalisationsbild in lateraler Ebene wird die axiale Ausdehnung der Strukturen zugeordnet. D: zugh. Phasen zum Amplitudenbild B umgerechnet in relative Abstände der Strukturen. E: den Molekülpositionen aus Lokalisationsbild in lateraler Ebene werden die relativen Abstände aus der Phaseninformation zugeordnet. Bei ausgedehnteren Strukturen sind Phasensprünge zu erkennen. F: Bild E nach Korrektur der Phasensrpünge.
eine Positionsinformation übersetzt werden:

$$B_{pos} = \frac{\Phi(x,y)}{2\pi} \cdot \lambda_{sw}.$$

Der Modulationskontrast C(x, y) ergibt sich dann zu:

$$C(x,y) = \frac{2A(x,y)}{K(x,y) + A(x,y)}.$$

Weitere Details bezüglich dieser Methode der Größen- und Positionsbestimmung für SMI-Daten sind in [Lemmer, 2009] genauer erläutert.

Der Algorithmus **zrecon** erstellt Lookup-Tabellen (s. Abb. 4.20) für die Bestimmung der Objektgröße in axialer Richtung anhand des Modulationskontrasts für die Anregungswellenlängen 488 nm und 568 nm. Hierbei wird entweder das Modell einer gaußförmigen (z.B. für Protein-Cluster) oder einer zylinderförmigen Verteilung (z.B. für Membranausläufer) der Fluorophore auf der Struktur verwendet.



#### Abbildung 4.20:

Lookup-Tabelle zur Bestimmung der Objektgröße. Für die Anregungswellenlängen 488 nm (blau) und 568 nm (gelb) sind die theoretisch zu erwartenden Verläufe des Modulationskontrasts gegen die Objektgröße aufgetragen. Hierbei wurde eine gaußförmige Verteilung der Fluorophore innerhalb der Strukturen simuliert. Als Durchmesser wird die Halbwertsbreite der Gauß-Verteilung angenommen. Die gestrichelte blaue Kurve gibt den theoretischen Verlauf für Fluorophore auf einer zylinderförmigen Struktur bei einer Anregunswellenlänge von 488 nm an.

Durch pixelweise Multiplikation des Positionsbildes  $B_{pos}$  mit dem Lokalisationsbild erhält man ein Bild, dessen Pixelwerte die axiale Position des jeweiligen Moleküls kodieren (s. Abb. 4.19E). Analog wird ein Bild aus der Information über den Modulationskontrast unter Verwendung der entsprechenden Lookup-Tabelle erzeugt. Hierbei kodiert der Pixelwert die lokale axiale Ausdehnung der Struktur (s. Abb. 4.19C).

Da die Phaseninformation nur modulo  $\pi$  vorliegt, sind in einem Bild, das Strukturen enthält, deren relative Position mehr als  $\lambda_{sw}$  beträgt, Phasensprünge enthalten, die korrigiert werden müssen. Dr. David Baddeley beschreibt in seiner Dissertation [Baddeley, 2007] zwei unterschiedliche Methoden zur Korrektur dieser Phasensprünge. Die eine vergleicht die Phase eines Objekts mit den umliegenden und subtrahiert den Wert  $\pi$  bei signifikanten Unterschieden. Die andere basiert auf der Anpassung einer Funktion (z.B. einer Ebene) an die Daten des Phasenbildes.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Algorithmus corrphase entwickelt, der es

ermöglicht die Phasensprünge manuell zu korrigieren. Als Eingabeparameter wird dem Algorithmus  $\pm \lambda_{sw}$  übergeben, wobei das Vorzeichen angibt, in welche Richtung die Positionen verschoben werden soll. Der Benutzer kann anhand eines farbkodierten Lokalisationsbildes die Region auswählen, an der ein Phasensprung auf der Struktur zu erkennen ist. In einem Bereich von 9 × 9 Pixeln wird der Mittelwert der axialen Position der darin enthaltenen Punkte bestimmt. Für die Korrektur werden nur Punkte innerhalb eines 17 × 17 Pixel großen Bereichs berücksichtigt, deren axiale Position ähnlich ist, wie der vorher bestimmte Mittelwert der kleineren Umgebung. Dadurch wird erreicht, dass benachbarte Molekülpositionen, die nicht verändert werden sollen, von der Korrektur unberücksichtigt bleiben. Diese manuelle Methode der Korrektur der Phasensprünge eignet sich besonders für zusammenhängende Strukturen, wie es bei den Membranausläufern in den Beispielbildern der Fall ist. Abbildung 4.19F zeigt das gleiche Positionsbild wie in Abbildung 4.19E nach der Korrektur der Phasensprünge mithilfe des Algorithmus corrphase.

#### 4.6.3 Rekonstruktion der dreidimensionalen Molekülverteilung

Der Algorithmus **phase3d** nutzt die Größen- und Positionsinformationen in den entsprechenden Lokalisationsbildern, die vom Algorithmus **zrecon** generiert wurden, um einen dreidimensionalen Datensatz zu erstellen. Die einzelnen Molekülpositionen werden entsprechend ihrer x-, y- und z-Koordinaten in ein "leeres" 3D-Bild eingetragen. Jede Position wird mit einer 3D-Gauß-Verteilung gefaltet, deren Standardabweichungen der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit in x- und y-Richtung sowie der axialen Ausdehnung der Struktur entsprechen.

Mit Programmen, die in der Lage sind dreidimensionale Volumen darzustellen, wie  $voxx^1$  oder ImageSurfer<sup>2</sup>, kann dieser 3D-Datenstapel visualisiert und als Video oder in einem Bild aus verschiedenen Blickwinkeln dargestellt werden.



#### Abbildung 4.21:

**3D-Darstellung der räumlichen Verteilung der Molekülpositionen. A** zeigt eine dreidimensionale Darstellung derselben Struktur wie in den vorangegangenen Beispielbildern. Die Visualisierung erfolgte mit dem Programm voxx. **B**: 3D-Darstellung mit ImageSurfer einer andern Aufnahme. Hier ist deutlich die dreidimensionale Struktur der Membranausläufer zu erkennen.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Indiana University, Indianapolis, USA

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>University of North Carolina, Chapel Hill, USA

# 5 Anwendung auf biologische Fragestellungen

# 5.1 Auswirkung des Einbettmediums auf das reversible Bleichen der Fluorophore bei SPDM

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Einbettmedien auf das Verhalten der Fluorophore zu untersuchen, wurden unterschiedliche Messreihen angelegt. Eine indirekte Immunfärbung von Membranproteinen (Her2/neu) mit dem Fluorophor Alexa488 diente als Beispiel für eine Antikörpermarkierung mit synthetischen Fluorophoren. Der Vergleich zu Fluoreszenzproteinen wurde über Präparate bewerkstelligt, bei denen über ein Fusionsprotein die Plasmamembran mit GFP gefärbt war. Für alle Präparate wurde beispielhaft die Zelllinie SKBr3 verwendet, da sich diese aufgrund morphologischer Eigenschaften gut für vergleichende Messungen an der Zellmembran eignet. Nach der Fluoreszenzmarkierung wurden die Präparate in unterschiedliche Einbettmedien eingebettet. Die Präparation der Proben wurde von Dr. Patrick Müller und Daniel Paech durchgeführt.

Zur Einbettung wurden sowohl kommerziell erhältliche als auch selbst hergestellte Lösungen verwendet. Im Falle der kommerziell erhältlichen Medien Fluoromount<sup>1</sup>, Immumount<sup>2</sup>, Mowiol<sup>3</sup>, ProlongGold<sup>4</sup> und VectaShield<sup>5</sup> ist keine Information über die Inhaltstoffe vorhanden. Im Fall des ProlongGolds wurden zusätzlich zwei unterschiedliche Varianten der Präparation untersucht. Es wurden Präparate angefertigt, in denen das ProlongGold auspolymerisiert war (im Folgenden abgekürzt mit P) und solche, bei denen es nicht auspolymerisieren konnte (abgekürzt mit NP).

Bei PBS (*Phosphate Buffered Saline*<sup>4</sup>) handelt es sich um das einfachste von den hier aufgeführten Medien, welches eine auf Wasser basierende Salzlösung, gepuffert mit Phosphaten, darstellt. Diese diente zugleich als Basis für eine Lösung mit 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethylamin<sup>4</sup> als Einbettmedium, welches im Folgenden mit MEA abgekürzt wird. Durch Zugabe von 0,5 mg/ml Glukoseoxidase<sup>4</sup>, 40 µg/ml Katalse<sup>4</sup> und 10% w/v Glukose kann der sog. Switching-Buffer [Van de Linde et al., 2008] hergestellt werden. Durch die Sauerstoff reduzierenden Enzyme soll hier das Verweilen der Fluorophore im reversibel gebleichten Zustand gefördert werden. Für die Aufnahmen wurden stets gleich große (~320 µm<sup>2</sup>), möglichst ähnliche Bereiche der Zelle ausgewählt. Hierbei wurden Regionen am Rand der Zellen benutzt, an denen deren Membran möglichst glatt ist, um eine bessere Vergleichbarkeit der Messungen zu erreichen (Beispielaufnahmen s. Abb. 5.1). Die Aufnahmeparameter (Laserintensität: ca. 23 kW/cm<sup>2</sup> bei 488 nm; Integrationszeit der Kamera: 55 ms) wurden für alle Aufnahmen einer Messreihe gleich eingestellt. Falls ein Farbstoff in einem Einbettmedium zu schnell ausgebleicht ist, wurde die Laserintensität um 50% verringert, um jeweils möglichst optimale SPDM-Aufnahmen

 $<sup>^1\</sup>mathrm{Southern}$ Biotechnology Associates, Birmingham, USA

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Thermo Scientific, Pittsburg, USA

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Roth, Karlsruhe

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Invitrogen, Carlsbad, USA

 $<sup>^5\</sup>mathrm{Vector}$ Laboratories, Burlingame, USA



#### Abbildung 5.1:

Antikörper- und GFP-markierte SKBr3-Zellen. A: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild von Her2/neu Protein-Clustern auf einer SKBr3-Zelle markiert mit Alexa488. B: vergrößerter Ausschnitt der Region gekennzeichnet in A. C: SPDM-Aufnahme der gleichen Region wie in B. D: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild der Plasmamembran einer SKBr3-Zelle gefärbt mit GFP. E: vergrößerter Ausschnitt der Region gekennzeichnet in C. F: SPDM-Aufnahme der gleichen Region wie in E.

durchführen zu können. Teilweise wurden zusätzliche Aufnahmen mit einer Integrationszeit von 150 ms vorgenommen, um den Einfluss dieses Parameters auf das Ergebnis der SPDM-Messungen zu untersuchen.

Im Folgenden werden unterschiedliche Parameter analysiert, die das reversible und irreversible Bleichen der Fluorophore charakterisieren und somit eine entscheidende Rolle für die SPDM-Aufnahmen spielen.

# 5.1.1 Quantitativer Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von Alexa488 bei SPDM-Messungen in verschiedenen Einbettmedien

Ein Vergleich der kumulativen Summen über die detektierten Signale der SPDM-Messungen zeigt anschaulich die Unterschiede und Eigenheiten die aus den verschiedenen Einbettmedien resultieren. Einer der wichtigsten Faktoren, die Gesamtzahl von detektierten Signalen in einer Messung, kann ebenso wie der zugehörige zeitliche Verlauf direkt den Diagrammen entnommen werden. Auch der Anteil der Signale, die auf den markierten Strukturen detektiert werden, wurde bestimmt. Zudem wurde der Hintergrund während der jeweiligen Messungen untersucht, welcher einen erheblichen Einfluss auf die Güte der Lokalisationsmessungen hat und gleichzeitig Aufschluss über Moleküle liefert, die nicht in einen reversibel gebleichten Zustand übergehen. Abbildung 5.2 zeigt den zeitlichen Verlauf der detektierten Einzelmolekülsignale und den des Hintergrunds für SPDM-Messungen bei einer Integrationszeit der Kamera von 55 ms. Bei den Einbettmedien MEA, Mowiol und PBS war die Anregungsintensität im Vergleich zu den anderen um 50% verringert. Bei den Präparaten in dem Einbettmedium VectaShield waren keine SPDM-Messungen möglich, da sich hier die Fluorophore offenbar von den markierten Proteinen abgelöst hatten und sich ungebunden im Medium bewegten.

In Abbildung 5.2A ist die kumulative Summe der detektierten Signale dargestellt. Bei den Einbettmedien ProlongGold, Immumount und dem Switching-Buffer wird ein Vielfaches der Signale detektiert verglichen mit Fluoromount, Mowiol, MEA und PBS. Abgesehen von den Messungen mit ProlongGold und dem Switching-Buffer nähern sich alle Kurven einem Sättigungswert an, wie man es bei einer exponentiell über die Zeit abfallenden Anzahl der aus dem reversibel gebleichten Zustand zurückkehrenden Moleküle erwarten würde.



#### Abbildung 5.2:

Zeitlicher Verlauf der detektierten Signale und des Hintergrunds für Alexa488 bei 55 ms Integrationszeit. A: kumulative Darstellung der detektierten Signale pro Einzelbild. Für die Messergebnisse beim Switching-Buffer wurden die Daten nochmals korrigiert, um eindeutige Mehrfachdetektionen eines Moleküls zu entfernen (gestrichelte rote Kurve). B: zeitlicher Verlauf des Hintergrunds. Hierbei wurden die aufleuchtenden Einzelmolekülsignale aus dem Datenstapel entfernt und über die Intensität aller Pixel in einem Bild gemittelt. C: Anteil der detektierten Signale, die auf der markierten Struktur liegen. D: mittlere Lokalisationsgenauigkeit. Im Fall des Switching-Buffers scheint sich nach ungefähr 500 Bildern ( $\sim$ 30 s) ein Gleichgewichtszustand einzustellen, in dem eine konstante Rate von Fluorophoren reversibel gebleicht wird und aus diesem Zustand wieder zurückkehrt in den fluoreszierenden Zustand. Dies hat einen linearen Anstieg der Kurve für die kumulative Summe über die detektierten Signale zur Folge. Bei den SPDM-Messungen von Alexa488-markierten Präparaten eingebettet in den Switching-Buffer war deutlich zu beobachten, dass die Fluorophore teilweise innerhalb kurzer Zeit (einige wenige bis > 50 Einzelbildern) sehr oft zwischen dem fluoreszierenden und dem reversibel gebleichten Zustand hin und her wechseln. Die gestrichelte rote Kurve in Abbildung 5.2A zeigt Daten, die auf diesen Effekt korrigiert wurden, um eine bessere Vergleichbarkeit aller Einbettmedien zu erreichen. Zu beachten ist, dass Flurophore, die über einen längeren Zeitraum (> 50 Bilder) zwischen fluoreszierendem und reversibel gebleichten Zustand wechseln, dabei nicht aus den Datensätzen entfernt werden konnten.

Der Verlauf der Kurven bei ProlongGold deutet ebenfalls darauf hin, dass nach dem zu Beginn abfallenden zeitlichen Verlauf der detektierten Signale ein Anstieg folgt. Dieser ist in der kumulativen Darstellung jedoch nicht linear, wie es beim Switching-Buffer der Fall ist, sondern weist einen quadratischen Anstieg auf und wird in den nachfolgenden Untersuchungen noch genauer analysiert.

Die Gesamtzahl detektierter Signale spiegelt nicht unbedingt die Güte der SPDM-Messung wider. Zwar ist die Punktdichte ein entscheidender Faktor für die Strukturauflösung bei der Lokalisationsmikroskopie, der Kontrast jedoch, mit dem die Struktur sich vom Hintergrund abhebt, hängt von dem Anteil der Fluorophore ab, die auf der markierten Struktur detektiert wurden. Um diesen Anteil bei den SPDM-Messungen für die verschiedenen Einbettmedien zu bestimmen, wurde ein Algorithmus entwickelt, der die Struktur in der konventionellen Weitfeldaufnahme mit der im Lokalisationsbild vergleicht. Hierfür werden die Signale im Weitfeldbild segmentiert, eventuelle Verschiebungen zwischen Weitfeld- und SPDM-Aufnahme korrigiert und danach der Anteil der Punkte, die im SPDM-Bild auf der markierten Struktur liegen, bestimmt.

In Abbildung 5.2C ist für die verschiedenen Einbettmedien der Anteil der Punkte, die auf der markierten Struktur detektiert wurden, dargestellt. Es fällt auf, dass die Einbettmedien, bei denen insgesamt relativ wenige Signale detektiert wurden, der Anteil der Signale, die auf der Struktur liegen, am höchsten ist. Dies lässt vermuten, dass in diesen Fällen weniger andere Moleküle aus der Zelle detektiert werden als bei den anderen Einbettmedien.

Ein weiteres Kriterium, das ausschlaggebend ist für die Lokalisationsmikroskopie, ist die Genauigkeit, mit der die Position der einzelnen Moleküle bestimmt werden kann. Für die Messreihen mit Alexa488 in verschiedenen Einbettmedien sind die jeweiligen Mittelwerte der Lokalisationsgenauigkeit in Abbildung 5.2D aufgetragen. Hier sind allerdings keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Präparaten zu beobachten.

Zur Untersuchung des Hintergrunds während den SPDM-Messungen wurden die Signale der einzeln aufleuchtenden Moleküle aus dem Datenstapel entfernt. Hierzu wurde ein Differenzdatenstapel durch die Subtraktion des nachfolgenden Einzelbildes vom vorhergehenden gebildet. Eine Subtraktion des Differenzdatenstapels vom Rohdatenstapel hat zur Folge, dass alle Signale, die nur in einem Einzelbild sichtbar sind, gelöscht werden. Dieser Vorgang wurde für die hier gezeigten Analysen insgesamt 10-mal durchgeführt, um auch Einzelmolekülsignale, die über mehrere Einzelbilder des Datenstapels fluoreszent waren, zu eliminieren. Für die Darstellung in Abbildung 5.2B wurde anschließend der Mittelwert über die Intensität aller Pixel in jedem Einzelbild berechnet.

Vergleicht man die Rangfolge der Kurven für die Zahl der detektierten Signale mit der Intensität des Hintergrunds, so ist zu erkennen, dass diese mit Ausnahme des Switching-Buffers fast genau übereinstimmen. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass bei den Messungen für die Einbettmedien MEA, Mowiol und PBS eine nur halb so hohe Anregungsintensität als bei den anderen verwendet wurde. Auch beim Betrachten der Hintergrundfluoreszenz unterschieden sich die Messungen bei ProlongGold von den anderen Einbettmedien. Nach dem exponentiellen Abfall, der bei allen zu erkennen ist, steigt die Intensität des Hintergrunds bei ProlongGold nach einigen hundert aufgenommenen Einzelbildern wieder an. Für eine Integrationszeit von 55 ms entspricht das den ersten 10-15 s der Messung. Die vergleichsweise niedrige Intensität des Hintergrunds bei den Präparaten, die mit dem Switching-Buffer eingebettet waren, und die zugleich hohe Anzahl von detektierten Signalen deuten wiederum auf unterschiedliche Vorgänge als in ProlongGold hin.

Abhängig von der Wahl des Einbettmediums, ist die Verweildauer der Fluorophore in dem reversibel gebleichten sowie im fluoreszierenden Zustand unterschiedlich lange. Deshalb erreicht man bei Einbettmedien wie ProlongGold, die eine positive Wirkung auf die Photostabilität der Fluorophore besitzen, bessere Ergebnisse bei den Lokalisationsmessungen, wenn die Integrationszeit der Kamera entsprechend angepasst wird.





Zeitlicher Verlauf der detektierten Signale und des Hintergrunds für Alexa488 bei 150 ms Integrationszeit. A: kumulative Darstellung der detektierten Signale pro Einzelbild. B: zeitlicher Verlauf des Hintergrunds. Hierbei wurden die aufleuchtenden Einzelmolekülsignale aus dem Datenstapel entfernt und über die Intensität aller Pixel in einem Bild gemittelt. C: Anteil der detektierten Signale, die auf der markierten Struktur liegen.

In Abbildung 5.3 sind für SPDM-Messungen mit einer Integrationszeit von 150 ms an Präparaten eingebettet in Fluoromount, Immumount und ProlongGold die Ergebnisse gleicher Analysen wie in 5.2 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass für die Einbettmedien Fluoromount und Immumount die Erhöhung der Integrationszeit keine Erhöhung der Gesamtzahl der detektierten Moleküle zur Folge hat. Bei genauer Betrachtung der Rohdaten und der Ergebnisse der Positionsbestimmungen zeigt sich, dass eine kürzere Integrationszeit ausreicht, ohne eine deutliche Mehrfachdetektion einzelner Signale zu erhalten. Auch die Lokalisationsgenauigkeit ist durch die höhere Integrationszeit und dem daraus resultierenden höheren Hintergrund (vergl. Abb. 5.2B und 5.3B) nicht verbessert im Vergleich zu den SPDM-Messungen bei 55 ms Integrationszeit.

Im Fall von ProlongGold wird bei 150 ms Integrationszeit innerhalb der gleichen Anzahl von aufgenommenen Bildern ein Vielfaches der Signale detektiert als bei einer Integrationszeit von 55 ms. Eine Gegenüberstellung der Unterschiede für die beiden Messreihen bei ProlongGold sowie der Vergleich zu dem Einbettmedium Immumount, ist in Abbildung 5.4 zu finden.



Abbildung 5.4:

Vergleich des Verhaltens von Alexa488 in ProlongGold und Immumount. Gezeigt sind jeweils die zeitlichen Verläufe der detektierten Signale von fünf Messungen, wobei die roten Kurven deren Mittelwerte darstellen. In die Histogramme über die Lokalisationsgenauigkeit fließen jeweils alle fünf Messungen der drei unterschiedlichen Messreihen mit ein. Die linke Spalte (A-C) zeigt die Ergebnisse der SPDM-Messungen für das Einbettmedium Immumount. Gegenübergestellt sind die Verläufe für ProlongGold NP gemessen mit einer Integrationszeit von 55 ms (D-F) und 150 ms (G-I).

Vergleicht man die zeitlichen Verläufe der detektierten Signale pro Einzelbild, so erkennt man einen deutlichen Unterschied zwischen dem der Fluorophore in Immumount und denen in ProlongGold (Abb. 5.4B,E,H). Im Fall des Einbettmediums Immumount zeigt sich ein exponentieller Abfall der detektierten Signale über die Zeit. Dies entspricht dem erwarteten Verhalten, wenn man davon ausgeht, dass die Fluorophore (abgesehen von denen, die irreversibel gebleicht werden) zu Beginn der Messung in den reversibel gebleichten Zustand übergehen und stochastisch über die Zeit verteilt wieder in den fluoreszierenden Zustand zurückkehren. Betrachtet man den Verlauf der Anzahl der detektierten Fluorophore über die Zeit für die Präparate, die in ProlongGold eingebettet waren, so folgt hier nach dem anfangs ebenfalls exponentiell abfallenden Verhalten ein linearer Anstieg (man beachte die logarithmische Darstellung in den Diagrammen 5.4B,E,H). In Kapitel 5.2 wird gezeigt, dass unmarkierte biologische Präparate bei der Verwendung von ProlongGold als Einbettmedium unter der Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm denselben linearen Anstieg der detektierten Einzelmolekülsignale zeigen. Dies lässt darauf schließen, dass die Kurven in den Abbildungen 5.4E,H aus einer Superposition einer exponentiell abfallenden und einer linear ansteigenden Kurve zweier unterschiedlicher Molekülsorten besteht. Zu Beginn der SPDM-Messung überwiegt der exponentielle Abfall der detektierten Signale der Alexa488-Moleküle. Nach einer bestimmten Zeit von ungefähr 50 s dominiert dann der lineare Anstieg einer anderen (oder auch mehrerer unterschiedlicher) Molekülsorten, die sich in den Zellen befinden. Wie in Kapitel 5.2 ebenfalls genauer erläutert wird, handelt es sich bei dem Anstieg der detektierten Signale über die Zeit vermutlich um eine Photoaktivierung bestimmter Moleküle in der Zelle. Diese Photoaktivierung von Molekülen, die somit zusätzlich zu den zur biologischen Markierung verwendeten Fluorophren bei einer SPDM-Messung in ProlongGold detektiert werden, macht klar, weshalb hier deutlich mehr Moleküle detektiert werden als bei den übrigen Einbettmedien.

Betrachtet man die beiden Histogramme über die Lokalisationsgenauigkeit bei ProlongGold (Abb. 5.4F,I), so ist im Fall der Integrationszeit von 55 ms im Vergleich zu 150 ms eine Verschiebung der Verteilung zu höheren Werten hin zu beobachten (55 ms:  $(35.0 \pm 10.6)$  nm;  $150 \text{ ms:} (27,3 \pm 10,8) \text{ nm}$ ). In Abbildung 5.2B ist zu erkennen, dass der Hintergrund bei 55 ms Integrationszeit deutlich niedriger ist als für 150 ms (Abb. 5.3B). Die im Mittel schlechtere Lokalisationsgenauigkeit für kürze Integrationszeiten lässt sich nur dadurch erklären, dass in diesem Fall die Fluorophore oft über 2-3 Einzelbilder hinweg im fluoreszierenden Zustand verweilen. Dadurch, dass der Algorithmus zur Positionsbestimmung der Einzelmolekülsignale nur diejenigen berücksichtigt, die sich von einem Bild zum nächsten ändern, verliert man bei denen, die über mehrere Bilder aufleuchten entsprechend viele Photonen für die Positionsbestimmung, was wiederum zu einer schlechteren Lokalisationsgenauigkeit führt. Bei einer Integrationszeit von ungefähr 150 ms erreicht man, dass die meisten Fluorophore nur in einem Einzelbild von der Kamera registriert werden. Das bedeutet, dass für die Positionsbestimmung der einzelnen Moleküle ein Optimum von detektierbaren Photonen zur Verfügung steht und somit eine bessere mittlere Lokalisationsgenauigkeit erreicht wird. Die Form der Verteilung der Lokalisationsgenauigkeit bleibt gleich, auch wenn man nur die Signale betrachtet, die mit großer Wahrscheinlichkeit von den Alexa488-Moleküle stammen (nicht gezeigt). Eine Trennung der detektierten Signale in diejenigen, die von den Alexa488-Molekülen stammen und jene, die von anderen, photoaktivierten Molekülen der Zelle herrühren, ist über ihr zeitliches Auftauchen während der Messung möglich. Wie bereits oben erwähnt, überwiegen bis zu einer Zeit von ungefähr 50 s die Signale von Alexa488.

# 5.1.2 Quantitativer Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von GFP bei SPDM-Messungen in verschiedenen Einbettmedien

Åhnlich wie für den Farbstoff Alexa488 wurden für eine GFP-Markierung Untersuchungen gemacht, die über das Verhalten der Fluorophore in unterschiedlichen Einbettmedien bezüglich des reversiblen Bleichens Aufschluss geben sollten. Alle Präparate wurden mit einer Integrationszeit von 55 ms bei gleicher Anregungsintensität aufgenommen. SPDM-Messungen an den Präparaten, die in MEA und dem Switching-Buffer eingebettet waren, erwiesen sich als unmöglich, da das GFP selbst bei minimaler Anregungsintensität so schnell gebleicht ist, dass eine korrekte Einstellung der Fokusebene auf die markierten Strukturen nicht möglich war. Eine Bestimmung des Anteils der Signale, die auf der markierten Struktur liegen, war hier nicht möglich, da die GFP-Moleküle homogen über die gesamte Zellmembran verteilt waren.



#### Abbildung 5.5:

Zeitlicher Verlauf der detektierten Signale und des Hintergrunds für GFP bei 55 ms Integrationszeit. A: kumulative Darstellung der detektierten Signale pro Einzelbild. B: zeitlicher Verlauf des Hintergrunds. Hierbei wurden die aufleuchtenden Einzelmolekülsignale aus dem Datenstapel entfernt und über die Intensität aller Pixel in einem Bild gemittelt.

Abbildung 5.5 zeigt, dass auch bei der Verwendung von GFP als Fluoreszenzmarker die Wahl des Einbettmediums eine entscheidende Rolle spielt. Die Anzahl der detektierten Fluorophore während einer SPDM-Messung kann durch die Verwendung eines anderen Einbettmediums um ein Vielfaches gesteigert werden. Auffällig ist auch hier wieder der Verlauf der Kurven für die kumulative Summe der detektierten Signale bei ProlongGold. Wie bei den Messungen mit dem organischen Farbstoff Alexa488 zeigt sich wieder ein Anstieg der Zahl der detektierten Signale mit der Zeit. Wie bereits erwähnt, ist dieser Anstieg unabhängig von den verwendeten Fluoreszenzmarkern und deshalb auch bei den SPDM-Messungen mit GFP zu beobachten. Aufgrund der homogenen Verteilung der GFP-Moleküle auf der Zellmembran war eine Bestimmung des Anteils der Signale, die auf der markierten Struktur liegen, hier nicht möglich. Im Vergleich zu dem organischen Farbstoff Alexa488 zeigen die Einbettmedien Mowiol und VectaShield eine andere Wirkung auf das reversible Bleichen von GFP. Beide führen zu einer vergleichbar hohen Zahl an detektierten Molekülen pro Fläche. Auffällig bei VectaShield ist jedoch der enorm hohe Hintergrund während der Lokalisationsmessung. Dieser ist fast 5-mal so hoch wie bei den anderen Einbettmedien. Eine erste Vermutung legt nahe, dass dadurch die Lokalisationsgenauigkeit deutlich schlechter wäre, wie beispielsweise bei Mowiol oder Immumount. Die Messungen zeigen allerdings, dass die Positionen der GFP-Moleküle in VectaShield im Mittel sogar mit einer um 6 nm höheren Genauigkeit bestimmt werden können als bei den übrigen Einbettmedien, was auf eine deutlich erhöhte Anzahl von emittierten Photonen pro Einzelmolekül hindeutet. Dies kann auch ein Grund für das erhöhte Hintergrundsignal sein.

# 5.1.3 Einfluss des Alters der Einbettmedien auf die Fluoreszenzeigenschaften von Alexa488 und GFP bei SPDM-Messungen

Bei den vorhergegangenen Messreihen für einen Vertreter der organischen und einen der biogenen Fluoreszenzfarbstoffe wurden die SPDM-Messungen jeweils am Tag nach der Präparation der Proben durchgeführt. Der Einfluss des Einbettmediums auf das reversible Bleichen sollte nun anhand der gleichen Messreihen an den selben Präparaten untersucht werden, nachdem diese ungefähr einen Monat bei 4°C gelagert worden waren. Da ein erheblicher logistischer Mehraufwand betrieben werden muss, um Präparate (vor allem solche von internationalen Kooperationspartnern) möglichst kurz nach der Präparation zu vermessen, ist es wichtig zu wissen, welchen Einfluss das Alter der Präparate auf die Qualität der Lokalisationsmessungen hat.

Die Abbildungen 5.6, 5.7 und 5.8 zeigen eine Gegenüberstellung der Eigenschaften des jeweiligen Einbettmediums auf das Verhalten der Alexa488-Moleküle abhängig von dem Zeitpunkt der Messung, bzw. dem Zeitraum der Lagerung. Es wird für jedes Einbettmedium jeweils die kumulative Summe der detektierten Signale, die mittlere Intensität des Hintergrunds während der Messung sowie der Anteil der Fluorophore, die auf der markierten biologischen Struktur detektiert wurden, mit den Analysen der frischen Präparate verglichen.

Bei allen Einbettmedien ist zu erkennen, dass nach einer längeren Lagerung das Verhältnis von Punkten, die auf der markierten Struktur detektiert werden, im Vergleich zu denen, die sich daneben befinden, verringert (Abb. 5.6, 5.7 und 5.8, untere Reihe). Der Grund hierfür dürfte einerseits sein, dass sich die Antikörper mit der Zeit von den Bindungsstellen an den Proteinen ablösen und somit zu einem höheren Anteil an unspezifischen Signalen führen. Andererseits wäre es aber auch denkbar, dass mehr autofluoreszente Moleküle aus der Zelle detektiert werden, die nicht auf den mit dem Farbstoff markierten Strukturen liegen. Diese Annahme resultiert zum einen daraus, dass der Effekt für die verschieden Einbettmedien unterschiedlich ist, zum anderen, dass bei fast allen Einbettmedien ein deutlicher Anstieg der Gesamtanzahl der detektierten Moleküle erkennbar ist (Abb. 5.6, 5.7 und 5.8, obere Reihe).

Bei den auf PBS basierenden Einbettmedien ist zu beobachten, dass der Einfluss des Alters der Präparate am kleinsten ist (Abb. 5.6). Lediglich beim Switching-Buffer ist eine deutliche Abnahme der Zahl der detektierten Signale, jedoch auch der Hintergrundintensität zu verzeichnen. Da hier Sauerstoff reduzierende Enzyme verwendet wurden, um den Übergang in einen reversibel gebleichten Zustand zu begünstigen, ist es zu erwarten, dass die Aktivität dieser Enzyme mit der Zeit abnimmt.

Die kommerziell erhältlichen Einbettmedien zeigen meist eine drastische Veränderung bezüglich der untersuchten Eigenschaften aufgrund des Alterungsprozesses. Fluoromount, das von allen getesteten Einbettmedien mit (69  $\pm$  3)% den höchsten Anteil an Fluorophoren auf der

Struktur aufweist, lässt auch nach einer Lagerung von einem Monat noch die Detektion von  $(44 \pm 7)\%$  der Signale auf der Struktur zu (Abb. 5.7A-C). Im Falle von Immumount, Mowiol und ProlongGold verringert sich dieser Anteil um das Zwei- bis Vierfache. Bei Werten unterhalb von ungefähr 10% ist die markierte Struktur im Lokalisationsbild nicht mehr erkennbar und unterscheidet sich auch nicht mehr von zufallsverteilten Punkten. In diesen Fällen ist es somit nicht mehr möglich die Lokalisationsmikroskopie zur Strukturauflösung der markierten biologischen Strukturen zu verwenden. Da aber im konventionellen Weitfeld-Bild die markierten Strukturen zu sehen sind, ist dies ein weiteres Indiz für die Annahme, dass die Abnahme des Anteils von Signalen, die auf der markierten Struktur detektiert wurden auch von anderen



Abbildung 5.6:

**Einfluss des Alters der Präparate für PBS-basierte Einbettmedien auf SPDM-Messungen.** Gezeigt sind jeweils die kumulative Summe über die Anzahl der detektierten Signale, der zeitliche Verlauf der Hintergrundintensität und der Anteil der Fluorophore, die auf der markierten Struktur detektiert wurden. Die farbigen Kurven geben den Mittelwert der Messungen der frischen Präparate wieder, die schwarzen die Mittelwerte der Messungen nach einem Monat Lagerung. Die linke Spalte (**A-C**) zeigt die Ergebnisse der SPDM-Messungen für das Einbettmedium PBS, die mittlere für 10mM MEA in PBS (**D-F**) und die rechte Spalte für den Switching-Buffer (**G-I**). Effekten herrühren, als nur von dem Ablösen der Antikörper von den Bindungsstellen. In Kapitel 5.1.1 wurde bereits erwähnt, dass ein Großteil der detektierten Signale im Hintergrund von Molekülen in den Zellen stammt, die ebenfalls ein reversibles Bleichverhalten aufweisen.

Abhängig von der jeweiligen Anwendung sind unterschiedliche Einbettmedien für die Präparation der Proben für SPDM-Messungen zu bevorzugen. Die auf PBS basierenden Einbettmedien zeigen einen relativ kleinen Einfluss des Alters der Präparate auf die Qualität der SPDM-Messungen. Der Nachteil hier ist jedoch die kleine Gesamtanzahl von detektierten



#### Abbildung 5.7:

**Einfluss des Alters der Präparate für die Einbettmedien Fluoromount, Immumount und Mowiol auf SPDM-Messungen.** Gezeigt sind jeweils die kumulative Summe über die Anzahl der detektierten Signale, der zeitliche Verlauf der Hintergrundintensität und der Anteil der Fluorophore, die auf der markierten Struktur detektiert wurden. Die farbigen Kurven geben den Mittelwert der Messungen der frischen Präparate wieder, die schwarzen die Mittelwerte der Messungen nach einem Monat Lagerung. Die linke Spalte (A-C) zeigt die Ergebnisse der SPDM-Messungen für das Einbettmedium Fluoromount, die mittlere für Immumount (D-F) und die rechte Spalte für Mowiol (G-I). Fluorophoren (~1000 bei PBS und MEA). Durch den Einsatz von Sauerstoff reduzierenden Enzymen ist es jedoch möglich die Detektionseffizienz deutlich zu erhöhen, um mehr Fluorophore detektieren zu können (ca. 2- bis 4-mal mehr als ohne Enzyme), was aber wiederum zu einer Abhängigkeit der Qualität der Messung von dem Alter der Präparate führt. Fluoromount erwies sich bei den SPDM-Messungen als das Einbettmedium, das von allen getesteten nach einem Monat Lagerung das beste Resultat bei den Lokalisationsmessungen mit Alexa488 lieferte. Dafür ist jedoch die Gesamtanzahl der detektierten Fluorophore geringer als bei den



Abbildung 5.8:

**Einfluss des Alters der Präparate für das Einbettmedium ProlongGold auf die SPDM-Messung.** Gezeigt sind jeweils die kumulative Summe über die Anzahl der detektierten Signale, der zeitliche Verlauf der Hintergrundintensität und der Anteil der Fluorophore, die auf der markierten Struktur detektiert wurden. Die farbigen Kurven geben den Mittelwert der Messungen der frischen Präparate wieder, die schwarzen und grauen die Mittelwerte der Messungen nach einem Monat Lagerung. Die linke Spalte (A-C) zeigt die Ergebnisse der SPDM-Messungen für das Einbettmedium ProlongGold versiegelt in nicht polymerisiertem Zustand, die mittlere für Prolong-Gold, das auspolymerisiert war (D-F) und die rechte Spalte für ProlongGold gemessen bei einer Integrationszeit von 150 ms über 300 Einzelbilder (~50 s) (G-I).

anderen kommerziell erhältlichen Einbettmedien. Immumount lässt eine relativ hohe Zahl an detektierten Molekülen zu, die im frischen Zustand des Präparats auch zu  $(42 \pm 6)\%$  auf der markierten Struktur liegen. Allerdings ist bei älteren Präparaten kaum mehr ein Unterschied zu einer Zufallsverteilung von Punkten zu erkennen. Bei Mowiol werden auf der Struktur im frischen Zustand sowie nach einem Monat Lagerung effektiv nur sehr wenig Fluorophore detektiert. Bei ProlongGold ist vor allem der extrem erhöhte Hintergrund während der SPDM-Messungen zu beobachten. Dieser stellt das Hauptproblem für die Messungen an älteren Präparaten dar. Eine Erhöhung des Anteils der auf den Strukturen detektierten Signale kann dadurch ermöglicht werden, dass nur solche berücksichtigt werden, die in den ersten 50 s der Messung aufgenommen werden (Abb. 5.8G-I). Wie schon bereits in Abschnitt 5.1.1 gezeigt, überwiegt nach dieser Zeit der Anteil der Signale, die von anderen fluoreszenten Molekülen in der Zelle stammen. Im frischen Zustand der Präparate resultiert dies in einem Anteil der auf der Struktur detektierten Signale von ca. 40% bei einer hohen Gesamtzahl von detektierten Fluorophoren. Die Messungen an den älteren Präparaten haben gezeigt, dass auf diese Weise auch noch Aufnahmen mit Alexa488 in ProlongGold möglich sind.



#### Abbildung 5.9:

Zeitlicher Verlauf der detektierten Signale und des Hintergrunds für GFP nach einem Monat Lagerung. A: kumulative Darstellung der detektierten Signale pro Einzelbild. B: zeitlicher Verlauf des Hintergrunds. Hierbei wurden die aufleuchtenden Einzelmolekülsignale aus dem Datenstapel entfernt und über die Intensität aller Pixel in einem Bild gemittelt.

Ebenso wie an den mit Alexa488 markierten Präparaten wurden an denen, die mit GFP gefärbt waren, die gleichen Messreihen nach einem Monat Lagerung erneut durchgeführt, um auch hier die Auswirkungen des Alters der Präparate auf die Ergebnisse der SPDM-Messungen zu untersuchen.

Die kumulative Summe detektierter Signale über die Zeit für die jeweiligen Einbettmedien, die in Abbildung 5.9A für die Messungen an den ein Monat alten Präparaten gezeigt ist, unterscheidet sich nur geringfügig von den Ergebnissen bei den frischen Präparaten (Abb. 5.5). Es ist zu beobachten, dass auch im Falle der GFP-Markierung bei den älteren Präparaten insgesamt mehr Signale detektiert werden. Eine Bestimmung des Anteils der Signale, die auf der markierten Struktur liegen, war wie bei den Messungen in Abschnitt 5.1.2 nicht möglich, da die GFP-Moleküle homogen über die gesamte Zellmembran verteilt waren. Es ist jedoch anzunehmen, dass auch hier die Zahl der unspezifischen Signale mit dem Alter der Präparate zunimmt.

Die mittlere Intensität des Hintergrunds während der SPDM-Messung an den älteren Präparaten ist ebenfalls kaum verändert im Vergleich zu den frischen (vergl. Abb. 5.9 und 5.5). Lediglich bei ProlongGold ist ein deutlicher Anstieg zu beobachten.

Das Einbettmedium Mowiol hat sich bei den GFP-markierten Präparaten als sehr gut geeignet für SPDM-Messungen herausgestellt. Einerseits werden relativ viele Signale detektiert, andererseits ist der Hintergrund während der Messung sehr gering. Dies schafft günstige Bedingungen für die Positionsbestimmung der einzelnen Signale. Ein sehr hoher Hintergrund kann auch zu falsch positiven Positionen führen, was in einem höheren Anteil an unspezifischeren Punkten oder gar strukturartigen Artefakten im Lokalisationsbild resultieren kann.

#### 5.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Vergleichen der Einbettmedien

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Resultate der Untersuchungen der Abhängigkeit des reversiblen Bleichens vom Einbettmedium im Bezug auf SPDM-Messungen zusammengefasst. Die verschiedenen Eigenschaften und Aufnahmeparameter sind getrennt für Alexa488, als Beispiel für einen organischen Farbstoff, und GFP, als Vertreter eines biogenen Fluorophors, aufgelistet.

Die empfohlene Integrationszeit der Kamera  $t_{Int}$  und die Anregungsintensität des Lasers I<sub>Laser</sub> basieren auf den Resultaten der oben gezeigten Untersuchungen. Sie müssen gegebenenfalls auf eine andere Systemkonfiguration (insbesondere Kamera) oder das biologische Präparat angepasst werden. Die verschiedenen Eigenschaften der Einbettmedien auf das Fluoreszenzverhalten der Farbstoffmoleküle bei SPDM-Messungen werden in der Tabelle grob durch die Symbole +, o und - bewertet. Die Gesamtzahl der detektierten Signale für ein Einbettmedium wird relativ zu den anderen eingestuft. Die Spezifität gibt an, ob bei einem Einbettmedium relativ viele oder nur wenige Signale auf der markierten Struktur detektiert wurden. Bei der Bewertung des Hintergrundsignals während der SPDM-Messung gibt ein + einen niedrigen Wert an, ein - entsprechend einen hohen. Der Einfluss des Alters der Präparate wird hauptsächlich durch die Veränderung der Spezifität angegeben. Ein + bedeutet, dass ein Präparat in einem Einbettmedium auch nach längerer Lagerung (Messwerte für den Zeitraum von einem Monat) noch verwertbare Messergebnisse erzielt.

Deutliches mehrfaches Aufleuchten eines einzelnen Fluorophors konnte nur bei der Verwendung des Switching-Buffers als Einbettmedium beobachtet werden und ist deshalb nicht in der Tabelle aufgeführt. Ebenso wurde die Lokalisationsgenauigkeit nicht in die Auflistung der Eigenschaften mit aufgenommen, da hier die Unterschiede aufgrund der verschiedenen Einbettmedien nur geringfügig ausgeprägt sind.

Da die Spezifität bei den Präparaten mit GFP nicht bestimmt werden konnte, sind in Klammern die Ergebnisse der Messungen an den Präparaten mit Alexa488 angeben. Unter der Annahme, dass der Unterschied der detektierten Signale neben den markierten Strukturen hauptsächlich von fluoreszierenden reversibel bleichenden Molekülen der Zelle beeinflusst wird, sollte sich die Spezifität bei den Messungen der GFP-Präparate ähnlich verhalten, wie die der mit Alexa488. SPDM-Messungen an anderen Farbstoffen zeigen, dass die Angaben in der Tabelle auf ähnliche Fluorophore übertragen werden können. Beispielsweise verhalten sich die Fluorophore Alexa568 und Alexa594 sehr ähnlich zu dem hier aufgeführten Alexa488. YFP und andere Varianten der fluoreszierenden Proteine weisen sehr ähnliche Charakteristiken auf, wie sie für GFP gezeigt wurden.

Einbettmedium	$t_{Int}$ [ms]	$\begin{array}{c} I_{Laser} \\ [kW/cm^2] \end{array}$	Anzahl det. Signale	Spezifität	Hintergrund	Alter
Alexa488						
Fluoromount	$\sim 55$	$\sim \! 25$	0	+	0	+
Immumount	$\sim 55$	$\sim \! 25$	+	0	+	-
Mowiol	$\sim 55$	$\sim 25$	0	0	+	-
ProlongGold NP	$\sim \! 150$	$\sim 25$	+	0	-	0
ProlongGold P	$\sim \! 150$	$\sim 25$	+	-	-	0
PBS	$\sim 55$	$\sim \! 25$	-	+	+	0
$10 \mathrm{mM}$ MEA	$\sim 55$	$\sim \! 25$	-	+	+	+
Switching-Buffer	$<\!\!55$	$\sim \! 25$	+	0	О	-
GFP						
Fluoromount	$<\!\!55$	$\sim \! 15$	-	(+)	+	/
Immumount	$<\!\!55$	$\sim \! 15$	+	(o)	+	/
Mowiol	$<\!\!55$	$\sim \! 15$	+	(o)	+	/
ProlongGold NP	$<\!\!55$	$\sim \! 15$	+	(o)	О	/
ProlongGold P	$<\!\!55$	$\sim \! 15$	+	(-)	О	/
VectaShield	$<\!\!55$	$\sim \! 15$	+	/	-	/
PBS	$<\!\!55$	$\sim \! 15$	-	(+)	+	/

# 5.2 Untersuchung autofluoreszenter photoschaltbarer Moleküle in unmarkierten Zellen

In Kapitel 5.1 wurde bereits gezeigt, dass neben den Fluorophoren, die zur Markierung biologischer Strukturen verwendet wurden, auch andere Moleküle in der Zelle reversibel gebleicht werden können und somit auch in Form von Einzelmolekülsignalen während einer SPDM-Messung detektiert werden. Insbesondere bei der Verwendung des Einbettmediums Prolong-



## Abbildung 5.10:

**Lokalisationsbild einer unmarkierten Cal-51-Zelle. A**: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild vor der SPDM-Messung. Strukturelle Details sind aufgrund von Autofluoreszenz sichtbar. **B**: SPDM-Aufnahme derselben Region. In beiden Bildern sind Membranstrukturen sichtbar, die sehr hellen sphärischen Objekte nur im Lokalisationsbild. Für die Anregung wurde ein Laser der Wellenlänge 488 nm verwendet. Aus [Kaufmann et al., 2011a].

### Gold trat dieser Effekt auf.

Für eine genauere Charakterisierung des Fluoreszenz- und Bleichverhaltens dieser Moleküle wurden Präparate angefertigt, die nicht mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Ein Ziel war hierbei neben der Charakterisierung der photophysikalischen Eigenschaften auch die Bestimmung der biologischen Strukturen, auf welchen diese Signale gehäuft detektiert wurden.

## 5.2.1 SPDM-Messungen an unmarkierten biologischen Strukturen

Bisher war es bei der Lokalisationsmikroskopie nur möglich biologische Strukturen aufzunehmen, die mit fluoreszenten Farbstoffen markiert sind und sich zwischen zwei spektral unterschiedlichen Zuständen schalten lassen. Im Folgenden wird gezeigt, dass unter geeigneten Bedingungen bestimmte Moleküle in der Zelle in einen reversibel gebleichten Zustand überführt werden können und dass die stochastische Rückkehr in den fluoreszenten Zustand, ebenso wie bei Fluoreszenzfarbstoffen, für die Lokalisationsmikroskopie genutzt werden kann.

Es wurden zwei Brustkrebszelllinien (Cal-51 und SKBr3) verwendet, die nach Standardverfahren kultiviert, für die Messungen mit Formaldehyd fixiert und in ProlongGold eingebettet wurden. Die anschließenden SPDM-Messungen wurden bei den Laserwellenlängen 488 nm und 568 nm bei einer Anregungsintensität im Bereich von ca. 25 kW/cm<sup>2</sup> im Objektraum und einer Integrationszeit der Kamera von 50 ms durchgeführt. Konventionelle Weitfeldfluoreszenzbilder wurden bei einer um mehrere Größenordnungen geringeren Anregungsintensität aufgenommen.

Abbildung 5.10 zeigt eine SPDM-Aufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm einer unmarkierten Cal-51 Zelle. Im konventionellen Weitfeldbild (Abb. 5.10A), das vor den SPDM-Messungen aufgenommen wurde, sind aufgrund von Autofluoreszenz der Kern und Membranstrukturen sichtbar. Schaut man sich das Lokalisationsbild (Abb. 5.10B) an, so kann man auch hier sehr deutlich dieselben Membranstrukturen erkennen, wohingegen im Zellkern nur vergleichbar wenige Moleküle detektiert wurden. Zusätzlich zeigt das SPDM-Bild sphärische Objekte im Zytoplasma der Zelle, die eine Größe im Bereich von wenigen  $\mu$ m aufweisen. Diese sind in dem konventionellen Weitfeldfluoreszenzbild nicht sichtbar. Durchlichtaufnahmen zeigen jedoch ebenfalls die sphärischen Objekte, was bedeutet, dass es sich um markante biologische Strukturen handelt, die unter Bedingungen der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie über keine Fluoreszenz verfügen (vergl. Abb. 5.11A,B,D,E).

In dem Beispiel der Messungen an einer SKBr3-Zelle, die in Abbildung 5.11 gezeigt sind, wurde nach den Durchlicht- und Weitfeldfluoreszenzaufnahmen (Abb. 5.11A,B,D,E) eine SPDM-Messung bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm durchgeführt (Abb. 5.11F). In dem zugehörigen Lokalisationsbild ist keinerlei Struktur zu erkennen, lediglich eine kleine Menge zufällig verteilter Punkte. Daraus kann gefolgert werden, dass auch bei einer SPDM-Messung mit einer Anregungswellenlänge von 568 nm die Moleküle in den sphärischen Strukturen nicht sichtbar gemacht werden können. In Abbildung 5.11G ist das Ergebnis einer SPDM-Messung bei 488 nm Anregungslicht dargestellt. Hier sind nun die sphärischen Objekte deutlich zu sehen. Führt man nach dieser Messung erneut eine SPDM-Messung mit einer Wellenlänge von 568 nm durch (Abb. 5.11H), so wird nun ebenfalls eine große Menge an Punkten auf denselben sphärischen Strukturen detektiert, wie bei der Messung mit 488 nm. Abbildung 5.11I zeigt die Überlagerung der beiden Lokalisationsbilder, welche verdeutlichen, dass es sich tatsächlich um die selben Strukturen handelt.



#### Abbildung 5.11:

**Unmarkierte SKBr3-Zelle angeregt mit 488 nm und 568 nm. A**: Durchlichtbild zeigt deutlich einige dunkle Flecken im Zytoplasma der Zelle. **B**: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild, das vor den SPDM-Messungen aufgenommen wurde. Der rote Kanal stellt die Anregung mit 568 nm dar, der grüne die mit 488 nm. Die Objekte, die als dunkle Flecken im Durchlichtbild zu erkennen sind, fehlen im Fluoreszenzbild (vergl. **D** und **E**). **F**: Lokalisationsbild einer SPDM-Aufnahme bei 568 nm. Es sind keine Strukturen wahrnehmbar. **G**: zweites Lokalisationsbild aufgenommen mit einer Anregung bei 488 nm. Sphärische Objekte sind deutlich erkennbar an den Positionen, wo im Durchlichtbild die dunklen Flecken zu sehen sind. **H**: Lokalisationsbild einer erneuten SPDM-Messung mit einer Anregungswellenlänge von 568 nm, die nach der vorherigen Messung bei 488 nm durchgeführt wurde. Die gleichen sphärischen Objekte wie bei der Anregung mit 488 nm sind zu sehen (s. überlagertes Bild in **I**). Diese Strukturen wurden auch sichtbar im konventionellen Weitfeldfluoreszenzbild, das nach den SPDM-Messungen aufgenommen wurde (**J**). **C** und **K**: überlagerte Bilder des Durchlichtbildes, des Weitfeldfluoreszenzbildes, das nach den SPDM-Messungen aufgenommen wurde, und der beiden letzteren Lokalisationsbilder. Aus [Kaufmann et al., 2011a].

Nach den SPDM-Messungen wurden nochmals konventionelle Weitfeldfluoreszenzbilder bei den beiden unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommen, in welchen die zuvor nicht detektierbaren sphärischen Objekte jetzt auch deutlich zu sehen sind (Abb. 5.11J). Diese Tatsache lässt eine Photoaktivierung durch eine hohe Anregungsintensität bei 488 nm spezieller Moleküle, die sich auf oder in diesen sphärischen Strukturen befinden, vermuten. Abbildung 5.11K zeigt eine Überlagerung des Durchlichtbilds mit dem Weitfeldfluoreszenzbild, das nach den SPDM-Messungen aufgenommen wurde, und den beiden letzteren Lokalisationsaufnahmen. Dies verdeutlicht noch einmal die perfekte Übereinstimmung der Strukturen, die in den unterschiedlichen Aufnahmen zu sehen sind.



#### Abbildung 5.12:

Histogramm über die Anzahl der detektierten Signale bei SPDM-Messungen mit 488 nm und 568 nm Anregunswellenlänge. A: linearer Anstieg der Anzahl der detektierten Signale über die Zeit der SPDM-Messung bei 488 nm (vergl. Abb. 5.10G). B: Ergebnis einer SPDM-Messung mit 568 nm Anregungswellenlänge nach der Messung bei 488 nm (vergl. Abb. 5.10H). Hier ist ein exponentieller Abfall im Histogramm zu erkennen. Die Balkenbreite in beiden Histogrammen entspricht 1 s (20 Einzelbildern der Aufnahme). Aus [Kaufmann et al., 2011a].

Um das Fluoreszenzverhalten der Moleküle bei unterschiedlichen Anregungswellen genauer zu betrachten, sind in Abbildung 5.12 die zeitlichen Verläufe der Zahl der detektierten Moleküle während den SPDM-Messungen mit 488 nm und 568 nm dargestellt. Betrachtet man den Verlauf für die Messung mit 488 nm (Abb. 5.12A), so ist nach einem sehr kurzen anfänglichen Abfall der Zahl der detektierten Moleküle ein linearer Anstieg zu beobachten. Dies bedeutet, dass Moleküle, die vor der SPDM-Messung nicht fluoreszent waren, auf irgendeine Art und Weise photoaktiviert werden. Hierbei könnte es sich um eine Konformationsänderung des Moleküls selbst, oder aber auch um eine Änderung bei einem benachbarten Molekül, das vorher die Fluoreszenz des anderen unterdrückt hat, handeln. Führt man nach der SPDM-Messung mit 488 nm Anregungslicht eine mit 568 nm durch, so werden, wie oben gezeigt, Moleküle auf den selben Strukturen detektiert. Schaut man sich den zeitlichen Verlauf der Zahl der detektierten Moleküle bei der Messung mit 568 nm an (Abb. 5.12B), so stellt man fest, dass diese exponentiell abfällt, wie man es bei einer SPDM-Messung an einem Fluorophor erwarten würde, bei dem keine Aktivierung zusätzlicher Moleküle stattfindet. Die beiden zeitlichen Verläufe der Zahl der detektierten Moleküle während einer SPDM-Messung machen deutlich, dass bei einer Anregung mit 488 nm eine Photoaktivierung bestimmter Moleküle in der Zelle stattfindet. Bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm ist das nicht der Fall und es werden, wenn vorher keine Photoaktivierung stattfand, nur einige wenige unspezifische Signale detektiert. Im Fall einer zuvor erfolgten Photoaktivierung werden Moleküle auf bestimmten Strukturen detektiert und man verzeichnet eine exponentielle Abnahme der Zahl der Signale aufgrund irreversiblen Ausbleichens über die Zeit der SPDM-Messung hinweg.

Eine detailliertere Charakterisierung der Strukturen, die in den Lokalisationsmessungen sichtbar werden ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Die sphärischen Strukturen zeigen eine bemerkenswert hohe Signaldichte von mehreren 1000 Signalen/ $\mu$ m<sup>2</sup>. Für zwei der sphärischen



#### Abbildung 5.13:

**Charakterisierung der Strukturen in SPDM-Bildern unmarkierter SKBr3-Zellen. A**: Weitfeldfluoreszenzbild eines Bereichs im Zytoplasma, das nach einer SPDM-Messung bei einer Wellenlänge von 488 nm aufgenommen wurde. **B**: Lokalisationsbild derselben Region. Insgesamt wurden ca. 100.000 Signale detektiert mit einer mittleren Lokalisationsgenauigkeit von 31,5 nm. Durch eines der sphärischen Objekte wurde ein Linienprofil (dargestellt in gelb) mit einer Breite von 200 nm gelegt. **C**: Vergleich der Linienprofile aus Weitfeld- und Lokalisationsbild. Beide Kurven sind auf ihr Integral normiert. Um feine Membranstrukturen im Lokalisationsbild hervorzuheben, wurde in einem Bereich (**D**) der dynamische Kontrast entsprechend angepasst. Die sphärischen Objekte sind in dieser Darstellung stark übersättigt, da sie eine viel höhere Signaldichte aufweisen. Aus [Kaufmann et al., 2011a]. Objekte (markiert in orange) in Abbildung 5.13B wurde die mittlere Dichte bestimmt, welche einen Wert von 8728 Signale/ $\mu$ m<sup>2</sup> für das kleinere und 6007 Signale/ $\mu$ m<sup>2</sup> für das größere ergab. Die Membranstrukturen, die sowohl in den konventionellen Weitfeldfluoreszenzbildern als auch in den SPDM-Bildern sichtbar sind, weisen eine deutlich geringere Signaldichte auf. Um sie im Lokalisationsbild neben sehr hellen sphärischen Strukturen sichtbar zu machen, wurde in einem Ausschnitt (Abb. 5.13D) der dynamische Bereich entsprechend angepasst. Durch eines der sphärischen Objekte in dem Weitfeldfluoreszenzbild, das nach der SPDM-Messung aufgenommen wurde (Abb. 5.13A) und dasselbe im Lokalisationsbild (Abb. 5.13B) wurde ein Linienprofil gelegt (dargestellt in gelb). Abbildung 5.13C zeigt den Vergleich der beiden Linienprofile und zeigt die deutlich erhöhte Strukturauflösung im Lokalisationsbild, die bei ungefähr 60 nm lag.



#### Abbildung 5.14:

Vergleich der sphärischen Objekte mit einer Antikörpermarkierung gegen Lysosmen und frühe Endosomen in SKBr3-Zellen. A: Weitfeldfluoreszenzbild (rot) der Antikörpermarkierung gegen Lysosomen mit Alexa568 überlagert mit Durchlichtbild (grau). B: Weitfeldfluoreszenzbild der Antikörpermarkierung gegen Lysosomen mit Alexa568 (rot) überlagert mit Weitfeldfluoreszenzbild aufgenommen nach Aktivierung mit einer Anregungswellenlänge von 488nm (grün). In C und D sind die Ergebnisse einer Antikörpermarkierung gegen frühe Endosomen analog zu A und B dargestellt. Für beide Markierungen ist keine Übereinstimmung der Strukturen festzustellen.

Zur Feststellung, um welche biologischen Strukturen es sich bei den sphärischen Objekten handelt, auf denen hauptsächlich die photoaktivierbaren Moleküle detektiert werden, wurde eine Immunfärbung von Lysosomen (LAMP1<sup>1</sup> und LAMP2<sup>1</sup>) und frühen Endosomen (EEA1<sup>2</sup>) durchgeführt. Diese wurden gewählt, weil sie in Größe und Form denen der sphärischen Objekte ähneln und es sich um biologische Strukturen handeln muss, die eine sehr viel höhere Dichte aufweisen als die Umgebung, um den starken Kontrast im Durchlichtbild zu verursachen, wie es in den oben gezeigten Messungen der Fall war. In Abbildung 5.14A,C sind die Weitfeldfluoreszenzbilder der Antikörpermarkierungen mit Alexa568 den Durchlichtbildern gegenübergestellt. Es ist keine Kolokalisation der Fluoreszenzsignale mit den dunklen Flecken in den Durchlichtbildern zu erkennen. Um nochmals zu verifizieren, ob es sich bei diesen Flecken tatsächlich um die gesuchten sphärischen Objekte handelt, wurden die Präparate mit einer ent-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

sprechend hohen Anregungsintensität bei 488 nm bestrahlt, um so die gewünschten Moleküle zu photoaktivieren. Eine Überlagerung der Weitfeldfluoreszenzbilder aufgenommen nach der Aktivierung mit den Bildern der Antikörpermarkierung sind in Abbildung 5.14B,D gezeigt. Es ist klar ersichtlich, dass Lysosomen und frühe Endosomen für die sphärischen Strukturen ausgeschlossen werden können. Aufgrund der bereits erwähnten hohen Brechkraft dieser Objekte wäre es auch denkbar, dass diese Liposomen oder Lipidtröpfchen sind. Es kämen auch sog. *stress bodies* [Kedersha et al., 2005] in Frage, in denen sich bei physikalischen Stress der Zelle (z.B. Temperaturveränderung) angehaltene Translationsinitiationskomplexe anhäufen. Um die tatsächliche Identität der sphärischen Objekte festzustellen, sind weiterführende biologische Experimente geplant.

### 5.2.2 Photoaktivierbare Moleküle in der Zelle als zusätzliche Information im Lokalisationsbild

In Kapitel 5.1 und 5.2 wurde gezeigt, dass bestimmte Moleküle in der Zelle durch die Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 488 nm photoaktiviert werden und ein reversibles Bleichverhalten aufweisen. Im Falle einer SPDM-Messung bei der entsprechenden Wellenlänge von fluoreszenzmarkierten Strukturen in einer Zelle sind die Signale, die zusätzlich zu der eigentlichen Markierung unter den entsprechenden Bedingungen detektiert werden, als Störeffekt zu betrachten. Durch das Verkürzen der Aufnahmedauer oder die Wahl eines anderen Einbettmediums kann dieser Effekt unterdrückt oder eliminiert werden (s. Kapitel 5.1). Andererseits ist es jedoch denkbar, die Signale der photoaktivierten Moleküle der Zelle als zusätzliche Information bei einer SPDM-Messung zu nutzen.

Abbildung 5.15 zeigt beispielhaft zwei unterschiedliche SPDM-Messungen, bei welchen die Signale der photoaktivierten Moleküle in der Zelle als zusätzliche Farbe im Bild dargestellt sind. Auf diese Weise können zusätzlich zu den markierten Strukturen weitere Strukturdetails der Zelle sichtbar gemacht werden.

Für die Aufnahmen wurden jeweils SKBr3-Zellen verwendet. Im Fall der Messungen, die in Abbildung 5.15A-C gezeigt sind, wurde das Membranprotein Her2/neu mit Alexa488 markiert. Die SPDM-Messung erfolgte bei einer Laserwellenlänge von 488 nm und einer Anregungsintensität von ca. 25 kW/cm<sup>2</sup>. Im Weitfeldfluoreszenzbild, wie auch im Lokalisationsbild, sind die Antikörper-markierten Protein-Cluster in rot, die durch die photoaktivierten Moleküle sichtbar gewordenen Strukturen in der Zelle in grün dargestellt. Hiermit erhält man im Lokalisationsbild zusätzlich die Struktur der Membran sowie anderer Objekte, in denen sich die photoaktivierbare Moleküle befinden. Abbildung 5.15D-F veranschaulicht, dass auch bei einer Zwei-Farben-Markierung von Her2/neu-Proteinen mit Alexa568 und Her3-Proteinen mit Alexa488 die Signale der photoaktivierten Moleküle als dritte Farbe im Lokalisationsbild herangezogen werden können, um wiederum zusätzliche Strukturen der Zelle zu visualisieren. Die Intensität der beiden Anregungswellenlängen lag bei diesen Messungen ebfalls bei ca.  $25 \text{ kW/cm}^2$ .



#### Abbildung 5.15:

**Trennung der Fluorophore von Signalen photoaktivierter Moleküle der Zelle. A**: zeitlicher Verlauf der Anzahl der detektierten Signale während einer SPDM-Messung von Her2/neu-Proteinen auf einer SKBr3-Zelle markiert mit Alexa488. **B**: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild aufgenommen vor der SPDM-Messung (rot) überlagert mit dem Weitfeldbild, das nach der SPDM-Messung aufgenommen wurde (grün). **C**: Lokalisationsbild des gleichen Ausschnitts wie in **B**. In rot sind die Signale dargestellt, die in den ersten 300 Einzelbildern detektiert wurden, in grün die Signale, die später detektiert wurden (vergl. **A**). **D**: zeitlicher Verlauf der Anzahl der detektierten Signale während einer SPDM-Messung von Her2/neu-Proteinen auf einer SKBr3-Zelle markiert mit Alexa568 und Her3-Proteinen markiert mit Alexa488. **E**: konventionelle Weitfeldfluoreszenzbilder aufgenommen vor der SPDM-Messung (rot = Alexa568, grün = Alexa488) überlagert mit dem Weitfeldbild, das nach der SPDM-Messung aufgenommen wurde (blau). **F**: Lokalisationsbild des gleichen Ausschnitts wie in **E**. Die in rot gezeigten Signale entsprechen der Aufnahme für Alexa568. In grün sind jeweils die Signale dargestellt, die in den ersten 300 Einzelbildern bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm detektiert wurden, in blau die Signale, die bei der selben Wellenlänge in den Einzelbildern 301-1000 detektiert wurden (vergl. **D**).

# 5.3 Analyse von Her2/neu-Protein-Clustern in der Membran verschiedener Brustkrebszellen

Das Transmembranprotein Her2/neu (human epidermal growth factor receptor 2, erbB2) gehört zur Familie der Wachstumsfaktoren (epidermal growth factor receptor, EGFR) [Yarden und Sliwkowski, 2001, Warren und Landgraf, 2006]. Es stellt einen Glykoproteinrezeptor mit einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne dar. Her2/neu-Rezeptoren dienen nach Phosphorylierung als Bindungstellen für die Rekrutierung von anderen Proteinen und Enzymen im Zytoplasma. Diese lösen unterschiedliche Signalkaskaden aus, die zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Stoffwechsel und Apoptose steuern.



#### Abbildung 5.16:

**Funktionsweise eines Rezeptorproteins.** Die Kinasedomäne des Rezeptorproteins ist inkativ, bis ein spezifischer Ligand an die externe Binderegion des Proteins koppelt. Dies führt zur Auslösung der Signalkaskade, welche u.a. die Proliferation der Zelle stimuliert. Bei einer Überexpression des Rezeptorproteins wird diese Stimulation entsprechend verstärkt. Mod. nach [Kuriyan, 2009].

Das Protein Her2/neu spielt eine wichtige Rolle bei der Diagnose und Therapie von Brustkrebs. In 20-30% der Erkrankungsfälle liegt eine Überexpression dieses Proteins vor [Albanell und Baselga, 1999], was mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate der Patientinnen verbunden ist [Slamon et al., 1967, Slamon et al., 1989, Elledge et al., 1992]. Therapeutische Ansätze nutzen den gegen die extrazelluläre Domäne von Her2/neu gerichteten Antikörper Trastuzumab (Herceptin), um dessen Rezeptoraktivität zu blockieren [Sawyers, 2002, Workman, 2003]. Für die Durchführung einer solchen Behandlung wird überprüft, ob eine Überexpression des Her2/neu-Proteins vorliegt. Dies erfolgt über immunhistochemische Methoden des Tumorgewebes oder der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf Genebene.

Im Folgenden wird ein Projekt vorgestellt, in dem die hohe Strukturauflösung und die Einzelmolekülinformation der Lokalisationsmikroskopie genutzt wurde, um mehr über die räumliche Anordnung der einzelnen Her2/neu-Proteine auf der Zellmembran und deren Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs in Erfahrung zu bringen.

# 5.3.1 Präparation der Proben

Die Lokalisationsmessungen der Her2/neu-Proteine wurden an drei verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Dies ermöglicht einen Vergleich zwischen Zellen aus einem gesunden Brust-Epithelgewebe (AG11132) mit Brustkrebszellen (Cal-51, SKBr3) sowie den Vergleich zweier unterschiedlicher Brustkrebszellinien (Cal-51 vs. SKBr3). In Abbildung 5.17 sind konventionelle Weitfeldfluoreszenzbilder der drei unterschiedlichen Zellinien gezeigt.

- AG11132: Zellen eines gesunden Spenders. Die Zellinie AG11132<sup>1</sup> stammt aus dem Brust-Epithelgewebe eines gesunden Spenders. Die Zellen wurden in MEGM (Brustdrüsenepithelwachstumsmedium) mit 4 µl/ml Rinder-Hypophysen-Extrakt, 5 µg/ml Insulin, 5 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor, 0,5 µg/ml Hydrocortison, 10 µM Isoproterenol, 5 µg/ml Transferrin, 10 mM HEPES-Puffer und 2 ml/l Gentamicin/Amphotericin kultiviert.
- Cal-51: Brustkrebszelllinie. Cal-51<sup>2</sup> stellt eine Brustkreszelllinie mit einer Überexpression von Her2/neu dar, die jedoch einen normalen diploiden Karyotyp besitzt. Die Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mit 20% FCS (Fetales Kälberserum), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.
- SKBr3: Brustkrebszelllinie. SKBr3<sup>3</sup> stellt ebenfalls eine Brustkrebszelllinie dar, die eine Amplifikation des *Her2/neu*-Gens und daher eine Überexpression von Her2/neu aufweist. Sie besitzt einen hypertriploiden Chromosomensatz mit Translokationen auf fast allen Chromosomen. Die Zellen wurden kultiviert in McCoy's 5A Medium mit 10% FCS (Fetales Kälberserum), 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin.

Alle Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5%  $CO_2$  in einem Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert, über Antikörper fluoreszent markiert und in ProlongGold eingebettet. Die Kultivierung der Zellen und die Probenpräparation wurde von Dr. Patrick Müller durchgeführt (weiterführende Erläuterungen und Details hierzu s. [Müller, 2011]). Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der verwendeten Antikörper zur Markierung der Her2/neu-Proteine.

Abkürzung	Antikörper	Bindungsdomäne
$\mathbf{EXR}$ intra $\mathbf{TR}$	$\begin{array}{l} {\rm Monoclonal-anti-Her 2/neu^4} \\ {\rm Polyclonal-anti-Her 2/neu^5} \end{array}$	extrazelluläre Domäne (Mouse IgG) intrazelluläre Kinasedomäne (Rabbit IgG)
Alexa488 Alexa488 Alexa568	Alexa Fluor 488 <sup>6</sup> Alexa Fluor 488 <sup>6</sup> Alexa Fluor 456 <sup>6</sup>	Sekundärantikörper (Goat anti-mouse IgG) Sekundärantikörper (Goat anti-rabbit IgG) Sekundärantikörper (Goat anti-mouse IgG)

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Coriell Institute, Camden, USA

 $<sup>^2 \</sup>mathrm{Deutsche}$ Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>American Type Culture Collection - ATCC, Manassas, USA

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Merck, Darmstadt

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>Invitrogen, Carlsbad, USA



#### Abbildung 5.17:

Zelllinien für die Untersuchung von Her2/neu-Clustern. Konventionelle Weitfeldfluoreszenzbilder von Her2/neu-Proteinen markiert mit Alexa488 in den unterschiedlichen Zelllinien AG11132, Cal-51 und SKBr3.

#### 5.3.2 Lokalisationsmessungen und statistische Analysen

Im Folgenden werden die Ergebnisse von Lokalisationsmessungen an Antikörper-markierten Her2/neu-Proteinen auf verschiedenen Zelltypen vorgestellt. Das Hauptaugenmerk bei der Analyse der Daten lag auf der genaueren Charakterisierung der Protein-Cluster, die auf der Membran der Zellen lokalisiert sind.

#### Parameter für Lokalisationsmessungen

Für die SPDM-Messungen wurden entsprechend den verwendeten Fluorophoren Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und 568 nm bei einer jeweiligen Anregungsintensität im Bereich von 20-30 kW/cm<sup>2</sup> benutzt. Für die Aufnahmen wurde eine Integrationszeit der Kamera von 150 ms verwendet. Im Fall der Messungen an Alexa488-markierten Präparate wurden insgesamt 500 Einzelbilder aufgenommen, bei der Färbung mit Alexa568 bestand der Datenstapel aus 2000 Einzelbildern. Die gewählten Parameter für die SPDM-Messungen ergeben sich aus den Erkenntnissen für die Untersuchungen des reversiblen Bleichverhalten der Fluorophore in unterschiedlichen Einbettmedien (s. Kapitel 5.1.1 und 5.2).

#### Bestimmung der Cluster-Größe

Zur Identifikation und Charakterisierung der Protein-Cluster in den Lokalisationsbildern wurde der in Kapitel 4.3 vorgestellte Algorithmus **autoclusters** benutzt. Es wurden folgende Eingabeparameter verwendet: Pixelgröße: 10 nm, Radius: 60 nm, Mindestanzahl von benachbarten Molekülen in diesem Radius: 5, Schwellwert für lokale Dichte: 530 Punkte/ $\mu$ m<sup>2</sup>, Maximalgröße für Cluster: 100 Punkte. Für die Bestimmung der lokalen Dichte über den Abstand zum nächsten benachbarten Punkt wurde der Vorgang der zufälligen Neuanordung der Punkte, um die Lokalisationsgenauigkeit zu berücksichtigen, 100-mal wiederholt (s. Kapitel 4.3.1).



## Abbildung 5.18:

**Her2/neu-Cluster auf der Membran einer SKBr3-Zelle. A**: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild von Alexa488-markierten Her2/neu-Proteinen. **B**: Lokalisationsbild derselben Region wie in **A**. **C**: Ergebnis des Algorithmus clusters\_v3 zur Identifikation der Protein-Cluster. Die Positionen der einzelnen Moleküle sind durch schwarze Punkte repräsentiert, die Cluster sind orange gefärbt. Der Schwellwert für die lokale Dichte wurde auf 530 Punkte/µm<sup>2</sup> gesetzt. Aus [Kaufmann et al., 2011b]. Die Wahl dieser Eingabeparameter führt dazu, dass die Wahrscheinlichkeit einen zufällig geformten Cluster in einer zufälligen Verteilung von Punkten mit derselben mittleren Punktdichte und derselben Gesamtzahl von Punkten wie für die Lokalisationsdaten zu finden auf unter 0,1% fällt.

Abbildung 5.18 zeigt beispielhaft Aufnahmen von Alexa488-markierten Her2/neu-Proteinen in einem Ausschnitt einer Region auf der Membran einer SKBr3-Zelle. Das konventionelle Weitfeldfluoreszenzbild (Abb. 5.18A) ist dem Lokalisationsbild (Abb. 5.18B) gegenübergestellt. Hier ist die deutliche Erhöhung der Strukturauflösung im Lokalisationsbild aufgrund einer mittleren Lokalisationsgenauigkeit von ungefähr 25 nm klar erkennbar. In Abbildung 5.18C ist das Ergebnis des Algorithmus zur Cluster-Identifikation mit den oben beschriebenen Parametern veranschaulicht.

Zur Bestimmung der Cluster-Größe wurden insgesamt 176 Lokalisationsaufnahmen von Membranregionen auf den unterschiedlichen Zelllinien mit dem Algorithmus **autoclusters** ausgewertet. Der Mittelwert des Durchmessers von 20.637 Her2/neu-Clustern ergab sich zu 67 nm mit einer Standardabweichung von 21 nm (s. Abb. 5.19A). Die mittlere Dichte detektierter Signale innerhalb eines Clusters beträgt ungefähr 2400 Punkte/ $\mu$ m<sup>2</sup>.



Abbildung 5.19:

**Durchmesser der Her2/neu-Cluster. A**: Histogramm über den Durchmesser der Her2/neu-Cluster. Die Verteilung hat einen Mittelwert von 67 nm mit einer Standardabweichung von 21 nm. Ausgewertet wurden 20.637 Protein-Cluster aus 176 SPDM-Messungen. Aus [Kaufmann et al., 2011b]. B: getrennte Darstellung der Cluster-Größe für die unterschiedlichen Zelllinien und verschiedene Antikörpermarkierungen. Die Häufigkeit ist normiert auf die jeweilige Gesamtzahl von Clustern.

Um den Einfluss der verwendeten Antikörper auf das Ergebnis der Cluster-Größe zu untersuchen, wurden SPDM-Messungen an Präparaten mit Primärantikörper gegen die extrazelluläre Domäne von Her2/neu sowie gegen die intrazelluläre Domäne durchgeführt. Bei der Analyse der Cluster-Größe ist kein Unterschied für die verschiedenen Markierungen festzustellen. Ebenso wurde der Einfluss von den verwendeten Fluorophoren überprüft. Auch die Bestimmung des Durchmessers der Her2/neu-Cluster für sekundäre Antikörper mit Alexa488 oder Alexa568 zeigte keinen Unterschied bezüglich der Antikörpermarkierung. In Abbildung 5.19B ist der Durchmesser der Protein-Cluster getrennt für die unterschiedlichen Markierungen aufgetragen.

Vergleicht man nun die Größe der Her2/neu-Cluster auf den unterschiedlichen Zelltypen, so stellt man fest, dass der Durchmesser der Cluster bei allen gleich ist (vergl. Abb. 5.19). Die Größe der Her2/neu-Cluster ist folglich von der Gesamtzahl der Her2/neu-Proteine auf der Zellmembran unabhängig, was in Übereinstimmung mit Untersuchungen durch optische Rasternahfeldmikroskopie (*SNOM, scanning near-field optical microscopy*) von Her2/neu-Proteinen ist [Nagy et al., 1999].

Die erhöhte Strukturauflösung der Lokalisationsmikroskopie lässt einerseits eine genauere Untersuchung der Größe der Her2/neu-Cluster zu, andererseits reicht diese Information jedoch nicht aus, um Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen auf dem Niveau der einzelnen Protein-Cluster zu bestimmen.

#### Distanzanalysen auf dem Einzelmolekülniveau

Für eine genauere Analyse der Verteilung der einzelnen Proteine auf der Membran der unterschiedlichen Zellen wurden die Distanzen zwischen den einzelnen Molekülpositionen in den Lokalisationsbildern bestimmt. Diese geben Aufschluss über den prozentualen Anteil der Moleküle, die innerhalb eines Clusters detektiert wurden und somit über einen Unterschied zu einer zufälligen Punktverteilung mit gleicher mittlerer Punktdichte und gleicher Gesamtzahl von Punkten. Zudem ermöglichen diese Analysen auch einen sehr präzisen Vergleich von Proteinverteilungen auf unterschiedlichen Zelllinien.

Abbildung 5.20A zeigt die Verteilungen aller Distanzen zwischen den einzelnen Molekülpositionen in den Lokalisationsbildern der verschiedenen Zelllinien. Zu jedem Lokalisationsdatensatz wurde eine zufällige Verteilung von Punkten generiert, deren mittlere Punktdichte und Gesamtzahl von Punkten denen im Lokalisationsbild entspricht. Auf diesen simulierten Daten wurden die gleichen Analysen durchgeführt, wie für die Daten der SPDM-Messungen. Die Verteilung der Distanzen in den simulierten Zufallsdaten sind in dem Histogramm in Abbildung 5.20A als gestrichelte Linie eingetragen. Daraus ist klar ersichtlich, dass die Distanzverteilungen in den Lokalisationsdaten von denen zufällig verteilter Punkte abweicht. Bei allen drei Zelllinien ist eine deutlich erhöhte Anzahl von kleinen Distanzen (<100 nm) im Vergleich zu den Zufallsdaten zu beobachten. Dies ist allgemein ein Indikator, dass Strukturen im Lokalisationsbild vorhanden sind - in diesem Fall Protein-Cluster. Die Distanzverteilung der Her2/neu-Proteine auf der Membran der Zellen von einem gesunden Spender (AG11132) weicht sehr deutlich von den beiden Verteilungen bei den Krebszelllinien (Cal-51, SKBr3) ab. Die relative Anzahl von kleinen Distanzen ist um ein Vielfaches geringer als es bei den Distanzverteilungen der beiden Krebszelllinien der Fall ist. Die relative Anzahl der kleinen Distanzen zischen den Proteinen auf den Cal-51-Zellen ist ebenfalls merklich geringer als im Fall der SKBr3-Zellen. Diese Ergebnisse lassen zunächst mehrere Schlussfolgerung zu: a) Es gibt unterschiedlich viele Her2/neu-Cluster auf den verschieden Zelllinien, wobei sich die meisten auf den SKBr3-Zellen befinden gefolgt von den Cal-51-Zellen und den AG11132-Zellen. b) Die Her2/neu-Cluster sind unterschiedlich groß, wobei die auf der Membran der SKBr3-Zellen am größten sind und die in AG11132 am kleinsten. c) Die Cluster weisen eine unterschiedlich



#### Abbildung 5.20:

**Vergleich der drei verschiedenen Zelllinien auf dem Einzelmolekülniveau.** A: Histogramme über alle Distanzen zwischen den einzelnen Molekülpositionen in den Lokalisationsbildern bis zu 200 nm. Bei allen drei Verteilungen ist ein klarer Unterschied zu einer entsprechenden Zufallsverteilung von Punkten zu beobachten. Auch ist ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien erkennbar. **B** zeigt die Ergebnisse der gleichen Analyse wie in **A** jedoch nur für Signale, die innerhalb eines Clusters detektiert wurden. Auch hier ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Distanzverteilungen der verschiedenen Zelllinien zu sehen. **C**: 2D-Histogramme, welche die Anzahl der detektierten Signale innerhalb eines Clusters gegen den Cluster-Durchmesser zeigen. Die unterschiedlichen Zelltypen sind farblich, die Häufigkeit als Helligkeit der Pixel kodiert. Unterschiede zwischen den Zellen des gesunden Spenders (AG11132) und den Krebszellen (Cal-51, SKBr3) sind klar ersichtlich. Die Unterschiede zwischen den beiden Krebszelllinien sind in dieser Darstellung kaum erkennbar. Aus [Kaufmann et al., 2011b].

hohe Proteindichte auf (höchste Dichte bei SKBr3-Zellen, kleinste bei AG11132-Zellen). d) Eine Mischung aus den Fällen a) bis c).

Um die Unterschiede der Proteinverteilungen zwischen den verschiedenen Zelllinien genauer zu verstehen, wurden die gleichen Distanzanalysen wie zuvor durchgeführt, jedoch nur für die Signale, die innerhalb von Clustern detektiert wurden. Abbildung 5.20B zeigt die Ergebnisse für die drei unterschiedlichen Zelllinien. Auch hier ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Distanzverteilungen der Her2/neu-Proteine innerhalb der Cluster auf den verschiedenen Zelllinien zu beobachten.



#### Abbildung 5.21:

Distanzanalysen von Her2/neu auf den verschiedenen Zelllinien bei unterschiedlicher Antikörpermarkierung. Links sind die Distanzanalysen für alle Distanzen zwischen den einzelnen Molekülpositionen gezeigt, rechts die Verteilungen der Abstände zum nächsten benachbarten Molekül. Die Häufigkeiten sind auf die jeweilige Gesamtzahl der Distanzen normiert. A und B zeigen die Distanzverteilungen für die extrazelluläre Markierung mit Alexa488, C und D mit Alexa568. In den Histogrammen in E und F sind die Ergebnisse für die intrazelluläre Markierung mit Alexa488 dargestellt.

Verbindet man diese Erkenntnis mit dem Ergebnis der Bestimmung der Cluster-Größe, welche gezeigt hat, dass es keine klaren Unterschiede bezüglich des Durchmessers der Cluster gibt, so ist die Folgerung, dass die Proteindichte innerhalb der Her2/neu-Cluster für die drei verschiedenen Zelltypen unterschiedlich ist. In den Clustern auf der Membran der Zellen von einem gesunden Spender (AG11132) ist die Proteindichte im Mittel am geringsten. Für die beiden Krebszelllinien ist sie höher. Im Falle von SKBr3, der Zelllinie mit dem hypertriploiden Chromosomensatz, ist die Dichte von Her2/neu-Proteinen innerhalb der Cluster höher als bei den Cal-51-Zellen, welche einen normalen Karyotyp aufweisen.

Eine Zusammenfassung der Distanzanalysen für die verschiedenen Antikörpermarkierungen von Her2/neu ist in Abbildung 5.21 gezeigt. Es werden jeweils die Verteilungen aller Distanzen bis zu 200 nm zwischen den einzelnen Molekülpositionen sowie die Verteilungen der Abstände zum nächsten benachbarten Molekül aufgeführt. Abbildung 5.21A,B stellt die Ergebnisse für die extrazelluläre Markierung mit Alexa488 für alle drei Zelllinien dar. Für die extrazelluläre Markierung mit Alexa488 (Abb. 5.21C,D) und die intrazelluläre Markierung mit Alexa488 (Abb. 5.21E,F) wurden die SPDM-Messungen nur für die beiden Krebszelllinien durchgeführt. Die Analysen der Nächsten-Nachbar-Distanzen spiegeln die Her2/neu-Verteilung innerhalb der Cluster wider. Diese Kontrollmessungen mit unterschiedlichen Antikörpern und verschiedenen Fluorophoren bestätigen die oben beschriebenen Ergebnisse für die Verteilung der Her2/neu-Proteine auf der Membran der drei verschiedenen Zelllinien.

In Abbildung 5.20C ist der Unterschied in der Proteindichte für die drei Zelllinien direkt in zweidimensionalen Histogrammen veranschaulicht. Hierbei ist die Anzahl der detektierten Signale innerhalb eines Clusters gegen den Cluster-Durchmesser aufgetragen. Die Zelltypen sind farblich kodiert, die Häufigkeit wird durch die Helligkeit der Pixel repräsentiert. In den beiden oberen Histogrammen ist die Verteilung für die Zellen des gesunden Spenders in grün, die für die Krebszellen in rot dargestellt. Vergleicht man hier die Anzahl von Her2/neu-Proteinen in einem Cluster auf einer Krebszelle mit dem auf einer Zelle des gesunden Spenders, so ist ersichtlich, dass sich eine höhere Anzahl von Her2/neu-Proteinen in einem Cluster auf einer Krebszelle Größe auf einer Zelle des gesunden Spenders be-finden. Der Unterschied zwischen den beiden Krebszelllinien ist in dieser Darstellung nicht zu erkennen.

Die Distanzanalysen der Her2/neu-Proteine auf der Zellmembran lassen eine Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen auf dem Einzelmolekülniveau zu. Kombiniert mit der Information über die Struktur/Größe der Cluster ist eine genaue Charakterisierung der Proteinverteilung auf der Membran der drei unterschiedlichen Zellinien möglich.

#### Kombination der Analysen auf dem Einzelmolekülniveau mit der Information über die globale Proteinmenge auf Zellniveau im Rahmen einer FACS-Analyse

Konventionelle Verfahren wie die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) erlauben unter einem hohen Durchsatz eine schnelle Bestimmung der relativen Anzahl von fluoreszenzmarkierten Proteinen in Zellen. Hierbei erhält man jedoch nur eine globale mittlere Anzahl von Proteinen in der gesamten Zelle. Analysen mit der Lokalisationsmikroskopie ermöglichen hingegen eine Bestimmung der Proteinverteilung auf dem Niveau einzelner Moleküle. Die lokale, sehr detaillierte Information über die Verteilung der einzelnen Proteine kann durch die Verbindung der beiden Methoden auf die gesamte Zelle extrapoliert werden. Zur Bestimmung der relativen Anzahlen der Her2/neu-Proteine auf den drei verschiedenen Zelltypen wurde hierzu von Dipl.-Biol. Benjamin Fiebiger<sup>1</sup> eine FACS-Analyse an den mit Alexa488 markierten Zellen durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse sind in Abbildung 5.22 und in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.



#### Abbildung 5.22:

**FACS-Analysen für Her2/neu.** Die Ergebnisse der FACS-Analysen für Her2/neu auf den drei unterschiedlichen Zelllinien sind in den Histogrammen dargestellt. Die grünen Verteilungen repräsentieren die Messungen der mit Alexa488 markierten Zellen, in rot sind die jeweiligen Negativ-kontrollen der ungefärbten Zellen gezeigt.

Zelllinie	Mittelwert der	geometrisches Mittel	Median der	
	Intensität [a.u.]	der Intensität [a.u.]	Intensität [a.u.]	
negativ Kontrollen				
AG11132	2,26	$2,\!20$	$2,\!23$	
Cal-51	$2,\!63$	2,52	$2,\!57$	
SKBr3	$2,\!90$	2,79	$2,\!61$	
Her2/neu EXR-Alexa488				
AG11132	$13,\!34$	$12,\!84$	$12,\!86$	
Cal-51	$21,\!10$	$19,\!64$	$20,\!35$	
SKBr3	33,40	31,70	33,08	

Zusammen mit den Daten der FACS-Analyse stehen nun verschiedene Parameter zur Charakterisierung der Verteilung der Her2/neu-Proteine auf den unterschiedlichen Zellen zur Verfügung. Für jede Zelllinie i wurden ermittelt:

 $N_{qes}^i$ : relative Gesamtzahl der Proteine in der Zelle.

 $D^i_{alle}$ : relative Anzahl von kleinen Distanzen in Bezug auf alle detektierten Moleküle.

 $D_{cl}^{i}$ : relative Anzahl der Distanzen von Molekülen in Clustern.

 $\rho_{cl}^{i}$ : Dichte der Cluster auf der Zellmembran.

Der Zusammenhang der einzelnen Messgrößen kann durch die folgende Gleichung ausgedrückt werden:

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Helmholtz Zentrum München

$$\frac{D_{cl}^{i}}{D_{cl}^{j}} \cdot \frac{\rho_{cl}^{i}}{\rho_{cl}^{j}} \cdot \frac{N_{ges}^{i}}{N_{ges}^{j}} = \frac{D_{alle}^{i}}{D_{alle}^{j}} \quad \Longleftrightarrow \quad \frac{\rho_{cl}^{i}}{\rho_{cl}^{j}} = \frac{\frac{D_{alle}^{i}}{D_{alle}^{j}}}{\frac{D_{cl}^{i}}{D_{cl}^{j}} \cdot \frac{N_{ges}^{i}}{N_{ges}^{j}}}$$

Da alle Messgrößen (abgesehen von der Cluster-Dichte) nur als relative Werte vorliegen, werden in der obigen Gleichung die jeweiligen Verhältnisse für die Zelllinie *i* und *j* betrachtet. Die Information der Her2/neu-Proteindichte innerhalb der Cluster  $D_{cl}$  wird kombiniert mit der Dichte der Cluster auf der Membran  $\rho_{cl}$  und der Gesamtzahl der Her2/neu-Proteine in der Zelle  $N_{ges}$ . Hieraus ergibt sich theoretisch die gleiche Information, wie aus der Analyse der Distanzverteilungen aller Her2/neu-Proteine  $D_{alle}$ , die in den SPDM-Messungen detektiert wurden. Da die Cluster-Dichte die Messgröße ist, die mit den größten Fehlern behaftet ist, wird die Gleichung umgeformt, so dass das Verhältnis der Cluster-Dichte aus den präziseren Messwerten berechnet und mit den tatsächlichen Messwerten verglichen werden kann.

Zelllinien	$\frac{D^i_{alle}}{D^j_{alle}}$	$\frac{D^i_{cl}}{D^j_{cl}}$	$\frac{N^i_{ges}}{N^j_{ges}}$	$rac{ ho_{cl}^{i}}{ ho_{cl}^{j}}$ berechnet	$rac{ ho_{cl}^{i}}{ ho_{cl}^{j}}$ gemessen
AG11132/Cal-51	$0{,}28\pm0{,}06$	$0{,}94\pm0{,}06$	$0,\!65\pm0,\!04$	$0{,}46\pm0{,}11$	$0{,}29\pm0{,}17$
AG11132/SKBr3	$0{,}23\pm0{,}06$	$0{,}85\pm0{,}06$	$0{,}41\pm0{,}03$	$0{,}58\pm0{,}18$	$0{,}47\pm0{,}32$
Cal-51/SKBr3	$0{,}81\pm0{,}03$	$0{,}91\pm0{,}06$	$0{,}62\pm0{,}02$	$1{,}44\pm0{,}12$	$1{,}63\pm0{,}90$

Die berechneten Werte für die Verhältnisse der Cluster-Dichten bestätigen die Messwerte aus den Analysen der Lokalisationsdaten. Für die Zellen des gesunden Spenders (AG11132) wurde im Vergleich die kleinste Dichte  $\rho_{cl}$  von Her2/neu-Clustern gemessen. Sie beträgt im Mittel  $0,30/\mu m^2$  mit einer Standardabweichung von  $0,15/\mu m^2$ . Interessanterweise ist die Cluster-Dichte auf den Cal-51-Zellen mit einem Mittelwert von  $1,04/\mu m^2$  und einer Standardabweichung von  $0,33/\mu m^2$  höher als die auf den SKBr3-Zellen, bei denen die Dichte der Her2/neu-Cluster im Mittel  $0,64/\mu m^2$  mit einer Standardabweichung von  $0,29/\mu m^2$  beträgt. Diese Tatsache ist in sofern bemerkenswert, da auf den SKBr3-Zellen insgesamt deutlich mehr Her2/neu-Proteine vorhanden sind. Eine erhöhte Dichte der Her2/neu-Cluster auf den Cal-51-Zellen könnte ein Hinweis darauf sein, weshalb diese Zelllinie krebsartig ist, obwohl sie keine Amplifikation des *Her2/neu*-Gens aufweist, wie es bei SKBr3 der Fall ist [Albanell und Baselga, 1999].

### 5.3.3 Zwei-Farben-3D-Lokalisationsmikroskopie von Her2/neu- und Her3-Protein-Clustern

Die bisher aufgeführten Lokalisationsmessungen haben sich alle auf die laterale Ebene beschränkt. Um mehr über die räumliche Anordnung der Protein-Cluster in allen drei Raumrichtungen zu erfahren, wurde durch die Verbindung von SPDM mit der SMI-Mikroskopie (s. Kapitel 2.3.3 und 4.6) eine Zwei-Farben-3D-Lokalisationsmessung von Her2/neu- und Her3-Clustern realisiert. Die hierfür verwendete Zelllinie war AG11132. Der Membranrezeptor Her2/neu wurde mit Alexa568 markiert, Her3 mit Alexa488. Alle anderen Schritte der Markierung entsprachen den oben aufgeführten Lokalisationsmessungen an Her2/neu-Proteinen.
## Aufnahmeprozedur

Die Aufnahmen zur dreidimensionalen Rekonstruktion der Protein-Cluster auf der Zellmembran wurden sequentiell durchgeführt. Nach den konventionellen Weitfeldfluoreszenzbildern wurden nacheinander jeweils eine Objekt-Rasterung sowie eine Phasen-Rasterung bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm und 488 nm aufgezeichnet. Nach den SMI-Aufnahmen fanden die SPDM-Messungen statt. Um zu verhindern, dass beide Fluorophortypen schon bei der ersten Messung aufgrund der hohen Laserintensitäten gebleicht werden, erfolgte zuerst die Messung bei 568 nm. Anschließend wurde die SPDM-Messung bei 488 nm durchgeführt. Die Anregungsintensitäten der beiden Laserwellenlängen entsprach denen für die oben aufgeführten 2D-Lokalisationsmessungen. Für die Aufnahmen bei den unterschiedlichen Anregungswellenlängen wurden jeweils die entsprechenden Sperrfilter verwendet (s. Kapitel 3.1.1).

## Laterale Korrektur der chromatischen und der mechanischen Verschiebung

Für die Bestimmung und Korrektur der mechanischen sowie der chromatischen Verschiebung zwischen den SPDM-Aufnahmen bei den Anregungswellenlängen von 568 nm und 488 nm, wurden 100 nm große fluoreszierende Beads (TetraSpeck<sup>1</sup>) als Referenzobjekte dem Präparat hinzugefügt. Da diese sich auf den Zellen und dem Deckglas ablagerten, befanden sie sich in derselben axialen Ebene, in der die Messungen durchgeführt wurden. Die SPDM-Messungen wurden mit zwei verschiedenen Varianten des Algorithmus SPDM ausgewertet (Details s. Kapitel 3.2.1). Die Methode, die auf dem Differenzdatenstapel basiert, lieferte die Signale der markierten Proteine, da auf diese Weise nur die Positionen der "blinkenden" Signale bestimmt werden. Die auf den Rohdaten basierende Methode ermöglicht zusätzlich die Positionsbestimmung der konstant bleichenden Beads, da hier die Positionen von allen Signalen im Datenstapel bestimmt werden, unabhängig von ihrem zeitlichen Verhalten. Aus diesen Informationen kann die mechanische und die chromatische Verschiebung zwischen beiden Lokalisationsbildern in der lateralen Ebene bestimmt und korrigiert werden.

# Bestimmung der axialen Informationen aus den SMI-Aufnahmen und chromatische Korrektur in axialer Richtung

Mithilfe des in Kapitel 4.6 vorgestellten Algorithmus **zrecon** wurden die axialen Positionen und Ausdehnungen der Protein-Cluster anhand der Phasen-Rasterungen für die beiden Anregungswellenlängen bestimmt. Aus den axialen Positionen der Beads kann die chromatische Verschiebung entlang dieser Richtung zwischen den Aufnahmen der beiden Wellenlängen bestimmt und korrigiert werden. Dafür wurden zunächst die Positionen der Beads über die Anpassung einer Gauß-Verteilung in axialer Richtung der Objekt-Rasterung bestimmt. In Abbildung 5.23A sind die axialen Positionen der Beads für die beiden Anregungswellenlängen eingetragen. Für die beiden Beads auf der rechten Seite des Bildes beträgt der axiale Versatz zwischen der Aufnahme bei 488 nm und der bei 568 nm ungefähr 60 nm. Betrachtet man den Bead links unten, so ist ein axialer Versatz von 80 nm zu verzeichnen. Diese Inhomogenität in der einen Richtung des Bildes ist auf eine nicht ganz symmetrische Ausrichtung des stehenden Wellenfeldes entlang der optischen Achse zurückzuführen. Für die kleine Region (s. Markierung in Abb. 5.23A), in der die 3D-Rekonstruktion durchgeführt wurde, kann ein homogener Versatz angenommen werden. Aus der Positionsbestimmung der Beads folgt eine Korrektur

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Invitrogen, Carlsbad, USA



## Abbildung 5.23:

**Bestimmung der axialen Position der Moleküle in den Protein-Clustern. A**: Lokalisationsbilder des mit der auf den Rohdaten basierten Methode des Algorithmus SPDM ausgewerteten Daten. Die Anzahl der detektierten Signale an den Positionen der Beads ist deutlich erhöht gegenüber den Signalen der Antikörpermarkierung. Im Bild ist der laterale Versatz zwischen der Aufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm (rot) zu der Aufnahme bei 488 nm (grün) zu erkennen. Zusätzlich sind den Beads ihre axialen Positionen zugeordnet. Hier wird die chromatische Verschiebung in axialer Richtung deutlich. B: Lokalisationsbild aufgenommen mit 488 nm Anregungslicht der Region, die in **A** markiert ist. Die axiale Position der einzelnen Moleküle ist farbkodiert. **C**: dieselbe Region wie in **B** aufgenommen bei 568 nm. Die Bilder in **B** und **C** sind bereits vollständig auf mechanische und chromatische Verschiebungen in allen drei Raumrichtungen korrigiert.

um +80 nm der axialen Molekülpositionen in der Aufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 568 nm.

Zur Überprüfung der axialen Positionen der Protein-Cluster, die mithilfe des Algorithmus **zrecon** aus der Phasen-Rasterung gewonnen wurden, erfolgte eine manuelle Überprüfung der Positionsinformation anhand der Objekt-Rasterung. Durch Anpassen einer Gauß-Verteilung entlang der axialen Richtung des Datenstapels wurden die Positionen der Cluster erneut bestimmt und mit denen aus der Phasen-Rasterung verglichen. Dadurch ist auch eine eindeutige Positionsbestimmung der Objekte möglich, die weiter voneinander entfernt sind und aufgrund der Phasensprünge im Phasenbild nicht die korrekte Position vom Algorithmus zugeordnet bekommen (Details s. Kapitel 4.6).

Abbildung 5.23B,C zeigt die Lokalisationsbilder mit farblich kodierten axialen Positionen für die Aufnahme mit 488 nm sowie 568 nm. Hierbei wurden bereits der chromatische und der mechanische Versatz in alle drei Raumrichtungen mit den oben beschriebenen Methoden korrigiert.

## Visualisierung der Zwei-Farben-3D-Information

Der in Kapitel 4.6 beschrieben Algorithmus phase3d wurde dazu verwendet, dreidimensionale Datenstapel für die Aufnahmen der beiden Wellenlängen zu generieren. Jeder Datenstapel

repräsentiert die Positionen der einzelnen detektierten Moleküle im Raum sowie die axiale Ausdehnung der Strukturen, auf denen sie sich befinden. Beide Datensätze wurden zu einem 3D-Bild zusammengefügt, so dass die Farbkodierung die jeweilige Anregungswellenlänge widerspiegelt.

Durch Kombination von SMI- und Lokalisationsmikroskopie war es möglich die Positionen der Protein-Cluster in allen drei Raumrichtungen mit einer mittleren Lokalisationsgenauigkeit von ca. 25 nm zu bestimmen. Dies erlaubt eine erste dreidimensionale Untersuchung der Verteilung von Her2/neu- und Her3-Proteinen auf der Membran einer Zelle. In Abbildung 5.24 ist eine Zwei-Farben-3D-SPDM-Messung von Her2/neu- und Her3-Clustern auf der Membran einer AG11132-Zelle gezeigt. Hierbei wurden die Her2/neu-Proteine mit Alexa568 und die Her3-Proteine mit Alexa488 über Antikörper markiert. Abbildung 5.24A spiegelt eine konventionelle Weitfeldfluoreszaufnahme einer dieser Zellen wider. Für die 3D-Rekonstruktion wurde ein kleiner Bereich auf der Membran der Zelle ausgewählt. Dieser ist im Bild durch einen Pfeil markiert und vergrößert in Abbildung 5.24B dargestellt. Daneben befindet sich das zugehörige 2D-Lokalisationsbild (Abb. 5.24C). Die 3D-Rekonstruktion aus der Kombination von SPDM-



## Abbildung 5.24:

**3D-Rekonstruktion einer Zwei-Farbenaufnahme von Her2/neu und Her3. A**: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild einer AG11132-Zelle. Her2/neu ist markiert mit Alexa568 (rot), Her3 mit Alexa488 (grün). **B**: vergrößerter Ausschnitt einer kleinen Region in **A** (s. Pfeil). **C**: 2D-Lokalisationsbild derselben Region wie in **B**. **D** und **E** zeigen eine 3D-Rekonstruktion der Protein-Cluster, die durch die Kombination von SPDM mit SMI-Mikroskopie (s. Kapitel 4.6) erreicht wurde. Die Lokalisationsgenauigkeit in allen drei Raumrichtungen beträgt ca. 25 nm. Der Maßstab in **D** und **E** ist 500 nm in x-, y- und z-Richtung. Aus [Kaufmann et al., 2011b]. und SMI-Messung ist in Abbildung 5.24D,E gezeigt. Hier ist die räumliche Anordnung der unterschiedlichen Protein-Cluster auf der Zellmembran mit einer Genauigkeit von weniger als 25 nm zu beobachten.

Im Vergleich zu dem 2D-Lokalisationsbild werden einige Signale in der 3D-Rekonstruktion nicht wiedergegeben. Dies liegt einerseits daran, dass Signale mit einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis, deren axiale Position oder Ausdehnung nicht eindeutig bestimmt werden kann, nicht in der 3D-Rekonstruktion dargestellt werden. Andererseits ist die Lokalisationsmikroskopie sensitiver für einzelne Moleküle als die konventionelle Weitfeldfluoreszenzmikroskopie, auf deren Basis die SMI-Aufnahmen durchgeführt werden. Signale, die hier nicht detektiert werden, fehlen somit auch in der 3D-Rekonstruktion.

Die Zwei-Farben-3D-Lokalisationsaufnahme von Her2/neu- und Her3-Protein-Clustern ermöglicht einen ersten Einblick in deren räumliche Anordnung auf der Plasmamembran der Zellen mit einer bisher unerreichten Strukturauflösung.

## 5.4 Strukturanalyse von Tight Junction-Netzwerken anhand von Claudin-Proteinen

Tight Junctions halten benachbarte Zellen des Epithelgewebes zusammen und formen eine Diffusionsbarriere für den parazellulären Transport von Molekülen und Ionen. Abbildung 5.25 zeigt eine schematische Darstellung von Tight Junctions zwischen zwei benachbarten Zellen. Zu ihren Funktionen gehören unter anderem das Aufrechterhalten der Polarität von Zellen sowie der Blut-Hirn-Schranke.



## Abbildung 5.25:

Strukturmodell der Tight Junctions. Proteine in der äußeren Plasmamembranschicht halten die beiden benachbarten Zellen zusammen. Auf diese Weise wird der Raum zwischen ihnen so abgedichtet, dass keine Moleküle hindurch diffundieren können. Aus [Alberts et al., 1995].

Mithilfe der Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Tight Junctions aus Proteinkomplexen unterschiedlicher Membranproteine zusammengesetzt sind [Staehelin, 1974]. Die wichtigsten stellen die Transmembranproteine aus der Familie der Claudine dar, welche das Polymerrückgrat der Tight Junctions bilden [Morita et al., 1999, Piontek et al., 2008]. Die verschiedenen Claudin-Subtypen unterscheiden sich in ihrer Verteilung und der von ihnen geformten Netzwerkstruktur auf der Zellmembran sowie ihren Funktionen innerhalb der Tight Junctions [Krause et al., 2008]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine Claudin-3 und Claudin-5 zählen beide zu den Barriere-bildenden Subtypen.

Um die regulierende Funktion der Tight Junctions besser verstehen zu können, ist die Untersuchung ihrer Morphologie von großer Relevanz. Im Folgenden wird eine auf der Lokalisationsmikroskopie basierende quantitative Analyse der von Claudin-3 und Claudin-5 gebildeten Netzwerkstrukturen gezeigt. Diese liefert einen detaillierteren Einblick in den Aufbau von Tight Junctions als es bisher möglich war.

## 5.4.1 Präparation der Proben

Die Lokalisationsmessungen wurden an HEK293-Zellen durchgeführt, welche stabil transfiziert waren mit mausspezifischem Claudin-3-YFP bzw. Claudin-5-YFP (weitere Details s. [Piontek et al., 2008]). Die Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)<sup>1</sup> mit 10% FCS (Fetales Kälberserum), 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 mg/ml G418<sup>2</sup> und 1% L-Alanyl-L-Glutamin<sup>1</sup> kultiviert. Sie wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesät und drei Tage später fixiert durch Inkubation mit 2,4% Paraformaldehyd, 100 mM Na-Cacodylat, 100 mM Saccharose und pH 7,5 für 10 min. Zur Unterdrückung

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Invitrogen, Carlsbad, USA

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Calbiochem, La Jolla, USA

der Autofluoreszenz wurden die Zellen für 20 min in PBS mit 0,1 M Glycin gegeben. Danach wurden sie mit PBS gewaschen, für 10 min in PBS mit 1% BSA (Rinderserumalbumin) inkubiert und anschließend in Immumount<sup>1</sup> eingebettet. Die Herstellung der Präparate wurde im Labor von Dr. Jörg Piontek<sup>2</sup> durchgeführt.

## 5.4.2 Lokalisationsmessungen und Strukturanalyse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der SPDM-Messungen an den YFP-markierten Claudin-3und Claudin-5-Proteinen vorgestellt. Der Schwerpunkt der Datenanalyse lag bei der genaueren Untersuchung der Maschen in den Tight Junction-Netzwerken zwischen den einzelnen Zellen und dem Vergleich der beiden Claudin-Typen.



## Abbildung 5.26:

Tight Junction-Netzwerk von Claudin-3. A: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild von YFPmarkierten Claudin-3-Proteinen in HEK293-Zellen. B: Lokalisationsbild der Region markiert in A. Mehr als 450.000 Moleküle wurden mit einer mittleren Lokalisationsgenauigkeit von ca. 20 nm detektiert. Der mittlere Abstand zum nächsten benachbarten Molekül beträgt ca. 10 nm. Die Strukturauflösung liegt folglich bei ca. 48 nm. D und E zeigen ein vergrößertes Bild der markierten Region in B. C repräsentiert die gleiche Region, jedoch aus dem konventionellen Weitfeldfluoreszenzbild. In E sind die Maschenstrukturen, die von dem Algorithmus maschenana identifiziert wurden, weiß gekennzeichnet. Aus [Kaufmann et al., 2011c].

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Thermo Scientific, Pittsburg, USA

 $<sup>^2 {\</sup>rm Leibniz\mathchar}$ Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin



## Abbildung 5.27:

**Tight Junction-Netzwerk von Claudin-5. A**: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild von YFPmarkierten Claudin-5-Proteinen in HEK293-Zellen. **B**: Lokalisationsbild der Region markiert in **A**. Mehr als 260.000 Moleküle wurden mit einer mittleren Lokalisationsgenauigkeit von ca. 21 nm detektiert. Der mittlere Abstand zum nächsten benachbarten Molekül beträgt ca. 7 nm. Die Strukturauflösung liegt folglich bei ca. 50 nm. **D** und **E** zeigen ein vergrößertes Bild der markierten Region in **B**. **C** repräsentiert die gleiche Region, jedoch aus dem konventionellen Weitfeldfluoreszenzbild. In **E** sind die Maschenstrukturen, die von dem Algorithmus maschenana identifiziert wurden, weiß gekennzeichnet. Aus [Kaufmann et al., 2011c].

#### Parameter der Lokalisationsmessungen

Für die SPDM-Messungen wurde ein Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm bei einer Anregungsintensität von ca. 7 kW/cm<sup>2</sup> benutzt. Für die Aufnahmen wurde eine Integrationszeit der Kamera von 55 ms verwendet und jeweils 8000 Einzelbilder aufgenommen.

Die ausgewählten Regionen für die Lokalisationsmessungen betrugen ca. 30 µm × 30 µm. Im Fall von Claudin-3 lag die Fläche, die von dem Tight Junction-Netzwerk überspannt wurde, im Bereich von 200-400 µm<sup>2</sup>. Bei den SPDM-Messungen wurden in diesen Netzwerken jeweils  $4.5 \times 10^5$  bis  $1.1 \times 10^6$  einzelne Moleküle detektiert. Die Tight Junction-Netzwerke, die von Claudin-5 gebildet waren, nahmen weniger Fläche ein (im Bereich von ca. 100 µm<sup>2</sup>). Sie wiesen im Vergleich zu den Messungen an Claudin-3 eine größere Ausdehnung in eine Raumrichtung auf (vergl. Abb. 5.26 und 5.27). Bei den Lokalisationsmessungen wurden jeweils  $2.2 \times 10^5$  bis  $2.9 \times 10^5$  Einzelmolekülsignale in einer Netzwerkstruktur detektiert.

Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit der SPDM-Messungen lag bei ca. 21 nm. Der Medi-

an der Abstände zur nächsten benachbarten Molekülposition lag bei etwa 10 nm. Aufgrund der hohen Dichte von detektierten Molekülen ist die mittlere effektive optische Auflösung (Strukturauflösung) nur durch die Lokalisationsgenauigkeit begrenzt und liegt bei ca. 50 nm. Zur Darstellung der Lokalisationsbilder wurde der in Kapitel 4.1.1 beschriebene Algorithmus Orte2NN4Bild verwendet.

#### Durchmessers der Maschenstrukturen von Claudin-3 und Claudin-5

Zur Untersuchung der Maschenstrukturen der Tight Junction-Netzwerke wurde der in Kapitel 4.4 vorgestellte Algorithmus maschenana verwendet. Für die Analysen wurden zwei Aufnahmen der Präparate mit Claudin-3 und drei Aufnahmen der Präparate mit Claudin-5 ausgewertet, was 888 charakterisierten Maschen für Claudin-3 und 462 charakterisierte Maschen für Claudin-5 entsprach.



## Abbildung 5.28:

**Durchmesser der Maschenstrukturen von Claudin-3 und Claudin-5.** A: Bestimmung der Maschengröße von Claudin-3-Tight Junction-Netzwerken. Das Histogramm über die Durchmesser zeigt zwei sich überlappende Verteilungen: eine bei sehr kleinen Werten ( $\sim$ 100 nm) und eine weitere bei einem Durchmesser von ca. 360 nm. B: Ergebnisse der Messungen für Claudin-5. Auch hier sind zwei Verteilungen ( $\sim$ 60 nm und  $\sim$ 480 nm) zu beobachten. An beide Datensätze wurde die Summe zweier Gauß-Funktionen angepasst (Fit-Ergebnisse dargestellt in orange). Aus [Kaufmann et al., 2011c].

Die Analyse der Maschengröße brachte leicht unterschiedliche Ergebnisse für die beiden Typen von Claudin-Proteinen hervor. Die Histogramme in Abbildung 5.28 zeigen sowohl für Claudin-3 als auch für Claudin-5 zwei unterschiedliche überlagerte Verteilungen. In beiden Fällen wurde die Summe zweier Gauß-Funktionen an die Daten angepasst. Bei Claudin-3 ergab sich hieraus eine Verteilung bei einem Mittelwert von  $(105 \pm 6)$  nm und eine weitere bei  $(364 \pm 26)$  nm. Die Verteilung der Durchmesser der von Claudin-5 geformten Maschenstrukturen sind deutlicher voneinander getrennt als im Fall von Claudin-3. Hier ergab die Anpassung von zwei Gauß-Funktionen eine Verteilung bei einem Mittelwert von  $(61 \pm 34)$  nm und eine

#### bei (482 $\pm$ 15) nm.

Die Ungenauigkeit bei der Bestimmung des Mittelwerts der Verteilung von kleinen Maschen bei Claudin-3, rührt daher, dass hier anzunehmen ist, dass die Mehrheit der Strukturen kleiner ist als die, die aufgenommen und untersucht werden können, da die Strukturauflösung der SPDM-Messungen bei ca. 50 nm liegt.

Der Unterschied zwischen den Verteilungen der Durchmesser der Maschenstrukturen zeigt, dass im Fall von Claudin-5 verhältnismäßig mehr kleine Maschen mit einem Durchmesser kleiner als 100 nm und mehr große Maschen mit einem Durchmesser größer als 500 nm in den Tight Junctions vorhanden sind als bei denen geformt von Claudin-3.



#### Abbildung 5.29:

Feret-Durchmesser der Maschenstrukturen. In den Histogrammen ist das Verhältnis von minimalem Durchmesser einer Masche zu dem dazu maximalen senkrechten Durchmesser aufgetragen. Beide Claudin-Typen zeigen eine ähnliche Verteilung mit einem Maximum bei einem Wert von ca. 0,7. Die Häufigkeit ist auf die jeweilige Gesamtzahl von Maschen normiert. Aus [Kaufmann et al., 2011c].

Betrachtet man das Verhältnis von minimalem Durchmesser einer Masche zu dem dazu senkrechten maximalen Durchmesser (Feret-Durchmesser), so fällt zunächst auf, dass hier keine großen Unterschiede zwischen Claudin-3 und Claudin-5 vorliegen. Die zugehörigen Histogramme in Abbildung 5.29 zeigen jedoch, dass beide Verteilungen ein Maximum bei einem Verhältnis von ca. 0,7 aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass die Mehrheit der Maschen nicht kreisförmig ist, sondern eine größere Ausdehnung in einer Richtung besitzt.

## Proteindichte auf den Strängen und innerhalb der Maschen

Mithilfe des Algorithmus maschenana wurde sowohl die Moleküldichte auf den Strängen der Maschen als auch die Dichte in deren Inneren bestimmt. Die Lokalisationsmikroskopie liefert aufgrund der begrenzten Detektionseffizienz keine absoluten Angaben bezüglich der Anzahl der Proteine, die sich tatsächlich in einer biologischen Struktur befinden. Die Anzahl der detektierten Moleküle kann jedoch für relative Vergleiche zwischen unterschiedlichen Messungen genutzt werden.

Die Histogramme in Abbildung 5.30C zeigen die Proteindichte auf den Strängen der analysierten Maschenstrukturen. Sowohl die Verteilung bei Claudin-3 als auch die bei Claudin-5 weist eine mittlere Moleküldichte von ca. 3730 Molekülen/ $\mu$ m<sup>2</sup> auf. Die Verteilung der Moleküldichte auf den Strängen bei Claudin-5 ist leicht verbreitert gegenüber der bei Claudin-3. Da deutlich weniger Maschen von Claudin-5 als Claudin-3 analysiert wurden, liegt dieser Unterschied jedoch im Rahmen dessen, was man statistisch als Erhöhung der Standardabweichung erwarten würde. Neben der Moleküldichte auf den Strängen der Maschenstrukturen, wurde auch die Dichte detektierter Moleküle innerhalb der Maschen bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Histogrammen in Abbildung 5.30D dargestellt. Auch hier sind keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Claudin-Typen zu erkennen. Im Inneren vieler Maschen (insbesondere sehr kleiner Maschen) wurden keine Moleküle detektiert. Diese sind in der Darstellung in Abbildung 5.30D nicht berücksichtigt.

In Abbildung 5.31 ist die Proteindichte in den Tight Junction-Netzwerken von Claudin-3 und Claudin-5 nach der in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Methode über eine Farbkodierung visualisiert.



## Abbildung 5.30:

**Proteindichte auf den Strängen und innerhalb der Maschen. A** und **B**: Lokalisationsbilder von Claudin-3 (A) und Claudin-5 (B) überlagert mit den Einzelmolekülpositionen, die durch rote Kreuze dargestellt sind. **C**: Histogramme über die Dichte detektierter Moleküle auf den Strängen der Maschenstrukturen (orange Pfeile in **A**,**B**). Claudin-3 und Claudin-5 zeigen ähnliche Verteilungen mit Mittelwerten von ca. 3730 Molekülen/ $\mu$ m<sup>2</sup>. Die Standardabweichung bei Claudin-3 beträgt 760 Moleküle/ $\mu$ m<sup>2</sup>. Die Verteilung bei Claudin-5 ist mit einer Standardabweichung von 900 Molekülen/ $\mu$ m<sup>2</sup> etwas breiter. **D**: Histogramm über die Dichte der Moleküle, die innerhalb einer Masche detektiert wurden (grüne Pfeile in **A**,**B**). Auch hier sind die Verteilungen ähnlich für die beiden Claudin-Typen (Mittelwert: ca. 780 Moleküle/ $\mu$ m<sup>2</sup>). Die Maschen, bei denen keine Moleküle im Inneren detektiert wurden, sind in den Histogrammen in **D** nicht berücksichtigt. Aus [Kaufmann et al., 2011c].



## Abbildung 5.31:

Visualisierung der Proteindichte in den Tight Junction-Netzwerken von Claudin-3 und Claudin-5. A: Lokalisationsbild mit Farbkodierung der lokalen Dichte der detektierten YFP-Moleküle eines Claudin-3-Netzwerks. Die lokale Dichte wurde in einem Radius von 50 nm um jede Molekülposition bestimmt. Der dynamische Bereich der Farbdarstellung wurde zwischen 0 und 3700 Molekülen/ $\mu$ m<sup>2</sup> gewählt. B: vergrößerten Ausschnitt des markierten Bereichs in A. C und D: analoge Darstellung der lokalen Proteindichte für Claudin-5. Aus [Kaufmann et al., 2011c].

## 5.5 Analyse von Splicing-Faktoren CELF1 im Bezug auf den transkribierten DNA-Strang

Der erste Schritt der Proteinbiosynthese besteht in der Transkription einer bestimmten Gensequenz der DNA (Desoxyribonukleinsäure) in mRNA (Messenger-RNA). Dies erfolgt durch die RNA-Polymerase II. Bevor die mRNA bei der Translation in ein Protein übersetzt wird, finden noch weitere Prozesse (die sog. "mRNA-Reifung") im Zellkern statt. Einer dieser Prozesse ist das "Splicing" der mRNA. Hierbei werden nicht kodierende Abschnitte (Introns) aus dem RNA-Strang entfernt. Ein Protein, das vor allem beim alternativen Splicing (unterschiedliches Verbinden der kodierende Gensequenzen in der mRNA) eine wichtige Rolle spielt, ist der Splicing-Faktor CELF1 (CUG-BP1) [Wang et al., 2007].



## Abbildung 5.32:

**Transkription der DNA.** Links ist schematisch die RNA-Polymerase II abgebildet, welche den Doppelstrang der DNA abliest und ein RNA-Transkript erstellt. Im rechten Bild ist der wachsende RNA-Strang in der Transkriptionsrichtung gezeigt. Die Einzelstrang-RNA faltet sich zu einer kompakteren Sekundärstruktur. Mod. nach [Alberts et al., 1995].

Da sich die Splicing-Faktoren CELF1 um den RNA-Strang anordnen, dienten sie für die im Folgenden vorgestellten Lokalisationsmessungen und Analysen zur Distanzbestimmung der RNA zum abgelesenen DNA-Strang. Aus der deutlich verkürzten Entfernung der Splicing-Faktoren im Vergleich zur Länge des entsprechenden abgelesenen DNA-Strangs wird ein Einblick in die Faltung des RNA-Strangs ermöglicht.

Die Messungen wurden an Lampenbürstenchromosomen eines Wassermolchs (*Notophthalmus viridescens*) durchgeführt. Diese eigenen sich in besonderer Weise zur Untersuchung der Transkription der DNA, da die aktiven Bereiche als große Schlaufen aus dem kondensierten Bereich entlang der Chromosomenachse hinausragen.

## 5.5.1 Präparation der Proben

Die Herstellung der Präparate wurde im Labor von Prof. Joseph G. Gall<sup>1</sup> durchgeführt. Detaillierte Anweisungen zur Präparation von Lampenbürstenchromosomen finden sich in [Gall et al., 1991, Gall, 1998]. Durch eine Immunfärbung wurden RNA-Polymerase II mit Alexa488

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Carnegie Institution, Baltimore, USA

und CELF1-Splicing-Faktoren mit Alexa 594 fluoreszent markiert. Für die Mikroskopie<br/>aufnahmen wurden die Präparate in das Einbettmedium Prolong<br/>Gold<sup>1</sup> eingebettet.



## Abbildung 5.33:

**Lampenbürstenchromosomen.** Konfokale Aufnahme<sup>2</sup> (J. Gall) von Alexa594-markierten CELF1-Splicing-Faktoren (rot) und Alexa488-markierter RNA-Polymerase II (grün) an Lampenbürstenchromosomen eines Wassermolchs (*Notophthalmus viridescens*).

## 5.5.2 Distanz- und Cluster-Analyse der Zwei-Farben-Lokalisationsmessungen

Im Folgenden werden lokalisationsmikroskopische Analysen der Splicing-Faktoren CELF1 vorgestellt. Hierbei wurde neben der Cluster-Bildung dieser Proteine vor allem deren Abstand zu dem transkribierten DNA-Strang untersucht, um genauere Erkenntnisse über die Faltung der RNA zu erlangen.

## Parameter der Lokalisationsmessungen

Die Lokalisationsmessungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm für die Aufnahmen von Alexa<br/>488 und 568 nm für Alexa 594 durchgeführt. Im Fall von Alexa<br/>488 wurde eine Laserintensität im Bereich von 15-20 kW/cm² im Objektra<br/>um verwendet. Bei einer Integrationszeit von 150 ms der Kamera wurden jeweils 1000 Einzel<br/>bilder aufgenommen. Die An-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Invitrogen, Carlsbad, USA

 $<sup>^{2}\</sup>mbox{Leica TCS SP2},$  NA=1,4 63x-Objektiv, Leica Microsystems, Heidelberg



## Abbildung 5.34:

**CELF1-Splicing-Faktoren auf Lampenbürstenchromosomen. A**: konfokale Aufnahme (Ausschnitt aus markiertem Bereich in Abb. 5.33) von Alexa594-markierten CELF1-Splicing-Faktoren (rot) und Alexa488-markierter RNA-Polymerase II (grün). **B**: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild derselben Struktur wie in **A**. In **C** ist die entsprechende SPDM-Aufnahme gezeigt. In **D-F** sind vergrößerte Ausschnitte der jeweils darüber liegenden Bilder dargestellt. Die deutlich erhöhte Strukturauflösung im Bereich von 60 nm der Lokalisationsaufnahme (**C**,**F**) gegenüber den konventionellen Verfahren ist klar erkennbar.

regungsintensität für Alexa 594 betrug 20-30 kW/cm<sup>2</sup>. Hier wurden für eine SPDM-Messung 2000 Einzelbilder bei einer Integrationszeit von ebenfalls 150 ms aufgezeichnet. Mit diesen Einstellungen war es möglich, bei den Lokalisationsaufnahmen eine Strukturauflösung zwischen 30 und 70 nm zu erreichen.

Die chromatische Verschiebung zwischen den detektierten Signalen der unterschiedlichen Fluorophore wurde sowohl in den Lokalisationsbildern als auch in den Weitfeldfluoreszenzaufnahmen global über eine Autokorrelation der beiden verschiedenfarbigen Bildern korrigiert. Da die Verschiebung nicht homogen im gesamten Bereich der Aufnahme ist, kann dies zu Fehlern bei den individuellen Molekülpositionen führen. Eine Kontrollmessung mit Beads, welche in beiden Wellenlängenbereichen fluoreszieren, hat jedoch gezeigt, dass der Fehler hierbei in lateraler Richtung deutlich kleiner ist (im Bereich von 10 nm) als die Strukturauflösung, die bei den SPDM-Aufnahmen erreicht wurde. Aus diesem Grund wurde die aus den globalen chromatischen Korrekturen resultierende Ungenauigkeit für die weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

#### Distanzanalyse von CELF1 entlang des DNA-Strangs anhand einer Messung

Mithilfe des in Kapitel 4.5 vorgestellten Algorithmus CELFana wurden die Zwei-Farben-SPDM-Messungen an den oben beschriebenen Präparaten analysiert. Als Startpunkt wurde die Stelle



#### Abbildung 5.35:

der CELF1-Splicing-Faktoren zum DNA-Strang. A: Zwei-Farben-Distanzmessung Lokalisationsbild der CELF1-Splicing-Faktoren (rot) und RNA-Polymerase II (grün), die um den DNA-Strang angelagert ist. Die weiße Linie repräsentiert den Polygonzug, der entlang der RNA-Polymerase II angepasst wurde, die beiden Kreuze Start- und Endpunkt. B: Visualisierung des Ergebnis der Cluster-Identifikation (orange) mit dem Algorithmus clusters\_v3. Die grüne Linie zeigt den Polygonzug, zu dem die Distanzen der Cluster bestimmt wurden. C: konventionelles Weitfeldfluoreszenzbild desselben Ausschnitts wie in A. Der Polygonzug ist in weiß, das Ergebnis des Kantenfilters zur Bestimmung der Entfernung der CELF1-Splicing-Faktoren vom DNA-Strang ist in blau eingezeichnet. D: Distanzanalyse mithilfe des Algorithmus CELFana der Daten der SPDM-Messung aus A,B. Es sind die Distanzen der einzelnen Molekülpositionen (grau) bzw. die Positionen der CELF1-Cluster (orange) gegen die relative Distanz entlang des DNA-Strangs aufgetragen. Es wurde jeweils über die Werte in einem Intervall von 500 nm auf der Abszisse gemittelt. Die Fehlerbalken stellen die Fehler der Mittelwerte dar. E: Distanzanalyse anhand des entsprechenden Weitfeldfluoreszenzbildes (C) mit dem Algorithmus CELFana\_wf mit Mittelung der Werte in einem Intervall von 1 µm. Hier ist deutlich der Unterschied zu den Ergebnissen der Lokalisationsmessung erkennbar (man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinatenachse).

auf dem DNA-Strang gewählt, an der sich der Ausgangspunkt der Transkription befindet. In Abbildung 5.35 ist die Vorgehensweise der Distanzanalyse und deren Ergebnisse exemplarisch anhand einer der Aufnahmen gezeigt. Es wurden die Distanzen der einzelnen CELF1-Moleküle zum DNA-Strang sowie die Distanzen der CELF1-Cluster zum DNA-Strang in Abhängigkeit von der relativen Position entlang des Strangs bestimmt. Abbildung 5.35D zeigt, dass beide Analysen einen sehr ähnlichen Verlauf der Abstände der Splicing-Faktoren zum DNA-Strang aufweisen. Da bei den Distanzmessungen, basierend auf den einzelnen Molekülen, deutlich mehr Messwerte vorliegen, ist hier die Varianz kleiner. Abbildung 5.35E zeigt das Ergebnis der Distanzanalyse, basierend auf den Daten einer konventionellen Weitfeldfluoreszenzaufnahme derselben Struktur. Der Vergleich mit den Daten der SPDM-Messungen verdeutlicht den Unterschied im Bezug auf die Präzision der Distanzanalysen.

## Distanzanalyse von CELF1 entlang des DNA-Strangs basierend auf den Daten von mehreren SPDM-Messungen

Für die folgenden Analysen wurden die Ergebnisse der Distanzanalysen von acht SPDM-Messungen zusammengefasst, um Schwankungen in den einzelnen Messungen auszugleichen. In Abbildung 5.36 sind die Distanzen der einzelnen CELF1-Moleküle sowie der Cluster-Positionen gegen die relative Distanz entlang des DNA-Strangs aufgetragen. Die beiden Verläufe der Datenpunkte sind sehr ähnlich und zeigen, dass die Distanz der Splicing-Faktoren zum DNA-Strang um ein Vielfaches kürzer ist als die Länge des transkribierten DNA-Strangs. Hieraus kann gefolgert werden, dass die mRNA stark gefaltet sein muss. Das Verhältnis von Stranglänge und gemessener Distanz kann Aufschluss über die Art der RNA-Faltung geben.



#### Abbildung 5.36:

**Distanz der CELF1-Splicing-Faktoren zum DNA-Strang. A**: die Distanzen der einzelnen CELF1-Moleküle zum DNA-Strang sind gegen die relativen Positionen entlang des Strangs aufgetragen. Es wurde jeweils über die Werte in einem Intervall von 500 nm auf der Abszisse gemittelt. Die Fehlerbalken stellen die Fehler der Mittelwerte dar. An die Daten wurden zwei verschiedene Modellfunktionen des Typs  $c + \beta \cdot N^{\alpha}$  angepasst. **B**: analog zu **A** sind hier die Distanzen der CELF1-Cluster zum DNA-Strang dargestellt. Die Mittelung erfolgte in einem Intervall von 600 nm. Es wurde ebenfalls eine Anpassung zweier Modellfunktionen desselben Typs durchgeführt.

In [Fang et al., 2011] wird ein Modell für die Faltung von Einzelstrang-RNA (ssRNA, singlestranded RNA) beschrieben. Als ein Maß für die Ausdehnung der Sekundärstruktur von ssRNA wird hier die von [Bundschuh und Hwa, 2002] eingeführte "Ladder-Distance" verwendet. Diese gibt die Zahl der Basenpaare an, die sich entlang des kürzesten Pfades von der Base *i* zur Base *j* befinden. Um die Größe der Sekundärstruktur zu beschreiben, wird für alle Kombinationen von *i* und *j* die maximale "Ladder-Distance" (MLD) bestimmt. In [Fang et al., 2011] wird eine mittlere MLD  $\bar{\zeta}$  für eine Reihe von RNA-Sequenzen gleicher Länge *N* und Zusammensetzung der Basen eingeführt. Basierend auf Daten von Simulationen konnten sie zeigen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen  $\ln \bar{\zeta}$  und  $\ln N$  besteht, woraus folgt:  $\bar{\zeta} \sim N^{\alpha}$ . Aus den Simulationen von [Fang et al., 2011] ergab sich für  $\alpha$  ein Wert von ca. 0,7.

Ausgehend von diesen Ergebnissen theoretischer Modelle für die Faltung von ssRNA wurde an die Daten der oben beschriebenen Messungen eine Modellfunktion der Form  $c + \beta \cdot N^{\alpha}$ angepasst. Um einen linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Abstands der CELF1-Moleküle zum DNA-Strang und dem Logarithmus der Länge des transkribierten DNA-Strangs zu erhalten, müsste c = 0 und  $\beta = 1$  sein. Aus diesem Grund wurde eine zweite Modellfunktion an die Daten angepasst, bei welcher  $\beta = 1$  gesetzt wurde. Da eine bestimmte Distanz zwischen DNA-Strang und dem gefalteten RNA-Strang liegt und auch die Strukturauflösung der Lokalisationsaufnahmen auf ca. 50 nm begrenzt ist, wurde der Wert von cnicht auf 0 festgehalten.

Beide Modellfunktionen beschreiben sowohl die Daten der Distanzanalysen basierend auf den einzelnen Molekülpositionen als auch diejenigen der CELF1-Cluster sehr gut. Für den Parameter  $\alpha$ , ergibt sich ein Wert von ca. 0,5. Dieser ist somit etwas kleiner als der aus den theoretischen Simulationen von [Fang et al., 2011].

## Cluster-Analyse der CELF1-Proteine entlang des DNA-Strangs

Verbindet man die oben aufgeführten Distanzanalysen mit einer Cluster-Analyse der CELF1-Proteine (analog zu den in Kapitel 5.3 gezeigten Messungen), so kann nicht nur Information über deren Anordnung in dem RNA-Strang gewonnen werden, sondern auch eine Abhängigkeit von der relativen Position entlang des DNA-Strangs untersucht werden.

Abbildung 5.38 zeigt zunächst zwei Parameter der zusammengefassten Ergebnisse der Cluster-Analysen unabhängig von ihrer relativen Position entlang des DNA-Strangs. Die beiden Histogramme ermöglichen eine "globale" Charakterisierung der CELF1-Cluster.

Die Auftragung verschiedener Parameter der Cluster gegen ihre Position entlang des DNA-Strangs lässt eine direkte Einschätzung ihrer Abhängigkeit von der Distanz vom Startpunkt der Transkription zu. Die Resultate der Cluster- und Distanzanalysen der SPDM-Messungen von CELF1 (s. Abb. 5.37) zeigen keinen klaren Zusammenhang der Cluster-Eigenschaften und ihrer jeweiligen Position entlang des DNA-Strangs.



#### Abbildung 5.37:

**Cluster-Eigenschaften in Abhängigkeit von der relativen Position entlang des DNA-Strangs. A**: die Cluster-Größe ist als Anzahl der detektierten Signale pro Cluster gegen die relative Position des jeweiligen Clusters entlang des DNA-Strangs aufgetragen. Darstellung der Cluster-Durchmesser (**B**) und der Dichte von detektierten Molekülen innerhalb der Cluster (**C**) in Abhängigkeit von der Distanz entlang des DNA-Strangs. **D**: Auftragung der Distanzen zu den nächsten benachbarten Clustern gegen die relative Position entlang des DNA-Strangs. Es wurde jeweils über die Werte in einem Intervall von 500 nm auf der Abszisse gemittelt. Die Fehlerbalken stellen die Fehler der Mittelwerte dar. In keinem Fall konnte eine klare Abhängigkeit der untersuchten Cluster-Eigenschaft von der relativen Position der Cluster entlang des DNA-Strangs festgestellt werden.



#### Abbildung 5.38:

**Histogramme der Cluster-Größe. A**: Histogramm über die Anzahl von detektierten Molekülen pro Cluster. Das Maximum der Verteilung liegt bei 3 Molekülen/Cluster, der Mittelwert bei 18 Molekülen/Cluster. **B**: Histogramm über den Cluster-Durchmesser. Der Mittelwert der Verteilung beträgt 74 nm mit einer Standardabweichung von 53 nm. Das Maximum liegt bei ca. 40 nm.

# 6 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

## 6.1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue Methoden zur quantitativen Analyse von Lokalisationsdaten entwickelt, in MATLAB implementiert und auf aktuelle biologische Fragestellungen angewandt.

Ein Bestandteil waren hierbei Methoden zur reinen Visualisierung von Lokalisationsdaten, welche die lokale Punktdichte, basierend auf den Nächsten-Nachbarn-Distanzen, für die Darstellung nutzen, zu entwickeln. Auf diese Weise können Lokalisationsbilder erstellt werden, welche sowohl die Strukturauflösung korrekt widerspiegeln als auch, im Bezug auf die Art der Darstellung, konventionellen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen entsprechen.

Der Schwerpunkt lag bei der Etablierung von Algorithmen für weiterführende statistische Analysen, um mehr Informationen aus den in einer Messung der Lokalisationsmikroskopie gewonnen Daten zu extrahieren. Grundlegende Voraussetzung ist hierbei zunächst die Bestimmung und Korrektur des lateralen mechanischen Drifts, der während einer Messung auftreten kann. Hierfür wurden Algorithmen entwickelt, welche entweder anhand von Referenzobjekten, oder der biologischen Struktur selbst, den Versatz der Einzelmolekülpositionen bestimmen und korrigieren. Für die Analyse von Protein-Clustern wurde ein automatisiertes Verfahren etabliert, das die Cluster in den Lokalisationsbildern identifiziert und alle relevanten Größen, wie beispielsweise die Ausdehnung und die Proteindichte, bestimmt. Diese Methode wurde zur Untersuchung von Her2/neu-Proteinen in der Membran von Brustkrebszellen angewandt, um einen tieferen Einblick in deren Verteilung zu erhalten. Dies ist ein wichtiger Ansatzpunkt für die Therapie von Brustkrebs. Zur quantitativen Analyse von Netzwerk- oder maschenartigen Strukturen wurde ein Algorithmus entwickelt, welcher eine automatisierte Vermessung von deren Größe, Punktdichte und weiterer wichtiger Parameter ermöglicht. Mithilfe dieses Verfahrens konnten morphologische Eigenschaften von Tight Junctions, aufgebaut von Claudin-Proteinen, näher charakterisiert werden. Ein weiterer Algorithmus wurde entwickelt, um die Distanzen von Molekülen zu einer definierten Struktur und deren Abhängigkeit ihrer jeweiligen Positionen entlang dieser Struktur zu bestimmen. Dies ermöglichte eine präzise Untersuchung der Anordnung von Splicing-Faktoren um den transkribierten DNA-Strang und somit einen Einblick in die Faltung der mRNA. Um eine dreidimensionale Rekonstruktion, einer durch die Kombination von SMI- und Lokalisationsmikroskopie aufgenommenen Struktur, durchführen zu können, wurde ein weitgehend automatisiertes Verfahren realisiert. Anhand dessen wurde eine hochaufgelöste Zwei-Farben-3D-Rekonstruktion von unterschiedlichen Protein-Clustern in der Plasmamembran einer Zelle erstellt.

Neben der Anwendung der Lokalisationsmikroskopie auf biologische Proben, wurden in der vorliegenden Arbeit auch Analysen zu dem Einfluss der verwendeten Einbettmedien auf das reversible Bleichverhalten der Fluorophore sowie Veränderungen durch das Altern der Präparate durchgeführt. Darüber hinaus fand eine Untersuchung von fluoreszenten, reversibel bleichenden Molekülen in nicht gefärbten Zellen statt.

## 6.2 Diskussion

## Einfluss des Einbettmediums auf das reversible Bleichverhalten der Fluorophore

Betreibt man die Lokalisationsmikroskopie mit konventionellen Fluorophoren, die dafür zwischen dem fluoreszenten Zustand und einem langlebigen Dunkelzustand geschaltet werden, ist das Einbettmedium (Mikroumgebung der Fluorophore) von entscheidender Bedeutung. Hierdurch kann die Lebensdauer und Übergangsrate der Moleküle in den Dunkelzustand aber auch die Verweildauer im fluoreszenzten Zustand sowie die Zahl der emittierten Photonen maßgeblich beeinflusst werden. Frühere Untersuchungen [Heilemann et al., 2009] haben bereits die Auswirkungen von Sauerstoff reduzierenden Medien auf das reversible Bleichverhalten konventioneller Farbstoffe gezeigt. Der Schwerpunkt, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen, lag auf dem Vergleich verschiedener gängiger konventioneller Einbettmedien der Fluoreszenzmikroskopie für die Verwendung in der Lokalisationsmikroskopie. Derartige Präparate bieten die Möglichkeit, diese auch mit anderen Methoden der Fluoreszenzmikroskopie zu beobachten, bei denen eine gute Photostabilität der Fluorophore erforderlich ist (z.B. konfokale Mikroskopie oder Strukturierte Beleuchtung).

Für die Messungen wurden ein Vertreter der organischen Farbstoffe (Alexa488) und das Fluoreszenzprotein GFP herangezogen. Beide zählen zu den meist genutzten Fluorophoren in der Fluoreszenzmikroskopie. Die Untersuchungen haben den enormen Einfluss der Einbettmedien auf das reversible Bleichverhalten der Fluorophore bestätigt. Zur Charakterisierung wurden vor allem die Gesamtzahl der detektierten Signale in einer Messung, deren Spezifität sowie die Höhe des Hintergrundsignals während der Messung, aber auch der Einfluss des Alters der Präparate miteinander verglichen. Die wichtigsten Ergebnisse wurden in einer Tabelle zusammengefasst, welche einen groben Anhaltspunkt für die Verwendung des entsprechenden Einbettmediums bieten soll. Auf diese Weise kann das Präparat den Anforderungen der Fluorophore und der biologischen Fragestellung angepasst werden.

Bei der Verwendung von Alexa488 oder einem ähnlichen Fluorophor hängt die Wahl des geeignetsten Einbettmediums sehr von der Präparation und der biologischen Fragestellung ab. Ist die Gesamtzahl der detektierten Signale der bedeutendste Faktor und stellt ein hohes Hintergrundsignal aufgrund der erhöhten Autofluoreszenz der Zelle während den Lokalisationsmessungen kein Problem dar, bietet das Einbettmedium ProlongGold<sup>1</sup> die passenden Eigenschaften. Steht hingegen die Spezifität der detektierten Signale im Vordergrund oder soll die Hintergrundintensität während den Messungen reduziert werden, ist Fluoromount<sup>2</sup> besser geeignet als die anderen untersuchten Einbettmedien. Die Verwendung des Switching-Buffers<sup>3</sup> als Einbettmedium ermöglicht, im Gegensatz zu allen anderen, eine deutliche Mehrfachdetektion der einzelnen Moleküle. Hierdurch kann einerseits aufgrund der erhöhten Punktdichte und Detektionseffizienz die Strukturauflösung im Lokalisationsbild verbessert werden, andererseits wird jedoch eine Analyse der Molekülverteilung erschwert. Ist das Präparat mit GFP oder einem anderen fluoreszierenden Protein markiert, so haben die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen gezeigt, dass die Einbettmedien Immumount<sup>4</sup> und Mowiol<sup>5</sup> beide sehr gut für die Anwendung in der Lokalisationsmikroskopie geeignet sind. Alle anderen

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Invitrogen, Carlsbad, USA

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>Zusammensetzung s. [Van de Linde et al., 2008]

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>Thermo Scientific, Pittsburg, USA

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>Roth, Karlsruhe

untersuchten Einbettmedien wiesen im Vergleich zusätzliche negative Eigenschaften wie eine erhöhte Hintergrundintensität oder eine deutlich geringere Anzahl von detektierten Signalen auf.

## Reversibles Bleichen autofluoreszenter Moleküle in unmarkierter Zellen

Bei der Verwendung des kommerziellen Einbettmediums ProlongGold konnten Moleküle in unmarkierten Zellen beobachtet werden, die ein reversibles Bleichverhalten aufwiesen. Dies machte es möglich, sie ebenfalls als einzelne Moleküle zu detektieren und somit ein hochaufgelöstes Lokalisationsbild ihrer Verteilung in der Zelle zu erhalten. Neben Membranstrukturen, deren Autofluoreszenz auch mit der konventionellen Weitfeldfluoreszenzmikroskopie zu beobachten ist, wurden auch Moleküle in anderen definierten Strukturen der Zelle detektiert, welche erst nach einer Photoaktivierung mit einer Laserwellenlänge von 488 nm sichtbar waren. Dies könnte auf einer Photokonversion der beobachteten Moleküle selbst oder benachbarter Moleküle, welche deren Fluoreszenz unterdrücken, beruhen. So liegen beispielsweise die meisten Flavine als enzymale Kofaktoren vor [Kunz und Kunz, 1985, Voltti und Hassinen, 1978]. Im allgemeinen resultiert die Autofluoreszenz hauptsächlich von Proteinen, die aromatische Aminosäuren enthalten, die reduzierte Form von Pyrimidinnukleotiden (NAD(P)H), Flavinen und Lipopigmenten [Benson et al., 1979, Dayan und Wolman, 1993, Galeotti et al., 1970, Udenfriend, 1962], welche sich größtenteils in den Mitochondrien und den Lysosomen befinden [Monici, 2005].

Mitochondrien konnten aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften ausgeschlossen werden, Lysosomen und frühe Endosomen durch einen Vergleich der Strukturen mit Antikörpermarkierten Präparaten. Betrachtet man die hohe Brechkraft der Strukturen, kämen auch Liposomen oder Lipidtröpfchen in Frage. Es wäre auch denkbar, dass es sich um sog. *stress bodies* handelt, die durch physikalischen Stress der Zelle im Zytoplasma entstehen können [Kedersha et al., 2005].

In [Min et al., 2009] wurde beschrieben, wie mithilfe von stimulierter Emission Moleküle in Zellen aufgenommen werden können, deren Fluoreszenz mit anderen Methoden der Lichtmikroskopie nicht beobachtbar ist. Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode, mit welcher in den SPDM-Messungen eine Strukturauflösung von ca. 60 nm erreicht wurde, ist hierbei die Auflösung jedoch beugungsbegrenzt und somit auf Strukturen limitiert, die größer als 200 nm sind.

Es existiert bereits eine Vielzahl von Anwendungen, welche die Fluoreszenz von im Zytoplasma angehäuften Granula als Technik für die Diagnose von altersbedingten Erkrankungen [Shimasaki et al., 1980, Tsuchida et al., 1987], Krebs [Shin et al., 2000, Matsumoto, 2001] und retinaler Degeneration [Stark et al., 1984] verwendet. Die Möglichkeit, hochaufgelöste Bilder unmarkierter zellulärer Strukturen mithilfe der Lokalisationsmikroskopie zu erhalten, könnte als ein präzises und quantitatives diagnostisches Hilfsmittel dienen.

## Korrektur des mechanischen Drifts

In der Regel benötigt man für eine Lokalisationsmessung zwischen ca. 30 s und einigen Minuten. In diesem Zeitraum ist der Effekt eines mechanische Drifts der Probe relativ zum Objektiv und der Kamera eine nicht zu vernachlässigende Fehlerquelle. Die Größenordnung der Verschiebung ist abhängig von der Stabilität des Mikroskopaufbaus. Für Kalibrationsmessungen werden in der Fluoreszenzmikroskopie häufig fluoreszierende Mikrosphären (*Beads*) verwendet. Diese können auch für eine Bestimmung und Korrektur des mechanischen Drift während einer Lokalisationsmessung genutzt werden, wie es bereits in [Betzig et al., 2006] erwähnt wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren genauer charakterisiert und ein Algorithmus zur Driftkorrektur entwickelt. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in [Paech, 2011]. Es konnte gezeigt werden, dass schon mit wenigen Referenzobjekten ein komplexes Driftverhalten mit einer Genauigkeit von weniger als 2 nm präzise bestimmt und korrigiert werden kann.

Abhängig vom biologischen Präparat und der jeweiligen Fragestellung ist das Einbringen von Referenzobjekten nicht immer möglich (z.B. wenn die zu untersuchende Struktur tief im Inneren einer Zelle oder zwischen zwei Zellen liegt). Außerdem können die Referenzobjekte durch ihre hohe Intensität des Fluoreszenzlichts, welche zur genauen Bestimmung ihrer Positionen in jedem Bild des Datenstapels benötigt wird, die Einzelmolekülmessungen störend beeinflussen. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Algorithmus entwickelt, der eine Driftkorrektur ohne Referenzobjekte erlaubt. Durch eine Autokorrelation von Lokalisationsbildern von Teilmengen des Datenstapels wird der Versatz der Molekülpositionen bestimmt. Dieses Verfahren verlangt eine hohe Punktdichte auf den Strukturen im Bild. Da dasselbe Kriterium jedoch auch für eine hohe Strukturauflösung in der Lokalisationsmikroskopie gilt, kann eine Driftkorrektur auf diese Weise immer dann eingesetzt werden, wenn eine Struktur hochaufgelöst dargestellt werden soll.

Die hier vorgestellten Algorithmen zur Driftkorrektur für Messungen der Lokalisationsmikroskopie sind lediglich in der Lage laterale Verschiebungen zu korrigieren. Tritt während einer Messung ein signifikanter Drift in axialer Richtung auf, kann dieser hinterher nicht mehr korrigiert werden, da die Information aus Ebenen außerhalb der Fokusebene nicht wieder hergestellt werden kann. In diesen Fällen muss eine Korrektur aktiv während der Messung durchgeführt werden.

## Visualisierung von Lokalisationsdaten

Bei der Lokalisationsmikroskopie erhält man aus einer Messung zunächst kein Bild der aufgenommenen Struktur, sondern die Positionen und weitere Parameter der detektierten Moleküle. Zur Visualisierung dieser Daten muss, basierend auf den Positionsinformationen, ein Bild neu generiert werden. Hierbei gilt es die effektive optische Auflösung (Strukturauflösung), die durch die aufgenommenen Daten erreicht wurde, korrekt wiederzugeben. Gleichzeitig soll das resultierende Lokalisationsbild vom Betrachter auch leicht interpretierbar und mit Bildern anderer Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie vergleichbar sein.

Die gängigste Methode zur Darstellung von Lokalisationsdaten ist das in Kapitel 3.3.1 beschriebene Verfahren, welches über jede Position im Bild eine Gauß-Verteilung setzt, deren Standardabweichung der jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit entspricht. Wie schon in [Baddeley et al., 2010] erläutert, birgt diese Darstellung einige Nachteile (s. Kapitel 4.1). Alternative Methoden für eine verbesserte Visualisierung von Lokalisationsdaten wurden in [Baddeley et al., 2010] vorgeschlagen. Eine Möglichkeit bietet ein Histogramm basiertes Verfahren mit adaptiver Pixelgröße, welches eine korrekte Darstellung der Daten im Bezug auf die Strukturauflösung bietet. Aufgrund der großen Pixel im Bereich von mittleren bis niedrigen Punktdichten im Bild, entsteht jedoch der Eindruck einer sehr "kantigen", "verpixelten" Struktur. Dieser Nachteil tritt bei der zweiten vorgeschlagene Visualisierung, basierend auf einer Delaunay-Triangulation, nicht auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weitere Methoden zur verbesserten Darstellung von Lokalisationsdaten entwickelt. Durch die Bestimmung der lokalen Punktdichte, basierend auf den Nächsten-Nachbarn-Distanzen (bzw. dem jeweiligen Mittelwert zu den nächsten 4 benachbarten Molekülen), wird eine Visualisierung ermöglicht, welche der gängigen Methode zur Erstellung eines Lokalisationsbildes ähnelt, die Strukturauflösung jedoch korrekt widerspiegelt. Da die Methode jede Molekülposition einzeln betrachtet, kann zusätzlich die Information der detektierten Photonen pro Einzelmolekülsignal in die Darstellung miteinbezogen werden. Auf diese Weise kann ein Lokalisationsbild erzeugt werden, dessen Intensitätswerte von der Signalstärke der einzelnen Moleküle und deren Dichte abhängen. Dies entspricht dem, was der Betrachter von konventionellen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erwarten würde und gewohnt ist.

## Cluster-Analyse von Her2/neu-Proteinen in Brustkrebszellen

Die Bildung von Protein-Clustern spielt eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Prozessen. Deren Analyse stellt aus diesem Grund die Basis für viele Ansätze der Lokalisationsmikroskopie zur Untersuchung biologischer Fragestellungen dar. So wurde beispielsweise in [Baddeley et al., 2009b] die Verteilung von Ryanodin-Rezeptoren, die in großen "Super-Clustern" aggregieren, auf ähnliche Weise untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Algorithmus entwickelt, welcher ein automatisiertes Auffinden von Clustern in einer Reihe von Lokalisationsaufnahmen und deren Analyse ermöglicht. Im Gegensatz zu den Analysen von [Baddeley et al., 2009b], stand hier die Charakterisierung von sehr viel kleineren Clustern im Vordergrund, deren innere Anordnung unterhalb der Strukturauflösung der Lokalisationsaufnahmen liegt. Information über die Verteilung der Proteine innerhalb eines Clusters kann in diesem Fall nur über eine Analyse der Proteindichte bzw. der Abstände zwischen den einzelnen detektierten Molekülen gewonnen werden. Als Anwendungsbeispiel wurde die ausführliche Analyse des Membranrezeptorproteins Her2/neu aufgeführt, das eine wichtige Rolle in der Diagnose und Therapie von Brustkrebs spielt.

Die Größenbestimmung der Cluster auf verschiedenen Brustkrebszelltypen und einer Zelllinie eines gesunden Spenders ergab einen mittleren Durchmesser von 67 nm. Im Bezug auf die Cluster-Größe konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Zelltypen festgestellt werden. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Untersuchungen von Her2/neu mit der optischen Raster-Nahfeld-Mikroskopie [Nagy et al., 1999], welche gezeigt haben, dass die Größe der Her2/neu-Cluster unabhängig von der Gesamtzahl der exprimierten Her2/neu-Proteine pro Zelle ist.

Durch weitere statistische Analysen, basierend auf den Distanzen zwischen den einzelnen detektierten Molekülen, in Verbindung mit den Cluster-Analysen, konnte ein Unterschied der Her2/neu-Verteilung auf den verschiedenen Zelltypen gezeigt werden. Bei gleicher Cluster-Größe liegt bei den Krebszelllinen eine höhere Dichte von Her2/neu-Proteinen innerhalb der Cluster vor, im Vergleich zu der Zelllinie des gesunden Spenders. Mit dieser Methode konnten sogar Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Krebszelllinien auf dem Niveau einzelner Proteine festgestellt werden. Im Vergleich zu konventionellen Verfahren, wie beispielsweise der FACS-Analyse, mit der die Gesamtzahl von bestimmten Proteinen in einer Zelle festgestellt werden kann, bietet der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Ansatz die Möglichkeit einer Differenzierung anhand der Verteilung der einzelnen Her2/neu-Proteine in der Zelle sowie in den Clustern. Durch den Vergleich mit den Ergebnissen einer FACS-Analyse von Her2/neu in den verschiedenen Zelllinien, konnten die Ergebnisse der Lokalisationsmessungen nicht nur bestätigt werden, sondern auch zusätzliche Informationen bezüglich der Cluster-Dichte auf der Membran gewonnen werden.

Erste Zwei-Farben-3D-Lokalisationsmessungen von Her2/neu- und Her3-Clustern haben gezeigt, dass deren räumliche Anordnung mit einer Genauigkeit von ca. 25 nm in allen drei Raumrichtungen bestimmt werden kann. Hierdurch wird nicht nur aufgrund der dritten zugänglichen Raumrichtung mehr Information gewonnen, sondern auch durch die Verteilung der beiden unterschiedlichen Proteintypen relativ zueinander. Durch die Kombination mit den oben aufgeführten statistischen Analysen könnte ein noch tieferer Einblick in die Verteilung von Proteinen erreicht werden.

Die Erkenntnisse der Cluster-Analyse von Her2/neu könnten zu einem besseren Verständnis der Rolle und Funktionsweise dieses Proteins in der Entstehung und Behandlung von Brustkrebs führen. Zudem eröffnet die Methode neue Möglichkeiten einer präziseren Diagnose des Her2/neu-Status, der mit einer schlechteren Prognose der Brustkrebspatientinnen korreliert [Slamon et al., 1967, Slamon et al., 1989, Elledge et al., 1992]. Auf diese Weise könnte eine individuellere Therapie der Patientinnen stattfinden, welche zu einem erhöhten Erfolg führen könnte.

## Quantitative Strukturanalyse von Tight Junction-Netzwerken

Tight Junctions halten benachbarte Zellen zusammen und regulieren den parazellulären Transport von Molekülen und Ionen. Hierbei ist ein wichtiger Parameter die Morphologie der Maschen im Netzwerk der Tight Junctions.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben bereits die maschenförmigen Netzwerkstrukturen der Tight Junctions gezeigt [Morita et al., 1999, Piontek et al., 2008, Piontek et al., 2011]. Allerdings war eine quantitative Analyse, vor allem aufgrund des hohen Zeitaufwands, der dafür nötig wäre, bisher nicht durchführbar. Die Lokalisationsmikroskopie hingegen stellt eine zwar niedrigere jedoch genügend hohe Strukturauflösung zur Visualisierung der Tight Junction-Netzwerke zur Verfügung. Die Spezifität der Fluoreszenzmarkierung, die präparativen Vorteile sowie die Fähigkeit weit ausgedehnte Netzwerke schnell und effizient aufzunehmen, eröffnen im Vergleich zur Elektronenmikroskopie die Möglichkeit einer quantitativen Strukturanalyse morphologischer Eigenschaften von Tight Junction-Netzwerken.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführte Analyse der Maschengröße der von Claudin-3 und Claudin-5 gebildeten Netzwerke haben gezeigt, dass bei beiden Proteintypen jeweils zwei unterschiedliche Verteilungen vorliegen. Ein großer Teil der Maschen besitzt einen Durchmesser von weniger als 100 nm. Eine weitere Anhäufung ist im Bereich zwischen 300 nm und 600 nm zu beobachten. Im Fall von Claudin-3 liegen die beiden Verteilungen näher beieinander als bei Claudin-5. Eine Bestimmung des Feret-Durchmessers hat gezeigt, dass die Mehrzahl der Maschen in elliptischer Form vorliegt. Hier ist die Abweichung von einer Kreisform der Maschen von Claudin-5 leicht erhöht gegenüber den Maschen von Claudin-3. Betrachtet man die gesamte Ausdehnung der Tight Junction-Netzwerke, so ist zu erkennen, dass diejenigen, welche von Claudin-5 gebildet wurden, sich ebenfalls mehr in einer Richtung erstrecken als die von Claudin-3. Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen der Form der einzelnen Maschen und des gesamten Netzwerks hindeuten. Bei den Untersuchung der Proteindichte auf den Strängen der Maschen und außerhalb der Strukturen konnte kein deutlicher Unterschied festgestellt werden.

In weiterführenden Experimenten könnten Strukturen von anderen Proteinen, die am Aufbau der Tight Junctions beteiligt sind und andere Funktionen ausüben, mit der in der vorliegen-

den Arbeit beschriebenen Methode analysiert werden, um den Zusammenhang zwischen deren Funktion und deren Struktur zu untersuchen. Eine Bestimmung der Dynamik der einzelnen Proteine in den hochaufgelösten Lokalisationsbildern könnte einen tieferen Einblick in die morphologische Organisation und die Funktion der Tight Junction-Netzwerke ermöglichen.

Die Weiterentwicklung des Algorithmus zur Maschenanalyse könnte die Untersuchungen effizienter und präziser machen. In [Andres et al., 2008] wurde für die Segmentierung von Membranen in elektronenmikroskopischen Bildern von Nervengewebe ein Algorithmus vorgestellt, der auf statistischem maschinellem Lernen (*machine learning*) beruht. Dieser generiert eine "Kanten-Wahrscheinlichkeits-Karte" durch einen *Random-Forest*-Klassifikator, welche dann mithilfe einer *Watershed*-Transformation in "Super-Voxels" aufgeteilt wird. Eine ähnliche Prozedur könnte für die Segmentierung der Maschen in den Tight Junction-Netzwerken verwendet werden.

## Distanzanalyse von Splicing-Faktoren im Bezug auf die Faltung der mRNA

Die Entwicklung eines Algorithmus, der die Distanzen von Proteinen zu einer anderen Struktur bestimmt und das in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Position entlang dieser Struktur, ermöglicht eine Untersuchung von Proteinverteilungen gekoppelt mit ihrer Lokalität im Präparat. Diese Methode wurde genutzt, um die Distanzen von CELF1-Splicing-Faktoren, die um die mRNA angelagert sind, zum transkribierten DNA-Strang zu bestimmen und die Abhängigkeit der Distanz von der relativen Position entlang des DNA-Strangs zu analysieren.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Distanz der Splicing-Faktoren zum DNA-Strang um ein Vielfaches kürzer ist als die Länge des transkribierten DNA-Strangs. Diese verkürzte Ausdehnung der mRNA wurde auch schon in Aufnahmen der Elektronenmikroskopie beobachtet und beschrieben [Laird et al., 1976]. Die SPDM-Messungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, ermöglichen erstmals eine detaillierte Beschreibung der Distanzverteilung der CELF1-Moleküle um den DNA-Strang, basierend auf den Daten lichtmikroskopischer Aufnahmen. Da diese Proteine am Splicing-Prozess der mRNA beteiligt sind, geben sie somit auch deren Position an. Die deutlich verkürzte Distanz bzw. reduzierte Ausdehnung der mRNA relativ zum abgelesenen DNA-Strang resultiert von ihrer Faltung zu einer Sekundärstruktur.

Theoretische Modelle [Bundschuh und Hwa, 2002, Fang et al., 2011] beschreiben die Faltung von Einzelstrang-RNA. Basierend auf den Ergebnissen der Simulationen von [Fang et al., 2011] wurde an die experimentellen Daten, der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Distanzanalysen, eine entsprechende Modellfunktion angepasst. Diese liefert eine gute Beschreibung der Daten, die erhaltenen Parameter weichen jedoch leicht von denen der theoretischen Simulationen ab. Der Grund hierfür könnte einerseits biologische Ursachen haben, wie beispielsweise die Ausdehnung von bestimmten Proteinen, die am Prozess der Transkription und der weiteren "Reifung" der mRNA beteiligt sind. Andererseits lag die Strukturauflösung bei den Lokalisationsaufnahmen im Bereich von 50 nm, wodurch eine präzise Beschreibung der tatsächlichen Struktur unterhalb dieses Werts nicht möglich ist. Auch die Effekte der Projektion in eine Ebene, der Struktur, die sich räumlich um die Achse der DNA windet, wurden nicht berücksichtigt.

Um mehr über die Faltung der mRNA zu erfahren, könnte man die experimentellen Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, mit weiteren Simulationen, basierend auf theoretischen Modellen, vergleichen. Auf diese Weise könnten auch verschiedene Modell anhand der Daten überprüft werden.

## 6.3 Ausblick

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf quantitativen Untersuchungen biologischer Fragestellungen mithilfe der Lokalisationsmikroskopie. Diese Methode der hochauflösenden Lichtmikroskopie eignet sich in besonderer Weise für derartige Analysen, da neben der erhöhten Strukturauflösung zusätzliche Informationen über die einzelnen detektierten Moleküle zur Verfügung stehen. Mittlerweile wird dies sehr vielseitig für statistische Analysen der Lokalisationsdaten genutzt. Über die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Anwendungen hinaus, wurde in weiteren Projekten der Arbeitsgruppe die Anordnung von Histon-Proteinen im Zellkern auf diese Weise untersucht [Gunkel et al., 2009, Bohn et al., 2010, Markaki et al., 2011].

Andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Lokalisationsmikroskopie auch für *Single/Multiple Particle Tracking* verwendet werden kann [Manley et al., 2008, Baddeley et al., 2011], um zusätzliche Information über die Dynamik der einzelnen detektierten Molekül zu erhalten. Auch erste Ansätze für zeitlich aufgelöste Lokalisationsaufnahmen in lebenden Zellen konnten realisiert werden [Hess et al., 2007]. Hier liegt die zeitliche Auflösung jedoch noch im Bereich von 10 s, was für die meisten biologischen Anwendungen nicht ausreichend ist.

Neben den zahlreichen Mehr-Farben- und 3D-Ansätzen der letzten Jahre [Shroff et al., 2007, Bates et al., 2007, Bock et al., 2007, Huang et al., 2008, Juette et al., 2008, Lemmer et al., 2008, Gunkel et al., 2009, Pavani et al., 2009, Shtengel et al., 2009], ist ein deutlicher Trend zu mehr quantitativen und statistischen Analysen, basierend auf der Lokalisationsmikroskopie, zu erkennen. Auch die Dynamik der einzelnen Moleküle spielt eine immer größere Rolle. Einen entscheidenden Beitrag leistet dazu auch die fortschreitende Entwicklung schneller und sensitiver Detektorsysteme. Diese und die Photonenausbeute der Fluorophore stellen, neben den Herausforderungen bei der Markierung biologischer Strukturen, die limitierenden Parameter in der Lokalisationsmikroskopie dar. Neu entwickelte Detektoren, wie z.B. die Integration einzelner Lawinenphotodioden (SPADs, *Singel-Photon Avalanche Diodes*) in die CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*)-Technologie [Veerappan et al., 2011], die es ermöglichen einzelne Photonen mit einer Zeitauflösung von einigen ns zu detektieren, könnten weitere Anwendungsgebiete der Lokalisationsmikroskopie eröffnen. Auf diese Weise wäre es denkbar, die Fluoreszenzlebensdauer der einzelnen detektierten Moleküle zu bestimmen.

Aufgrund der hohen Strukturauflösung und Spezifität, im Bezug auf die Markierung biologischer Strukturen, eignet sich die Lokalisationsmikroskopie in besonderer Weise zur Kombination mit anderen Mikroskopietechniken, wie beispielsweise der Elektronenmikroskopie. Die grundlegende Verknüpfung der Lichtmikroskopie mit der Elektronenmikroskopie wurde schon vor vielen Jahren beschrieben (Details s. [Hayat, 1987]). Ein erster Ansatz, die Lokalisationsmikroskopie mit der Elektronenmikroskopie zu kombinieren, wurde von [Betzig et al., 2006] gezeigt. Für die Untersuchung aktueller biologischer Fragestellungen wäre die Entwicklung eines routinemäßig arbeitenden Systems erforderlich, wie es bereits für die Kombination von konventioneller Fluoreszenzmikroskopie mit der Elektronenmikroskopie realisiert wurde [Polishchuk et al., 2000, Kukulski et al., 2011]. Hier können biologische Strukturen durch die Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen beobachtet werden, um dann zu einem beliebigen Zeitpunkt ein Bild ihrer "Ultrastruktur" aufzunehmen. Die Kombination der Lokalisationsmikroskopie mit der Elektronenmikroskopie würde eine deutlich präzisere Korrelation der Strukturen in beiden Mikroskopieaufnahmen ermöglichen. Auch die Effizienz des Auffindens der interessanten Regionen bei der Elektronenmikroskopie würde gesteigert, da bei der Lokalisationsmikroskopie aufgrund ihrer hohen Strukturauflösung eine gezieltere Vorauswahl stattfinden kann.

# 7 Anhang

## Literaturverzeichnis

- [Abbe, 1873] Abbe, E. (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der Mikroskopischen Wahrnehmung. Archiv für Mikroskopische Anatomie, 9:413–468.
- [Albanell und Baselga, 1999] Albanell, J. und Baselga, J. (1999). The erbb receptors as targets for breast cancer therapy. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 4:337–351.
- [Alberts et al., 1995] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D. (1995). Molekularbiologie der Zelle, Band 3. VCH.
- [Albrecht, 2002] Albrecht, B. (2002). Hochpräzisions-Fluoreszenzmessungen mit Räumlich Modulierter Anregung. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Albrecht et al., 2002] Albrecht, B., Schweizer, A., Failla, A. V., Edelmann, P. und Cremer, C. (2002). Spatially Modulated Illumination Microscopy Allows Axial Distance Resolution in the Nanometer Range. *Applied Optics*, 41:80–87.
- [Andres et al., 2008] Andres, B., Köthe, U., Helmstaedter, M., Denk, W. und Hamprecht, F. (2008). Segmentation of sbfsem volume data of neural tissue by hierarchical classification. *Pattern recognition*, pages 142–152.
- [Anthony und Garnick, 2009] Anthony, S. und Garnick, S. (2009). Image analysis with rapid and accurate two-dimensional Gaussian fitting, Band 25. Langmuir.
- [Baddeley, 2007] Baddeley, D. (2007). Precision measurements with SMI and 4Pi Microscopy. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Baddeley et al., 2007] Baddeley, D., Batram, C., Weiland, Y., Cremer, C. und Birk, U. J. (2007). Nanostructure Analysis Using Spatially Modulated Illumination Microscopy. *Nature Protocols*, 2:2640–2646.
- [Baddeley et al., 2010] Baddeley, D., Cannell, M. und Soeller, C. (2010). Visualization of localization microscopy data. *Microscopy and Microanalysis*, 16:64–72.
- [Baddeley et al., 2011] Baddeley, D., Crossman, D., Rossberger, S., Cheyne, J., Montgomery, J., Jayasinghe, I., Cremer, C., Cannell, M. und Soeller, C. (2011). 4d super-resolution microscopy with conventional fluorophores and single wavelength excitation in optically thick cells and tissues. *PloS one*, 6:e20645.
- [Baddeley et al., 2009a] Baddeley, D., Jayasinghe, I., Cremer, C., Cannell, M. und Soeller, C. (2009a). Light-induced dark states of organic fluochromes enable 30 nm resolution imaging in standard media. *Biophysical journal*, 96:L22–L24.
- [Baddeley et al., 2009b] Baddeley, D., Jayasinghe, I., Lam, L., Rossberger, S., Cannell, M. und Soeller, C. (2009b). Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor

distribution in rat cardiac myocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106:22275–22280.

- [Bates et al., 2007] Bates, M., Huang, B., Dempsey, G. und Zhuang, X. (2007). Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 317:1749–1753.
- [Benson et al., 1979] Benson, R., Meyer, R., Zaruba, M. und McKhann, G. (1979). Cellular autofluorescence is it due to flavins? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 27:44–48.
- [Betzig, 1995] Betzig, E. (1995). Proposed method for molecular optical imaging. *Optics letters*, 20:237–239.
- [Betzig et al., 2006] Betzig, E., Patterson, G. H., Sougart, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J. und Hess, H. F. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science Express*, 313:1642– 1645.
- [Bobroff, 1986] Bobroff, N. (1986). Position measurement with a resolution and noise-limited instrument. *Review of scientific instruments*, 57:1152–1157.
- [Bock et al., 2007] Bock, H., Geisler, C., Wurm, C., Von Middendorff, C., Jakobs, S., Schönle, A., Egner, A., Hell, S. und Eggeling, C. (2007). Two-color far-field fluorescence nanoscopy based on photoswitchable emitters. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 88:161–165.
- [Bohn et al., 2010] Bohn, M., Diesinger, P., Kaufmann, R., Weiland, Y., Müller, P., Gunkel, M., von Ketteler, A., Lemmer, P., Hausmann, M., Heermann, D. und Cremer, C. (2010). Localization microscopy reveals expression-dependent parameters of chromatin nanostructure. *Biophysical journal*, 99:1358–1367.
- [Bornfleth et al., 1998] Bornfleth, H., Spätzler, K. und Cremer, C. (1998). High-precision Distance Measurements and Volume-Conserving Segmentation of Objects Near and Below the Resolution Limit in Three-Dimensional Confocal Fluorescence Microscopy. Journal of Microscopy, 189:118–136.
- [Bundschuh und Hwa, 2002] Bundschuh, R. und Hwa, T. (2002). Statistical mechanics of secondary structures formed by random rna sequences. *Physical Review E*, 65:031903.
- [Burns et al., 1985] Burns, D., Callis, J., Christian, G. und Davidson, E. (1985). Strategies for attaining superresolution using spectroscopic data as constraints. *Applied Optics*, 24:154– 161.
- [Christ et al., 2001] Christ, T., Kulzer, F., Bordat, P. und Basche, T. (2001). Watching the photo-oxidation of a single aromatic hydrocarbon molecule. Angewandte Chemie-International, 40:4192–4195.
- [Clark, 1980] Clark, B. (1980). An efficient implementation of the algorithm 'CLEAN'. Astronomy and Astrophysics, 89:377–378.
- [Dayan und Wolman, 1993] Dayan, D. und Wolman, M. (1993). Lipid pigments. Progress in histochemistry and cytochemistry, 25:1–75.

- [Demtröder, 2006] Demtröder, W. (2006). Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik, Band 4. Springer-Verlag.
- [Dickson et al., 1997] Dickson, R., Cubitt, A., Tsien, R. und Moerner, W. (1997). On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 388:355–358.
- [Elledge et al., 1992] Elledge, R. M., McGuire, W. L. und Osborne, C. K. (1992). Prognostic Factors in Breast Cancer. Seminars in Oncology, 19:244–253.
- [Failla et al., 2003] Failla, A., Albrecht, B., Spöri, U., Schweizer, A., Kroll, A., Hildenbrand, G., Bach, M. und Cremer, C. (2003). Nanostructure analysis using spatially modulated illumination microscopy. *Complexus*, 1:77–88.
- [Failla et al., 2002] Failla, A. V., Cavallo, A. und Cremer, C. (2002). Subwavelength Size Determination by Spatially Modulated Illumination Virtual Microscopy. Applied Optics, 4:6651–6659.
- [Fang et al., 2011] Fang, L., Yoffe, A., Gelbart, W. und Ben-Shaul, A. (2011). A sequential folding model predicts length-independent secondary structure properties of long ssrna. The Journal of Physical Chemistry B.
- [Fölling et al., 2008] Fölling, J., Bossi, M., Bock, H., Medda, R., Wurm, C., Hein, B., Jakobs, S., Eggeling, C. und Hell, S. (2008). Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nature methods*, 5:943–945.
- [Galeotti et al., 1970] Galeotti, T., Rossum, G., Mayer, D. und Chance, B. (1970). On the fluorescence of nad (p) h in whole-cell preparations of tumours and normal tissues. *European Journal of Biochemistry*, 17:485–496.
- [Gall, 1998] Gall, J. (1998). Spread preparation of Xenopus germinal vesicle contents, Band 1.
- [Gall et al., 1991] Gall, J., Callan, H., Wu, Z. und Murphy, C. (1991). Xenopus laevis: practical uses in cell and molecular biology, Band 36. Academic Press.
- [Gould et al., 2009] Gould, T., Verkhusha, V. und Hess, S. (2009). Imaging biological structures with fluorescence photoactivation localization microscopy. *Nature protocols*, 4:291–308.
- [Grüll et al., 2011] Grüll, F., Kirchgessner, M., Kaufmann, R., Hausmann, M. und Kebschull, U. (2011). Accelerating image analysis for localization microscopy with FPGAs. In 2011 International Conference on Field Programmable Logic and Applications, im Druck. IEEE.
- [Gu, 2000] Gu, M. (2000). Advanced Optical Imaging Theory, Band 1. Springer.
- [Gunkel, 2011] Gunkel, M. (2011). Lokalisationsmikroskopie mit mehreren Farben und ihre Anwendung in biologischen Präaparaten. *Dissertation, Universität Bielefeld*.
- [Gunkel et al., 2009] Gunkel, M., Erdel, F., Rippe, K., Lemmer, P., Kaufmann, R., Hörmann, C., Amberger, R. und Cremer, C. (2009). Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. *Biotechnology journal*, 4:927–938.

- [Gustafsson, 2005] Gustafsson, M. (2005). Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:13081–13086.
- [Gustafsson, 2000] Gustafsson, M. G. L. (2000). Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy. *Journal of Microscopy*, 198:82–87.
- [Hayat, 1987] Hayat, M. (1987). Correlative microscopy in biology. Instrumentation and methods. Academic Press.: Correlative microscopy in biology.
- [Heilemann et al., 2009] Heilemann, M., van de Linde, S., Mukherjee, A. und Sauer, M. (2009). Super-resolution imaging with small organic fluorophores. Angewandte Chemie International Edition, 48:6903–6908.
- [Heilemann et al., 2008] Heilemann, M., van de Linde, S., Schüttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P. und Sauer, M. (2008). Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angewandte Chemie International Edition*, 47:6172–6176.
- [Heintzmann und Cremer, 1998] Heintzmann, R. und Cremer, C. (1998). Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. In *Proceedings of SPIE*, Band 3568, pages 185–196.
- [Heintzmann et al., 2002] Heintzmann, R., Jovin, T. und Cremer, C. (2002). Saturated patterned excitation microscopy (SPEM) - a novel concept for optical resolution improvement. *Journal of the Optical Society of America A: Optic*, 19:1599–1609.
- [Hess et al., 2007] Hess, S., Gould, T., Gudheti, M., Maas, S., Mills, K. und Zimmerberg, J. (2007). Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:17370–17377.
- [Hess et al., 2006] Hess, S. T., Girirajan, T. P. K. und Mason, M. D. (2006). Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical Journal*, 91:4258–4272.
- [Högbom, 1974] Högbom, J. (1974). Aperture synthesis with a non-regular distribution of interferometer baselines. Astronomy and Astrophysics Supplement Series, 15:417–426.
- [Huang et al., 2008] Huang, B., Wang, W., Bates, M. und Zhuang, X. (2008). Three-Dimensional Super Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science Express*, 319:810–813.
- [Juette et al., 2008] Juette, M., Gould, T., Lessard, M., Mlodzianoski, M., Nagpure, B., Bennett, B., Hess, S. und Bewersdorf, J. (2008). Three-dimensional sub–100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nature methods*, 5:527–529.
- [Kasper, 2009] Kasper, R. (2009). Optimierung von photophysikalischen Eigenschaften organischer Farbstoffe zur Auflösungserhöhung. *Dissertation, Universität Bielefeld*.
- [Kaufmann, 2008] Kaufmann, R. (2008). Lokalisationsmikroskopie an biologischen Proben. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

- [Kaufmann et al., 2009] Kaufmann, R., Lemmer, P., Gunkel, M., Weiland, Y., Müller, P., Hausmann, M., Baddeley, D., Amberger, R. und Cremer, C. (2009). SPDM: single molecule superresolution of cellular nanostructures. *Proceedings of SPIE*, 7185:71850J.
- [Kaufmann et al., 2011a] Kaufmann, R., Müller, P., Hausmann, M. und Cremer, C. (2011a). Imaging label-free intracellular structures by localisation microscopy. *Micron*, 42:348–352.
- [Kaufmann et al., 2011b] Kaufmann, R., Müller, P., Hildenbrand, G., Hausmann, M. und Cremer, C. (2011b). Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy. *Journal of Microscopy*, 242:46–54.
- [Kaufmann et al., 2011c] Kaufmann, R., Piontek, J., Grüll, F., Kirchgessner, M., Rossa, J., Blasig, I. und Cremer, C. (2011c). Visualisation and quantitative analysis of tight junction networks using localization microscopy. *Manuskript in Vorbereitung*.
- [Kedersha et al., 2005] Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M., Scheuner, D., Kaufman, R., Golan, D. und Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mrnp remodeling. *The Journal* of cell biology, 169:871–884.
- [Klar et al., 2000] Klar, T., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A. und Hell, S. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97:8206–8210.
- [Krause et al., 2008] Krause, G., Winkler, L., Mueller, S., Haseloff, R., Piontek, J. und Blasig, I. (2008). Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778:631–645.
- [Kukulski et al., 2011] Kukulski, W., Schorb, M., Welsch, S., Picco, A., Kaksonen, M. und Briggs, J. (2011). Correlated fluorescence and 3d electron microscopy with high sensitivity and spatial precision. *The Journal of cell biology*, 192:111–119.
- [Kunz und Kunz, 1985] Kunz, W. und Kunz, W. (1985). Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA)-General Subjects, 841:237–246.
- [Kuriyan, 2009] Kuriyan, J. (2009). Kuriyan Lab, University of California, Berkeley, USA. http://jkweb.berkeley.edu.
- [Laird et al., 1976] Laird, C., Wilkinson, L., Foe, V. und Chooi, W. (1976). Analysis of chromatin-associated fiber arrays. *Chromosoma*, 58:169–190.
- [Lakowicz, 2006] Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Band 3. Springer.
- [Lemmer, 2009] Lemmer, P. (2009). Lichtmikroskopische Untersuchungen konventionell markierter Präparate weit unterhalb der Beugungsgrenze. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Lemmer et al., 2008] Lemmer, P., Gunkel, M., Baddeley, D., Kaufmann, R., Urich, A., Weiland, Y., Reymann, J., Müller, P., Hausmann, M. und Cremer, C. (2008). SPDM: Light Microscopy with Single-Molecular Resolution at the Nanoscale. *Applied Physics B*, 93:1–12.

- [Manley et al., 2008] Manley, S., Gillette, J., Patterson, G., Shroff, H., Hess, H., Betzig, E. und Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature methods*, 5:155–157.
- [Markaki et al., 2011] Markaki, Y., Gunkel, M., Schermelleh, L., Beichmanis, S., Neumann, J., Heidemann, M., Leonhardt, H., Eick, D., Cremer, C. und Cremer, T. (2011). Functional nuclear organization of transcription and dna replication. In *Cold Spring Harbor Symposia* on Quantitative Biology.
- [Martyński et al., 2005] Martyński, M., Zydlewicz, J., Boens, N. und Molski, A. (2005). Determination of photophysical parameters from photon arrival time trajectories in single molecule fluorescence spectroscopy. *The Journal of chemical physics*, 122:1345071–1345076.
- [Matsumoto, 2001] Matsumoto, Y. (2001). Lipofuscin pigmentation in pleomorphic adenoma of the palate. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics, 92:299–302.
- [McAnaney et al., 2005] McAnaney, T. B., Zeng, W., Doe, C. F. E., Bhanji, N., Wakelin, S., Pearson, D. S., Abbyad, P., Shi, X., Boxer, S. G. und Bagshaw, C. R. (2005). Protonation, Photobleaching, and Photoactivation of Yellow Fluorescent Protein(YFP 10C): A Unifying Mechanism. *Biochemistry*, 44:5510–5524.
- [Min et al., 2009] Min, W., Lu, S., Chong, S., Roy, R., Holtom, G. und Xie, X. (2009). Imaging chromophores with undetectable fluorescence by stimulated emission microscopy. *Nature*, 461:1105–1109.
- [Müller, 2011] Müller, P. (2011). Molekularbiologische Analyse von Her2/neu-Nanostrukturen in unterschiedlichen Brustkrebszelllinien auf Gen- und Proteinebene basierend auf hochaufgelösten fluoreszenzmikroskopischen Darstellungen. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Monici, 2005] Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review*, 11:227–256.
- [Morita et al., 1999] Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96:511-516.
- [Nagy et al., 1999] Nagy, P., Jenei, A., Kirsch, A., Szöllosi, J., Damjanovich, S. und Jovin, T. (1999). Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *Journal of cell science*, 112:1733–1741.
- [Novotny et al., 1995] Novotny, L., Pohl, D. und Hecht, B. (1995). Scanning near-field optical probe with ultrasmall spot size. *Optics letters*, 20:970–972.
- [Paech, 2011] Paech, D. (2011). Driftkorrektur und Fluoreszenzoptimierung zur Lokalisationsmikroskopie biologischer Nanostrukturen. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Pavani et al., 2009] Pavani, S., Thompson, M., Biteen, J., Lord, S., Liu, N., Twieg, R., Piestun, R. und Moerner, W. (2009). Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function. *Proceedings* of the National Academy of Sciences, 106:2995–2999.
- [Piontek et al., 2011] Piontek, J., Fritzsche, S., Cording, J., Richter, S., Hartwig, J., Walter, M., Yu, D., Turner, J., Gehring, C., Rahn, H. et al. (2011). Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cellular and Molecular Life Sciences*, pages 1–16.
- [Piontek et al., 2008] Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G. und Blasig, I. (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *The FASEB Journal*, 22:146–158.
- [Polishchuk et al., 2000] Polishchuk, R., Polishchuk, E., Marra, P., Alberti, S., Buccione, R., Luini, A. und Mironov, A. (2000). Correlative light-electron microscopy reveals the tubularsaccular ultrastructure of carriers operating between golgi apparatus and plasma membrane. *The Journal of cell biology*, 148(1):45–58.
- [Rayleigh, 1879] Rayleigh, L. (1879). Investigations in Optics with Special Reference to the Spectroscope. *Philosophical Magazine*, 8.
- [Reymann, 2007] Reymann, J. (2007). Entwicklung eines SMI Mikroskops zur Päzissions-Strukturanalyse in vitalen biologischen Systemen. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Ruckelshausen, 2011] Ruckelshausen, T. (2011). Lichtoptische Nanoskopie von Biostrukturen mit fokussierter, strukturierter und homogener Belechtung. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Rust et al., 2006] Rust, M. J., Bates, M. und Zhuang, X. (2006). Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). Nature Methods, 3:793– 796.
- [Saleh und Teich, 2007] Saleh, B. E. A. und Teich, M. C. (2007). Fundamentals of Photonics, Band 2. Wiley.
- [Sawyers, 2002] Sawyers, C. L. (2002). Rational Therapeutic Interventions in Cancer: Kinases as Drug Targets. Current Opinion in Genetics and Development, 12:111–115.
- [Schneider, 1999] Schneider, B. (1999). Spatially modulated illumination microscopy. *Disser*tation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Schuster et al., 2005] Schuster, J., Cichos, F. und von Borczyskowski, C. (2005). Blinking of single molecules in various environments. Optics and spectroscopy, 98:712–717.
- [Shannon, 1949] Shannon, C. (1949). Communication in the presence of noise. Proceedings of the IRE, 37:10–21.
- [Shimasaki et al., 1980] Shimasaki, H., Ueta, N. und Privett, O. (1980). Isolation and analysis of age-related fluorescent substances in rat testes. *Lipids*, 15:236–241.

- [Shin et al., 2000] Shin, S., Kanomata, N. und Rosen, P. (2000). Mammary carcinoma with prominent cytoplasmic lipofuscin granules mimicking melanocytic differentiation. *Histopa*thology, 37:456–459.
- [Shroff et al., 2007] Shroff, H., Galbraith, C., Galbraith, J., White, H., Gillette, J., Olenych, S., Davidson, M. und Betzig, E. (2007). Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proceedings of the National Acade*my of Sciences, 104:20308–20313.
- [Shtengel et al., 2009] Shtengel, G., Galbraith, J., Galbraith, C., Lippincott-Schwartz, J., Gillette, J., Manley, S., Sougrat, R., Waterman, C., Kanchanawong, P., Davidson, M. et al. (2009). Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106:31251–31256.
- [Sinnecker et al., 2005] Sinnecker, D., Voigt, P., Hellwig, N. und Schaefer, M. (2005). Reversible Photobleaching of Enhanced Green Fluorescent Proteins. *Biochemistry*, 44:7085–7094.
- [Slamon et al., 1967] Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. und McGuire, W. L. (1967). Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplifications of the HER-2/neu Oncogene. *Science*, 235:177–182.
- [Slamon et al., 1989] Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J. und Ullrich, A. (1989). Studies of the HER2/neu Proto-Oncogen in Human Breast and Ovarian Cancer. *Science*, 244:707–712.
- [Sparrow, 1916] Sparrow, C. M. (1916). On Spectroscopic Resolving Power. Astrophysical Journal, 44:76.
- [Spöri, 2004] Spöri, U. (2004). Messungen mit dem SMI-Mikroskop. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Staehelin, 1974] Staehelin, L. (1974). Structure and function of intercellular junctions. International Review of Cytology, 39:191–283.
- [Stark et al., 1984] Stark, W., Miller, G. und Itoku, K. (1984). Calibration of microspectrophotometers as it applies to the detection of lipofuscin and the blue-and yellow-emitting fluorophores in situ. *Methods in enzymology*, 105:341–347.
- [Thomson et al., 2002] Thomson, R. E., Larson, D. R. und Webb, W. W. (2002). Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophysical Journal*, 82:2775–2783.
- [Trauth et al., 1989] Trauth, B., Klas, C., Peters, A., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. und Krammer, P. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 245:301.
- [Tsuchida et al., 1987] Tsuchida, M., Miura, T. und Aibara, K. (1987). Lipofuscin and lipofuscin-like substances. *Chemistry and physics of lipids*, 44:297–325.
- [Udenfriend, 1962] Udenfriend, S. (1962). Fluorescence assay in biology and medicine. Academic Press, Inc., London/New York.

- [Van de Linde et al., 2008] Van de Linde, S., Kasper, R., Heilemann, M. und Sauer, M. (2008). Photoswitching microscopy with standard fluorophores. Applied Physics B: Lasers and Optics, 93:725–731.
- [Veerappan et al., 2011] Veerappan, C., Richardson, J., Walker, R., Li, D., Fishburn, M., Maruyama, Y., Stoppa, D., Borghetti, F., Gersbach, M., Henderson, R. und Charbon, E. (2011). A 160x128 single-photon image sensor with on-pixel 55ps 10b time-to-digital converter. *in Proceedings of ISSCC*.
- [Vogel et al., 1995] Vogel, M., Gruber, A., Wrachtrup, J. und Von Borczyskowski, C. (1995). Determination of Intersystem Crossing Parameters via Observation of Quantum Jumps on Single Molecules. *The Journal of Physical Chemistry*, 99:14915–14917.
- [Voltti und Hassinen, 1978] Voltti, H. und Hassinen, I. (1978). Oxidation-reduction midpoint potentials of mitochondrial flavoproteins and their intramitochondrial localization. *Journal* of Bioenergetics and Biomembranes, 10:45–58.
- [Wagner, 2004] Wagner, C. (2004). Neue Methoden zur Größen- und Formbestimung von Fluoreszierenden Nanostrukturen unter Verwendung der SMI-Mikroskopie. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- [Wang et al., 2007] Wang, G., Kearney, D., De Biasi, M., Taffet, G. und Cooper, T. (2007). Elevation of rna-binding protein cugbp1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 117:2802.
- [Warren und Landgraf, 2006] Warren, C. M. und Landgraf, R. (2006). Signaling Through ERBB Receptors: Multiple Layers of Diversity and Control. *Cellular Signalling*, 18:923– 933.
- [Westphal und Hell, 2005] Westphal, V. und Hell, S. W. (2005). Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope. *Physical Review Letters*, 94:1439031–143904.
- [Workman, 2003] Workman, P. (2003). Paul workman on the Challenges of Cancer Drug Development. Drug Disc Today, 8:775–777.
- [Yarden und Sliwkowski, 2001] Yarden, Y. und Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB Signalling Network. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2:127–137.
- [Zondervan et al., 2003] Zondervan, R., Kulzer, F., Orlinskii, S. und Orrit, M. (2003). Photoblinking of rhodamine 6G in poly (vinyl alcohol): radical dark state formed through the triplet. *The Journal of Physical Chemistry A*, 107:6770–6776.

## Publikationen mit eigener Beteiligung

## Erstautorenschaft

Kaufmann, R., Piontek, J., Grüll, F., Kirchgessner, M., Rossa, J., Blasig, I. und Cremer, C. (2011). Visualisation and quantitative analysis of tight junction networks using localization microscopy. *Manuskript in Vorbereitung*.

Kaufmann, R., Müller, P., Hildenbrand, G., Hausmann, M. und Cremer, C. (2011). Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy. *Journal of Microscopy*, 242:46-54.

Kaufmann, R., Müller, P., Hausmann, M. und Cremer, C. (2011). Imaging label-free intracellular structures by localisation microscopy. *Micron*, 42:348-352.

Kaufmann, R., Lemmer, P., Gunkel, M., Weiland, Y., Müller, P., Hausmann, M., Baddeley, D., Amberger, R., und Cremer, C. (2009). SPDM: single molecule superresolution of cellular nanostructures. *Proceedings of SPIE*, 7185:71850J.

## Koautorenschaft

Grüll, F., Kirchgessner, M., Kaufmann, R., Hausmann, M. und Kebschull, U. (2011). Accelerating image analysis for localization microscopy with FPGAs. In 2011 International Conference on Field Programmable Logic and Applications, im Druck. IEEE.

Cremer, C., Kaufmann, R., Gunkel, M., Pres, S., Weiland, Y., Müller, P., Ruckelshausen, T., Lemmer, P., Geiger, F., Degenhard, S., Wege, C., Lemmermann, N., Holtappels, R., Strickfaden, H. und Hausmann, M. (2011). Superresolution Imaging of Biological Nanostructures by Spectral Precision Distance Microscopy (SPDM). *Biotechnology Journal, im Druck.* 

Müller, P., Schmitt, E., Jacob, A., Hoheisel, J., Kaufmann, R., Cremer, C. und Hausmann, M. (2010). COMBO-FISH Enables High Precision Localization Microscopy as a Prerequisite for Nanostructure Analysis of Genome Loci, *International Journal of Molecular Sciences*, 11:4094-4104.

Bohn, M., Diesinger, P., Kaufmann, R., Weiland, Y., Müller, P., Gunkel, M., von Ketteler, A., Lemmer, P., Hausmann, M., Heermann, D. und Cremer C. (2010). Localization Microscopy Reveals Expression-Dependent Parameters of Chromatin Nanostructure, *Biophysical Journal*, 99:1358-1367.

Cremer, C., von Ketteler, A., Lemmer, P., Kaufmann, R., Weiland, Y., Müller, P., Hausmann, M., Gunkel, M., Ruckelshausen, T., Baddeley, D. und Amberger, R. (2010) Far-Field Fluorescence Microscopy of Cellular Structures at Molecular Optical Resolution, *in: Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy and Nanoscopy*, Taylor & Francis, 3:1-35.

Gunkel, M., Erdel, F., Rippe, K., Lemmer, P., Kaufmann, R., Hörmann, C., Amberger, R. und Cremer, C. (2009). Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. *Biotechnology Journal*, 4:927-938.

Lemmer, P., Gunkel, M., Weiland, Y., Müller, P., Baddeley, D., Kaufmann, R., Urich, A., Eipel, H., Amberger, R., Hausmann, M. und Cremer, C. (2009). Using conventional fluorescent markers for far-field fluorescence localization nanoscopy allows resolution in the 10-nm range, *Journal of Microscopy*, 235:163-171.

Lemmer, P., Gunkel, M., Baddeley, D., Kaufmann, R., Urich, A., Weiland, Y., Reymann, J., Müller, P., Hausmann, M., und Cremer, C. (2008). SPDM: Light Microscopy with Single-Molecular Resolution at the Nanoscale. *Applied Physics B*, 93:1-12.

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Ermöglichung dieser Arbeit durch die fachkundige Unterstützung sowie die Möglichkeit an zahlreichen unterschiedlichen Projekten mitzuarbeiten, um einen tiefen Einblick in die hochauflösende Mikroskopie und deren biologische Anwendungen zu erlangen
- Prof. Dr. Rasmus Schröder für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit
- allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die stimulierenden Diskussionen und Ratschläge, insbesondere Margund Bach, Gerrit Best, Heinz Eipel, Dr. Manuel Gunkel, Dr. Paul Lemmer, Daniel Paech, Sebastian Pres, Sabrina Rossberger, Thomas Ruckelshausen und Yanina Weiland
- Prof. Dr. Michael Hausmann, Dr. Patrick Müller und Dr. Götz Pilarczyk für die ständige Unterstützung, gute Zusammenarbeit und fachkundige Kritik
- allen externen Kooperationspartner für die interessante und gute Zusammenarbeit, insbesondere Prof. Joseph G. Gall (Carnegie Institution, Baltimore, USA), Dr. Jörg Piontek (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin), Dr. habil. Michael Wassenegger (AlPlanta - Institute for Plant Research, Neustadt) und Dr. Nicolai Fricker, Dr. Olga Shatnyeva sowie Dr. Inna Lavrik (DKFZ, Heidelberg)
- meinen Eltern und meiner Familie, ohne deren fortwährende Unterstützung all dies nicht möglich gewesen wäre.

Erklärung:

Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den