

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich – Mathematischen
Gesamtfakultät
Der Ruprecht – Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Christian Müller
aus Konstanz

Tag der mündl. Prüfung: 18.12.2003

Entwicklung einer Methode
zur
zeit- und spektralaufgelösten
Präzisionsdistanzmikroskopie
auf Einzelmolekülebene

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Wolfrum

Prof. Dr. Christoph Cremer

Zusammenfassung / Abstract

In der Fluoreszenzmikroskopie können punktförmige fluoreszierende Lichtquellen, wie z.B. einzelne Fluorophore mit Nanometergenauigkeit lokalisiert werden, indem das erwartete Fluoreszenzbild (Punktabbildungsfunktion) gefittet wird. Wenn jedoch der Abstand zweier fluoreszierender Moleküle kleiner ist als der durch das Rayleigh-Kriterium gegebene Abstand, versagt diese hohe Auflösung, weil sich die beiden Punktabbildungsfunktionen überlagern und weil die Photonenstatistik bei einzelnen Farbstoffmolekülen aufgrund von Photozerstörung eingeschränkt ist. Hier wird eine Technik für die ultrahochauflösende Kolo-kalisation zweier konventioneller Farbstoffmoleküle mit Nanometergenauigkeit präsentiert. Die Technik basiert auf der kürzlich entwickelten spektral-aufgelösten Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (SFLIM), die es ermöglicht, gleichzeitig Fluoreszenzintensität, Fluoreszenzlebensdauer und das Emissionsmaximum aufzunehmen, indem zwei spektral separierte Detektoren verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden Parameter evaluiert und ein theoretischer Ansatz entwickelt, so dass jedes detektierte Photon verlässlich der entsprechenden Farbstoffsorte zugeordnet werden kann. Durch das Benutzen von DNA als ein rigides molekulares Lineal und Simulationen, um die entwickelten Analysemodelle und Fehlerabschätzungen zu überprüfen, konnte gezeigt werden, dass Abstände bis zu $10 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$ zwischen einzelnen Molekülen gemessen werden können.

In fluorescence microscopy, localization of point-like fluorescent sources such as single fluorophores can be achieved with nanometer-resolution by fitting the expected microscopic image (point-spread function, PSF) or by simple centroid-finding algorithms. However, if the distance between two fluorescent molecules is smaller than that given by the Rayleigh criterion, high resolution localization fails due to the overlap of the molecules' PSFs and the limited number of photons emitted by single fluorophores. Here, a technique for ultrahigh-resolution colocalization of conventional single fluorescent dyes with nanometer accuracy using two spectral characteristics, i.e. the fluorescence lifetime and the emission wavelength, is presented. The technique is based on the recently developed Spectrally-resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (SFLIM) of single molecules, which enables simultaneous detection of intensity, fluorescence lifetime and emission maximum by using two spectrally separated detectors. This work focuses on the evaluation of parameters and the development of an theoretical approach so that every photon detected is reliably assigned to the corresponding dye species. Using DNA as a rigid molecular ruler system and simulations to test the developed models for analysis and error estimation, it is shown that the distance between single molecules can be measured down to 10 nm with an error of 6 nm depending on photon statistics.

Inhaltsverzeichnis

<i>I. Einleitung</i>	<i>1</i>
<i>II. Theorie</i>	<i>7</i>
<i>II.1. Statistische Grundlagen</i>	<i>7</i>
<i>II.2. Grundlagen zum Verhalten von Farbstoffen und dem Abklingverhalten der Fluoreszenz</i>	<i>13</i>
<i>II.3. Die laterale und axiale Auflösung eines konfokalen Mikroskops</i>	<i>19</i>
<i>III. Material und Methoden</i>	<i>31</i>
<i>III.1. Die verwendeten Farbstoffe</i>	<i>31</i>
<i>III.2. Die Lichtquelle</i>	<i>34</i>
<i>III.3. Das Mikroskop</i>	<i>37</i>
<i>III.4. Die Detektion</i>	<i>39</i>
<i>III.5. Die Datenanalyse</i>	<i>41</i>
<i>IV. Ergebnisse und Diskussion-Einführung in die Kolokalisationstheorie</i>	<i>44</i>
<i>IV.1. Die Parametrisierung der Information eines Pixels</i>	<i>47</i>
<i>IV.2. Das Prinzip der Mustererkennung mit Hilfe des Abklingverhaltens</i>	<i>50</i>
<i>IV.3. Überprüfung der klassischen Mustererkennung mit Hilfe von simulierten Abklingkurven</i>	<i>54</i>
<i>IV.4 Anpassung der inneren Struktur der klassischen Mustererkennung</i>	<i>62</i>
<i>IV.5 Simulation eines kompletten zeitaufgelösten Datensatzes</i>	<i>72</i>
<i>V. Erweiterung der Kolokalisationstheorie</i>	<i>96</i>
<i>V.1. Symmetrisierung des Kolokalisationsalgorithmus</i>	<i>96</i>
<i>V.2. Korrelation zwischen Intensität und dem F_2-Wert</i>	<i>102</i>
<i>V.3. Die spektrale Kolokalisationstheorie</i>	<i>105</i>
<i>V.4. Unabhängigkeit von spektraler Information und Zeitinformation</i>	<i>108</i>
<i>V.5. Erweiterung des zeitaufgelösten Datensatz zu einem SFLIM-Datensatz</i>	<i>109</i>
<i>V.6. Zusammenfassung der Kapitel IV und V</i>	<i>111</i>

VI. Anpassung der Kolokalisationstheorie an reale Datensätze	112
VI.1. Überführung einer gefalteten Abklingkurve in ein rein exponentielles Abklingverhalten	114
VI.2. Bestimmung der Verteilungen $\{V_{\tau}^j(\tau_j)\}$ und $\{V_R^j(p_{Rot}^j)\}$	126
VI.3. Berücksichtigung des Hintergrundrauschens	131
VI.4. Anpassung der Kolokalisationstheorie	134
VI.5. Bestimmung der PSF einer Punktlichtquelle	138
VI.6. Überprüfung des SFLIM-U Algorithmus bzw. der V-SFLIM-U Algorithmus mit einem simulierten Datensatz und realen Daten	142
VII. Zusammenfassung und Ausblick	152

Literatur

I. Einleitung

Nach Beendigung des Human Genome Projects und nachdem im Laufe der letzten Jahre viele RNS und Proteinstrukturen hochaufgelöst untersucht werden konnten, fokussieren sich die biologisch relevanten Fragestellungen auf die Wechselwirkungen und Prozesse innerhalb der Grundbausteine einer Zelle. Es wurden entscheidende Fortschritte hinsichtlich eines besseren Verständnis des kontrollierten Transports von Substanzen in und aus dem Zellkern und deren Lokalisation in Zellen erarbeitet. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie, der Fluoreszenzmikroskopie von Proteinen und enzymatisch eingebauten Nukleotiden und neuer in situ Hybridisierungstechniken konnten verschiedene Strukturen im Zellkern identifiziert und teilweise auch ihre biochemischen Aufgaben aufgeklärt werden [1-3]. Zu diesen Substrukturen gehören beispielsweise die Replikationszentren [4-7], die neue DNS synthetisieren und nur während der S-Phase des Zellzyklus gebildet werden, und die Transkriptionszentren [8-10], in denen DNS in mRNA umgeschrieben wird. Die Funktionsweise dieser Zentren oder Maschinen basiert auf der Dynamik der funktionellen Organisation und Architektur der beteiligten Proteine und Nucleinsäuren. Leider existieren aber gerade darüber, d.h. über die Abstände der beteiligten Biomoleküle und die Dynamik dieser 3D-Architektur, bisher wenig Daten [11].

Eine Methode um dynamische Prozesse in Proteinen [12-15] aufzulösen, wird durch die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (*FRET*) Theorie beschrieben. Der FRET-Mechanismus basiert auf einer abstandsabhängigen Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen zwei Farbstoffmolekülen. Der Abstandsbereich, der mit FRET beschrieben werden kann, liegt zwischen 2-8nm. Da die Größe der lebenswichtigen „Bio-Molekularen Maschinen“ im Bereich von einigen 10 Nanometern liegt und die Auflösungsgrenze der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie bei ~ 200 nm lateral und ~700 nm axial liegt [16], besteht ein hoher Bedarf an Techniken, die sogenannte Auflösungslücke, die einerseits durch das Rayleigh-Kriterium und andererseits durch die Reichweite von FRET begrenzt ist, zu überwinden. In vielen dieser Bio-Molekularen Maschinen befinden sich zudem nur eine kleine Anzahl bestimmter Interaktionspartner, so dass es für die Erforschung ihrer Funktionsweise notwendig ist, Abstände zwischen einzelnen Molekülen mit hoher Präzision zu messen. Die Bestimmung von Abständen in einem Bereich zwischen 10-200 nm wird als Präzisionsdistanzmessung bzw. Kollokalisierung bezeichnet. Dazu bedarf es neuer optischer, nicht-invasiver Methoden, die das dynamische Zusammenspiel der wechselwirkenden Proteine und

Nukleinsäuren mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung bestimmen können. Auch wenn mit Hilfe neuer laserspektroskopischer Verfahren mittlerweile eindrucksvoll unter Beweis gestellt wurde, dass einzelne Moleküle (Farbstoffe) in Lösung [17-19], auf Oberflächen oder in Gelen [20,21] und selbst in Membranen [22,23] lebender Zellen mit hohem Signal-zu-Rausch Verhältnis detektiert werden können, sind bisher keine Ergebnisse über Präzisionsdistanzmessungen zwischen einzelnen Farbstoffen bekannt.

Neuere Methoden zur Überwindung der Auflösungsgrenze der optischen Mikroskopie sind (i) die nachträgliche Bildverarbeitung mit Computern [24], (ii) Nahfeldmikroskopietechniken (NSOM) [25], (iii) Point-Spread-Function (PSF) Engineering durch stimulierte Emission (STED) [26], (iv) die 4 Pi Mikroskopie [27] und (v) die Wellenfeld Mikroskopie [28]. Als Nahfeldtechnik erlaubt NSOM die Detektion einzelner Farbstoffe nur in der äußeren Zellmembran und kann damit nicht für die (Struktur)-Aufklärung in Zellen eingesetzt werden. Alle anderen hochauflösenden Methoden konnten bisher noch nicht für die Einzelmoleküldetektion eingesetzt werden. Die derzeit am häufigsten angewendete Methode zur Überwindung der optischen Auflösungsgrenze stellt die konfokale Mehrfarben-Mikroskopie dar [29,30]. Hierbei werden verschiedene Laser zur effizienten Anregung spektral verschiedener Farbstoff verwendet und das Emissionssignal über mehrere Strahlteiler aufgeteilt. Die Präzision dieser Verfahren wird aber aufgrund der unterschiedlichen Anregungslaser stark durch sphärische und chromatische Abberationen eingeschränkt [31,32].

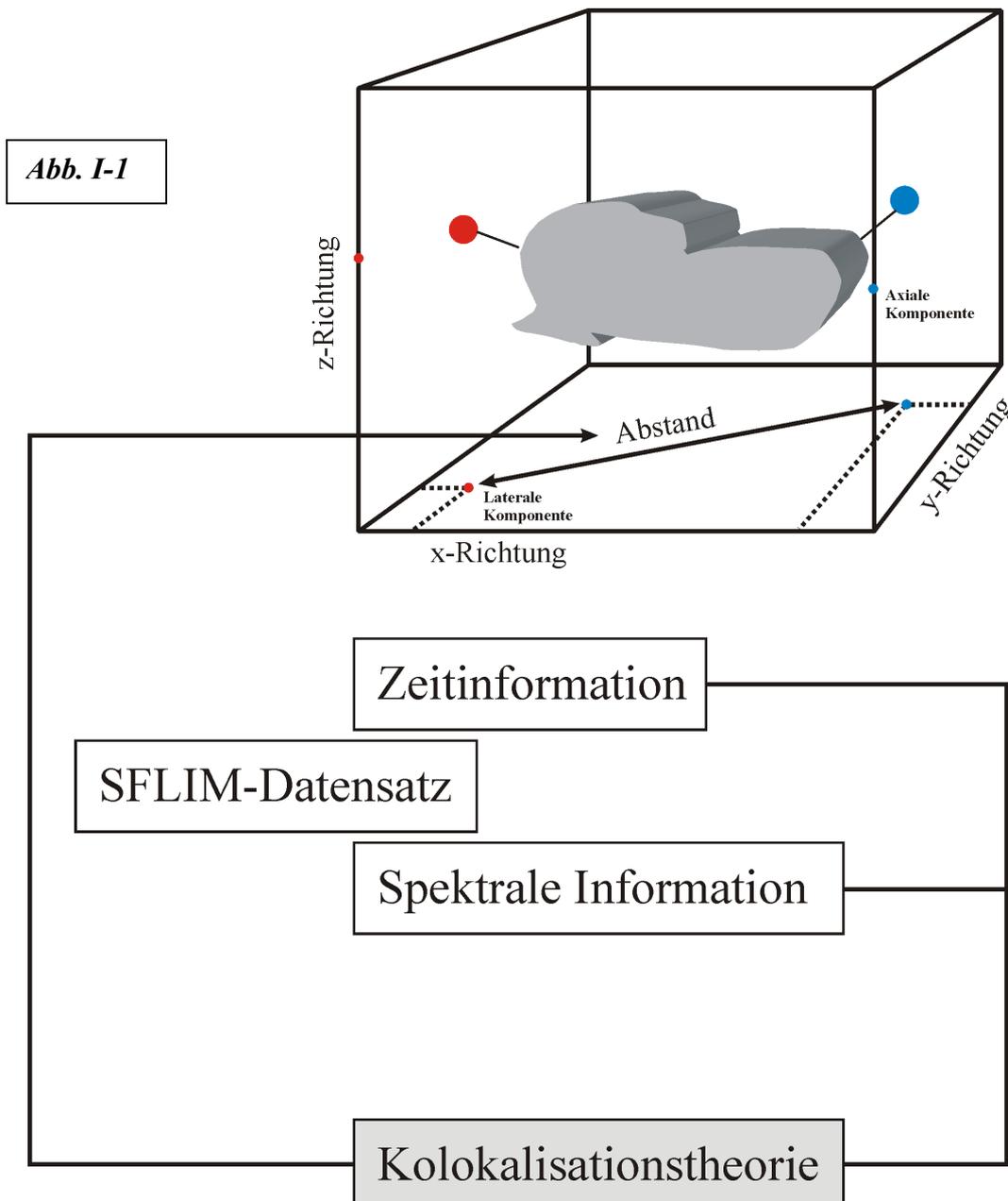
Zur Umgehung der chromatischen Abberationen wurde von Lacoste *et al.* [33] eine neue Methode der Mehrfarben-Kolokalisation beschrieben, die auf der Verwendung von Farbstoffen beruht, die bei der selben Wellenlänge angeregt werden können aber unterschiedliche Emissionsmaxima besitzen. Diese Eigenschaften haben z.B. (i) kleine Energie-Transfer Beads (20-40 nm; TransFluoSpheres, Molecular Probes) oder (ii) Halbleiter Nanokristalle, sogenannte Quantum Dots (QDs) [34]. Beide zeigen eine starke Fluoreszenz und sind bei weitem stabiler als die konventionellen Farbstoffe [35], was zur Folge hat, dass die Anzahl der pro Emitter detektierbaren Photonen wesentlich höher ist. Andererseits verhindert der relativ große Durchmesser der Fluoreszenzbeads von 20-40 nm ihren Einsatz zur Strukturaufklärung in kleinen molekularen Maschinen mit ähnlichem Durchmesser. QDs besitzen den Nachteil, dass sie starke Fluoreszenzschwankungen aufweisen, teilweise für mehrere Sekunden in Abhängigkeit von der Anregungsleistung nicht leuchten (sogenannte

off-states). Diese *off*-states führen zu stark zerrissenen PSFs der QDs, was wiederum die Präzision der Lokalisation stark verschlechtert. Da alle Emittter bei der selben Wellenlänge angeregt werden, treten im Anregungsarm keine chromatischen Abberationen auf. Dieser Umstand wird auch bei hochaufgelösten Distanzmessungen auf Einzelmolekülebene, die auf der spektral aufgelösten Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie [36,37] (engl.: Spectrally-Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (*SFLIM*)) basieren, ausgenutzt. In Verbindung mit einem konfokalen Scanning-Mikroskop wird das Fluoreszenzsignal hier in zwei Spektralbereiche separiert und auf zwei Detektoren registriert. Eine PC-Einsteckkarte für zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen ermöglicht die simultane Aufnahme der Fluoreszenzintensität, der Fluoreszenzlebensdauer und des Emissionsmaximums. Durch eine geeignete Wahl von Farbstoffen, kann gewährleistet werden, dass die Farbstoffe mit einer vergleichbaren Effizienz bei 635 nm angeregt werden können. In dieser Arbeit werden die Farbstoffe Cy5.5 und BodiPY630/650 verwendet, die durch einen abgestimmten Strahlteiler (bei ~ 675 nm) im Detektionsarm spektral so getrennt werden, dass das Cy5.5 Signal ausschließlich auf dem langwelligen und das BodiPy630/650 Signal hauptsächlich auf dem kurzwelligeren Detektor registriert wird. Die Anregung mit gepulsten Diodenlasern im roten Spektralbereich (635 nm) führt eine reduzierte Hintergrundfluoreszenz in biologischen Proben nach sich. Das somit verbesserte Signal-zu-Rausch Verhältnis erhöht die Sicherheit der Identifizierung der einzelnen Farbstoffe. Hinzu kommt die wesentlich einfachere Probenvorbereitung, d.h. Experimente in wässriger Umgebung können mit Leitungswasser durchgeführt werden.

Bisher wurden vor allem Mehrfarben Kolokalisationsexperimente an einzelnen Molekülen durchgeführt [38,39]. Neben der Farbe, d.h. dem Emissionsmaximum, kann auch die Fluoreszenzlebensdauer bzw. eine mit der Fluoreszenzlebensdauer korrelierte Zeitinformation für Präzisionsdistanzmessungen genutzt werden. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzlebensdauer einzelner Moleküle auf Oberflächen oder in Gelen ebenso als eindeutiges Identifizierungsmerkmal verwendet werden kann [36,40]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Koinzidenzanalyse nach gepulster Laseranregung eine eindeutige Bestimmung der Anzahl der Emittter durchgeführt werden kann [41]. Bei Verwendung der Fluoreszenzlebensdauer als Identifizierungsmerkmal in Kombination mit effizienten Musterkennungsverfahren [42] sollte die Präzision der Abstandsbestimmung deutlich verbessert werden, da keine störenden chromatischen Abberationen auftreten. In

Verbindung mit SFLIM sollten daher Abstände im Bereich < 50 nm zwischen einzelnen Molekülen mit hoher Präzision selbst in lebenden Zellen bestimmbar sein.

Die im Rahmen dieser Arbeit gestellte Fragestellung lässt sich auf das in Abb. I-1 gezeigte Bild reduzieren. Ein mit Farbstoffen markiertes dreidimensionales Objekt wird mit Hilfe eines SFLIM Aufbaus untersucht. Aus der Messung wird ein sogenannter SFLIM-Datensatz erhalten, der bezüglich der Zeitinformation und der spektralen Information klassifiziert werden kann. Aus dem Datensatz heraus soll eine Aussage über die Struktur des Objekts getroffen werden. Um den Datensatz entsprechend zu analysieren, wird eine effiziente Kolokalisationstheorie benötigt, die sowohl die Zeitinformation der Farbstoffe wie die



spektrale Information der Farbstoffe ausnutzt. Die Entwicklung dieser Kolokalisationstheorie, steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Die Kolokalisationstheorie liefert als Parametersatz die Positionen der einzelnen Moleküle. Die Effizienz bzw. die Güte einer Kolokalisationstheorie wird durch die Genauigkeit der Positionsbestimmung charakterisiert. Wenn Strukturen mit einer Größe zwischen 10-50 nm aufgelöst werden sollen, muss der Fehler ΔPos in der Bestimmung der Positionen in der Größenordnung von einigen Nanometern liegen. Als Faustregel kann eine Obergrenze für ΔPos von 5 nm angenommen werden. Neben den Positionen sollte eine Kolokalisationstheorie einen Schätzer für den Fehler ΔPos liefern. Diese Fehlerabschätzung ist entscheidend für die Anwendbarkeit des Kolokalisationsalgorithmus. Da ein perfektes Eichsystem nicht zur Verfügung steht, kann nur über Simulationen gezeigt werden, ob die geschätzten Fehler mit dem tatsächlichen Fehler vergleichbar sind. Dazu müssen aus den bekannten Gesetzmäßigkeiten und Eigenschaften der Farbstoffe komplette SFLIM-Datensätze simuliert werden, die dann mit Hilfe des Kolokalisationsalgorithmus analysiert werden können. Nur wenn der geschätzte Fehler und der tatsächliche Fehler innerhalb einer solchen Simulationen vergleichbar sind, kann der Kolokalisationsalgorithmus auf reale Datensätze angewendet werden.

Für die zu entwickelnde Kolokalisationstheorie wird die axiale Komponente der Farbstoffe vernachlässigt. Diese Reduzierung der Objekte auf 2 Dimensionen ist gerechtfertigt, da ein 3 dimensionales Objekt immer als eine Überlagerung von mehreren x-y Ebenen beschrieben werden kann. Wenn gezeigt werden kann, dass der Kolokalisationsalgorithmus in 2 Dimensionen funktioniert, kann der Algorithmus immer auf 3 Dimensionen erweitert werden, ohne dass die erarbeiteten Gesetzmäßigkeiten verloren gehen. Die innere Struktur basiert auf der Struktur der Musteranpassung- (Pattern Matching) bzw. Mustererkennungsmethode (Pattern Recognition), die zur Identifizierung von einzelnen Molekülen entwickelt wurde.

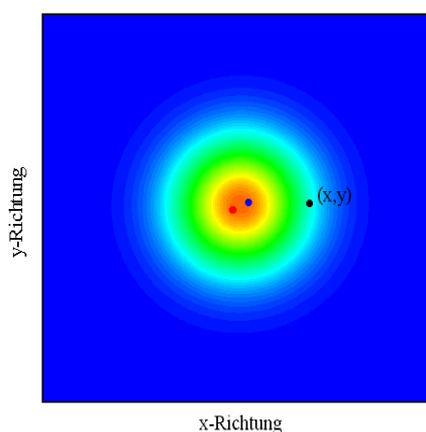


Abb. I-2

Eine weitere Vereinfachung besteht darin, dass nur zwei verschiedene Farbstoffmarkierungen gleichzeitig betrachtet werden. Prinzipiell kann jede Struktur mit zwei verschiedenen Farbstoffmarkierungen aufgelöst werden, wenn die Position des einen Farbstoffmoleküls festgehalten wird, und nur die Position des anderen Moleküls variiert wird. Aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens der verwendeten Mikroskope verteilt sich die Fluoreszenz der beiden in Abb. I-1 gezeigten Farbstoffmoleküle innerhalb einer x-y Ebene auf ein Beugungsbild (siehe in Abb. I-2). An jedem Ort (x,y) des Fluoreszenzbildes muss angegeben werden, wie viele Photonen von Farbstoff 1 (●) bzw. wie viele Photonen von Farbstoff 2 (●) stammen. Die Größe des in Abb. I-2 gezeigten Fluoreszenzbildes beträgt $1 \times 1 \mu\text{m}$, und die Moleküle haben einen Abstand von 35 nm. Die Aufgabe besteht somit darin, aus den lateralen Komponenten der Farbstoffe (siehe Abb. I-1) einen Abstand der beiden Farbstoffe zu bestimmen.

II. Theorie

In diesem Kapitel soll eine Zusammenstellung der mathematischen Techniken und eine Einführung in die methodischen Grundlagen gegeben werden. Einerseits werden für die späteren Betrachtungen wichtige Zusammenhänge erläutert und definiert, und zum anderen soll eine Zusammenstellung aller relevanter statistischer Verfahren [45,46] gegeben werden, die für die Entwicklung der in Kapitel IV und Kapitel V dargestellten Theorie zur Kolokalisierung von Molekülen auf Oberflächen benötigt werden.

II.1. Statistische Grundlagen

Wenn eine Zufallsgröße X um einen Erwartungswert $\langle X \rangle$ verteilt ist, dann muss grundsätzlich zwischen verschiedenen Verteilungstypen unterschieden werden. Zum einen kann X einer diskreten Wahrscheinlichkeitsverteilung $\{P(X)\}$ folgen, wenn es sich bei X um eine diskrete Zufallsgröße mit den Elementen $\{x_i\}$ ($i=1, 2, \dots$) handelt, oder X folgt einer kontinuierlichen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $p(X)$, wenn X alle Werte in einem bestimmten Wertebereich annehmen kann.

Aus einer Verteilung von X kann der Erwartungswert $\langle X \rangle$ berechnet werden, und zwar im diskreten Fall nach Gl. II-1 a.

$$\langle X \rangle = \sum_i x_i \cdot P(x_i), P(x_i) = \{P(X = x_i)\}$$

Gl. II-1 a

und im kontinuierlichen Fall nach Gl. II-1 b.

$$\langle X \rangle = \int X \cdot p(X) \cdot dX$$

Gl. II-1 b

Der Erwartungswert wird auch als erstes Moment oder als Mittelwert der Zufallsgröße X bezeichnet, und ist ein Maß für das Zentrum der Verteilung $\{P(X)\}$. Wenn die $P(x_i)$ als Massen aufgefasst werden, so würde $\langle X \rangle$ den Schwerpunkt angeben. Eine besondere Bedeutung kommt dem zweiten zentralen Moment V_X zu.

$$V_X = \sum_i (x_i - \langle X \rangle)^2 \cdot P(x_i)$$

$$V_X = \int (X - \langle X \rangle)^2 \cdot p(X) \cdot dX$$

Gl. II-2

V_X wird als Varianz bezeichnet. Die Wurzel der Varianz ist die Standardabweichung σ_X , die ein Maß für die Streuung der Verteilung um den Erwartungswert darstellt.

$$\sigma_X = \sqrt{V_X}$$

Gl. II-3

Der bekannteste Vertreter einer diskreten Wahrscheinlichkeitsverteilung ist die Poissonverteilung. Eine Zufallsgröße X heißt poissonverteilt wenn sie die abzählbar unendlich vielen möglichen Werte $k=0, 1, 2, \dots$ mit den Wahrscheinlichkeiten $\text{Poisson}(k;\lambda)$ annehmen kann.

$$\text{Poisson}(k; \lambda) = \frac{\lambda^k}{k!} \cdot \exp(-\lambda)$$

Gl. II-4

λ wird als Parameter der Verteilung bezeichnet.

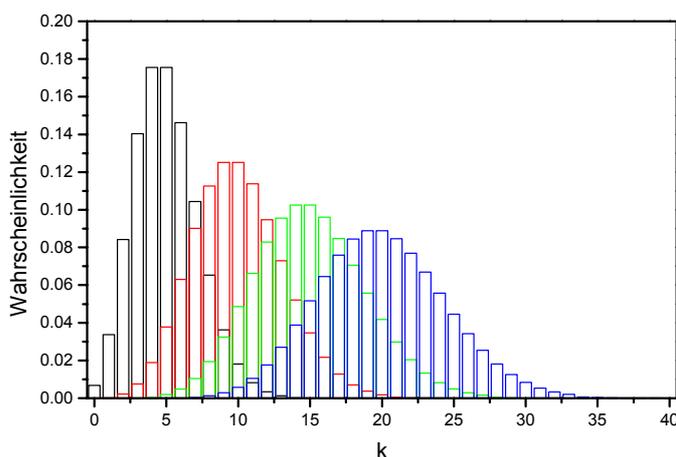
Die Werte $\langle X \rangle$, V_X und σ_X der Poissonverteilung können wie folgt berechnet werden.

$$\langle X \rangle = \sum_{k=0}^{\infty} k \cdot \frac{\lambda^k}{k!} \cdot \exp(-\lambda) = \lambda$$

$$V_X = \sum_{k=0}^{\infty} (k - \lambda)^2 \cdot \frac{\lambda^k}{k!} \cdot \exp(-\lambda) = \lambda$$

$$\sigma_X = \sqrt{\lambda}$$

Gl. II-5

**Abb. II-1**

Poissonstatistik für $\lambda=5$ (□),
 $\lambda=10$ (□), $\lambda=15$ (□), $\lambda=20$ (□)

Die Poissonverteilung zeichnet sich also dadurch aus, dass Erwartungswert gleich der Varianz ist. In Abb. II-1 sind die Funktionen Poisson(k;5) (□), Poisson(k;10) (□), Poisson(k;15) (□) und Poisson(k;20) (□) für $\lambda=5, 10, 15, 20$ aufgetragen.

Der bekannteste Vertreter unter den kontinuierlichen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen ist die Normalverteilung, eine Zufallsgröße X heißt normalverteilt wenn die Dichte $N(X;a,\omega)$ die folgende Gestalt hat.

$$N(X; a, \omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \omega} \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \cdot \frac{(X - a)^2}{\omega^2}\right)$$

Gl. II-6

a und ω sind die Parameter der Verteilung. $N(X;a,\omega)$ ist eine symmetrische Verteilung und der Wertebereich geht von $-\infty$ bis $+\infty$. $\langle X \rangle$, V_X und σ_X lassen sich nach Gl. II-7 berechnen.

$$\begin{aligned} \langle X \rangle &= \int_{-\infty}^{\infty} X \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \omega} \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \cdot \frac{(X - a)^2}{\omega^2}\right) \cdot dX = a \\ V_X &= \int_{-\infty}^{\infty} (X - a)^2 \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi} \cdot \omega} \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \cdot \frac{(X - a)^2}{\omega^2}\right) \cdot dX = \omega^2 \\ \sigma_X &= \omega \end{aligned}$$

Gl. II-7

Aus einer Wahrscheinlichkeitsdichte lässt sich durch Integration ableiten, mit welcher Wahrscheinlichkeit P die Größe X in einen Bereich $[\underline{X}, \underline{X} + \Delta\underline{X}]$ fällt.

$$P(X \in [\underline{X}, \underline{X} + \Delta\underline{X}]) = \int_{\underline{X}}^{\underline{X} + \Delta\underline{X}} p(X) \cdot dX$$

Gl. II-8

Neben den Verteilungen über eine Zufallsgröße, werden auch oft Verteilungsfunktionen $V(X, Y, Z, \dots)$ von mehreren Zufallsgrößen betrachtet: Da in dieser Arbeit immer nur zwei Zufallsgrößen miteinander verteilt sind, wird im folgenden die Betrachtung auf den Zufallsvektor (X, Y) mit den Elementen $\{x_i\}$ und $\{y_j\}$ beschränkt. Eine Frage, die sich stellt, ist, ob die Zufallsgrößen miteinander korreliert oder unabhängig voneinander sind. Diese Fragestellung kann anhand einer Kovarianzuntersuchung überprüft werden. Im weiteren Verlauf wird $V(X, Y) = \{P(X, Y)\}$ gesetzt.

Bei einer Kovarianzuntersuchung wird die Mischung zwischen den Zufallsgrößen X,Y bestimmt, indem eine Kovarianzmatrix für das zweite zentrale Moment aufgestellt wird. Die Berechnung des zweiten zentralen Moments benötigt auch die ersten Momente der Verteilung $\{P(X,Y)\}$. Die ersten Momente werden im folgenden als α , die zweiten zentralen Momente als μ bezeichnet. Eine Kovarianzmatrix hat die Form aus Gl. II-9.

$$\begin{pmatrix} \mu_{XX} & \mu_{XY} \\ \mu_{YX} & \mu_{YY} \end{pmatrix}$$

Gl. II-9

Die einzelnen Einträge bestimmen sich wie folgt.

$$\mu_{XX} = \sum_i \sum_j (x_i - \alpha_{XX})^2 \cdot P(x_i, y_j) = V_X, \alpha_{XX} = \sum_i \sum_j x_i \cdot P(x_i, y_j)$$

$$\mu_{YY} = \sum_i \sum_j (y_i - \alpha_{YY})^2 \cdot P(x_i, y_j) = V_Y, \alpha_{YY} = \sum_i \sum_j y_i \cdot P(x_i, y_j)$$

$$\mu_{XY} = \mu_{YX} = \sum_i \sum_j (x_i - \alpha_{XX}) \cdot (y_i - \alpha_{YY}) \cdot P(x_i, y_j)$$

Gl. II-10

Die Zweiten Momente μ_{XY} und μ_{YX} sind nichts anderes als die Varianz V_X und V_Y der Größen X und Y bezüglich der Verteilungen $\{P_X(X)\}$ bzw. $\{P_Y(Y)\}$. Die Mischung liegt in den Termen μ_{XY} und μ_{YX} , die auch als Kovarianz der Zufallsgrößen X, Y bezüglich der Verteilung $\{P(X,Y)\}$ bezeichnet werden. Aus der Kovarianzmatrix heraus definiert sich die Größe Cov_X^Y (siehe Gl. II-11), deren mögliche Werte zwischen 0 und 1 liegen. Ein Wert von ungefähr Null bedeutet, dass die Zufallsgrößen miteinander unkorreliert, also unabhängig sind.

$$\text{Cov}_X^Y = \left| \frac{\mu_{XY}}{\sqrt{V_X \cdot V_Y}} \right|$$

Gl. II-11

Je mehr Cov_X^Y gegen 1 geht, umso korrelierter sind die Größen.

In der Praxis sind solche Kovarianzmatrizen relativ einfach zu berechnen, da die Verteilung $\{P(X,Y)\}$ entweder schon bekannt ist oder aus den Verteilungen $\{P(X)\}$ und $\{P(Y)\}$ gut berechnet werden kann.

Wenn die Größen X, Y unabhängig sind, dann gilt für die Verteilung $\{P(X, Y)\}$.

$$\{P(X, Y)\} = \{P_x(X)\} \cdot \{P_y(Y)\}$$

Gl. II-12

Wobei $\{P_x(X)\}$ und $\{P_y(Y)\}$ die Wahrscheinlichkeitsverteilungen für die Größe X bzw. Y sind. Für den kontinuierlichen Fall gilt natürlich entsprechend.

$$p(X, Y) = p_x(X) \cdot p_y(Y)$$

Gl. II-13

Sehr oft stellt sich auch die Frage, wie eine Funktion $f(X, Y)$ verteilt ist, wenn der Zufallsvektor (X, Y) der Verteilung $p(X, Y)$, bzw. einer Wahrscheinlichkeitsverteilung $\{P(X, Y)\}$ gehorcht.

Wird z.B. eine Addition $f(X, Y) = Z = X + Y$ der Größen X und Y betrachtet, dann berechnet sich die Verteilung $p(Z)$ der Größe Z aus $p(X, Y)$ nach Gl. II-14.

$$p(Z) = \int_a^b p(X, Z - X) \cdot dX$$

Gl. II-14

Die Grenzen werden durch die möglich Werte von X bestimmt, für die $Z = X + Y$ erfüllt ist. Geht man davon aus, dass die Größen X und Y unabhängig sind, dann kann nach Gl. II-13 die Gleichung Gl. II-14 umgeformt werden, indem unter dem Integral von Gl. II-14 $p(X, Z - Y)$ gleich $p_x(X) \cdot p_y(Z - X)$ gesetzt wird.

$$p(Z) = \int_a^b p_x(X) \cdot p_y(Z - X) \cdot dX$$

Gl. II-15

Der Ausdruck in Gl. II-15 wird als Faltungssatz der totalen Wahrscheinlichkeit bezeichnet. Im diskreten Fall mit den Wahrscheinlichkeitsverteilungen $\{P_x(X)\}$ und $\{P_y(Y)\}$ ergibt sich Gl. II-16.

$$P(Z) = \sum_i P_x(x_i) \cdot P_y(Z - x_i)$$

Gl. II-16

Der in Gl. II-16 beschriebene Zusammenhang wird auch als Satz der totalen Wahrscheinlichkeit bezeichnet.

Das in Gl. II-15 gezeigte Integral stellt den mathematischen Formalismus einer Faltung dar. Wird angenommen, dass die Größen X und Y einen Wertebereich von $-\infty \dots \infty$ überspannen, dann erstreckt sich der Wertebereich von Z ebenfalls von $-\infty \dots \infty$ und die Integralgrenzen können auf $a=-\infty$ und $b=\infty$ festgesetzt werden. Wird vorausgesetzt, dass die Verteilungen $p_x(X)$ ($\int p_x(X) \cdot dX=1$) und $p_y(Y)$ ($\int p_y(Y) \cdot dY=1$) auf 1 normiert sind und einen Erwartungswert $\langle X \rangle$ bzw. $\langle Y \rangle$ bzw. eine Standardabweichung σ_X bzw. σ_Y besitzen, dann können die entsprechenden Größen $\langle Z \rangle$ und σ_Z (siehe Gl. II-17) angegeben werden, ohne explizit eine Faltung durchführen zu müssen und ohne, dass explizit eine bekannte Verteilungsfunktion $p_x(X)$ bzw. $p_y(Y)$ angesetzt werden muss.

$$F = \int_{-\infty}^{\infty} p(Z) \cdot dZ = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} p_x(X) \cdot p_y(Z-X) \cdot dX \cdot dZ \quad (\text{a})$$

$$\Downarrow$$

$$\langle Z \rangle = \frac{1}{F} \cdot \int_{-\infty}^{\infty} Z \cdot p(Z) \cdot dZ = \frac{1}{F} \cdot \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} p_x(X) \cdot Z \cdot p_y(Z-X) \cdot dX \cdot dZ \quad (\text{b})$$

$$\Downarrow$$

$$\sigma_Z^2 = \frac{1}{F} \cdot \int_{-\infty}^{\infty} (Z - EZ)^2 \cdot p(Z) \cdot dZ = \frac{1}{F} \cdot \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} p_x(X) \cdot (Z - \langle Z \rangle)^2 \cdot p_y(Z-X) \cdot dX \cdot dZ \quad (\text{c})$$

Gl. II-17

Die in Gl. II-17 (a) – (c) angegebenen Integrale lassen sich vereinfachen. Die Integrale müssen von oben nach unten gelöst werden. Gl. II-17 (a) wird gelöst, indem zuerst die Integration über Z ausgeführt wird, und $u=Z-X$ substituiert wird. Ohne die entsprechenden Zwischenschritte anzugeben, ergibt sich.

$$F = \int_{-\infty}^{\infty} p(Z) \cdot dZ = 1$$

Gl. II-18

Dass Integral F kann dann in Gl. II-17 (b) eingesetzt werden. Mit der gleichen Substitution wie oben, ergibt sich für $\langle Z \rangle$.

$$\langle Z \rangle = \langle X \rangle + \langle Y \rangle$$

Gl. II-19

Der Mittelwert $\langle Z \rangle$ kann also geschrieben werden, als die Addition der Mittelwerte $\langle X \rangle$ und $\langle Y \rangle$ der Verteilungen $p_x(X)$ bzw. $p_y(Y)$. $\langle Z \rangle$ und F werden in Gl. II-17 (c) eingesetzt. Dies liefert für σ_Z den Zusammenhang aus Gl. II-20.

$$\sigma_Z^2 = \sigma_X^2 + \sigma_Y^2$$

Gl. II-20

Diese Zusammenhänge gelten für jede Faltung unter der Voraussetzung, dass sich der Wertebereich von $-\infty \dots \infty$ erstreckt.

II.2. Grundlagen zum Verhalten von Farbstoffen und dem Abklingverhalten der Fluoreszenz

In kondensierten Phasen verläuft die Fluoreszenzemission im allgemeinen in einem Vier-Stufen Zyklus: (a) elektronische Anregung vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen angeregten elektronischen Zustand S_1 ; (b) interne Relaxation im angeregten Zustand; (c) strahlende oder nicht-strahlende Deaktivierung vom angeregten Zustand zum Grundzustand, bestimmt durch die Lebensdauer des angeregten Zustandes; und (d) interne Relaxation im Grundzustand. Für kleine Moleküle in kondensierter Phase verläuft die Schwingungs- und Rotationsrelaxation im allgemeinen auf der Picosekunden Zeitskala, während die Lebensdauer des angeregten Zustandes im Subnano- bis Nanobereich liegt. Dementsprechend ist der Fluoreszenzzyklus hauptsächlich durch die Absorptions- und Emissionsschritte bestimmt (Abb. II-2).

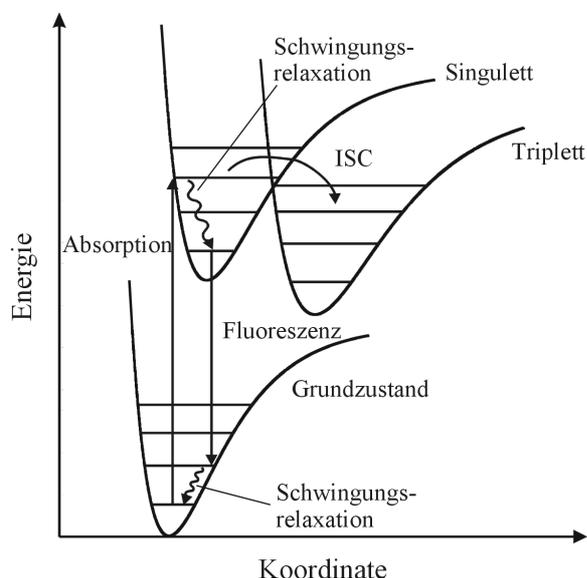


Abb. II-2:
Potentialkurven und Fluoreszenzzyklus eines einzelnen Moleküls. (ISC: *intersystem crossing*).

Gelegentlich kann ein Farbstoffmolekül über intersystem crossing in einen Triplettzustand übergehen (siehe Abb. II-2). Auf der Einzelmolekülebene drückt sich das durch sogenanntes Blinken aus, da der Triplettzustand eine Lebensdauer im μs - bis ms -Bereich hat. Bei der folgenden Behandlung der Fluoreszenzlebensdauer wird das Farbstoffmolekül zur Vereinfachung als Zweiniveausystem behandelt.

Die Übergangsrate k aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand kann für ein einzelnes Farbstoffmolekül als konstant angesehen werden, $k = \text{Const.}$ In diesem Fall lässt sich die Anregungswahrscheinlichkeitsdichte $\rho(t)$ schreiben als.

$$\rho(t) = \exp(-k \cdot t)$$

Gl. II-21

Von $\rho(t)$ kann auf die Wahrscheinlichkeitsdichte $p_e(t)$ geschlossen werden, die angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Photon zum Zeitpunkt t emittiert wird.

$$p_e(t) = k \cdot \rho(t) = k \cdot \exp(-k \cdot t)$$

Gl. II-22

Durchlebt ein Farbstoff mehrere Anregungszyklen in einem gepulsten Lichtfeld und werden die emittierten Photonen und deren zeitlicher Abstand zum entsprechenden Anregungszeitpunkt detektiert, so zeigt ein Histogramm über diese Abstände ein exponentielles Abklingverhalten.

In der Praxis sind die Pulse des Anregungslichtfeldes nicht unendlich schmal, sondern besitzen eine endliche Länge mit der Pulsform $\text{Puls}(t)$. Von $\text{Puls}(t)$ lässt sich auf die Anregungswahrscheinlichkeitsdichte $AW(t)$ schließen.

$$AW(t) \propto \text{Puls}(t)$$

Da der Extinktionskoeffizient eines Farbstoffmoleküls eine zeitunabhängige

Größe ist, wird das Zeitverhalten von $AW(t)$ proportional zu $\text{Puls}(t)$ sein. Um nun $p_{eA}(t)$ zu

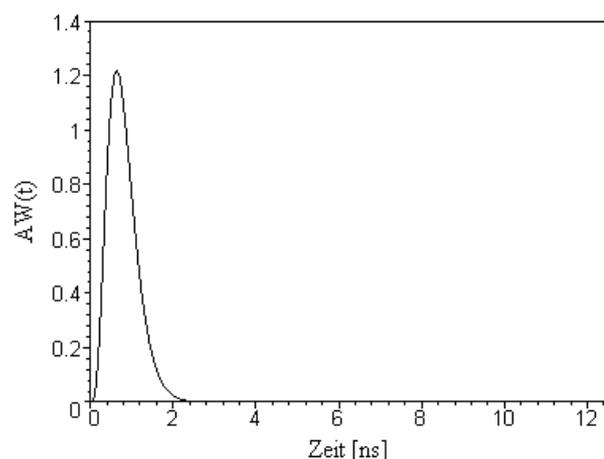


Abb. II-3:
Anregungswahrscheinlichkeitsdichte
 $AW(t)$

berechnen, greift man auf Gl. II-15 zurück. Für die Zeit t , welche angibt, wann ein Photon emittiert wird, nachdem es zum Zeitpunkt t_A angeregt wurde, gilt:

$$t = t_A + t_E$$

Gl. II-23

Die Emissionswahrscheinlichkeit $p_{eA}(t)$ nach endlicher Anregung lässt sich entsprechend schreiben als:

$$p_{eA}(t) = \int_0^t AW(t_A) \cdot p_e(t - t_A) \cdot dt_A$$

Gl. II-24

t_A kann nur Werte zwischen 0 und t annehmen, sonst wäre die Gleichung Gl. II-23 nicht erfüllt. Die Transformation in Gl. II-24 wird als Faltung zwischen der Anregungswahrscheinlichkeitsdichte und der Emissionswahrscheinlichkeitsdichte bezeichnet. In dieser Betrachtung wurde der Einfluss des Detektors vernachlässigt. Wird zu einem festen Zeitpunkt t_0 ein Photon auf den Detektor geschickt, und wird dann die Zeit gemessen, an der das Photon detektiert wird, dann wären die Zeitpunkte, an denen der Detektor anspricht, nicht immer gleich t_0 sondern um t_0 herum verteilt. Dies wird als endliches Ansprechverhalten des Detektors bezeichnet, und die Verteilung dieser Ansprechzeiten ist durch die Wahrscheinlichkeitsdichte $RF(t)$ gegeben. Um nun die Wahrscheinlichkeitsdichte $p(t)$ zu bestimmen, welche die Detektionszeitpunkte eines Photons beschreibt, dass von einem Molekül stammt, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt t_A angeregt wurde und zu einem anderen Zeitpunkt t_E emittiert hat, muss $p_{eA}(t)$ nochmals mit $RF(t)$ gefaltet werden. $p(t)$ wird während dieser Arbeit auch als Grundwahrscheinlichkeit bezeichnet.

$$p(t) = \int_0^t p_{eA}(t') \cdot RF(t - t') \cdot dt'$$

Gl. II-25

Da weder $AW(t)$ noch $RF(t)$ unabhängig voneinander messbar sind, wird eine gemeinsame Wahrscheinlichkeitsdichte $GF(t)$, die auch als Gerätefunktion bezeichnet wird, definiert.

$$GF(t) = \int_0^t AW(t'') \cdot RF(t - t'') \cdot dt''$$

Gl. II-26

Mit deren Hilfe kann $p(t)$ aus Gl. II-25 geschrieben werden als:

$$p(t) = \int_0^t GF(t') \cdot p_H(t-t') \cdot dt'$$

Gl. II-27

Die Funktion $GF(t)$ ist über eine Messung einer nicht fluoreszierenden Streulichtprobe zugänglich.

Bei den oben geführten Überlegungen wurde bisher davon ausgegangen, dass sich die sowohl Anregung, Emission und Detektion in einem unendlich großen Zeitfenster abspielen. Für einen gepulsten Laser als Lichtquelle gilt aber, dass das Zeitfenster eine endliche Größe t_{Max} hat. Die Photonenzeiten t_{Mikro} werden bei einer SPC-Karte in der Regel quasi kontinuierlich abgespeichert (8ps Zeitauflösung). Für die nachgeschaltete Datenanalyse werden die Zeiten aber in diskrete Zeitabschnitten zusammengefasst (typischerweise in 195ps Kanäle). Dies bedeutet, dass sich das Zeitfenster t_{Max} in eine gewisse Anzahl N von Zeitkanälen t_i mit einer Breite Δt aufspaltet. Bei dieser Diskretisierung geht die Grundwahrscheinlichkeitsdichte $p(t)$ aus Gl. II-27 in eine diskrete Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ über.

$$P(t_i) = \int_{t_i - \frac{\Delta t}{2}}^{t_i + \frac{\Delta t}{2}} p(t) \cdot dt$$

$$\int_0^{t_{\text{Max}}} p(t) \cdot dt = 1$$

Gl. II-28

Ein wichtiger Operator ist die Funktion, die einer Exponentialfunktion in einem bestimmten Zeitfenster t_{Max} eine mittlere Zeit T_{Exp} zuordnet.

Wieder werden die zwei Fälle einer diskreten Verteilung $\{P_{\text{Exp}}(t_i)\}$ und einer kontinuierlichen Funktion $p_{\text{Exp}}(t)$ unterschieden.

$$p_{\text{Exp}}(t) = \frac{1}{\tau \cdot [1 - \exp(-\frac{t_{\text{Max}}}{\tau})]} \cdot \exp(-\frac{t}{\tau}), \int_0^{t_{\text{Max}}} p_{\text{Exp}}(t) \cdot dt = 1$$

$$P_{\text{Exp}}(t_i) = \frac{[\exp(-\frac{\Delta t}{2\tau}) - \exp(-\frac{t_i + \Delta t}{2\tau})]}{[1 - \exp(-\frac{N \cdot \Delta t}{\tau})]} \cdot \exp(-\frac{t_i}{\tau}), \sum_{i=1}^N P_{\text{Exp}}(t_i) = 1, t_i = (i-0.5) \cdot \Delta t$$

Gl. II-29

Das Zeitfenster t_{Max} wird so gewählt, dass gilt $t_{Max}=N \cdot \Delta t$.

Der Operator $T_{Exp}^K(p_{Exp})$ bildet dann die Verteilung $p_{Exp}(t)$ auf eine mittlere Zeit T_{Exp}^P ab, und der Operator $T_{Exp}^D(\{P_{Exp}\})$ bildet die Verteilung $\{P_{Exp}(t_i)\}$ auf eine mittlere Zeit $T_{Exp}^{\{P\}}$ ab (siehe Gl. II-29).

$$T_{Exp}^K(p_{Exp}) = T_{Exp}^P(\tau; t_{Max}) = \frac{\tau \cdot [1 - \exp(-\frac{t_{max}}{\tau})] \cdot (\frac{t_{Max}}{\tau} + 1)}{[1 - \exp(-\frac{t_{Max}}{\tau})]}$$

$$T_{Exp}^D(\{P\}) = T_{Exp}^{\{P\}}(\tau; t_{Max}) = \frac{\Delta t \cdot \exp(-\frac{\Delta t}{\tau})}{[1 - \exp(-\frac{\Delta t}{\tau})]} - \frac{N \cdot \Delta t \cdot \exp(-\frac{N \cdot \Delta t}{\tau})}{[1 - \exp(-\frac{N \cdot \Delta t}{\tau})]} + \frac{\Delta t}{2}$$

Gl. II-30

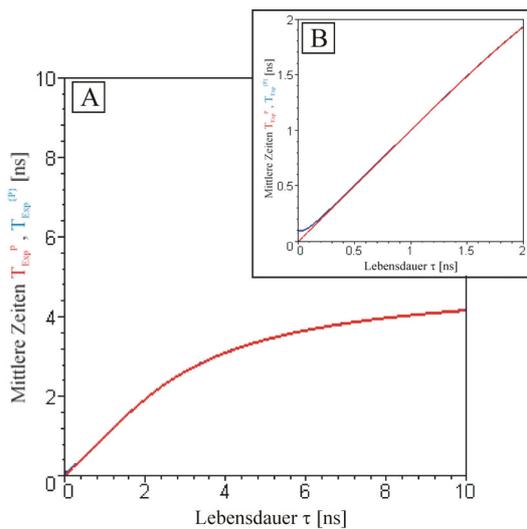


Abb. II-4:
 A: Die Wirkungsweise der Operatoren $T_{Exp}^P(\tau; t_{Max})$ (—) und $T_{Exp}^{\{P\}}(\tau; t_{Max})$ (—) für Lebensdauern von 0 bis 10 ns
 B: Teilausschnitt für Lebensdauern von 0 bis 2ns.
 t_{Max} beträgt 10ns

Die Operatoren aus Gl. II-30 können als ein Projektor einer Lebensdauer in ein Zeitfenster t_{Max} aufgefasst werden. Wenn die mittleren Zeiten $T_{Exp}^P(\tau; t_{Max})$ bzw. $T_{Exp}^{\{P\}}(\tau; t_{Max})$ (siehe Gl. II-30) gegenüber der Lebensdauer aufgetragen werden, ergibt sich das Bild in Abb. II-4.

Deutlich ist zu erkennen, dass die Kurven $T_{Exp}^P(\tau; t_{Max})$ und $T_{Exp}^{\{P\}}(\tau; t_{Max})$ ein typisches Sättigungsverhalten zeigen, was bedeutet, dass, je größer τ wird, T_{Exp}^P und $T_{Exp}^{\{P\}}$ immer mehr gegen einen Wert T_S streben, der durch $t_{Max}/2$ festgelegt ist. Für große Lebensdauern

sind die Werte von T_{Exp}^p und $T_{Exp}^{\{P\}}$ praktisch identisch, nur bei kleinen τ weicht $T_{Exp}^{\{P\}}$ von T_{Exp}^p ab, da der kleinst mögliche Wert für $T_{Exp}^{\{P\}}$ nicht Null sondern $\Delta t/2$ ist.

$$\lim_{\lambda \rightarrow \infty} T_{Exp}^p = \lim_{\lambda \rightarrow \infty} T_{Exp}^{\{P\}} = T_S = t_{Max} / 2$$

$$\lim_{\lambda \rightarrow 0} T_{Exp}^p = 0$$

$$\lim_{\lambda \rightarrow 0} T_{Exp}^{\{P\}} = \Delta t / 2 \quad \text{Gl. II-31}$$

II.3. Die laterale und axiale Auflösung eines konfokalen Mikroskops

Jedes optische Instrument wirkt als beugende Öffnung, und entwirft von einem unendlich entfernten Punkt keinen scharfen Bildpunkt, sondern ein Beugungsbild. Das Beugungsbild einer Punktlichtquelle wird als PSF bezeichnet (*PSF: Point Spread Function*). Das konfokale Mikroskop aus Abb. III-6 ist gleichzusetzen mit einer Abbildung einer Punktlichtquelle auf einen Punktdetektor [16]. Das konfokale Mikroskop reduziert sich dann auf die in Abb. II-5 gezeigte Situation. Im weiteren Verlauf wird das Objektiv durch eine einzige Linse vom Radius a angenähert.

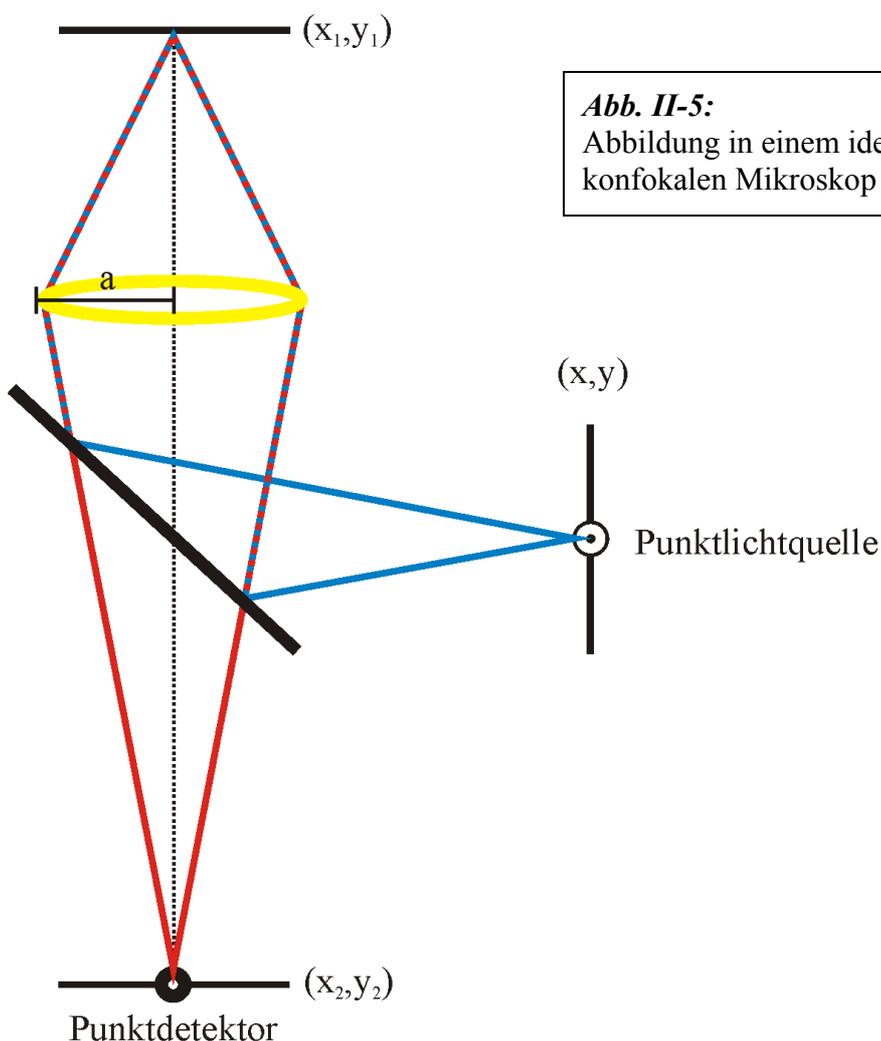


Abb. II-5:
Abbildung in einem idealen
konfokalen Mikroskop

Die Symmetrie eines Mikroskops kann durch Zylinderkoordinaten (ρ, α, z) beschrieben werden. Es wird davon ausgegangen werden, dass die Abbildungseigenschaften des Mikroskops rotationssymmetrisch sind. Auch wird im ersten Schritt die Abhängigkeit von z vernachlässigt. Die Aufgabe besteht darin, das Beugungsbild PSF (siehe Abb. II-5) einer

Punktlichtquelle aus der Ebene (x,y) in der Ebene (x_2,y_2) anzugeben. Mit R_0 wird die Radiale Komponente in Ebene der Apertur der Linse bezeichnet, r bezeichnet die radiale Komponente in der Ebene (x_1,y_1) und R die radiale Komponente in der Ebene (x_2,y_2) . Zur besseren Darstellung werden die hergeleiteten Intensitätsverteilungen in Abhängigkeit von r' bzw. R' angegeben, mit $|r'|=r$ bzw. $|R'|=R$. r' bzw. R' können also auch negative Werte annehmen. Alle hergeleiteten Intensitätsverteilungen sind rotationssymmetrisch um die Position $r'=0$ bzw. $R'=0$. Für die Berechnungen im weiteren Verlauf wird zuerst die Vergrößerung M der Linse gleich 1 gesetzt. Die Abbildung aus der Ebene (x,y) in die Ebene (x_2,y_2) kann in zwei Teilschritte zerlegt werden. Zuerst wirkt das konfokale Mikroskop wie ein Fernrohr (blauer Strahlengang in Abb II.5) indem es einen Punkt $P(x,y)$ aus (x,y) in (x_1,y_1) abbildet. Die Impulsantwort $h_1(v)$ des Fernrohrs in der Ebene (x_1,y_1) können in Zylinderkoordinaten geschrieben werden als:

$$h_1(v) = \frac{\int_0^{2\pi} \int_0^1 A(\delta) \cdot J_0(v \cdot \delta) \cdot d\alpha \cdot \delta \cdot d\delta}{\int_0^{2\pi} \int_0^1 d\alpha \cdot \delta \cdot d\delta} = 2 \cdot \int_0^1 A(\delta) \cdot J_0(v \cdot \delta) \cdot \delta \cdot d\delta \quad \text{Gl. II-32}$$

Dabei wird angenommen, dass jeder Punkt auf der Linse eine ebene Welle aussendet. v und δ sind jeweils normierte dimensionslose Größen (siehe Gl. II-33). Die Größe v wird in Abhängigkeit von r' angegeben:

$$\delta = \frac{R_0}{a}, 0 \leq \delta \leq 1$$

$$v = \frac{2\pi \cdot NA}{\lambda} \cdot r' \quad \text{Gl. II-33}$$

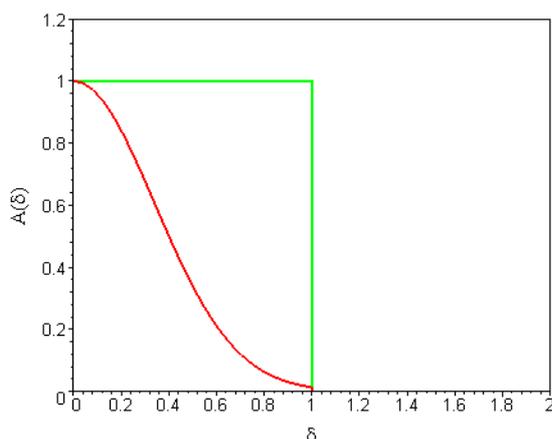


Abb. II-6:

(—): $A(\delta)$ für gleichmäßige Beleuchtung
 (—): $A(\delta)$ für eine Beleuchtung mit einem rotationssymmetrischen Gaussprofil.

$A(\delta)$ stellt die Aperturfunktion dar, die angibt, wie die Apertur der Linse ausgeleuchtet ist. Wird angenommen, dass die Linse gleichmäßig beleuchtet ist, so gilt: $A(\delta)=1$ für $0 \leq \delta \leq 1$, und $A(\delta)=0$ für alle anderen δ . Ein solches $A(\delta)$ stellt die Kurve (—) in Abb. II-6 dar.

$J_0(v \cdot \delta)$ in Gl. II-33 steht für die Besselfunktion 0-ter Ordnung. Die Gl. II-33 lässt sich analytisch lösen und ergibt für die Impulsantwort $h_1(v)$:

$$h_1(v) = 2 \cdot \frac{J_1(v)}{v} \quad \text{Gl. II-34}$$

Für die Intensitätsverteilung $I_1(v)$ in der Ebene (x_1, y_1) gilt:

$$I_1(v) = |h_1(v)|^2 = \left| 2 \cdot \frac{J_1(v)}{v} \right|^2 \quad \text{Gl. II-35}$$

$J_1(v)$ steht für die Besselfunktion 1-ter Ordnung. $I_1(v)$ aus Gl. II-35 ist in Einheiten von v in Abb. II-7 aufgetragen. Die erste Nullstelle von $I_1(v)$ liegt bei $v=3.832$.

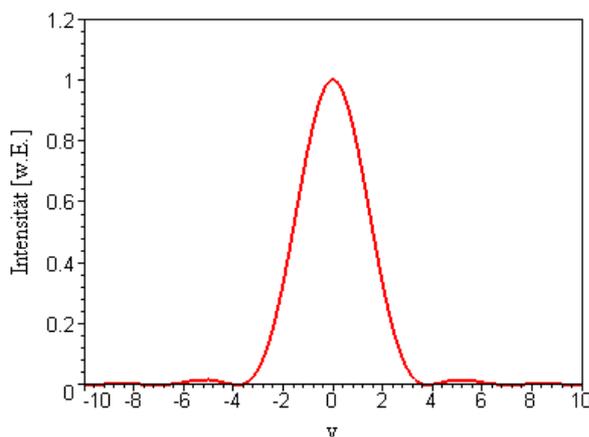


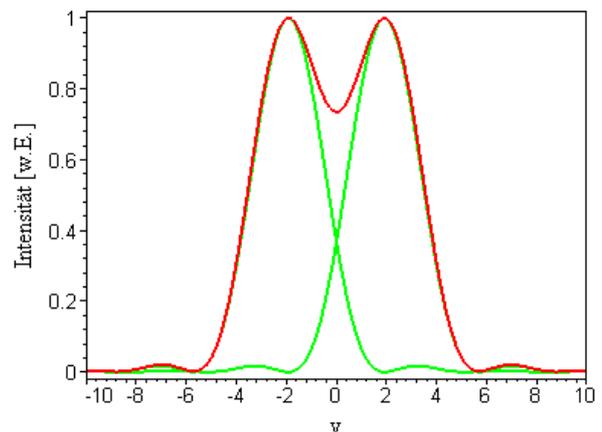
Abb. II-7:
 $I_1(v)$ für das $A(\delta)$ (—) aus Abb. III-5

Die Verteilung $I_1(v)$ stellt das Beugungsbild für eine Punktlichtquelle in einem konventionellen Mikroskop dar. Will man zwei Punktlichtquellen in einem konventionellen Mikroskop auflösen, dann müssen die Punkte gerade einen Abstand von $\Delta v=3.832$ haben. Die zweite Punktquelle muss in der ersten Nullstelle der Intensitätsverteilung der ersten Punktquelle liegen. Wird Δv über Gl. II-33 auf die reale Größe r' umgerechnet, dann ergibt sich ein $\Delta r=0.61 \cdot \lambda / \text{NA}$.

In Abb. II-8 ist die Überlagerung $I_{\cup}(v)$ (siehe (—) in Abb. II-8) von $I_1(v-\Delta v/2)$ und $I_1(v+\Delta v/2)$ (siehe (—) in Abb. II-8) dargestellt, $I_{\cup}(v)=I_1(v-\Delta v/2)+I_1(v+\Delta v/2)$. $I_1(v-\Delta v/2)$ steht für eine Punktlichtquelle an der Position $-\Delta v/2$ und $I_1(v+\Delta v/2)$ steht für eine Punktlichtquelle an der Position $+\Delta v/2$. $I_{\cup}(v)$ nimmt für $v=0$ einen Wert von 0.735 an. Das in Abb. II-8 dargestellte Verhalten wird als Rayleigh-Kriterium bezeichnet. Zwei Punktlichtquellen sind demnach dann auflösbar, wenn das lokale Minimum zwischen den Punktpositionen 73.5% von der Maximalintensität beträgt.

Abb. II-8:

(—): Die Überlagerung $I_{\cup}(v)$ von zwei Punktlichtquellen mit einer Intensitätsverteilung $I_1(v\pm\Delta v/2)$ aus GL. III-4



Das Rayleigh-Kriterium dient später dazu, für ein konfokales Mikroskop den Abstand Δv_{konf} zu bestimmen. Um das Beugungsbild PSF eines konfokalen Mikroskops angeben zu können, muss zusätzlich der rote Strahlengang aus Abb. II-5 berücksichtigt werden. In dieser Abbildung wird ein Objekt aus der Ebene (x_1, y_1) in die Ebene (x_2, y_2) transformiert. $h_1(v)$ in der Ebene (x_1, y_1) stellt dabei die Impulsantwort auf eine Punktlichtquelle in der Ebene (x, y) dar. Gefragt ist nach der Impulsantwort $h_2(V)$, mit $V=(2\pi \cdot \text{NA}/\lambda) \cdot (R'/M)$, in der Ebene (x_2, y_2) , wenn in der Ebene (x_1, y_1) eine Punktlichtquelle liegt. Da $M=1$ angenommen wurde, gilt $v=V$. Der rote und blaue Strahlengang in Abb. II-5 sind identisch, da mit der gleichen Linse abgebildet wird. Daraus folgt, dass für die Impulsantwort $h_2(V)=h_2(v)$ gilt:

$$h_2(v) = h_1(v) \\ \Rightarrow I_2(V) = I_2(v) = I_1(v)$$

Gl. II-36

Da die Gleichheit zwischen $h_2(v)$ und $h_1(v)$ gilt, müssen auch die Intensitätsverteilungen $I_1(v)$ und $I_2(V)=I_2(v)$ identisch sein. Für die kombinierte Impulsantwort $h_{12}(v)$ gilt.

$$h_{12}(v) = h_1(v) \cdot h_2(v)$$

Gl. II-37

Aus $h_{12}(v)$ lässt sich die resultierende Intensitätsverteilung $I_{12}(v)$ bestimmen, die das Beugungsbild einer in der Ebene (x,y) befindlichen Punktlichtquelle in der Ebene (x_2,y_2) beschreibt.

$$I_{12}(v) = |h_{12}(v)|^2 = |h_1(v) \cdot h_2(v)|^2 = I_1(v) \cdot I_2(v) = \left| 2 \cdot \frac{J_1(v)}{v} \right|^4$$

Gl. II-38

In Abb. II-9 ist $I_{12}(v)$ (—) aus Gl. II-38 und $I_1(v)$ (○) aus Gl. II-35 aufgetragen. $I_{12}(v)$ ist deutlich schmaler als $I_1(v)$ ist, und die Nebenmaxima sind bei $I_{12}(v)$ stark unterdrückt.

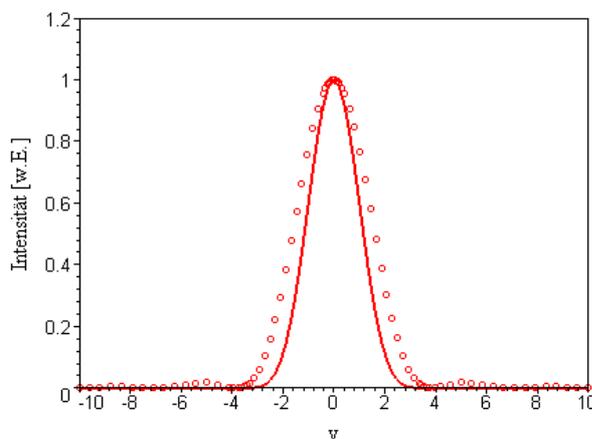
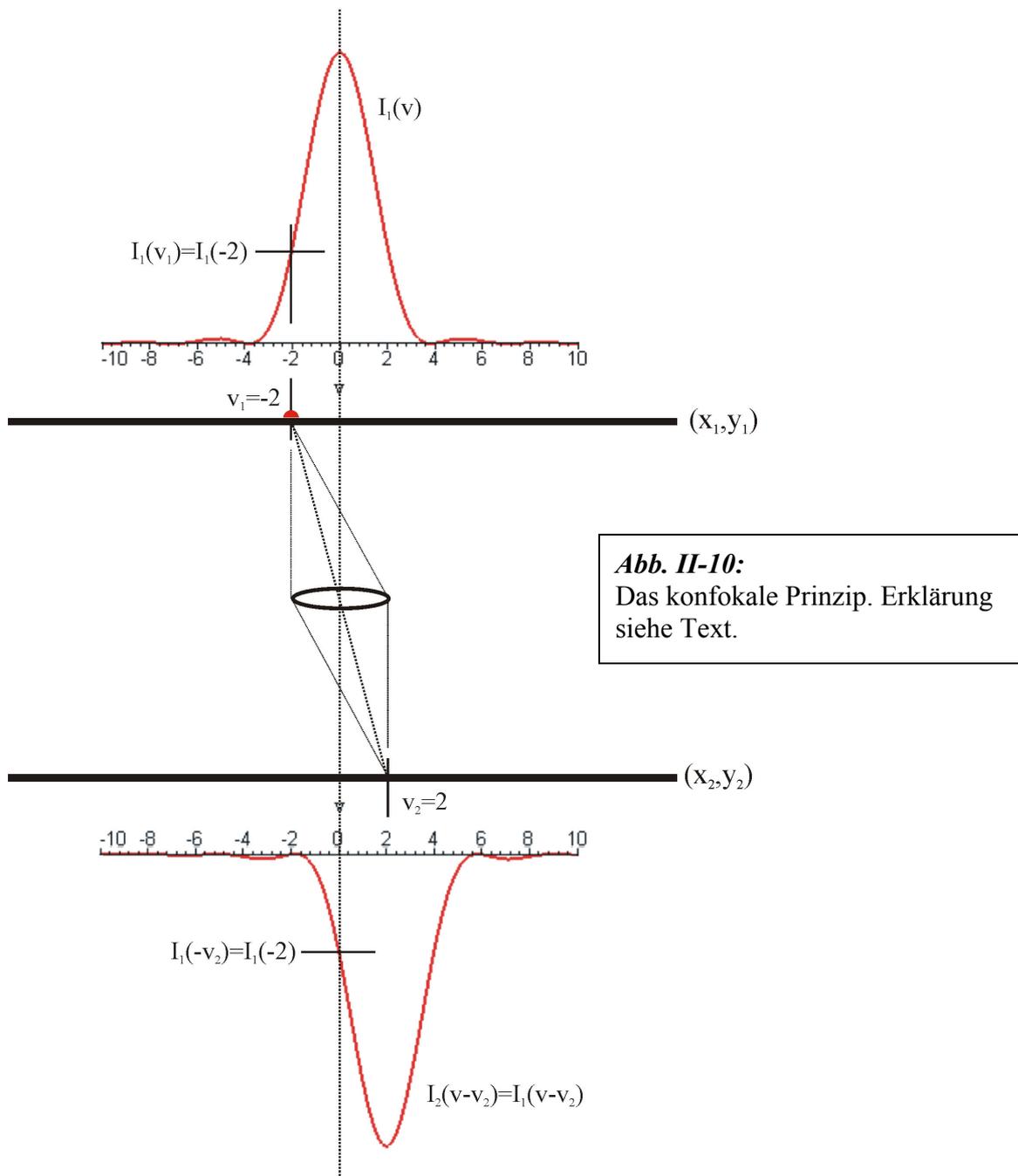


Abb. II-9:

(—): $I_{12}(v)$ aus Gl. II-38

(○): $I_1(v)$ aus Gl. II-35

Bis jetzt wurde die Ebene (x_1,y_1) als eine Spiegelebene angesehen. Wie sieht aber die Intensitätsverteilung in der Ebene (x_2,y_2) aus, wenn sich in der Ebene (x_1,y_1) eine mit Farbstoffen belegte Probe befindet (Abb. II-10). Die Probe kann mit einer Verschiebeeinheit lateral verschoben werden. Ein Farbstoffmolekül befindet sich an der Position $v_1=-2$ in der Ebene (x_1,y_1) , und wird über das Intensitätsprofil $I_1(v)$ der Punktlichtquelle angeregt. $I_1(v)$ hat bei $v_1=-2$ die Intensität $I_1(-2)$. Der Farbstoff absorbiert in einer bestimmten Zeit $N \cdot I_1(-2)$ und emittiert $N' \cdot I_1(-2)$ Photonen. Über das Objektiv wird der Farbstoff, der aufgrund seiner geringen Größe als Punktlichtquelle aufgefasst werden kann, auf das Beugungsbild $N' \cdot I_1(-2) \cdot I_2(v-v_2)$ in der Ebene (x_2,y_2) abgebildet. Hier gibt $v_2=2$ das Zentrum der Verteilung $I_2(v-v_2)$ an. Am Ort des Punktdetektors bei $V=v=0$ hat das Beugungsbild des Moleküls die Intensität $N' \cdot I_1(-2) \cdot I_2(-2)$ (siehe Abb. II-10).



Wird mit dem Molekül die ganze Fläche (x_1, y_1) abgetastet, und für jede Position v_1 des Moleküls die Intensität $N \cdot I_1(v_1) \cdot I_2(v_1)$ am Detektor gemessen und gegenüber v_1 aufgetragen. Dann ergibt sich ein Intensitätsverlauf, dessen Form durch $I_{12}(v)$ beschrieben wird. $I_{12}(v)$ stellt somit die PSF für ein Molekül in einem idealen konfokalen Mikroskop dar. Ein ideales konfokales Mikroskop besteht aus einer Punktlichtquelle und einem Punktdetektor. Abb. II-10

beschreibt somit das konfokale Prinzip. Das konfokale Prinzip besagt, dass mit Hilfe einer Punktquelle eine Fläche Punkt für Punkt abgebildet werden kann.

Aus $I_{12}(v)$ kann unter Berücksichtigung des Rayleigh-Kriteriums der minimale Abstand Δv_{konf} bestimmt werden, den zwei Moleküle haben können, damit sie gerade noch aufgelöst werden können. Für Δv_{konf} ergibt sich 2.77. Über die Gl. II-33 kann Δv_{konf} auf einen tatsächlichen Abstand Δr_{konf} umgerechnet werden (siehe Gl. II-39).

$$\Delta r_{\text{konf}} = \frac{\lambda}{2\pi \cdot NA} \cdot \Delta v_{\text{konf}} = 0.44 \cdot \frac{\lambda}{NA}$$

Gl. II-39

Für eine Wellenlänge von $\lambda=670\text{nm}$ und einer Numerischen Apertur von $NA=1.4$ ergibt sich ein Δr_{konf} von 211nm . Das Δr_{konf} aus Gl. II-39 stellt das theoretische Minimum für die Auflösungsgrenze in einem idealen konfokalen Mikroskop dar. Bei gleichem λ und gleicher NA ergibt sich in einem konventionellen Mikroskop ein Δr von 291nm .

Bei realen konfokalen Mikroskopen kann niemals davon ausgegangen werden, dass mit einem Punktdetektor gearbeitet wird. Die aktive Fläche des Detektors hat eine gewisse Ausdehnung. Limitiert wird die aktive Fläche durch eine Lochblende, mit einem Durchmesser D_L . Die Vergrößerung M wurde bis jetzt gleich 1 gesetzt. Bei den verwendeten Objektivs in einem realen Mikroskop liegt M bei 100. Daraus folgt, dass V nicht mehr gleich v ist. Die Intensitätsverteilungen $I_1(v)$ bzw. $I_2(V)$ müssen daher zuerst einmal auf die Verteilungen ${}_r I_1(r')$ bzw. ${}_R I_2(R')$ (siehe Gl. II-40) zurückgerechnet werden, um die PSF eines Moleküls in einem realen Mikroskop zu berechnen.

$$\begin{aligned} {}_r I_1(r') &= I_1\left(\frac{2\pi \cdot NA}{\lambda} \cdot r'\right) \\ {}_R I_2(R') &= I_2\left(\frac{2\pi \cdot NA}{\lambda} \cdot \frac{R'}{M}\right) \\ R' &= M \cdot r' \end{aligned}$$

Gl. II-40

In $I_2(R')$ aus Gl. II-40 wird die Wellenlänge λ in Einheiten von μm angegeben.

Das konfokale Prinzip stellt sich in einem realen Mikroskop wie in Abb. III-8 dar. Befindet sich ein Molekül an der Position r_1' , z.B. $r_1'=-100\text{nm}$, dann sendet dieses $N \cdot {}_r I_1(r_1')$ Photonen

aus. In der Ebene (x_2, y_2) werden die Photonen auf ein Beugungsbild $N' \cdot ({}_r I_1(r_1')) \cdot ({}_R I_2(R_2' - R_2'))$ verteilt, $R_2' = 10 \mu\text{m} = M \cdot r_1'$. Die gemessene Intensität ist gegeben durch:

$$PSF(r_1') = N' \cdot ({}_r I_1(r_1')) \cdot \int_{-D_L/2}^{D_L/2} {}_R I_2(R' - R_2') \cdot dR' \quad \text{Gl. II-41}$$

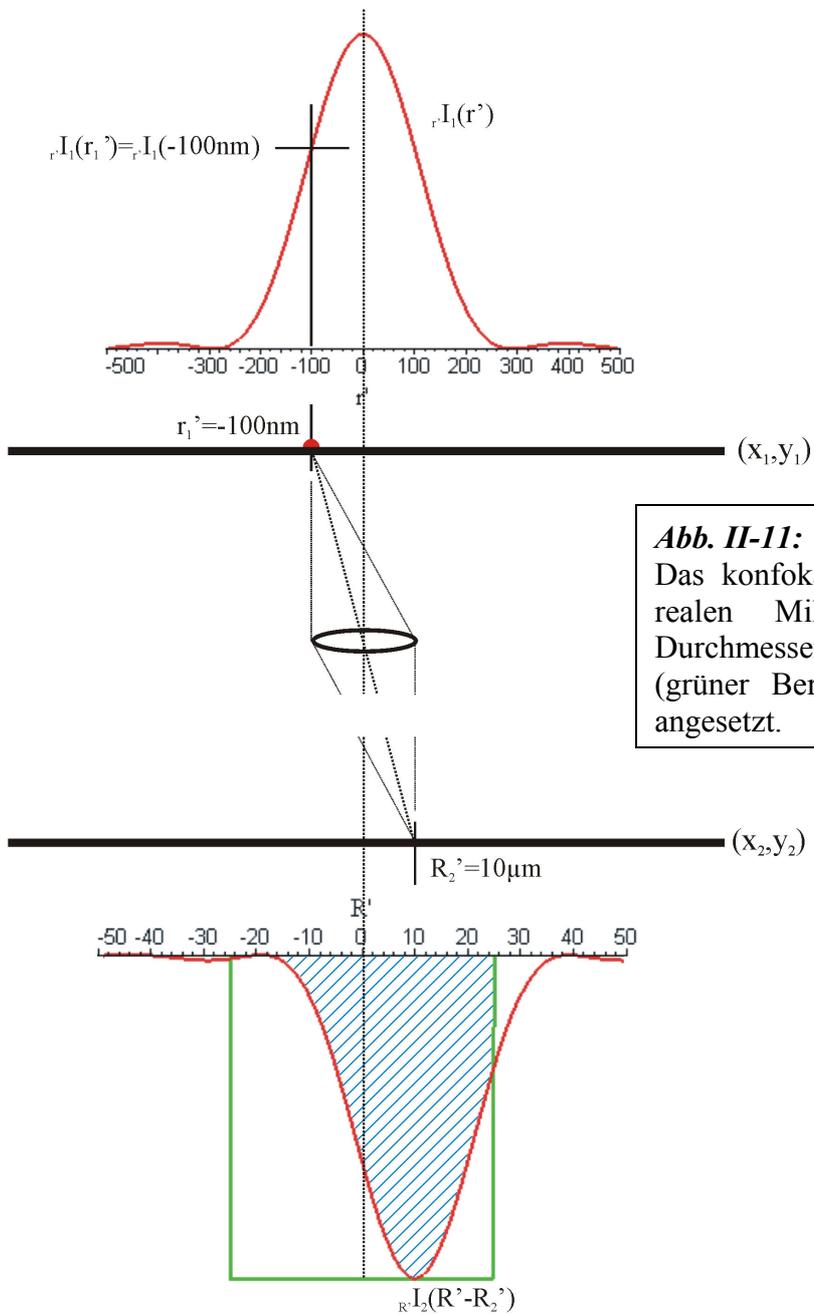


Abb. II-11:
Das konfokale Prinzip in einem realen Mikroskop. Für den Durchmesser der Lochblende (grüner Bereich) wurden $50 \mu\text{m}$ angesetzt.

Das Beugungsbild $R \cdot I_2(R'-R_2')$ muss über die radiale Ausdehnung, gekennzeichnet durch den grünen Bereich in Abb. III-10, der Lochblende integriert werden (blau schraffierter Bereich in Abb. II-11)

Wird wieder die ganze Fläche (x_1, y_1) durch das Molekül abgetastet dann ergibt sich für die gemessenen Intensitätsverteilung $PSF(r')$ (—) des Moleküls der in Abb. II-12 dargestellte Verlauf, ($\lambda=0.670\mu\text{m}$, $NA=1.4$, $M=100$, $D_L=50\mu\text{m}$). Die Halbwertsbreite von $PSF(r')$ $\Delta r_{0,5}$ beträgt 232nm. Das Farbstoffmolekül wird nicht kontinuierlich bewegt, sondern nur in diskreten Schritten durch die Ebene (x_1, y_1) gefahren wird. Damit sind für die Positionen r' nicht alle Werte möglich, r' liegt diskret vor. Der Abstand zwischen den einzelnen Positionen, die das Farbstoffmolekül annehmen kann, liegt bei 50nm. Die mögliche Werte für r' sind gegeben mit $r'=0, \pm 50\text{nm}, \pm 100\text{nm}$. Die $PSF(r')$ ist aus diesem Grund keine kontinuierliche Verteilung, sondern liegt diskret vor (siehe (□) Abb. II-12).

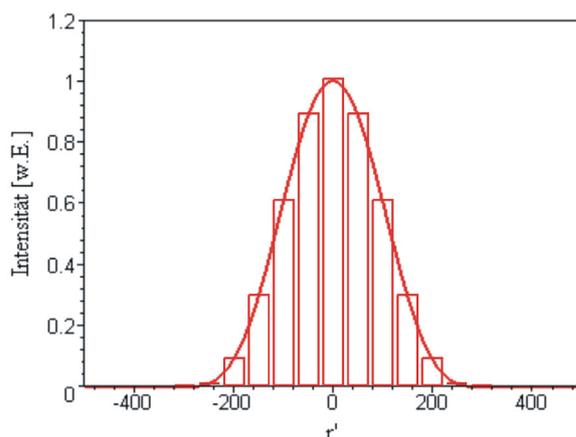


Abb. II-12:

(—): kontinuierliche Verteilung $PSF(r')$
 (□): diskrete Verteilung von $PSF(r')$ an den Positionen $r'=0, \pm 50\text{nm}, \pm 100\text{nm}$
 ...

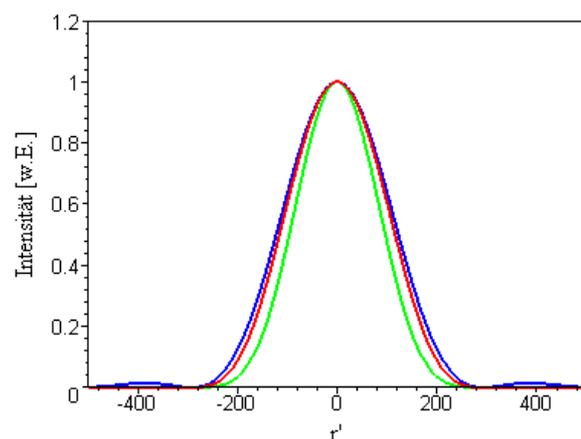
($\lambda=0.670\mu\text{m}$, $NA=1.4$, $M=100$,
 $D_L=50\mu\text{m}$)

Je kleiner der Durchmesser der Lochblende vor dem Detektor gewählt wird umso besser wird die Auflösung. Werden drei verschiedene Lochblenden betrachtet mit einem Durchmesser von 25 μm , 50 μm und 100 μm , dann ergibt für die verschiedenen $PSF(r')$ das in Abb. II-13 gezeigte Verhalten [16].

Abb. II-13:

Die Verteilung $PSF(r')$ für drei verschiedene Durchmesser D_L der Lochblende.

(—): $D_L=25\mu\text{m}$
 (—): $D_L=50\mu\text{m}$
 (—): $D_L=100\mu\text{m}$



Bei einer gegebenen Laserleistung und einer festen Quanteneffizienz des Farbstoffes, nimmt die gemessene Intensität am Detektor ab, wenn der Durchmesser der Lochblende verringert wird. Das Integral über die Verteilung ${}_R I_2(R'-R_2')$ in Gl. II-41 wird kleiner wenn D_L abnimmt. Den besten Kompromiss zwischen gemessener Intensität und Auflösung stellt ein $D_L=50\mu\text{m} - 100\mu\text{m}$ dar.

Für die in Abb. II-12 gezeigte Verteilung $\text{PSF}(r')$ wurde immer noch vorausgesetzt, dass die Apertur des Objektivs gleichmäßig beleuchtet wird. Bekanntlich zeigt ein radialer Querschnitt durch den Laserstrahl aber keine gleichverteilten Intensitätsverlauf. Sondern der Intensitätsverlauf wird in der Regel durch eine rotationssymmetrische Gaussverteilung beschrieben. Dadurch verändert sich die Aperturfunktion $A(\delta)$ aus Gl. II-32. $A(\delta)$ ist gegeben durch Gl. II-42. In Abb. II-6 (—) ist $A(\delta)$ für ein Gaussprofil mit einem $\omega_\delta=0.68$ dargestellt. Setzt man dieses $A(\delta)$ in Gl. II-42 ein, dann verbreitert sich die Impulsantwort $h_1(v)$ bzw. die Intensitätsverteilung $I_1(v)$ auf $h_1^G(v)$ bzw. $I_1^G(v)$.

$$A(\delta) = \exp\left(-2 \cdot \frac{\delta^2}{\omega_\delta^2}\right) \text{ für } 0 \leq \delta \leq 1$$

$$A(\delta) = 0 \text{ sonst}$$

Gl. II-42

Die Intensitätsverteilung $I_2(V)$ bleibt unverändert, da für die Abbildung von der Ebene (x_1, y_2) in die Ebene (x_2, y_2) das Laserprofil keine Rolle mehr spielt. Ein breiteres $I_1^G(v)$ führt automatisch zu einer breiteren Verteilung ${}_R I_1^G(r')$ und schließlich zu einer breiteren $\text{PSF}^G(r')$. Für das $A(\delta)$ mit einem $\omega_\delta=0.68$ ergibt sich die in Abb. II-14 (—) dargestellte Verteilung $\text{PSF}^G(r')$ mit einem $\Delta r_{0.5}$ von 324nm. (○) zeigt die $\text{PSF}(r')$ für eine gleichmäßige Beleuchtung.

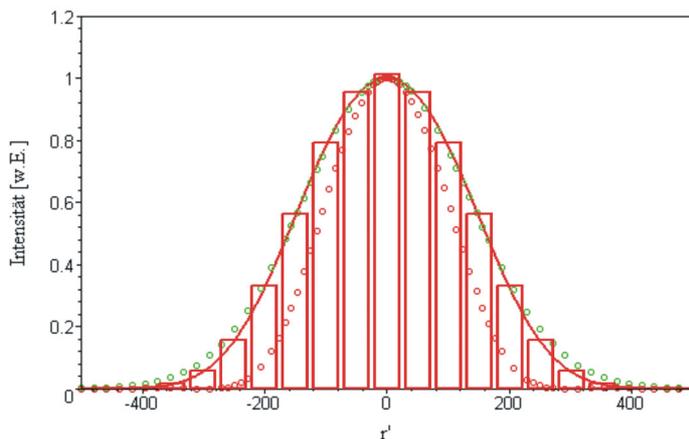


Abb. II-14:

- (—): $\text{PSF}^G(r')$
- (○): $\text{PSF}(r')$ aus Abb. II-12
- (●): Gaussfunktion mit gleichem $\Delta r_{0.5}=324\text{nm}$ wie $\text{PSF}^G(r')$
- (□): diskrete Verteilung von $\text{PSF}^G(r')$

Die Kurve (○) zeigt das zeigt eine Gaussfunktion mit einer gleichen Halbwertsbreite $\Delta r_{0.5}$ wie die Verteilung $\text{PSF}^G(r')$. Eine solche Gaussfunktion beschreibt die Kurve $\text{PSF}^G(r')$ gut. Erst für r' mit $|r'| > 250\text{nm}$ kommt es zu einer deutlichen Abweichung. Das Balkendiagramm (□) zeigt die diskrete Verteilung von $\text{PSF}^G(r')$.

Somit ergibt sich unter den diskutierten Annahmen eine Auflösung Δr_{real} im realen konfokalen Mikroskop von 381nm. Δr_{real} kann auch in Abhängigkeit von $\Delta r_{0.5}$ angegeben werden.

$$\Delta r_{\text{real}} = 1.18 \cdot \Delta r_{0.5} = 381\text{nm}$$

Gl. II-43

Δr_{real} ist berechnet für $\lambda=670\text{nm}$, $\text{NA}=1.4$ und $D_L=50\mu\text{m}$. Werden die analogen Berechnungen für ein $D_L=100\mu\text{m}$ durchgeführt, ergibt sich ein $\Delta r_{0.5}=380\text{nm}$ und eine Auflösung Δr_{real} von 456nm.

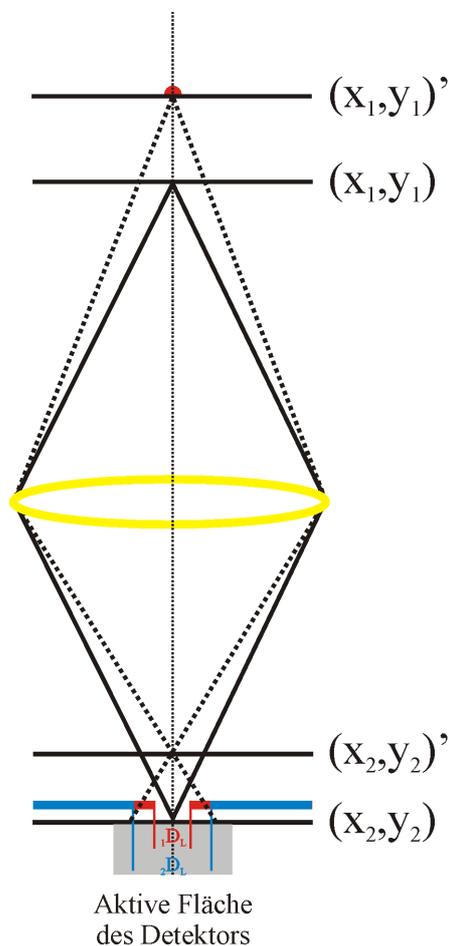


Abb. II-15:
Axiale Auflösung eines konfokalen Mikroskops

Die Größe der Lochblende limitiert nicht nur die laterale Auflösung des konfokalen Mikroskops, sondern auch dessen axiale Auflösung. Die in Abb. II-15 dargestellte Situation tritt ein, wenn ein 3-dimensionaler Raum durch ein Farbstoffmolekül abgetastet wird.

Befindet sich das Farbstoffmolekül in der Ebene $(x_1, y_1)'$ an der durch den roten Halbkreis markierten Position, dann bildet das Objektiv die Fluoreszenz auf das Beugungsbild $\text{PSF}^G(r')$ in die Ebene $(x_2, y_2)'$ ab. In der Ebene (x_2, y_2) des Detektors ist das Beugungsbild der Farbstofffluoreszenz breiter als in der Ebene $(x_2, y_2)'$. Befindet sich vor der aktiven Fläche des Detektor eine Lochblende mit dem Durchmesser ${}_1D_L$, dann blockt dieses einen großen Teil der Fluoreszenz. Eine Lochblende mit dem Durchmesser ${}_2D_L$, ${}_2D_L > {}_1D_L$, lässt die gesamte Fluoreszenzintensität auf den Detektor. Umso größer die Lochblende gewählt wird, desto geringer wird die axiale Auflösung Δz des konfokalen Mikroskops. Im Fall eines idealen konfokalen Mikroskops ist die axiale Auflösung gegeben durch Gl. II-44:

$$\Delta z = 1.4 \cdot \frac{\lambda \cdot n}{NA^2}$$

Gl. II-44

Für $\lambda=670\text{nm}$, $NA=1.4$ und $n=1.51$ ergibt sich ein Δz von 722nm .

Der Vorteil eines konfokalen Mikroskop gegenüber einem konventionellen Mikroskop liegt in seiner besseren lateralen und axialen Auflösung.

Die in dieser Arbeit erarbeitete Kolokalisationstheorie basiert auf der in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Sauer und Prof. Dr. J. Wolfrum entwickelten, einzelmolekülempfindlichen und spektral aufgelösten Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (Spectrally-resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy SFLIM) [48]. Daher wird in diesem Teil der SFLIM Aufbau erläutert. Dieser besteht im wesentlichen aus einem inversen Mikroskop, in das über einen Strahlteiler ein Laserstrahl als Anregungsquelle eingekoppelt wird. Das Objektiv dient sowohl zur Anregung, als auch zum Sammeln des Fluoreszenzlichtes, welches über einen dichroitischen Strahlteiler vom Anregungslicht getrennt wird. Anschließend werden die Fluoreszenzphotonen auf zwei Avalanche Photodioden detektiert. Neben dem Aufbau sind die verwendeten Farbstoffe von entscheidender Bedeutung. Daher werden zunächst die Farbstoffe und insbesondere die Kriterien, die Farbstoffe zu geeigneten Kandidaten für Kolokalisationsmessungen mit einzelnen Molekülen machen, beschrieben.

III.1. Die verwendeten Farbstoffe

Für die Einzelmolekülspektroskopie geeignete Farbstoffe müssen sich durch folgende Eigenschaften auszeichnen: (i) einen hohen Extinktionskoeffizienten ϵ bei der Anregungswellenlänge λ , (ii) eine hohe Quantenausbeute für Fluoreszenz Φ_f sowie (iii) eine

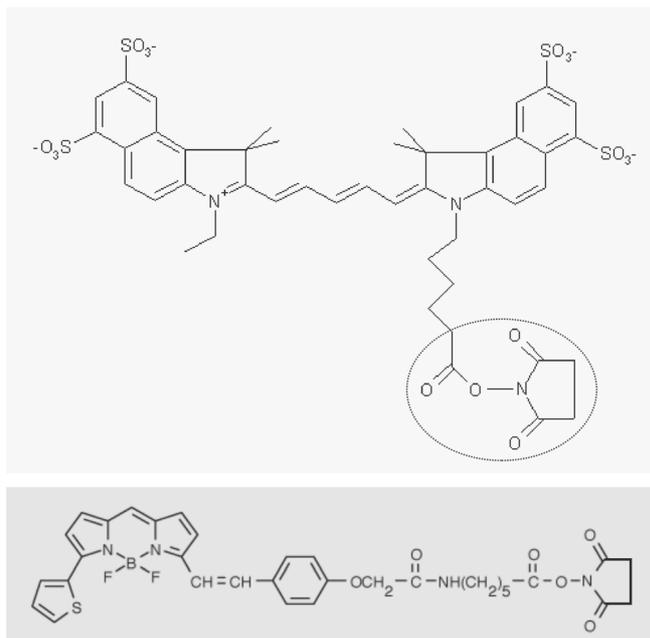


Abb. III-1:

Struktur von Cy5.5 (hell grau unterlegte Fläche). Der markierte Bereich stellt den NHS-Ester dar.

In der dunkel grau unterlegten Fläche ist die Struktur von Bodipy630/650 gezeigt.

hohe Photostabilität. Kürzlich wurden eine Reihe einzelmolekülauglicher Farbstoffe für den Einsatz in hochaufgelösten Kolokalisationsmessungen auf Basis von SFLIM getestet

[37,40,41,48]. Ein insbesondere für Kolokalisationsmessungen auf Basis der Fluoreszenzseparation wichtiges Ergebnis im Rahmen der Erforschung einzelner Farbstoffe auf Oberflächen war, dass Fluoreszenzlebensdauer und Spektrum unabhängige, nicht-korrelierte Eigenschaften einzelner Farbstoffe sind [36]. Dies ist die Voraussetzung, dass die Fluoreszenzlebensdauer und die spektrale Information unabhängig voneinander verwendet werden können, um jedes einzelne Fluoreszenzphoton einem Farbstoff zuzuordnen. Ein für Kolokalisationsmessungen gutes Farbstoffpaar zeichnet sich dadurch aus, dass die Farbstoffe möglichst unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern und unterschiedliche Emissionsmaxima aufweisen. Bei Vorarbeiten kristallisierte sich heraus, dass besonders das Farbstoffpaar Bodipy630/650 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) und Cy5.5 (Amersham Life Science, Braunschweig) für Kolokalisationsmessungen geeignet ist (für Strukturformeln siehe Abb. III-1). Absorptions- und Emissionsspektren des Farbstoffpaares Bodipy630/650 und Cy5.5 sind in Abb. III-2 dargestellt. Obwohl die Emissionsmaxima der beiden Farbstoffe um ca. 45 nm auseinanderliegen, lassen sie sich dennoch mit vergleichbarer Effizienz bei der Laserwellenlänge von 635 nm anregen. Grund dafür ist der hohe Extinktionskoeffizient von ca. $250000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ der Carbocyaninfarbstoffe. BodiPy630/650 hat einen Extinktionskoeffizient von ca. $100000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Quantenausbeute der Farbstoff liegen bei 0.25 (Cy5.5) und 0.9 (BodiPy). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Emissionseigenschaften lässt sich die Fluoreszenz der beiden Farbstoffe recht gut spektral trennen. Für die bessere Zuordnung jedes einzelnen Photons soll zudem die

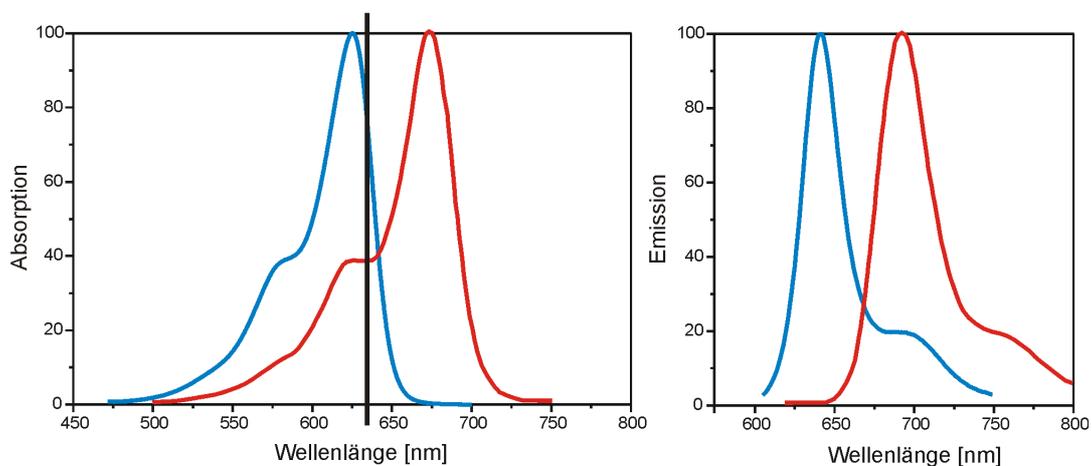


Abb. III-2:
Absorptions- und Emissionsspektren von Bodipy630/650 (blau) und Cy5.5 (rot). Bei den Absorptionsspektren ist zusätzlich die Anregungswellenlänge markiert.

Information der Fluoreszenzlebensdauer verwendet werden. Cy5.5 hat, immobilisiert auf trockener Oberfläche, eine Fluoreszenzlebensdauer von ca. 1.8 ns, während Bodipy630/650 eine Fluoreszenzlebensdauer von ca. 4.2 ns aufweist. Die verwendeten Oberflächen bestehen entweder aus dünnen Glasplättchen, die bevor die Farbstoffe aufgebracht werden mit 1%iger wässriger Lösung von 3-Aminopropyl-triethoxysilane (*APS*) behandelt werden. Oder die Farbstoff werden in eine Agarose-Matrix eingebettet, die über ein Spin-Coating Verfahren auf ein unbehandeltes Glasplättchen verteilt wird. Um die Farbstoff in die Agarose einzubringen, wird diese erhitzt (30-40°C). Weitere wichtige Kriterien für die Auswahl der Farbstoffe sind ihre Biokompatibilität (d.h. Löslichkeit in Wasser, Koppelbarkeit an Biomoleküle), sowie ihr photophysikalisches Verhalten. Beispielsweise ist bekannt, dass Carbocyaninfarbstoffe in Abwesenheit von Sauerstoff lange Triplettzustände im ms-Bereich zeigen [21,48,49,50,51]. Ausserdem ist aufgrund der flexiblen Polymethinkette des Cy5.5 eine cis-trans-Isomerisierung möglich. Nur das trans-Isomer ist jedoch fluoreszent [52]. Bei dem Bodipyfarbstoff wurden auf Einzelmolekülebene vornehmlich seltene und längere Auszeiten im Bereich vieler Millisekunden gefunden [37]. Die verwendeten Farbstoffe lassen sich über NHS-Ester (siehe Abb. III-1) an Aminogruppen binden.

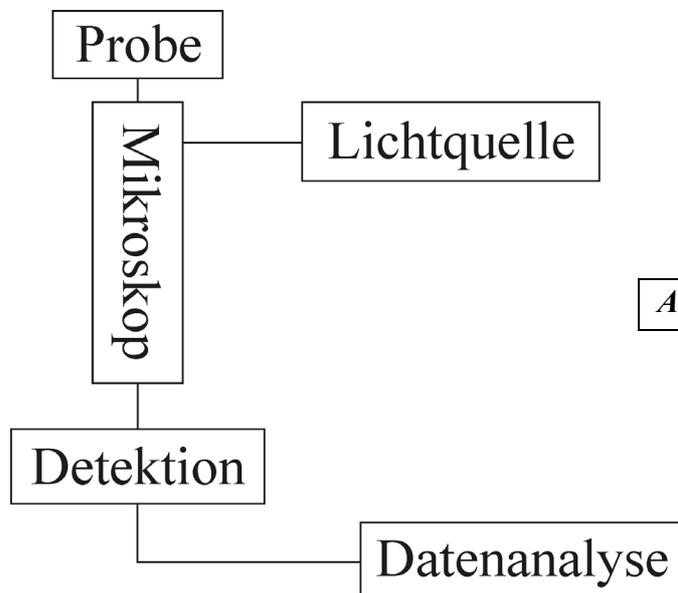


Abb. III-3: SFLIM-Aufbau

Eine Kolokalisationstheorie stellt die mathematische Formulierung einer Datenstruktur dar. Die Datenstruktur ist aber charakteristisch für den Messaufbau. Daher muss, bevor in den Kapiteln IV und V eine Beschreibung für eine spektral und zeitaufgelöste Kolokalisationstheorie entwickelt wird, zuerst einmal die Datenstruktur eines SFLIM-

Aufbaus (*SFLIM: Spectrally resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) erklärt werden. Schematisch kann ein SFLIM-Aufbau in die in Abb. III-1 dargestellten Komponenten gegliedert werden.

Ein SFLIM-Aufbau besteht aus einer Lichtquelle und einem Mikroskop, in das die Lichtquelle eingekoppelt wird. Das Anregungslicht wird mit Hilfe eines Objektivs auf die zu untersuchende Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht der Probe wird über das gleiche Objektiv auf die Detektionseinheit gelenkt, die dann mit Hilfe eines Computers ausgelesen und ausgewertet wird. Die fünf dargestellten Komponenten werden in diesem Kapitel besprochen.

III.2. Die Lichtquelle

Die Information eines SFLIM-Aufbaus muss zeitaufgelöst sein. Eine zeitaufgelöste Information verlangt aber eine gepulste Anregung. Unter einer gepulsten Anregung versteht man ein periodisches An- und Aus-Verhalten der Lichtquelle. Die Bandbreite der Zeitauflösung wird u.a. dadurch festgelegt, wie schnell man eine Lichtquelle an- bzw. ausschalten kann. Die Zeitkonstante von Farbstoffen liegt im ns-Bereich. Um solche Zeiten messen zu können, ist eine Bandbreite von > 1 GHz erforderlich. Nur Laser als Lichtquellen besitzen eine solche Bandbreite, thermische Lichtquellen können gar nicht so schnell an- und ausgeschaltet werden.

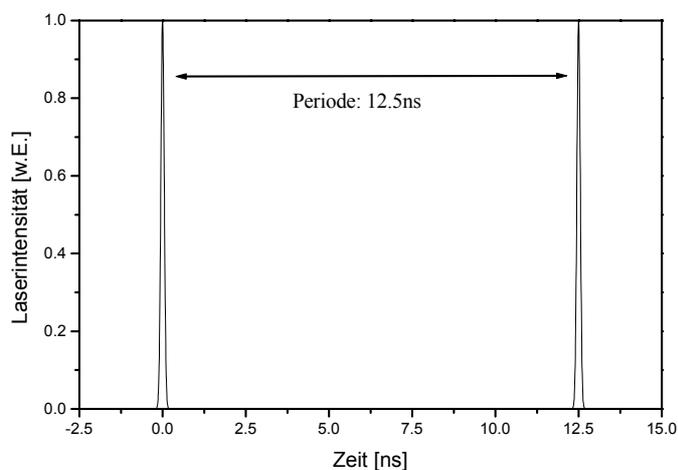
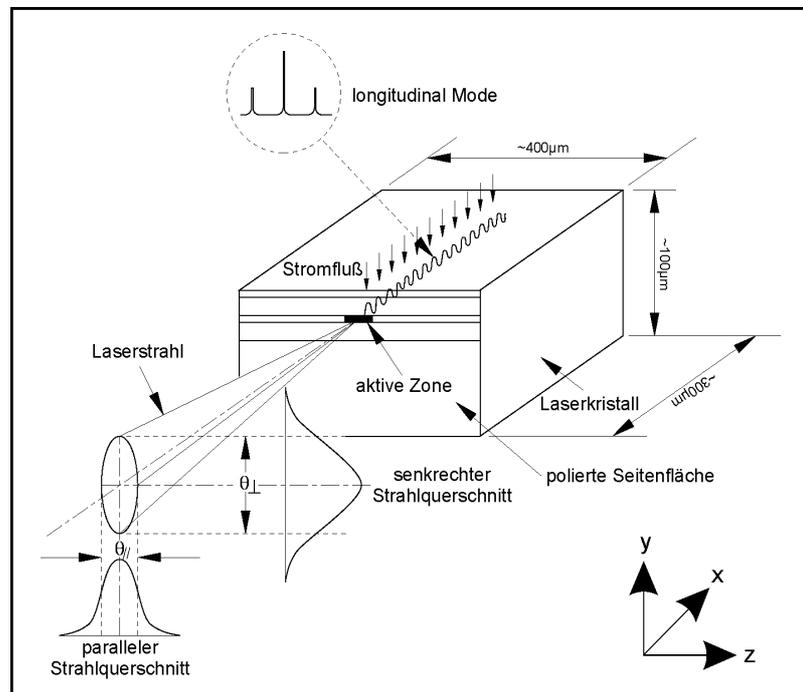


Abb. III-4:
Intensitätsverlauf einer
gepulsten Laserlichtquelle

In Abb. III-4 ist das periodische An- und Aus-Verhalten eines Lasers gezeigt. Nur für einen bestimmten Zeitbereich, mit einer Breite von 100ps, ist die Laserintensität größer Null. Die

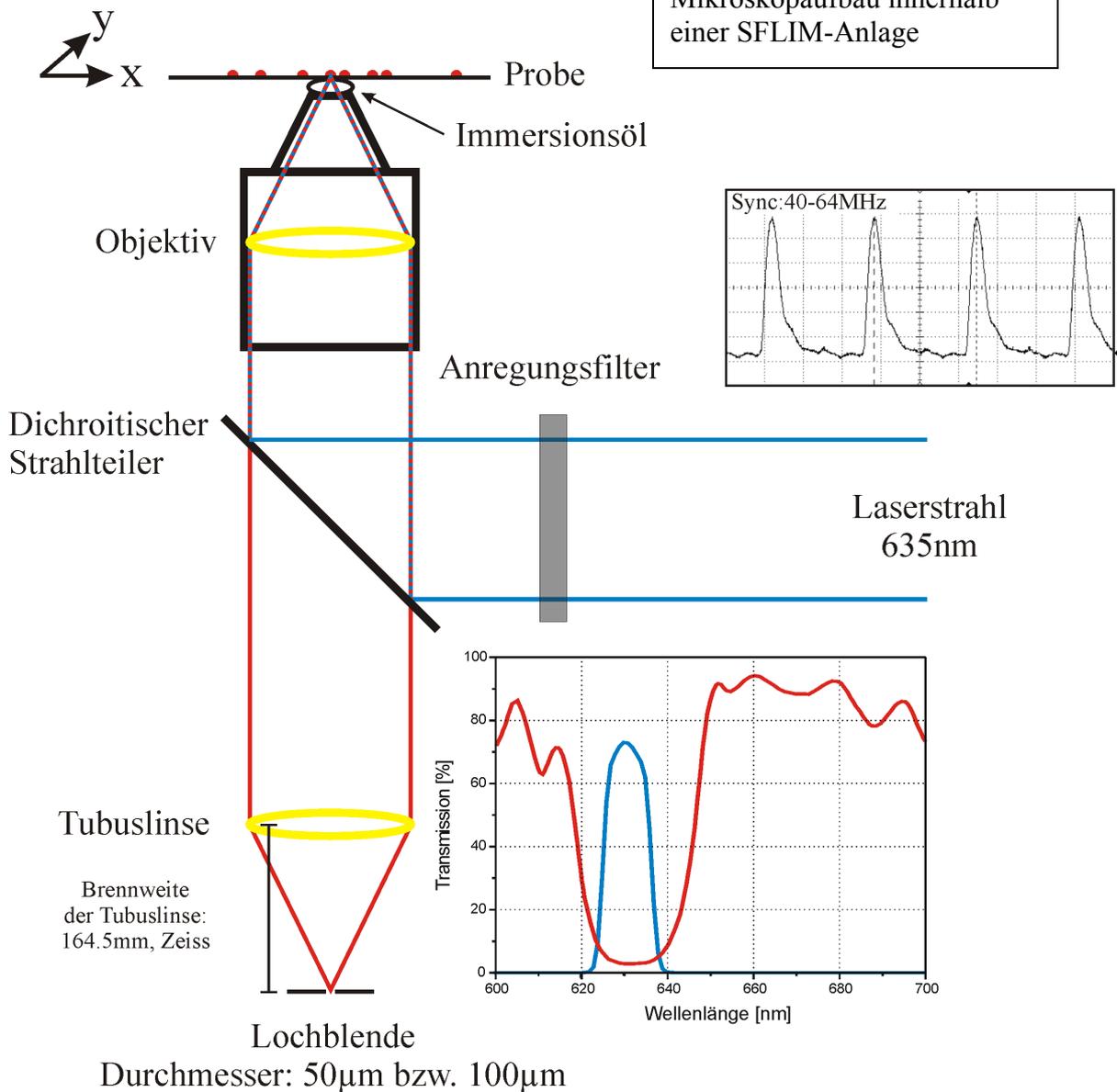
Abb. III-5:
Schematischer
Aufbau einer
Laserdiode



Pulse wiederholen sich mit einer Periode von beispielsweise 12.5ns, was einer Repetitionsrate des Lasers von 80 MHz entspricht. Bei Lasern unterscheidet man zwischen passiv gepulsten Lasern und aktiv gepulsten Lasern. Zur Klasse der aktiv gepulsten Laser gehört die gepulste Laserdiode, bei der über einen Pulsgenerator ein Spannungspuls an eine Laserdiode gelegt wird. Die Pulslänge solcher Pulsgeneratoren liegt bei 50-100 ps. Für die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen wurden ausschließlich gepulste Laserdioden von der Picoquant GmbH (Berlin) mit einer Wellenlänge von 635 nm und einer Repetitionsrate von 64 bzw. 40 MHz verwendet. Bei einer Laserdiode handelt es sich um einen Halbleiterlaser [1]. In Abb. III-3 ist der schematische Aufbau einer Laserdiode dargestellt. Der Stromfluss geht von oben nach unten durch die Halbleiterschichtstruktur und die aktive Zone. Bei der aktiven Zone der Laserdiode handelt es sich um ein p-i-n-Halbleitermedium, z.B. um eine p-AlGaInP/AlGaInP/n-AlGaInP-Schichtstruktur. Ummantelt ist die aktive Zone z.B. durch eine n-InP/p-InP/n-InP-Schichtstruktur. Der Stromfluss durch die Laserdiode ist so gepolt, dass die p-i-n-Diode in der aktiven Zone in Durchlassrichtung, und somit die p-i-n-Diode der Ummantelung in Sperrrichtung geschaltet ist. Der Strom fließt vorwiegend durch die aktive Zone, die als Lasermedium dient, so dass es in der Verarmungszone der aktiven Zone, zu einer Besetzungsinversion kommt. Neben der Eigenschaft als Lasermedium dient die aktive

Zone auch als Resonator. Aufgrund des großen Brechungsindex der verwendeten Halbleitermaterialien, ($n=3-4$), kommt es an den Stirnflächen der aktiven Zone beim Übergang von dem Halbleiter zu Luft, zur Totalreflexion. Ein Grossteil des Lichts wird wieder in die aktive Zone zurück gestreut. Da der Brechungsindex von InP kleiner ist als der von AlGaInP, $n_{\text{InP}} < n_{\text{AlGaInP}}$, wirkt die aktive Zone als ein Wellenleiter. In der aktiven Zone bildet sich aufgrund von stimulierter Emission, ein starkes Lichtfeld aus. Nur Moden, die einen bestimmten Winkel zur Normalen der Stirnfläche haben, können die Stirnfläche verlassen. Um die Transmission in eine Richtung zu begünstigen, wird eine Seitenfläche mit einer Anti-Reflektions-Schicht (AR) versehen. Das Laserprofil hat die Eigenschaft, dass es nicht rotationssymmetrisch bezüglich der x-Richtung (siehe Abb. III-5) sondern entlang der y-Richtung wesentlich breiter als in z-Richtung ist. Der Grund hierfür liegt darin, dass die aktive Zone in y-Richtung nur eine Ausdehnung von 30nm hat, die Ausdehnung in z-Richtung beträgt $5\mu\text{m}$, hierdurch treten Beugungseffekte auf. Durch diese Beugungseffekte hat die Laserdiode eine sehr hohe Divergenz θ_y in y-Richtung, $\theta_y \approx 30^\circ$. Bevor das Licht einer Laserdiode in das Mikroskop eines SFLIM-Aufbaus eingekoppelt wird, muss es kollimiert werden und über ein eindimensionales, aus Zylinderlinsen bestehendes Teleskop in y-Richtung aufgeweitet werden. Die Licht der Laserdiode ist linear polarisiert, der Polarisationsvektor liegt entlang der z-Richtung. Das Polarisationsverhältnis zwischen z und y-Richtung liegt in der Regel zwischen 100-500. Über ein $\lambda/4$ -Plättchen kann die lineare Polarisation in eine zirkulare Polarisation umgeformt werden

III.3. Das Mikroskop



In Abb. III-3 ist der Aufbau eines Mikroskops des Typs Axiovert der Firma Zeiss (Jena) skizziert. Bevor das Licht der Laserquelle in das Mikroskop eingekoppelt wird, passiert es einen Anregungsfilter. Laserdioden haben eine spektrale Halbwertsbreite von 10-20nm. Bei Laserdioden mit einer mittleren Wellenlänge von 635nm wird ein 635DF10 Anregungsfilter der Firma Omega Optics (Brattleboro, VT, USA) (siehe (—) Abb. III-6) verwendet. Mit dem Anregungsfilter wird gewährleistet, dass das Spektrum des eingekoppelten Lichts überwiegend durch das Transmissionsprofil des Filters bestimmt wird. Die Nomenklatur für einen Filter setzt sich aus einer Zentrumswellenlänge λ_Z und der Halbwertsbreite $\Delta\lambda$ des Transmissionspektrums zusammen. Für einen Strahlteiler ist die Grenzwellenlänge λ_R charakteristisch, die den reflektiven Bereich des Strahlteilers charakterisiert. Für Wellenlängen größer als λ_R ist der Strahlteiler durchlässig. Der Pulsgenerator der Laserdiode

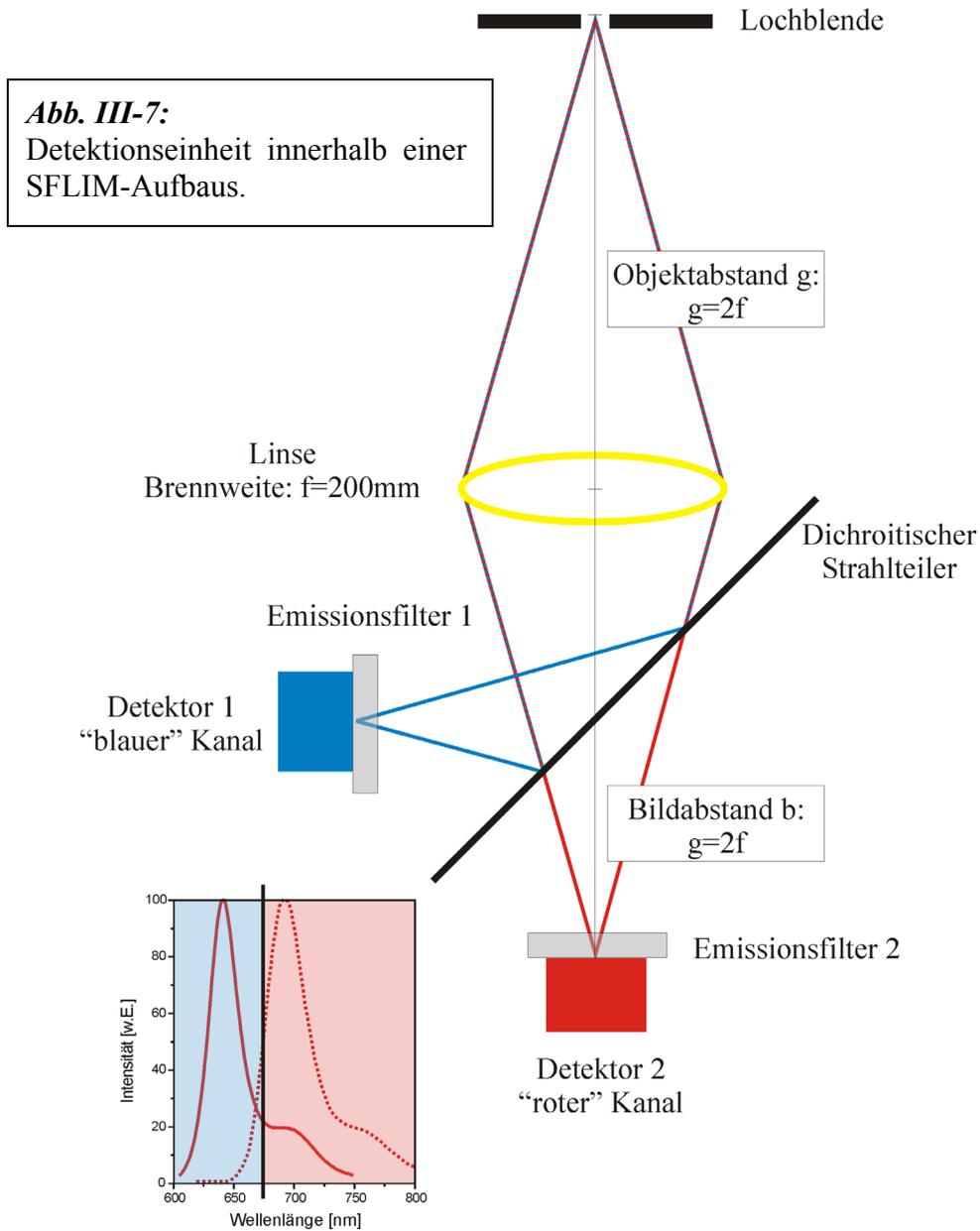
steuert nicht nur die Laserdiode, sondern liefert auch ein mit den Laserpulsen korreliertes Ausgangssignal (siehe (—) Abb. III-6), das im folgenden als Sync bezeichnet wird. Der Sync spielt eine entscheidende Rolle bei der Nutzung der Zeitinformation der Farbstoffe.

Der kollimierte Laserstrahl wird an einen dichroitische Strahlteiler (640DRLP, siehe (—) Abb. III-6) reflektiert, und durch ein Ölimmersionsobjektiv der Firmen Nikon und Olympus, mit einer numerischen Apertur $NA=1.4$, auf die Probe fokussiert. Es wurden nur auf unendlich korrigierte Objektive mit 100facher Vergrößerung verwendet. Das verwendete Immersionsöl hat einen Brechungsindex von $n=1.51$. Die Farbstoffprobe wird auf einem Deckglas immobilisiert. Über eine Piezoverschiebeeinheit der Firma Queensgate kann die Probe lateral in diskreten Schritten durch den Fokus geschoben werden. Die Schrittweite beträgt sowohl in x- wie in y-Richtung 50nm.

Durch das Objektiv wird das Fluoreszenzlicht der Probe gesammelt. Das Fluoreszenzlicht ist gegenüber dem Anregungslicht rotverschoben, und kann daher den Strahlteiler passieren. Über eine weitere Linse, auch Tubuslinse genannt, wird das Fluoreszenzlicht auf eine Lochblende mit einem Durchmesser von $50\mu\text{m}$ bzw. $100\mu\text{m}$ fokussiert. Das in Abb. III-6 dargestellte Mikroskop wird als inverses konfokales Mikroskop bezeichnet.

III.4. Die Detektion

Innerhalb der Detektionseinheit eines SFLIM-Aufbaus (siehe Abb. III-7) wird die Lochblende über eine Linse mit einer Brennweite $f=200\text{mm}$ auf zwei Detektoren abgebildet. Die Detektoren haben den gleiche Abstand $b=2f$ (b : Bildabstand) von der Linse. Die Lochblende befindet sich in einem Abstand $g=2f$ (g : Bildabstand) vor der Linse.



Eine solche $2f$ -Abbildung hat den Vorteil, dass die Bildgröße B gleich der Objektgröße G ist. Damit bleiben alle in Abschnitt II.3 hergeleiteten Gesetzmäßigkeiten über den Einfluss der Lochblende in einem konfokalen Mikroskop gültig. Dadurch, dass die Detektionseinheit in

einem 2f-Modus aufgebaut wird, werden beide Detektoren über eine Lochblende abgebildet. Somit ist sichergestellt, dass das gleiche Volumenelement in der Probe abgebildet wird. Die Detektoren werden als Detektor 1, „blauer“ Kanal, und Detektor 2, „roter“ Kanal bezeichnet. Der dichroitische Strahlteiler hat die Eigenschaft, Licht mit einer Wellenlänge kleiner als λ_R zu reflektieren, und Wellenlängen größer als λ_R durchzulassen. Der dichroitische Strahlteiler zerlegt somit das Fluoreszenzlicht der Probe in zwei Spektralbereiche (siehe Abb. III-7, (—): Emissionsspektrum Bodipy630/650, (··): Emissionsspektrum Cy5.5). Der blauverschobene Bereich wird auf den Detektor 1 reflektiert und der rotverschobene Bereich gelangt auf den Detektor 2. Bei den Detektoren handelt es sich um APDs (*APD: Avalanche Photo Diode*) der Firma EG&G Optoelectronics (Canada, mittlerweile Perkin Elmer). Diese zeichnen sich durch eine hohe Detektionseffizienz $D_E=70\%$ bei 670 nm, einer kleinen aktiven Fläche von ungefähr 150 μm Durchmesser, einem schnellen Ansprechverhalten (200-300ps), und einem breitbandigen Detektionsbereich aus. Das Ansprechverhalten eines Detektors ist korreliert mit dessen Bandbreite. Um mit einem Detektor eine Zeitinformation, die im Bereich von Nanosekunden liegt, aufnehmen zu können, wird eine Bandbreite größer von 1GHz verlangt. Bei den verwendeten Detektoren liegt die Bandbreite größer 5GHz. Vor jedem Detektor befindet sich ein Emissionsfilter, der verhindern soll, dass Streulicht auf den Detektor gelangt. Die Kombination aus dem dichroitischen Strahlteiler und den zwei Emissionsfiltern wird als Filtersatz bezeichnet. In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Filtersätze verwendet.

Filtersatz 1: Dichroitische Strahlteiler: 670DRLP

Emissionsfilter 1: 685HQ70+660DF60

Emissionsfilter 2: 690DF60

Filtersatz 2: Dichroitische Strahlteiler: 685DRLP

Emissionsfilter 1: 667DF30

Emissionsfilter 2: 710DF60

Das gemessene Verhältnis der Intensität I_R im roten Kanal zu der Gesamtintensität $I = I_R + I_B$ (I_B : Intensität im blauen Kanal), wird als F_2 -Wert (*fractional intensity of second detector*) bezeichnet (siehe Gl. III-1).

$$F_2 = \frac{I_R}{I_R + I_B} = \frac{I_R}{I} \quad \text{Gl. III-1}$$

Die mittlere Wahrscheinlichkeit, ein Photon im roten Kanal zu detektieren, wird hier mit p_{Rot} bezeichnet. In Abschnitt III.1 wurde gezeigt, dass sich ein Farbstoff durch ein spezifisches Emissionsspektrum charakterisiert. Mit der geschilderten Detektionseinheit ist es allerdings nicht möglich, das Spektrum aufzulösen, sondern das Spektrum wird auf einen Wert p_{Rot} reduziert. p_{Rot} ist somit ein charakteristischer Parameter für einen Farbstoff und wird später dafür genutzt, Fluoreszenzphotonen dem entsprechenden Farbstoff zuzuordnen.

III.5. Die Datenanalyse

Neben der Aufteilung der Photonen in zwei Spektralbereiche, ist es in einer SFLIM-Anlage möglich, die Photonen nach ihrem Detektionszeitpunkt zu klassifizieren. Zur Auswertung der Detektoren wird eine PCI-Computersteckkarte der Firma Becker & Hickl (Berlin) des Typs

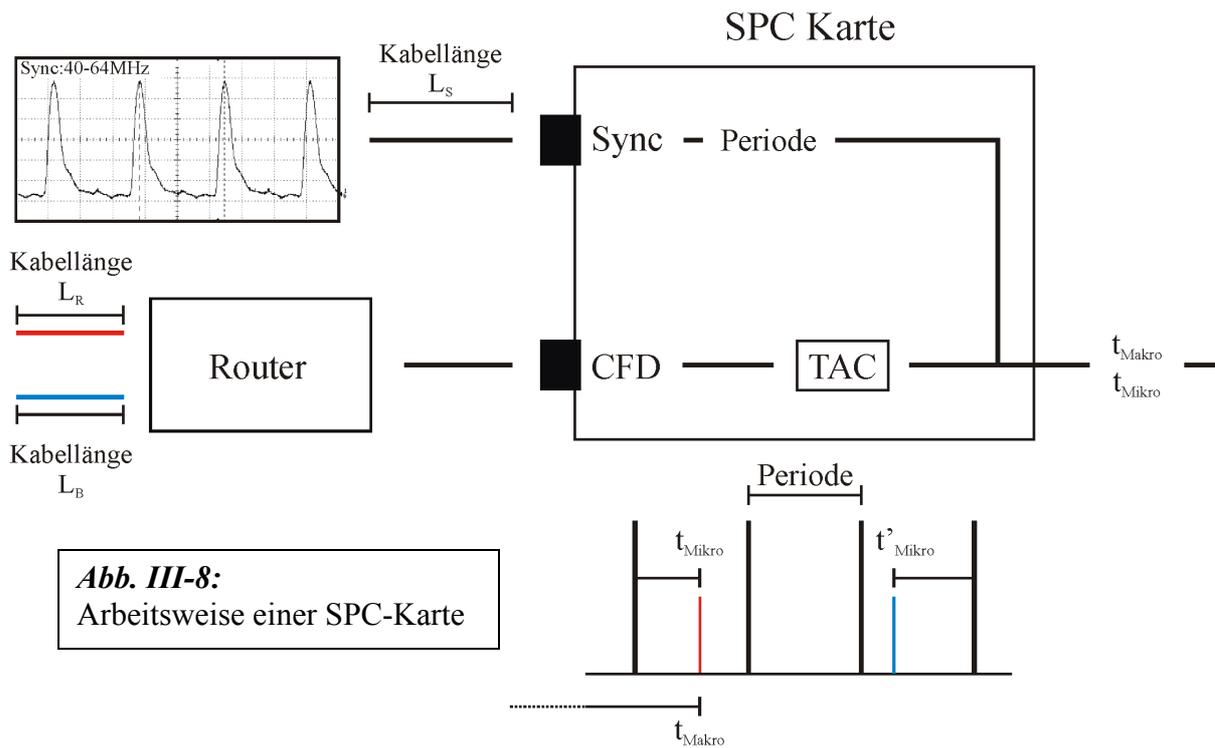


Abb. III-8:
Arbeitsweise einer SPC-Karte

SPC 630 (SPC: Single Photon Counting) verwendet. Eine SPC-Karte arbeitet wie folgt: Das in Abb. III-6 gezeigte Sync Signal wird auf den Sync Eingang der SPC-Karte gelegt (siehe Abb. III-8). Aus dem Sync Signal kann die Periode des Signals bestimmt werden. Wurde ein Photon am Detektor 1 oder 2 detektiert, dann sendet der Detektor ein elektronisches Signal aus. Dieses Signal wird mit einem BNC-Kabel über einen Router der Firma Becker & Hickl auf den CFD Eingang (CFD: Constant Fraction Discriminator) der Karte gelegt (siehe Abb.

III-8). Solange kein Signal am CFD gemessen wird, befindet sich die SPC Karte im Stop-Modus. Trifft ein Signal am CFD ein, beginnt die Karte mit der Signalverarbeitung. Dieser Betriebsmodus wird als inverser Modus bezeichnet. Der Vorteil des inversen Modus liegt darin, dass die Karte nur dann belastet wird, wenn ein Photon detektiert wurde.

Die maximale Anzahl an Verarbeitungsprozessen, die eine SPC-Karte pro Sekunde durchführen kann, liegt bei 5 Millionen. Die Karte besitzt somit eine Totzeit von 200ns. Erhält der CFD Eingang ein Signal, sendet dieser einen Startpuls an den TAC der Karte (*TAC: Time to Amplitude Converter*). Der TAC lädt einen Kondensator bei einer festen Spannung auf. Die im Kondensator gespeicherte Ladung, ist dann ein Maß für die verstrichene Zeit. Der Ladeprozess dauert solange an, bis ein Signal am Sync Eingang die Karte wieder auf Stop setzt. Der Kondensator wird ausgelesen, und die Ladung in eine Mikrozeit t'_{Mikro} umgerechnet. Da der Sync periodisch ist, kann mit der Kenntnis der Periode auf die Zeit t_{Mikro} zurück gerechnet werden (siehe Gl. III-2, siehe Abb. III-8)

$$t_{\text{Mikro}} = \text{Periode} - t'_{\text{Mikro}}$$

Gl. III-2

Neben der Zeit t_{Mikro} wird für jedes Photon noch eine Makrozeit t_{Makro} gespeichert, welche die Zeit angibt, die seit dem Startpunkt der gesamten Messung verstrichen ist. Repetitionsraten von 64 oder 40MHz sind gleich zu setzen mit einer Periode von 15.625ns bzw. 25ns. Die Periode gibt die Größe des maximal nutzbaren Zeitfensters an. Von dem maximalen Zeitfenster werden durch die SPC-Karte je nach Einstellung nur ein effektives Zeitfenster t_{Max} von 12.5ns bzw. 25ns genutzt.

Mit Hilfe des in Abb. III-8 gezeigten Routers ist es möglich, zwei Detektoren mit einer einzigen SPC-Karte auszulesen. Die Bandbreite des Routers ist mit 5 MHz genauso groß wie die der SPC-Karte. Der Router arbeitet im sogenannten FiFo- Modus (*FiFo: First in First out*). Das erste Signal, das von den Detektoren am Router ankommt, wird durchgeschaltet. Der Router besitzt dann eine Totzeit von 200ns, bevor er wieder einsatzbereit ist. Da mit zwei Detektoren gearbeitet wird, beträgt im Mittel die effektive Totzeit pro Detektor 400ns, was einer Bandbreite von 2.5MHz entspricht. Für jedes Signal, das vom Router verarbeitet wird, sendet dieser an die SPC-Karte zusätzlich die Information, von welchem Detektor das Signal ausgesendet wurde. So können später die detektierten und verarbeiteten Photonen dem „roten“ bzw. „blauen“ Kanal zugeordnet werden. In der Regel liegt bei zu untersuchenden

Fluoreszenzproben die maximale Zählrate unterhalb von 100kHz. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass alle detektierten Photonen auch mit der SPC-Karte nachgewiesen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass von beiden Detektoren in einem Zeitfenster von 200 μ s ein Photon detektiert wird, ist sehr gering.

Theoretisch wäre es möglich die Zeitinformation kontinuierlich aufzunehmen. In Realität wird die Zeitauflösung aber durch die SPC Karte begrenzt. Die bestmögliche Zeitauflösung liegt bei 8ps.

IV. Einführung in die Kolokalisationstheorie

In diesem Kapitel wird ein Modell entwickelt, das es erlaubt, den Abstand von kolokalisierten Molekülen so genau wie möglich zu bestimmen. Neben dem geschätzten Abstand sollte das Modell auch einen Schätzer für den Fehler der Abstandsbestimmung angeben. Die Distanzen, für die das Modell ausgelegt werden soll, liegen im Bereich von 10-200 nm. Die Obergrenze wird durch das theoretische Auflösungsvermögen eines konfokalen Mikroskops bestimmt (siehe Abschnitt II.3). Die Untergrenze wird dadurch festgelegt, dass Farbstoffe bei Abständen unterhalb von 10 nm in Wechselwirkung [47] zueinander treten können. Für diese Aufgabenstellung steht bereits ein Algorithmus zu Verfügung, der als klassische Mustererkennung, im Englischen auch als „Pattern Recognition“, bezeichnet wird. Die klassische Mustererkennung [42] beinhaltet das Problem, dass der Algorithmus nicht auf die vollständige Information des Datensatzes zurückgreift. Zudem ist der Algorithmus in seiner kontinuierlichen Schreibweise nicht ausbaubar, er kann also nicht zu einem SFLIM-Algorithmus erweitert werden, der auf die spektrale und zeitliche Information aufbaut. Die Aufgabe dieser Arbeit besteht daher darin, eine neue Kolokalisationstheorie zu entwickeln, welche die Fehler der klassischen Mustererkennung beseitigt. Um einen Algorithmus zu analysieren, ist ein bekannter Datensatz nötig, auf den der Algorithmus angewendet werden kann. Bei realen Datensätzen ist keiner der Parameter, anhand dessen die Güte des Algorithmus überprüft werden könnte, vorher bekannt. Würde z.B. der Algorithmus geändert werden, dann ist nicht feststellbar, ob diese Veränderung eine Verbesserung oder eine Verschlechterung darstellt. Der Algorithmus muss daher auf simulierte Datensätze angewendet werden. Dabei sollte die Simulation so gestaltet werden, dass die simulierten Datensätze mit realen Datensätzen zu vergleichen sind. Die innere Struktur einer Kolokalisationstheorie ist eng mit dem Informationsgehalt des untersuchten Datensatzes

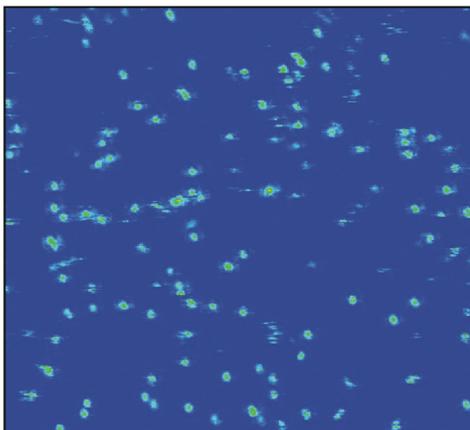


Abb. IV-1:
Fluoreszenzbild einer Bodipy630/650-Probe

verknüpft. Es wird daher eine Hauptaufgabe sein, in den folgenden Kapiteln eine geeignete Parametrisierung für einen SFLIM-Datensatz zu finden, die es erlaubt, Farbstoffe zu charakterisieren und deren Verhalten berechenbar zu machen.

In dieser Arbeit werden nur 2 dimensionale Oberflächenmessungen besprochen. Die hergeleiteten Gesetzmäßigkeiten sind aber auch für Lösungsmessungen anwendbar. Die aufgenommenen Bilder bestehen übergeordnet aus einer sogenannten Spotstruktur. Unter einem Spot versteht man eine ausgedehnte Anhäufung von Photonen. Die Photonen der Spots stammen überwiegend von der Fluoreszenz der auf der Oberfläche befindlichen Farbstoffe. In der Regel ist ein Molekül, bzw. ein kolokalisiertes Molekülpaar mit einem Spot korreliert. Der Bereich zwischen den einzelnen Spots eines Bildes wird als Hintergrundbereich bezeichnet. In Abb. IV-1 ist das Fluoreszenzbild einer Bodipy630/650-Probe dargestellt. Die Spotstruktur des Bildes ist deutlich zu erkennen.

Die mit den Farbstoffen belegten Oberflächen werden abgerastert, indem die Oberfläche in diskreten Schritten durch den Laserfokus gefahren wird. Dies hat zur Folge, dass die zu besprechenden Bilder in digitalisierter Form vorliegen. Üblicherweise bestehen die aufgenommenen Bilder aus 200x200 bis 400x400 Bildpunkten. Die Information ist also nicht kontinuierlich an jedem Punkt des Bildes gegeben, sondern liegt nur an diskreten Orten vor. Jeder einzelne Bildpunkt stellt für die weiteren Betrachtungen eine Dateneinheit dar. Da die genaue Form dieser Grundeinheit keine Rolle spielt, es ist nicht ratsam von einer gewissen Ausdehnung zu sprechen, sondern vielmehr bietet es sich an, sich den Informationsgehalt konzentriert auf eine Stelle vorzustellen. Die Information des Bildes wird somit auf ein 2-dimensionales Gitter projiziert, wobei jeder Knoten dieses Gitters als Pixel bezeichnet wird. Der Abstand der Pixel in x- bzw. y-Richtung des Bildes beträgt hier immer 50nm. Der Informationsgehalt eines Pixels besteht in erster Linie aus einer gewissen Anzahl von Photonen. Diese Photonen können in einem SFLIM-Aufbau noch bezüglich einer Zeitinformation und einer spektralen Information klassifiziert werden.

Es treten zwei Arten von Pixeln auf. Die erste Art beinhaltet ausschließlich Hintergrundphotonen und wird als Hintergrundpixel bezeichnet. Die andere Art beinhaltet zusätzlich zu den Hintergrund- auch noch Fluoreszenzphotonen, und wird daher als Spotpixel bezeichnet. Wird in erster Näherung der Hintergrund vernachlässigt und macht man die Annahme, dass sich nur ein bestimmter Farbstofftyp auf der Oberfläche befindet, dann haben

nur noch die Spotpixel eine verwertbare Information, die zu weiteren Analyse genutzt werden kann. Jeder Pixel wird als unabhängig von den anderen betrachtet und stellt somit eine Momentaufnahme des Farbstoffes dar. Alle Pixel werden zusammen gefasst, und bezüglich ihrer Zeit- bzw. spektralen Information ausgewertet. Die so analysierten Datensätze sollten Rückschlüsse auf das charakteristische Verhalten des Farbstofftyps zulassen. Mit Hilfe dieser Information können qualitative Aussagen getroffen werden, z.B. ob die Fluoreszenz eines Farbstoffs „länger“ oder „kürzer“ bzw. eher rot- oder blauverschoben ist. Farbstofftypen können somit gut miteinander verglichen werden, oder es können gewisse Wechselwirkungen der Farbstoffe in verschiedenen Umgebungen zu untersuchen.

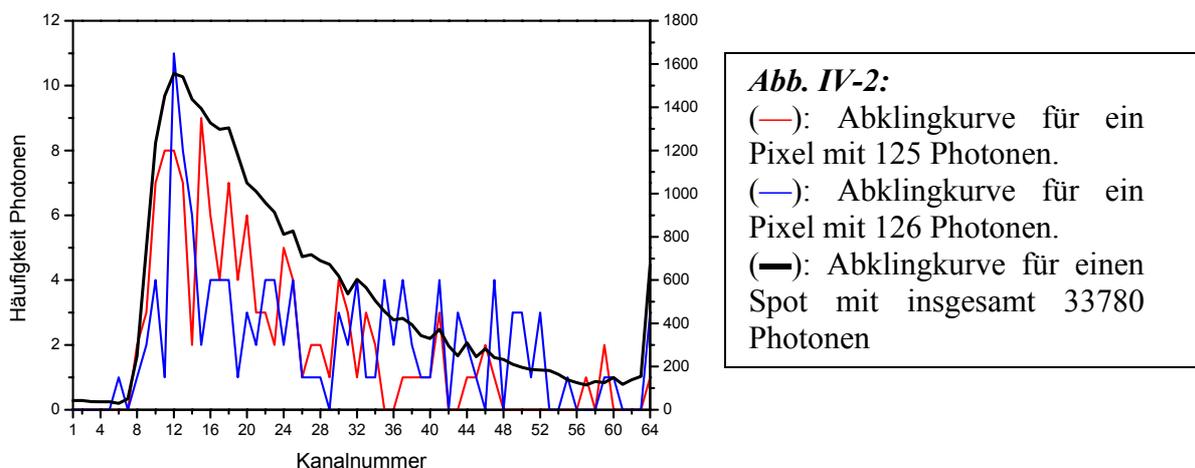
Im Fall von kolokalisierten Molekülen stellt sich die Situation anders dar. Zwei spektral und nach der Zeitinformation unterscheidbare Farbstoffe befinden sich jeweils paarweise in unmittelbarer Nähe zu einander. In einer solchen Situation werden nicht mehr einzelne Farbstoffmoleküle, sondern Molekülpaare betrachtet. Beide Moleküle eines Paares sollen sich völlig unabhängig voneinander verhalten, d.h. unabhängig voneinander absorbieren und emittieren. Die Unabhängigkeit der einzelnen Farbstoffe eines Molekülpaars hängt aber vom Abstand zwischen den Partnern ab. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei einem Abstand von weniger als 10nm die Unabhängigkeit aufgehoben wird und die Farbstoffe in Wechselwirkung zueinander treten. Eine mögliche Wechselwirkung ist der resonanter Energietransfer, bei dem Energie strahlungslos von dem „kurzwelligeren“ Partner auf den „langwelligeren“ Partner übertragen wird. Die innere Struktur des Kolokalisationsalgorithmus muss so gewählt werden, dass auch dieser Fall erfasst wird.

Beim Einstieg in die Kolokalisationstheorie wird angenommen, dass sich auf einer Oberfläche nur unabhängige Molekülpaare befinden. Ein Spot besteht also nicht mehr nur aus der Fluoreszenz eines Farbstofftyps, sondern aus einer Mischung der Fluoreszenz von zwei Typen. Somit stellt sich die Aufgabe, die detektierten Photonen eines Spotpixels zwei unterschiedlichen Farbstoffen zuzuordnen. In dieser Arbeit wird die spektrale als auch die zeitaufgelöste Information genutzt, um Farbstoffe getrennt auf einer Oberfläche zu lokalisieren. Bei einer gegebenen Anzahl von Photonen ist die Kenntnis der Wahrscheinlichkeitsverteilung für einen bestimmten Zeit- bzw. spektralen Parameter notwendig. Aus diesen Wahrscheinlichkeitsverteilungen für die reinen Farbstoffe lässt sich dann die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Mischungskombination berechnen, und somit eine statistische Aussage über die Aufteilung der Photonen treffen. Ist die Aufteilung der

Photonen für jeden Pixel eines Spots bekannt, kann das Bild eines Spots in zwei jeweils einem der beiden Farbstoffe zu zuordnenden Bilder auf gespalten werden, aus denen eine Abschätzung für die genaue Lage bzw. den Abstand der beiden Moleküle berechnet werden kann.

IV.1. Die Parametrisierung der Information eines Pixels

Um die Wahrscheinlichkeitsverteilungen berechenbar zu machen, spielt die Parametrisierung der Daten eine entscheidende Rolle. Bei einer SFLIM-Anlage besteht die Datenstruktur eines Pixel aus dem Parametersatz $(I, F_2, \{d(t_i)\})$. Bei I handelt es sich um die Anzahl der detektierten Photonen und mit F_2 wird die Abschnitt III.4 definierte Aufteilung der Photonen auf zwei Spektralbereiche bezeichnet. Besonders der F_2 -Wert ist sehr stark durch den Versuchsaufbau festgelegt. Die Verteilungen bezüglich dieses Parameters können daher nicht immer von einer zur anderen Messung übernommen werden. I und F_2 sind dadurch ausgezeichnet, dass es sich bei ihnen um diskret verteilte Größen handelt. Die Anzahl der Photonen pro Pixel I , wird in dieser Arbeit als Intensität eines Pixel bezeichnet. Theoretisch sind Photonenzahlen von 0 bis ∞ möglich, in der Praxis wird aber I selten größer als ~ 1000 , da die verwendeten Farbstoffe zum einen geringen Absorptionsquerschnitt besitzen und zum anderen nur eine begrenzte Anzahl an Anregungszyklen überstehen, bevor photochemische Prozesse dazu führen, dass der Farbstoff nicht mehr fluoreszieren kann.



Im Gegensatz zu I und F_2 liegt der Zeitinformation eine kontinuierliche Verteilung zu Grunde. Wie in Kapitel II gezeigt, kann jedem Photon eine Makrozeit t_{Makro} und eine Mikrozeit t_{Mikro}

zugeordnet werden. Die Zeiten t_{Makro} legen fest welchem Pixel die Photonen zugeordnet sind. Die Zeiten t_{Mikro} folgen einer Grundwahrscheinlichkeitsdichte $p(t)$. Die Begriffe Abklingkurve $\{d(t_i)\}$ und Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ bzw. Muster $\{M(t_i)\}$ ($\{M(t_i)\}=\{P(t_i)\}$) werden im Folgenden eine zentrale Rolle spielen. Unter einer Abklingkurve $\{d(t_i)\}$ versteht man die Verteilung der gemessenen Photonen in die einzelnen Zeitkanäle t_i . In der Regel geht man von $N=64$ Kanälen aus, die Breite pro Kanal Δt entspricht $\Delta t=12.5/64\text{ns}=195\text{ps}$. Der i -te Kanal steht für eine Zeit $t_i=(i-0.5)\cdot\Delta t$. Aus $\{d(t_i)\}$ kann nach Gl. IV-1 ein zeitlicher Mittelwert T bestimmt werden. Dagegen gibt die Grundwahrscheinlichkeitsdichte $p(t)$ an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Photon, zu einem bestimmten Zeitpunkt t detektiert wird. Die mittlere Zeit T_p ist dann die Zeit nach der im Mittel ein Photon detektiert wurde. T_p ist charakteristisch für einen Farbstoff. Für die spätere Auswertung ist aber notwendig, dass $p(t)$ in eine Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ überführt wird, was nach sich führt, dass auch die Zeit T_p in eine mittlere Zeit $T_{\{P\}}$ überführt werden muss. Die Abklingkurve $\{d(t_i)\}$ folgt der Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ des Farbstoffes.

Die Abklingkurven in Abb. IV-2 wurden aus einem Bodipy630/650 Farbstoffprobe generiert, die trocken auf eine Glasoberfläche aufgebracht wurde. Sie stellen die Abklingkurven für jeweils nur einen Pixel dar. Die Photonenzustatistik der beiden Pixel ist praktisch gleich, der mit der roten Kurve (—) korrelierte Pixel beinhaltet 125 Photonen, der mit der blauen Kurve (—) korrelierte Pixel 126 Photonen. Trotzdem ist die Variation innerhalb der Kurven beträchtlich. Werden alle Pixel eines Spots zusammen gefasst und die gemeinsame Abklingkurve ermittelt, dann ergibt sich ein Bild, wie bei der schwarzen Kurve in Abb. IV-2. Insgesamt beinhaltet dieser Spot 33780 Photonen. Die schwarze Kurve (—) zeigt ein hohes Maß an Homogenität, was impliziert, dass trotz der hohen Schwankungen von Pixel zu Pixel, eine für die Pixel gemeinsame Verteilungsfunktion zu Grunde liegt, die angibt, wie im Mittel die Photonen in

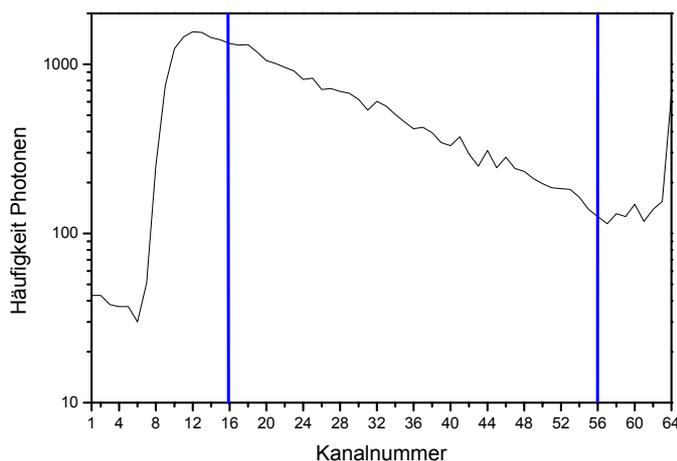


Abb. IV-3:

Abklingkurve eines Spots aus Abb. IV-1 (—) in einfach logarithmischer Auftragung; der Bereich zwischen den blauen Linien zeigt näherungsweise ein monoexponentielles Verhalten

die einzelnen Zeitkanäle verteilt werden. Um die Variationsbreite von einem Pixel zum Nächsten besser fassen zu können, bietet es sich an, die Abklingkurven auf einen Parameter zu reduzieren, üblicherweise der Parameter der Lebensdauer τ hierzu genutzt, was aber voraussetzt, dass sich die Abklingkurven innerhalb eines Teilbereiches des gesamten Zeitfensters exponentiell verhalten. Zur Verdeutlichung wurde in Abb. IV-3 die schwarze Abklingkurve (—) eines Spots aus Abb. IV-2 einfach logarithmisch aufgetragen. Zwischen dem 16 und 56 Kanal liegt näherungsweise ein monoexponentieller Abfall vor. Nur in diesem Bereich ist eine Beschreibung der Abklingkurve durch eine Lebensdauer zulässig. Für die Abklingkurven der beiden Pixel ((—),(—)) aus Abb. IV-2 stellt sich in diesem Bereich die Situation anders dar, besonders bei der blauen Kurve ist ein exponentielles Verhalten kaum noch zu erkennen. Zusätzlich werden bei einer Beschränkung des effektiven Zeitfensters von anfänglich 64 auf 40 Kanäle ein Teil der Photonen nicht genutzt. Bei der hier gezeigten Kurve wären das 35% der Photonen, was bei den geringen Photonenzahlen in Einzelmolekülexperimenten die Aussagekraft über den Parameter τ stark beschränkt. Anstatt der Lebensdauer τ bietet es sich an den Schwerpunkt T (siehe Gl. IV-1).

$$T = \frac{I}{I} \cdot \sum_i t_i \cdot d_i$$

Gl. IV-1

einer Abklingkurve als Parameter zu verwenden. $I = \sum d_i$ steht für die Gesamtintensität des Pixels und d_i ist die Anzahl der Photonen im i -ten Kanal. Der Vorteil liegt darin, dass alle Photonen eines Pixels verwendet werden können. Zusätzlich wird a priori nicht schon ein gewisses Modellverhalten vorausgesetzt, was bei der Tatsache, dass sich die Farbstofffluoreszenz nicht immer rein monoexponentiell verhalten, von großem Vorteil ist.

Im nächsten Abschnitt soll mit einer detaillierten Einführung in die klassische Mustererkennung aufgezeigt werden, welche Aufgaben für die Weiterentwicklung hin zu einer SFLIM-Kolokalisationstheorie gelöst werden müssen.

IV.2. Das Prinzip der Mustererkennung mit Hilfe des Abklingverhaltens

In diesem Abschnitt soll es darum gehen, die klassische Mustererkennung soweit zu verstehen, dass deren Defizite behoben werden können. Mit dem Wort klassisch wird der Stand der Wissenschaft bezeichnet, d.h. den bis jetzt allgemein anerkannten Ansatz zur Lösung des gestellten Problems, den Abstand zwischen zwei kolokalisierten Molekülen zu berechnen. Die klassische Mustererkennung ist ausschließlich auf die Verwendung der Zeitinformation beschränkt. Die Beschränkung der genutzten Information, ist eines der Hauptprobleme des Algorithmus, weshalb versucht werden muss, diese Beschränkung aufzuheben. Das Anwendungsgebiet sind Bilder von Oberflächen, die mit kolokalisierten Molekülpaaren belegt sind. Bei diesen Proben wird davon ausgegangen, dass die Photonen eines Spotpixel von zwei verschiedenen Farbstoffmolekülen herrühren. Das Grundprinzip der Klassischen Mustererkennung beruht auf der Annahme, dass in einem kolokalisierten Molekülpaar jeder Farbstoff unabhängig absorbiert und emittiert, was bedeutet, dass jeder Farbstoff einer spezifischen Grundwahrscheinlichkeit folgt. Aufgrund der Unabhängigkeit der Farbstoffe können die entsprechenden Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_1(t_i)\}$ und $\{P_2(t_i)\}$ durch zwei unabhängige Eichmessungen, bestehend aus einer rein mit Farbstoff 1 oder Farbstoff 2

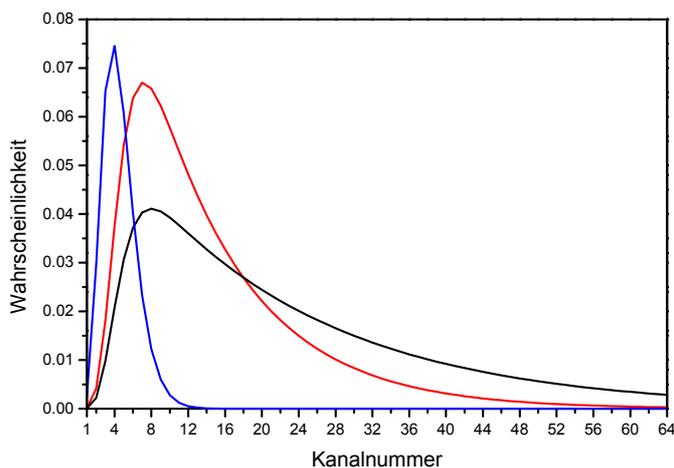


Abb. IV-4:

(—): $\{P_1(t_i)\}$ für den Farbstoff 1

(—): $\{P_2(t_i)\}$ für den Farbstoff 2.

(Die mittleren Zeiten sind

$T_{\{P\}}^1 = 2.76\text{ns}$ und

$T_{\{P\}}^2 = 4.14\text{ns}$)

(—): Gerätefunktion $\{GF(t_i)\}$

belegten Oberfläche, bestimmt werden. Die beiden ermittelten $\{P_1(t_i)\}$ und $\{P_2(t_i)\}$ werden im Folgenden auch als Muster bezeichnet. Die Abklingkurve eines Pixel in einem kolokalisierten Spot folgt einer gemischten Grundwahrscheinlichkeit, die sich als Linearkombination aus den zwei Mustern $\{P_1(t_i)\}$ und $\{P_2(t_i)\}$ berechnen lässt. Die Aufgabe des klassischen

Mustererkennungsalgorithmus besteht nun darin, die entsprechenden Anteile von Farbstoff 1 und Farbstoff 2 zu ermitteln.

A priori sind einem nur die beiden Muster bekannt. Die gemessene Abklingkurve $\{d(t_i)\}$ eines Pixels setzt sich aus einem Anteil p für den Farbstoff 1 mit einer Grundwahrscheinlichkeit $\{P_1(t_i)\}$, der einer „kurzen“ mittleren Zeit $T_{\{p\}}^1$ zuordnet werden kann (siehe Abb. IV-4 (—), $T_{\{p\}}^1 = 2.76\text{ns}$), in der Folge auch als kurzer Kanal bezeichnet, und einem Anteil $(1-p)$ für den Farbstoff 2 mit einer Grundwahrscheinlichkeit $\{P_2(t_i)\}$ mit einer „längeren“ mittleren Zeit $T_{\{p\}}^2$ (siehe Abb. IV-4 (—), $T_{\{p\}}^2 = 4.14\text{ns}$), hier als langer Kanal bezeichnet, zusammen. Aus Kapitel II ist bekannt, dass sich die Grundwahrscheinlichkeit als eine Faltung zwischen einer Gerätefunktion und einem rein exponentiellen Verhalten beschreiben lässt. Für die in Abb. IV-4 gezeigten Grundwahrscheinlichkeiten wurde ein rein exponentielles Verhalten mit einer Lebensdauer von 2ns ($\{P_1(t_i)\}$) bzw. 4ns ($\{P_2(t_i)\}$) angesetzt. Diese Funktion wurde dann mit einer analytisch vorgegebenen Gerätefunktion $\{GF(t_i)\}$ gefaltet (siehe Abb. IV-4 (—), nicht maßstabsgetreu dargestellt).

Aus den beiden Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_1(t_i)\}$ und $\{P_2(t_i)\}$ lässt sich die Grundwahrscheinlichkeit $\{P_{12}(t_i;p)\}$ kombinieren, welche die Abklingkurve des Pixels beschreibt, (siehe Gl. IV-2).

$$\{P_{12}(t_i; p^{Best})\} = p^{Best} \cdot \{P_1(t_i)\} + (1 - p^{Best}) \cdot \{P_2(t_i)\} \quad \text{Gl. IV-2}$$

Mit Hilfe des so ermittelten Anteils p , kann die Intensität des Pixels I in eine Intensität $I_1=p \cdot I$ für den kurzen Kanal und eine Intensität $I_2=(1-p) \cdot I$ für den langen Kanal überführt werden.

Um das bestmögliche p zu ermitteln, benötigt man einen Anpassungstest, der durch Variation von p die entsprechende Funktion $\{P_{12}(t_i;p)\}$ an die gemessenen Abklingkurve anpasst. Der Anpassungstest beruht darauf, dass eine Größe, die Likelihood-Funktion, welche die gemessenen Werte in Relation zu den entsprechenden Modellwerten setzt, je nach Algorithmus minimiert oder maximiert wird. Der bekannteste Vertreter ist der χ^2 -Test, der davon ausgeht, dass die Messwerte, d.h. die Intensitäten $d_i=d(t_i)$ in jedem einzelnen Kanal der Abklingkurve, unabhängig und um den theoretischen Wert $I \cdot \{P_{12}(t_i;p)\}$ normalverteilt (symmetrisch) sind. Zudem gehört die Normalverteilung zur Klasse der kontinuierlichen Verteilungsfunktionen.

Im Fall der Fluoreszenzspektroskopie werden aber Photonen gezählt, d.h. die Intensitätswerte sind diskret und erstrecken sie sich über den theoretischen Wertebereich von 0 bis ∞ und nicht über den Bereich $-\infty$ bis ∞ wie im Fall einer normalverteilten Messung. Zweitens ist die Unabhängigkeit der Zeitkanäle nicht mehr gewährleistet, da nur eine gewisse Anzahl von Photonen verteilt werden kann, und somit die Anzahl d_i der Photonen im Kanal i von der Anzahl der Photonen d_j im Kanal j , $j \neq i$, abhängt. Ohne Einschränkung der Allgemeinheit kann daher davon ausgegangen werden, dass die Intensitäten d_i nicht normal, sondern polynomial verteilt sind. Die Wahrscheinlichkeit $P_V(p; I) = P_V(p; d_1, \dots, d_N, I)$ für eine bestimmte Verteilung $\{d_1, \dots, d_N\}$ der Photonen in die Kanäle, wobei N die Anzahl von Kanälen beschreibt, lässt sich dann schreiben als.

$$P_V(p; d_1, \dots, d_N, I) = I! \cdot \prod_{i=0}^N \frac{P_{12}(t_i; p)^{d_i}}{d_i!}$$

$$\left[P_V(p; I) = I! \cdot \prod_{i=0}^I p_{12}(t; p), p_{12}(t; p) = p \cdot p_1(t) + (1-p) \cdot p_2(t) \right]$$

Gl. IV-3

Der in Klammern geschriebene Ausdruck in Gl. IV-3 gibt die Polynominalverteilung für den Fall an, dass mit einer Grundwahrscheinlichkeitsdichte $p(t)$ gearbeitet werden würde. Aus der Definition von $P_V(p; I)$ kann abgeleitet werden, warum die Überführung der Grundwahrscheinlichkeitsdichte $p(t)$ in die Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i; p)\}$ für die klassische Mustererkennung von zentraler Bedeutung ist. Ein Verteilung $\{P(t_i; p)\}$ kann empirisch gemessen werden, für $p(t)$ müsste eine analytische Funktion bekannt sein. Da aber für die Gerätefunktion im allgemeinen keine analytische Funktion gegeben ist, ist es unmöglich einen Ausdruck für $p(t)$ abzuleiten. Somit wäre der in Klammern geschriebene Ausdruck in Gl. IV-3 nicht definiert. Aus diesem Grund sind alle Datenauswertungsprogramme so geschrieben, dass die Photonen in bestimmte Zeitkanäle eingeordnet werden. Ohne näher auf die mathematischen Umformungen einzugehen, kann die Wahrscheinlichkeit $P_V(p; d_1, \dots, d_N, I)$ in die Kullback-Leibler Diskriminierungsinformation $KLI_V(p; I) = KLI(p; d_1, \dots, d_N, I)$, die oft auch als relative Entropie zwischen Messung und Modell bezeichnet wird, umgeformt werden.

$$KLI_V(p; I) = \sum_{i=1}^N d_i \cdot \ln \left[\frac{d_i}{P_{12}(t_i; p) \cdot I} \right], I = \sum_{i=1}^N d_i$$

Gl. IV-4

$KLI_V(p;I)$ wird minimal, wenn $P_V(p;I)$ maximal wird. Der Unterschied zwischen den beiden Größen liegt darin, dass die Diskriminierungsinformation $KLI_V(p;I)$ eine relative Größe darstellt, was zur Folge hat, dass verschiedene Abklingkurven nicht miteinander verglichen werden können. Der Grund, warum trotzdem gerne mit einer relativen Größe wie $KLI_V(p;I)$ gearbeitet wird, liegt darin, dass es sich um eine handliche Größe handelt. Man also nicht befürchten muss, dass $KLI_V(p;I)$ zu groß bzw. zu klein wird, und damit erhebliche Rundungsfehler auftreten können. Innerhalb eines festen Datensatz $\{d_i\}$ ist es nicht notwendig mit absoluten Größen zu arbeiten, es reicht daher aus, durch Variation von p den kleinsten Wert für $KLI_V(p^{Best};I)$ zu ermitteln. Dieses p^{Best} entspricht dann der größten Wahrscheinlichkeit $P_V(p^{Best};I)$ und somit der besten Linearkombination $\{P_{12}(t_i;p^{Best})\}$. Die Anpassung der Linearkombination erfolgt über ein Nelder-Mead-Optimierungsverfahren. Die klassische Mustererkennung ist aber so stabil, dass der Wert p^{Best} nicht vom gewählten Optimierungsverfahren abhängt. Ein Levenberg-Marquart-Verfahren wäre auch denkbar.

Um die innere Struktur des oben beschriebenen Algorithmus besser zu visualisieren, bietet es sich an, diesen auf simulierte Abklingkurven anzuwenden.

IV.3. Überprüfung der klassischen Mustererkennung mit Hilfe von simulierten Abklingkurven

Der Generierung simulierter Abklingkurven liegt die Annahme zu Grunde, dass ein Farbstoff durch eine bestimmte Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ beschrieben wird. $\{P(t_i)\}$ reicht alleine nicht aus, um eine simulierte Abklingkurve mit insgesamt I Photonen zu erstellen, vielmehr benötigt man ein Ensemble $E(t_i)$ von Zeiten, aus dem I Zeiten heraus gezogen werden können. Die Überführung einer Grundwahrscheinlichkeit aus einem Ensemble kann wie folgt durchgeführt werden. Zuerst einmal muss die Grundwahrscheinlichkeit in ein Histogramm umgewandelt werden. Bei der Simulation geht man davon aus, dass die Grundwahrscheinlichkeit aus 64 Zeitkanälen mit einer Breite von 195ps besteht, wobei jeder dieser Kanäle mit einem Faktor F , $F=100000$, multipliziert wird. F muss hierbei viel größer sein als die Anzahl der Kanäle bzw. als die Anzahl I von Photonen. Die so berechneten Werte $N_i=F \cdot P(t_i)$ werden noch gerundet. Aus der berechneten Häufigkeitsverteilung kann das Ensemble $E(t_j)$, $j=1 \dots \text{Länge}(E(t_i))$, bestimmt werden, indem N_1 mal die Zeit $t_1=0.5 \cdot dt$, N_2 mal

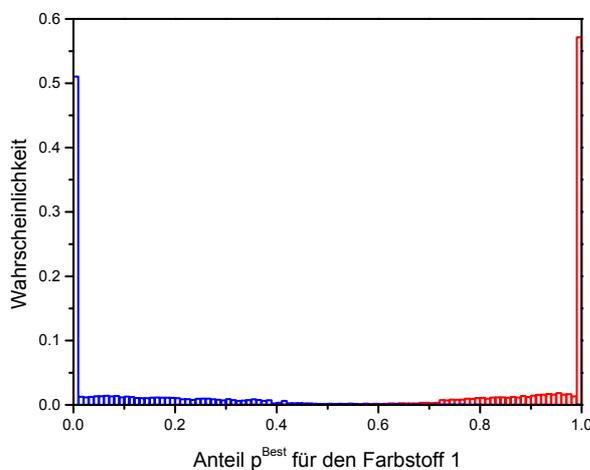


Abb. IV-5:

(□): $H(p^{\text{Best}})$ für $(40:0)_{40}$
(□): $H(p^{\text{Best}})$ für $(0:40)_{40}$

die Zeit $t_2=1.5 \cdot dt$ usw. in $E(t_i)$ hineingeschrieben wird. Die Größe $\text{Länge}(E(t_i))$ von $E(t_i)$ hängt davon ab, wie die N_i gerundet wurden, ist aber nur geringfügig verschieden von 100000. Aus den so erstandenen Ensemble an Zeiten kann man sich die Abklingkuren generieren.

Dieses Verfahren wurde auf zwei verschiedene Farbstofftypen, zum einen auf Farbstoff 1 mit einer Lebensdauer von $\tau_1=2\text{ns}$ bzw. auf Farbstoff 2 mit $\tau_2=4\text{ns}$ angewendet. Die den Farbstoffen zu Grunde liegenden Grundwahrscheinlichkeiten sind die in Abb. IV-4

dargestellten $\{P_1(t_i)\}$ und $\{P_2(t_i)\}$. Bei einer festen Intensität von $I=40$ wurden jeweils 10000 Abklingkurven berechnet, bei denen a) alle Zeiten aus dem Ensemble $E_1(t_i)$ ($(40:0)_{40}$ Mischung), b) alle Zeiten aus dem Ensemble $E_2(t_i)$ ($(0:40)_{40}$ Mischung) und c) 20 Zeiten aus $E_1(t_i)$ und 20 Zeiten aus $E_2(t_i)$ gezogen wurden ($(20:20)_{40}$ Mischung). Der Ausdruck $(I_1:I_2)_I$, $I=I_1+I_2$, bedeutet im weiteren Verlauf eine Mischung, bei der aus einem Ensemble von $E_1(t_i)$ I_1 Zeiten und aus einem Ensemble von $E_2(t_i)$ I_2 Zeiten gezogen wurden unter der Voraussetzung, dass insgesamt I Photonen gezogen werden. Auf die erzeugten Abklingkurven wurde jeweils die klassische Mustererkennung mit den Mustern $\{P_1(t_i)\}$ und $\{P_2(t_i)\}$ angewendet und die ermittelten p^{Best} histogrammiert. Die Balkenbreite des Histogramme $H(p^{\text{Best}})$ liegt bei 0.01. Für $(40:0)_{40}$ würde man ein mittleres $\langle p^{\text{Best}} \rangle \approx 1$ und für $(0:40)_{40}$ $\langle p^{\text{Best}} \rangle \approx 0$ erwarten. Für $(20:20)_{40}$ erwartet man ein $\langle p^{\text{Best}} \rangle \approx 0.5$. Aus dem Histogramm $H(p^{\text{Best}})$ kann man den Fehler Δp^{Best} der Mustererkennung ableiten, bei einer gegebenen Intensität I eine Mischung $(I_1:I_2)_I$ zu beschreiben. Definiert man das Mischungsverhältnis M_{12} als $M_{12}=I_1/I$, dann ist Δp^{Best} (siehe Gl. IV-5) das zweite zentrale Moment bezüglich M_{12} .

$$\Delta p^{\text{Best}} = \sqrt{\frac{I}{n} \cdot \sum_{\{p^{\text{Best}}\}} (p^{\text{Best}} - M_{12})^2}$$

Gl. IV-5

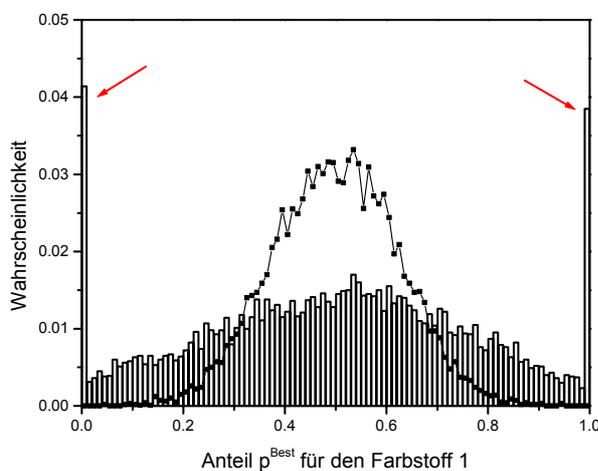


Abb. IV-6:

(□): $H(p^{\text{Best}})$ für $(20:20)_{40}$

(-■-): $H(p^{\text{Best}})$ für $(100:100)_{200}$

Wobei n die Anzahl der simulierten Abklingkurven darstellt. Es ist von Bedeutung, dass der Fehler Δp^{Best} bezüglich M_{12} , und nicht bezüglich $\langle p^{\text{Best}} \rangle$, des Mittelwerts der Verteilung $H(p^{\text{Best}})$, definiert wird. Geht man davon aus, dass für eine Verteilung $H(p^{\text{Best}})$ allgemein gilt: $M_{12} = \langle p^{\text{Best}} \rangle + \Delta p$, und setzt man diesen Zusammenhang in Gleichung Gl. IV-5 ein, dann zeigt sich, dass man Δp^{Best} schreiben kann als:

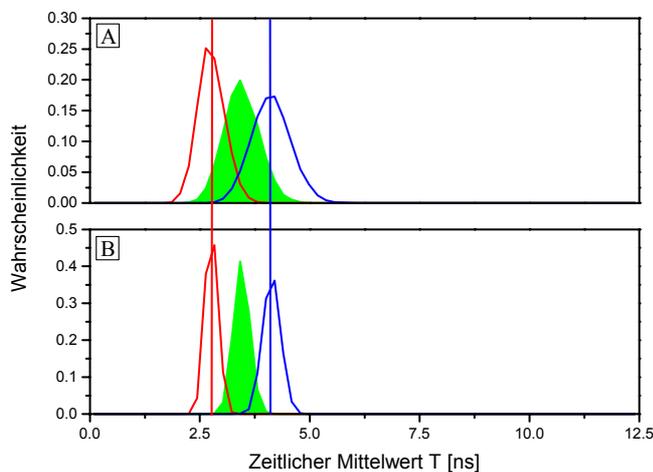
$$\Delta p^{\text{Best}} = \sqrt{\frac{I}{n} \cdot \underbrace{\sum_{\{p^{\text{Best}}\}} (p^{\text{Best}} - \langle p^{\text{Best}} \rangle)^2}_I + \frac{\Delta p^2}{2}}$$

Gl. IV-6

Der erste Summand unter der Wurzel in Gl. IV-6 stellt das Quadrat der herkömmlich definierten Standardabweichung der Verteilung $H(p^{\text{Best}})$ dar, der zweite Summand ist die quadratische Abweichung von M_{12} zu $\langle p^{\text{Best}} \rangle$. Der Fehler Δp^{Best} ist somit am kleinsten, wenn $H(p^{\text{Best}})$ schmal verteilt und der Mittelwert nicht vom Modellwert abweicht.

In Abb. IV-5 sind die Histogramme $H(p^{\text{Best}})$ für $(40:0)_{40}$ (□) und für $(0:40)_{40}$ (□) dargestellt. Wie erwartet sind die Wahrscheinlichkeiten für ein $p^{\text{Best}}=1$ bzw. ein $p^{\text{Best}}=0$ sehr viel größer als für alle anderen p^{Best} Werte, liegen mit 57% im Fall $(40:0)_{40}$ und 51% im Fall $(0:40)_{40}$ aber doch deutlich von 100% entfernt. Für die Mittelwerte ergeben sich $\langle p^{\text{Best}} \rangle = 0.92$ ($(40:0)_{40}$) bzw. $\langle p^{\text{Best}} \rangle = 0.13$, und die Fehler der Mustererkennung sind $\Delta p^{\text{Best}} = 0.16$ ($(40:0)_{40}$) bzw. $\Delta p^{\text{Best}} = 0.22$ ($(0:40)_{40}$).

Anders stellt sich die Situation für $(20:20)_{40}$ dar (siehe (□) in Abb. IV-6). Der Mittelwert der

**Abb. IV-7:**

A: I=40, B: I=200

(—): H(T) für Farbstoff 1

(—): H(T) für Farbstoff 2

(■): H(T) für $(20:20)_{40}$ bzw. $(100:100)_{200}$

Die rote Linie zeigt die mittlere Zeit der $(40:0)_{40}$ bzw. $(200:0)_{200}$ und die blaue Linie zeigt die mittlere Zeit der $(0:40)_{40}$ bzw. $(0:200)_{200}$

Verteilung $H(p^{\text{Best}})$ liegt wie erwartet bei $\langle p \rangle^{\text{Best}} \approx 0.5$, der Fehler ist aber mit $\Delta p^{\text{Best}} = 0.27$ sehr hoch. Auffällig sind die sehr hohen Wahrscheinlichkeiten für $p^{\text{Best}}=1$ bzw. für $p^{\text{Best}}=0$, in Abb. IV-6 gekennzeichnet mit den beiden roten Pfeilen. Aus dem Histogramm können relativ gut Rückschlüsse auf die innere Struktur der klassischen Mustererkennung gewonnen werden. Wie oben schon angemerkt sucht der Algorithmus nach dem Minimum von $KLI_V(p)$, wenn eine der simulierten Abklingkurven „kürzer“ ist, als das verwendet Muster $\{P_1(t_i)\}$, d.h. der

zeitliche Mittelwert T der Abklingkurve ist kleiner als die mittlere Zeit $T_{\{P\}}^1 = 2.76\text{ns}$. Dann liegt das Minimum immer bei $p^{\text{Best}}=1$. Ist der zeitliche Mittelwert T größer als die mittlere Zeit $T_{\{P\}}^2 = 4.14\text{ns}$ von $\{P_2(t_i)\}$ beträgt $p^{\text{Best}}=0$.

Verdeutlichen kann man sich diesen Sachverhalt, indem man während der Simulation nicht nur die klassische Mustererkennung auf die Abklingkurven anwendet, sondern zusätzlich noch deren zeitliche Mittelwerte T nach Gl. IV-1 bestimmt und histogrammiert. Als Balkenbreite dieser Histogramme $H(T)$ wurde 195 ps gewählt. Neben der Simulation für $I=40$ wurde eine weitere für $I=200$ durchgeführt.

Die in Abb. IV-7 A dargestellten Verteilungen $H(T)$ zeigen, dass bei $(20:20)_{40}$ (■) relativ häufig der Fall eintritt, dass T kleiner ist als $T_{\{P\}}^1$ (rote Linie) bzw. größer ist als $T_{\{P\}}^2$ (blaue Linie). Alle Abklingkurven mit einem T jenseits der beiden Linien ergeben die Extremwerte für p^{Best} . Die Wahrscheinlichkeit für Extremwerte von p^{Best} ist stark von der Photonenzahlstatistik abhängig. Bei der Simulation mit $I=200$ ergibt sich das in Abb. IV-7 B gezeigte Bild. $H(T)$ für $(100:100)_{200}$ (■) zeigt praktisch keine Überlappung mehr. Für $(100:100)_{200}$ ergibt sich das in Abb. IV-6 (---) gezeigte $H(p^{\text{Best}})$. Die Wahrscheinlichkeiten für $p^{\text{Best}}=1$ bzw. für $p^{\text{Best}}=0$ sind fast Null.

Aus dem oben gezeigten Verhalten kann man die Behauptung ableiten, dass die klassische

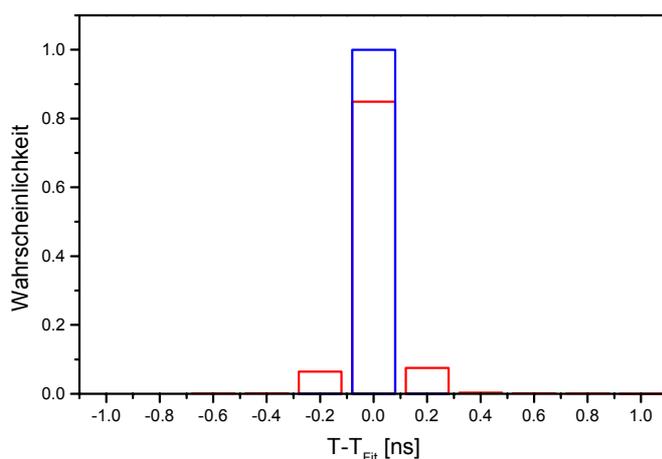


Abb. IV-8:

(□): $H(\Delta T)$ für $(20:20)_{40}$
 (□): $H(\Delta T)$ für $(100:100)_{200}$

Mustererkennung ein Algorithmus ist, in dem der zeitliche Mittelwert T quasi als eine Erhaltungsgröße angesehen werden kann. Die Linearkombination der Muster, die den kleinsten $\text{KLI}_V(p^{\text{Best}}, I)$ Wert liefert, ist die Linearkombination, deren zeitlicher Mittelwert T_{Fit} ,

dem zeitlichen Mittelwert T der gemessenen Abklingkurve entspricht. Wie gut der Erhaltungssatz den zeitlichen Mittelwert erfüllt hängt wieder von der Photonstatistik ab. Definiert man die Größe $\Delta T = T - T_{Fit}$ und bestimmt während der Simulation auch noch für jede Abklingkurve ΔT , dann verteilen sich die ΔT 's wie in Abb. IV-8. Die Balkenbreite der Histogramme $H(\Delta T)$ wurde auf 0.2ns festgelegt. Bei $I=40$ und einer $(20:20)_{40}$ Mischung ((□) in Abb. IV-8) befinden sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 85% alle ΔT 's in einem Bereich von $[-0.1 \dots 0.1]$. Bei einer Intensität $I=200$ und einer $(100:100)_{200}$ Mischung ((□) in Abb. IV-8) befinden sich praktisch 100% aller ΔT 's in diesem Bereich. Trotz der geringen Aufweichung des Erhaltungssatzes für die mittleren Zeiten bei geringen Photonstatistiken kann man davon ausgehen, dass auch die Zeit T eine selektive Größe für eine Mustererkennung sein kann. Im Laufe dieser Arbeit wird noch näher auf diesen Sachverhalt eingegangen.

Ein Algorithmus ist nur dann als Kolokalisationsalgorithmus geeignet, wenn es möglich ist, einen Fehler für den Optimierungsparameter abzuschätzen. Ohne die Möglichkeit $\Delta(p^{Best})$ angeben zu können, kann der Fehler für die berechneten Abstand zweier Moleküle nicht angegeben werden. Es fehlt somit schlussendlich eine statistische Aussage darüber, ob ein Abstand signifikant ist oder nicht. Um den Fehler $\Delta(p^{Best})$ für p^{Best} abzuschätzen müsste man die Integrale $\langle p \rangle = \int p \cdot P_V(p; I) \cdot dp$ und $V_p = \int (p - \langle p \rangle)^2 \cdot P_V(p; I) \cdot dp$ lösen. Aus $\langle p \rangle$ und V_p kann $\Delta(p^{Best})$ berechnet werden: $\Delta(p^{Best}) = \sqrt{(\langle p \rangle - p^{Best})^2 + V_p}$.

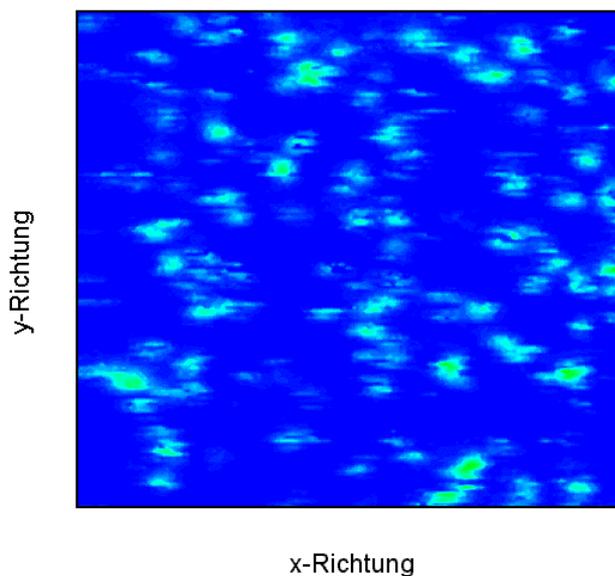
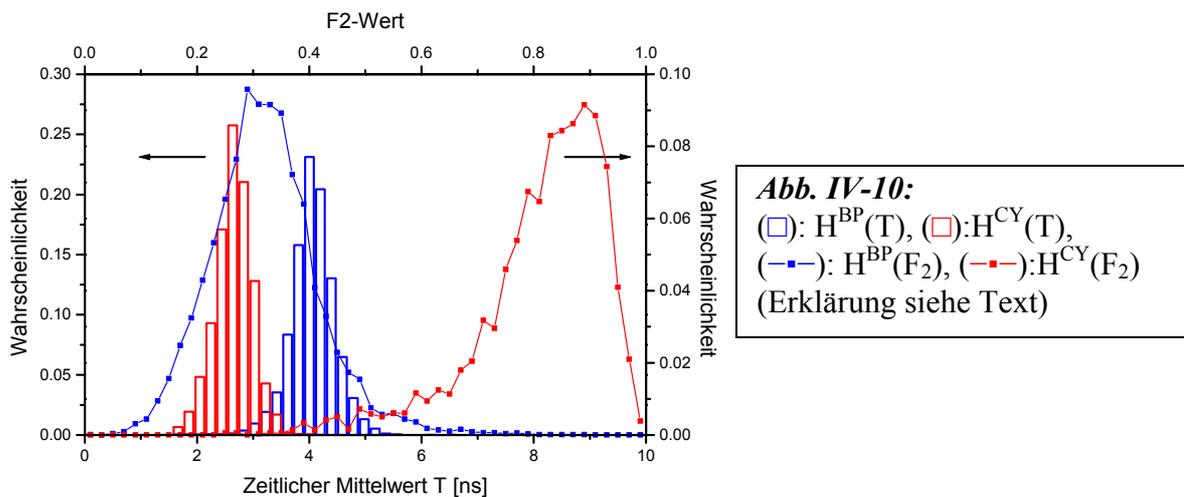


Abb. IV-9:
Bild einer Bodipy630/650
Oberfläche.

Die klassische Mustererkennung besitzt in der beschriebenen Form das Problem, dass nicht die vollständige Information eines Datensatzes ausgenutzt wird. Wie schon erwähnt, ist neben der Zeitinformation aber auch die spektrale Information charakteristisch für einen Farbstoff.

Die optimale Form einer Kolokalisationstheorie nutzt beide Informationen. Um ein Gefühl zu bekommen, wie sich die zeitliche und spektrale Information für einen Farbstoff verteilt, wurden zwei verschiedene Farbstoffproben untersucht. Es handelt sich zum einen um eine Cy5.5-Probe und zum anderen um eine Bodipy630/650-Probe. Beide Proben wurden trocken auf eine Glasoberfläche gebracht, und mit Hilfe einer SFLIM-Anlage untersucht, indem ein gewisser Bereich der Probe abgerastert wurde. Ein so entstandenes Bild einer Bodipy630/650-Oberfläche ist in Abb. IV-9 gezeigt.

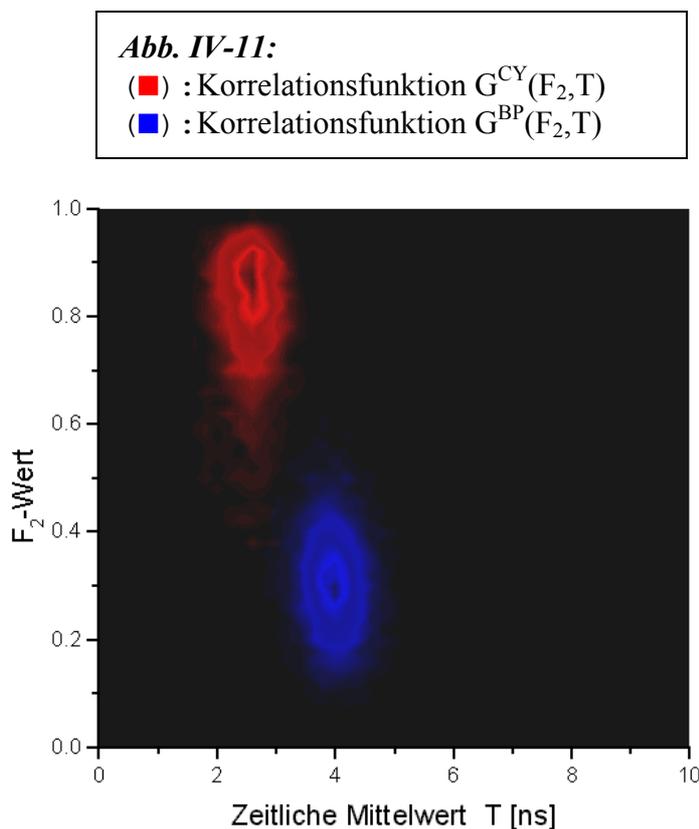
Für jeden Pixel oberhalb einer Schwellenintensität $I_S=30$ wurde der zeitliche Mittelwert T und der F_2 -Wert bestimmt. Der Grund, warum eine so hohe Schwelle angesetzt wurde, ist, dass Hintergrundeffekte vernachlässigt werden sollen. Auf diese Tatsache wird noch im Kapitel VI eingegangen. Die einzelnen Zeiten T ($H(T)$) und die einzelnen F_2 -Wert ($H(F_2)$) der Pixel wurden histogrammiert, die Balkenbreite der $H(T)$ Histogramme liegt bei 195 ps, die der $H(F_2)$ Histogramme bei 0.02. In Abb. IV-10 sind sowohl $H^{BP}(T)$ (\square) und $H^{CY}(T)$ (\square), wie auch $H^{BP}(F_2)$ ($\text{---}\square\text{---}$) und $H^{CY}(F_2)$ ($\text{---}\square\text{---}$) abgebildet. Die Indices BP bzw. CY stehen für die



Histogramme, die aus dem Bild der Bodipy630/650- bzw. der Cy5.5-Probe generiert wurden. Aus Abb. IV-10 ist deutlich zu entnehmen, dass die beiden Farbstoffe sowohl über die zeitliche, wie die spektrale Information relativ gut zu trennen sind, obwohl die Unterscheidbarkeit nicht bei 100% liegt. Dies ist daran erkennbar, dass sich die Histogramme $H^{BP}(T)$ und $H^{CY}(T)$, sowie $H^{BP}(F_2)$ und $H^{CY}(F_2)$ überschneiden.

Zur Erweiterung der klassische Mustererkennung um die spektrale Information, müsste der F_2 -Algorithmus ebenfalls in einer kontinuierlichen Schreibweise vorliegen. In der weiteren

Argumentation bezeichnet $LF^T(p;I)$ die Likelihood-Funktion der Mustererkennung bezüglich der Zeitinformation Inf^T , und $LF^{F_2}(p;I)$ die Likelihood-Funktion der Mustererkennung bezüglich der spektralen Information Inf^{F_2} . Der Datensatz auf den die Algorithmen angewendet werden, ist durch einen Pixel mit der Intensität I und einem gemessenen (Inf^T, Inf^{F_2}) Wertepaar gegeben. Bei Inf^T handelt es sich um eine Abklingkurve $\{d(t_i)\}$, und Inf^{F_2} ist gegeben durch einen F_2 -Wert. Aus beiden Likelihood-Funktionen kann eine resultierende Likelihood-Funktion $LF^{T,F_2}(p;I)$ bestimmt werden, und aus $LF^{T,F_2}(p;I)$ kann $(p^{T,F_2})^{Best}$ bzw. ein $\Delta(p^{T,F_2})^{Best}$ ermittelt werden. Es stellt sich die Frage, ob es überhaupt möglich ist den F_2 -Algorithmus in einer kontinuierlichen Schreibweise zu definieren. Die spektrale Information eines Pixel besteht aus der Anzahl I_R der Photonen im roten Kanal, geteilt durch die Gesamtintensität I . Es ergibt sich der F_2 -Wert: $F_2=I_R/I$. Da I_R wie I eine diskrete Größe ist, ist auch F_2 diskret verteilt. Im kolokalisierten Fall besteht die Fluoreszenz eines Pixels aus einer Mischung $(I_1:I_2)_I$. Als spektrales Muster für einen Farbstoff wählt man die Größe p_{Rot} . p_{Rot} stellt die Wahrscheinlichkeit dar, mit der ein Photon im roten Kanal detektiert wird. Die Abklingkurve des Pixel kann nach Gl. IV-1 in einen zeitlichen Mittelwert T umgerechnet werden. In Abb. IV-8 wurde gezeigt, dass der zeitliche Mittelwert eine Erhaltungsgröße darstellt. Die klassische Mustererkennung kann daher auch in der in Gl. IV-7 dargestellten Form geschrieben werden.



$$T = p \cdot T_p^1 + (1 - p) \cdot T_p^2, \quad p = 0 \dots 1$$

Gl. IV-7

T_p^1 und T_p^2 sind die mittleren Zeiten der Farbstoffe 1 und 2. Wenn der F_2 -Algorithmus kontinuierlich definierbar wäre, müsste es möglich sein die Struktur aus Gl. IV-7 auf den F_2 -Algorithmus zu übertragen (siehe Gl. IV-8).

$$F_2 = p^{F_2} \cdot p_{Rot}^1 + (1 - p^{F_2}) \cdot p_{Rot}^2$$

Gl. IV-8

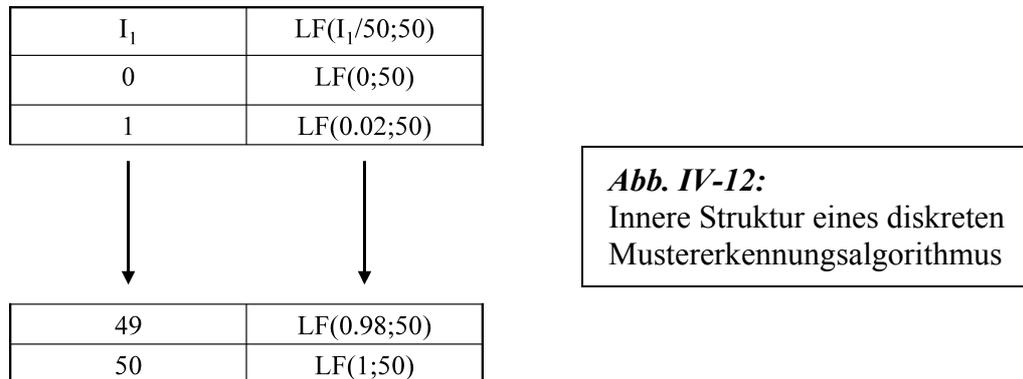
Da aber F_2 diskret ist, kann p^{F_2} aus Gl. IV-8 niemals kontinuierlich verteilt

sein. Bei einer Intensität I gibt es nur $(I+1)$ verschiedene p^{F_2} . Es ist somit nicht möglich den F_2 -Algorithmus kontinuierlich zu schreiben. Eine Likelihood-Funktion $LF^{F_2}(p;I)$ kann nicht definiert werden, und daraus folgt, dass auch kein $LF^{T,F_2}(p;I)$ bestimmt werden kann. Die klassische Mustererkennung ist in der gewählten Form folglich nicht zu einem F_2 -Algorithmus kompatibel.

Eine schlüssige Kombination der Zeitinformation und der spektralen Information stellt aber die beste Wahl für einen Kolokalisationsalgorithmus dar. Ein solcher Algorithmus wird als SFLIM-Algorithmus bezeichnet. Aus mathematischer Sicht kann ein solcher Algorithmus nie schlechter sein als der beste Einzelalgorithmus. Dies wird deutlich, wenn die Korrelationsfunktionen $\{G^{BP}(F_2,T)\}$ bzw. $\{G^{CY}(F_2,T)\}$ zwischen F_2 und T der beiden Farbstoffe Bodypy630/650 und Cy5.5 betrachtet werden. Eine Korrelationsfunktion $G(F_2,T)$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit welcher ein Wertepaar (F_2,T) in einem Pixel auftritt. In Abb. IV-11 sind $\{G^{BP}(F_2,T)\}$ und $\{G^{CY}(F_2,T)\}$ aufgetragen. Es ist deutlich zu sehen, dass die relative Überlappung der beiden Verteilungen wesentlich kleiner ist, wie im Fall von $H^{BP}(T)$ und $H^{CY}(T)$ bzw. $H^{BP}(F_2)$ und $H^{CY}(F_2)$ (siehe Abb. IV-10). Ein SFLIM-Algorithmus, dessen Güte mit der Überlappung der Korrelationsfunktion verknüpft ist, würde also einen wesentlich kleineren Fehler erwarten lassen.

Um einen SFLIM-Algorithmus zu entwickeln muss die innere Struktur der klassischen Mustererkennung verändert werden.

IV.4. Anpassung der inneren Struktur der klassischen Mustererkennung



Der oben beschriebene Algorithmus stellt einen kontinuierlichen Anpassungstest dar, bei dem sich die möglichen Werte von p über den Bereich von 0 bis 1 erstrecken können. Solch einen Algorithmus bezeichnet man als einen kontinuierlichen Best-Fit Algorithmus.

Hier zeigt sich aber schon ein Kompatibilitätsproblem auf, da, entgegen der kontinuierlichen Beschreibung des Algorithmus, die Photonenstatistik diskret vorliegt. Hier wird wieder angenommen, dass die Photonen eines Pixels aus zwei verschiedenen Grundwahrscheinlichkeiten stammen. Dann stellt bei einer Intensität I die Anzahl der Photonen I_1 die vom Farbstoff 1 kommen eine diskrete Größe dar. Es können nur $I_1=0,1,\dots,I$ Photonen vom Farbstoff 1 kommen. Dieses Argument spricht gegen eine kontinuierliche Schreibweise der klassischen Mustererkennung. Der kontinuierliche sollte in einen diskreten Algorithmus überführt werden. Dazu verlässt man den Ansatz, dass unendlich viele Linearkombinationen $\{P_{12}(t_i;p)\}$ möglich sind. Man geht von einer endlichen Anzahl von Linearkombinationen aus, und zwar für jede mögliche Mischung $(I_1:I_2)_I$. Der Übergang von einer kontinuierlichen zu einer diskreten Schreibweise entspricht somit einem Übergang von p zu einem Verhältnis $M_{12}=I_1/I$, bzw. einem Übergang von $\{P_{12}(t_i;p)\}$ zu $\{P_{12}(t_i;I_1/I)\}$. Die innere Struktur des Algorithmus ändert sich hierbei gravierend, siehe Abb. IV-12. Jede mögliche Linearkombination $\{P_{12}(t_i;I_1/I)\}$ führt zu einem Likelihood-Wert $LF(I_1/I;I)$. Bei einer Intensität I , kann man nun auf $I+1$ verschiedene Likelihood-Werte zurückgreifen, anstatt nur auf einen extremen Wert $LF(p^{\text{Best}};I)$. Im Fall von $I=50$ sind z.B. die Verhältnisse $I_1/I=0, 0.02, \dots, 1$ möglich.

Beim Übergang zum diskreten Fall muss überprüft werden, ob die oben eingeführte Kullback-Leibler-Diskriminierungsinformation $KL_{IV}(I_1/I;I)$ (siehe Gl. IV-4) immer noch als Likelihood-Funktion geeignet ist. Zum anderen muss geklärt werden, wie man aus der Verteilung $\{LF(I_1/I;I)\}$, den besten Schätzer I_1^{Best} für die wahre Intensität I_1 ermittelt, und einen Fehler $\Delta(I_1^{Best})$ angeben kann. Prinzipiell gibt es hierfür zwei Möglichkeiten.

Zum einen kann man für I_1^{Best} das I_1^{Max} wählen, für das $LF(I_1^{Max}/I;I)$ extrem wird. Einen solchen Algorithmus werde ich im Folgenden als einen diskreten Best-Fit Algorithmus bezeichnen. Dieser Algorithmus ist die diskrete Formulierung der oben beschriebenen klassischen Mustererkennung.

Oder man berechnet I_1^{Best} über die Gl. IV-9 (a) oder (b).

$$I_1^{Best} = \frac{\sum_{I_1=0}^I I_1 \cdot LF(I_1 / I; I)}{\sum_{I_1=0}^I LF(I_1 / I; I)} \quad (a), \text{ oder } I_1^{Best} = \frac{\sum_{I_1=0}^I I_1 \cdot (1 / LF(I_1 / I; I))}{\sum_{I_1=0}^I (1 / LF(I_1 / I; I))} \quad (b)$$

Gl. IV-9

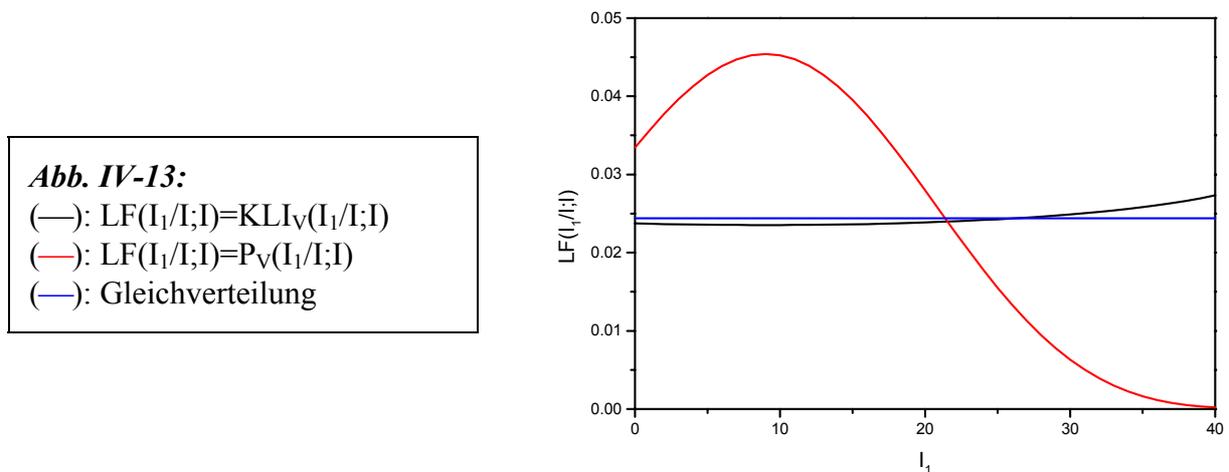
I_1^{Best} ist also nach Gl. IV-9 definiert als der Mittelwert der Wahrscheinlichkeitsverteilung $\{LF(I_1/I;I)\}$ (Fall (a)) oder der Wahrscheinlichkeitsverteilung $1/LF(I_1/I;I)$ (Fall (b)). Der Fall (a) trifft für Verteilungen über absolute Größe zu, $\{LF(I_1/I;I)\}$ wird gleich dem, aus der Polynominalverteilung abgeleiteten, $\{P_V(I_1/I;I)\}$ gesetzt. Der Fall (b) gilt für relative Größen, und $\{LF(I_1/I;I)\}$ wird gleich $KL_{IV}(p;I)$ gesetzt. Im Folgenden wird man bei dem durch Gl. IV-9 beschriebenen Algorithmus von einem Verteilungs-Algorithmus sprechen.

Der Vergleich zwischen dem diskreten Best-Fit Algorithmus und dem Verteilungsalgorithmus ist die Aufgabe dieses und des nächsten Kapitels. Die oben gewählten Beschreibungen der Algorithmen sind so allgemein gehalten, dass die herausgearbeiteten Zusammenhänge für alle diskreten Beschreibungen einer Kolokalisationstheorie gültig sind.

Die Frage, welcher der beiden möglichen Typen, ein diskreter Best-Fit Algorithmus oder ein Verteilungsalgorithmus, am besten geeignet ist, klärt man über eine Simulation. Hierzu geht man von einer Intensität $I=40$ aus und mischt I_1 Zeiten aus dem Ensemble $E_1(t_i)$ und I_2 Zeiten

aus dem Ensemble $E_2(t_i)$ zusammen. Für jeden möglichen Wert von I_1 , $I_1=0,1,\dots,I$, generiert man einen Satz aus 10000 Abklingkurven.

Es handelt sich prinzipiell um die gleiche Simulation wie im Abschnitt IV-3, mit dem Unterschied, das I_1 nicht fest vorgeben ist, sondern variiert wird. Auf jede generierte Abklingkurven wendet man sowohl den diskreten Best-Fit Algorithmus (Index dBf) wie auch den Verteilungsalgorithmus (Index VA) an und bestimmt das I_1^{Best} . Am Ende der Simulation



stehen für jedes $(I_1:I_2)_I$ zwei Verteilungen $H^{\text{dBf}}(I_1^{\text{Best}})$ und $H^{\text{VA}}(I_1^{\text{Best}})$ zu Verfügung, aus denen sich sowohl ein Mittelwert $\langle I_1^{\text{Best}} \rangle^{\text{dBf}}$ bzw. $\langle I_1^{\text{Best}} \rangle^{\text{VA}}$, wie auch die zweiten zentralen Momente $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBf}}$ und $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$ bezüglich dem bekannten I_1 bestimmen lassen.

Um die Frage zu klären, welche Likelihood-Verteilung $\{LF(I_1/I;I)\}$ man bei diskreten Algorithmen ansetzen muss, wird bei bestimmten Mischungen eine der simulierten Abklingkurve herausgegriffen. Aus der simulierten Abklingkurve werden die Verteilungen $\{KLI_V(I_1/I;I)\}$ und $\{P_V(I_1/I;I)\}$ berechnet. Für die in Abb. IV-13 gezeigten Verteilungen $\{KLI_V(I_1/I;I)\}$ (—) und $\{P_V(I_1/I;I)\}$ (—) wurde eine Abklingkurve aus einer $(12:28)_{40}$ Mischung genommen. Es ist bekannt das $P_V(I_1/I;I)$ maximal wird, wenn $KLI_V(I_1/I;I)$ minimal wird. Das I_1^{Best} des Verteilungsalgorithmus muss für $LF(I_1/I;I)=KLI_V(I_1/I;I)$ nach Gl. IV-9 (b) und für $LF(I_1/I;I)=P_V(I_1/I;I)$ nach Gl. IV-9 (a) bestimmt werden. Der Extremwert von $KLI_V(I_1/I;I)$ und $P_V(I_1/I;I)$ liegt bei $I_1=9$, genau auch diesen Wert würde der diskrete Best-Fit Algorithmus als I_1^{Best} liefern. Der Verteilungsalgorithmus liefert hingegen im Fall von $LF(I_1/I;I)=KLI_V(I_1/I;I)$ ein $I_1^{\text{Best}}=20$, im Fall von $LF(I_1/I;I)=P_V(I_1/I;I)$ aber $I_1^{\text{Best}}=12$. Der Grund, warum der Verteilungsalgorithmus für $LF(I_1/I;I)=KLI_V(I_1/I;I)$ schlecht arbeitet, liegt

daran, dass die Werte für $KLI_V(I_1/I;I)$ sehr nahe bei einer Gleichverteilung (siehe Abb. IV-13 (—)) liegen. Bei einer Gleichverteilung über den Parameter I_1 liegt der Mittelwert immer bei $0.5 \cdot I$, da I der maximale Wert ist, den I_1 annehmen kann. Für den diskreten Best-Fit-Algorithmus ist es im Grunde egal, welche Likelihood-Funktion benutzt wird, im Fall des Verteilungsalgorithmus ist es aber ausschlaggebend, dass man mit absoluten Größen arbeitet. Daher wird im weiteren Verlauf $LF(I_1/I;I)=P_V(I_1/I;I)$ angenommen. Hiermit reduziert sich Gleichung Gl. IV-9 auf den Fall (a).

Um die Verteilungen miteinander vergleichen zu können, benötigt man eine Gütefunktion $GF(I_1)$. Eine Gütefunktion ist die Verteilung eines Güteparameters GP, der angibt wie gut ein Modell einen Datensatz beschreibt. Bei einem Güteparameter muss es sich um einen absoluten Parameter handeln, sonst wäre ein Vergleich zwischen zwei Modellen oder innerhalb eines Modells nicht möglich. Als Güteparameter GP für die Verteilung $H(I_1^{Best})$ von I_1^{Best} bietet sich die inverse relative Abweichung $I/\Delta(I_1^{Best})$ der Verteilung $H(I_1^{Best})$ an. Um so weniger eine Verteilung um das tatsächlich gegebene I_1 herum streut desto größer ist die Güte des Algorithmus. Das zweite zentrale Moment $\Delta(I_1^{Best})$ bestimmt man nach Gl. IV-10.

$$\Delta(I_1^{Best}) = \sqrt{\frac{I}{n} \cdot \sum_{\{I_1^{Best}\}} (I_1^{Best} - I_1)^2}$$

Gl. IV-10

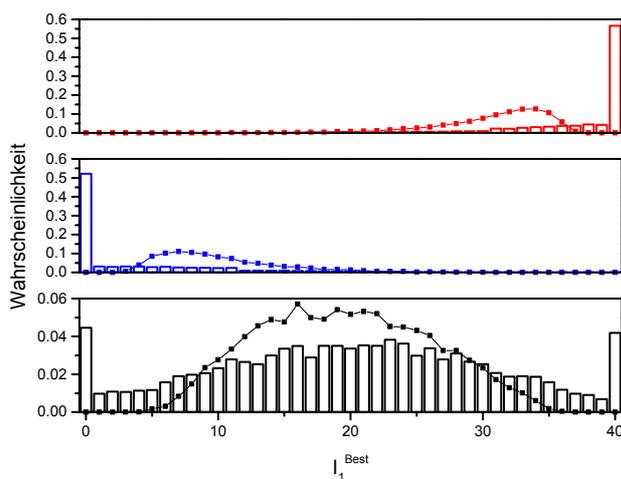


Abb. IV-14:
 (40:0)₄₀:
 (□): $H^{DBF}(I_1^{Best})$, (—■): $H^{VA}(I_1^{Best})$
 (0:40)₄₀:
 (□): $H^{DBF}(I_1^{Best})$, (—■): $H^{VA}(I_1^{Best})$
 (20:20)₄₀:
 (□): $H^{DBF}(I_1^{Best})$, (—■): $H^{VA}(I_1^{Best})$

Wobei n die Anzahl der simulierten Abklingkurven pro Mischung ist, und I_1 die bei der Mischung vorgegebene Intensität für den Farbstoff 1 darstellt.

In Abb. IV-14 sind die Verteilungen für die Mischungsverhältnisse $(40:0)_{40}$, $(0:40)_{40}$ und $(20:20)_{40}$ aufgetragen. Im Fall der Mischung $(20:20)_{40}$ ((\square) : $H^{\text{dBF}}(I_1^{\text{Best}})$, $(-\blacksquare-)$: $H^{\text{VA}}(I_1^{\text{Best}})$) fällt sofort auf, dass bei dem Verteilungsalgorithmus die Wahrscheinlichkeiten für die Extremwerte $I_1^{\text{Best}}=0$ zw. $I_1^{\text{Best}}=40$ sehr klein sind, im diskreten Best-Fit-Fall zeigt sich das oben schon im kontinuierlichen Best-Fit-Modus gezeigte Verhalten (siehe Abb. IV-6), dass die Wahrscheinlichkeiten für die Extremwerte größer sind als für alle anderen I_1^{Best} . Die Mittelwerte liegen wie zu erwarten mit $\langle I_1^{\text{Best}} \rangle^{\text{dBF}}=20$ und $\langle I_1^{\text{Best}} \rangle^{\text{VA}}=20$ genau bei $I_1=20$. Die Verteilung des Verteilungsalgorithmus erscheint aber homogener, was sich auch darin ausdrückt, dass mit $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}=6.449$ die Streuung der Werte von I_1^{Best} wesentlich kleiner als bei dem diskreten Best-Fit-Algorithmus mit $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}=10.507$ ist.

Auch im Fall der Mischungen $(40:0)_{40}$ ((\square) : $H^{\text{dBF}}(I_1^{\text{Best}})$, $(-\blacksquare-)$: $H^{\text{VA}}(I_1^{\text{Best}})$) und $(0:40)_{40}$ ((\square) : $H^{\text{dBF}}(I_1^{\text{Best}})$, $(-\blacksquare-)$: $H^{\text{VA}}(I_1^{\text{Best}})$) erscheinen die Verteilungen des Verteilungsalgorithmus homogener, die Mittelwerte $\langle I_1^{\text{Best}} \rangle^{\text{VA}}$ weichen aber mit 31 $(40:0)_{40}$ und mit 10 $(0:40)_{40}$ sehr stark von $I_1=40$ bzw. $I_1=0$ ab, was in einer großen Streuung $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$ von 10.074 bzw. 11.124 resultiert. Dagegen liegen die Mittelwerte $\langle I_1^{\text{Best}} \rangle^{\text{dBF}}$ bei 37 $((40:0)_{40})$ und 5 $((0:40)_{40})$ mit einer Streuung $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ von 6.411 und 8.716.

Berechnet man nun die Gütefunktion $GF^{\text{dBF}}(I_1)$ (siehe Abb. IV-15 $(-\blacksquare-)$) und $GF^{\text{VA}}(I_1)$ (siehe Abb. IV-15 $(-\blacksquare-)$) für alle Mischungen $(0:40)_{40} \dots (40:0)_{40}$ dann zeigen sich zwei unterschiedliche Bereiche. Links und Rechts der blauen Linien in Abb. IV-15 ist die Güte des diskreten Best-Fit Algorithmus besser, innerhalb der blauen Linien zeigt der Verteilungsalgorithmus eine bessere Güte.

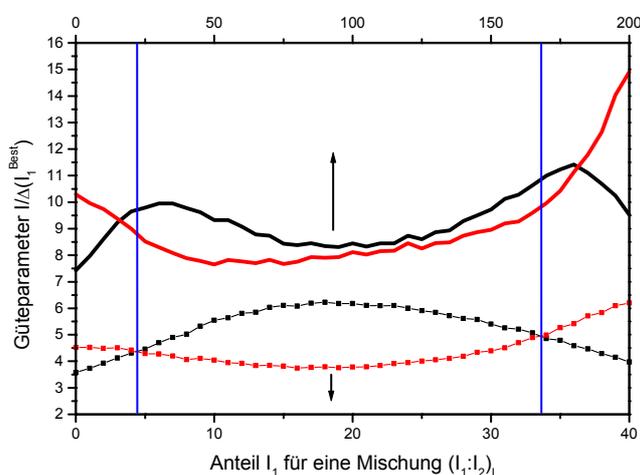


Abb. IV-15:

$I=40$:

$(-\blacksquare-)$: $GF^{\text{dBF}}(I_1)$, $(-\blacksquare-)$: $GF^{\text{VA}}(I_1)$

$I=200$:

$(-\blacksquare-)$: $GF^{\text{dBF}}(I_1)$, $(-\blacksquare-)$: $GF^{\text{VA}}(I_1)$

Das prinzipielle Verhalten bleibt auch erhalten, wenn man die gleiche Simulation für ein $I=200$ (siehe Abb. IV-15 (—): $GF^{dBf}(I_1)$, (—): $GF^{VA}(I_1)$) durchführt, obwohl sich die Form der Kurven stark verändert. Für alle Mischungen $(0:200)_{200} \dots (200:0)_{200}$ liegt die Güte oberhalb der Gütefunktion für die Simulation mit $I=40$. Dies war zu erwarten, da als Güteparameter die inverse relative Abweichung angenommen wurde und man mit einer größeren Photonenzahl schmalere Verteilungen (siehe auch Abb. IV-7), und damit eine bessere Unterscheidbarkeit erwartet. Greift man auf die Verteilungen $H(T)$ aus Abb. IV-7 A und B zurück, so ist die folgende Aussage möglich: Umso höher die Intensität I desto besser sind die Verteilungen $H(T)$ der Farbstoffe 1 und 2 getrennt, und umso größer wird die Güte der Algorithmen. Allgemein hängt der Fehler in der Unterscheidung von zwei Farbstoffen anhand eines Parameters von der Überlappung der Verteilungen des Parameters ab.

Die aus einem Datensatz über eine Kolokalisationstheorie ermittelte Information, ist immer mit einem Fehler behaftet. Die genaue Kenntnis dieser Fehler ist wichtig, da nur so die zu treffenden Aussagen statistisch erhärtet werden können. Wenn auf einen simulierten Datensatz zurück gegriffen wird, dann können die Fehler äußerst exakt ermittelt werden, da immer die der Simulation zugrunde liegende Information genutzt werden kann. So ist z.B. für einen Pixel die exakte Mischung bekannt, und diese kann mit der berechneten Mischung verglichen werden. Nun will man die entwickelten Algorithmen auf reale Datensätze anwenden, bei denen a priori der exakte Wert niemals bekannt ist. Der exakte Fehler muss bei einem gegebenen Datensatz direkt aus dem Algorithmus ohne Vorkenntnis des tatsächlichen Wertes geschätzt werden. Der oben in Gl. IV-10 definierte Parameter $\Delta(I_1^{Best})$ stellt den exakten Fehler für den Intensitätsanteil I_1^{Best} dar, er gibt also an um \pm wieviele Photonen der berechnete Wert I_1^{Best} im Mittel vom tatsächlichen Wert I_1 abweichen kann. Mit diesem Fehler können später die Fehler der Folgeaussagen abgeschätzt werden, z.B. der Fehler des Abstandes zwischen den kolokalisierten Molekülen. Da Die Intensität I fest vorgegeben ist, gilt für den Fehler $\Delta(I_2^{Best})$ für $I_2^{Best}=I-I_1^{Best}$: $\Delta(I_2^{Best})=\Delta(I_1^{Best})$. Bei simulierten Daten ist es immer möglich den Wert I_1 anzugeben, weshalb $\Delta(I_1^{Best})$ nach Gl. IV-10 bestimmt werden kann.

Im weiteren Verlauf besteht nun die Aufgabe darin einen guten Schätzer $s\Delta(I_1^{Best})^{dBf,VA}$ für die exakten Fehler $\Delta(I_1^{Best})^{dBf,VA}$ zu finden. Dabei greift man auf die Tatsache zurück, dass in der diskreten Schreibweise für jedes mögliche I_1 eine Wahrscheinlichkeit $P_V(I_1/I;I)$ bestimmt

werden kann. Aus der ermittelten Wahrscheinlichkeitsverteilung $\{P_V(I_1/I;I)\}$ lässt sich dann die Standardabweichung ${}_{P_V}\Delta(I_1^{\text{Best}})$ berechnen.

$${}_{P_V}\Delta(I_1^{\text{Best}}) = \sqrt{\sum_{I_1} P_V(I_1/I;I) \cdot (I_1 - \langle I_1 \rangle_{P_V})^2}, \quad \sum_{I_1} P_V(I_1/I;I) = 1$$

$$\langle I_1 \rangle_{P_V} = \sum_{I_1} P_V(I_1/I;I) \cdot I_1$$

Gl. IV-11

$\langle I_1 \rangle_{P_V}$ in Gl. IV-11 stellt den Mittelwert der auf 1 normierten Verteilung $\{P_V(I_1/I;I)\}$ dar. Von ${}_{P_V}\Delta(I_1^{\text{Best}})$ kann auf ${}_S\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF,VA}}$ geschlossen werden. Die Transformation ${}_{P_V}\Delta(I_1^{\text{Best}}) \rightarrow {}_S\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF,VA}}$ muss der Definition des Algorithmus folgen. Der Verteilungsalgorithmus selektiert den Mittelwert $\langle I_1 \rangle_{P_V}$ von $P_V(I_1/I;I)$ als I_1^{Best} , $I_1^{\text{Best}} = \langle I_1 \rangle_{P_V}$, die Transformation reduziert sich dann auf die Gleichheit ${}_S\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}} = {}_{P_V}\Delta(I_1^{\text{Best}})$. Im Fall des diskreten Best-Fit Algorithmus selektiert man den Maximalwert I_1^{Max} , $I_1^{\text{Best}} = I_1^{\text{Max}}$, aus $P_V(I_1/I;I)$. Im Allgemeinen muss man davon ausgehen, dass I_1^{Max} nicht gleich dem Mittelwert $\langle I_1 \rangle_{P_V}$ entspricht. Bei der Transformation ${}_{P_V}\Delta(I_1^{\text{Best}}) \rightarrow {}_S\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ ist es daher notwendig die Abweichung $(I_1^{\text{Max}} - \langle I_1 \rangle_{P_V})$ mit ein zu berechnen. ${}_S\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ berechnet sich dann wie folgt.

$${}_S\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}} = {}_{P_V}\Delta(I_1^{\text{Best}})$$

$${}_S\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}} = \sqrt{{}_{P_V}\Delta(I_1^{\text{Best}})^2 + (I_1^{\text{Max}} - \langle I_1 \rangle_{P_V})^2}$$

Gl. IV-12

Die Überprüfung, wie sich die ${}_S\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF,VA}}$ verteilen und ob der Schätzer geeignet ist, kann wieder nur über eine Simulation erfolgen. Der Aufbau der Simulation folgt den oben beschriebenen Ablauf, mit dem Unterschied, dass bei einer festen Intensität $I=40$ nun insgesamt 410000 mal per Zufallsgenerator ein I_1 zwischen 0 und 40 erzeugt wird. Jede dieser Mischungen $(I_1:I_2)_{40}$, $I_2=I-I_1$ wird nach dem bekannten Prinzip eine Abklingkurve $\{d(t_i)\}$ zugeschrieben, auf die dann sowohl der diskrete Best-Fit Algorithmus, wie der Verteilungsalgorithmus angewendet wird. Für jede Abklingkurve ist nun die Wahrscheinlichkeitsverteilung $P_V(I_1/I;I)$ bekannt, aus der dann ${}_{P_V}\Delta(I_1^{\text{Best}})$, und nach den oben definierten Transformationen ${}_S\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ und ${}_R\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$ berechnet werden kann. Der Zufallsoperator für I_1 wurde so programmiert, dass für jedes mögliche I_1 , $I_1=0 \dots 40$, die gleiche Häufigkeit von 10000 angesetzt wird. Jede simulierte Abklingkurve $\{d(t_i)\}$ ist unabhängig von den anderen, und zieht damit ein unabhängiges $P_V(I_1/I;I)$ nach sich. Für jedes

I_1 sind somit ~ 10000 unabhängige $p_v \Delta(I_1^{\text{Best}})$ -Werte gegeben, aus denen ein mittlerer Schätzer $\langle s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}} \rangle$, bzw. $\langle s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}} \rangle$ und deren Streuung bestimmt werden kann. In Abb. IV-16 sind bei $I=40$ für alle I_1 sowohl die Fehler $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ (—■—) und $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$ (—■—), sowie ihre mittleren Schätzer $\langle s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}} \rangle$ (—■—) und $\langle s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}} \rangle$ (—■—) und deren Streuung (■) bzw. (■) aufgetragen.

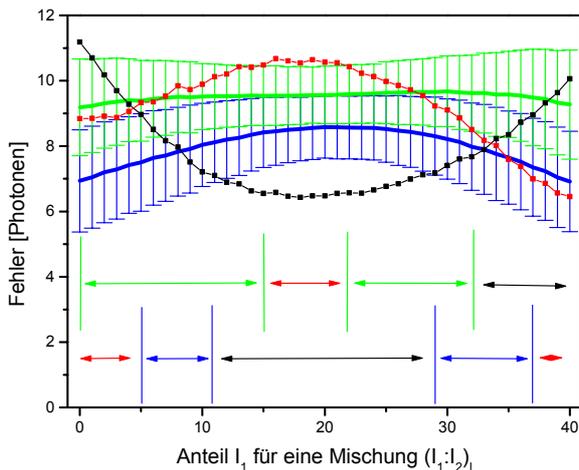


Abb. IV-16:

$I=40$:

Fehler von I_1^{Best} bei bekannten I_1 :

(—■—): $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$

(—■—): $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$

Fehler von I_1^{Best} ohne

Berücksichtigung von I_1 :

(—■—): $\langle s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}} \rangle$

(—■—): $\langle s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}} \rangle$

(■), (■): Streuungsintervalle

Erklärung grüne und blaue

Intervalle siehe Text

Aus Abb. IV-16 kann man entnehmen, dass im diskreten Best-Fit Modus die Werte des mittleren Schätzers $\langle s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}} \rangle$ im Intervall zwischen 9.18 – 9.65 liegen. Die Funktion $\langle s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}} \rangle$ von I_1 ist somit in guter Näherung durch eine Gleichverteilung zu beschreiben. Damit ist $\langle s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}} \rangle$ in 1. Näherung nur eine Funktion von I , $\langle s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}} \rangle = \langle s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}} \rangle(I)$, und unabhängig von der Mischung. Zusätzlich fällt auf, dass sich der Fehler $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ zum größten Teil innerhalb des Streuungsintervall von $s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ befindet. Diese Bereiche sind durch die grünen Intervalle in Abb. IV-16 gekennzeichnet. Die mit den roten Pfeilen gekennzeichneten Intervalle geben die Bereiche an, in denen die $s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ bzw. $s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$ den exakten Fehler unterschätzten, und die schwarzen Pfeile geben die Bereiche an, in denen der Fehler überschätzt wird. Der rote Bereich ist im diskreten Best-Fit Modus eindeutig am kleinsten. Zusätzlich liegen die Werte nur geringfügig über dem Streuungsintervall von $s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$. Es lässt sich ableiten, dass $s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ ein guter Schätzer für $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ ist.

Im Verteilungsmodus stellt sich die Situation anders dar. Der Definition von ${}_s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$ zu Folge (siehe Gl. IV-12) ist $\langle {}_s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}} \rangle$ immer kleiner als $\langle {}_s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}} \rangle$. Trotzdem verwundert es, dass $\langle {}_s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}} \rangle$ so stark von der Gleichverteilung abweicht. Neben der starken Abweichung von einer Gleichverteilung, fällt ebenfalls auf, dass sich das Streuungsintervall von ${}_s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$ und $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$ nur für kleine Bereiche, in Abb. IV-16 dargestellt durch die blauen Pfeile, überschneidet. Größten Teils liegen die Werte von $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$ deutlich unterhalb des Streuungsintervall, schwarze Intervalle, der Fehler wird somit überschätzt. Für die mit roten Pfeilen markierten Bereiche liegt $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$ ebenso deutlich oberhalb dem Streuungsintervall. Verglichen zum diskreten Best-Fit Modus zeigt der Schätzer im Verteilungsmodus eine unbefriedigende Übereinstimmung mit dem Wert $\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$.

Die oben durchgeführten Simulationen stellen eine 1-dimensionale Messung dar. Es wurde immer nur jeweils ein Pixel mit einer Gesamtintensität, bzw. einer vorgegebenen Mischung, $(I_1:I_2)_I$ betrachtet. Im Grunde sind die bis jetzt abgeleiteten Zusammenhänge nur ausreichend, um den Fall für eine Lösungsmessung umfassend zu beschreiben. Im Gegensatz zu einer Lösungsmessung, bei der ein Molekülpaar durch den Fokus schwimmt, daher zu einer bestimmten Makrozeit nur ein gemessenes Parameterpaar vorliegt, muss bei einer Oberflächenmessung berücksichtigt werden, dass jeder dieser 1-dimensionalen Messpunkte, Pixel genannt, zu einem Ensemble von Messpunkten gehört, dem Spot. Bei einer Oberflächenmessung legt die Makrozeit den Pixel fest, in den ein Photon einsortiert wird. Die Auswertung startet aber erst wenn ein ganzes Ensemble von Messpunkten, in unserem Fall ein Bild bestehend aus Spots, aufgenommen wurde. Somit spielt für die Datenauswertung die Makrozeit keine Rolle.

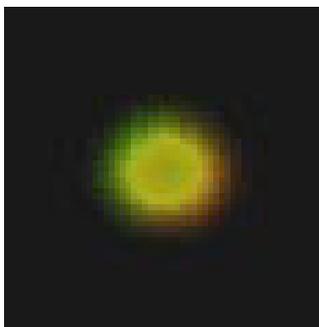


Abb. IV-17:

Kolokalisierter Spot bestehend aus zwei 2-dimensionalen Gaussfunktionen mit einem Abstand von 38 nm. Farbe der Schattierungen siehe Text.

Eine Simulation, die eine solche Messung beschreibt, muss daher 2-dimensional aufgebaut werden. Alle die oben ermittelten Gesetzmäßigkeiten behalten ihre Richtigkeit. Der Datensatz

in einer 2-dimensionalen Simulation stellt der in Abb. IV-17 abgebildete kolokalisierte Spot dar. Ein solcher Spot besteht aus zwei Teilspots für Farbstoff 1 und Farbstoff 2. Der Abstand der Moleküle beträgt 38nm, die Gesamtgröße des Bildes ist $(1 \times 1) \mu\text{m}$. Für die beiden Teilspot wurde eine 2-dimensionale Gauss-Verteilung, als Intensitätsverteilung angesetzt. Innerhalb des Gesamtspots zeichnen sich 3 Bereiche ab, ein Bereich hoher Intensität in der Mitte des Spots, indem ebenfalls eine große Überlappung der beiden Teilspots auftritt, dargestellt durch die gelbe Schattierung. Zudem Bereiche mit geringer Intensität am Rande des Spots, in denen überwiegend nur Farbstoff 1, rote Schattierung, oder Farbstoff 2, grüne Schattierung, vorliegen. Wird ein solches Bild zurück reduziert auf eine 1-dimensionale Betrachtung, dann sind Mischungen mit I_1 bzw. I_2 viel größer als I_2 bzw. I_1 korreliert mit einer geringeren Gesamtintensität, und Mischungen mit $I_1 \sim I_2$ korreliert mit einer hohen Gesamtintensität. Um abzuleiten wie sich die unterschiedlichen Typen bzw. der Fehler einer diskreten Kolokalisationstheorie bei einem solchen Datensatz verhält, benötigt man einen kompletten simulierten zeitaufgelösten Datensatz.

IV.5. Simulation eines kompletten zeitaufgelösten Datensatzes

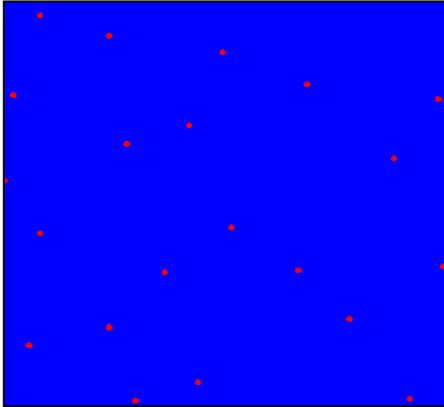


Abb. IV-18:
Lage der statistisch verteilten
Punktlichtquellen (y_C, x_C)

Um einen kompletten zeitaufgelösten Datensatz zu simulieren, muss man sich ein Bild einer mit kolokalisierten Farbstoffpaaren belegten Oberfläche simulieren. Hierbei geht man von den folgenden Annahmen aus: Der Abstand der einzelnen Pixels beträgt 50nm, sowohl in x- wie in y-Richtung, die Gesamtgröße der erzeugten Bilder ist frei wählbar, für die im Folgenden gezeigten Bilder beträgt sie 200x200Pixel, also umgerechnet 10x10 μ m. Auf diese Oberfläche verteilt man statistisch einzelne Moleküle des Typs 1. Bei einer solchen Auflösung sind die auf der Oberflächen statistisch verteilten Moleküle als Punktlichtquellen aufzufassen (siehe Abb. IV-18). Die Lage der Punktlichtquellen des Typs 1 sind gekennzeichnet durch einen Satz von Positionen (y_C, x_C) . Jedem dieser Punkte wird ein Punkt (y_C', x_C') zugeordnet, der für den entsprechend kolokalisierten Farbstoff des Typ 2 steht. Die Positionen (y_C', x_C') weichen statistisch in einem Bereich von (-1 ... +1) Pixel in x-Richtung bzw. y-Richtung von (y_C, x_C) ab. Neben der Lage der Moleküle wird auch die Gesamtzahl I_{Ges}^1 bzw. I_{Ges}^2 von Photonen festgelegt, die ein einzelnes Molekül des Typs 1 oder 2 emittieren kann. Bei realen Proben liegt I_{Ges} in einem Bereich von 5000-20000 Photonen. Für die folgenden Bilder wird von einem $I_{Ges}^1 = I_{Ges}^2 = 5000$ für jedes Molekül ausgegangen. Die Spotintensität wurde bewusst nicht zu hoch angesetzt, da in der Regel nicht davon ausgegangen werden kann, dass bei simulierten Daten alle Einflüsse auch vollständig realitätsnah kopiert werden können.

Aus Abschnitt II.3 ist bekannt, dass in einem Lichtmikroskop diese Photonen nicht alle auf einen Pixel fallen, sondern aufgrund von Beugungseffekten an den optischen Instrumenten, über mehrere Pixel verteilt sind. Diese jedem Spot zu Grunde liegende Verteilungsfunktion,

wird PSF genannt. Innerhalb dieser Simulation wird für die PSF eine Gauss-Funktion angenommen. Die PSF lässt sich schreiben als:

$$PSF(x,y) = \frac{2}{\pi \cdot \omega^2} \cdot \exp\left(-\frac{2(x - (x_c \text{ bzw. } x_c'))^2}{\omega^2}\right) \cdot \exp\left(-\frac{2(y - (y_c \text{ bzw. } y_c'))^2}{\omega^2}\right)$$

Gl. IV-13

ω ist 2 mal die 1σ -Abweichung der Gussverteilung, die in dieser Simulation 2.5 Pixel beträgt. Um auf die Pixelstruktur der Bilder angewendet werden zu können, muss $PSF(x,y)$ zuerst in die diskrete Intensitätsverteilung $\{\text{Spot}(m,n)\}$ für einen Spot überführt werden,

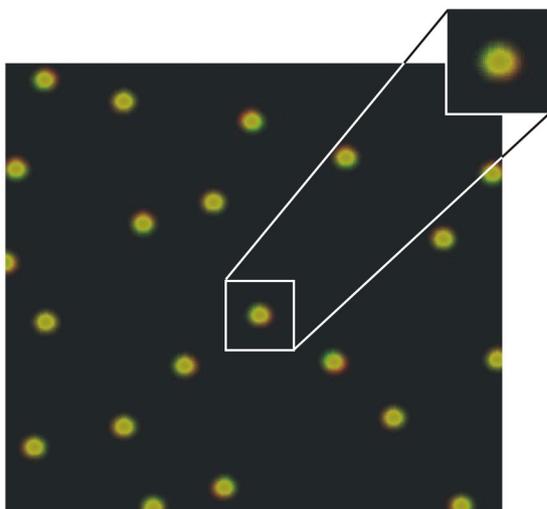
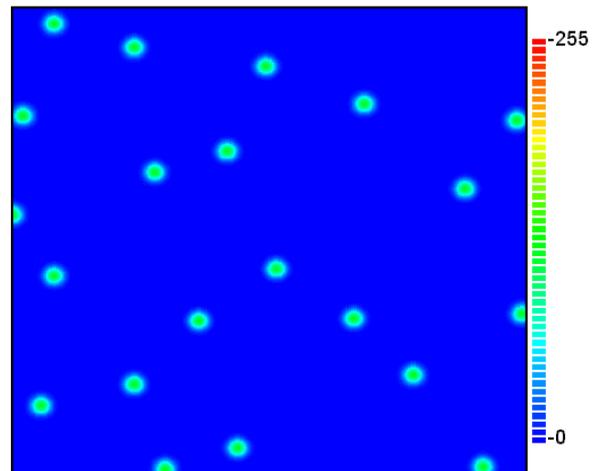
$$\text{Spot}(m,n) = I_{\text{Ges}} \cdot \frac{2}{\pi \cdot \omega^2} \cdot \int_{(n-1)}^n \exp\left(-\frac{2(x - (x_c \text{ bzw. } x_c'))^2}{\omega^2}\right) \cdot dx \cdot \int_{(m-1)}^m \exp\left(-\frac{2(y - (y_c \text{ bzw. } y_c'))^2}{\omega^2}\right) \cdot dy$$

Gl. IV-14

Die Schreibweise wird der normalen Matrixschreibform angepasst, wobei m ($m=1..200$) für Zeilenvektoren und n ($n=1..200$) für Spaltenvektoren steht.

Abb. IV-19:

Das über den Operator $\text{Spot}(m,n)$ (siehe Gl. IV-14) gaussverbreiterte Bild B_1 der Punktlichtquellen (y_c, x_c) aus Abb. IV-18. $I_{\text{Ges}}^1 = 5000$



Der Operator $\text{Spot}(m,n)$ wird sowohl auf den (y_c, x_c) -Satz, wie auf den (y_c', x_c') -Satz angewendet. In Abb. IV-19 ist das so

Abb. IV-20:

Die Überlappung der Bilder B_1 und B_2

erzeugte Gauss-verbreiterte Bild für den (y_C, x_C) -Satz des Farbstoffs 1 dargestellt. Die so erzeugten Bilder werden im Folgenden als B_1 und B_2 bezeichnet. Abb. IV-20 zeigt die Überlappung der Bilder B_1 und B_2 . Gelb steht für die Bereiche mit hoher Überlappung, die roten bzw. grünen Schattierungen stehen für Bereiche, in denen vorwiegend Farbstoff 1 (rot) bzw. Farbstoff 2 (grün) beiträgt.

Um so realitätsnah wie möglich zu sein, muss berücksichtigt werden, dass die Intensität I in einem Pixel um den statistischen Mittelwert $I_{\text{PSF}} = \text{Spot}(m,n)$ herum schwanken kann (siehe Abb. IV-21). Die Verteilung der diskreten Intensitäten folgt der aus Kapitel III bekannten Poisson-Statistik (siehe Gl. IV-15).

$\lambda = I_{\text{PSF}}$ wird als Parameter der Verteilung bezeichnet. $\{\text{Poisson}(k; \lambda)\}$ gibt die Wahrscheinlichkeit an das ein Pixel, der im Mittel die Intensität I besitzt, eine Intensität k ($k=0.. \infty$) zeigt.

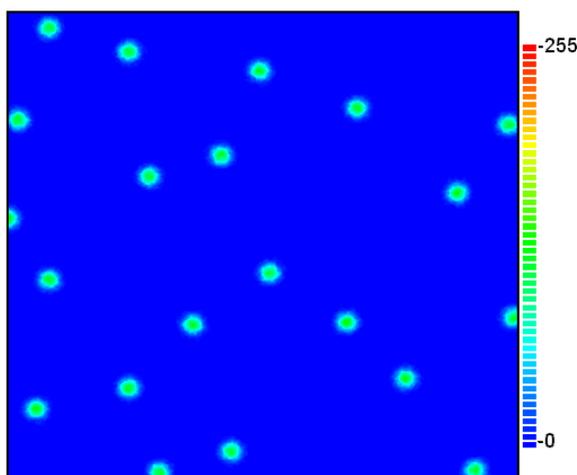


Abb. IV-21:
Poissonverrauschte Bild B_1^R

$$\text{Poisson}(k; \lambda) = \frac{\lambda^k}{k!} \cdot \exp(-\lambda), k = 0.. \infty$$

Gl. IV-15

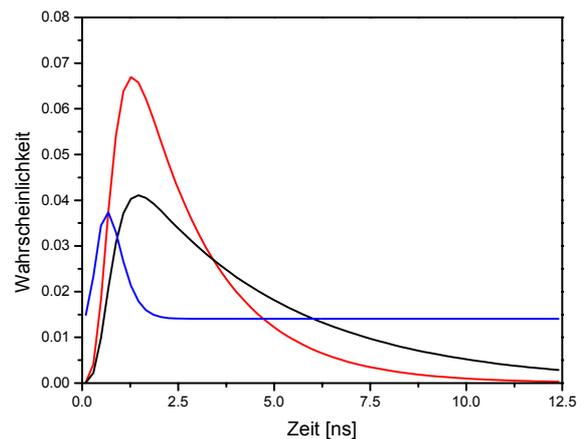
Für ein gegebenes I_{PSF} werden die Wahrscheinlichkeiten $\text{Poisson}(k; I_{\text{PSF}})$ für die Intensitäten $k=0 \dots N$ nach Gl. IV-15 berechnet, wobei N viel größer als I_{PSF} sein sollte. In der Regel wird $N=1000$ gesetzt. Es wird das ermittelte $\text{Poisson}(k; 50)$ mit einem Faktor F multipliziert, auch hier wird mit $F=10000$ eine sehr große Zahl gewählt. $N_k = F \cdot \text{Poisson}(k; 50)$ wird zur nächsten ganzen Zahl auf- oder abgerundet. Jedem k ist nun eine ganze Zahl N_k zugeordnet, $N_k \geq 0$. Jetzt kann ein Ensemble $E_k(I_{\text{PSF}})$ erstellt werden, das N_0 mal 0, N_1 mal 1 usw. enthält. Aus dieser Menge wird dann zufällig eine Intensität I herausgezogen die dann den Intensitätswert

des Pixels (m,n) darstellt. Am Ende erhält man zwei Poissonverrauschte Bilder B_1^R (siehe Abb. IV-21) und B_2^R .

Den beiden Farbstofftypen 1 und 2 werden nun die Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_1(t_i)\}$ und $\{P_2(t_i)\}$ aus Abb. IV-22 zugeordnet. Auf die Bilder B_1^R und B_2^R wird der bekannte

Abb. IV-22:

Die Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_1(t_i)\}$ (—), $\{P_2(t_i)\}$ (—) aus Abb. IV-4 und die Grundwahrscheinlichkeit $\{P_U(t_i)\}$ für den Hintergrund (—)



Algorithmus für die Zeitauflösung angewendet, in dem für einen Pixel aus B_1^R der Pixelintensität entsprechend viele Zeiten aus den Ensemble $E_1(t_i)$ gezogen werden, für einen Pixel aus B_2^R werden die Zeiten aus $E_2(t_i)$ gezogen. Die Zeiten werden den entsprechenden Zeitkanalnummern zugeordnet. Das Resultat sind die beiden zeitaufgelösten Bilder B_1^T und B_2^T .

Das Intensitätsrauschen ist nicht die einzige Störung die einbezogen werden muss, auch einer von der Fluoreszenz der Farbstoffe unabhängiger Hintergrund muss berücksichtigt werden. Der Hintergrund setzt sich zum einen aus einem Rest Streulicht, das durch die Filter vor den Detektoren nicht vollständig unterdrückt werden konnte, und zum anderen aus dem thermischen Rauschen des Detektors zusammen setzt. Im Mittel kann davon ausgegangen werden, dass zwischen $I_U=2-4$ Photonen pro Kanal nicht von der Fluoreszenz der Farbstoffe herrühren. Auch der Hintergrund ist ebenfalls Poisson verteilt. Das Intensitätsbild B_U wird mit $\lambda=I_U$ aus Gl. IV-15 berechnet.

Für die Streuung eines Photons aus einem externen Lichtfeld heraus, wird angenommen, dass ein gleichzeitiger Prozess vorliegt, was impliziert, dass das zeitliche Verhalten des Streulichtes der Gerätefunktion $GF(t)$ der SFLIM-Anlage folgt (siehe auch Abschnitt II.2).

Für das thermische Rauschen des Detektors kann vorausgesetzt werden, dass die Wahrscheinlichkeit für ein Photon für alle Kanäle gleich groß ist. Die Grundwahrscheinlichkeit $\{P_U(t_i)\}$ für den Hintergrund kann geschrieben werden als (siehe Gl. IV-16).

$$\{P_U(t_i)\} = A_{SL} \cdot \{GF(t_i)\} + A_{TR} \cdot 1/64, \sum_i G(t_i) = 1$$

Gl. IV-16

A_{SL} und A_{TR} stellen jeweils den Anteil für das Streulicht und das thermische Rauschen dar. Die in Abb. IV-22 dargestellte Grundwahrscheinlichkeit $\{P_U(t_i)\}$, wurde mit $A_{SL}=0.1$ und $A_{TR}=0.9$ berechnet. Wie bei den Bildern B_1^T und B_2^T lässt sich aus B_U und der Grundwahrscheinlichkeit $\{P_U(t_i)\}$ das Bild B_U^T bestimmen.

Die vollständige Simulation liefert sowohl die beiden Intensitätsbilder B_1^R und B_2^R für Farbstoff 1 und Farbstoff 2, sowie die beiden zeitaufgelösten Bilder B_1^T und B_2^T . Und für den Hintergrund entsprechend die Bilder B_U und B_U^T . Aus den zeitaufgelösten Bildern wird das zeitaufgelöste Gesamtbild B_{Ges}^T generiert und aus den Intensitätsbildern wird das Gesamtintensitätsbild B_{Ges} zusammen gesetzt.

Die Bilder B_{Ges}^T und B_{Ges} stellen den zeitaufgelösten Datensatz dar, auf den die Kolokalisationstheorie angewendet wird. Hier stellen sich zwei Aufgaben: Einerseits geht es darum, die beiden diskreten Algorithmustypen zu testen, andererseits soll der Fehler des Algorithmus abgeschätzt werden. Wie im letzten Abschnitt wird zwischen einem absoluten Fehler, der aus dem Vergleich von einem bekannten Parameter und einem berechneten Parameter bestimmt werden kann, und einem geschätzten Fehler, der alleine aus dem Algorithmus und dem Datensatz heraus ohne Vorkenntnis bestimmt werden kann, unterschieden.

Der Ablauf der Analyse des Datensatzes besteht darin, dass zuerst die zwei im letzten Abschnitt definierten Algorithmustypen, diskreter Best-Fit- und Verteilungsalgorithmus, angewendet werden um das Bild B_{Ges} auf zwei Teilbilder B_K bzw. B_L zurückrechnen. Die Annahme besteht dann darin, dass B_K bzw. B_L rein mit dem Farbstoff 1 bzw. Farbstoff 2 korreliert sind. Alleine die Bilder B_K bzw. B_L reichen aber nicht aus um die gestellten Aufgaben zu beantworten. Zusätzlich benötigt man also noch einen Algorithmus der die Bilder B_K und B_L auf einen Satz von Parametern reduziert, die es möglich machen B_K und B_L

mit den Bildern B_1 und B_2 zu vergleichen. Die Bilder B_1 und B_2 sind beschrieben durch die Positionen (y_C, x_C) und (y_C', x_C') , die jeweils die Lage der Moleküle angeben. (y_C, x_C) und (y_C', x_C') stellen absolute Größen dar. Diese stellen im weiteren Verlauf die Referenz dar, im Vergleich zu der die Güte des Kolokalisationsalgorithmus ausgemacht werden kann. Um die den Referenzpositionen entsprechenden Positionen aus den Bildern B_K und B_L zu bestimmen, wendet man einen Schwerpunktsalgorithmus an. Ein Schwerpunktsalgorithmus bildet die Gesamtheit eines Spot auf dessen Schwerpunkt ab. Unter der Annahme, dass der Schwerpunkt des Spot der Lage des Fluoreszenzmoleküls entspricht, bildet der Schwerpunktsalgorithmus einen Spot also auf die Molekülposition ab. Hiermit ist der Schwerpunkt eines Spots ein guter Schätzer für die Referenzposition (y_C, x_C) bzw. (y_C', x_C') .

Auf den Datensatz wird somit ein in sich verschachtelter Algorithmus, bestehend aus Kolokalisationsalgorithmus und Schwerpunktsalgorithmus, angewendet. Dies führt das Problem nach sich, dass der Fehler nicht mehr einem der beiden Algorithmen zugesprochen werden kann. Würde z.B. der Fall vorliegen, dass der Fehler des verschachtelten Algorithmus hauptsächlich durch den Fehler des Schwerpunktsalgorithmus bestimmt wäre, dann stellt die oben beschriebene Simulation keine befriedigende Lösung dar, den diskreten Best-Fit mit dem Verteilungsalgorithmus zu vergleichen. Die Einflüsse der beiden verschachtelten Algorithmen müssen daher effizient getrennt werden.

Im folgenden wird die oben skizzierte Wirkungsweise des verschachtelten Algorithmus detailliert besprochen. Dabei wird das Augenmerk darauf gerichtet, wie die beiden Algorithmen getrennt betrachtet werden können, um unabhängige Aussagen treffen zu können. Die Wirkungsweise des diskreten Best-Fit-Algorithmus und des Verteilungsalgorithmus wurde in Abschnitt IV.4 ausführlich beschrieben. Beide Algorithmen liefern für jeden Pixel der Bilder B_{Ges}^T und B_{Ges} einen Intensitätswert I_1^{Best} . I_1^{Best} wird dem „kurzen Kanal“ zugesprochen, der für den „kurzen“ Farbstoff 1 steht, und $I - I_1^{Best}$ wird dem, mit dem „langen“ Farbstoff 2 korrelierten, „langen Kanal“ zugesprochen. Die so entstandenen Bilder B_K und B_L werden mit Hilfe des Schwerpunktsalgorithmus analysiert. Der Kolokalisationsalgorithmus liefert zusätzlich zu B_K und B_L aber auch noch ein Bild E , in dem der geschätzte Fehler $s\Delta(I_1^{Best})$ von I_1^{Best} vermerkt ist. Der Fehler für I_1^{Best} folgt direkt aus dem Kolokalisationsalgorithmus und benötigt keine Vorkenntnisse, die nur für eine Simulation gegeben sind. Die Bilder B_K , B_L und E werden also so bestimmt, als handle es sich um reale Daten.

Um statistisch fundierte Aussagen treffen zu können, benötigt man den Vergleich zwischen B_K und B_L und den Bildern B_1 und B_2 . Dabei greift man auf den Differenzvektor $\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}=(^x\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}, ^y\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})$ zwischen dem bekannten Positionsvektor $\mathbf{Pos}^R_{1,2}$ ($\mathbf{Pos}^R_1=(y_C, x_C), \mathbf{Pos}^R_2=(y'_C, x'_C)$) und dem berechneten Positionsvektor $\mathbf{Pos}^A_{K,L}=(^x\mathbf{Pos}^A_{K,L}, ^y\mathbf{Pos}^A_{K,L})$ zurück (siehe Gl. IV-17).

$$\Delta\mathbf{Pos}_{K,L} = \mathbf{Pos}^R_{1,2} - \mathbf{Pos}^A_{K,L} \quad \text{Gl. IV-17}$$

Um die Positionen $\mathbf{Pos}^A_{K,L}$ zu bestimmen, wird ein bestimmter Bereich um jeden einzelnen Spot Spot_K und Spot_L in den Bildern B_K und B_L herausgeschnitten. Für jeden Pixel dieses Fensters wird dessen Position in x- bzw. y-Richtung mit der Pixelintensität gewichtet. Der Bereich wird so gewählt, dass die richtigen Positionen $\mathbf{Pos}^R_1=(y_C, x_C)$ jeweils im Zentrum des Bereichs liegen. In dieser Simulation wurde der Bereich auf 21x21 Pixel festgelegt. Die genaue Form des Schwerpunksalgorithmus stellt sich wie in Gl. IV-18 dar.

$$\mathbf{Pos}^A_K = \frac{1}{I_{Ges}} \cdot \sum_{n=x_c-10}^{x_c+10} \sum_{m=y_c-10}^{y_c+10} \binom{n}{m} \cdot \text{Spot}_K(m, n)$$

$$\mathbf{Pos}^A_L = \frac{1}{I_{Ges}} \cdot \sum_{n=x'_c-10}^{x'_c+10} \sum_{m=y'_c-10}^{y'_c+10} \binom{n}{m} \cdot \text{Spot}_L(m, n) \quad \text{Gl. IV-18}$$

Das Resultat ist die mittlere Position $\mathbf{Pos}^A_{K,L}$. Die Abweichung $\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}$ stellt eine absolute Größe dar, da sie in Referenz zu einer bekannten, also nicht geschätzten Größe, berechnet wird. Aus der Verteilung $H(\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})$ von $\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}$ lässt sich somit der absolute Fehler $\Delta(\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})$ des kombinierten Algorithmus berechnen (siehe auch Gl. IV-33).

Um vom verschachtelten Algorithmus auf die reine Mustererkennung schließen zu können, wird das unabhängige Verhalten des Schwerpunksalgorithmus benötigt. Hierzu bietet es sich an, die statistischen Abweichungen aufzulisten, die sich im Fehler $\Delta(\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})$ niederschlagen. Der erste Fehler besteht darin, dass die Intensitäten im Bild B_{Ges} um den wahren Wert herum Poisson verteilt sind, der zweite Fehler rührt daher, dass die zeitaufgelöste Kolokalisation einen Fehler in der Zuteilung $I \rightarrow I_1$ und I_2 nach sich führt. Wenn nachdem unabhängigen Fehler des Schwerpunksalgorithmus gefragt wird, dann ist der Fehler zu berechnen, der nur aus dem Poisson-Rauschen abgeleitet werden kann. Betrachtet man einen Spot aus dem Gesamtbild B_{Ges} , dann setzt sich dieser aus zwei Teilspots zusammen. Unter der Annahme,

dass die Intensität I in einem bestimmten Pixel um den wahren Wert von I herum Poisson verteilt ist, dann muss die folgende Aussage zutreffen, dass auch die Intensitäten I_1 bzw. I_2 des Pixel in den beiden Teilbildern Poisson verteilt sind. Auf den ersten Blick erscheint diese Aussage trivial, besonders im Hinblick darauf, dass bei der oben beschriebenen Simulation, dass Gesamtbild aus zwei Poisson verrauschten Teilbildern zusammen gesetzt ist. Bei realen Daten ist a priori diese Vorkenntnis aber nicht vorhanden. Es muss gezeigt werden, dass nur wenn die Größen I_1 und I_2 Poisson verteilt sind, auch die Größe $I: I=I_1+I_2$ Poisson verteilt ist. Wenn die Wahrscheinlichkeiten einen Wert k_1 bzw. k_2 für I_1 und I_2 zu finden unter der Annahme das $\langle I_1 \rangle$ und $\langle I_2 \rangle$ die Mittelwerte für I_1 und I_2 darstellen gegeben sind durch:

$$Poisson(k_1; \langle I_1 \rangle) = \frac{\langle I_1 \rangle^{k_1}}{k_1!} \cdot e^{(-\langle I_1 \rangle)}, k_1 = 0.. \infty$$

$$Poisson(k_2; \langle I_2 \rangle) = \frac{\langle I_2 \rangle^{k_2}}{k_2!} \cdot e^{(-\langle I_2 \rangle)}, k_2 = 0.. \infty$$

Gl. IV-19

, dann besteht die Aufgabe darin, die Wahrscheinlichkeit $P(k; (\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle))$ für einen Wert k , $k=0 \dots \infty$, anzugeben. Für $P(k; (\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle))$ muss dann gelten.

$$P(k; (\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle)) = Poisson(k; \langle I \rangle) = \frac{\langle I \rangle^k}{k!} \cdot e^{(-\langle I \rangle)}, k = 0.. \infty \quad (a)$$

$$\langle I \rangle = \langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle \quad (b) \quad \text{Gl. IV-20}$$

Wobei $Poisson(k; \langle I \rangle)$ die Poisson-Verteilung von I um dessen Mittelwert $\langle I \rangle$ darstellt. Die Gl. IV-20 (a) darf nur erfüllt sein, wenn die Gl. IV-20 (b) erfüllt ist. Das folgt daraus, dass gilt $I_1+I_2=I$. Für den Beweis wird der Satz der totalen Wahrscheinlichkeit aus Abschnitt II.1 genutzt, indem für jedes mögliche k , $k=0 \dots \infty$, alle Möglichkeiten aufsummiert werden, für die gilt $k_1+k_2=k$. Hier wird die Berechnung für $k=0,1,2$ durchgeführt.

Für $k=0$ gibt es nur eine Möglichkeit für die k_1 und k_2 gleich Null sind. Für die Wahrscheinlichkeit $P(0; \langle I \rangle)$ gilt dann:

$$P(0; (\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle)) = Poisson(0; \langle I_1 \rangle) \cdot Poisson(0; \langle I_2 \rangle)$$

$$= e^{(-\langle I_1 \rangle)} \cdot e^{(-\langle I_2 \rangle)} = e^{(-(\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle))} = Poisson(0; \langle I \rangle)$$

Gl. IV-21

Für $k=1$ gibt es die Möglichkeiten $k_1=0$ und $k_2=1$ bzw. $k_1=1$ und $k_2=0$, somit ergibt sich für $P(1; \langle I \rangle)$.

$$\begin{aligned}
 P(1; (\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle)) &= \text{Poisson}(0; \langle I_1 \rangle) \cdot \text{Poisson}(1; \langle I_2 \rangle) + \text{Poisson}(1; \langle I_1 \rangle) \cdot \text{Poisson}(0; \langle I_2 \rangle) \\
 &= e^{-(\langle I_1 \rangle)} \cdot \langle I_2 \rangle \cdot e^{-(\langle I_2 \rangle)} + \langle I_1 \rangle \cdot e^{-(\langle I_1 \rangle)} \cdot e^{-(\langle I_2 \rangle)} \\
 &= (\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle) \cdot e^{-(\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle)} \\
 &= \text{Poisson}(1; \langle I \rangle)
 \end{aligned}$$

Gl. IV-22

Die Möglichkeiten für $k=2$ sind gegeben durch $k_1=0, k_2=2$ bzw. $k_1=1, k_2=1$ und $k_1=2, k_2=1$. $P(2; \langle I \rangle)$ lässt sich also schreiben als.

$$\begin{aligned}
 P(2; (\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle)) &= \frac{\langle I_2 \rangle^2}{2} \cdot e^{-(\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle)} + \langle I_1 \rangle \cdot \langle I_2 \rangle \cdot e^{-(\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle)} + \frac{\langle I_1 \rangle^2}{2} \cdot e^{-(\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle)} \\
 &= \frac{(\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle)^2}{2} \cdot \exp^{-(\langle I_1 \rangle + \langle I_2 \rangle)} \\
 &= \text{Poisson}(2; \langle I \rangle)
 \end{aligned}$$

Gl. IV-23

Für $k > 2$ läuft der Beweis analog. Damit ist die Behauptung bewiesen, dass ein poissonverraushtes Bild als eine Summe aus zwei ebenfalls poissonverrauschten Teilbildern geschrieben werden kann. Um den Fehler des reinen Schwerpunktsalgorithmus abzuschätzen, wird der Fehler des Kolokalisationsalgorithmus vernachlässigt, und es wird davon ausgegangen, dass die Fehler beider Teilbilder B_K und B_L nur einer Poisson-Verteilung unterliegen.

Nun wird nach Gl. IV-14 eine 2-dimensionale Gauss-Verteilung (siehe Abb. IV-23) mit einer Spotintensität I_{Ges} generiert. Die Größe des Fensters in Abb. IV-23 sind 21×21 Pixel, der Mittelpunkt des Fensters liegt somit im 11. Pixel in x- wie in y-Richtung. Genau im Mittelpunkt des Fensters liegt auch das exakte Zentrum der Gauss-Verteilung. Diese a priori symmetrische Funktion wird über den oben erklärten Poisson-Algorithmus verrauscht. Insgesamt wurden 10000 Bilder erzeugt und mit dem Schwerpunktsalgorithmus analysiert. Die Verteilungen $H(\Delta \text{Pos}^{\text{SP}}; I_{\text{Ges}})$ der Differenzvektoren $\Delta \text{Pos}^{\text{SP}} = ({}^x \Delta \text{Pos}^{\text{SP}}, {}^y \Delta \text{Pos}^{\text{SP}})$ zwischen dem berechneten Schwerpunkt und dem exakten Schwerpunkt sind in Abb. IV-24 ((—): $H({}^x \Delta \text{Pos}^{\text{SP}}; I_{\text{Ges}})$, (---): $H({}^y \Delta \text{Pos}^{\text{SP}}; I_{\text{Ges}})$) für drei verschiedene Gesamtintensitäten $I_{\text{Ges}}=2500$ (grüne Kurven), $I_{\text{Ges}}=5000$ (rote Kurven) und $I_{\text{Ges}}=7500$ (blaue Kurven) dargestellt. Die Verteilungen sind vollständig symmetrisch. Die Mittelwerte der Verteilungen

$H(\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; I_{\text{Ges}})$ liegen relativ genau bei Null. Wie zu erwarten wird die Breite der Verteilung immer geringer für größere Intensitäten. Auch die Abweichung zwischen der x- und der y-Position ist relativ gering. Für alle Histogramme $H(\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; I_{\text{Ges}})$ wurde eine Balkenbreite von 2.5 nm angenommen. Die Fehler $\Delta(\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; I_{\text{Ges}})$ der Verteilungen werden wie oben bestimmt und liegen bei $\Delta(\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 2500)=(2.46\text{nm}, 2.46\text{nm})$, $\Delta(\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 5000)=(1.76\text{nm}, 1.76\text{nm})$ und $\Delta(\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 7500)=(1.45\text{nm}, 1.44\text{nm})$. Die Fehler sind äußerst homogen in x- und y-Richtung.

Nicht immer kann davon ausgegangen werden, dass einem Spot eine rein symmetrische Intensitätsverteilung zu Grunde liegt. Es stellt sich daher die Frage, wie sich das Verhalten

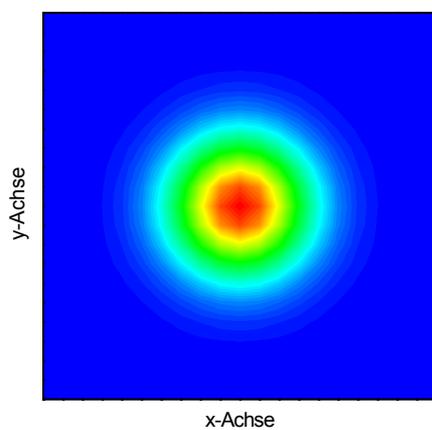


Abb.IV-23:
2-dimensionale
Gaussverteilung

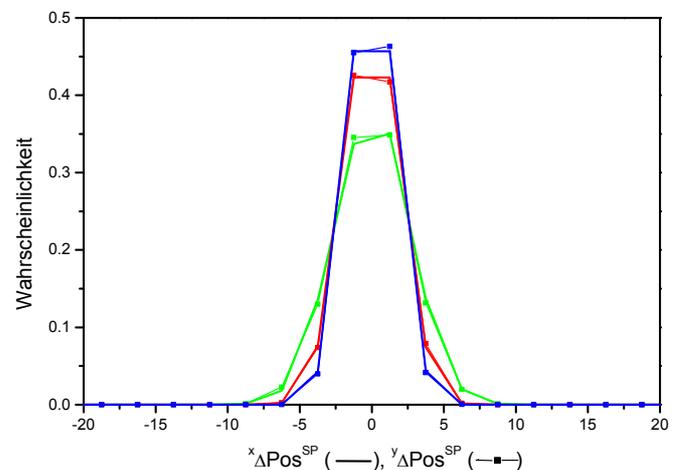


Abb.IV-24:
(—): $H(x\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 2500)$
(-■-): $H(y\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 2500)$
(—): $H(x\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 5000)$
(-■-): $H(y\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 5000)$
(—): $H(x\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 7500)$
(-■-): $H(y\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 7500)$

des Schwerpunktsalgorithmus verändert, wenn eine gewisse Asymmetrie in der Intensitätsverteilung auftritt. Um diesen Sachverhalt zu klären, wird die gleiche Simulation auch für einen asymmetrischen Spot $^{\text{asym}}\text{Spot}(p_{\text{as}})$ durchgeführt. $^{\text{asym}}\text{Spot}(p_{\text{as}})$ wird erzeugt, indem zu der symmetrischen Intensitätsverteilung aus Abb. IV-23 ein gewisser Anteil p_{as} der asymmetrischen Intensitätsverteilung aus Abb. IV-25 dazu gemischt wird. Insgesamt wurden fünf verschiedene $^{\text{asym}}\text{Spot}(p_{\text{as}})$ erzeugt für ein $p_{\text{as}}=0, 0.1, 0.5, 0.9$ und 1. Wobei $p_{\text{as}}=0$ ein rein symmetrischer und $p_{\text{as}}=1$ ein rein asymmetrischer Spot darstellt. Der asymmetrische Spot

wurde so generiert, dass sich die Asymmetrie nur bezüglich der x-Achse auswirkt, entlang der y-Achse ist der Spot, wie der Spot in Abb. IV-23, symmetrisch. Die Gesamtintensität der $^{\text{asym}}\text{Spot}(p_{\text{as}})$ Intensitätsverteilungen wurde jeweils auf $I_{\text{Ges}}=5000$ festgelegt. Wie bei der symmetrischen Verteilung können die Verteilungen bezüglich der Abweichung entlang der x- und y-Achse analysiert werden. Die Verteilungen werden mit $H(\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; p_{\text{as}})$ bezeichnet.

Für die Abweichung in y-Richtung sollte es unabhängig sein, ob man den Spot $^{\text{asym}}\text{Spot}(0)$ oder den Spot $^{\text{asym}}\text{Spot}(1)$ analysiert. Die Verteilungen $H(^y\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 0)$ (—) und $H(^y\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 1)$

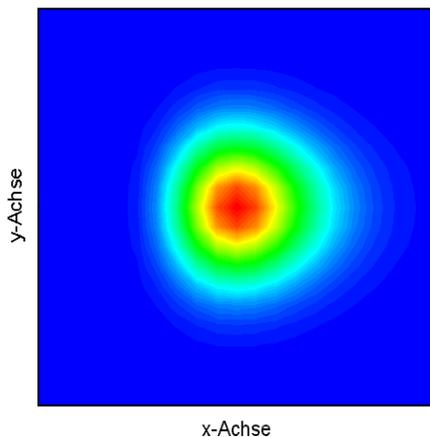


Abb. IV-25:

Asymmetrische Intensitätsverteilung. Die Asymmetrie wirkt sich nur entlang der x-Achse aus. Entlang der y-Achse ist die Verteilung symmetrisch.

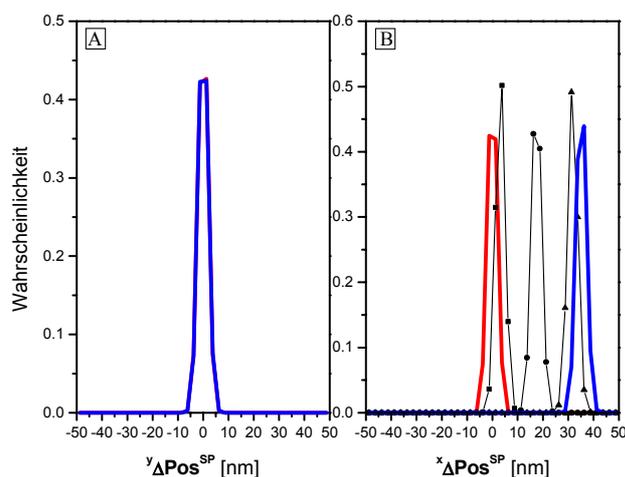


Abb. IV-26:

A:

(—): $H(^y\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 0)$

(—): $H(^y\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 1)$

B:

(—): $H(^x\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 0)$

(—): $H(^x\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 1)$

(-■-): $H(^x\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 0.1)$

(-▲-): $H(^x\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 0.5)$

(-●-): $H(^x\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; 0.9)$

(—) sind deckungsgleich (siehe Abb. IV-26 A). Die Standardabweichungen der Verteilungen liegen bei 1.76nm bzw. 1.75nm. Der Unterschied drückt sich erst innerhalb der $H(^y\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; p_{\text{as}})$ aus. In Abb. IV-26 B sind die Verteilungen für $p_{\text{as}}=0$ (—), $p_{\text{as}}=0.1$ (-■-), $p_{\text{as}}=0.5$ (-▲-), $p_{\text{as}}=0.9$ (-●-) und $p_{\text{as}}=0$ (—) dargestellt. Die Verteilungen streuen relativ gleich breit. Die Standardabweichungen liegen in der beschriebenen Reihenfolge bei 1.76nm, 1.75nm, 1.81nm,

1.84nm und 1.82nm. Dagegen wird der Mittelwert der Verteilungen bezüglich der Mitte des Fensters im 11. Pixel bei zunehmender Asymmetrie immer mehr nach Rechts verschoben. Die Abweichung beträgt bei der rein asymmetrischen Verteilung 35nm, d.h. fast einen Pixel.

Neben dem Poisson-Rauschen, stellt die begrenzte Anzahl von Stichproben eine Rauschquelle dar. Dieser Rauschfaktor wird im Folgenden als Stichprobenrauschen bezeichnet. Im oben beschriebenen Fall beträgt die Stichprobe 10000 Poissonverrauschte Intensitätsverteilungen, die alle auf die gleiche Grundverteilung zurückgreifen. Um das gezeigte Verhalten eindeutig dem Einfluss der Poisson-Statistik zuschreiben zu können, muss gezeigt werden, dass das Stichprobenrauschen vernachlässigbar ist.

Eine solche Überprüfung kann zum einen dadurch stattfinden, das man die Stichprobenzahl verkleinert oder vergrößert, und die selben Verteilungen $H(\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; I_{\text{Ges}})$ und $H(\Delta\text{Pos}^{\text{SP}}; p_{\text{as}})$ und diese mit den in Abb. IV-24 und Abb. IV-26 A und B gezeigten vergleicht. Es wäre aber wünschenswert, wenn die Überprüfung analytisch über eine Formel gelöst werden könnte. Die Berechnung wird nur für die Abweichung in x-Richtung durchgeführt, da beide Richtungen unabhängig sind, und die Überlegungen analog auch für die y-Richtung gelten. Man weiß, dass aus den 10000 generierten Spots jeweils ein Schwerpunkt x_c^i , $i=1 \dots 10000$, bestimmt wird. Alle x_c^i werden dann zu einem gemeinsamen \underline{x}_c aufaddiert (siehe Gl. IV-24)

$$\underline{x}_c = \sum_{i=1}^{10000} x_c^i \quad \text{Gl. IV-24}$$

Wenn die Verteilung der x_c^i bzw. deren Standardabweichung σ_c^i bekannt ist, dann gilt für die Standardabweichung $\underline{\sigma}_c$ von \underline{x}_c :

$$\underline{\sigma}_c = \sqrt{\sum_{i=1}^{10000} (\sigma_c^i)^2} \quad \text{Gl. IV-25}$$

Da alle x_c^i gleich verteilt sein müssen, gilt für alle σ_c^i : $\sigma_c^i = \Sigma$, $i=1 \dots 10000$. Damit reduziert sich die Gl. IV-25 zu:

$$\underline{\sigma}_c = \sqrt{10000} \cdot \Sigma \quad \text{Gl. IV-26}$$

Um den mittleren Schwerpunkt x_c zu berechnen, muss \underline{x}_c noch durch die Größe Stichprobenmenge geteilt werden. Für x_c und dessen Standardabweichung σ_c gilt dann:

$$x_c = \frac{\underline{x}_c}{10000} \rightarrow \sigma_c = \frac{\underline{\sigma}_c}{10000} = \frac{\Sigma}{\sqrt{10000}} \quad \text{Gl. IV-27}$$

Σ ist also die Größe, die bestimmt werden muss. Dafür wird der Schwerpunktsalgorithmus aus Gl. IV-18 für die x-Richtung wie folgt um geschrieben.

$$\underbrace{\frac{1}{I_{Ges}^i} \cdot \sum_{n=1}^{2l} \sum_{m=1}^{2l} n \cdot Spot_i(m,n)}_{S_1} - x_c^i = \underbrace{\frac{1}{I_{Ges}^i} \cdot \sum_{n=1}^{2l} \sum_{m=1}^{2l} (n - x_c^i) \cdot Spot_i(m,n)}_{S_2} = 0 \quad \text{Gl. IV-28}$$

Bei $Spot_i$ handelt es sich um i-ten generierten Spot, I_{Ges} ist die Gesamtintensität dieses Spots, und $Spot_i(m,n)$ bezeichnet die Intensität im m,n-ten Pixel des Spots. Die in Gl. IV-28 gewählte Schreibweise lässt sich dadurch erklären, dass der Schwerpunktsalgorithmus auch als eine Variation der Größe x_c^i aufgefasst werden kann, unter der Voraussetzung, dass Gl. IV-28 erfüllt ist. Der Fehler von x_c^i drückt sich dann in der möglichen Abweichung von der Summe S_1 aus Gl. IV-28 bezogen zu dem exakten Wert von S_1 aus. Die Abweichung von S_1 beruht darin, dass die Intensitäten $Spot_i(m,n)$ um den exakten Wert herum poissonverteilt sind. Für den Fehler $\Delta(Spot_i(m,n))$ von $Spot_i(m,n)$ kann dann $\sqrt{Spot_i(m,n)}$ angesetzt werden: $\Delta(Spot_i(m,n)) = \sqrt{Spot_i(m,n)}$.

Nach dem Gesetz der Gausschen Fehlerfortpflanzung ist dann der Fehler ΔS_2 der Summe S_2 aus Gl. IV-28 und damit auch der Fehler σ_c^i von x_c^i gleich:

$$\begin{aligned}
\Delta S_2 = \sigma_c^i &= \sqrt{\sum_{n=1}^{2l} \sum_{m=1}^{2l} (n - x_c^i)^2 \cdot \frac{\Delta(\text{Spot}_i(m,n))^2}{I_{\text{Ges}}^2} + \underbrace{S_2^2 \cdot \frac{\Delta I_{\text{Ges}}^2}{I_{\text{Ges}}^2}}_{=0, \text{ siehe Gl.}}} \\
&= \frac{I}{\sqrt{I_{\text{Ges}}}} \cdot \sqrt{\sum_{n=1}^{2l} \sum_{m=1}^{2l} (n - x_c^i)^2 \cdot \frac{\text{Spot}_i(m,n)}{I_{\text{Ges}}}} \\
\rightarrow \Sigma &= \frac{I}{\sqrt{\langle I_{\text{Ges}} \rangle}} \cdot \sqrt{\underbrace{\sum_{n=1}^{2l} \sum_{m=1}^{2l} (n - X_c)^2 \cdot \frac{\langle \text{Spot} \rangle(m,n)}{I_{\text{Ges}}}}_{S_3}} \\
\rightarrow \Sigma &= \frac{I}{\sqrt{\langle I_{\text{Ges}} \rangle}} \cdot \sqrt{\sum_{n=1}^{2l} \sum_{m=1}^{2l} (n - X_c)^2 \cdot \text{PSF}(m,n)}
\end{aligned}$$

Gl. IV-29

Gl. IV-29 kann verwendet werden um Σ zu berechnen, in dem man über alle Spot_i mittelt. Der gemittelte Spot $\langle \text{Spot} \rangle$ ist aber in guter Näherung durch den der Simulation zu Grunde liegende PSF und einer mittleren Gesamtintensität $\langle I_{\text{Ges}} \rangle$ gegeben. X_c ist das bekannte Zentrum der PSF.

Will man z.B. Σ für die symmetrische Intensitätsverteilung berechnen, wird eine 2-dimensionale unverrauschte Gaussfunktion als PSF angesetzt, deren Zentrum im 11-ten Pixel liegt und diese in Gl. IV-29 eingesetzt. Je nach angesetzter Gesamtintensität ergibt sich dann für Σ , 0.05 Pixel für $I_{\text{Ges}}=2500$, 0.0353 Pixel für $I_{\text{Ges}}=5000$ und 0.0289 Pixel für $I_{\text{Ges}}=7500$. Mit dem bekannten Abstand von 50nm zwischen den Pixeln lässt sich der Schwerpunktsfehler Σ in nm umrechnen: ($\Sigma=2.5\text{nm}, I_{\text{Ges}}=2500$), ($\Sigma=1.77\text{nm}, I_{\text{Ges}}=5000$) und ($\Sigma=1.44\text{nm}, I_{\text{Ges}}=7500$). Aus den berechneten Σ 's ergibt sich für die σ_c 's, $\sigma_c=0.0250\text{nm}$, $\sigma_c=0.0177\text{nm}$ und $\sigma_c=0.0144\text{nm}$. Die σ_c 's sind somit ungefähr einen Faktor 100 kleiner als die Standardabweichungen der Verteilungen $H(\Delta \text{Pos}^{\text{SP}}; I_{\text{Ges}})$ aus Abb. IV-24. Das Stichprobenrauschen kann somit vernachlässigt werden. Aus dem Vergleich der berechneten Σ 's aus Gl. IV-29 mit den simulierten Verteilungen $H(x \Delta \text{Pos}^{\text{SP}}; 2500)$, $H(x \Delta \text{Pos}^{\text{SP}}; 5000)$ und $H(x \Delta \text{Pos}^{\text{SP}}; 7500)$ bzw. deren Standardabweichungen fällt auf, dass Gl. IV-29 einen sehr guten Schätzer für die Streuung eines poissonverrauschten Spots darstellt. Der Vorteil liegt darin, dass man keine zeitaufwendige Simulation durchführen muss, man benötigt nur die PSF des Spots und dessen Gesamtintensität und kann die mittlere Abweichung des Schwerpunkts von der exakten Lage des Moleküls angeben. Bei genauerer Betrachtung der Gl. IV-29 fällt auf, dass die Summe S_3 die Standardabweichung entlang der x- bzw. y-Richtung der PSF darstellt.

Bei der 2-dimensionalen Gauss-Funktion aus Abb. IV-23 beträgt die Standardabweichung für die x- bzw. y-Komponente 2.5 Pixel, was 125 nm entspricht. Die Standardabweichung der asymmetrischen PSF aus Abb. IV-25 beträgt entlang der x-Achse 2.58 Pixel (129 nm) und entlang der y-Achse, wie erwartet, 2.5 Pixel (125 nm). Man kann also sagen, dass eine schmalere PSF weniger stark streut im Schwerpunktsalgorithmus.

Das Verhalten des Schwerpunktsalgorithmus bei verschiedenen Intensitätsverteilungen kann wie folgt zusammen gefasst werden. Bei symmetrischen Verteilungen liefert der Algorithmus im Mittel den exakten Schwerpunkt. Bei asymmetrischen Spots zieht der Algorithmus einen relativ großen Fehler nach sich, da der berechnete Schwerpunkt um eine gewisse Distanz gegenüber dem exakten Schwerpunkt verschoben ist. Es muss daher unter allen Umständen vermieden werden, dass die symmetrische Punktabbildungsfunktion eines Moleküls verzerrt wird. Das erfordert zum einen eine gute Justage des Mikroskopaufbaus. Zum anderen muss überprüft werden, ob die Aufteilung durch den Kolokalisationsalgorithmus zu einer Abweichung von der Symmetrie führt. Wenn dies der Fall ist, dann sollte dieser Fehler korrigiert werden können. Auf diesen Zusammenhang muss während der Simulation geachtet werden.

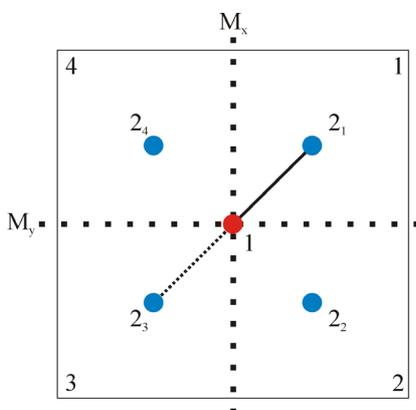


Abb.IV-27: Relative Lage der Farbstoffmoleküle zueinander, innerhalb eines kolokalisierten Spot.

Für die eigentliche Simulation eines zeitaufgelösten Datensatzes kann die Frage nach dem aus dem Poissonrauschen heraus resultierende Fehler des verschachtelten Algorithmus durch Gl. IV-29 gelöst werden. Benötigt wird die PSF für beide Moleküle und die mittlere Intensität der Spot_K und Spot_L. Die PSF ist aus der Simulation bekannt, es handelt sich um eine symmetrische Funktion. Die mittlere Intensität $\langle I_{Ges}^K \rangle$ bzw. $\langle I_{Ges}^L \rangle$ wird dadurch bestimmt, dass alle vollständig im Bild B_K bzw. B_L liegende Spots aufsummiert und gemittelt werden. Bei der gewählten Form der Simulation wurde angesetzt, dass die Position der Moleküle bis ± 1 Pixel voneinander abweichen können. Es stellt sich daher bezogen auf die Lage der

Moleküle die in Abb. IV-27 dargestellte Situation dar. Mit 1 wird die Position des Moleküls des Farbstofftyps 1 bezeichnet, die Positionen $2_1 - 2_4$ bezeichnen 4 mögliche Positionen des kolokalisierten Moleküls des Typs 2 dar. Zu jeder Position 2_1 aus dem Quadranten 1 gibt es mit gleicher Wahrscheinlichkeit eine Position 2_3 aus dem Quadranten 3. Dementsprechend gibt es auch für jede Position 2_2 mit gleicher Wahrscheinlichkeit eine Position 2_4 . Die Quadranten werden im Uhrzeigersinn von rechts oben bis links oben durch gezählt (siehe Abb. IV-27). Die Verzerrung der Spots wird immer entlang der Verbindungslinie zwischen den Positionen der beiden Farbstoffe stattfinden. Somit können aufgrund der Wahl des Bereichs der Abweichungen der Positionen die mittleren Spots $\langle \text{Spot}_K \rangle$ und $\langle \text{Spot}_L \rangle$ symmetrisch erscheinen, obwohl jeder einzelne Spot verzerrt sein kann. Alle Spot's müssen daher vor der Summation so gespiegelt werden, dass das Zentrum der zu Grunde liegenden PSF für den Farbstoff 2 immer im zweiten Quadranten liegt. Das bedeutet z.B. für die Position 2_4 , dass der Spot der aus dieser Molekülposition resultiert zuerst an der Ebene M_x und dann an der Ebene M_y gespiegelt werden muss.

Aus den so ermittelten Größen lässt sich der unabhängige Fehler Σ^K und Σ^L des Schwerpunktsalgorithmus aus Gl. IV-29 abschätzen. Da man bei dem zeitaufgelösten Datensatz von einer symmetrischen PSF ausgeht, kann man annehmen, dass im Mittel der Schwerpunkt der Spot's mit der wahren Position des Moleküls gleichzusetzen ist. Dies bedeutet, dass Σ den Gesamtfehler einer nicht näher spezifizierten Verteilung $H(\Delta \mathbf{Pos}_{K,L}^{\text{SP}}; I_{\text{Ges}}^{K,L})$ darstellt.

Nach der Anwendung des verschachtelten Algorithmus auf den zeitaufgelösten Datensatz stehen die folgenden Größen zur Verfügung. Die wahren Positionen der Moleküle $\mathbf{Pos}_{1,2}^R$ sowie die berechneten Positionen $\mathbf{Pos}_{K,L}^A$ und die daraus resultierenden Differenzvektoren $\Delta \mathbf{Pos}_{K,L}$ bzw. deren Verteilung $H(\Delta \mathbf{Pos}_{K,L})$ sind bekannt. Zusätzlich sind die mittleren Intensitäten $\langle I_{\text{Ges}}^K \rangle$ bzw. $\langle I_{\text{Ges}}^L \rangle$ und die Fehler Σ^K und Σ^L bekannt. $H(\Delta \mathbf{Pos}_{K,L})$ stellt die Verteilung des verschachtelten Algorithmus dar. Eine Aufgabe besteht aber darin, die beiden Algorithmen zu trennen. Dazu muss aber von $H(\Delta \mathbf{Pos}_{K,L})$ auf eine Verteilung $H(\text{Korr} \Delta \mathbf{Pos}_{K,L})$ geschlossen werden können, wobei $\text{Korr} \Delta \mathbf{Pos}_{K,L}$ den Differenzvektor darstellt, der alleine aus dem Kolokalisationsalgorithmus stammt. Bei den oben eingeführten Verteilungen handelt sich jeweils um Verteilungen um einen Vektor. Man muss sich daher $H(\Delta \mathbf{Pos}_{K,L})$ und $H(\text{Korr} \Delta \mathbf{Pos}_{K,L})$ als zwei Verteilungen vorstellen, und zwar eine Verteilung der x-

Komponenten und eine Verteilung der y-Komponenten der Vektoren $\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}$ und ${}^{Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}$.

Bei der Korrektur wird von der folgenden Beziehung ausgegangen:

$$\Delta\mathbf{Pos}_{K,L} = {}^{Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L} + \Delta\mathbf{Pos}^{SP}_{K,L} \quad \text{Gl. IV-30}$$

d.h. es wird davon ausgegangen, dass die beiden Algorithmen des verschachtelten Algorithmus unabhängig von einander sind. Die gemessene Abweichung $\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}$ setzt sich zum einen aus der Abweichung des Schwerpunktsalgorithmus und zum anderen aus der Abweichung des Kolokalisationsalgorithmus zusammen. Da alle Größen kontinuierlich verteilt sind und deren Wertebereich sich von $-\infty \dots \infty$ erstreckt, gilt nach Gl. aus Kapitel III, dass sich $H(\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})$ als eine Faltung zwischen den Verteilungen $H(\Delta\mathbf{Pos}^{SP}_{K,L}; I_{Ges}^{K,L})$ und $H({}^{Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})$ schreiben lässt (siehe Gl. IV-31).

$$H(\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}) = H({}^{Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}) \otimes H(\Delta\mathbf{Pos}^{SP}_{K,L}; I_{Ges}^{K,L}) \quad \text{Gl. IV-31}$$

Von den oben aufgeführten Verteilungen ist nur $H(\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})$ zugänglich, deren Mittelwert $\langle\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}\rangle = (\langle^x\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}\rangle, \langle^y\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}\rangle)$ und Standardabweichung $\sigma(\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}) = (\sigma(^x\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}), \sigma(^y\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}))$ sind durch die Simulation bestimmt. Den Einfluss des Schwerpunktsalgorithmus steckt in der Größe Σ . Um den Fehler der Verteilung $H({}^{Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})$ abschätzen zu können, muss deren Mittelwert $\langle{}^{Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}\rangle = (\langle^{x,Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}\rangle, \langle^{y,Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}\rangle)$ und Standardabweichung $\sigma({}^{Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}) = (\sigma(^{x,Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}), \sigma(^{y,Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}))$ berechnet werden. Da der oben beschriebene Zusammenhang über die Faltung besteht, kann nach den im Abschnitt II.1 hergeleiteten Gesetzmäßigkeiten für gefaltete Größen, $\langle{}^{Korr}\Delta\mathbf{Pos}^{SP}_{K,L}\rangle$ und $\sigma({}^{Korr}\Delta\mathbf{Pos}^{SP}_{K,L})$ bestimmt werden.

$$\begin{aligned} \langle^{x,Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}\rangle &= \langle^x\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}\rangle \\ \langle^{y,Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}\rangle &= \langle^y\Delta\mathbf{Pos}_{K,L}\rangle \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \sigma(^{x,Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})^2 &= \sigma(^x\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})^2 - \Sigma^2 \\ \sigma(^{y,Korr}\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})^2 &= \sigma(^y\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})^2 - \Sigma^2 \end{aligned}$$

Gl. IV-32

Aus den Standardabweichungen und den Mittelwerten kann über die Relation

$$\Delta(\Delta Pos_{K,L}) = \sqrt{\sigma(\Delta Pos_{K,L})^2 + \langle \Delta Pos_{K,L} \rangle^2}$$

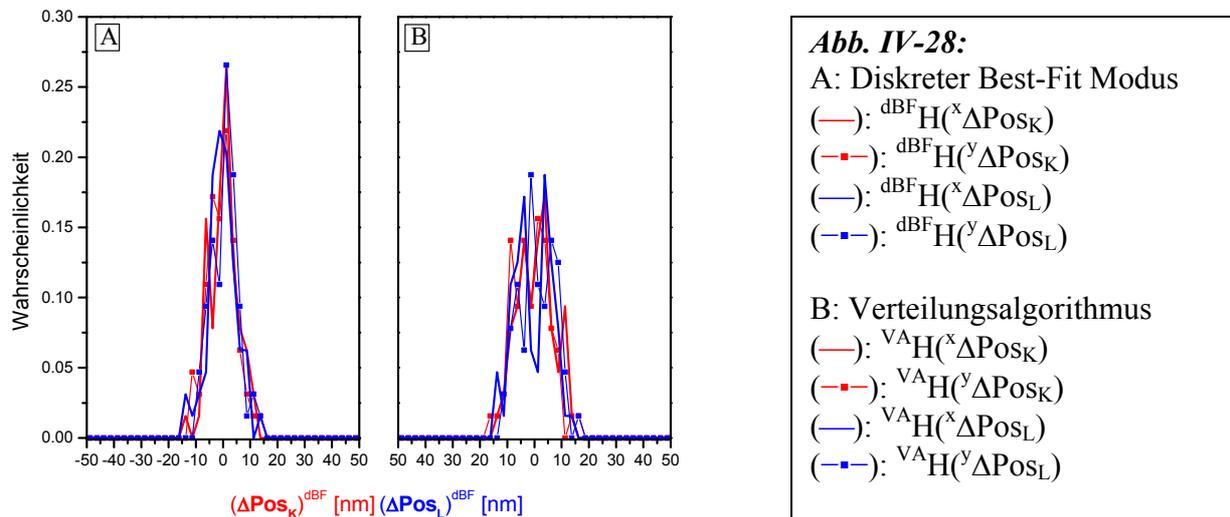
$$\Delta(\Delta Pos_{K,L}) = \sqrt{\sigma(\Delta Pos_{K,L})^2 + \langle \Delta Pos_{K,L} \rangle^2}$$

$$\Delta(\Delta Pos_{K,L}^{Korr}) = \sqrt{\sigma(\Delta Pos_{K,L}^{Korr})^2 + \langle \Delta Pos_{K,L}^{Korr} \rangle^2}$$

$$\Delta(\Delta Pos_{K,L}^{Korr}) = \sqrt{\sigma(\Delta Pos_{K,L}^{Korr})^2 + \langle \Delta Pos_{K,L}^{Korr} \rangle^2}$$

Gl. IV-33

auf den absoluten Fehler $\Delta(\Delta Pos_{K,L})$ und $\Delta(\Delta Pos_{K,L}^{Korr})$ geschlossen werden. Bei den



Differenzvektoren $\Delta Pos_{K,L}$ und $\Delta Pos_{K,L}^{Korr}$ liegt der theoretische Wert immer bei Null. Über die Fehler $\Delta(\Delta Pos_{K,L})$, Σ und $\Delta(\Delta Pos_{K,L}^{Korr})$ kann eine Aussagen über die Güte des kombinierten Algorithmus und den reinen Kolokalisationsalgorithmus getroffen werden. Umso kleiner $\Delta(\Delta Pos_{K,L})$ bzw. $\Delta(\Delta Pos_{K,L}^{Korr})$ werden, desto größer ist die Güte. Zum anderen ist es möglich, beide Typen des Kolokalisationsalgorithmus miteinander zu vergleichen.

Zuerst wurde ein vollständiger zeitaufgelöster Datensatzes mit folgenden Annahmen simuliert: Der Hintergrund wird vernachlässigt. Für das zeitaufgelöste Gesamtbild B_{Ges}^T gilt dann: $B_{Ges}^T = B_1^T + B_2^T$, und für das Gesamtbild B_{Ges} gilt: $B_{Ges} = B_1 + B_2$. Die Spotintensität I_{Ges}

wurde mit $I_{\text{Ges}}^1 = I_{\text{Ges}}^2 = 5000$ für beide Bilder gleich gewählt, und als Grundwahrscheinlichkeiten für die beiden Farbstoffe wurden $\{P_1(t_i)\}$ und $\{P_2(t_i)\}$ aus Abb. IV-22 angenommen. Die Tatsache dass die Farbstoffe 1 und 2 gleich stark leuchten wird als Idealfall für kolokalisierte Moleküle bezeichnet. Die Bildgröße wurde auf 400x400 Pixel festgelegt. Es wurde ein Bild mit insgesamt 64 Spots untersucht. Auf die Bilder B_{Ges}^T und B_{Ges} wird sowohl der diskrete Best-Fit Modus (Index dBF) wie den Verteilungsmodus (Index VA) angewendet. Die Spots in den Bildern ${}^{\text{dBF}}B_K$ und ${}^{\text{dBF}}B_L$ bzw. ${}^{\text{VA}}B_K$ und ${}^{\text{VA}}B_L$ wurden mit dem Schwerpunktsalgorithmus analysiert und die Verteilungen ${}^{\text{dBF}}H(\Delta\text{Pos}_{K,L})$ und ${}^{\text{VA}}H(\Delta\text{Pos}_{K,L})$ ermittelt. Neben den Teilbildern ${}^{\text{dBF}}B_K$ und ${}^{\text{dBF}}B_L$ bzw. ${}^{\text{VA}}B_K$ und ${}^{\text{VA}}B_L$ stehen noch die Fehlerbilder ${}^{\text{dBF}}E$ bzw. ${}^{\text{VA}}E$ zur Verfügung. Aus ${}^{\text{dBF}}B_K$, ${}^{\text{dBF}}B_L$, ${}^{\text{VA}}B_K$ und ${}^{\text{VA}}B_L$ können die mittleren Spots $\langle {}^{\text{dBF}}\text{Spot}_K \rangle$, $\langle {}^{\text{dBF}}\text{Spot}_L \rangle$, $\langle {}^{\text{VA}}\text{Spot}_K \rangle$ und $\langle {}^{\text{VA}}\text{Spot}_L \rangle$, sowie die mittlere Spotintensität $\langle {}^{\text{dBF}}I_{\text{Ges}}^K \rangle$, $\langle {}^{\text{dBF}}I_{\text{Ges}}^L \rangle$, $\langle {}^{\text{VA}}I_{\text{Ges}}^K \rangle$ und $\langle {}^{\text{VA}}I_{\text{Ges}}^L \rangle$ ermittelt werden, mit deren Hilfe Σ bestimmt werden kann. Aus den Verteilungen ${}^{\text{dBF}}H(\Delta\text{Pos}_{K,L})$ bzw. ${}^{\text{VA}}H(\Delta\text{Pos}_{K,L})$ kann unter Berücksichtigung von Σ auf die Statistik der Größen ${}^{\text{dBF,Korr}}\Delta\text{Pos}_{K,L}$ bzw. ${}^{\text{VA,Korr}}\Delta\text{Pos}_{K,L}$ geschlossen werden.

In Abb. IV-28 A sind die Verteilungen ${}^{\text{dBF}}H(\Delta\text{Pos}_{K,L})$ für den kombinierten Algorithmus mit diskreter Best-Fit Mustererkennung gezeigt, (—) steht für ${}^{\text{dBF}}H^x(\Delta\text{Pos}_K)$, (---) für ${}^{\text{dBF}}H^y(\Delta\text{Pos}_K)$, (—) steht für ${}^{\text{dBF}}H^x(\Delta\text{Pos}_L)$, und (—) für ${}^{\text{dBF}}H^y(\Delta\text{Pos}_L)$. Als Balkenbreite der Histogramme wurden 2.5nm angenommen. Die Verteilungen haben alle ungefähr die gleiche Standardabweichungen und Mittelwerte. Die Fehler der Verteilungen berechnen sich zu ${}^{\text{dBF}}\Delta(\Delta\text{Pos}_K) = (4.99\text{nm}, 5.13\text{nm})$ und ${}^{\text{dBF}}\Delta(\Delta\text{Pos}_L) = (5.21\text{nm}, 4.83\text{nm})$. Die Fehler sind sehr

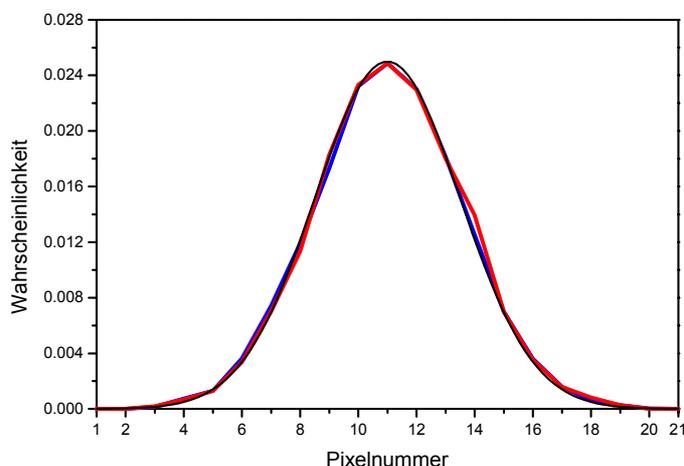


Abb. IV-29:

(—): Q_x , Querschnitt entlang der x-Achse von $\langle {}^{\text{dBF}}\text{Spot}_K \rangle$
 (—): Q_y , Querschnitt entlang der x-Achse

(—): symmetrische Gaussfunktion

homogen, nicht nur bezüglich der x- und y-Komponente, sondern auch im Vergleich von „kurzem“ und „langem“ Kanal.

Entsprechend zu Abb. IV-28 A sind in Abb. IV-28 B die Verteilungen für den kombinierten Algorithmus im Verteilungsmodus aufgetragen. Die Verteilungen ${}^{VA}H(\Delta\mathbf{Pos}_{K,L})$ sind ebenfalls homogen, Standardabweichung und Mittelwert sind fast identisch. Doch fällt auf, dass die Verteilungen wesentlich breiter sind als im Fall des diskreten Best-Fit-Modus, was die Fehler mit ${}^{VA}\Delta(\Delta\mathbf{Pos}_K)=(6.52\text{nm},6.63\text{nm})$ und ${}^{VA}\Delta(\Delta\mathbf{Pos}_L)=(6.80\text{nm},6.56\text{nm})$ im ungefähr 1.5nm größer ausfallen lässt.

Für die Spots in B_K und B_L sollte im Mittel eine Gesamtintensität von 5000 herauskommen, genaue Werte werden später angegeben. Was auffällt ist, dass die Gesamtfehler deutlich größer sind verglichen mit dem reinen Poissonfehler des kombinierten Algorithmus, der in der Größenordnung von 1.7 - 1.8 nm liegen sollte. Diese Abweichung lässt vermuten, dass der Kolokalisationsalgorithmus die Spots, bezogen zu der vorgegebenen PSF der Simulation, verzerrt. Überprüfen kann man diese Behauptung indem man sich die mittleren Spots $\langle{}^{dBF}\text{Spot}_K\rangle$, $\langle{}^{dBF}\text{Spot}_L\rangle$, $\langle{}^{VA}\text{Spot}_K\rangle$ und $\langle{}^{VA}\text{Spot}_L\rangle$ betrachtet. Wichtig ist, dass die Spots, wie oben beschrieben, aufsummiert wurden, so dass bezogen zur Position des Farbstoff 1 der Farbstoff 2 immer rechts unten liegt (siehe Abb. IV-27). In Abb. IV-29 sind die Querschnitte Q_x und Q_y des Spot's $\langle{}^{dBF}\text{Spot}_K\rangle$ entlang der x-Achse und y-Achse dargestellt (—): Querschnitt entlang der x-Achse, (—):Querschnitt entlang der Y-Achse). Aufgetragen sind Q_x und Q_y über die Pixel des Spot's, zusätzlich wurde $\langle{}^{dBF}\text{Spot}_K\rangle$ auf 1 normiert. Zum Vergleich ist eine Gauss-Funktion mit einer Standardabweichung von 2.5 Pixel aufgetragen. Es wird deutlich, dass Q_x und Q_y im Vergleich zur symmetrischen Gaussfunktion (—) deutlich verzerrt sind. Der Mittelpunkt von Q_x liegt bei 11.0223, was einer Abweichung vom exakten Mittelpunkt bei 11 von 1.12nm entspricht. Für Q_y liegt der Mittelpunkt bei 11.06827, entsprechend ist die Abweichung vom exakten Wert 3.41nm. Diese Abweichung gibt Anlass zur Überlegung, ob es möglich ist, den Kolokalisationsalgorithmus so umzuschreiben, dass die Abweichung von der Symmetrie reduziert wird. Auf diese Erweiterung wird im Kapitel V eingegangen.

Es muss noch überprüft werden, ob die Abweichungen zwischen diskretem Best-Fit-Modus und Verteilungsmodus statistisch signifikant sind. Das Vorgehen ist wie bei den Überlegungen für den Schwerpunktsalgorithmus. Für jeden Pixel kann auf einen Fehler, der

ausschließlich aus dem Kolokalisationsalgorithmus entspringt, zurück gegriffen werden. Aus den Fehlerbildern ${}^{\text{dBF}}E$ und ${}^{\text{VA}}E$ kann die geschätzte Abweichung $s\Delta(I_1^{\text{Best}})$ der Intensität I_1^{Best} entnommen werden. Anstatt in Gl. IV-29 den Poissonfehler einzusetzen, wird nun der Fehler aus dem Kolokalisationsalgorithmus eingesetzt. Für jeden untersuchten Spot ergibt sich ein Fehler ${}^x\sigma_{KT}$ in der Bestimmung des Schwerpunktes nach Gl. IV-34.

$${}^x\sigma_{KT} = \sqrt{\sum_{n=1}^{2l} \sum_{m=1}^{2l} (n - {}^x\text{Pos}^A)^2 \cdot \frac{E(m,n)^2}{I_{\text{Ges}}^2}}$$

$${}^x\Sigma_{KT} = \langle \sigma_{KT} \rangle \quad \text{Gl. IV-34}$$

In Gl. IV-34 steht $E(m,n)$ für den Wert aus einem der Fehlerbilder ${}^{\text{dBF}}E$ und ${}^{\text{VA}}E$, I_{Ges} ist die Gesamtintensität des Spots und ${}^x\text{Pos}^A$ steht für die x -Komponente des berechneten Schwerpunktes. Für die y -Komponente schreibt sich die Gleichung analog. Werden die ${}^x\sigma_{KT}$ aller Spots aus ${}^{\text{dBF}}B_K$, ${}^{\text{dBF}}B_L$, ${}^{\text{VA}}B_K$ und ${}^{\text{VA}}B_L$ gemittelt ergeben sich die Fehler ${}^{x,\text{dBF}}\Sigma_{KT}^K$, ${}^{x,\text{dBF}}\Sigma_{KT}^L$, ${}^{x,\text{VA}}\Sigma_{KT}^K$ und ${}^{x,\text{VA}}\Sigma_{KT}^L$. Für die oben durchgeführte Simulation ergeben sich die folgenden Werte: ${}^{x,\text{dBF}}\Sigma_{KT}^K=3.77\text{nm}$, ${}^{x,\text{dBF}}\Sigma_{KT}^L=3.88\text{nm}$, ${}^{x,\text{VA}}\Sigma_{KT}^K=3.51\text{nm}$, ${}^{x,\text{VA}}\Sigma_{KT}^L=3.44\text{nm}$. Für die y -Komponente sind die Σ_{KT} Werte vergleichbar. ${}^{\text{dBF}}\Sigma_{KT}^K$, ${}^{\text{dBF}}\Sigma_{KT}^L$, ${}^{\text{VA}}\Sigma_{KT}^K$ und ${}^{\text{VA}}\Sigma_{KT}^L$ stellen den Fehler für die Genauigkeit der Kolokalisation dar. In den Fehlern ${}^{\text{dBF}}\Sigma_{KT}^K$ und ${}^{\text{dBF}}\Sigma_{KT}^L$ impliziert ist bereits das Poissonrauschen, da in Abschnitt IV.4 gezeigt wurde, dass $s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ in 1. Näherung nur von der Intensität I abhängt. Damit wird die vom Poissonrauschen verursachte Abweichung von I zum Erwartungswert von I direkt mit in das Bild ${}^{\text{dBF}}E$ eingerechnet. Für die Fehler ${}^{\text{VA}}\Sigma_{KT}^K$ und ${}^{\text{VA}}\Sigma_{KT}^L$ gilt dies nicht, da $s\Delta(I_1^{\text{Best}})^{\text{VA}}$ über die möglichen Mischungen $(I_1:I_2)_I$ bei einem festen I variiert. Aus den Fehlern ${}^{\text{dBF}}\Sigma_{KT}^K$ und ${}^{\text{dBF}}\Sigma_{KT}^L$ lässt sich analog zu Gl. IV-27 das Stichprobenrauschen abschätzen, indem ${}^{x,\text{dBF}}\Sigma_{KT}^K$, ${}^{x,\text{dBF}}\Sigma_{KT}^L$ durch die Wurzel der Stichprobenmenge, $\sqrt{64}$, geteilt wird. Das Stichprobenrauschen liegt somit in der Größenordnung von 0.48 nm und ist damit über einen Faktor 10 kleiner als die aus der Simulation bestimmten Fehler ${}^{\text{dBF}}\Delta({}^x\Delta\text{Pos}_K)$ und ${}^{\text{dBF}}\Delta({}^x\Delta\text{Pos}_L)$ bzw. ${}^{\text{VA}}\Delta({}^x\Delta\text{Pos}_K)$ und ${}^{\text{VA}}\Delta({}^x\Delta\text{Pos}_L)$. Für die y -Richtung ergibt sich ein identischer Wert. Somit sind die Fehler statistisch signifikant unterscheidbar.

Die mittleren Intensitäten $\langle {}^{\text{dBF}}I_{\text{Ges}}^K \rangle$, $\langle {}^{\text{dBF}}I_{\text{Ges}}^L \rangle$, $\langle {}^{\text{VA}}I_{\text{Ges}}^K \rangle$ und $\langle {}^{\text{VA}}I_{\text{Ges}}^L \rangle$ ergeben sich aus den Bildern ${}^{\text{dBF}}B_K$, ${}^{\text{dBF}}B_L$, ${}^{\text{VA}}B_K$ und ${}^{\text{VA}}B_L$, und betragen 5050.1 , 4908.4 , 4933.3 und 5025.1 . Mit Hilfe der Fehler ${}^{\text{dBF}}\Sigma_{KT}^K$, ${}^{\text{dBF}}\Sigma_{KT}^L$, ${}^{\text{VA}}\Sigma_{KT}^K$ und ${}^{\text{VA}}\Sigma_{KT}^L$ lassen sich die Fehler ${}^{\text{dBF}}\Delta(\Delta\text{Pos}_K)$ und

${}^{\text{dBF}}\Delta(\Delta\text{Pos}_L)$ bzw. ${}^{\text{VA}}\Delta(\Delta\text{Pos}_K)$ und ${}^{\text{VA}}\Delta(\Delta\text{Pos}_L)$ nach Gl. IV-32 berechnen, und mit Gl. IV-33 kann auf die Fehler ${}^{\text{dBF}}\Delta(\text{Korr}\Delta\text{Pos}_K)$ und ${}^{\text{dBF}}\Delta(\text{Korr}\Delta\text{Pos}_L)$ bzw. ${}^{\text{VA}}\Delta(\text{Korr}\Delta\text{Pos}_K)$ und ${}^{\text{VA}}\Delta(\text{Korr}\Delta\text{Pos}_L)$ des reinen Kolokalisationsalgorithmus zurückgerechnet werden. Es ergeben sich die Fehler ${}^{\text{dBF}}\Delta(\text{Korr}\Delta\text{Pos}_K)=(4.67\text{nm},4.82\text{nm})$ und ${}^{\text{dBF}}\Delta(\text{Korr}\Delta\text{Pos}_L)=(4.89\text{nm},4.49\text{nm})$ bzw. bei ${}^{\text{VA}}\Delta(\text{Korr}\Delta\text{Pos}_K)=(6.27\text{nm},6.39\text{nm})$ und ${}^{\text{VA}}\Delta(\text{Korr}\Delta\text{Pos}_L)=(6.57\text{nm},6.32\text{nm})$. Im Mittel kann wieder von ungefähr 1.5nm Unterschied im Fehler ausgegangen werden.

Umso größer der Fehler, desto kleiner ist die Güte des Algorithmus. Die durchgeführte Simulation würde somit die Aussage zulassen, dass der diskrete Best-Fit-Modus die bessere Beschreibung für einen Kolokalisationsalgorithmus als der Verteilungsmodus darstellt. Die bis jetzt herausgearbeiteten Erkenntnisse reichen noch nicht aus, um die Frage nach der besten Beschreibung zu klären. Eine Vielzahl von Einflüssen wurde ausgeblendet, beispielsweise wurde der Hintergrund noch nicht berücksichtigt. Gerade aber der Hintergrund wäre bei realen Daten ein entscheidender Faktor, da er unkorreliert ist und somit eine große Verzerrung der Spots Spot_K und Spot_L nach sich führen müsste. Auch wurde davon ausgegangen, dass sich ein Farbstoff alleine durch eine mittlere Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ beschreiben lässt. Es wird sich zeigen, dass diese Annahme bei realen Farbstoffmolekülen nicht zutrifft. Auf diesen Sachverhalt wird im Kapitel „Anpassung der Kolokalisationstheorie an reale Datensätze“ eingegangen. Und vor allem wurde bis jetzt noch nicht gezeigt, dass mit Hilfe der spektralen Information eine Verbesserung der Güte der Kolokalisationstheorie erreicht werden kann. Die oben gewählte Form der Simulation wurde aber so flexibel gehalten, dass ohne Weiteres die genannten Faktoren mit einbezogen werden können. Alle Faktoren müssen nun Schritt für Schritt abgearbeitet werden. Der erste Schritt liegt darin zu überprüfen, ob es möglich ist den Kolokalisationsalgorithmus zu symmetrisieren.

Um später verschiedene Simulationen miteinander vergleichen zu können, bietet es sich an, die Güte des Algorithmus auf einen Parameter zu reduzieren. Diesen Parameter wird der Abstandsfehler $\Delta(\Delta\text{Abst})$ darstellen. Neben richtige Abstand Abst der Molekülpaare ist aus der Simulation der aus den Positionen $\text{Pos}_{K,L}^A$ berechnete Abstand Abst^A bekannt (siehe Gl. IV-35).

$$\text{Abst} = \left| \text{Pos}_{1}^R - \text{Pos}_{2}^A \right|$$

$$\text{Abst}^A = \left| \text{Pos}_{K}^A - \text{Pos}_{L}^A \right|$$

$Abst^A$, wird in nm angegeben, im Idealfall ist $Abst^A=0$, und umso größer $Abst^A$ wird, desto schlechter ist die Güte des Algorithmus. Aus dem Abstand $Abst$ und $Abst^A$ lässt sich eine Differenz $\Delta Abst = |Abst - Abst^A|$ berechnen. Aus allen Spots der Bilder der B_K und B_L ergibt sich somit eine Verteilung $H(\Delta Abst)$. Analog kann aus der Standardabweichung $\sigma(\Delta Abst)$ und der Abweichung des Mittelwertes $\langle \Delta Abst \rangle$ vom theoretisch zu erwartenden Wert der Fehler für die Bestimmung des Abstandes abgeleitet werden. Theoretisch würde man erwarten, dass alle Abstände $Abst$ gleich groß sind wie die berechneten Werte $Abst^A$. Der theoretische Wert für $\Delta Abst$ liegt also bei $\Delta Abst=0$. Der Abstandsfehler $\Delta(\Delta Abst)$ kann somit geschrieben werden als:

$$\Delta(\Delta Abst) = \sqrt{\sigma(\Delta Abst)^2 + \langle \Delta Abst \rangle^2} \quad \text{Gl. IV-36}$$

Für den diskreten Best-Fit Modus ergibt sich ein Abstandsfehler für die durchgeführte Simulation von $\Delta(\Delta Abst)^{dBf}=10.62\text{nm}$. Der Verteilungsalgorithmus liefert einen Fehler von $\Delta(\Delta Abst)^{VA}=16.88\text{nm}$. Wie zu erwarten, ist der Fehler deutlich größer als im diskreten Best-Fit Modus. $\Delta(\Delta Abst)$ stellt einen absoluten Fehler dar. Wie oben schon mehrmals erwähnt, sind die absoluten Fehler nur innerhalb einer Simulation bestimmbar. Wird der Algorithmus auf einen realen Datensatz angewendet, benötigt man eine Möglichkeit den Fehler $\Delta(\Delta Abst)$ abzuschätzen. Der geschätzte Fehler $\Delta(Abst^A)$ basiert auf den geschätzten Fehlern $\sigma_{KT}^K=(x\sigma_{KT}^K, y\sigma_{KT}^K)$ und $\sigma_{KT}^L=(x\sigma_{KT}^L, y\sigma_{KT}^L)$ aus Gl. IV-34. $\Delta(Abst^A)$ kann aus Gl. IV-35 abgeleitet werden und berechnet sich wie folgt.

$$\Delta(Abst^A) = \frac{2}{Abst^A} \cdot \sqrt{((x\sigma_{KT}^K)^2 + (x\sigma_{KT}^L)^2) \cdot (xPos^A_K - xPos^A_L)^2 + ((y\sigma_{KT}^K)^2 + (y\sigma_{KT}^L)^2) \cdot (yPos^A_K - yPos^A_L)^2}$$

Gl. IV-37

Der Faktor 2 in Gl. IV-37 ergibt sich dadurch, dass σ_{KT}^K und σ_{KT}^L Schätzer für die Standardabweichung der Verteilungen $H(\Delta Pos_{K,L})$ sind, benötigt wird aber die mittlere Breite der Verteilung $H(\Delta Pos_{K,L})$ um $\Delta(Abst^A)$ richtig abzuschätzen. Da $H(\Delta Pos_{K,L})$ symmetrisch verteilt ist (siehe Abb. IV-28), ist die mittlere Breite aber gleich 2 mal die Standardabweichung der Verteilung. Wenn über alle Spot's aus $^{dBf}B_K$ und $^{dBf}B_L$ bzw. über alle Spots aus $^{VA}B_K$ und $^{VA}B_L$ gemittelt wird, ergibt sich für die geschätzte Abweichung $\Delta(Abst^A)^{dBf}=10.80\text{nm}$ und für $\Delta(Abst^A)^{dBf}=9.82\text{nm}$. Wieder zeigt sich, dass der Schätzer im Verteilungsmodus den tatsächlichen Fehler unterschätzt. Dagegen liegen im diskreten Best-

Fit Modus der Schätzer und der tatsächliche Fehler sehr eng beieinander. Wichtig ist dass der Schätzer den tatsächlichen Wert überschätzt, so kann man später bei der Anwendung des Algorithmus auf reale Daten davon ausgehen, dass der geschätzte Fehler die Obergrenze für den tatsächlichen Fehler angibt.

Die oben durchgeführte Simulation stellt einen Idealfall für ein kolokalisiertes Molekülpaar dar. Zudem stellt der bis jetzt verwendete Algorithmus in seiner diskreten Best-Fit-Form die diskrete Schreibweise der klassischen Mustererkennung dar, die zur Zeit den aktuellsten Stand in der Kolokalisationstheorie beschreibt. Als Regel gilt, dass der Abstandsfehler eines Kolokalisationsalgorithmus den kleinstmöglichen signifikanten Abstand angibt. Bei einem $\Delta(\Delta\text{Abst})$ von ungefähr 10nm, gegeben durch den diskreten Best-Fit-Algorithmus, ist die diskrete Mustererkennung im Idealfall in Lage den Gültigkeitsbereich einer Kolokalisationstheorie von 10 bis 200 nm voll auszuschöpfen. Der kleinstmögliche signifikante Abstand stellt den Schwellwert einer Kolokalisationstheorie dar. Bei realen Daten, die verglichen zum Idealfall weiteren Störeinflüssen unterliegen, liegt der Fehler aber oberhalb des Schwellwertes. Im nächsten Kapitel wird es nun darum gehen, den Algorithmus soweit zu modifizieren, dass der Schwellwert unter 10 nm gedrückt wird.

V. Erweiterung der Kolokalisationstheorie

Im letzten Kapitel konnte ein Problem der bis jetzt verwendeten Kolokalisationstheorie herausgearbeitet werden. So handelt es sich bei der im Kapitel definierten Form um einen pixelorientierten Algorithmus. Wird ein Pixel betrachtet, der durch eine Intensität I und eine Abklingkurve $\{d(t_i)\}$ beschrieben ist, dann wird nur auf diese beiden Parameter zurückgegriffen, um eine Aufteilung in einen „kurzen“, bzw. „langen“ Kanal durchzuführen. Dabei wird vernachlässigt, dass jeder Pixel zu einem Spot gehört, dem wiederum eine PSF zu Grunde liegt. Geht man davon aus, dass ein kolokalisierter Spot in zwei Teilspots Spot_K und Spot_L aufgeteilt wird. Wird weiterhin angenommen, dass ein Farbstoffmolekül durch den Mikroskopaufbau auf eine symmetrische PSF abgebildet wird, dann sollte im Mittel Spot_K und Spot_L auch symmetrisch sein. Im Kapitel IV konnte gezeigt werden, dass dies gerade nicht der Fall ist (siehe Abb. IV-29). Bekannt ist, dass ein asymmetrischer Spot einen relativen großen Fehler in der Bestimmung des Schwerpunkts nach sich führt. Der Kolokalisationsalgorithmus muss daher umgeschrieben werden, so dass eine symmetrische PSF einen symmetrischen Spot nach sich führt.

V.1. Symmetrisierung des Kolokalisationsalgorithmus

Im letzten Kapitel konnte gezeigt werden, dass ein Kolokalisationsalgorithmus in einer diskreten Schreibweise die in Abb. IV-12 gezeigte innere Struktur hat. Bei einer Pixelintensität I ist für jeden möglichen Wert von I_1 , eine Wahrscheinlichkeit $P_V(I_1/I;I)$ bekannt. Aus der Verteilung $\{P_V(I_1/I;I)\}$ wird dann das Maximum im diskreten Best-Fit Modus, oder der Mittelwert im Verteilungsmodus als I_1^{Best} heraus selektiert. I_1^{Best} stellt den wahrscheinlichsten Wert für I_1 dar. Bei einem kolokalisierten Spot, bestehend aus der Fluoreszenz zweier unterschiedlicher Moleküle, wird jeder Pixel als unabhängig angesehen.

Es wird von der folgenden Hypothese ausgegangen, dass die PSF der Farbstoffmoleküle bekannt ist und durch eine 2-dimensionale Gauss-Funktion beschrieben werden kann. Dann ist es möglich, für jeden Pixel des kolokalisierten Spots anzugeben, mit welcher Wahrscheinlichkeit $P_S(I_1;I)$ eine bestimmte Intensität I gemessen wird, wenn I_1 Photonen vom Farbstoff 1 emittiert wurden.

Unter genannten Voraussetzungen ist es möglich anzugeben, wie viele Photonen λ_1 im Mittel vom Farbstoff Typ 1 im Pixel (m,n) detektiert bzw. wie viele Photonen λ_2 vom Farbstoff Typ2 detektiert werden.

$$\begin{aligned}\lambda_1 &= I_{Ges}^1 \cdot N_1 \cdot \exp\left(-\frac{2 \cdot (m - y_C)}{\omega_y^2}\right) \cdot \exp\left(-\frac{2 \cdot (n - x_C)}{\omega_x^2}\right) \\ \lambda_2 &= I_{Ges}^2 \cdot N_2 \cdot \exp\left(-\frac{2 \cdot (m - y_C')}{\omega_y^2}\right) \cdot \exp\left(-\frac{2 \cdot (n - x_C')}{\omega_x^2}\right)\end{aligned}\quad \text{Gl. V-1}$$

I_{Ges}^1 bzw. I_{Ges}^2 geben die Gesamtzahl der von Farbstoff 1 oder Farbstoff 2 detektierten Photonen an. N_1 und N_2 stellen Normierungsfaktoren dar, und (x_C, y_C) ist die genaue Lage von Farbstoff 1 bzw. (x_C', y_C') ist die genaue Lage von Farbstoff 2.

Die Wahrscheinlichkeit $P_K(I_1)$, dass von einem Farbstoffmolekül des Typ 1 bei einer einzigen Messung I_1 Photonen im Pixel (m,n) detektiert werden, ist dann über die Poisson-Statistik festgelegt. Das gleiche gilt für die Wahrscheinlichkeit $P_K(I_2)$, also der Wahrscheinlichkeit, dass bei einer einzigen Messung I_2 Photonen vom Farbstoff 2 im Pixel (m,n) detektiert werden.

$$\begin{aligned}P_K(I_1) &= \frac{\lambda_1^{I_1}}{I_1!} \cdot \exp(-\lambda_1) \\ P_L(I_2) &= \frac{\lambda_2^{I_2}}{I_2!} \cdot \exp(-\lambda_2)\end{aligned}\quad \text{Gl. V-2}$$

Die Wahrscheinlichkeiten $P_K(I_1)$ und $P_K(I_2)$ sind unabhängig voneinander. Es soll gelten:

$$I_1 + I_2 = I \quad \text{Gl. V-3}$$

Mit der Bedingung aus Gl. V-3 kann man die Wahrscheinlichkeit $P_S(I_1; I)$, I Photonen im Pixel (m,n) zu messen, unter der Annahme das I_1 Photonen von Farbstoff 1 kommen, schreiben als:

$$P_S(I_1; I) = P_K(I_1) \cdot P_L(I - I_1), I_1 = 0 \dots I \quad \text{Gl. V-4}$$

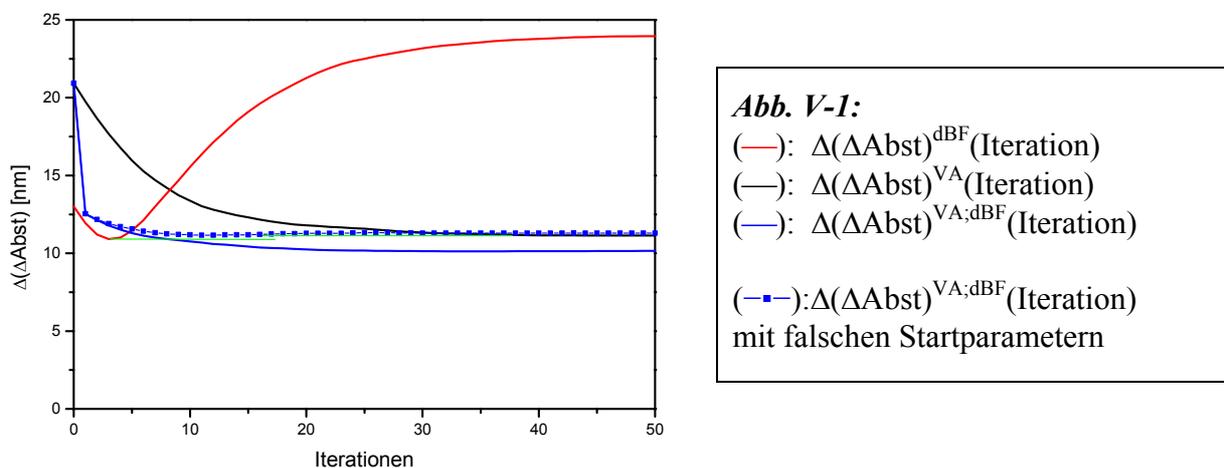
$P_S(I_1;I)$ zeigt somit die gleiche Struktur wie $P_V(I_1/I;I)$, und kann somit genutzt werden die Kolokalisationstheorie zu symmetrisieren, indem der Algorithmus nicht mehr auf die Verteilung $\{P_V(I_1/I;I)\}$ sondern auf die Verteilung $\{P_V(I_1/I;I) \cdot P_S(I_1;I)\}$ zurückgreift.

Die oben aufgestellten Annahmen sind natürlich niemals bei einem realen Datensatz gegeben. Weder die exakte Lage des Farbstoffmoleküls noch die Gesamtzahl der detektierten Photonen sind anfänglich bekannt. Die Symmetrisierung muss daher iterativ aufgebaut werden. Zuerst lässt man über den Datensatz die nicht symmetrisierte Form des Algorithmus laufen, also den Algorithmus, der nur auf die Verteilung $\{P_V(I_1/I;I)\}$ zurückgreift. Aus dem Algorithmus heraus schätzt man für jeden kolokalisierten Spot die Schwerpunkte \mathbf{Pos}^A_K und \mathbf{Pos}^A_L und die Gesamtintensitäten I_{Ges}^K und I_{Ges}^L der Teilspots $Spot_K$ und $Spot_L$. Wichtig ist, dass während der folgenden iterativen Annäherung die Gesamtintensitäten immer mit den gleichen Gesamtintensitäten I_{Ges}^K und I_{Ges}^L gearbeitet wird, d.h. I_{Ges}^K und I_{Ges}^L dürfen nicht angepasst werden. Im ersten Iterationsschritt untersucht man den Datensatz mit dem symmetrisierten Algorithmus. Für jeden Spot setzt man anstatt (x_C, y_C) bzw. (x_C', y_C') und I_{Ges}^1 bzw. I_{Ges}^2 in Gl. V-1 die geschätzten Werte ein und bearbeitet Gl. V-2 - Gl. V-4. Am Ende stehen nun die Teilspots $Spot_K'$ und $Spot_L'$, die wieder anhand ihrer Schwerpunkte $\mathbf{Pos}^A_{K'}$ und $\mathbf{Pos}^A_{L'}$ analysieren werden können. Bei der Iteration 2 greift der symmetrisierte Algorithmus dann auf die Positionen $\mathbf{Pos}^A_{K,L'}$ zurück. Auch der symmetrisierte Algorithmus kann wieder entweder in einem diskreten Best-Fit Modus oder einem Verteilungsmodus unterschieden werden. Um die Güte des Algorithmuses für die Iterationen 1 ... N anzugeben, wird der im Abschnitt IV.5 definierte Parameter $\Delta(\Delta Abst)$ verwendet, der den absoluten mittleren Fehler in der Abstandsbestimmung angibt.

Die oben beschriebene iterative Symmetrisierung wird auf einen zeitaufgelösten Datensatz angewendet. Der Unterschied zu dem im letzten Kapitel besprochenen Datensatz liegt darin, dass man nicht mehr davon ausgeht, dass beide Farbstoffe gleich stark leuchten. Man nimmt vielmehr an, dass innerhalb eines kolokalisierten Spot $I_{Ges}^1=2500$ Photonen vom Farbstoff 1 und $I_{Ges}^2=7500$ Photonen vom Farbstoff 2 kommen. Diese Ungleichmäßigkeit in der Photonenausbeute der verschiedenen Farbstofftypen entspricht eher der realen Situation. Je größer die Differenz in der Helligkeit der Farbstoffe ist, desto größer wird die vom nicht symmetrisierten Kolokalisationsalgorithmus verursachte Verzerrung der PSF sein. Ein weiterer Unterschied in der Simulation besteht darin, dass die exakten Positionen (x_C, y_C) und (x_C', y_C') der Farbstoffe nicht mehr (-1 .. +1) Pixel in beide Richtungen voneinander

abweichen können, sondern nur noch (0 .. +1) Pixel. Damit wird gewährleistet, dass sich die verursachte Asymmetrie nicht herausmittelt. In Abb. V-1 sind die Funktionen $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}(\text{Iteration})$ (—) und $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA}}(\text{Iteration})$ (—) aufgetragen. Insgesamt wurden 50 Iterationsschritte durchgeführt.

Die Werte $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}(0)$ und $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA}}(0)$ geben den Fehler des nicht symmetrisierten Algorithmus an. Wie vermutet wurde liegen die Fehler mit $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}(0)=13.01\text{nm}$ und $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA}}(0)=20.92\text{nm}$ deutlich oberhalb der Werte die aus der Simulation mit gleichmäßiger Helligkeit ermittelt wurden. Dies ist nur dadurch zu erklären ist, dass die Asymmetrie zunimmt.



Das Verhalten der beiden Modi ist völlig verschieden. Im diskreten Best-Fit Modus (siehe (—) in Abb. V-1) sinkt $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}$ ziemlich schnell nach 3 Iterationen auf einen Wert von 10.91nm. Das Minimum (untere grüne Linie in Abb. V-1) ist aber nicht stabil, mit zunehmender Iterationszahl steigt $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}$ wieder stark an. Der Verlauf von $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}(\text{Iteration})$ stellt keine befriedigende Lösung dar, da der Parameter $\Delta(\Delta\text{Abst})$ nur innerhalb einer Simulation definiert ist. Würde man die Symmetrisierung im diskreten Best-Fit Modus über einen realen Datensatz laufen lassen, dann wäre es unmöglich abzuschätzen, wann der Algorithmus sein Optimum erreicht hat.

Der Verlauf im Verteilungsmodus (siehe (—) in Abb. V-1) ist wesentlich besser, da er sich asymptotisch einem Minimum nähert. Der minimale Wert von $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA}}$, 11.14nm, obere grüne Linie in Abb. V-1, liegt aber oberhalb des Minimums des diskreten Best-Fit Modus.

Zusätzlich sind 12 Iterationen nötig, bevor $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}(\text{Iteration})$ kleiner ist als $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}(0)$, und erst bei Iteration 40 hat $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}(\text{Iteration})$ sein Minimum erreicht. Da jede Iteration Rechenzeit bedeutet, ist es wünschenswert, die Anzahl der Iterationen so gering wie möglich zu halten.

Aus dem oben gezeigten Verhalten der beiden Modi kann abgeleitet werden, dass eine Kombination der beiden Modi die optimale Lösung für das Symmetrisierungsverfahren darstellen würde. Die Kombination der beiden Algorithmen wirkt sich nur in der Wahl der Startparameter aus. Es wurde gezeigt, dass die über den nicht symmetrisierten diskreten Best-Fit Algorithmus bestimmten Schwerpunkte wesentlich besser die exakten Positionen der Moleküle beschreiben, als die aus dem Verteilungsalgorithmus bestimmten Schwerpunkte. Es bietet sich daher an, für die Startwerte der Schwerpunkte $^{\text{dBF}}\text{Pos}^{\text{A}}_{\text{K}}$ und $^{\text{dBF}}\text{Pos}^{\text{A}}_{\text{L}}$ anzunehmen. Als Startparameter für die Intensitäten werden die aus dem nicht symmetrisierten Verteilungsmodus ermittelten $^{\text{VA}}\text{I}_{\text{Ges}}^{\text{K}}$ und $^{\text{VA}}\text{I}_{\text{Ges}}^{\text{L}}$ angenommen. Es ist wichtig, die Startparameter wie beschrieben festzulegen, würden z.B. auch die Intensitäten aus dem diskreten Best-Fit Modus generieren werden, dann würde der folgende Algorithmus eine schlechtere Güte zeigen (siehe Abb. V-1, (—■—) im Vergleich zu (—)). Mit dem Startparametersatz $\{^{\text{dBF}}\text{Pos}^{\text{A}}_{\text{K}}, ^{\text{dBF}}\text{Pos}^{\text{A}}_{\text{L}}, ^{\text{VA}}\text{I}_{\text{Ges}}^{\text{K}}, ^{\text{VA}}\text{I}_{\text{Ges}}^{\text{L}}\}$ startet man die Symmetrisierung, die im Verteilungsmodus betrieben wird. Diesen Modus bezeichnet man als VA;dBF-Modus. Beim dBF;VA-Modus handelt es sich somit um den Verteilungsmodus mit gemischten Startparametern.

Das Verhalten des VA;dBF-Modus ist ebenfalls in Abb. V-1 (—) dargestellt. Von dem Wert bei Null $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA;dBF}}(0) = \Delta(\Delta\text{Abst})(0)$, sinkt $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA;dBF}}(\text{Iteration})$ schlagartig auf einen Wert von 12.53nm. Ist somit schon nach einer Iteration besser als $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}(0)$. Nach 8 Iterationen ist $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA;dBF}}(\text{Iteration})$ besser als der minimale Wert von $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}(\text{Iterationen})$ und schon nach 24 Iterationen hat $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA;dBF}}(\text{Iteration})$ sein Minimum erreicht. Das Minimum $\text{Min}\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA;dBF}}$ liegt mit 10.12nm deutlich niedriger als die Minima des reinen diskreten Best-Fit bzw. des reinen Verteilungsmodus. Der VA;dBF-Modus stellt somit die ideale Form einer Symmetrisierung dar.

Aus Abschnitt IV.4 ist bekannt, dass der geschätzte Fehler $_{\text{S}}\Delta(\text{I}_1^{\text{Best}})^{\text{dBF}}$ für ein festes I praktisch gleichverteilt ist. Ebenso wie bei der Simulation mit gleich hellen Molekülen, $\text{I}_{\text{Ges}}^1=5000$ und $\text{I}_{\text{Ges}}^2=5000$, sollte bei der Simulation mit unterschiedlicher Helligkeit,

$I_{Ges}^1=2500$ und $I_{Ges}^2=7500$, die Gesamtintensität $I_{Ges}=I_{Ges}^1+I_{Ges}^2$ für einen kolokalisierten Spot gleich sein. Da $s\Delta(I_1^{Best})^{dBf}$ nur von I abhängt, sollte der Fehler σ_{KT} in der Bestimmung der Schwerpunktspunkte der Spot $Spot_K$ und $Spot_L$ im Grunde gleich sein. Dies bedeutet, dass das Minimum $_{Min}\Delta(\Delta Abst)^{VA;dBf}=10.12nm$ durch den am Ende von Kapitel IV berechneten Wert $\Delta(Abst^A)^{dBf}=10.80nm$ abgeschätzt werden kann.

Mit Hilfe des Symmetrisierungsalgorithmus ist es möglich, auch Datensätze, die nicht dem Idealfall der gleichmäßigen Helligkeit beider Farbstoffe entsprechen, so zu analysieren, dass der Abstandsfehler den Schwellwert von 10nm erreicht.

Im weiteren Verlauf besteht die Aufgabe darin über die spektrale Information den Schwellwert weiter zu reduzieren. Die spektrale Information ist charakterisiert durch den F_2 -Wert, d.h. dem Verhältnis zwischen der Anzahl I_R der detektierten Photonen im langwelligen Detektor und der Gesamtzahl I der detektierten Photonen in beiden Detektoren.

Im Gegensatz zur Zeitinformation, gegeben durch eine Abklingkurve $\{d(t_i)\}$, handelt es sich bei F_2 um keine Verteilung. Es ist daher unmöglich, den Kolokalisationsalgorithmus für die spektrale Information in gleicher Art und Weise zu formulieren, wie den auf der Zeitinformation basierenden Algorithmus.

V.2. Korrelation zwischen Intensität und F_2 -Wert

Um ein tieferes Verständnis zu bekommen, wie sich der F_2 -Wert für verschiedene Intensitäten I verteilt, wird die Korrelationsfunktion $\{G(F_2, I)\}$ analysiert. Diese Funktion gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Parameterpaar (I, F_2) innerhalb eines Pixel auftritt. $\{G(F_2, I)\}$ wird aus realen Datensätzen ermittelt, indem von einer trocken auf einer APS-Oberfläche aufgetragenen Farbstoffprobe ein Fluoreszenzbild aufgenommen wird. Von jedem Pixel dieses Bildes, dessen Intensität I oberhalb einer Schwelle $I_S=30$ liegt, wird (I, F_2) bestimmt. Alle (I, F_2) -Paare werden bezüglich dem F_2 -Wert und I histogrammiert. Die Schrittweite entlang der F_2 -Achse beträgt 0.02 und entlang der I -Achse 4 Photonen. In Abb. V-2 ist die

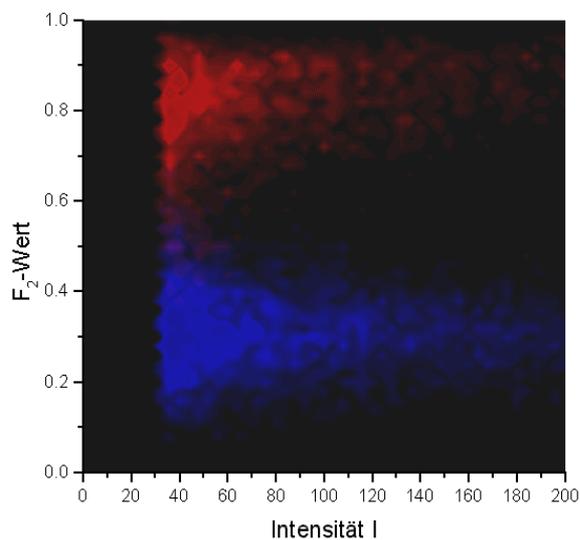


Abb.V-2:

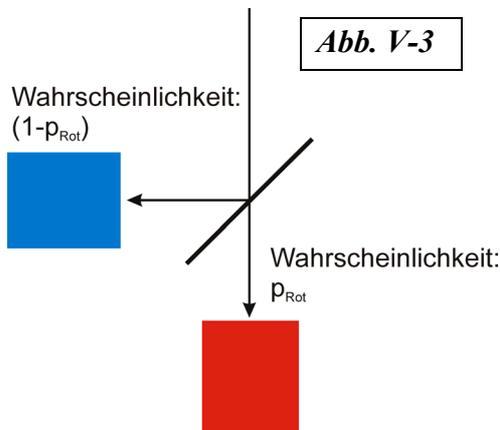
Rote Verteilung:
Korrelationsverteilung $\{G^{Cy55}(F_2, I)\}$ für eine Cy55-Probe.

Blaue Verteilung:
Korrelationsverteilung $\{G^{BoPy}(F_2^m, I_p^n)\}$ für eine BodyPy630-650-Probe

Korrelationsfunktion $\{G(F_2^m, I_p^n)\}$ jeweils für eine Cy5.5-Probe ($\{G^{Cy55}(F_2, I)\}$, rote Verteilung) und eine Bodypy630-650 Probe ($\{G^{BoPy}(F_2, I)\}$, blaue Verteilung) aufgetragen. Die Cy5.5-Probe hat einen mittleren F_2 -Wert p_{Rot} von 0.82, die Bodypy630-650 Probe zeigt ein $p_{Rot}=0.32$.

$\{G(F_2, I)\}$ zeigt keine Korrelation zwischen F_2 und I . Dagegen ist aber die Standardabweichung SD_{F_2} der F_2 -Verteilung bei einer festen Intensität I mit I korreliert ist. Umso größer die Intensität I , desto weniger streuen die F_2 -Werte. Es muss eine Beziehung zwischen der Verteilung von F_2 und I bestehen. Wenn es möglich ist, diese Wahrscheinlichkeitsverteilung $\{P(F_2, 1 - F_2; p_{Rot})\}$ für einen Farbstoff anzugeben, dann sollte es auch möglich sein, die Wahrscheinlichkeitsverteilung für eine Mischung von Farbstoffen anzugeben, was wiederum erlaubt, eine auf dem F_2 -Wert basierende Kolokalisationstheorie zu entwickeln.

Um $\{P(F_2, 1 - F_2; p_{Rot})\}$ abzuleiten, stellt man sich die in Abb. V-3 skizzierte Situation vor. Ein Molekül emittiert ein Photon, das auf einen Strahlteiler vor den beiden Detektoren trifft. Das



Photon kann entweder den Strahlteiler passieren und im roten Kanal detektiert zu werden, oder abgelenkt werden, und im blauen Kanal detektiert zu werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon den roten Kanal erreicht, wird als p_{Rot} bezeichnet. Sendet das Molekül insgesamt I Photonen aus, dann haben I_R Photonen den roten Kanal erreicht, und $I - I_R$ den blauen. Interessant ist, wie I_R um den Mittelwert $\langle I_R \rangle$ verteilt ist.

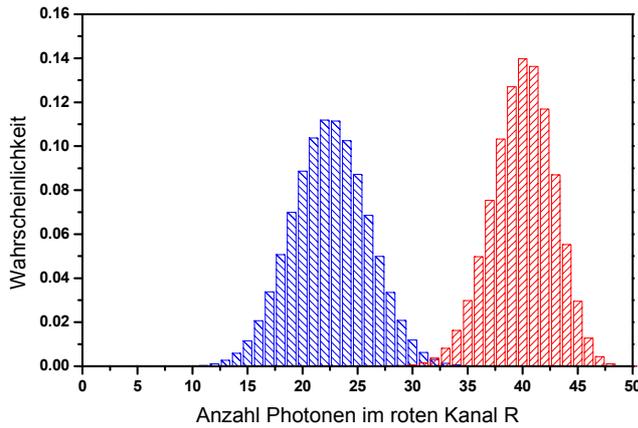
Um nun mathematisch eine Verteilungsfunktion $\{P(I_R, I - I_R; p_{Rot})\}$ für die möglichen Werte von I_R , $I_R = 0 \dots I$ herzuleiten, muss $(p_{Rot} + (1 - p_{Rot}))^I$ nach seinen Binomialkoeffizienten entwickelt werden. Der Ausdruck $(p_{Rot} + (1 - p_{Rot}))^I$ steht für den Fall, dass I mal eine ja/nein-Entscheidung durchgeführt wird, mit einer Wahrscheinlichkeit von p_{Rot} für ja und $(1 - p_{Rot})$ für nein. Die einzelnen Binomialkoeffizienten geben an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Zustand z.B. mit 20 mal ja und $I - 20$ mal nein aufgetreten ist. Die Gesamtwahrscheinlichkeit beträgt 1.

$$(p_{Rot} + (1 - p_{Rot}))^I = \sum_{I_R=0}^I \underbrace{\frac{I!}{I_R! \cdot (I - I_R)!} \cdot p_{Rot}^{I_R} \cdot (1 - p_{Rot})^{I - I_R}}_{P(I_R, I - I_R; p_{Rot})} = 1 \tag{Gl. V-5}$$

Jeder, mit $P(I_R, I - I_R; p_{Rot})$ bezeichnete, Term der Summe in Gleichung Gl. V-5 ist nichts anderes als die Wahrscheinlichkeit, dass I_R Photonen im roten Kanal und $I - I_R$ Photonen im blauen Kanal detektiert werden. Unter der Voraussetzung I Gesamtphotonen detektiert wurden und eine Wahrscheinlichkeit p_{Rot} , für das Erreichen des roten Kanals vorliegt.

Somit lässt sich die Verteilungsfunktion $P(I_R, I - I_R; p_{Rot})$ schreiben als:

$$P(I_R, I - I_R; p_{Rot}) = \frac{I!}{I_R! \cdot (I - I_R)!} \cdot p_{Rot}^{I_R} \cdot (1 - p_{Rot})^{I - I_R}, I_R = 0 \dots I \tag{Gl. V-6}$$

**Abb. V-4:**Rotes Histogramm: $P(I_R, 50-I_R; 0.45)$.Blaues Histogramm: $P(I_R, 50-I_R; 0.80)$

In Abb. V-4 ist $\{P(I_R, I-I_R; p_{Rot})\}$ für $I=50$ Gesamtphotonen, und einem $p_{Rot}=0.45$ (blaues Histogramm) und $p_{Rot}=0.80$ (rotes Histogramm) über die Werte von $I_R=0 \dots 50$ aufgetragen. Die blaue Kurve $\{P(I_R, 50-I_R; 0.45)\}$ ist breiter als die rote Kurve $\{P(I_R, 50-I_R; 0.80)\}$. Dies kann sehr einfach mathematisch gezeigt werden, wenn die Eigenschaften von $\{P(I_R, I-I_R; p_{Rot})\}$ erarbeitet werden.

Zuerst wird der Erwartungswert $\langle I_R \rangle$ der Verteilung $P(I_R, I-I_R; p_{Rot})$ bestimmt.

$$\langle I_R \rangle = \sum_{I_R=0}^I \frac{I!}{I_R! \cdot (I-I_R)!} \cdot I_R \cdot p_{Rot}^{I_R} \cdot (1-p_{Rot})^{I-I_R} = I \cdot p_{Rot} \quad \text{Gl. V-7}$$

Mit Hilfe des Erwartungswertes $\langle I_R \rangle$ lassen sich die Varianz V_R und die Standardabweichung σ_R bestimmen.

$$V_R = V_R(p_{Rot}) = \sum_{I_R=0}^I \frac{I!}{I_R! \cdot (I-I_R)!} \cdot (I_R - \langle I_R \rangle)^2 \cdot p_{Rot}^{I_R} \cdot (1-p_{Rot})^{I-I_R} = I \cdot (p_{Rot} - p_{Rot}^2)$$

$$\sigma_R = \sqrt{V_R} = \sqrt{I} \cdot \sqrt{(p_{Rot} - p_{Rot}^2)} \quad \text{Gl. V-8}$$

Die Varianz $V_R(p_{Rot})$ besitzt bei einem festen I ein Maximum bei $p_{Rot}=0.5$, das ist auch der Grund warum die Verteilung $\{P(I_R, 50-I_R; 0.45)\}$ breiter ist $\{P(I_R, 50-I_R; 0.80)\}$.

Um die Verteilung $\{P(F_2, 1-F_2; p_{Rot}, I)\}$ zu bestimmen, auf der die in Abb. V-2 dargestellte Korrelation $\{G(F_2, I)\}$ beruht, wird die folgende Transformation durchgeführt:

$$I_R \rightarrow F_2 = \frac{I_R}{I} \quad \text{Gl. V-9}$$

Der Erwartungswert $\langle F_2 \rangle$, die Varianz V_{F_2} und die Standardabweichung σ_{F_2} der Verteilung $\{P(F_2, 1-F_2; p_{Rot}, I)\}$ lassen sich aus Gl. V-7 und Gl. V-8 berechnen.

$$\begin{aligned} \langle F_2 \rangle &= p_{Rot} \\ V_{F_2} &= \frac{I}{I} \cdot (p_{Rot} - p_{Rot}^2) \\ \sigma_{F_2} &= \frac{I}{\sqrt{I}} \cdot \sqrt{(p_{Rot} - p_{Rot}^2)} \end{aligned} \quad \text{Gl. V-10}$$

Die Standardabweichung zeigt eine Wurzelabhängigkeit von der Intensität.

V.3. Die spektrale Kolokalisationstheorie

Mit Hilfe der in Gl. V-6 hergeleiteten Verteilungsfunktion $P(I_R, I-I_R; p_{Rot})$ für die spektrale Information lässt sich die Kolokalisationstheorie erweitern. Für einen Pixel wird der Parametersatz (I, F_2) angenommen. Aus dem F_2 -Wert lässt sich I_R berechnen. Unter der Annahme, dass I_1 Photonen von Farbstoff des Typs 1 kommen, der durch p_{Rot}^1 charakterisiert wird, und I_2 Photonen von Farbstoff des Typs 2, mit einem p_{Rot}^2 , kommen, gilt $I_1 + I_2 = I$.

Dementsprechend gilt für die Intensität im roten Kanal:

$$I_R^1 + I_R^2 = I_R \quad \text{Gl. V-11}$$

Die Wahrscheinlichkeit $P(I_R; I, I_1)$ I_R Photonen im roten Kanal zu finden ist bei einem Pixel mit einer Intensität I und einer Mischung $(I_1:I_2)_I$ durch die Summe in Gl. V-12 gegeben.

$$P(I_R; I, I_1) = \sum_{\{I_R^1 + I_R^2 = I_R\}} P(I_R^1, I_1 - I_R^1; p_{Rot}^1) \cdot P(I_R^2, I_2 - I_R^2; p_{Rot}^2) \quad \text{Gl. V-12}$$

Wobei die Summation in Gl. V-12 über alle Zustände geht, für die Gl. V-11 erfüllt ist. I und I_1 werden während der Summation konstant gehalten. Gl. V-12 stellt die Grundgleichung für die spektrale Kolokalisationstheorie dar. In einem Pixel mit der Intensität I können alle Mischungen $(I_1:I_2)_I$, $I_1=0 \dots I$ auftreten. Nach Gl. V-12 ist für jede Mischung ein $P(I_R;I,I_1)$ gegeben.

Die Wirkungsweise des spektralen Algorithmus kann anhand eines Zahlenbeispiels verdeutlicht werden. Es wird ein Pixel mit $I=50$ Photonen betrachtet, von denen $I_R=20$ Photonen im roten Kanal detektiert wurden. Prinzipiell sind für den Pixel die Mischung $(0:50)_{50} \dots (50:0)_{50}$ möglich. Für jede Mischung wird nach der Wahrscheinlichkeit $P(20;50,I_1)$ gefragt. Für die Mischung $(0:50)_{50}$ ist $I_1=0$, und damit ist auch $I_R^1=0$. Es gibt also nur einen Fall für den gilt $I_R^1+I_R^2=20$, und zwar dass $I_R^2=20$ ist. $P(20;50,0)$ ist gegeben durch die Wahrscheinlichkeit $P(20,30;p_{Rot}^2)$, da $P(0,0;p_{Rot}^1)$ gleich 1 ist.

$$P(20;50,0) = P(20,30; p_{Rot}^2)$$

Gl. V-13

Für die Mischung $(1:49)_{50}$ ist $I_1=1$, die möglichen Werte für I_R^1 sind 0 und 1, und $P(20;50,1)$ ist somit durch die Summe aus Gl. V-14 gegeben.

$$P(20;50,1) = P(0,1; p_{Rot}^1) \cdot P(20,29; p_{Rot}^2) + P(1,0; p_{Rot}^1) \cdot P(19,30; p_{Rot}^2)$$

Gl. V-14

Für die Mischung $(2:48)_{50}$ ist $I_1^1=0,1,2$, d.h. es ergibt sich ein $P(20;50,2)$ aus Gl. V-15.

$$P(20;50,2) = P(0,2; p_{Rot}^1) \cdot P(20,28; p_{Rot}^2) + P(1,1; p_{Rot}^1) \cdot P(19,29; p_{Rot}^2) + P(2,0; p_{Rot}^1) \cdot P(18,30; p_{Rot}^2)$$

Gl. V-15

I_1	$P(20;50,I_1)$
0	$P(20;50,0)$
1	$P(20;50,1)$

49	$P(20;50,49)$
50	$P(20;50,50)$

Abb. V-5:
Innere Struktur eines spektralen Kolokalisationsalgorithmus für einen Pixel mit $I=50$ und $I_R=20$

Die Verteilungen $P(I_R^{1,2}, I_{1,2} - I_R^{1,2}, p_{\text{Rot}}^{1,2})$ können jeweils nach Gl. V-6 berechnet werden. Der einzige Parameter, der bekannt sein muss, ist $p_{\text{Rot}}^{1,2}$, und dieser kann für einen Farbstofftyp aus einer Eichmessung bestimmt werden. Für die anderen Mischungen laufen die Berechnungen analog. Am Ende steht für jedes mögliche I_1 ein Wert $P(20;50,I_1)$. Die innere Struktur des Algorithmus stellt sich wie in Abb. V-5 dar.

Die Verknüpfung der inneren Struktur aus Abb. V-5 mit der Struktur aus Abb. IV-12 bedeutet, dass die spektrale Kolokalisationstheorie bezüglich der diskreten Mustererkennung über die Zeitinformation völlig kompatibel ist.

In der Regel besteht bei realen Daten eine Messreihe immer aus mehreren kolokalisierten Bildern des gleichen Typs. Um Rechenzeit zu sparen ist es daher ratsam sich eine Schablone $\text{Dist}_{F_2}(I)$ zu erstellen. Dabei wird für eine festes I , für alle Mischungen $(I_1:I_2)_I$ und alle möglichen $I_R=0 \dots I$ das $P(I_R;I,I_1)$ bestimmt. $\text{Dist}_{F_2}(I)$ stellt eine Matrix dar, deren x-Komponente die Mischung und deren y-Komponente das I_R angibt. Eine solche Matrix hat

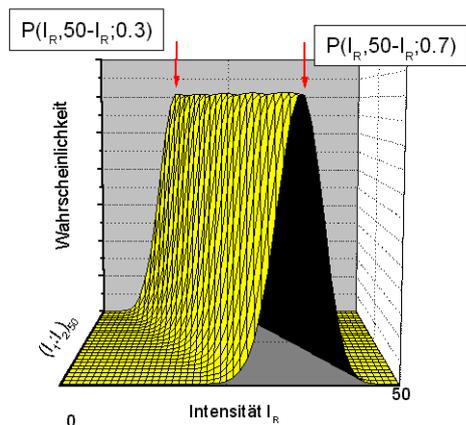


Abb. V-6:

Schablone $\text{Dist}_{F_2}(50)$, die mit den roten Pfeilen markierten Verteilungen, stellen die Verteilungen der reinen Farbstoffe dar.

$(I+1) \times (I+1)$ Elemente. In Abb. V-6 ist $\text{Dist}_{F_2}(50)$ aufgetragen, die $p_{\text{Rot}}^{1,2}$ der beiden Farbstoffe wurden mit $p_{\text{Rot}}^1=0.7$ und $p_{\text{Rot}}^2=0.3$ festgelegt.

Die in Abb. V-6 mit den roten Pfeilen markierten Verteilungen stellen die Verteilungen für die Mischungen $(0:50)_{50}$ und $(50:0)_{50}$ dar. In diesen beiden Fälle kommen alle Photonen von Farbstoff 2 bzw. von Farbstoff 1. Damit sind diese beiden Verteilungen durch $P(I_R, 50-I_R; 0.3)$ und $P(I_R, 50-I_R; 0.7)$ gegeben. Das Arbeiten mit Schablonen spart Rechenzeit, da wenn mehrere Bilder ausgewertet werden müssen, jedes $P(I_R;I,I_1)$ nur einmal berechnet werden muss.

V.4. Unabhängigkeit von spektraler Information und Zeitinformation

Wenn die spektrale Kolokalisationstheorie mit der Kolokalisationstheorie über die Zeitinformation kombiniert werden soll, gilt es noch festzulegen, wie die Wahrscheinlichkeitsverteilung $\{P_V(I_1/I;I)\}$ aus der Zeitinformation mit der Wahrscheinlichkeitsverteilung $\{P(I_R;I,I_1)\}$ aus der spektralen Information zu $\{P_G(I_1;I)\}$ kombiniert werden muss.

Unter der Voraussetzung, dass die Zeitinformation unabhängig von der spektralen Information ist, kann $\{P_G(I_1;I)\}$ geschrieben werden als:

$$P_G(I_1;I) = P_V(I_1/I;I) \cdot P(I_R;I,I_1) \quad \text{Gl. V-13}$$

Innerhalb eines Pixel mit der Intensität I kann für jede mögliche Mischung die Wahrscheinlichkeit aus der Zeitinformation mit der Wahrscheinlichkeit aus der spektralen Information multipliziert werden.

Ob die Unabhängigkeit der beiden Informationen zutrifft, kann gut anhand der Korrelationsfunktion $\{G(F_2,T)\}$ aus Abb. IV-11 überprüft werden. In Abb. IV-11 sind die Korrelationsverteilungen $\{G^{BP}(F_2,T)\}$ und $\{G^{CY}(F_2,T)\}$ aufgetragen. $\{G^{BP}(F_2,T)\}$ und $\{G^{CY}(F_2,T)\}$ wurden aus einer Bodypy630/650 bzw. einer Cy5.5 Probe generiert. Dabei handelt es sich um die gleichen Proben, aus denen auch die Korrelationsfunktionen $\{G^{Cy55}(F_2,I)\}$ und $\{G^{BoPy}(F_2,I)\}$ in Abb. V-2 generiert wurden. In Abschnitt II.1 konnte gezeigt werden, dass zwei Größen X und Y gerade dann unabhängig voneinander sind, wenn deren gemeinsame Wahrscheinlichkeitsverteilung $\{P(X,Y)\}$ unkorreliert ist. Eine Wahrscheinlichkeitsverteilung $\{P(X,Y)\}$ ist dann unkorreliert, wenn der Kovarianzwert Cov_X^Y (siehe Gl. II-11) gegen 0 geht. Aus der Verteilung $\{G^{BP}(F_2,T)\}$ in Abb. IV-11 ergibt sich ein Kovarianzwert $\text{Cov}_T^{F_2}$ von 0,17. $\text{Cov}_T^{F_2}$ ist so nahe bei Null, dass davon ausgegangen werden kann, dass $\{G^{BP}(F_2,T)\}$ unkorreliert ist und damit F_2 und T unabhängig sind.

Damit sind die Voraussetzungen für Gl. V-13 erfüllt. Nun ist es möglich, eine in sich schlüssige Kombination der beiden Informationen durchzuführen. Der Kolokalisationsalgorithmus, der auf beide Informationentypen spektral wie zeitlich zurückgreift, wird als SFLIM-Algorithmus bezeichnet. Die innere Struktur des Algorithmus ist diskret, somit

bleiben alle getroffenen Aussagen, welche die diskrete Schreibweise betreffen, gültig. Man unterscheidet auch beim SFLIM-Algorithmus zwischen einem diskreten Best-Fit Modus und einem Verteilungsmodus. Der wahrscheinlichste Wert I_1^{Best} für I_1 ist entweder gleich dem Maximalwert I_1^{Max} der Verteilung $\{P_G(I_1;I)\}$ beim diskreten Best-Fit Modus, oder gleich dem Mittelwert $\langle I_1 \rangle_{P_G}$ von $\{P_G(I_1;I)\}$. Die Fehler von I_1^{Best} werden analog zur Gleichung GL. IV-12 abgeschätzt.

Wie in Kapitel IV sollte der SFLIM Algorithmus anhand von simulierten Daten untersucht werden.

V.5. Erweiterung des zeitaufgelösten Datensatzes zu einem SFLIM-Datensatz

Ein Datensatz, der sowohl einen Zeitparameter als auch einen spektralen Parameter besitzt wird als SFLIM-Datensatz bezeichnet. Die Simulation eines SFLIM-Datensatzes greift auf den zeitaufgelösten Datensatz aus Kapitel IV zurück. Der zeitaufgelöste Datensatz besteht aus zwei Intensitätsbildern B_1 und B_2 und zwei zeitaufgelösten Bildern B_1^T und B_2^T . Auf die Bilder B_1 und B_2 wird ein Algorithmus angewendet, der jeder Pixelintensität eine Intensität I_R für den roten Kanal zuordnet.

Zuerst wird für jeden Pixel aus B_1 I mal eine Zufallszahl Z zwischen 0 und 1 gezogen. I stellt die Pixelintensität dar. Wird davon ausgegangen, dass B_1 mit dem Farbstoff 1 korreliert ist, und dieser durch ein p_{Rot}^1 charakterisiert wird, dann ist I_R^1 gerade die Anzahl von Zufallszahlen aus der Menge $\{Z\}$ für die gilt: $Z < p_{\text{Rot}}^1$. Für das Bild B_2 wird analog vorgegangen. Dabei wird vorausgesetzt, dass der Farbstoff 2 durch ein p_{Rot}^2 charakterisiert ist. Das Resultat sind zwei spektral aufgelöste Bilder B_1^R und B_2^R . Aus B_1^R und B_2^R wird dann das spektral aufgelöste Gesamtbild $B^R = B_1^R + B_2^R$ berechnet.

Für den vollständigen SFLIM-Datensatz, anhand dessen der SFLIM-Algorithmus getestet werden soll, gelten wieder die Idealbedingungen: kein Untergrund und $I_{\text{Ges}}^1 = I_{\text{Ges}}^2 = 5000$. Die $p_{\text{Rot}}^{1,2}$ der beiden Farbstoffe wurden wie in Abschnitt V.3 mit $p_{\text{Rot}}^1 = 0.7$ und $p_{\text{Rot}}^2 = 0.3$ festgelegt. Die Positionen (y_C, x_C) und (y_C', x_C') können in einem Bereich von $(-1 \dots +1)$ Pixel variieren.

Die Analyse des Datensatzes läuft analog zu Kapitel IV, am Ende steht somit der Abstandsfehler $\Delta(\Delta\text{Abst})$ bzw. der geschätzte Abstandsfehler $\Delta(\text{Abst}^A)$. Für den diskreten Best-Fit Modus des SFLIM-Algorithmus ergibt sich ein $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{dBF}}=5.54\text{nm}$. Der Verteilungsalgorithmus liefert einen Fehler von $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA}}=7.90\text{nm}$. Die geschätzten Fehler liegen bei $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{dBF}}=6.54\text{nm}$ und $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{dBF}}=6.37\text{nm}$. Wieder trifft zu, dass der Schätzer $\Delta(\text{Abst}^A)$ besser im diskreten Best-Fit Modus funktioniert. Zusammenfassend kann behauptet werden, dass der Abstandsfehler im Vergleich zum Kolokalisationsalgorithmus allein über die Zeitinformation um einen Faktor 2 kleiner ist. Der Schwellwert des SFLIM-Algorithmus liegt bei ungefähr 5nm, ist somit kleiner als der kleinste Abstand des Gültigkeitsbereichs, 10-200nm.

Symmetrisiert man den Algorithmus nach dem im Abschnitt V.1 beschriebenen Verfahren, zum einen für einen Datensatz mit $I_{\text{Ges}}^1=I_{\text{Ges}}^2=5000$ (siehe Abb. V-7 (—)) und zum anderen für einen Datensatz mit $I_{\text{Ges}}^1=2500$ und $I_{\text{Ges}}^2=5000$ (siehe Abb. V-7 (—)), dann ergibt sich für die Funktionen $\Delta(\Delta\text{Abst})(\text{Iteration})$ das in Abb. V-7 dargestellte Bild.

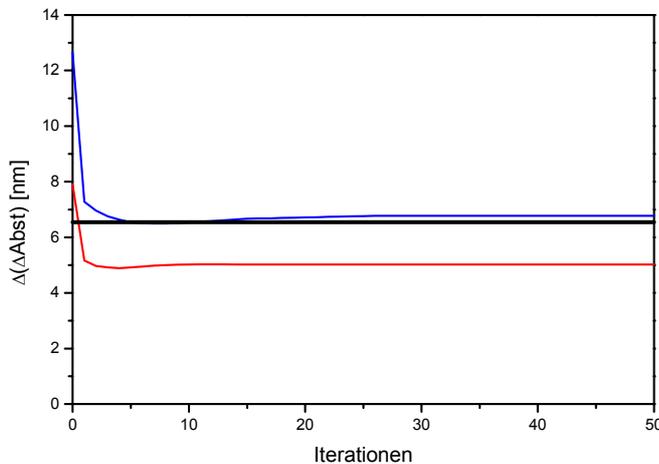


Abb. V-7:

$I_{\text{Ges}}^1=I_{\text{Ges}}^2=5000$:

(—): $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA;dBF}}(\text{Iteration})$

$I_{\text{Ges}}^1=2500, I_{\text{Ges}}^2=7500$:

(—): $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA;dBF}}(\text{Iteration})$

(—): $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{dBF}}=6.54\text{nm}$

Die durch (—) dargestellte Linie in Abb. V-7 stellt den $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{dBF}}=6.54\text{nm}$ im Idealfall dar. Beide Verteilungen $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{VA;dBF}}(\text{Iteration})$ in Abb. V-7 haben nach ungefähr 20 Iterationen einem stabilen Wert von 5.02nm ($I_{\text{Ges}}^1=I_{\text{Ges}}^2=5000$) und 6.77nm ($I_{\text{Ges}}^1=2500, I_{\text{Ges}}^2=7500$) erreicht. Diese beiden Werte lassen sich wieder relativ gut mit $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{dBF}}$ abschätzen.

Der SFLIM-Algorithmus verhält sich gleich wie die diskrete Mustererkennung aus Kapitel IV. Die Güte ist aber um einen Faktor 2 besser.

V.6. Zusammenfassung der Kapitel IV und V

In den Kapiteln IV und V ging es darum, eine passende Beschreibung für eine Kolokalisationstheorie zu entwickeln. Der Ausgangspunkt war der klassische Mustererkennungsalgorithmus in seiner kontinuierlichen Schreibweise. Diese innere Struktur erlaubt es nicht, dass der Algorithmus zu einer SFLIM-Kolokalisationstheorie, basierend auf einer zeitlichen und spektralen Information, ausgeweitet werden kann. Der Algorithmus muss zuerst in eine diskrete Schreibweise umgeformt werden. Innerhalb eines diskreten Algorithmus gibt es zwei verschiedenen Modi, den diskreten Best-Fit und den Verteilungsmodus. Diese beiden Modi wurden miteinander verglichen. Ohne Symmetrisierung stellt der diskrete Best-Fit Modus die bessere Beschreibung für einen diskreten Algorithmus dar. Der Schwellwert liegt im Idealfall, d.h. bei gleich viel emittierten Photonen von Farbstoff 1 und 2, bei 10nm.

Über die Symmetrisierung des Algorithmus kann auch für Datensätze mit unterschiedlich hellen Farbstoffen die Güte des Algorithmus im Idealfall berechnet werden. Die diskrete Mustererkennung wurde durch die zusätzliche spektrale Information zu einem SFLIM-Algorithmus ausgebaut. Der Schwellwert des SFLIM-Algorithmus liegt bei ungefähr 5 nm. Die Güte ist somit um einen Faktor 2 besser als bei der reinen diskreten Mustererkennung.

Der entwickelte SFLIM-Algorithmus beruht auf den zwei Hauptannahmen, dass die Zeitinformation der Farbstofffluoreszenz durch eine mittlere Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ parametrisiert wird, und dass zum zweiten die spektrale Information durch einen mittleren Parameter p_{Rot} beschrieben wird. Um die Symmetrisierung nachdem im Abschnitt V.1 beschriebenen Verfahren durchzuführen, ist es einerseits notwendig, die PSF eines Moleküls zu kennen, andererseits muss die PSF durch einen analytische Funktion beschrieben werden können. Diese beide Annahmen müssen anhand von realen Datensätzen überprüft werden.

VI. Anpassung der Kolokalisationstheorie an reale Datensätze

Um die in Kapitel IV und V entwickelte SFLIM Kolokalisationstheorie an reale Datensätze anzupassen, werden die grundlegenden Annahmen an Eichmessungen überprüft. Als Eichmessung wird ein Datensatz bezeichnet, der aus einer Oberfläche besteht, die nur mit einem bestimmten Farbstofftyp belegt ist. Bei den verwendeten Farbstoffen handelt es sich um Bodipy630/650 und Cy5.5. Die Proben wurden nach zwei verschiedenen Verfahren hergestellt. Zum einen wurde eine mit APS (Aminopropylsilan) behandelte Oberfläche mit reinem Farbstoff belegt. Zum anderen wurde der an eine einzelsträngige DNS gekoppelte Farbstoff in eine Agarose-Matrix eingebettet, die dann auf ein unbehandeltes Glasplättchen aufgebracht wurde.

Ein SFLIM-Datensatz besteht aus einem Intensitätsbild B_I , einem Intensitätsbild B_I^R für den „roten“ Kanal, und einem zeitaufgelösten Bild B^T . B^T kann zerlegt werden in ein zeitaufgelöstes Bild B_R^T für den „roten“ Kanal bzw. ein B_B^T für den „blauen“ Kanal. Jeder Datensatz wird gleich analysiert, indem insgesamt vier verschiedene Verteilungen bestimmt werden: eine Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ (siehe Abb. VI-1 A), eine Verteilung $H(T)$ des zeitlichen Mittelwertes T (siehe Abb. VI-1 B), eine Verteilung $H(F_2)$ der F_2 -Werte (siehe Abb. VI-1 C) und eine Verteilung $H(I)$ (siehe Abb. VI-1 D), die angibt wie häufig eine

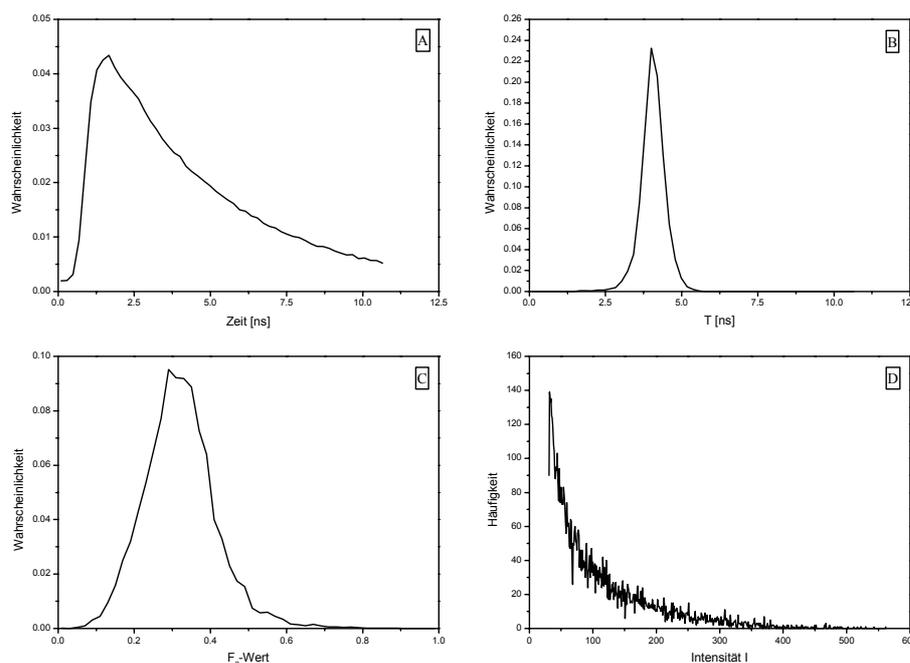
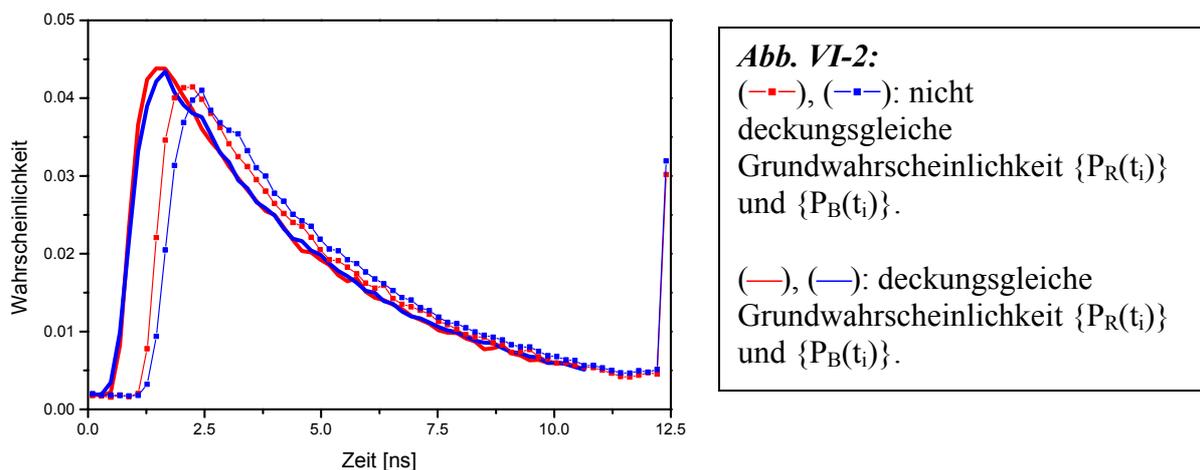


Abb. VI-1:
Die aus einer Eichmessung einer Bodipy630/650 Probe abgeleiteten Verteilungen.
A: $\{P(t_i)\}$
B: $H(T)$
C: $H(F_2)$
D: $H(I)$

bestimmte Pixelintensität in den Bildern vorkommt. Für die Verteilungen $\{P(t_i)\}$, $H(T)$, $H(F_2)$ und $H(I)$ werden nur Pixel betrachtet, deren Intensität oberhalb einer Schwelle I_S liegen. Die Schwelle liegt in der Regel bei $I_S=30$. Bekannt ist, dass ein Farbstoff auf seine Umgebung reagiert. Wird ein Farbstoff in verschiedenen Umgebungen eingebracht, dann werden sich die Verteilungen $H(T)$ und $H(F_2)$ verändern. Der Schwerpunkt dieser Verteilungen wird sich zu größeren bzw. kleineren Werten verschieben. Das prinzipielle Verhalten der Farbstoffe wird aber gleich bleiben. Die in Abb. VI-1 gezeigten Verteilungen wurden von einer Bodipy630/650 Probe auf einer APS Oberfläche ermittelt. Für die Messung wurde der Filtersatz 1 aus Abschnitt II.4 verwendet. Bei diesem Filtersatz liegt das p_{Rot} der Bodipy630/650 Farbstoffe zwischen 0.3 und 0.4. Somit bekommen beide Kanäle ausreichend Photonen, um statistische Aussagen treffen zu können.



Auf einer APS-Oberfläche liegt das Cy5.5 Molekül mit hoher Wahrscheinlichkeit in seiner nichtfluoreszierenden Cis Konfiguration vor. Die Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ setzt sich in einer SFLIM-Anlage aus der Information von zwei Detektoren zusammen. Somit kann $\{P(t_i)\}$ als Summe einer Grundwahrscheinlichkeit für den „roten“ Kanal $\{P_R(t_i)\}$ bzw. aus einer Grundwahrscheinlichkeit für den „blauen“ Kanal $\{P_B(t_i)\}$ geschrieben werden. In Kapitel IV und V wurde vorausgesetzt, dass die beiden Detektoren vollständig identisch sind. In Realität sind zwei Detektoren aber in ihrem Ansprechverhalten niemals völlig gleich. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die Signale der beiden Detektoren über BNC Kabel der Länge L_R bzw. L_B (siehe Abb. II-) zum Router transportiert werden. Ein BNC Kabel besitzt eine endliche Laufgeschwindigkeit, was bedeutet, dass das Signal bezüglich der Zeit der Einspeisung in das Kabel eine gewisse Verzögerung Δt_K erfährt. Δt_K hängt von der

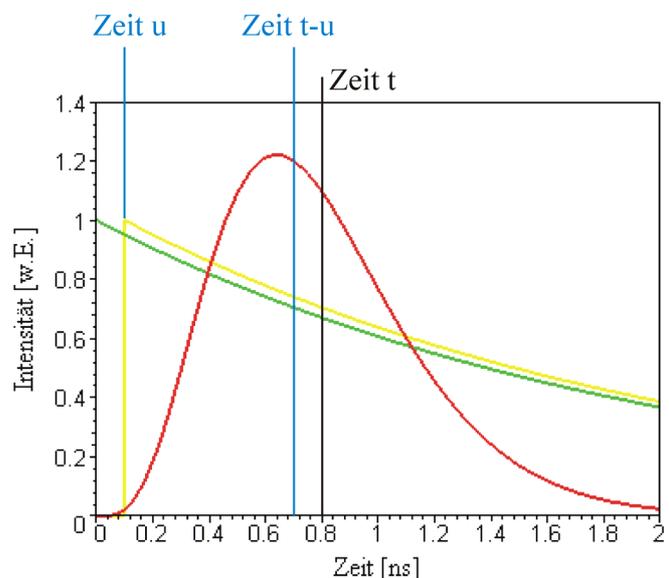
Kabellänge ab (ca 4ns Verzögerung pro 1m Kabellänge). Da jedes BNC Kabel eine gewisse Toleranzlänge besitzt, ist es äußerst schwierig, die Längen L_R bzw. L_B identisch lang zu wählen, was zur Folge hat, dass Δt_K^R für den „roten“ Kanal und Δt_K^B für den „blauen“ Kanal nicht gleich sind. Bei einer festen Kabellänge L_S zwischen dem Sync Ausgang des Pulsgenerator der Laserdiode und dem Sync Eingang der SPC-Karte, bedeutet eine Differenz zwischen Δt_K^R und Δt_K^B dass $\{P_R(t_i)\}$ und $\{P_B(t_i)\}$ nicht deckungsgleich im Zeitfenster liegen (siehe Abb. VI-2, (---) und (---)). $\{P_R(t_i)\}$ und $\{P_B(t_i)\}$ (siehe Abb. VI-2, (—) und (—)) werden dann als deckungsgleich bezeichnet, wenn die Schwerpunkte $T_{\{GF\}}^R$ und $T_{\{GF\}}^B$ der beiden Gerätefunktionen für den „roten“ Kanal und den „blauen“ Kanal identisch sind. Eine Möglichkeit zur Bestimmung von $T_{\{GF\}}^R$ und $T_{\{GF\}}^B$ wird im folgenden Abschnitt aufgezeigt.

VI.1 Überführung einer gefalteten Abklingkurve in ein rein exponentielles Abklingverhalten

Im Kapitel II wurde gezeigt, dass sich die Grundwahrscheinlichkeitsdichte $p(t)$ eines Farbstoffmoleküls als Faltung zwischen einer Gerätefunktion $GF(t)$, die sich aus der zeitlichen Anregungsverteilung der externen Lichtquelle und dem Ansprechverhalten des Detektors zusammensetzt, und der exponentiellen Emissionswahrscheinlichkeitsdichte des Farbstoffes, schreiben lässt (siehe Gl. VI-1). Aus $p(t)$ lässt sich dann die Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ ableiten:

$$p(t) = \frac{\int_0^t GF(u) \cdot \exp\left(-\frac{(t-u)}{\tau}\right) \cdot du}{\int_0^{t_{\text{Max}}} \int_0^t GF(u) \cdot \exp\left(-\frac{(t-u)}{\tau}\right) \cdot du \cdot dt} \quad \text{Gl. VI-1}$$

Abb. VI-3:
Mathematischer Ablauf der Faltung. Die rote Kurve (—) stellt $GF(t)$ dar, die grüne Kurve (—) die Exponentialfunktion $\exp(-t/\tau)$ und die gelbe Kurve (—) die Funktion $d(t,u)$.



t_{Max} ist die Größe des Zeitfensters. Ohne Einschränkung der Allgemeinheit kann angenommen werden, dass $GF(t)$ eine auf 1 normierte Wahrscheinlichkeitsdichte darstellt (siehe Gl. VI-2).

$$\int_0^{t_{\text{Max}}} GF(t) \cdot dt = 1 \quad \text{Gl. VI-2}$$

Zuerst wird nur das Integral betrachtet:

$$\int_0^t GF(u) \cdot \exp\left(-\frac{(t-u)}{\tau}\right) \cdot du \quad \text{Gl. VI-3}$$

Anhand der Abb. VI-3 kann der genaue mathematische Ablauf einer solchen Faltung erklärt werden. Die rote Kurve stellt die Gerätefunktion $GF(t)$ dar und die grüne Kurve die Exponentialfunktion $\exp(-t/\tau)$, in diesem Fall mit einer Lebensdauer von 2 ns. Bei der Berechnung des Integrals, wird für alle Zeiten u von 0 bis t der entsprechende Wert $GF(u)$ mit dem Wert $\exp(-(t-u)/\tau)$ multipliziert. Es wird nun die Funktion $d(t,u)$ definiert, für die jeder Wert u in $GF(u) \cdot \exp(-(t-u)/\tau)$ gleich $GF(u) \cdot d(t,u)$ ist (siehe Gl. VI-4 sowie Abb. VI-3, gelbe Kurve).

$$d(t,u) = \begin{cases} 0 & t < u \\ \exp\left(-\frac{(t-u)}{\tau}\right) & t \geq u \end{cases} \quad \text{Gl. VI-4}$$

Da für Zeiten t mit $t < u$ $d(t,u) = 0$ ist (siehe auch Abb. VI-4), sind in diesem Fall für u alle Zeiten von 0 bis t_{Max} möglich. Diese Transformation hat zur Folge, dass man das Faltungsintegral aus Gl. VI-3 umschreiben kann:

$$\int_0^t GF(u) \cdot \exp\left(-\frac{(t-u)}{\tau}\right) \cdot du = \int_0^{t_{\text{Max}}} GF(u) \cdot d(t,u) \cdot du \quad \text{Gl. VI-5}$$

Diese Transformation ist eine völlig unterschiedliche Interpretation der Faltung. Das linksseitige Integral von Gl. VI-5 hat den Nachteil, dass die Zeit t die Integralgrenze darstellt, für die nachfolgenden Betrachtungen ist diese Schreibweise nicht geeignet, daher wird im weiteren mit $p(t)$ aus Gl. VI-6 gearbeitet.

$$p(t) = \frac{\int_0^{t_{Max}} GF(u) \cdot d(t,u) \cdot du}{\int_0^{t_{Max}} \int_0^{t_{Max}} GF(u) \cdot d(t,u) \cdot du \cdot dt}$$

Gl. VI-6

Zur Überprüfung sind in Abb. VI-4 die beiden Grundwahrscheinlichkeiten $p(t)$ aus Gl. VI-1 (+) und $p(t)$ aus Gl. VI-6 (o) dargestellt. Beide Funktionen sind identisch.

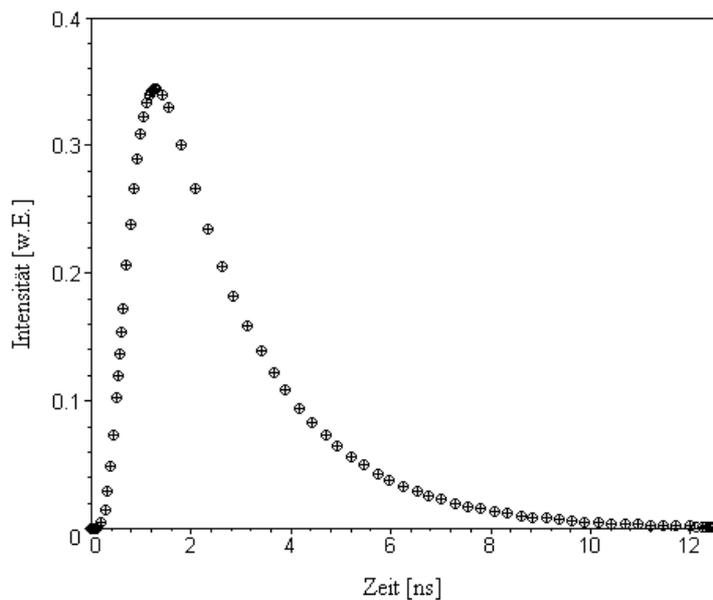


Abb. VI-4:
Grundwahrscheinlichkeiten $p(t)$
aus Gl. VI-1 (+) und $p(t)$ aus Gl.
VI-6 (o)

Aus $p(t)$ (Gl. VI-6) lässt sich die mittlere Zeit T_p^{exakt} ermitteln.

$$T_p^{exakt} = \int_0^{t_{Max}} t \cdot p(t) \cdot dt = \frac{\int_0^{t_{Max}} \int_0^{t_{Max}} GF(u) \cdot t \cdot d(t,u) \cdot du \cdot dt}{\int_0^{t_{Max}} \int_0^{t_{Max}} GF(u) \cdot d(t,u) \cdot du \cdot dt} = \frac{\int_0^{t_{Max}} GF(u) \cdot \underbrace{\left[\int_0^{t_{Max}} t \cdot d(t,u) \cdot dt \right]}_{I_2(u)} \cdot du}{\int_0^{t_{Max}} GF(u) \cdot \underbrace{\left[\int_0^{t_{Max}} d(t,u) \cdot dt \right]}_{I_1(u)} \cdot du} \quad \text{Gl. VI-7}$$

Die Integrationen über u sowie über t sind miteinander vertauschbar. Für die weiteren Berechnungen wird eine analytische Gerätefunktion $GF(t)$ (siehe Abb. VI-5) generiert. Für die weiteren Betrachtungen, spielt die genaue Form der Gerätefunktion keine Rolle. Der zeitliche Mittelwert T_{GF} von $GF(t)$ liegt bei 0.8ns. Diese Funktion $GF(t)$ wurde auch für Simulationen verwendet.

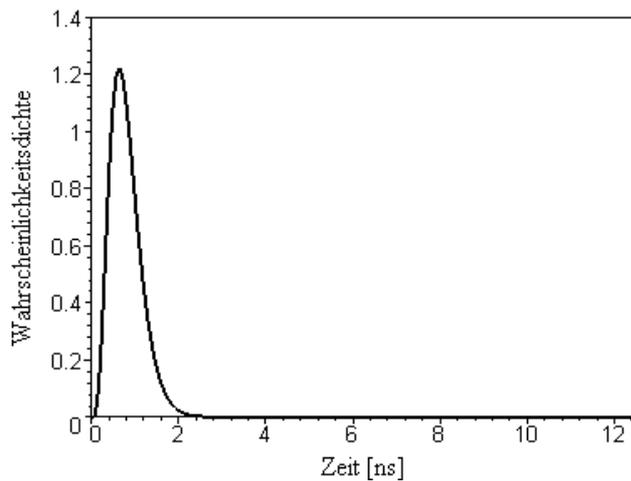


Abb. VI-5:
Die Gerätefunktion GF(t)

In Gl. VI-7 wird zuerst die Integration über t durchgeführt. Dabei müssen die Integrale I_1 und I_2 berechnet werden.

$$I_1(u) = \int_0^{t_{Max}} d(t,u) \cdot dt, I_2(u) = \int_0^{t_{Max}} t \cdot d(t,u) \cdot dt$$

$$I_1(u) = \int_u^{t_{Max}} \exp\left(-\frac{(t-u)}{\tau}\right) \cdot dt \stackrel{\text{Subst.: } v=t-u}{=} \underbrace{\int_0^{(t_{Max}-u)} \exp\left(-\frac{v}{\tau}\right) \cdot dv}_{i_1(u)}$$

$$I_2(u) = \int_u^{t_{Max}} t \cdot \exp\left(-\frac{(t-u)}{\tau}\right) \cdot dt \stackrel{\text{Subst.: } v=t-u}{=} \int_0^{(t_{Max}-u)} (v+u) \cdot \exp\left(-\frac{v}{\tau}\right) \cdot dv$$

$$= u \cdot i_1(u) + \underbrace{\int_0^{(t_{Max}-u)} v \cdot \exp\left(-\frac{v}{\tau}\right) \cdot dv}_{i_2(u)}$$

Gl. VI-8

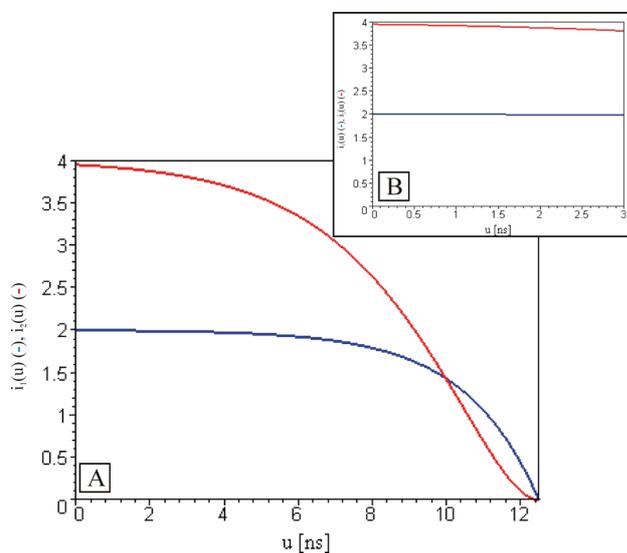


Abb. VI-6:
A: Die Funktionen $i_1(u)$ (—) und $i_2(u)$ (—) für einen Bereich von $u=0...12.5\text{ns}$ und $\tau=2\text{ns}$.
B: Die gleichen Funktionen $i_1(u)$ (—) und $i_2(u)$ (—) im Bereich $u=0..3\text{ns}$

Die Funktionen $I_1(u)$ und $I_2(u)$ lassen sich bestimmen, und in Abhängigkeit zweier neuer Funktionen $i_1(u)$ und $i_2(u)$ ausdrücken. Die beiden Funktionen $i_1(u)$ (—) und $i_2(u)$ (—) sind für u von 0 bis $t_{\text{Max}}=12.5\text{ns}$ und $\tau=2\text{ns}$ in Abb. VI-6 A dargestellt.

Diese Funktionen werden im zweiten Schritt (siehe Gl. VI-7) noch mit $GF(u)$ gewichtet. $GF(u)$ aus Abb. VI-6 geht für Zeiten $u \geq 3\text{ns}$ sehr schnell gegen Null. Daher ist für $i_1(u)$ und $i_2(u)$ praktisch nur der Bereich von $u=0..3\text{ns}$ von Bedeutung (siehe Abb. VI-6 B). In diesem Bereich ist aber $i_1(u)$ in guter Näherung konstant und $i_2(u)$ linear abhängig von u . $I_1(u)$ und $I_2(u)$ können geschrieben werden als.

$$\begin{aligned} I_1(u) &= i_1(u) \approx m_1 \\ i_2(u) &\approx m_2 \cdot u \Rightarrow I_2(u) \approx m_1 \cdot u + m_2 \cdot u \end{aligned} \quad \text{Gl. VI-9}$$

Wird die Wichtung mit $GF(u)$ und die Integration über u durchgeführt, so ergibt sich für $T_p^{\text{Näherung}}$:

$$T_p^{\text{exakt}} = T_p^{\text{exakt}}(t_{\text{Max}}) \approx T_p^{\text{Näherung}}(t_{\text{Max}}, T_{\text{GF}}) = T_{\text{GF}} + T_{\text{Exp}}(t_{\text{Max}} - T_{\text{GF}}; \tau)$$

$$\left[\begin{aligned} T_{\text{GF}} &= \int_0^{t_{\text{Max}}} u \cdot GF(u) \cdot du \\ T_{\text{Exp}}(t_{\text{Max}} - T_{\text{GF}}; \tau) &= \int_0^{(t_{\text{Max}} - T_{\text{GF}})} v \cdot \exp\left(-\frac{v}{\tau}\right) \cdot dv \end{aligned} \right]$$

Gl. VI-10

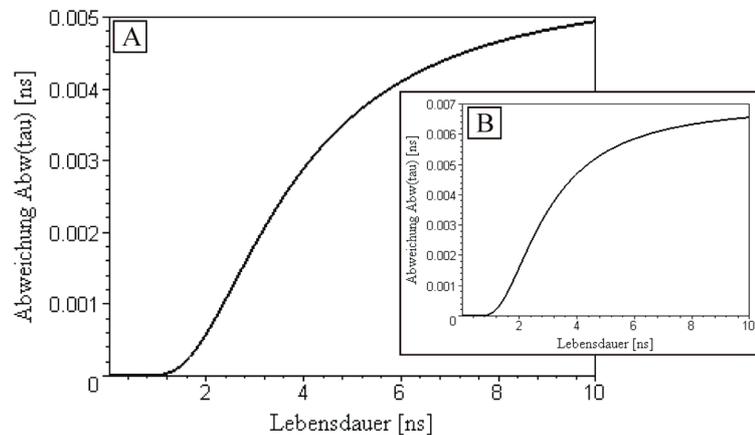
T_p^{exakt} kann also näherungsweise als die Linearkombination des zeitlichen Mittelwertes der Gerätefunktion T_{GF} und des zeitlichen Mittelwertes einer Exponentialfunktion T_{Exp} mit der Lebensdauer τ in einem Zeitfenster mit der Länge $(t_{\text{Max}} - T_{\text{GF}})$ ausgedrückt werden. Wie genau der zeitliche Mittelwert der Gerätefunktion bestimmt wird, wird im nächsten Abschnitt genauer erläutert.

Zur Überprüfung der oben eingeführten Näherung, wird eine Funktion $Abw(\tau)$ (siehe Gl. VI-11) definiert, welche die Abweichung des exakten zeitlichen Mittelwertes T_p^{exakt} einer gefalteten Grundwahrscheinlichkeitsdichte $p(t)$ mit der Lebensdauer τ von der oben hergeleiteten Näherung $T_p^{\text{Näherung}}$ (siehe Gl. VI-10) angibt.

$$Abw(\tau) = Abw(\tau; t_{Max}) = \left| T_p^{exakt}(t_{Max}) - T_p^{Näherung}(t_{Max}) \right|$$

Gl. VI-11

Aus Abb. VI-7 A kann entnommen werden, dass selbst für eine Lebensdauer von 10ns die Abweichung nicht größer ist als 0.005ns=5ps. Die Funktion $Abw(\tau)$ ist abhängig von der Größe des Zeitfensters. Je kleiner das Zeitfenster wird, desto größer werden die Abweichungen. Im Fall $t_{Max}=10ns$, liegt die Abweichung bei $\tau=10ns$ bei 0.0066ns=6.6ps (siehe VI-7 B).



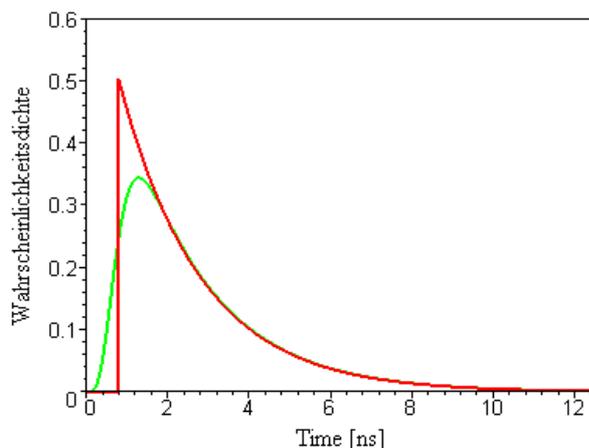
Bei diesen geringen Abweichungen kann immer davon ausgegangen werden, dass jede gefaltete Grundwahrscheinlichkeit $p(t)$ in eine rein exponentielle Grundwahrscheinlichkeitsdichte

$d(t, T_{GF})$ (siehe Gl.VI-4) umgerechnet werden kann, dass die gleiche mittlere Zeit liefert. In Abb. VI-8 sind die beiden Grundwahrscheinlichkeitsdichten $p(t)$ und $d(t, T_{GF})$ für ein $\tau=2ns$ und ein $T_{GF}=0.8ns$ dargestellt. Die grüne Kurve ist die Faltung, die rote Kurve stellt das exponentielle Verhalten dar.

Abb.VI-7:

A Die Funktion $Abw(\tau)$ für ein Zeitfenster $t_{Max}=12.5ns$

B Die Funktion $Abw(\tau)$ für ein Zeitfenster $t_{Max}=10ns$

**Abb.VI-8:**

(—): $p(t)$ aus Gl.VI-6

(—): $d(t, T_{GF})$ aus Gl. VI-4

$\tau=2ns, T_{GF}=0.8ns$

Bislang wurde vernachlässigt, dass keine kontinuierliche, sondern eine in Zeitkanäle verteilte Information, vorliegt. Es muss daher untersucht werden ob die in Gl.VI-11 beschriebene Näherung auch für eine diskrete Zeitinformaton zutrifft.

Zuerst werden gefaltete Grundwahrscheinlichkeitsdichten $p(t)$ mit einer Lebensdauer zwischen 0 bis 10ns generiert. Diese werden in eine diskrete Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ umgerechnet. Aus jedem $\{P(t_i)\}$ lässt sich dann die mittlere Zeit $T_{\{p\}}$ bestimmen.

$$T_{\{p\}} = \sum_{i=1}^{64} t_i \cdot \{P(t_i)\} \quad \text{Gl. VI-12}$$

$T_{\{p\}}$ sollte sich wie in Gl. VI-11 zusammen setzen aus dem Mittelwert $T_{\{GF\}}$ der diskreten Gerätefunktion $\{GF(t_i)\}$ und der mittleren Zeit $T_{\{Exp\}}$ einer diskreten Exponentialfunktion $\{Exp(t_i)\}$.

$$T_{\{GF\}} = \sum_{i=1}^{64} t_i \cdot \{GF(t_i)\} = 0.8000092646ns \quad \text{Gl. VI-13}$$

Der Wert ist also etwas größer als im kontinuierlichen Fall. Um den Wert $T_{\{Exp\}}$ zu erhalten, wird $T_{\{GF\}}$ in eine Kanalnummer K_N umgerechnet, indem $T_{\{GF\}}$ durch $dt=(25/128)ns$ geteilt und dann aufgerundet wird. Für K_N ergibt sich 5. Daraus folgt, dass das Zeitfenster für die Exponentialfunktion $64-5=59$ Kanäle beträgt, der Wert $T_{\{Exp\}}$ ergibt sich aus der Summe:

$$T_{\{Exp\}} = Norm \cdot \sum_{i=1}^{59} t_i \cdot \exp\left(-\frac{t_i}{\tau}\right), \frac{1}{Norm} = \sum_{i=1}^{59} \exp\left(-\frac{t_i}{\tau}\right) \quad \text{Gl. VI-14}$$

Wie oben wird $Abw^D(\tau)$ als Differenz zwischen dem Wert $T_{\{p\}}$ und der Summe $T_{\{GF\}}+T_{\{Exp\}}$ definiert:

$$Abw^D(\tau) = \left| T_{\{p\}} - (T_{\{GF\}} + T_{\{Exp\}}) \right| \quad \text{Gl. VI-15}$$

Die rote Kurve (—) in Abb. VI-9 stellt die so ermittelte Funktion $Abw^D(\tau)$ dar. Zum Vergleich ist die Kurve $Abw(\tau)$ (—) aus Abb. VI-8 A aufgetragen. Die Abweichungen zwischen den beiden Kurven sind sehr deutlich. Zuvor wurde gezeigt, dass besonders für

kleine Lebensdauern der diskrete Mittelwert $T_{\{Exp\}}$ sehr stark vom kontinuierlichen Mittelwert T_{Exp} abweicht. Daher ist es ratsam, $T_{\{P\}}$ nicht durch $T_{\{GF\}}+T_{\{Exp\}}$, sondern durch $T_{\{GF\}}+T_{Exp}(t_{Max}-T_{\{GF\}};\tau)$ anzunähern (siehe Gl. VI-10). Die blaue Kurve (—) in Abb. VI-9 zeigt die auf diese Art berechnete Funktion $Abw^K(\tau)$:

$$Abw^K(\tau) = |T_{\{P\}} - (T_{\{GF\}} + T_{Exp}(t_{Max} - T_{GF}; \tau))|$$

Gl. VI-16

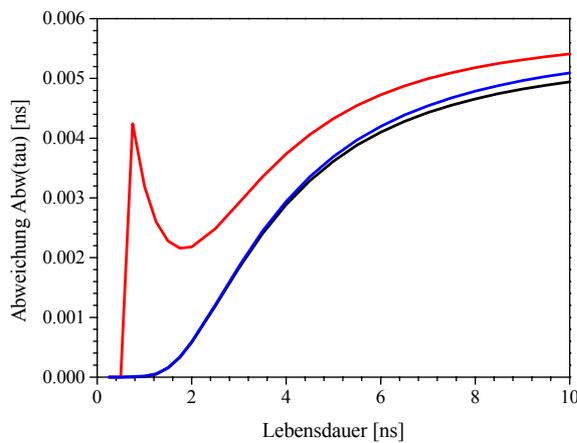


Abb. VI-9:
 (—): $Abw^D(\tau)$ aus Gl. VI-15
 (—): $Abw(\tau)$ aus Abb. VI-8 A
 (—): $Abw^K(\tau)$ aus Gl. VI-16

Diese Kurve ist für kleine Lebensdauern praktisch deckungsgleich mit der schwarzen Kurve und zeigt nur bei großen Lebensdauern geringfügige Abweichungen. Die Zeit $T_{Exp}(t_{Max}-T_{\{GF\}};\tau)$ hängt bei einem gegebenen τ und einem bekannten t_{Max} nur von der Zeit $T_{\{GF\}}$ ab. Mit Hilfe von Gl. VI-16 lässt sich ein Anpassungstest formulieren. Um $\{P_R(t_i)\}$ und $\{P_B(t_i)\}$ in einer Eichmessung zu bestimmen, werden von jedem Pixel des Bildes B_i , dessen Intensität oberhalb einer Schwelle I_S liegt, die Abklingkurven $\{d_R(t_i)\}$ und $\{d_B(t_i)\}$ im „roten“ wie im „blauen“ Kanal bestimmt. Alle Abklingkurven werden auf 1 normiert und aufsummiert. Bei

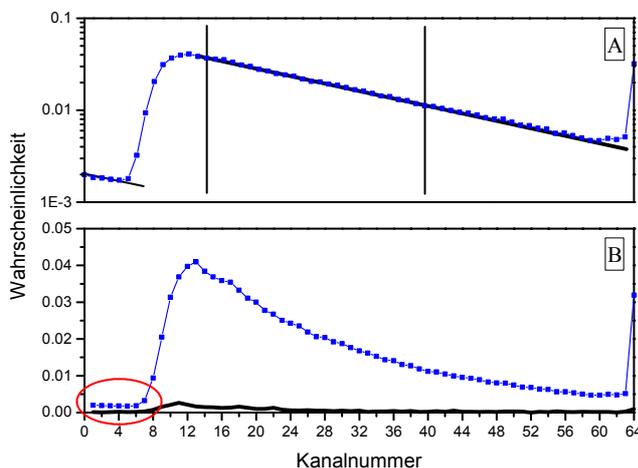


Abb. VI-10:
 A: $\{P_B(t_i)\}$ einer Bodipy630/650 Probe. Einfach logarithmisch. Schwarze Linie stellt die exponentielle Näherung für den Bereich zwischen den senkrechten schwarzen Linien dar.
 B: Lineare Skala. Die schwarze Kurve stellt die Verteilung der Untergrundphotonen in die Zeitkanäle dar. Der rot markierte Bereich wird im Text erläutert.

der in Abb. VI-10 A dargestellten Grundwahrscheinlichkeit $\{P_B(t_i)\}$ einer BodiPy630/650 Probe wird der Bereich zwischen den beiden schwarzen Linien, durch eine Exponentialfunktion $\exp(-t/\tau)$ angenähert.

Die Kanalnummern des markierten Bereich liegen zwischen 15 und 40 Das bestimmte τ wird in Gl. VI-16 eingesetzt. $T_{\{P\}}$ wird zwischen den Kanalnummern 1 und 40 bestimmt und t_{Max} wird gleich $40 \cdot 25 / 128 ns$ gesetzt. Nun kann $T_{\{GF\}}$ solange variiert werden bis $Abw^K(\tau)$ Null wird. Das gleich Verfahren wird auf $\{P_R(t_i)\}$ angewendet. Am Ende stehen dann die Schwerpunkte $T_{\{GF\}}^R$ und $T_{\{GF\}}^B$ der beiden Gerätefunktionen für den „roten“ und „blauen“ Kanal zu Verfügung. Die Differenz $\Delta T_{\{GF\}}$ von $T_{\{GF\}}^R$ und $T_{\{GF\}}^B$ gibt an, wie die beiden Kanäle gegeneinander verschoben werden müssen. In Abb. VI-10 A ist $\{P_B(t_i)\}$ einfach logarithmisch aufgetragen. Die schwarze Linie gibt die exponentielle Näherung für den Bereich zwischen den Kanalnummern 15 und 40 an. In Abb. VI-10 B ist $\{P_B(t_i)\}$ linear aufgetragen. $\{P_B(t_i)\}$ stellt eine Mittelung über insgesamt 7733 Pixel dar. Die Intensität eines Pixels besteht nicht alleine aus Fluoreszenzphotonen, sondern beinhaltet ebenfalls Untergrundphotonen. Pro Pixel werden unter den gewählten experimentellen Bedingungen im Mittel vier Untergrundphotonen detektiert, 3 Photonen auf dem „blauen“ Kanal und 1 Photon auf dem „roten“ Kanal. Die Verteilung der Untergrundphotonen in die Zeitkanäle ist in Abb. VI-10 B durch die schwarze Kurve dargestellt. Das Signal zu Rausch Verhältnis S/N im „blauen“ Kanal liegt bei S/N=25. Aufgrund dieses großen S/N-Wertes lassen sich die hohen Wahrscheinlichkeiten für die Zeitkanäle im rot markierten Bereich nicht durch Untergrundeffekte erklären. Stattdessen kann diese Erhöhung auf die begrenzte Größe des Zeitfenster t_{Max} zurückgeführt werden. Ein Farbstoff mit einer Lebensdauer τ hat eine gewisse Wahrscheinlichkeit, Photonen zu emittieren, deren Zeitabstand t_E zwischen Anregung und Emission größer ist als die Periode des Lasers. Solchen Photonen werden durch die SPC-Karte eine Mikrozeit $t_{Mikro}=t_E$ -Periode zugeordnet (siehe auch Kapitel III). Dies führt zu einer Erhöhung der Grundwahrscheinlichkeitsdichte für kleine Zeiten (siehe Abb. VI-11). Die Verteilung der Photonen in die Zeitkanäle mit einem $t_E >$ Periode ist rein exponentiell. Aus der in Abb. VI-9 gezeigten Beschreibung einer Grundwahrscheinlichkeitsdichte $p(t)$ durch eine rein exponentielle Grundwahrscheinlichkeitsdichte $d(t, T_{GF})$, kann die Wahrscheinlichkeit p_0 , dafür das ein Photon in das Zeitfenster emittiert wird und die Wahrscheinlichkeit p_{-1} , dass ein Photon aus dem Zeitfenster heraus emittiert wird, berechnet werden.

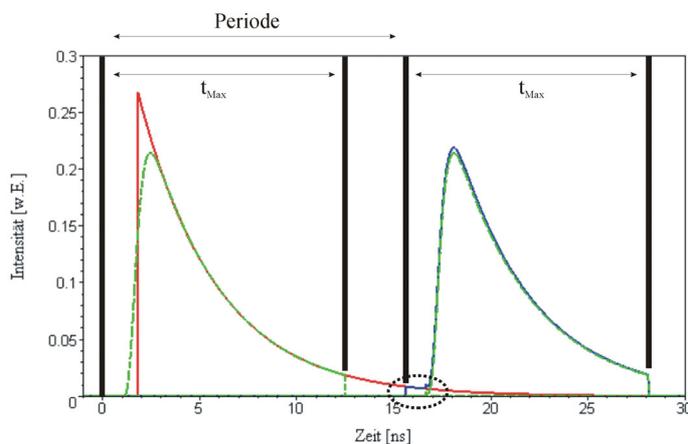
$$p_0 = \frac{F_0}{F_0 + F_{-1}}$$

$$p_{-1} = \frac{F_{-1}}{F_0 + F_{-1}}$$

$$F_0 = \int_{T_{\{GF\}}}^{t_{Max}} \exp(-(t - T_{\{GF\}}) / \tau) \cdot dt$$

$$F_{-1} = \int_{Periode}^{Periode+t_{Max}} \exp(-(t - T_{\{GF\}}) / \tau) \cdot dt$$

Gl. VI-17

**Abb. VI-11:**

(---):
Grundwahrscheinlichkeitsdichte
 $p(t)$ ohne Erhöhung durch
Photonen mit $t_E > \text{Periode}$.

(---): Erhöhung der

Grundwahrscheinlichkeitsdichte
 $p(t)$

(---): $d(t, T_{GF})$ aus Abb. VI-8

p_0 und p_{-1} sind abhängig von der Lebensdauer τ des Farbstoffes, der Größe des Zeitfensters t_{Max} und der Periode. Durch den in Abb. VI-11 beschriebenen Zusammenhang muss $Abw^K(\tau)$ aus Gl. VI-16 umgeschrieben werden zu:

$$Abw^K(\tau) = \left| T_{\{P\}} - p_0 \cdot (T_{\{GF\}} + T_{Exp}(t_{Max} - T_{GF}; \tau)) - p_{-1} \cdot T_{Exp}(t_{Max}; \tau) \right|$$

Gl. VI-18

Mit Gl. VI-18 und dem daraus resultierenden Anpassungstest für den Schwerpunkt $T_{\{GF\}}$ der Gerätefunktion kann immer gewährleistet werden, dass $\{P_R(t_i)\}$ und $\{P_B(t_i)\}$ deckungsgleich übereinander liegen. Für die in Abb. VI-2 gezeigten $\{P_R(t_i)\}$ und $\{P_B(t_i)\}$ (siehe (---) und (---)) ergibt sich ein $\Delta T_{\{GF\}}$ von 0.22ns, was ungefähr der Breite eines Zeitkanals von 0.195ns entspricht. Der beschriebene Anpassungstest erfordert so wenig Rechenaufwand, dass er direkt in die Datenaufnahme eingebaut werden kann. Es ist möglich, während einer Eichmessung die Kabellängen L_R und L_B so anzupassen, dass $\Delta T_{\{GF\}}$ gleich Null wird. Die Anpassung von L_R und L_B könnte über einen Frequenzgenerator erfolgen, der z.B. das Signal eines Detektors so verzögert, dass Δt_K^R und Δt_K^B gleich sind. Alternativ kann die

Zeitinformation nachträglich angepasst werden. Zusätzlich werden von $\{P_R(t_i)\}$ und $\{P_B(t_i)\}$ die ersten drei Zeitkanäle und die letzten drei Zeitkanäle abgeschnitten, so dass die deckungsgleichen Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_R(t_i)\}$ und $\{P_B(t_i)\}$ (siehe (—) und (—) Abb. VI-2) eine Länge von 55 Zeitkanälen haben. Die Transformationen, die an $\{P_R(t_i)\}$ und $\{P_B(t_i)\}$ durchgeführt werden, müssen auch auf die Bilder B_R^T und B_B^T angewendet werden. Aus $B^T = B_R^T + B_B^T$ kann die Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ ermittelt werden (siehe Abb. VI-1 A). Im folgenden kann die Abweichung zwischen den Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_R(t_i)\}$ und $\{P_B(t_i)\}$ vernachlässigt werden

In Abschnitt IV.3 wurde beschrieben, wie aus einer Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ auf eine Abklingkurve $\{d(t_i)\}$ mit einer Intensität I geschlossen werden kann. Für alle Pixelintensitäten I einer Eichmessung, beschrieben durch die Verteilung $H(I)$ (siehe Abb. VI-1), werden 10000 Abklingkurven generiert. Jede Abklingkurve wird auf ihren zeitlichen Mittelwert T umgerechnet. Aus den 10000 Werten für T kann eine Verteilung $H_B(T, I)$ bestimmt werden. Mit einem bekannten $H(I)$ können die $H_B(T, I)$ zu einem $H_B(T)$ gemittelt werden.

$$H_B(T) = \frac{\sum H(I) \cdot H_B(T, I)}{\sum H_B(I)} \quad \text{Gl. VI-19}$$

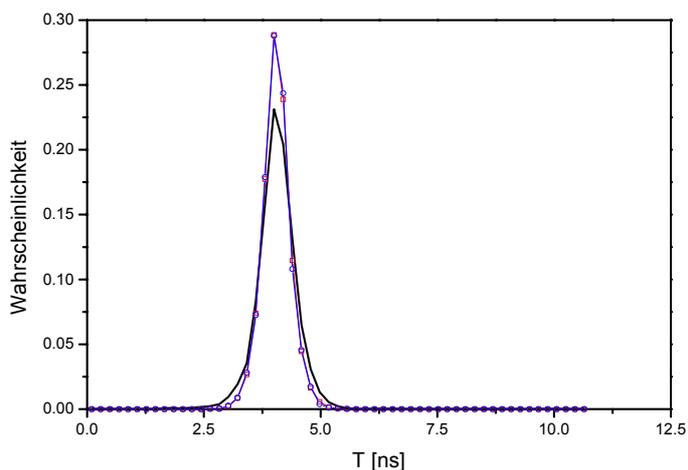


Abb. VI-12:

(—): $H(T)$ aus Abb. VI-1

(—□—): $H_B(T)$

(—○—): $H_B'(T)$

Das aus Gl. VI-19 berechnete $H_B(T)$ kann mit der gemessenen Verteilung $H(T)$ aus Abb. VI-1 verglichen werden. Das Bild B_I einer Eichmessung besteht aus der Fluoreszenz von mehreren Farbstoffmolekülen. Wenn die Behauptung zutrifft, dass jedes Farbstoffmolekül der gleichen Grundwahrscheinlichkeit folgt, dann sollte $H_B(T)$ und $H(T)$ identisch sein. Aus Abb. VI-12

wird aber deutlich, dass $H(T)$ (—) wesentlich breiter ist als $H_B(T)$ (-□-). Eine mögliche Erklärung der Abweichung könnte darin liegen, dass für jede mögliche Pixelintensität I gleichviele Abklingkurven generiert werden. Es stellt sich daher die Frage, wie sich $H_B(T)$ verändert, wenn nur der Häufigkeit $H(I)$ entsprechend viele Abklingkurven für ein bestimmtes I erstellt werden. Aus den $H(I)$ vielen Abklingkurven lässt sich dann ein $H_B'(T,I)$ erstellen. Entsprechend der Gl. VI-19 können die $H_B'(T,I)$ zu einem $H_B'(T)$ (siehe (-○-) Abb. VI-12) gemittelt werden. $H_B(T)$ und $H_B'(T)$ weichen kaum voneinander ab. Daraus lässt sich schließen, dass die oben getroffene Behauptung, dass jedes Farbstoffmolekül eines Farbstofftyps der gleichen Grundwahrscheinlichkeit folgt, nicht zutrifft. Vielmehr zeigen die immobilisierten Farbstoffmoleküle eine statische Heterogenität und jedes Farbstoffmolekül besitzt eine eigene Grundwahrscheinlichkeit $\{P_j(t_i; \tau_j)\}$. Wird über alle möglichen $\{P_j(t_i; \tau_j)\}$ einer Eichmessung gemittelt, dann ergibt sich die gezeigte Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$.

$$P(t_i) = \sum_j V_\tau^j(\tau_j) \cdot P_j(t_i; \tau_j)$$

Gl. VI-20

Die Verteilung $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ gibt an, wie häufig eine bestimmte Grundwahrscheinlichkeit $\{P_j(t_i)\}$ auftritt. Nur die einzelnen $\{P_j(t_i)\}$ sind monoexponentiell, $\{P(t_i)\}$ ist dagegen multiexponentiell. Die Annahme, dass $\{P(t_i)\}$ monoexponentiell beschrieben werden kann, stellt daher nur eine Näherung dar. Von dieser Näherung wird aber im weiteren Verlauf nochmals Gebrauch gemacht. Wenn zutrifft, dass jedes Farbstoffmolekül unabhängig gesehen werden muss, dann sollte auch die Beschreibung der spektralen Information durch ein einziges p_{Rot} falsch sein. Aus Abschnitt V.2 ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung $\{P(I_R, I-I_R; p_{\text{Rot}})\}$ bekannt, die angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit bei einer Pixelintensität I und einem gegebenen p_{Rot} eine bestimmte Intensität I_R im „roten“ Kanal gemessen wird. Mit

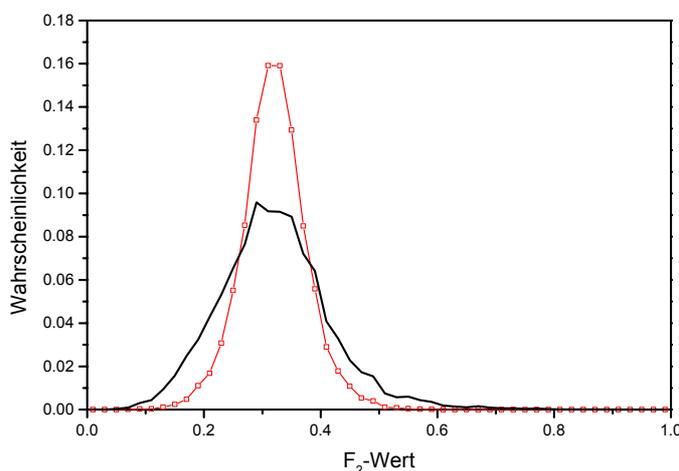


Abb. VI-13:

(—): $H(F_2)$ aus Abb. VI-1

(-□-): $H_B(F_2)$

zunehmenden I nehmen auch die möglichen Werte für I_R zu. Eine einfache Mittelung von $\{P(I_R, I-I_R; p_{Rot})\}$ über die Intensitätsverteilung $H(I)$ ist daher nicht möglich. Die Verteilung $\{P(I_R, I-I_R; p_{Rot})\}$ muss daher auf eine Verteilung $H(F_2; p_{Rot}, I)$ mit einer festen Balkenbreite ΔF_2 umgerechnet werden, in dem jedem möglichen Wert für I_R ein I_R/I zugeordnet wird. Alle Wahrscheinlichkeiten $P(I_R, I-I_R; p_{Rot})$ für die gilt $0.02 \leq I_R/I < (i+1) \cdot 0.02$ werden dem i -ten F_2 -Kanal von $H(F_2; p_{Rot}, I)$ zugeordnet. Die Verteilungen $H(F_2; p_{Rot}, I)$ können analog zu Gl. VI-19 zu einem $H_B(F_2, p_{Rot})$ gemittelt werden. Für das $H_B(F_2, p_{Rot})$ (—□—) aus Abb. VI-13 wurde ein p_{Rot} von 0.32 angesetzt. Deutlich ist die große Abweichung zwischen $H_B(F_2, 0.32)$ und $H(F_2)$ (—) zu sehen. Jedes Farbstoffmolekül hat ein unterschiedliches Spektrum, somit ein unterschiedliches p_{Rot}^j .

$$H(F_2) = \sum_j V_R^j(p_{Rot}^j) \cdot H_B(F_2, p_{Rot}^j)$$

Gl. VI-21

Die Verteilung $\{V_R^j(p_{Rot}^j)\}$ gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein bestimmtes p_{Rot}^j auftritt. Die genaue Kenntnis der Verteilungen $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ und $\{V_R^j(p_{Rot}^j)\}$ ist im Hinblick auf die Kolokalisationstheorie von Bedeutung. Würde in einer SFLIM Kolokalisationstheorie weiterhin mit einem $\langle p_{Rot} \rangle$ bzw. mit einer mittleren Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ gearbeitet, würde dies besonders bei der Nutzung der spektralen Information zu einem Fehler führen.

VI.2 Bestimmung der Verteilungen $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ und $\{V_R^j(p_{Rot}^j)\}$

Im ersten Schritt wird die Verteilung $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ bestimmt. Hierzu benötigt man die Kenntnis über die Gerätefunktion. Ist die Gerätefunktion $\{GF(t_i)\}$ bekannt, dann kann ein Satz von Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_j(t_i)\}$ erzeugt werden, mit dem die Verteilung $\{P(t_i)\}$ angefitet werden kann.

Der genaue Ablauf der Bestimmung von $\{GF(t_i)\}$ wird anhand der Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ aus Abb. VI-1 A erklärt. Für einen Bereich zwischen den Kanalnummern 12 bis 30 wird $\{P(t_i)\}$ monoexponentiell angenähert. Aus dieser Näherung kann ein mittleres τ berechnet werden. Mit diesem τ wird eine diskrete exponentielle Verteilung $\{E(t_i)\}$ für die Zeitkanäle 1 bis 55 berechnet. Nun wird eine diskrete Startverteilung für $\{GF(t_i)\}$ und deren

Schwerpunkt $T_{\{GF\}}$ festgelegt. $\{GF(t_i)\}$ und $\{E(t_i)\}$ werden zur einer Verteilung $\{D(t_i)\}$ gefaltet. Um zwei diskret Verteilungen miteinander zu falten, wird ein FFT-Algorithmus (*FFT: Fast Fourier Transformation*) genutzt. Für die Faltung von zwei Verteilungen gilt der Faltungssatz der Fouriertransformation, der besagt, dass die Fouriertransformation der Faltung von zwei Verteilungen im Zeitraum gleich dem Produkt der Fouriertransformierten der einzelnen Verteilung ist:

$$FFT(\{g(t_i)\} \otimes \{f(t_i)\}) = FFT(\{g(t_i)\}) \cdot FFT(\{f(t_i)\})$$

Gl. VI-22

Um $FFT(\{E(t_i)\})$ und $FFT(\{GF(t_i)\})$ zu bestimmen, werden $\{E(t_i)\}$ und $\{GF(t_i)\}$ auf $2 \cdot 55 = 110$ Kanäle erweitert. Die Wahrscheinlichkeit für die Kanäle 56 bis 110 wird gleich Null gesetzt. Nun werden $FFT(\{E(t_i)\})$ und $FFT(\{GF(t_i)\})$ miteinander multipliziert und über einen inversen FFT-Algorithmus zurück transformiert. Es wird $\{D(t_i)\}$ mit einer Länge von 110 Zeitkanälen erhalten, von denen nur die Kanäle 1 bis 55 eine Bedeutung haben. $\{D(t_i)\}$ wird daher auf 55 Kanäle gekürzt. Aufgrund des endlichen Zeitfensters muss die gefittete Grundwahrscheinlichkeit $\{P_{Fit}(t_i)\}$ geschrieben werden als:

$$\{P_{Fit}(t_i)\} = p_0 \cdot \{D(t_i)\} + p_{-1} \cdot \{E(t_i)\}$$

Gl. VI-23

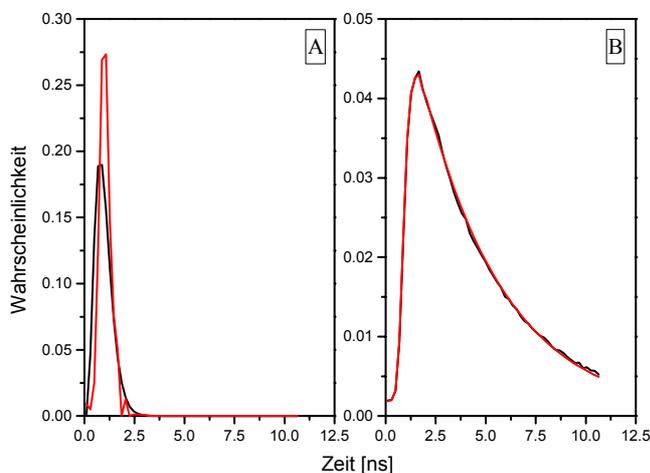


Abb. VI-14:

A: (—): Startverteilung von $\{GF(t_i)\}$
 (—): optimierte Verteilung von $\{GF(t_i)\}$
 B: (—): $\{P(t_i)\}$ aus Abb. VI-1 A
 (—): $\{P_{Fit}(t_i)\}$

Zwischen $\{P_{\text{Fit}}(t_i)\}$ und $\{P(t_i)\}$ wird eine Likelihood-Funktion bestimmt, die minimiert wird. Als Likelihood-Funktion wird die Kullback-Leibler Diskriminierungsinformation aus Gl. IV-4 verwendet, indem d_i durch $P(t_i)$ und $P_{12}(t_i;p)$ durch $P_{\text{Fit}}(t_i)$ ersetzt wird. Der Wert für I in Gl. IV-4 wird gleich 1 gesetzt. Im weiteren Verlauf werden die Likelihood-Funktionen immer auf die gleiche Weise definiert. Am Ende dieses Anpassungstests steht $\{GF(t_i)\}$ mit einer optimierten Form und einem optimierten $T_{\{GF\}}$ erhalten. In Abb. VI-14 A sind die Startverteilung (—) und die optimierte Verteilung (—) von $\{GF(t_i)\}$ aufgetragen.

In Abb. VI-14 B sind die $\{P(t_i)\}$ (—) aus Abb. VI-1 A und $\{P_{\text{Fit}}(t_i)\}$ (—) aufgetragen. Die Gerätefunktion setzt sich aus einem gewissen Anteil aus dem „roten“ Kanal bzw. dem „blauen“ Kanal zusammen. Würde eine Grundwahrscheinlichkeit aus einer Cy5.5 Probe angefitet, dann ergäbe sich eine leicht unterschiedliche Gerätefunktion.

Der Schwerpunkt der Gerätefunktion $T_{\{GF\}}$ liegt bei 1.053ns. $T_{\{GF\}}$ liegt also innerhalb des 5 Zeitkanals. Das Zeitfenster $t_{\text{Max}}' = t_{\text{Max}} - T_{\{GF\}}$ hat eine Größe von 50 Zeitkanälen. Aus Kapitel II ist bekannt, dass die mittlere Zeit T_{Exp}^D einer diskreten Exponentialfunktion nie größer sein kann, als die Hälfte des Zeitfensters t_{Max}' . $t_{\text{Max}}'/2$ wird in 100 Abschnitte aufgeteilt und jedem Abschnitt wird eine Zeit T_{τ}^j , $T_{\tau}^j = (j-0.5) \cdot t_{\text{Max}}' / (2 \cdot 100)$, zugeteilt. Jedes T_{τ}^j wird dann in eine Lebensdauer τ_j , $j=1 \dots 100$, umgerechnet. Die T_{τ}^j 's haben einen konstanten Abstand, während der Abstand der τ_j 's exponentiell anwächst. Jedem τ_j wird eine diskrete Exponentialfunktion $\{E_j(t_i; \tau_j)\}$ zugeordnet, die mit der ermittelten Gerätefunktion $\{GF(t_i)\}$ gefaltet wird. Für den Satz von Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_j(t_i; \tau_j)\}$ gilt:

$$\{P_j(t_i; \tau_j)\} = p_0 \cdot \{D_j(t_i; \tau_j)\} + p_{-1} \cdot \{E_j(t_i; \tau_j)\}$$

Gl. VI-24

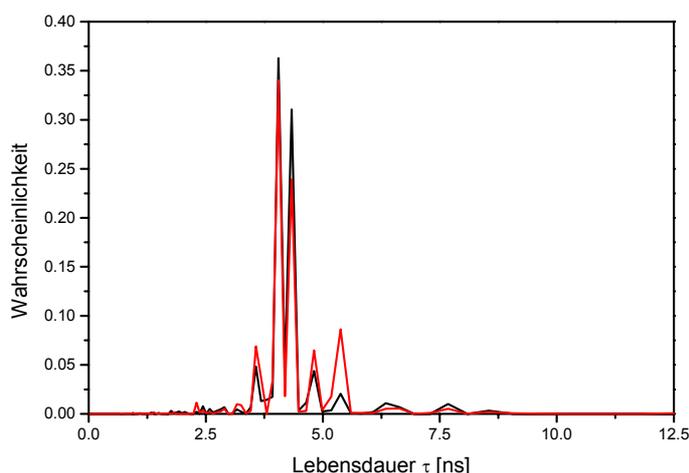


Abb. VI-15:

(—): Die bezüglich $\{P(t_i)\}$ optimierte Verteilung $\{V_{\tau}^j(\tau_j)\}$ für eine BodiPy630/650 Eichmessung

(—): Die bezüglich $H(T)$ optimierte Verteilung $\{V_{\tau}^j(\tau_j)\}$

Hier stellt $\{D_j(t_i; \tau_j)\}$ die Faltung zwischen $\{E_j(t_i; \tau_j)\}$ und $\{GF(t_i)\}$ dar. Für $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ wird eine Startverteilung bestimmt und $\{P_{Fit}(t_i)\}$ nach Gl. VI-20 bestimmt. $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ wird solange optimiert bis eine Likelihood-Funktion zwischen $\{P_{Fit}(t_i)\}$ und $\{P(t_i)\}$ minimal wird. Die optimierte Verteilung $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ ist in Abb. VI-15 (—) dargestellt. Das oben beschriebene Anpassungsverfahren ist sehr rechenaufwendig und liefert nur eine gute Näherung für die Verteilung $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$, da für die Bestimmung von $\{GF(t_i)\}$ angenommen wird, dass $\{P(t_i)\}$ monoexponentiell ist. Um die Verteilung $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ exakter annähern zu können, müsste der Anpassungstest iterativ aufgebaut werden, indem mit Hilfe von $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ eine multiexponentielle Verteilung $\{E(t_i)\}$ bestimmt wird, die wieder in Gl. VI-23 eingesetzt wird. $\{GF(t_i)\}$ wird dann weiter optimiert, und eine neue Verteilung $\{V_\tau^j\}$ wird bestimmt. Für einen normalen PC ist diese iterative Beschreibung zu rechenaufwendig. Mit einem Computer Cluster wäre der iterative Anpassungstest aber problemlos durchführbar.

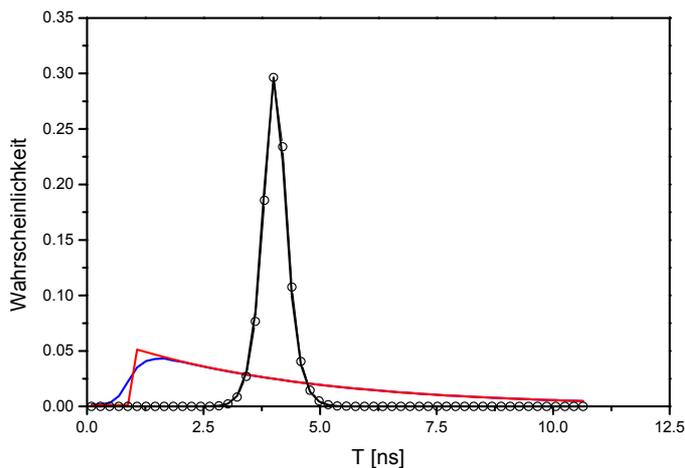


Abb. VI-16:

- (—): $H_B(T; \tau_j)$
- (-○-): $H_B(T; \tau_j)^{Exp}$
- (—): $\{P_j(t_i; \tau_j)\}^{Exp}$
- (—): $\{P_j(t_i; \tau_j)\}$

Eine andere Möglichkeit $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ zu bestimmen, besteht darin, $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ aus der Verteilung $H(T)$ abzuleiten. Aus jeder Grundwahrscheinlichkeit $\{P_j(t_i; \tau_j)\}$ und der gemessenen Intensitätsverteilung $H(I)$ lässt sich analog zu Gl. VI-19 eine Verteilung $H_B(T; \tau_j)$ berechnen. Mit der Verteilung $\{V_\tau^j(\tau_j)\}$ lassen sich die $H_B(T; \tau_j)$ zu einem $H_B(T)$ mitteln. $H_B(T)$ kann dann mit $H(T)$ verglichen werden. Der Vorteil $H(T)$ anstatt von $\{P(t_i)\}$ anzufitten liegt darin, dass die Linienform der Gerätefunktion kaum noch eine Rolle spielt. Die Unabhängigkeit von der Linienform kann gezeigt werden, indem für ein τ_j die Verteilung $\{D_j(t_i; \tau_j)\}$ aus Gl. VI-24 analog zu Abb. VI-9 in eine rein exponentielle Verteilung $\{P_{Exp}^j(t_i; \tau_j)\}$ überführt wird. Mit $\{P_{Exp}^j(t_i; \tau_j)\}$ und $\{E_j(t_i; \tau_j)\}$ lässt sich nach Gl. VI-24 ein $\{P_j(t_i; \tau_j)\}^{Exp}$ (siehe Abb. VI-16 (—)) bestimmen. Für die Verteilung $H(I)$ wird aus $\{P_j(t_i; \tau_j)\}^{Exp}$ ein $H_B(T; \tau_j)^{Exp}$ berechnet, dass mit

$H_B(T; \tau_j)$ verglichen werden kann. Der einzige Parameter der Gerätefunktion, der für $H_B(T; \tau_j)^{\text{Exp}}$ eine Rolle spielt, ist die Zeit $T_{\{GF\}}$. $T_{\{GF\}}$ kann über zwei unabhängige Methoden ermittelt werden, und ist somit sehr genau bekannt. In Abb. VI-16 sind $H_B(T; \tau_j)^{\text{Exp}}$ (—○—) und $H_B(T; \tau_j)$ (—) für ein $\tau_j=4.0528\text{ns}$ aufgetragen. Die Abweichung zwischen den Kurven ist vernachlässigbar, was den Rückschluss zulässt, dass auch für die Verteilungen $H_B(T; \tau_j)$ nur die Zeit $T_{\{GF\}}$ von Bedeutung ist. Die aus dem Vergleich $H_B(T)$ und $H(T)$ abgeleitete Verteilung $\{V_{\tau}^j\}$ ist in Abb. VI-15 (—) gezeigt.

Nachdem die Verteilung $\{V_{\tau}^j(\tau_j)\}$ bekannt ist, muss die $\{V_R^j(p_{\text{Rot}}^j)\}$ bestimmt werden. Der Vorteil in der Bestimmung von $\{V_R^j(p_{\text{Rot}}^j)\}$ liegt darin, dass für eine gegebene Verteilung $H(I)$ $H_B(F_2, p_{\text{Rot}})$ analytisch bestimmbar ist. Der Abschnitt zwischen 0 und 1 wird in 100 gleich große Abschnitte zerlegt, und jedem dieser Abschnitte wird ein p_{Rot}^j , $p_{\text{Rot}}^j=(j-0.5)\cdot 0.01$, zugeordnet. $\{V_R^j(p_{\text{Rot}}^j)\}$ ist dann die Verteilung über die Werte für p_{Rot}^j . Wie für $\{V_{\tau}^j(\tau_j)\}$ wird zuerst eine Startverteilung für $\{V_R^j(p_{\text{Rot}}^j)\}$ festgelegt, und diese bezüglich $H(F_2)$ aus Abb. VI-1 C optimiert. Die optimierte Verteilung $\{V_R^j(p_{\text{Rot}}^j)\}$ für eine BodiPy630/650 Probe ist in Abb. VI-17 aufgetragen.

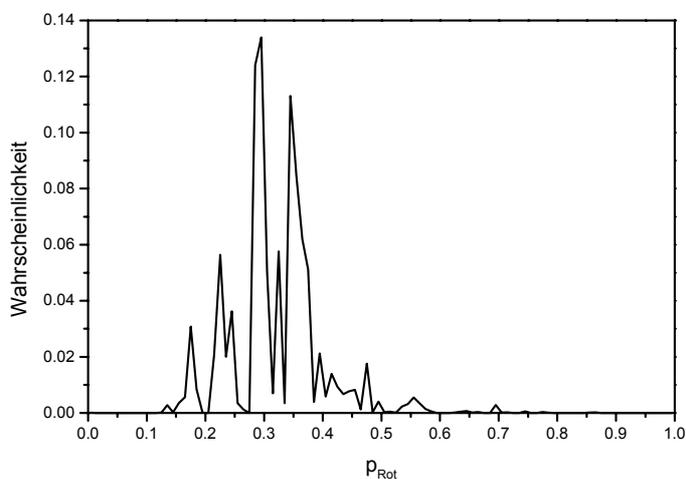


Abb. VI-17:

(—): Die bezüglich $H(F_2)$
optimierte Verteilung $\{V_R^j\}$
für eine BodiPy630/650
Eichmessung

VI.3 Berücksichtigung des Hintergrundrauschens

Die Verteilungen $\{V_{\tau}^j(\tau_j)\}$ und $\{V_{R'}^j(p_{Rot}^j)\}$ aus Abb. VI-15 und Abb. VI-17 stehen im Grunde nicht alleine für einen Farbstoff, sondern bezeichnen eine bestimmte Mischung zwischen Farbstofffluoreszenz und Hintergrundrauschen. Im folgenden werden Eichmessungen betrachtet, die an in einer Agarose-Matrix eingebetteten Farbstoffmolekülen durchgeführt wurden. Die Farbstoffmoleküle sind an eine einzelsträngige DNS gekoppelt. Neben einer Probe aus Bodipy630/650 Farbstoffmolekülen wurde eine mit Cy5.5

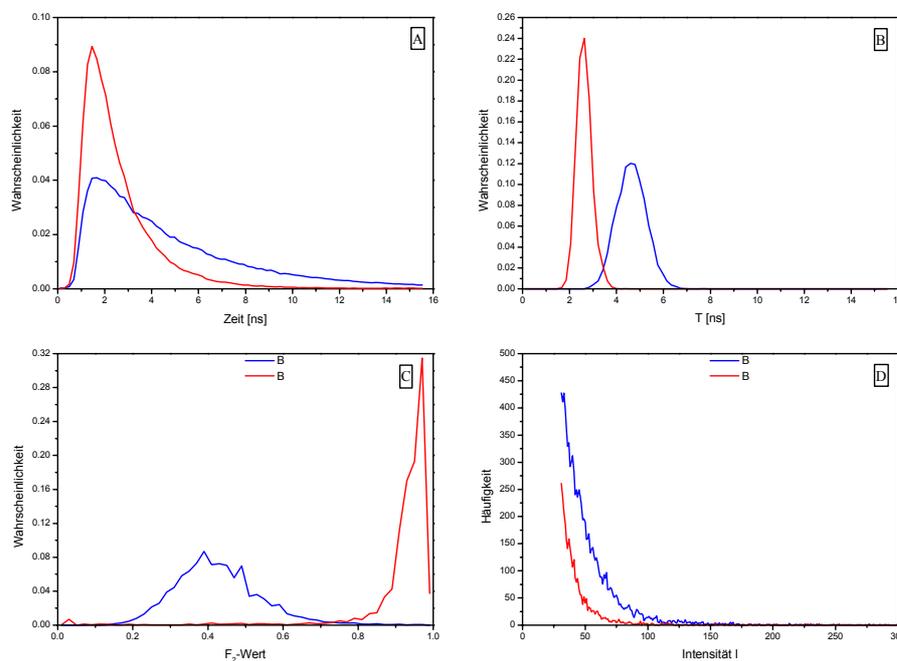


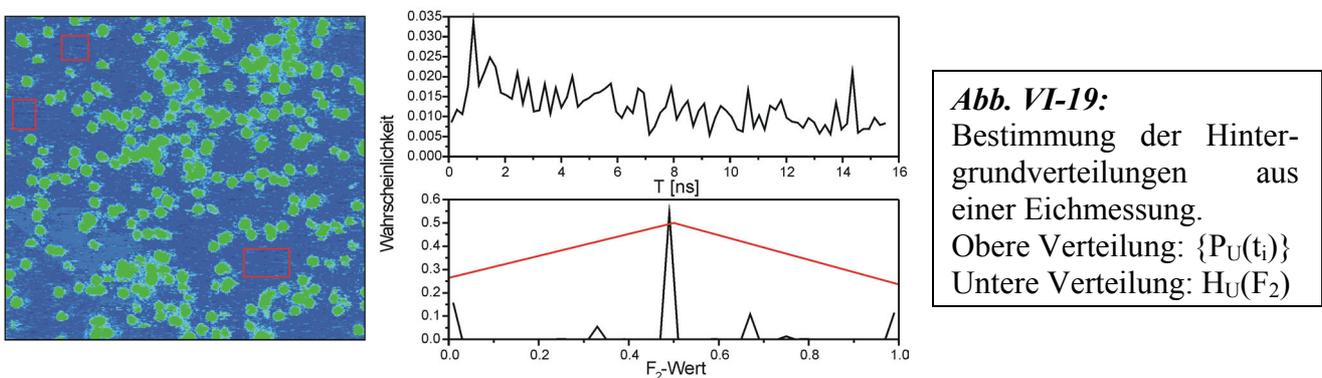
Abb. VI-18:
Verteilungen aus einer Bodipy630/650 Probe (blaue Kurven) und einer Cy5.5 Probe (rote Kurven).
A: $\{P_{BP,CY}(t_i)\}$
B: $H_{BP,CY}(T)$
C: $H_{BP,CY}(F_2)$
D: $H_{BP,CY}(I)$

Farbstoffmolekülen untersucht. Aus den Eichmessungen wurden die Verteilungen $\{P_{BP,CY}(t_i)\}$ (siehe Abb. VI-18 A), $H_{BP,CY}(T)$ (siehe Abb. VI-18 B), $H_{BP,CY}(F_2)$ (siehe Abb. VI-18 C) und eine $H_{BP,CY}(I)$ bestimmt. Für die Messung wurde der Filtersatz 2 aus Abschnitt II-5 verwendet.

Der Schwellwert I_S für die Pixelintensitäten beträgt wieder 30 Photonen. Aus den Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_{BP}(t_i)\}$ und $\{P_{CY}(t_i)\}$ lassen sich die Gerätefunktionen $\{GF_{BP}(t_i)\}$ und $\{GF_{CY}(t_i)\}$ ableiten. Mit den Gerätefunktionen lassen sich zwei Sätze von Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_{BP}^{BP}(t_i, \tau_j)\}$ und $\{P_{BP}^{CY}(t_i, \tau_j)\}$ bestimmen. Als Repetitionsrate wurde 40 MHz gewählt, als Zeitfenster können daher 80 Zeitkanäle gewählt werden, was

einem $t_{\text{Max}}=15.625\text{ns}$ entspricht. Die Verteilungen müssen noch mit dem Hintergrundrauschen erweitert werden.

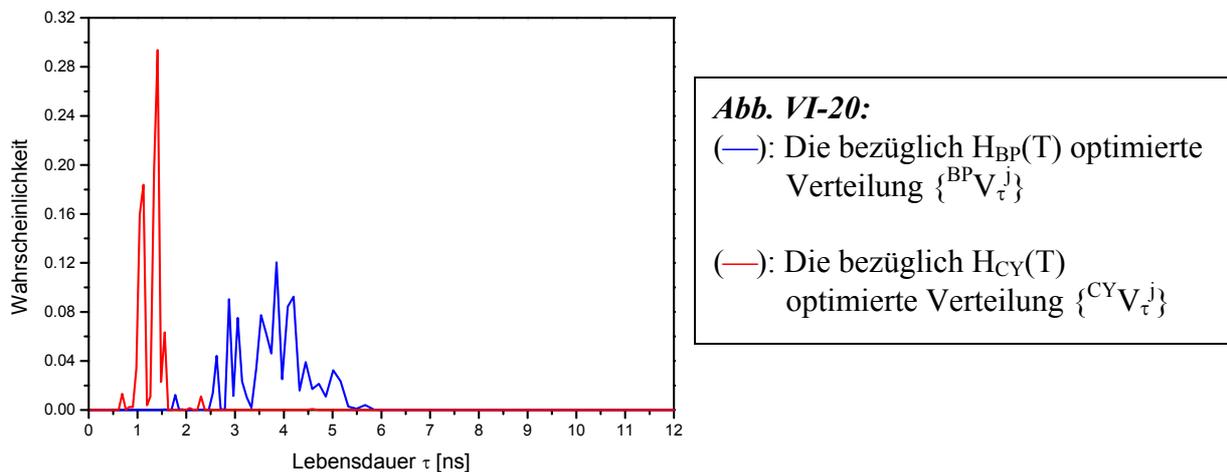
Der Hintergrund lässt sich direkt aus den Eichmessungen ableiten, indem bestimmte Bereiche ohne Farbstofffluoreszenz aus den Bildern B_I , B^T und B_I^R gewählt werden (siehe Abb. VI-19). Aus diesen Bereichen lässt sich eine mittlere Hintergrundintensität I_U pro Pixel, eine Grundwahrscheinlichkeit $\{P_U(t_i)\}$ und eine Verteilung $H_U(F_2)$ ableiten. Je kleiner die Pixelintensität I ist, desto mehr spielt der Untergrund eine Rolle. Das berechnete I_U liegt bei 2 Photonen.



Für jede Pixelintensität lassen sich die Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_j^{\text{BP}}(t_i; \tau_j)\}$ und $\{P_j^{\text{CY}}(t_i; \tau_j)\}$ aus Gl. VI-24 unter Berücksichtigung von $\{P_U(t_i)\}$ nach Gl. VI-25 in die Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_j^{\text{BP}}(t_i; \tau_j)\}'$ und $\{P_j^{\text{CY}}(t_i; \tau_j)\}'$ überführen.

$$\{P_j(t_i; \tau_j)\}' = (I - I_U) \cdot \{P_j(t_i; \tau_j)\} + I_U \cdot \{P_U(t_i)\}$$

Gl. VI-24



Mit Hilfe von $\{P_j^{BP}(t_i; \tau_j)\}$ und $\{P_j^{CY}(t_i; \tau_j)\}$ lassen sich ${}^{BP}H_B(T, I; \tau_j)$ und ${}^{CY}H_B(T, I; \tau_j)$ berechnen, die dann, unter Verwendung von $H_{BP}(I)$ und $H_{CY}(I)$, zu den Verteilungen ${}^{BP}H_B(T; \tau_j)$ und ${}^{CY}H_B(T; \tau_j)$ gemittelt werden können. Es wird eine Startverteilung für $\{{}^{BP}V_\tau^j(\tau_j)\}$ und $\{{}^{CY}V_\tau^j(\tau_j)\}$ festgelegt. $\{{}^{BP}V_\tau^j(\tau_j)\}$ und $\{{}^{CY}V_\tau^j(\tau_j)\}$ werden solange optimiert, bis die aus $\{{}^{BP, CY}V_\tau^j(\tau_j)\}$ und ${}^{BP, CY}H_B(T; \tau_j)$ berechneten Verteilungen ${}^{BP}H_B(T)$ und ${}^{CY}H_B(T)$ den Verteilungen $H_{BP}(T)$ und $H_{CY}(T)$ aus Abb. VI-18 B entsprechen. Die so optimierten Verteilungen $\{{}^{BP}V_\tau^j(\tau_j)\}$ (—) und $\{{}^{CY}V_\tau^j(\tau_j)\}$ (—) sind in Abb. VI-20 aufgetragen. Die beiden Verteilungen $\{{}^{BP}V_\tau^j\}$ und $\{{}^{CY}V_\tau^j\}$ überschneiden sich kaum. Die Mittelwert $\langle \tau_{BP, CY} \rangle$ der Verteilungen betragen $\langle \tau_{BP} \rangle = 3.71 \text{ ns}$ und $\langle \tau_{CY} \rangle = 1.28 \text{ ns}$.

Auch bei der Bestimmung von $\{{}^{BP, CY}V_R^j(p_{Rot}^j)\}$ muss der Untergrund berücksichtigt werden. Für einen Pixel der Intensität I liegt ein Mischung $((I-I_U):I_{BG})$ zwischen Farbstofffluoreszenz und Hintergrundrauschen vor. Aus der Verteilung $H_U(F_2)$ lässt sich ein $U_{p_{Rot}}$ für den Untergrund ableiten. Dann werden für alle p_{Rot}^j der Verteilung $\{{}^{BP, CY}V_R^j(p_{Rot}^j)\}$ ein $\{P^F(I_R, (I-I_U)-I_R; p_{Rot}^j)\}$ nach Gl. VI-6 bestimmt, die dann zu einem $\{{}^{BP, CY}P^F(I_R, (I-I_U)-I_R)\}$ gemittelt werden können. Für $U_{p_{Rot}}$ und einem I_U wird ein $\{P^U(I_R, I_U - I_R; U_{p_{Rot}})\}$ nach Gl. VI-6 bestimmt (siehe Abb. VI-19 (—)). I_R und I_U sind die möglichen Intensitätswerte im „roten“ Kanal für die Farbstofffluoreszenz bzw. des Hintergrundrauschens. Nach Gl. V-12 lässt sich aus $\{{}^{BP, CY}P(I_R, (I-I_U)-I_R)\}$ und $\{P(I_R, I_U; U_{p_{Rot}})\}$ ein $\{{}^{BP, CY}P(I_R; I, I-I_U)\}$ berechnen. $\{{}^{BP, CY}P(I_R; I, I-I_U)\}$ gibt für eine Mischung $((I-I_U):I_U)$ die Wahrscheinlichkeit an einen Intensitätswert I_R im „roten“ Kanal zu finden. Die $\{{}^{BP, CY}P(I_R; I, I-I_U)\}$ werden in ein ${}^{BP, CY}H_B(F_2; I, I-I_U)$ mit einer festen Balkenbreite $\Delta F_2 = 0.02$ überführt. Mit den Verteilungen $H_{BP}(I)$ und $H_{CY}(I)$ lassen sich die Verteilungen ${}^{BP, CY}H_B(F_2; I_U)$ bestimmen, die dann mit $H_{BP}(F_2)$ und $H_{CY}(F_2)$ aus Abb. VI-17 C verglichen werden können.

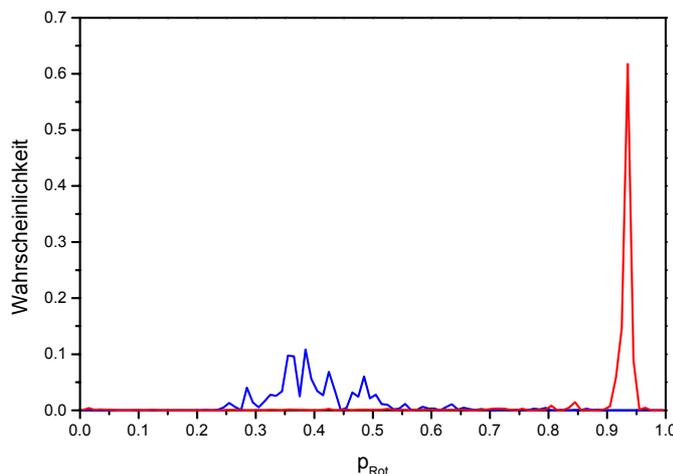


Abb. VI-21:

- (—): Die bezüglich $H_{BP}(F_2)$ optimierte Verteilung $\{{}^{BP}V_R^j(p_{Rot}^j)\}$.
- (—): Die bezüglich $H_{CY}(F_2)$ optimierte Verteilung $\{{}^{CY}V_R^j(p_{Rot}^j)\}$.

Die optimierten Verteilungen $\{^{BP}V_R^j(p_{Rot}^j)\}$ (—) und $\{^{CY}V_R^j(p_{Rot}^j)\}$ (—) sind in Abb. VI-21 aufgetragen. Die Mittelwert $\langle^{BP,CY}p_{Rot}\rangle$ der Verteilungen betragen $\langle^{BP}p_{Rot}\rangle=0.41$ und $\langle^{CY}p_{Rot}\rangle=0.91$.

VI.4 Anpassung der Kolokalisationstheorie

Mit den Verteilungen $\{^{BP,CY}V_\tau^j(\tau_j)\}$ und $\{^{BP,CY}V_R^j(p_{Rot}^j)\}$ lässt sich die in Kapitel IV und V entwickelte SFLIM-Theorie an reale Daten anpassen. Die Annahmen aus Abschnitt VI.2 und VI.4 war, dass jedes Farbstoffmolekül ein eigene Lebensdauer τ_j und ein eigenes p_{Rot}^j besitzt. Zusätzlich wurde angenommen, dass die Gesamtzahl I_{Ges} von Photonen, die ein Farbstoffmolekül emittiert, unabhängig von den Parametern τ_j und p_{Rot}^j ist. Diese Annahmen können an einer Eichmessung getestet werden. Aus einer BodiPy630/650 Eichmessung (siehe Abb. VI-22) wurden 3 Spots herausgegriffen. Jeder Spot steht für ein einzelnes

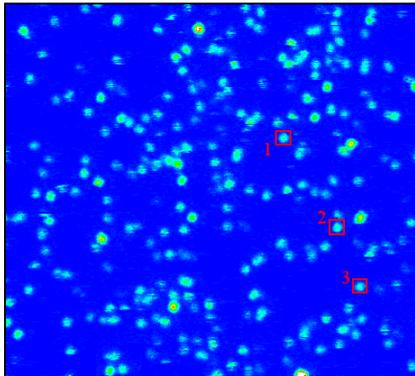
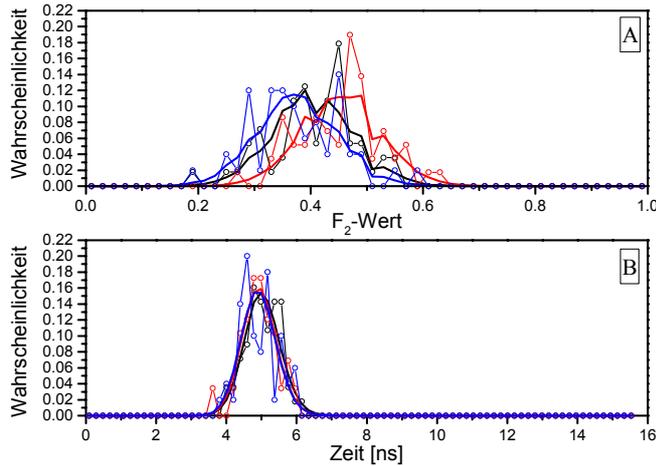


Abb. VI-22:
Eichmessung einer BodiPy630/650 Probe. Die rot markierten Bereiche stehen für 3 einzelne Moleküle.

Farbstoffmolekül. Von den einzelnen Spots wurden die Verteilungen $\{P_{S1,2,3}(t_i)\}$, $H_{S1,2,3}(I)$, $H_{S1,2,3}(T)$ (siehe (—○—), (—○—), (—○—) in Abb. VI-23 B) und $H_{S1,2,3}(F_2)$ (siehe (—○—), (—○—), (—○—) in Abb. VI-23 A) bestimmt.

Mit $\{P_{S1,2,3}(t_i)\}$ und $H_{S1,2,3}(I)$ lassen sich die Verteilungen $^B H_{S1,2,3}(T)$ (siehe (—), (—), (—) in Abb. VI-23 B) berechnen. Aus den Verteilungen $H_{S1,2,3}(F_2)$ wird das p_{Rot}^j der Moleküle bestimmt, $p_{Rot}^j=0.40, 0.45, 0.38$. Aus p_{Rot}^j und $H_{S1,2,3}(I)$ ergeben sich die Verteilungen $^{S1,2,3}H_B(F_2;p_{Rot}^j)$ (siehe (—), (—), (—) in Abb. VI-23 A).

**Abb. VI-23:**

A: (—), (—), (—): $S_{1,2,3}H_B(F_2; p_{Rot}^j)$
 (—○—), (—○—), (—○—): $H_{S_{1,2,3}}(F_2)$

B: (—), (—), (—): ${}^B H_{S_{1,2,3}}(T)$
 (—○—), (—○—), (—○—): $H_{S_{1,2,3}}(T)$

Die relativen Breiten der berechneten Verteilungen weichen kaum von denen der gemessenen Verteilungen ab. Aus Abb. VI-23 lässt sich ableiten, dass die oben aufgestellten Annahmen, dass sich ein Farbstoff durch ein einzelnes p_{Rot}^j und eine einzelne Grundwahrscheinlichkeit $\{P_j(t_i; \tau_j)\}$ beschreiben lässt, richtig sind.

Bei der Anpassung der SFLIM Kollokalisierungstheorie an reale Daten muss zuerst das Hintergrundrauschen berücksichtigt werden. Dabei wird angenommen, dass sich ein kollokalisiertes Molekülpaar aus einem BodiPy630/650 Molekül und einem Cy5.5 Molekül zusammensetzt. Das BodiPy630/650 Molekül wird durch einen Parametersatz (${}^{BP}\tau_j, {}^{BP}p_{Rot}^j$) und das Cy5.5 Molekül durch den Parametersatz (${}^{CY}\tau_j, {}^{CY}p_{Rot}^j$) beschrieben. Für einen Pixel aus dem Spot des kollokalisiertes Molekülpaars setzt sich die Intensität I aus einem Fluoreszenzanteil I_F und eine Hintergrundanteil I_U zusammen. Für jede Mischung $(I_{CY}:I_{BP})_{I_F}$ lässt sich eine gemischte Grundwahrscheinlichkeit $\{P_{CY_BP}(t_i)\}$ (siehe Gl. VI-26), sowie nach Gl. V-12 eine Verteilung $\{{}^{CY_BP}P^F(I_R; I_F, I_{CY})\}$ ableiten.

$$\{P_{CY_BP}(t_i)\} = \frac{I_{BP}}{I} \cdot \{P_j^{BP}(t_i; {}^{BP}\tau_j)\} + \frac{I_{CY}}{I} \cdot \{P_{j'}^{CY}(t_i; {}^{CY}\tau_{j'})\} + \frac{I_U}{I} \cdot \{P_U(t_i)\}$$

Gl. VI-26

Die Verteilung Nachdem $\{{}^{CY_BP}P^F(I_R; I_F, I_{CY})\}$ wird nach Gl. V-12 bestimmt. Nach dem oben beschriebene Verfahren kann für jede Mischung die Verteilungen $\{{}^{CY_BP}P^F(I_R; I_F, I_{CY})\}$ auf ein $\{{}^{BP_CY}P(I_R; I, I_F=I_{CY}+I_{BP})\}$ umgerechnet werden.

Die an das Hintergrundrauschen angepasste Verteilungen $\{P_{CY_BP}(t_i)\}$ bzw. $\{^{BP-CY}P(I_R; I, I_F=I_{CY}+I_{BP})\}$ können in die in Kapitel IV und V entwickelte Theorie eingesetzt werden, mit dem Unterschied, dass nur I_F Photonen in die entsprechenden Kanäle für die Cy5.5 Moleküle bzw. die BodiPy630/650 Moleküle aufgeteilt werden. Im folgenden wird von einem SFLIM-U Algorithmus gesprochen.

Eine weitere Aufgabe besteht darin aus den Verteilungen $\{^{BP,CY}V_{\tau}^{jj'}(^{BP,CY}\tau_{jj'})\}$ und $\{^{BP,CY}V_R^{jj'}(^{BP,CY}p_{Rot}^{jj'})\}$ heraus, die Parametersätze $(^{BP}\tau_j, ^{BP}p_{Rot}^j)$ und $(^{CY}\tau_j, ^{CY}p_{Rot}^j)$ abzuschätzen. Dazu werden aus dem Spot des kolokalisierten Molekülpaars heraus, die Gesamtzahl I_{Ges} , bzw. die Verteilung $H_S(I)$ der detektierten Photonen, die Grundwahrscheinlichkeit $\{P_S(t_i)\}$, die Verteilungen $H_S(T)$ und $H_S(F_2)$ und der mittlere F_2 -Wert p_{Rot} bestimmt. Die Verteilungen $H_S(T)$ und $H_S(F_2)$ zeigen ein vergleichbares Verhalten wie in Abb. VI-23 gezeigt. Das Stichprobenrauschen dieser Verteilungen hängt von der Anzahl von Pixeln N_P ab, die ein Spot umfasst. In der Regel kann von $N_P=441$ Pixeln ausgegangen werden. Im Vergleich zu $H_S(T)$ und $H_S(F_2)$ ist das Stichprobenrauschen von $\{P_S(t_i)\}$ abhängig von I_{Ges} . I_{Ges} liegt normalerweise zwischen 10000-20000. Für die weitere Analyse wird ausschließlich $\{P_S(t_i)\}$ betrachtet.

Aus $\{P_S(t_i)\}$ kann das mittlere Mischungsverhältnis VI_{CY} abgeschätzt werden, das angibt wie viel Prozent der I_{Ges} Photonen vom Cy5.5 Molekül kommen. I_{Ges} steht für die Hintergrund korrigierte Gesamtzahl von Photonen, $I_{Ges}' = I_{Ges} - N_P \cdot I_U$. Analog zu Gl. VI-26 wird für jede Kombination $(^{BP}\tau_j, ^{CY}\tau_j)$ eine Grundwahrscheinlichkeit $\{P_S^{CY-BP}(t_i)\}$ bestimmt.

$$\{P_S^{CY-BP}(t_i)\} = \frac{I_{Ges}'}{I_{Ges}} \cdot (VI_{CY} \cdot \{P_j^{CY}(t_i; \tau_j)\} + (1 - VI_{CY}) \cdot \{P_j^{BP}(t_i; \tau_j)\}) + \frac{N_P \cdot I_U}{I_{Ges}} \cdot \{P_U(t_i)\}$$

Gl. VI-27

Für VI_{CY} werden 100 Werte zwischen 0 und 1 festgelegt, $VI_{CY} = (i-0.5) \cdot 0.02$, $i=1 \dots 100$. In einen Anpassungstest wird $(^{BP}\tau_j, ^{CY}\tau_j)$ solange variiert, bis die Wahrscheinlichkeit $P_T(VI_{CY}; I_{Ges})$ (siehe Gl. VI-28) maximal wird.

$$P_T(VI_{CY}; I_{Ges}) = P_V(VI_{CY}, I_{Ges}) \cdot ^{BP}V_{\tau}^j(\tau_j) \cdot ^{CY}V_{\tau}^{j'}(\tau_j)$$

Gl. VI-28

$P_V(VI_{CY}; I_{Ges})$ wird nach Gl. IV-3 bestimmt. Wenn das optimale VI_{CY} bekannt ist, dann lässt sich nach Gl. VI-29 die beste Kombination $(^{BP}p_{Rot}^j, ^{CY}p_{Rot}^{j'})$ bestimmen.

$$P_{Rot} = \frac{I_{Ges}'}{I_{Ges}} \cdot (VI_{CY} \cdot {}^{CY}P_{Rot}^{j'} + (1 - VI_{CY}) \cdot {}^{BP}P_{Rot}^{j'}) + \frac{N_P \cdot I_{U,U}}{I_{Ges}} \cdot P_{Rot}$$

Gl. VI-29

p_{Rot} ist das Verhältnis der Intensität im „roten“ Kanal ${}^R I_{Ges}$ zur Gesamtintensität I_{Ges} dar, $p_{Rot} = {}^R I_{Ges} / I_{Ges}$. Aus Abb. VI-19 sind $H_U(F_2)$, und dessen Mittelwert ${}^U p_{Rot} = 0.48575$ bekannt. Es wird die Kombination $({}^{BP}p_{Rot}^j, {}^{CY}p_{Rot}^j)$ gewählt für die Gl. VI-29 erfüllt ist, und die Wahrscheinlichkeit $P_{F_2} = {}^{BP}V_R({}^{BP}p_{Rot}^j) \cdot {}^{CY}V_R({}^{CY}p_{Rot}^j)$ maximal wird.

Der Parametersatz $({}^{BP}\tau_j, {}^{BP}p_{Rot}^j, {}^{CY}\tau_j, {}^{CY}p_{Rot}^j)$ mit der größten Wahrscheinlichkeit $P_G = P_T \cdot P_{F_2}$ beschreibt am besten den kolokalisierten Spot. Nachdem die Parameter für die beiden Moleküle festgelegt sind, kann der kolokalisierte Spot mit dem SFLIM-U Algorithmus analysiert werden. Diese Vorgehensweise wird auch V-SFLIM-U Algorithmus bezeichnet.

VI.5 Bestimmung der PSF einer Punktlichtquelle

Eine mit Farbstoffmolekülen belegte Oberfläche kann als Ensemble von Punktlichtquellen aufgefasst werden. Das Licht jeder Punktlichtquelle wird durch das Mikroskop auf ein Beugungsbild abgebildet (siehe Abschnitt II.3, siehe Abb. VI-24). Wenn die Punktabbildungsfunktion PSF des Mikroskops bekannt ist, dann kann nachdem im Abschnitt V.1 beschriebenen Verfahren der SFLIM-Algorithmus symmetrisiert werden.

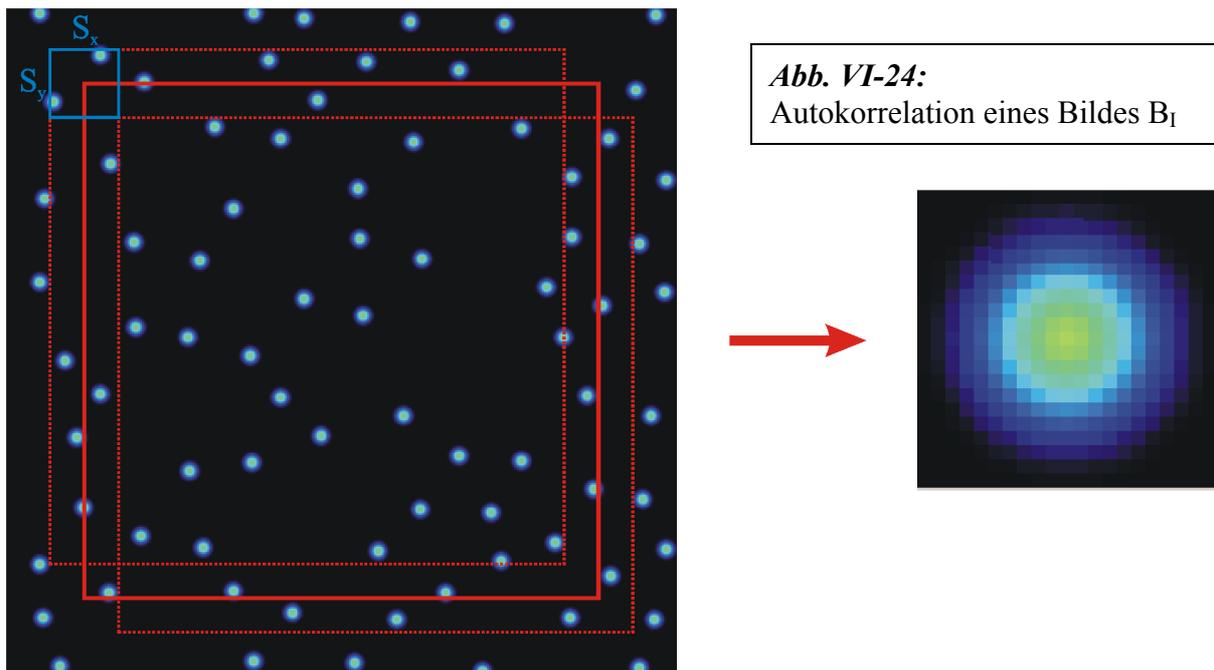


Abb. VI-24:
Autokorrelation eines Bildes B_I

Das Ensemble der Punktlichtquellen eines Fluoreszenzbildes wird mit $\{x_C, y_C\}$ bezeichnet. Dann kann ein Fluoreszenzbild B_I geschrieben werden als.

$$B_I = \sum_{\{x_C, y_C\}} I_{Ges}^{x_C, y_C} \cdot PSF(x_C, y_C) \quad \text{Gl. VI-30}$$

Wobei $I_{Ges}^{x_C, y_C}$ die Gesamtintensität des Spots des Moleküls am Ort (x_C, y_C) ist und $PSF(x_C, y_C)$ eine 2-dimensionale Gaussfunktion darstellt (siehe Gl. IV-11). Um aus einem Bild B_I auf die mittlere $\langle PSF(x_C, y_C) \rangle$ schließen zu können, wird B_I mit sich selbst autokorreliert. Bei der Autokorrelation wird aus B_I einen bestimmten Bereich R_1 aus ((—) markierter Bereich in Abb. VI-24) ausgewählt. Die Pixel von R_1 werden mit den Pixeln aus einem Bereich R_2 ((••) markierter Bereich in Abb. VI-24) gleicher Größe multipliziert. Der Ursprung von R_2 ist bezüglich dem Ursprung von R_1 um ein S_x bzw. S_y verschoben ist. Die Summe des Produkts

von R_1 und R_2 wird in ein Bild AK (rechtes Bild in Abb. VI-24) an der Stelle (S_x, S_y) eingetragen. AK aus Abb. VI-24 hat eine Größe von 21×21 Pixel, was einem Wertebereich von $-10 \dots 10$ für S_x bzw. S_y entspricht. Werden alle Zeilen bzw. Spalten von $AK(S_x, S_y)$ aufsummiert, dann ergeben sich die folgenden Profile Q_x (—) und Q_y (○) (siehe Abb. VI-25). Beide Profile lassen sich durch eine Gaussfunktion (—) annähern.

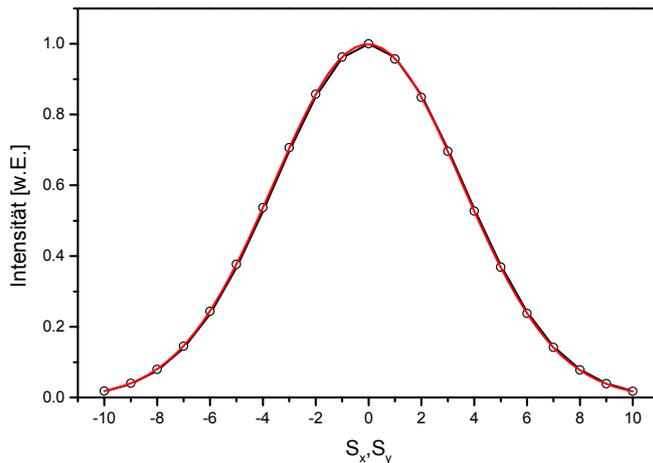


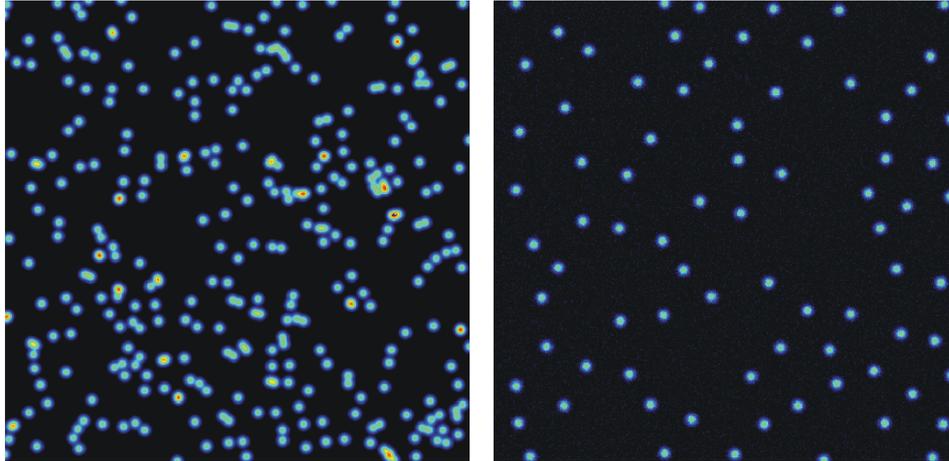
Abb. VI-25:
Die Profile Q_x (—) und Q_y (○) von $AK(S_x, S_y)$ aus Abb. VI-24.
(—): Gaussfit

Der Gaussfit ergibt für beide Richtungen ein $\omega_{AK} = \omega_{AK}^x = \omega_{AK}^y = 7.13$ Pixel. Bei dem B_1 aus Abb. VI-24 handelt es sich um einen simulierten Datensatz, somit ist $\langle \text{PSF}(x_C, y_C) \rangle$ bekannt. Bei $\langle \text{PSF}(x_C, y_C) \rangle$ handelt sich um eine rotationssymmetrischen Gaussfunktion mit einem $\omega = \omega_x = \omega_y = 5$ Pixel. Für ω_{AK} gilt in sehr guter Näherung:

$$\omega_{AK}^{x,y} = \sqrt{2} \cdot \omega_{x,y}$$

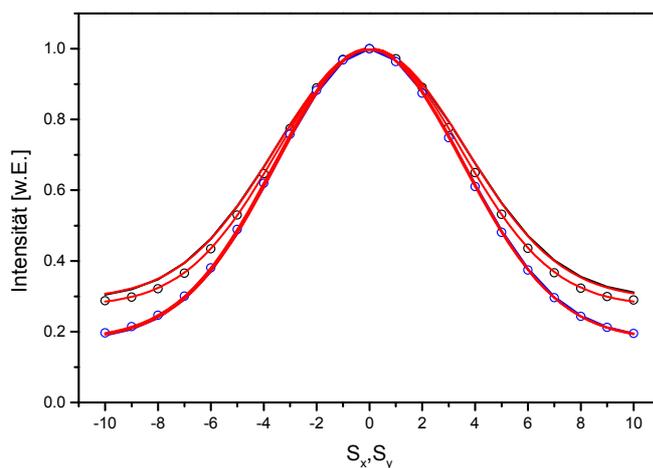
Gl. VI-31

Die in Gl. VI-31 beschriebene Näherung gilt nur, wenn die dem Bild B_1 zugrunde liegende $\text{PSF}(x_C, y_C)$ symmetrisch ist. In B_1 sind die Moleküle so weit voneinander entfernt, dass sich die einzelnen $\text{PSF}(x_C, y_C)$ praktisch nicht überschneiden. Zusätzlich wurde das Poissonrauschen und das Hintergrundrauschen vernachlässigt. Um diese beiden Einflüsse einzeln zu betrachten, wurde zum einen ein Bild B_1 ohne Rauschen, aber mit einer hohen Belegungsdichte der Moleküle generiert (rechtes Bild in Abb. VI-26). Zum anderen wurde das Bild B_1 aus Abb. VI-24 mit Rauschen versehen (linkes Bild in Abb. VI-26).

**Abb. VI-26:**

Linkes Bild: B_I mit hoher Belegungsdichte der Moleküle aber ohne Rauschen
 Rechtes Bild: B_I aus Abb. VI-24 mit Rauschen

Für das rechte B_I in Abb. VI-26 ergibt sich ein $AK(S_x, S_y)$ mit den aufsummierten Querschnitten Q_x (—) und Q_y (○) (siehe Abb. VI-27). Für das linke B_I in Abb. VI-26 ergibt sich ein $AK(S_x, S_y)$ mit der Querschnitten Q_x (—) und Q_y (○). (—) in Abb. VI-27 stellen die Gaussfit's dar.

**Abb. VI-27:**

Die Profile Q_x (—) und Q_y (○) von $AK(S_x, S_y)$ aus dem linken Bild in Abb. VI-26.

Die Profile Q_x (—) und Q_y (○) von $AK(S_x, S_y)$ aus dem rechten Bild in Abb. VI-26.

(—): Gaussfit

Die Querschnitte lassen sich durch eine Gaussfunktion mit einem konstanten Anteil annähern. Der Konstante Anteil ist unterschiedlich stark für die beiden B_I 's aus Abb. VI-26. Umso höher die Belegungsdichte und das Hintergrundrauschen werden, umso größer wird der konstante Anteil in der Autokorrelation $AK(S_x, S_y)$. Zusätzlich unterscheiden sich im Fall der höheren Belegungsdichte die Profile Q_x und Q_y leicht. Die Werte für ω_{AK}^x und ω_{AK}^y liegen

zwischen 6.92 und 7.14 Pixel. Trotz der konstanten Anteile in der Gaussfunktion werden die ermittelten ω_{AK}^x und ω_{AK}^y gut durch Gl. VI-30 beschrieben. Somit ist es möglich mit Hilfe der Autokorrelationsmethode aus einer Eichmessung heraus eine gute Abschätzung für die PSF des Mikroskops anzugeben.

Für die in Abb. VI-22 gezeigten Eichmessung einer BodiPY630/650- Probe ergibt sich ein $\omega_{AK}^x=7.57$ Pixel und ein $\omega_{AK}^y=8.35$ Pixel. Das berechnete $AK(S_x, S_y)$ ist in Abb. VI-28 gezeigt.

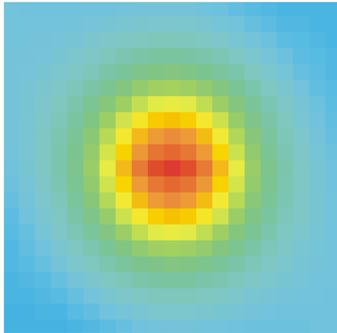
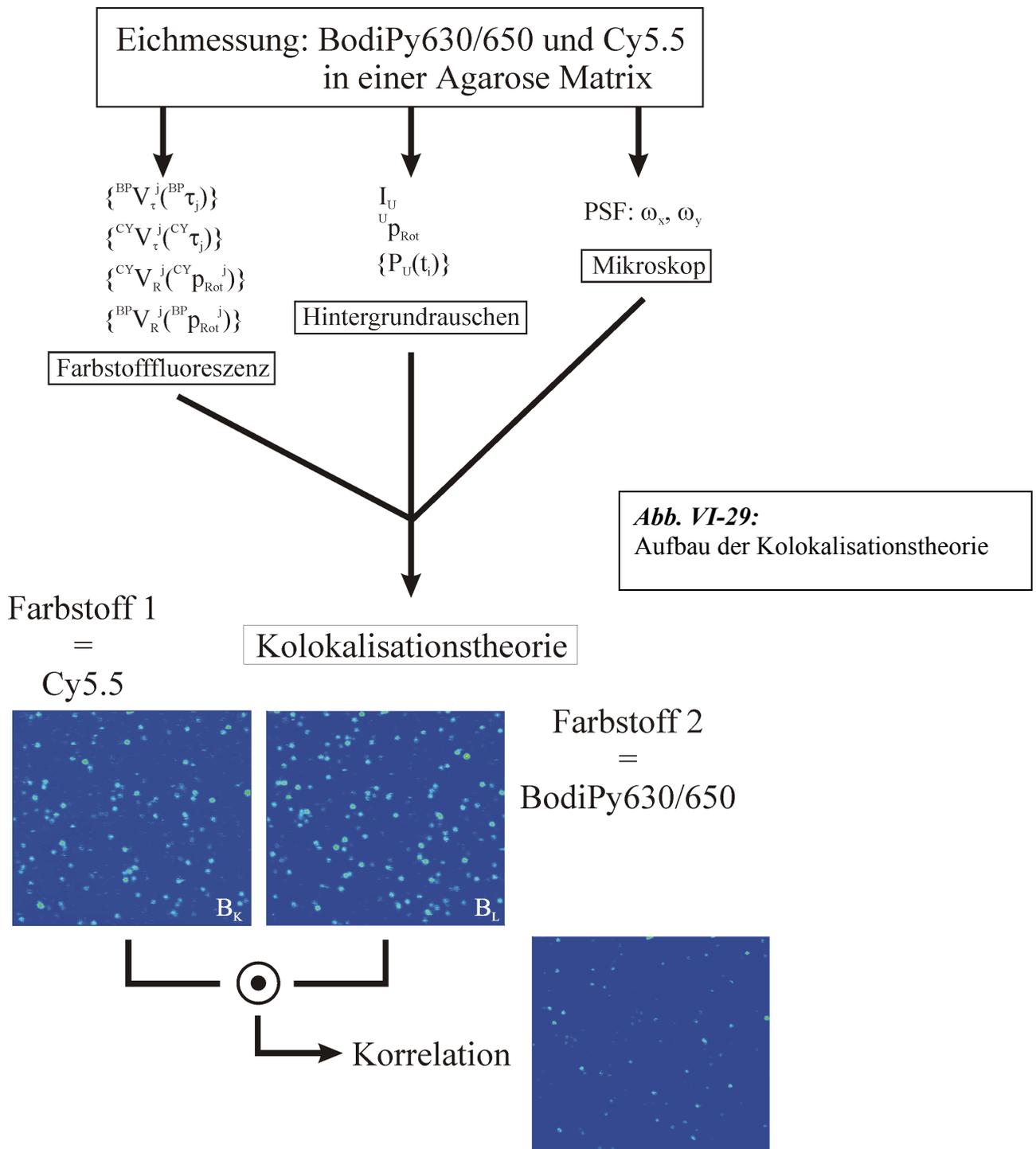


Abb. VI-28:

Das berechnete $AK(S_x, S_y)$ aus in Abb. VI-22 gezeigten Eichmessung einer BodiPY630/650- Probe. $AK(S_x, S_y)$ zeigt eine hohe Symmetrie

$AK(S_x, S_y)$ zeigt eine hohe Symmetrie, was es möglich macht die ω_{AK}^x und ω_{AK}^y nach Gl. VI-31 auf ein $\omega_x=5.35$ Pixel und ein $\omega_y=5.90$ Pixel umzurechnen. Mit diesen beiden Parametern ist eine 2-dimensionale Gaussfunktion definiert, mit deren Hilfe der SFLIM-U Algorithmus bzw. der V-SFLIM-U Algorithmus nach Abschnitt IV.1 symmetrisiert werden kann.

VI.6 Überprüfung des SFLIM-U Algorithmus bzw. der V-SFLIM-U Algorithmus mit einem simulierten Datensatz und realen Daten



In Abb. VI-29 wird ein schematischer Überblick über den Aufbau der in dieser Arbeit entwickelten Kolokalisationstheorie gegeben. Mit Eichmessungen werden die Eigenschaften der Farbstofffluoreszenz, des Hintergrundrauschens und der Abbildungsfunktion des Mikroskops charakterisiert. Diese Informationen werden genutzt um ein Bild aus

kolokalisierten Molekülen zu untersuchen. Ein Kolokalisationsalgorithmus zerlegt das Bild aus kolokalisierten Molekülen in zwei Teilbilder $B_K=B_{CY}$ und $B_L=B_{BP}$. Eines welche die Position der Farbstoffmoleküle des Typs 1, z.B. Cy5.5 und eines welche die Position der Farbstoffmoleküle des Typs 2, z.B. BodiPy630/650 festlegt. Aus diesen Bildern kann über den Schwerpunktsalgorithmus eine geschätzte Position der einzelnen Moleküle angegeben werden, mit deren Hilfe der Abstand zwischen den kolokalisierten Molekülpaaren berechnet werden kann. Neben dem Abstand lässt sich aus dem Algorithmus noch ein geschätzter Fehler $\Delta(\text{Abst}^A)$ siehe Gl. IV-35 angeben. Nur wo eine hohe Korrelation zwischen den Bildern B_K und B_L vorliegt, kann von einem kolokalisiertes Molekülpaar ausgegangen werden. Die Korrelation ist das Produkt zwischen den Bildern B_K und B_L , $\text{Korrelation}=B_K \cdot B_L$.

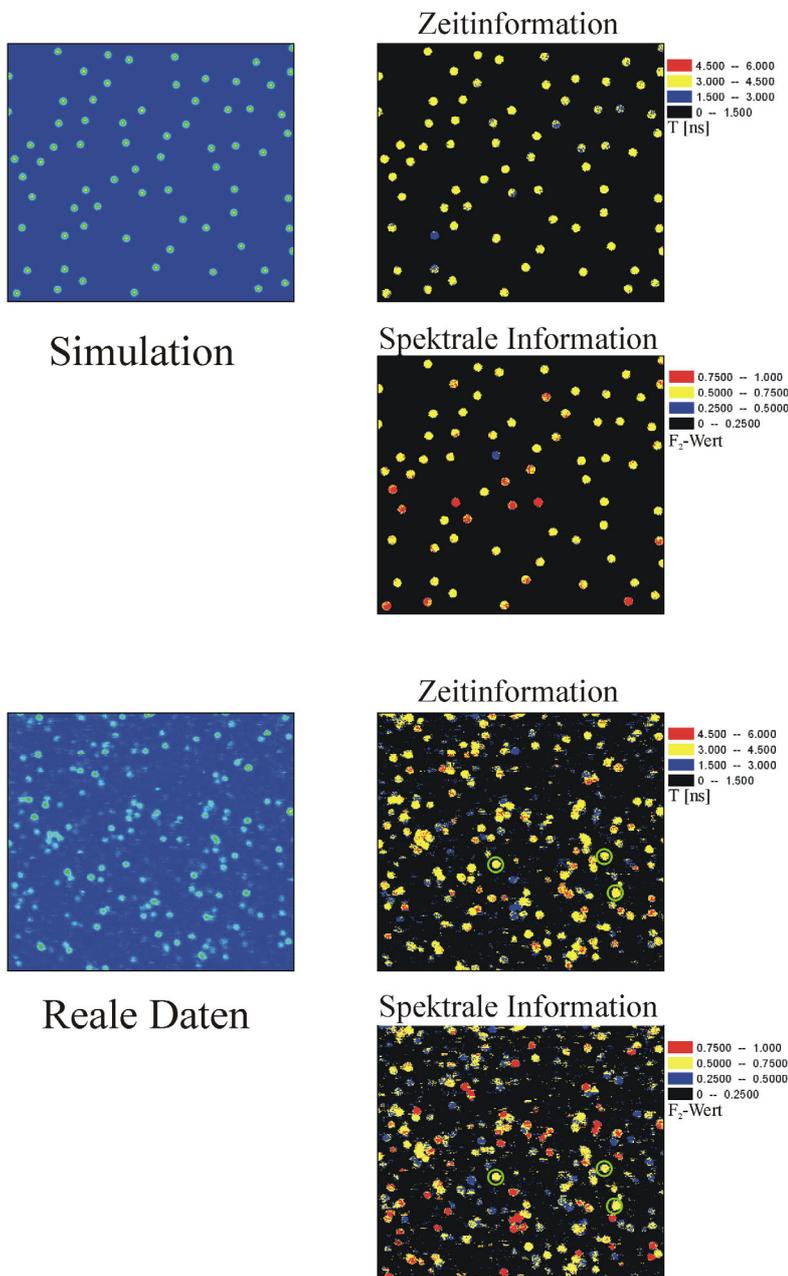


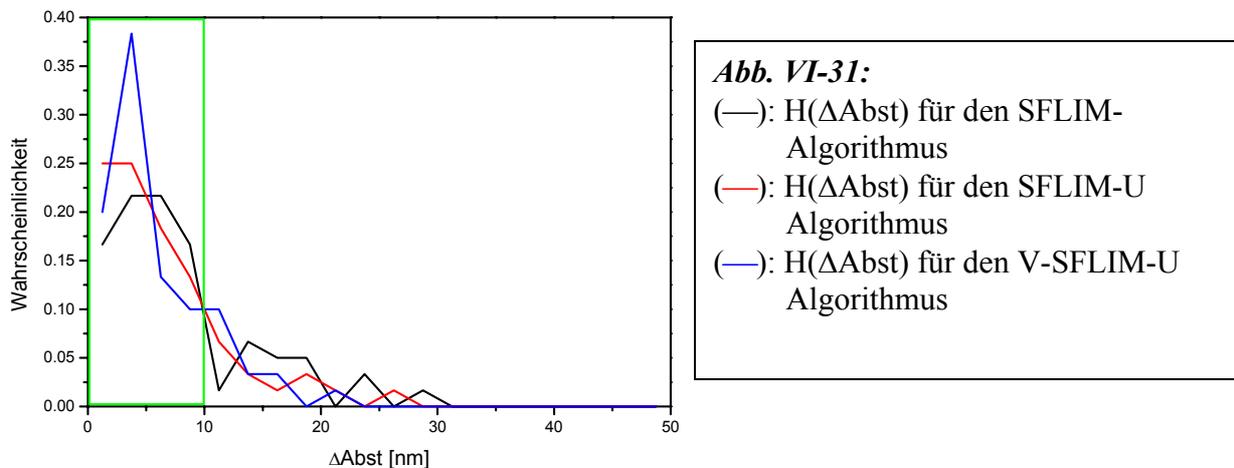
Abb. VI-30:
Zeitinformation und
spektrale
Information für
kolokalisierte
Molekülpaare.

Es muss noch gezeigt werden, dass die in Abschnitt VI-4 definierten SFLIM-U und V-SFLIM-U Algorithmen eine Verbesserung darstellen. Hierzu wurde ein zeitaufgelöster Datensatz nachdem in Kapitel IV beschriebenen Verfahren und ein spektral aufgelöster Datensatz nachdem in Kapitel V beschriebenen Verfahren generiert. Für die Farbstoffe wurde angenommen, dass der Farbstoff 1 sich gleich einem Cy5.5 Molekül verhält, mit den Verteilungen $\{^{CY}V_{\tau}^j(^{CY}\tau_j)\}$ und $\{^{CY}V_R^j(^{CY}p_{Rot}^j)\}$ und, dass der Farbstoff 2 einem BodiPy630/650 Molekül entspricht, mit den Verteilungen $\{^{BP}V_{\tau}^j(^{BP}\tau_j)\}$ und $\{^{BP}V_R^j(^{BP}p_{Rot}^j)\}$. Für jeden kolokalisierten Spot wurde aus den Verteilungen ein Parametersatz $(^{BP}\tau_j, ^{BP}p_{Rot}^j, ^{CY}\tau_j, ^{CY}p_{Rot}^j)$ bestimmt. Zusätzlich wurde ein Hintergrundrauschen mit einem mittleren $I_U=2$, einem $U_{p_{Rot}}=0.48575$ und einem $\{P_U(t_i)\}$ aus Abb. VI-19 in den Datensatz hinein gerechnet. Das effektive Zeitfenster beträgt 80 Zeitkanäle. Für die Farbstoffe wurde vorausgesetzt, dass die Helligkeit gleich ist. Für die Moleküle wurde eine Gesamtintensität von 5000 Photonen angenommen. Das Signal-zu-Rausch Verhältnis S/N pro Spot liegt somit bei S/N=11. Für die PSF des Mikroskops wurde $\omega_x=5.35$ und $\omega_y=5.90$ gesetzt. In Abb. VI-30 ist für die durchgeführte Simulation das Intensitätsbild dargestellt. Neben dem Intensitätsbild sind noch die Bilder für die Zeitinformation und die spektrale Information gegeben. Das Bild für Zeitinformation zeigt welchen Zeitlichen Mittelwert T die Pixel haben. Es wurden nur Pixel mit einer Intensität größer 15 betrachtet. Das Bild für spektrale Information zeigt welchen F₂-Wert die Pixel haben. Für fast alle Spots gilt, dass alle Pixel ein T zwischen 3 und 4.5 ns und F₂ zwischen 0.5 und 0.75 zeigen. Solche Pixel bzw. Spots müssen auch bei realen Daten gefunden werden, wenn die Probe aus kolokalisierten Molekülpaaren besteht.

Auf den Datensatz wurde zuerst der reine SFLIM-Algorithmus angewendet ohne Korrektur des Hintergrundrauschens und der Verteilungen $\{^{BP,CY}V_{\tau}^{jj'}(^{BP,CY}\tau_{jj'})\}$ und $\{^{BP,CY}V_R^{jj'}(^{BP,CY}p_{Rot}^{jj'})\}$. Aus der Abstandsverteilung ergibt sich ein Fehler $\Delta(\Delta Abst)^{SFLIM}$ von 9.31nm. Im zweiten Schritt wurde ein SFLIM-U Algorithmus auf den Datensatz angewendet. Innerhalb SFLIM-U Algorithmus wird zwar das Hintergrundrauschen berücksichtigt, die Verteilungen für $^{BP,CY}\tau_j$ und $^{BP,CY}p_{Rot}^j$ wurden aber vernachlässigt. Für die BodiPy630/650 Moleküle wurde eine mittlere Grundwahrscheinlichkeit $\{P^{BP}(t_i)\}$, die aus $\{^{BP}V_{\tau}^j(\tau_j)\}$ und den entsprechenden $\{P^{BP}_j(t_i, \tau_j)\}$ bestimmt wurde, und ein mittleres $\langle^{BP}p_{Rot}\rangle=0.41$ angenommen. Für die Cy5.5 Moleküle wurde mit einem mittleren $\{P^{CY}(t_i)\}$ und einem $\langle^{CY}p_{Rot}\rangle=0.91$ gearbeitet. Als Fehler wurde ein $\Delta(\Delta Abst)^{SFLIM-U}$ von 7.30nm bestimmt. Im letzten Schritt wurde ein V-SFLIM-U Algorithmus angewendet. Bei dem für jeden untersuchten Spot aus den Verteilungen $\{^{BP,CY}V_{\tau}^{jj'}(^{BP,CY}\tau_{jj'})\}$ und $\{^{BP,CY}V_R^{jj'}(^{BP,CY}p_{Rot}^{jj'})\}$ heraus, ein optimaler

Parametersatz $({}^{\text{BP}}\tau_j, {}^{\text{BP}}p_{\text{Rot}}^j, {}^{\text{CY}}\tau_j, {}^{\text{CY}}p_{\text{Rot}}^j)$ wurde. Der absolute Fehler $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{V-SFLIM-U}}$ reduziert sich auf 5.73nm. Jeder der in diesem Kapitel beschriebenen Anpassungsschritte erhöht die Güte der Kolokalisationstheorie.

In Abb. VI-31 sind die Verteilungen $H(\Delta\text{Abst})$ (siehe Kapitel IV) aufgetragen. Für den SFLIM-Algorithmus ergibt sich die schwarze Kurve, für den SFLIM-U Algorithmus die rote Kurve und für den V-SFLIM-U Algorithmus die blaue Kurve.



Für die Kurven befinden sich 76%, 86% bzw. 94% aller Fehler innerhalb dem grün markierten Bereich zwischen 0 und 10 nm.

Die mittleren geschätzten Fehler $\Delta(\text{Abst}^A)$ der drei Algorithmen liegen bei, $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{SFLIM}}=5.70\text{nm}$, $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{SFLIM-U}}=6.07\text{nm}$ und $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{V-SFLIM-U}}=5.88\text{nm}$. Die absoluten Fehler $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{SFLIM}}$, $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{SFLIM-U}}$ und $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{V-SFLIM-U}}$ werden um eine Faktor $F_A^{\text{SFLIM}}=1.63$ und $F_A^{\text{SFLIM-U}}=1.20$ unterschätzt. F_A ist definiert als $\Delta(\Delta\text{Abst})/\Delta(\text{Abst}^A)$. Der Grund hierfür liegt darin, dass sowohl das Hintergrundrauschen, wie die Tatsache, dass die Farbstoffe einer Verteilung über die Parameter $(\tau_j, p_{\text{Rot}}^j)$ unterliegen, einen Rauschfaktor darstellen, der die Güte des Algorithmus verschlechtert. Im Fall des V-SFLIM-U Algorithmus beträgt $F_A^{\text{V-SFLIM-U}}=0.98$, der geschätzte Fehler und der

Sowohl der SFLIM Algorithmus, wie der SFLIM-U Algorithmus berücksichtigen diese Rauschfaktoren gar nicht oder nur teilweise. Daher kommt es zwangsläufig zu einer Abweichung zwischen $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{SFLIM}}$ und $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{SFLIM-U}}$ und $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{SFLIM}}$ und $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{SFLIM-U}}$. Dass aber auch $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{V-SFLIM-U}}$ und $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{V-SFLIM-U}}$ voneinander

abweichen, lässt den Rückschluss zu, dass der in Abschnitt VI.4 beschriebene Algorithmus zur Bestimmung des bestmöglichen Parametersatzes (${}^{\text{BP}}\tau_j, {}^{\text{BP}}p_{\text{Rot}}^j, {}^{\text{CY}}\tau_j, {}^{\text{CY}}p_{\text{Rot}}^j$) nur teilweise funktioniert. Idealerweise würden $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{V-SFLIM-U}}$ und $\Delta(\Delta\text{Abst})^{\text{V-SFLIM-U}}$ nicht voneinander abweichen ($F_A^{\text{V-SFLIM-U}}=1$). F_A^{SFLIM} , $F_A^{\text{SFLIM-U}}$ und $F_A^{\text{V-SFLIM-U}}$ können durch eine Simulation abgeschätzt werden. Da alle für die Simulation notwendigen Parameter aus Eichmessungen bekannt sind, können F_A^{SFLIM} , $F_A^{\text{SFLIM-U}}$ und $F_A^{\text{V-SFLIM-U}}$ sehr genau bestimmt werden. Für $F_A^{\text{SFLIM-U}}$ und $F_A^{\text{V-SFLIM-U}}$ gilt, dass die Faktoren umso größer werden, je mehr das Signal-zu-Rausch Verhältnis S/N zunimmt, bzw. die Helligkeit der Farbstoff dem Idealfall entspricht. $F_A^{\text{SFLIM-U}}$ und $F_A^{\text{V-SFLIM-U}}$ laufen asymptotisch gegen eine Grenzwert. Für $F_A^{\text{SFLIM-U}}$ liegt der Grenzwert bei 1.59. In der Regel liegt aber $F_A^{\text{SFLIM-U}}$ ziemlich nahe bei 1.

Je mehr Information in den Kolokalisationsalgorithmus eingebracht wird, je größer wird die Güte des Algorithmus. Mit zunehmender Güte steigt aber auch der erforderliche Rechenaufwand an. Den besten Kompromiss zwischen Rechenaufwand und Güte stellt der SFLIM-U Algorithmus dar. Der Rechenaufwendigste Schritt innerhalb einer SFLIM-Kolokalisationstheorie ist die Berechnung der in Abschnitt V.3 definierten Schablone $\text{Dist}_{F_2}(I)$ für die möglichen Pixelintensitäten I . Innerhalb des SFLIM-U Algorithmus kann für $I=0$ bis hin zu einem festen $I=I_{\text{Max}}$ eine Schar $\{\text{Dist}_{F_2}(I)\}$ berechnet werden, die für eine Vielzahl von Bildern verwendet werden kann. Innerhalb des V-SFLIM-U Algorithmus muss für jeden kolokalisierten Spot, den Pixelintensitäten I entsprechend, eine eigene Schar $\{\text{Dist}_{F_2}(I)\}$ bestimmt werden. Wenn eine größere Anzahl N_K von kolokalisierten Spots untersucht werden soll, dann ist die mittlere Rechenzeit für den V-SFLIM-U um N_K -mal länger, als für den SFLIM-U Algorithmus. Für ein Bild mit 50-60 kolokalisierten Spots kann die Rechenzeit mehrere Stunden betragen.

BodiPy630/650

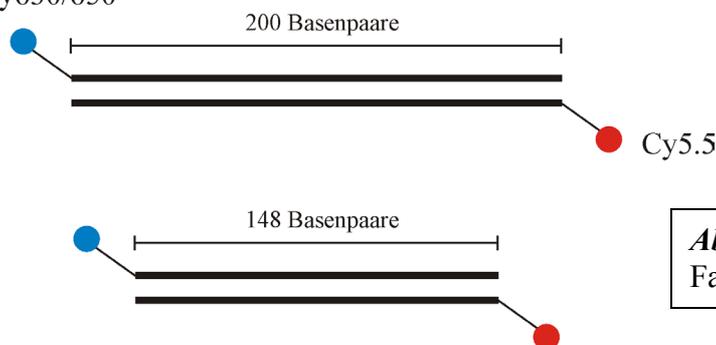


Abb. VI-32:
Farbstoff markierte DNS-Proben

Im folgenden wird der SFLIM-U Algorithmus auf einen realen Datensatz angewendet. Die untersuchte Probe besteht aus einer doppelsträngigen DNS angewendet. Die komplementären

Stränge der DNS sind an ihrem 5'-Ende jeweils mit einem Cy5.5 und einem BodiPy630/650 Molekül markiert wurden. Die Länge der DNS beträgt 200 Basenpaare bzw. 148 Basenpaare (siehe Abb. VI-32).

Die Farbstoff markierten DNS Moleküle werden in eine Agarose Matrix eingebettet. Von jeder Probe werden mehrere Bilder aufgenommen. Für die 148 Basenpaare lange DNS Probe ist ein Intensitätsbild in Abb. VI-30 gezeigt. Analog zur Simulation sind wieder die Zeitinformation und die spektrale Information gezeigt. Relativ häufig (grün markierte Bereiche in Abb. VI-30) zeigen die Bilder Spots, für die alle Pixel ein T zwischen 3 und 4.5 ns und F2 zwischen 0.5 und 0.75 zeigen. Solche Spots sind wie in der Simulation gezeigt kolokalisiert. Zusätzlich fällt auf, dass sowohl die PSF der einzelnen Moleküle, wie die Intensität der Spots mit der durchgeführten Simulation ähnlich sind. Die Datenanalyse der 148 Basenpaare lange DNS Probe, kann also somit, mit der Simulation verglichen werden. Über die oben beschriebene Korrelationsmatrix $Korrelation = B_K \cdot B_L$ werden die Spots herausgegriffen, bei denen mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Cy5.5 und ein BodiPy630/650 Molekül zur Fluoreszenz beitragen, also ein kolokalisiertes Molekülpaar vorliegt. Innerhalb einer Agarose Matrix haben die Cy5.5 und ein BodiPy630/650 Farbstoffe in der Regel eine vergleichbare Helligkeit. Zusätzlich ist die Wahrscheinlichkeit das ein Cy5.5 Molekül in einen nichtfluoreszierenden Cis-Zustand übergeht in Agarose stark unterdrückt. Die Fragestellung besteht nun darin, ob es möglich ist, die beiden Proben signifikant zu unterscheiden. Dazu wurden für die verschiedenen DNS-Proben 58 bzw. 69 kolokalisierte Spots untersucht. Für jeden kolokalisierte Spots wurde der Abstand zwischen dem Cy5.5 Molekül und dem BodiPy630/650 berechnet. Aus den Abständen wurde ein Abstandshistogramme $H_{200}(\text{Abstand})$ und $H_{148}(\text{Abstand})$ erstellt. Die Balkenbreite der Histogramme beträgt 10 nm.

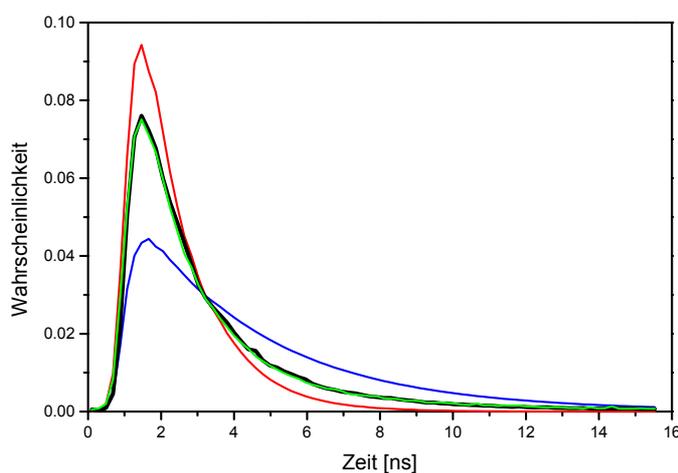


Abb. VI-33:

- (—): Grundwahrscheinlichkeit $\{P^{CY}(t_i)\}$
- (—): Grundwahrscheinlichkeit $\{P^{BP}(t_i)\}$
- (—): Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ aus dem zeitaufgelösten Bild einer Farbstoff markierten 148 Basenpaare lange DNS Probe
- (—): gemischte Grundwahrscheinlichkeit $\{P_G(t_i)\}$, $VI_{CY}=0.665$

Die Kolokalisationstheorie beruht auf der Annahmen, dass sich die Farbstoffe unabhängig verhalten. Dies kann überprüft werden, wenn aus den zeitaufgelösten Bildern der DNS-Proben heraus eine Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ bestimmt wird. Wenn die Fluoreszenz der Farbstoffe unabhängig ist, sollte $\{P(t_i)\}$ beschrieben werden durch eine Mischung mit einem Anteil VI_{CY} für die mittlere Grundwahrscheinlichkeit $\{P^{CY}(t_i)\}$ der Cy5.5 Moleküle und einem Anteil $(1-VI_{CY})$ der mittleren Grundwahrscheinlichkeit $\{P^{BP}(t_i)\}$ der BodiPy630/650 Moleküle. In Abb. VI-33 ist $\{P(t_i)\}$ (—) für eine Messung einer Farbstoff markierten, 148 Basenpaare langen, DNS Probe aufgetragen. Aus $\{P^{CY}(t_i)\}$ (—) und $\{P^{BP}(t_i)\}$ (—) wurde mit einem Mischungsverhältnis $VI_{CY}=0.665$ ein gemischte Grundwahrscheinlichkeit $\{P_G(t_i)\}$ (—) berechnet. Zusätzlich wurde der gemischte Grundwahrscheinlichkeit, dem Signal-zu-Rausch Verhältnis des Bildes entsprechend, noch ein gewisser Anteil Hintergrundrauschen hinzugefügt.

$\{P(t_i)\}$ und $\{P_G(t_i)\}$ liegen praktisch deckungsgleich übereinander. Für 200 Basenpaare lange DNS führt eine analoge Betrachtung zum gleichen Ergebnis. Die Fluoreszenz der untersuchten Proben stammt somit von unabhängigen Molekülen, somit sind Voraussetzungen für die Kolokalisationstheorie erfüllt.

Neben der Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ kann aus der Messung einer Farbstoff markierten 148 Basenpaare lange DNS Probe auch die Verteilung $H(I)$ und $H(F_2)$ (siehe Abb. VI-34 (—)) bestimmt werden. Mit den Verteilungen $\{^{BP,CY}V_R^{j,j'}(^{BP,CY}p_{Rot}^{j,j'})\}$ und $H(I)$ können die Verteilungen $H_{CY}(F_2)$ (siehe Abb. VI-34 (—)) und $H_{BP}(F_2)$ (siehe Abb. VI-34 (—)) berechnet werden. Für die Verteilungen gezeigten $H_{CY}(F_2)$ und $H_{BP}(F_2)$ wurden ebenfalls das Hintergrundrauschen mit berücksichtigt.

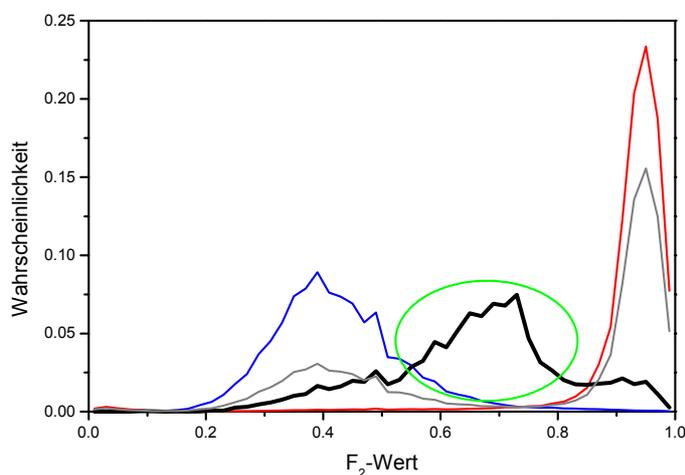


Abb. VI-33:

(—): $H_{CY}(F_2)$

(—): $H_{BP}(F_2)$

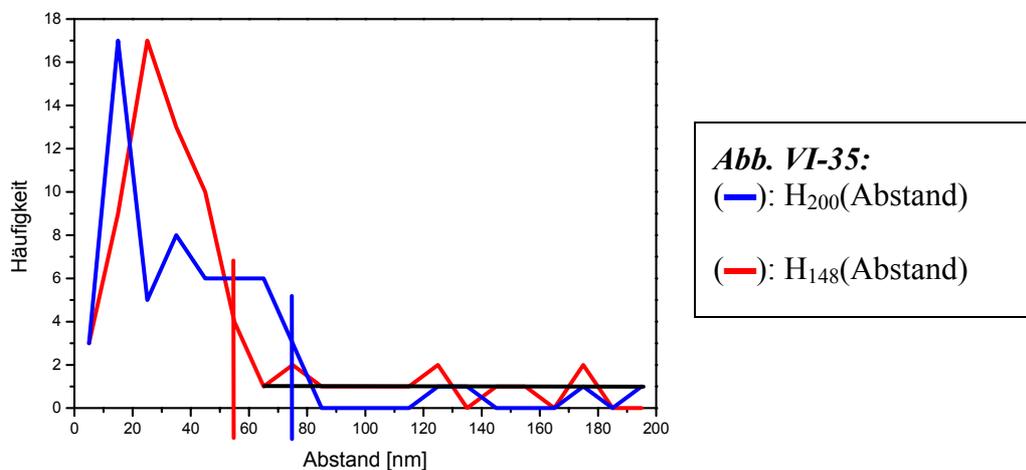
(—): $H(F_2)$

aus dem zeitaufgelösten Bild
einer Farbstoff markierten, 148
Basenpaare lange DNS Probe

(—): gemischte
 F_2 -Verteilung $H_G(F_2)$,
 $VI_{CY}=0.665$

Würde die Probe keine kolokalisierten Moleküle beinhalten, dann würde $H(F_2)$ den grau markierten Verlauf $H_G(F_2)$ zeigen. $H_G(F_2)$ lässt sich schreiben als $VI_{CY} \cdot H_{CY}(F_2) + (1 - VI_{CY}) \cdot H_{BP}(F_2)$, $VI_{CY}=0.665$. Im Vergleich zu $H_G(F_2)$ zeigt $H(F_2)$ jedoch eine deutliche Häufung für F_2 -Werte zwischen 0.5 und 0.8 (grün markierter Bereich in Abb. VI-34). Dies lässt den Rückschluss zu, dass der größte Teil der Fluoreszenz von kolokalisierten Molekülpaaren kommt.

Die ermittelten Abstandshistogramme $H_{200}(\text{Abstand})$ (—) und $H_{148}(\text{Abstand})$ (—) sind in Abb. VI-35. gezeigt. Die ermittelten Abstände zeigen eine relativ breite Verteilung. Abstände deren Häufigkeit statistisch um 1 (schwarze Linie in Abb. VI-35) herum verteilt sind werden für die weitere Betrachtung nicht mit berücksichtigt. Erst ab einem gewissen Abstand L_{DNS} zeigt die Häufigkeit $H_{200}(\text{Abstand})$ sowie $H_{148}(\text{Abstand})$ einen signifikanten Anstieg. Dieser Abstand charakterisiert die Länge der DNS. Aus $H_{148}(\text{Abstand})$ ergibt sich ein $L_{DNS}^{148}=55\text{nm}$ (siehe rote senkrechte Linie in Abb. VI-35) und aus $H_{200}(\text{Abstand})$ ergibt sich ein $L_{DNS}^{200}=75\text{nm}$ (siehe blaue senkrechte Linie in Abb. VI-35). Unter der Voraussetzung, dass jedes Basenpaar eine Länge von 3.4\AA hat, sollte die 200 Basenpaare lange DNS eine Länge von 68nm haben, und die 148 Basenpaare lange DNS eine Länge von 50nm . Die aus der Kolokalisationstheorie



heraus bestimmten Längen L_{DNS}^{148} und L_{DNS}^{200} stimmen sehr gut mit den theoretischen Werten überein.

Der mittlere geschätzte Fehler für die berechneten Abstände beträgt bei der Messung der 148 Basenpaare langen DNS 7.23nm und bei der Messung der 200 Basenpaare langen DNS 13.43nm . Die Differenz in den Längen L_{DNS}^{148} und L_{DNS}^{200} ist somit signifikant, da im Histogramm $H_{148}(\text{Abstand})$ 56 der 69 untersuchten Spot's einen Abstand kleiner gleich 55 nm

zeigen. Im Histogramm $H_{148}(\text{Abstand})$ zeigen 54 der 58 Spot's einen Abstand kleiner gleich 75nm.

Der Grund warum auch Abstände größer als L_{DNS}^{148} und L_{DNS}^{200} ermittelt werden, liegt an der Tatsache, dass einzelne DNS Moleküle aneinander haften können. Dieser Effekt kann durch

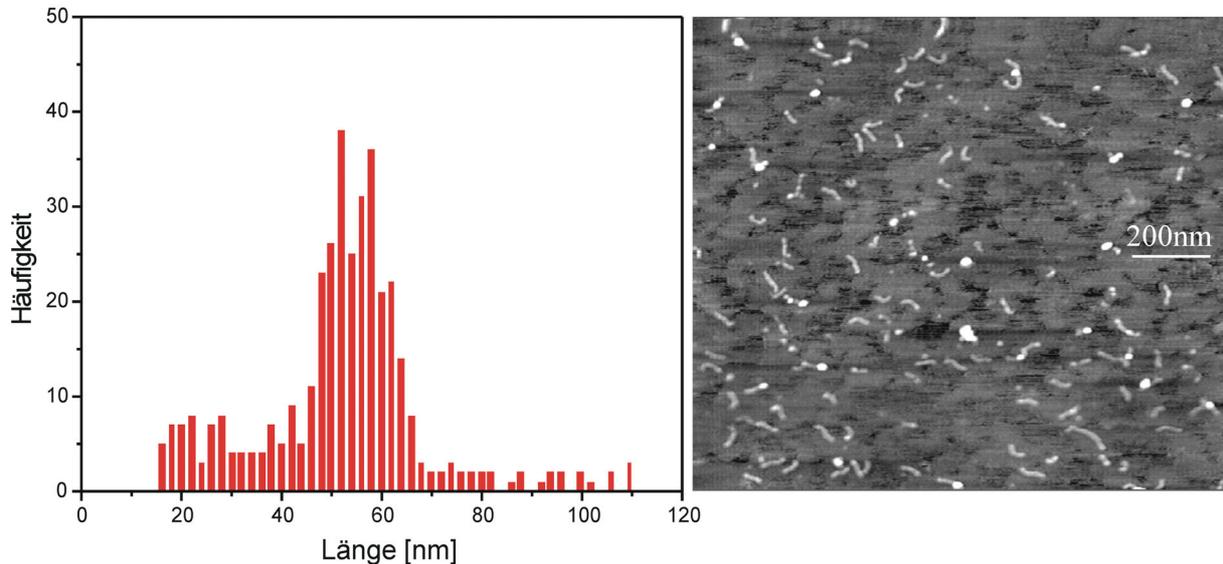


Abb. VI-36:

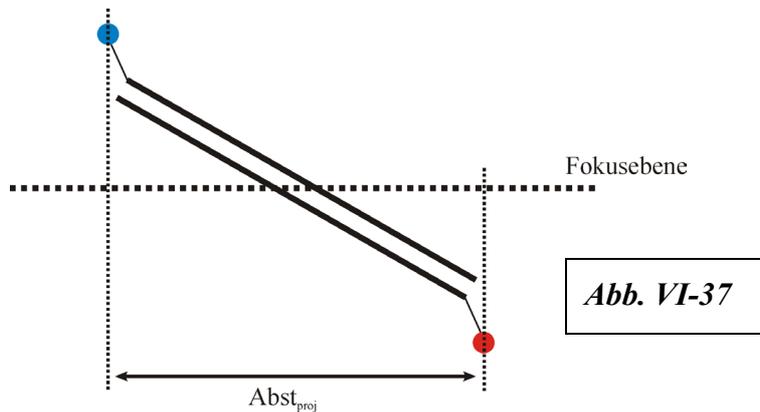
Rechts: AFM Messung einer 200 Basenpaare langen DNS auf eine Glitteroberfläche

Links: Histogramm der Längen zwischen den Enden der DNS.

eine AFM (*AFM: Atomic Force Microscopy*) Messung einer mit 200 Basenpaare langen DNS Molekülen belegten Glitteroberfläche bestätigt werden (siehe Abb. VI-36). Aus dem AFM Bild lässt sich eine Länge L_{E-E} zwischen den Enden der DNS bestimmen. Das Histogramm der berechneten L_{E-E} ist in Abb. VI-36 gezeigt. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit lagern sich zwei DNS Moleküle aneinander und zeigen ein L_{E-E} größer 68nm.

Ebenso ist möglich, dass sich eine einzelne DNS Moleküle zusammen falten, was ein L_{E-E} keiner als 68nm ergibt. Die Ursache warum sich die DNS so stark faltet ist noch nicht geklärt. Eine doppelsträngige DNS hat eine Persistenzlänge L_P von 50nm. L_P gibt die mittlere Länge an, über welche die DNS eine gestreckte Form annimmt. Bei einem $L_P=50\text{nm}$ sollte es also sehr unwahrscheinlich sein, dass sich die DNS vollständig faltet. Was die Vermutung zu lässt, dass die DNS partiell aufschmelzen muss, und über einen großen Bereich einzelsträngig vorliegt. Für eine einzelsträngige DNS gilt: $L_P=5\text{nm}$. Bezüglich dieser Fragestellung müssen noch weiter Messungen in späteren Arbeiten durchgeführt werden.

Bei der verwendeten Agarosematrix kommt ein weiterer Effekt zu trage. So ist nicht immer gewährleistet, dass die DNS Moleküle koplanar zur Fokusebene der Mikroskopobjektivs liegen. In der beschriebenen Kolo-kalisationstheorie wird aber nur der auf die Fokusebene projizierte Abstand $\text{Abst}_{\text{proj}}$ der Moleküle gemessen (siehe Abb. VI-37). $\text{Abst}_{\text{proj}}$ ist immer kleiner aus der tatsächliche Abstand L_{E-E} der DNS.



Die in Abb. VI-35 gezeigten Verteilungen $H_{148}(\text{Abstand})$ und $H_{200}(\text{Abstand})$ sind schlüssig erklärbar. Es wurde gezeigt, dass die durchgeführte Simulation gut die Messungen der Farbstoffmarkierten 148Basenpaaren langen DNS beschreiben. Der aus der Simulation geschätzte Fehler $\Delta(\text{Abst}^A)^{\text{SFLIM-U}}$ beträgt 6.07nm, der aus den realen Daten geschätzte Fehler liegt bei 7.23nm. Mit dem ermittelten $F_A^{\text{SFLIM-U}}=1.20$ kann auf den absoluten Fehler der realen Daten zurückgerechnet werden. Der absolute Fehler in der Bestimmung Abstände innerhalb der Messung der Farbstoffmarkierten 148Basenpaaren langen DNS liegt bei 8.68 nm. Im Vergleich mit der durchgeführten Simulation, kann die Behauptung unterstützt werden, dass es unter gleichen experimentellen Bedingungen möglich ist mit Hilfe des V-SFLIM-U Algorithmus Abstände mit einer Genauigkeit von 6nm zu bestimmen. Mit der in Abschnitt V.1 vorgestellten Symmetrisierungsmethode, ist die Bestimmungsgenauigkeit nochmals zu steigern. Mit Hilfe der entwickelte Kolo-kalisationstheorie können also Abstände signifikant mit einer Genauigkeit bestimmt werden, die deutlich kleiner als 10nm ist.

Weitere gehende Betrachtungen werden in den Arbeiten von Herr Andreas Bibricher und Herr Thomas Heinlein folgen, bei denen ich mich für ihre Unterstützung im experimentellen Teil dieser Arbeit bedanken möchte.

VII. Zusammenfassung und Ausblick

VII.1. Zusammenfassung

In den letzten Jahren zeigt sich ein wachsendes Interesse an der Auflösung und dem Verständnis verschiedene Strukturen im Zellkern. Als Beispiele können die Replikationszentren, die neue DNA synthetisieren bzw. die Transkriptionszentren genannt werden. Die meisten Prozesse in „Bio-Molekularen Maschinen“ laufen auf Einzelmolekülniveau ab. Es bedarf daher mikroskopischer Verfahren, die es erlauben Abstände im Bereich < 50 nm zwischen einzelnen Molekülen mit hoher Präzision selbst in lebenden Zellen zu bestimmen. Das Gesamtziel stellt die Erarbeitung eines Koordinatensystems mit Nanometer-Präzision zur Aufklärung der dynamischen 3-dimensionalen (3D) Architektur lebender Zellen auf Einzelmolekülniveau dar. Dieses Cellular Positioning System (CPS) ist dem Globalen Positioniersystem (GPS) analog. Während letzteres auf Satelliten-Koordinatenstützpunkte im Weltraum basiert, muss auch hier ein externes, festes Koordinatennetz entwickelt werden, das Referenzstützpunkte zur Verfügung stellt. Mit Hilfe der in Heidelberg entwickelten Methode zur Identifizierung einzelner Moleküle auf Oberflächen und in lebenden Zellen, der „Spectrally Resolved Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (SFLIM)“ sollen Abstände zwischen einzelnen Molekülen im Bereich von 10-200 nm aufgrund der unterschiedlichen Emissionsmaxima und des Fluoreszenzabklingverhalten der eingesetzten Farbstoffe durch eine effektive Fluoreszenzzentrenmessung mit einem minimalen Fehler bestimmt werden. Damit werden Abstandsmessungen in der „Auflösungslücke“ von 10-200 nm, die durch die klassische Auflösungsgrenze der konfokalen Mikroskope einerseits und der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Methode vorgegeben ist, selbst auf Einzelmolekülebene möglich.

Der SFLIM-Aufbau besteht zum einen aus einer gepulsten Laserdiode, als Anregungslichtquelle, die mit einer Repetitionsrate von 40-64MHz arbeitet. Zum anderen wird im Detektionsarm das Fluoreszenzlicht über einen Strahlteiler in zwei Spektralbereiche zerlegt und mit zwei unabhängigen Detektoren registriert. Ein SFLIM-Datensatz besteht aus einem Fluoreszenzbild, einer Zeitinformation und einer spektralen Information. Auf die Information kann nur an diskreten Orten, Pixeln, zugegriffen werden. Der Abstand der Pixel beträgt sowohl in x- wie in y- Richtung des Fluoreszenzbildes 50nm. Aufgrund des limitierten Auflösungsvermögens des Mikroskops wird die Fluoreszenz der Farbstoffe auf ein

Beugungsbild, auch Spot genannt, abgebildet. Einem Spot liegt die Abbildungsfunktion (PSF) des Mikroskops zu Grunde. Die Information jedes Pixels ist gegeben durch eine Anzahl von detektierten Photonen I . Für jedes Photon ist eine Mikrozeit t_{Mikro} bekannt, die angibt wie viel Zeit zwischen der Anregung des Farbstoffmoleküls und der Detektion des emittierten Photons verstrichen ist. Für die Analyse des Fluoreszenzbildes werden die Zeiten t_{Mikro} in diskrete Zeitabschnitte t_i aufgeteilt. Den I Photonen eines Pixels kann somit eine Abklingkurve $\{d(t_i)\}$ zugeordnet werden. $\{d(t_i)\}$ charakterisiert die Zeitinformation. Zusätzlich ist die Anzahl der Photonen I_R bekannt, die im roten Kanal, Detektor 2, detektiert wurden. I_R bzw. das Verhältnis $F_2=I_R/I$ charakterisiert die spektrale Information. Die Information eines Pixels kann somit durch den Parametersatz $(I, F_2, \{d(t_i)\})$ beschrieben werden. Um aus einem SFLIM-Datensatz heraus Abstände bzw. Strukturen in nm Bereich auflösen zu können, bedarf es einer Kolokalisationstheorie. Einer Kolokalisationstheorie beruht auf der Annahme, dass sich die Intensität I eines Pixels als eine Mischung $(I_1:I_2)_I$ schreiben lässt. I_1 steht für die Anzahl von Photonen, die vom Farbstoff 1 emittiert wurden und I_2 steht für die Anzahl von Photonen, die von einem Farbstoff 2 emittiert wurden. In dieser Arbeit entspricht der Farbstoff 1 einem Cy5.5 Molekül und der Farbstoff 2 einem BodoPy630/650 Molekül. Für eine Mischung $(I_1:I_2)_I$ wird angenommen, dass sich die gemessene Abklingkurve $\{d(t_i)\}$ durch eine Mischung $\{P_{12}(t_i)\}$ der Grundwahrscheinlichkeiten $\{P_1(t_i)\}$ und $\{P_2(t_i)\}$ schreiben lässt, $\{P_{12}(t_i)\}=I_1 \cdot \{P_1(t_i)\} + I_2 \cdot \{P_2(t_i)\}$. Für jede mögliche Mischung $(I_1:I_2)_I$, $I_1=0 \dots I$, kann ein $\{P_{12}(t_i)\}$ berechnet werden, dass mit $\{d(t_i)\}$ verglichen werden kann. Dazu wird eine Likelihood-Funktion $P_V(I_1/I; I)$ zwischen $\{d(t_i)\}$ und $\{P_{12}(t_i)\}$ berechnet.

Die spektrale Information eines Farbstoffmoleküls ist durch dessen Emissionsspektrum gegeben. Da mit einer SFLIM Anlage das Spektrum eines Farbstoffs nicht aufgelöst werden kann reduziert sich die spektrale Information auf einen Parameter p_{Rot} , der angibt mit welcher Wahrscheinlichkeit ein emittiertes Photon am „roten“ Detektor registriert wird. Sind die einzelnen p_{Rot}^1 bzw. p_{Rot}^2 durch Eichmessungen bekannt, dann kann für jede mögliche Mischung $(I_1:I_2)_I$ eines kolokalisierten Pixels eine Wahrscheinlichkeit $P(I_R; I, I_1)$ berechnet werden. $P(I_R; I, I_1)$ gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein I_R im roten Kanal gemessen wird.

Da die spektrale Information eines Pixels unabhängig von der Zeitinformation ist, kann aus $\{P(I_R; I, I_1)\}$ und $\{P_V(I_1/I; I)\}$ eine Verteilung $\{P_G(I_1; I)\}$ berechnet werden, $\{P_G(I_1; I)\} = \{P(I_R; I, I_1)\} \cdot \{P_V(I_1/I; I)\}$, die sowohl die Zeitinformation wie die spektrale

Information beschreibt. Aus dieser kombinierten Verteilung $\{P_G(I_1;I)\}$ heraus kann zum einen der höchstwahrscheinlichste Wert I_1^{Best} für I_1 angegeben, zum anderen ist es möglich, den Fehler $\Delta(I_1^{\text{Best}})$ für die Bestimmung von I_1^{Best} abzuschätzen. Ein solcher Algorithmus wird als SFLIM Kolokalisationstheorie bezeichnet. Mit der SFLIM Kolokalisationstheorie wird ein kotlokalisierter Spot in zwei Teilspots zerlegt, die jeweils mit einem der beiden Farbstoffe korreliert sind. Aus den beiden Teilspots kann über einen Schwerpunktsalgorithmus die Position der Moleküle abgeschätzt werden, und aus den Molekülpositionen kann der Abstand der Moleküle abgeschätzt werden. Über den Fehler $\Delta(I_1^{\text{Best}})$ kann sowohl der Fehler der Positionsbestimmung, wie der Fehler der Abstandsbestimmung angegeben werden.

Für eine SFLIM Kolokalisationstheorie ist es entscheidend, dass die geschätzten Fehler der Positionsbestimmung bzw. der Abstandsbestimmung mit den tatsächlichen Fehlern übereinstimmen. Durch die Simulation von vollständigen SFLIM-Datensätze konnte gezeigt werden, dass die Abweichung zwischen den tatsächlichen Fehlern und den geschätzten Fehlern vernachlässigbar ist. Allgemein kann gesagt werden, dass durch die Kombination der spektralen Information bzw. der Zeitinformation, die Güte des Algorithmus bis zu einem Faktor 2 verbessert werden kann.

Eine Fehlerquelle des Kolokalisationsalgorithmus beruht darin, dass es sich um einen pixelorientierten Algorithmus handelt. Jeder Pixel wird unabhängig von den anderen Pixeln analysiert. Dabei wird außer acht gelassen, dass der Pixel zu einem Spot gehört, dem eine bestimmte PSF zu Grunde liegt. Da in der Regel davon ausgegangen werden kann, dass die Abbildungsfunktion eines Mikroskops in x- wie in y-Richtung symmetrisch ist, kann über ein Symmetrisierungsverfahren die Güte des Algorithmus nochmals verbessert werden.

Bei realen Daten müssen zwei Rauschfaktoren berücksichtigt werden. Zum einen zeigt ein Fluoreszenzbild einen gewissen Anteil von Hintergrundrauschen. Zum anderen ist bekannt, dass nicht jedes Molekül eines Farbstofftyps durch die gleiche Grundwahrscheinlichkeit $\{P(t_i)\}$ bzw. durch ein p_{Rot} beschrieben wird. Die verwendeten Farbstoffe zeigen eine Verteilung $\{V_t^j(\tau_j)\}$ von möglichen Lebensdauern τ_j bzw. eine Verteilung $\{V_R^j(p_{\text{Rot}}^j)\}$ von möglichen p_{Rot}^j . Jedem τ_j kann durch eine eigene Grundwahrscheinlichkeit $\{P_j(t_i, \tau_j)\}$ beschrieben werden. In dieser Arbeit wurde ein Algorithmus erarbeitet, der den Effekt des Hintergrundrauschens fast vollständig herausrechnet. Der so angepasste Kolokalisationsalgorithmus wird als SFLIM-U Algorithmus bezeichnet. Im zweiten Schritt

wurde ein Algorithmus implementiert, der einem kolokalisierten Spot einen optimalen Parametersatz $({}^{\text{BP}}\tau_j, {}^{\text{BP}}p_{\text{Rot}}^j, {}^{\text{CY}}\tau_j, {}^{\text{CY}}p_{\text{Rot}}^j)$ zuordnet (V-SFLIM-U Algorithmus). Beide Algorithmen arbeiteten hoch effizient und ermöglichen es somit auch reale Datensätze zu untersuchen. Die in dieser Arbeit verwendeten realen Datensätze bestehen aus DNS-Strängen unterschiedlicher Länge (148 und 200 Basenpaare), die am einen Ende mit dem Farbstoff Bodipy630/650 und am anderen Ende mit Cy5.5 markiert werden. Mit einer Persistenzlänge der DNS von 50 nm beträgt der Abstand zwischen den beiden Farbstoffen dementsprechend 50 bzw. 68nm. Die SFLIM-Datensätzen dieser beiden DNS-Proben wurden mit Hilfe eines SFLIM-U Algorithmus untersucht und aus den kolokalisierten Spot wurde der Abstand zwischen den Farbstoffen bestimmt. Anzahl von Spots Die Abstandsdiagramme dieser beiden DNS-Proben unterscheiden sich signifikant. Aus den Verteilungen konnte die Länge der einzelnen DNS Moleküle berechnet werden. Die berechneten Werte von 55 und 75nm stimmen sehr gut mit den theoretisch erwarteten Werten überein. Zudem war es möglich die Abstände der 148 Basenpaar langen DNS mit einem geschätzten Fehler von 7.23nm anzugeben. Aus einem Vergleich von simulierten Datensätzen und den realen Datensätzen folgt, dass es prinzipiell möglich ist Abstände mit einem Fehler von 6nm zu bestimmen. Die Fehler liegen somit deutlich unterhalb der Grenze von 10nm.

Mit der entwickelten Kolokalisationstheorie wird es somit in der Zukunft möglich sein auch 3-dimensionale Strukturen mit einer Ausdehnung von mehreren 10nm aufzulösen. In dieser Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen eine in sich schlüssige SFLIM Kolokalisationstheorie zu entwickeln, die es zum einen erlaubt Abstände mit sehr hoher Präzision zu bestimmen, und die gleichzeitig eine mathematisch fundierte Fehleranalyse der berechneten Abstände liefert.

VII.2. Ausblick

Bis jetzt wurde die entwickelte Kolokalisationstheorie nur auf mit Farbstoffen belegte Oberflächen angewendet. Ein Ziel besteht darin, kolokalisierte Farbstoff auch innerhalb von biologisch relevanten Umgebungen zu untersuchen. So besteht ein Ziel darin einzelne Transkriptionseinheiten in der Zelle zu markieren. In einer Transkriptionseinheit wird eine Gruppe von Strukturgenen innerhalb einer DNS mit Hilfe einer DNS-abhängigen RNS-Polymerase transkribiert. die Transkription der Strukturgene liefert eine m-RNS (*m-RNS: messenger-RNS*). Die m-RNS trägt die genetische Information des Gens. Die Transkriptionseinheiten haben eine Ausdehnung von 40-80nm und die Prozesse laufen innerhalb von mehreren Sekunden ab. Der Transkriptionszyklus ist in Abb VII-1 dargestellt

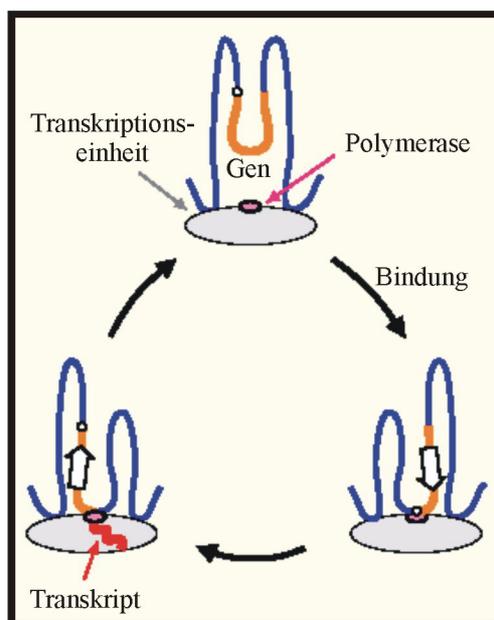


Abb. VII-1:
Transkriptionszyklus

Wäre es möglich sowohl die Transkriptionseinheit, wie bestimmte Genstrukturen innerhalb der DNS mit verschiedenen Farbstoffen zu markieren, dann könnten mit Hilfe der Kolokalisationstheorie die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden.

- Ob eine bestimmte Polymerase immer nur ein bestimmtes Gen oder mehrere verschiedene Gene transkribiert.
- Wie die Polymerasen bzw. die Transkriptionseinheiten organisiert sind.
- Wie viele Polymerasen sich innerhalb einer Transkriptionseinheit befinden.

Um diese Fragen zu beantworten, muss in vivo in Zellen gemessen werden. Zusätzlich sollten gleichzeitig nicht nur 2 sondern mehrere Farbstoffmarkierungen unterschieden werden können. Da eine Transkriptionseinheit eine räumliche Ausdehnung hat, sollte die Kolokalisationstheorie nicht nur eine Information über die laterale Anordnung der Farbstoffe sondern auch über die axiale Anordnung geben.. Die bis jetzt entwickelten und analysierten Algorithmen erlauben die Anpassungen an die gestellten Anforderungen, ohne, dass neue mathematische Beschreibungen erarbeitet werden müssen. Im folgenden werden die notwendigen Anpassungen schematisch aufgezeigt.

Das Arbeiten in lebenden Zellen hat zur Folge, dass das Hintergrundrauschen beträchtlich ansteigt. Zum einen zeigen Zellen im starken Maße Autofluoreszenz, zum anderen beinhaltet eine Zelle eine Vielzahl von streuenden Partikeln. Zum anderen muss erwartet werden, dass die Wechselwirkung der Farbstoffe mit ihrer Umgebung zu nimmt. Was in der Regel nach sich zieht, dass die Fluoreszenz der Farbstoffe gequencht wird. In Zellen muss daher von einem geringen Signal-zu-Rausch Verhältnis S/N ausgegangen werden. Mit dem abnehmenden S/N Verhältnis sinkt aber der Kontrast der spektralen Information und der Zeritinformation. Als Kontrast wird die Unterscheidbarkeit der Farbstoffe fluoreszenz vom Hintergrundrauschen bezeichnet. Durch die in Kapitel VI entwickelte Anpassung des SFLIM-Algorithmus an das Hintergrundrauschen, ist die Güte des SFLIM-U-Algorithmus praktisch unabhängig von dem S/N Wert. Diese Tatsache kann durch eine Simulation gezeigt werden, die auf Datensatz zurückgreift, der analog zu dem aus Abschnitt VI.6 generiert wurde. Der Unterschied besteht darin, dass $I_U=8$ gesetzt wurde und die Farbstoffe jeweils im Mittel nur $I_{CY}=I_{BP}=3677$ Photonen emittieren. In einem Fenster von 21×21 Pixeln um jeden Spot befinden sich somit gleich viele Photonen, wie für den Datensatz aus Abschnitt VI.6 ($I_U=2$, $I_{CY}=I_{BP}=5000$). Auf den neuen Datensatz wird der SFLIM-U-Algorithmus angewendet. Als $\Delta(\Delta Abst)^{SFLIM-U}$ ergibt sich 9.66 nm . Im Vergleich zu dem ermittelten $\Delta(\Delta Abst)^{SFLIM-U}$ $= 7.30 \text{ nm}$ aus Abschnitt VI.6 zeigt sich, dass $\Delta(\Delta Abst)^{SFLIM-U}$ nur um einen Faktor 1.32 größer wird, obwohl, dass S/N von 11 auf 2 abnimmt.

Die Innere Struktur des SFLIM-Algorithmus besteht darin, dass für eine Pixel mit der Intensität I und dem gemessenen Parametersatz $(F_2, \{d(t_i)\})$, für jede mögliche Mischung $(I_1:I_2)_I$ eine Verteilung $\{P_G(I_1;I)\}$ berechnet wird. $\{P_G(I_1;I)\}$ hat die Form eines Vektors mit der Dimension $(I+1)$. Beinhaltet der Pixel bzw. der kolokalisierte Spot Photonen, die von 3 verschiedenen Farbstoffen stammen, dann müssen die Mischungen $(I_1:I_2:I_3)_I$ berechnet

werden. Die innere Struktur lässt sich schreiben durch eine Verteilung $\{P_G(I_1, I_2; I)\}$. $\{P_G(I_1, I_2; I)\}$ stellt eine Matrix dar mit der Dimension $(I+1) \times (I+1)$. Mathematisch verlangt die Berechnung von $\{P_G(I_1, I_2; I)\}$ keine weiteren Arbeiten. Das Problem besteht darin, dass der Algorithmus einen hohen Rechenaufwand erfordert. Für eine herkömmlich PC ist dieser Rechenaufwand nicht zu bewältigen. In der Zukunft kann auf einen Computercluster zugegriffen werden, der es erlaubt, auch Strukturen, die mit drei und mehr Farbstoffen markiert sind, zu analysieren.

Wenn 3-dimensionale Objekte lebender Zellen auf Einzelmolekülniveau, sind durch diese Arbeit die notwendigen mathematischen Vorarbeiten geleistet worden. In zukünftigen Arbeiten muss gezeigt werden, dass die Photostabilität von Farbstoffen ausreichend ist, um eine Zelle bzw. einen Transkriptionseinheit 3-dimensional auszuleuchten.

In dieser Arbeit wurden das Augenmerk ausschließlich auf die Verbesserung der Datenanalyse der Farbstofffluoreszenz gelegt. Die Abbildungseigenschaften des Mikroskops wurden außer Acht gelassen. In Zukunft sollen daher die erarbeiteten Methoden zur verbesserten Datenanalyse mit Methoden zur Optimierung der Abbildungseigenschaften von Mikroskopen kombiniert werden verbessert werden.

Wenn sich zwei Farbstoffe näher als 10nm kommen, treten die beiden Farbstoffe in Wechselwirkung zu einander. Diese Wechselwirkung wird durch die Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (*FRET*) Theorie beschrieben. Die grundsätzliche Annahme besteht darin, dass die Übergangsmomente der beiden Farbstoffe einer Dipol-Dipol Wechselwirkung unterliegen. Der kurzwelligere Farbstoff wird als Donor (D) und der langwelligere Farbstoff als Akzeptor (A) bezeichnet. Die Kopplung der Farbstoffe wird durch die beiden Größen J und κ^2 beschrieben. Wobei J das Überlappungsintegral zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors darstellt und κ^2 die Orientierung der beiden Farbstoff charakterisiert. Die Kopplung zeigt eine starke Abhängigkeit ($1/R^6$) vom Abstand R der Moleküle, was die Reichweite der Wechselwirkung auf wenige nm begrenzt. Im Fall, dass der Donor (D^*) angeregt wird, wird mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit E_F die komplette Energie des Donors auf den Akzeptor transferiert, $D^* + A \rightarrow D + A^*$. Die Transferrate k_F gibt an, wie häufig ein solcher Prozess in einer bestimmten Zeiteinheit (ns) stattfindet. Über die Transferrate k_F ändern sich die Fluoreszenzkinetiken der Farbstoffe. Durch den FRET Mechanismus wird die Lebensdauer des Donormoleküls im angeregten

verkürzt. Das Akzeptormolekül wird mit der Transferrate k_F gepumpt, was die Anregungswahrscheinlichkeit zuerst ansteigen lässt, bevor sie aufgrund der begrenzten Lebensdauer wieder abnimmt. Die Fluoreszenzkinetiken des Donormoleküls bzw. des Akzeptormoleküls können somit genutzt werden, die Transferrate k_F , und somit indirekt den Abstand, zu bestimmen. Da in einer bestimmten Zeiteinheit nur eine diskrete Anzahl von Energiepaketen, vom Donor auf den Akzeptor transferiert werden können, ist k_F zwangsläufig eine diskrete Größe. Aus mathematischer Sicht kann somit die Bestimmung von k_F mit den gleichen Formalismen bzw. Algorithmen behandelt werden, die schon für die Kolokalisationstheorie verwendet wurden. Damit wird es möglich sein, den Kolokalisationsalgorithmus soweit anzupassen, dass die Limitierung der Abstandsbestimmung aufgehoben werden kann

Literatur

- [1] A. I. Lamond, W. C. Earnshaw. Structure and function in the nucleus. *Science* **280**, 547 (1998)
- [2] D. L. Spector. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 265 (1993)
- [3] T. Cremer, C. Cremer. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Rev.* **2**, 292 (2001).
- [4] P. R. Cook. The Organization of Replication and Transcription. *Science* **284**, 1790 (1999)
- [5] R. Berezney, M. J. Mortillaro, H. Ma, X. Wie, J. Samarabandu. The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int. Rev. Cytol.* **162A**, 1 (1995)
- [6] H. Leonhardt, H. P. Rahn, M. C. Cardoso. Intranuclear targeting of DNA replication factors. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **30/31**, 243 (1998)
- [7] U. Scheer, D. Weisenberger. The nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 354 (1994)
- [8] D. A. Jackson, F. J. Iborra, E. M. M. Manders, P. R. Cook. Numbers and Organization of RNA Polymerases, Nascent Transcripts, and Transcription Units in HeLa Nuclei. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 1523 (1998)
- [9] A. Pombo, D. A. Jackson, M. Hollinshead, Z. Wang, R. G. Roeder, P. R. Cook. Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III. *EMBO J.* **18**, 2241 (1999)
- [10] D. G. Wansink, O. C. Sibon, F. F. Cremers, R. van Driel, L. de Jong. Ultrastructural localization of active genes in nuclei of A431 cells. *J. Cell Biochem.* **62**, 10 (1996)

- [11] M. C. Cardoso, H. Leonhardt, B. Nadal-Ginard. Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* **74**, 979 (1993)
- [12] A. Dietrich, V. Buschmann, C. Müller, M. Sauer. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) and competing processes in donor-acceptor substituted DNA strands: A comparative study of ensemble and single molecule data. *Rev. in Mol. Biotechnology* **82/3**, 211 (2002)
- [13] T. Ha. Single Molecule fluorescence resonance energy transfer. *Methods* **25**, 78 (2001)
- [14] N.G. Walter. Structural dynamics of catalytic RNA highlighted by fluorescence resonance energy transfer. *Methods* **25**, 19 (2001)
- [15] Y. Ishii et al. Communication between troponin-C and -I revealed by single molecule fluorescence spectroscopy and FRET. *Biophys. J* **72**, WP196 (1997)
- [16] J. B. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. 2nd ed., New York, Plenum Press (1995).
- [17] Ü. Mets, R. Rigler. *J. Fluoresc.* **4**, 259 (1994)
- [18] S. Nie, N. T. Chiu, R. N. Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy. *Science* **266**, 1018 (1994)
- [19] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, A. van Orden, H. J. Werner, R. A. Keller. Single Molecule Fluorescence Spectroscopy at Ambient Temperature. *Chem. Rev.* **99**, 2929 (1999)
- [20] K. D. Weston, P. J. Carson, H. Metiu, S. K. Buratto. Room-temperature fluorescence characteristics of single dye molecules adsorbed on a glass surface. *J. Chem. Phys.* **109**, 7474 (1998)

- [21] J. A. Veerman, M. F. Garcia-Parajo, L. Kuipers, N. F. van Hulst. Time-Varying Triplet State Lifetimes of Single Molecules. *Phys. Rev. Lett.* **83**, 2155 (1999)
- [22] G. J. Schütz, G. Kada, V. P. Pastushenko, H. Schindler. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* **19**, 892 (2000)
- [23] Y. Sako, S. Minoguchi, T. Yanagida. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nature Cell Biol.* **2**, 168 (2000)
- [24] W. A. Carrington, R. M. Lynch, E. D. W. Moore, G. Idenberg, K. E. Fogarty, F.S. Fay. Superresolution three-dimensional images of fluorescence in cells with minimal light exposure. *Science* **268**, 1483 (1995)
- [25] T. Enderle, T. Ha, D. F. Ogletree, D. S. Chela, C. Magowan, S. Weiss. Membrane specific mapping and colocalization of malarial and host skeletal proteins in the Plasmodium falciparum infected erythrocyte by dual-color near-field scanning optical microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 520 (1997)
- [26] T. A. Klar, S. Jacobs, M. Dyba, A. Enger, S. W. Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8206-8210 (2000)
- [27] T. A. Klar, S. Jacobs, M. Dyba, A. Enger, S. W. Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8206-8210 (2000)
- [28] B. Albrecht, A. V. Failla, R. Heintzmann, C. Cremer. Spatially modulated illumination microscopy: online visualization of intensity distribution and prediction of nanometer precision of axial distance measurements by computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8206 (2000)
- [29] A. Patwardhan, E. M. M. Manders. Three-colour confocal microscopy with improved colocalization capability and cross-talk suppression. *Bioimaging* **4**, 17 (1996).

- [30] A. Esa, P. Edelmann, G. Kreth, L. Trakhtenbrot, G. Amariglio, G. Rechavi, M. Hausmann, C. Cremer. Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour DNA labelling: a study of the BCR region on chromosome 22 and the Philadelphia chromosome. *J. Microsc.* **199**, 96 (2000)
- [31] E. M. M. Manders. Chromatic shift in multicolour confocal microscopy. *J. Microsc.* **185**, 321 (1997)
- [32] A. M. van Oijen, J. Köhler, J., Schmidt, G. J. Brakenhoff. *Chem. Phys. Lett.* **292**, 183 (1998).
- [33] Th. D. Lacoste, X. Michalet, F. Pinaud, D. S. Chemla, P. Alivisatos, S. Weiss. Ultrahigh-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9461 (2000)
- [34] A. P. Alivisatos. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* **271**, 933 (1996)
- [35] U. Banin, M. Bruchez, A. P. Alivisatos, T. Ha, S. Weiss, D. S. Chemla. Evidence for a thermal contribution to emission intermittency in single CdSe/CdS core/shell nanocrystals. *J. Chem. Phys.* **10**, 1 (1999)
- [36] P. Tinnefeld, D. P. Herten, M. Sauer. Photophysical dynamics of single dye molecules studied by spectrally-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy (SFLIM). *J. Phys. Chem. A* **105**, 7989 (2001).
- [37] M. Heilemann, D. P. Herten, P. Tinnefeld, R. Heintzmann, C. Cremer, K. D. Weston, J. Wolfrum, M. Sauer. High-resolution colocalization of single dye molecules by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Anal. Chem.* **74**, 3511 (2002)
- [38] W. Trabesinger, B. Hecht, U. P. Wild, G. J. Schütz, Schindler, Th. Schmidt. Statistical analysis of single-molecule colocalization assays. *Anal. Chem.* **73**, 1100 (2001)

- [39] L. Cagnet, G. S. Harms, G. A. Blab, P. H. M. Lommerse, Th. Schmidt. Simultaneous dual-color and dual-polarization imaging of single molecules. *Appl. Phys. Lett.* **77**, 4052 (2000)
- [40] P. Tinnefeld, V. Buschmann, D. P. Herten, K. T. Han, M. Sauer. Confocal fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) at the single molecule level. *Single Mol.* **1**, 212 (2000).
- [41] P. Tinnefeld, C. Müller, M. Sauer. Time-varying photon probability distribution of individual molecules at room temperature. *Chem. Phys. Lett.* **345**, 252 (2001)
- [42] J. Enderlein, M. Sauer. Optimal algorithm for single molecule identification with time-correlated single photon counting. *J. Phys. Chem. A* **105**, 48-53 (2001).
- [43] M. Köllner. Statistische und experimentelle des ultraempfindlichen, selektiven Nachweises von Biomolekülen mit Hilfe von Multiplex-Farbstoffen. Dissertation am Physikalisch Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (1993)
- [44] D. P. Herten. Automatisierung eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops zur zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion von einzelnen Biomolekülen. Dissertation am Physikalisch Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2000)
- [45] I. N. Bronstein, K.A. Semendjajew. Taschenbuch der Mathematik, 25 Aufl., Stuttgart, Leipzig, B.G. Teubner Verlagsgesellschaft (1991)
- [46] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, B. P. Flannery. *Numerical Recipes*. 2nd ed., Cambridge, University Press (1997)
- [47] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **2**, 55 (1948)
- [48] P. Tinnefeld, K. D. Weston, T. Vosch, M. Cotlet, J. Hofkens, F. C. De Schryver, M. Sauer. Antibunching in the emission of a tetrachromophoric dendritic system. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14310 (2002)

- [49] P. Tinnefeld, V. Buschmann, K. D. Weston, M. Sauer. Direct observation of collective blinking and energy transfer in a bichromophoric system. *J. Phys. Chem. A*, **107**, 323 (2003)
- [50] D. S. English, A. Furube, P. F. Barbara. Single-molecule spectroscopy in oxygen-depleted polymer films. *Chemical Physics Letters*, **324**, 15 (2000)
- [51] K. D. Weston, P. J. Carson, J. A. DeAro, S. K. Buratto. Single-molecule detection fluorescence of surface-bound species in vacuum. *Chemical Physics Letters*, **308**, 58 (1999)
- [52] J. Widengren, P. Schwille. Characterization of Photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem A*, **104**, 6416 (2000)