

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Fakultät für Physik  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von

**Dipl.-Phys. Manuel Gunkel**

aus Speyer

Tag der Disputation: 10. Februar 2011



# Lokalisationsmikroskopie mit mehreren Farben und ihre Anwendung in biologischen Präparaten

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer  
Prof. Dr. Andreas Hütten



## **Lokalisationsmikroskopie mit mehreren Farben und ihre Anwendung in biologischen Präparaten**

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine wichtige Methode zur Erforschung biologischer Strukturen. Durch intrinsische Eigenschaften der Fluorophore ist es möglich, deren Signale voneinander zu trennen und individuell zu lokalisieren. Hierdurch erhält man quantitative Positionsinformationen, was zu einer Verbesserung der strukturellen Auflösung führt und die Möglichkeit statistischer Analysen eröffnet.

In dieser Arbeit wurde die Lokalisationsmikroskopie für spektral verschiedene Markierungen innerhalb biologischer Präparate angewandt. Es wurden verschiedene Algorithmen entwickelt, um den mechanischen und chromatischen Versatz der erhaltenen Positionsdaten zu korrigieren und diese weiter zu analysieren. Beispielsweise wurde die relative Verteilung zwischen einem DNA-Strukturprotein (H2A) zu einem am DNA-Umbau beteiligten Protein (SNF2h) untersucht. Gleichzeitig wurden diese Verteilungen mit zufälligen Verteilungen von Signalpositionen innerhalb der gleichen globalen Strukturen verglichen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich die Verteilungen signifikant von zufälligen Verteilungen unterscheiden.

Weiterhin ist es möglich, die Daten auf Signalanhäufungen zu überprüfen und deren Eigenschaften zu bestimmen. Dies wurde erst an simulierten Verteilungen getestet und später unter anderem zur Analyse von Signalanhäufungen von Centromerproteinen (CENP-A, CENP-B und CENP-C) im menschlichen Kinetochor genutzt. Zusätzlich kann die axiale Position der Lokalisationsdaten innerhalb der Struktur auf etwa  $50nm$  genau bestimmt werden. Für die Verteilung der Fluorophore in Tabakmosaikviren wurde ein Modell entwickelt, welches an die experimentellen Daten angepasst wurde. Durch die Lokalisationsmikroskopie konnte die elektronenmikroskopisch bestimmte Breite dieser Struktur von  $18nm$  bestätigt werden. Die Positionsgenauigkeit der einzelnen Signalpositionen betrug in diesem Fall im Mittel  $8nm$ . Um das von der Probe emittierte Fluoreszenzsignal aufgrund verschiedener Eigenschaften, wie beispielsweise unterschiedliche Polarisationsrichtungen oder verschiedene Spektralbereiche, aufzuspalten und simultan auf einem einzigen Detektor abzubilden wurde ein neuer Mikroskopaufbau realisiert. Hierdurch kann die Aufnahme einer Zweifarbenmessung beschleunigt werden, da beide Farbkanäle gleichzeitig detektiert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass kein mechanischer Versatz zwischen beiden Messungen entsteht.

## **Localization microscopy with multiple colors and its application in biological samples**

Fluorescence microscopy is an important method for studying biological structures. By intrinsic properties of the fluorophores it is possible to separate and individually localize their signals. These quantitative position information enable an improved structural resolution and a statistic analysis of the data.

In this thesis, localization microscopy was applied for multiple spectral markers within the observed biological samples. Several algorithms to compensate mechanical and chromatic shift and to correct and analyze the position data were developed. For example, the relative distribution of a structural protein of the DNA (H2A) and a DNA remodeler protein (SNF2h) was examined. The experimental results were compared with random distributed signal positions within the same global structures. It could be shown that the real distributions are significantly different from the random ones.

It is also possible to check the data for signal clusters and determine their properties. This was first tested on simulated distributions and later applied in the analysis of signal accumulations in biological structures like centromere protein clusters (CENP-A, CENP-B and CENP-C) within the human kinetochore. In addition, the axial position of the localization data within the structure can be determined with a precision of about  $50nm$ . A model for the distribution of the fluorophores in tobacco mosaic virus structures was developed and fitted to the data. The width of these structures determined by electron microscopy to be  $18nm$  could be confirmed. The mean localization accuracy in this case was  $8nm$ .

A new microscope setup was build to split the fluorescence signal emitted by the sample due to its different properties like direction of polarization or spectral range. Both parts of the signal could be imaged simultaneously on the same detector. This results in a shorter acquisition time for a two color measurement. Additionally, no mechanical drift between two measurements is apparent.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Motivation . . . . .	1
1.2	Stand der Technik . . . . .	3
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1	Die optische Abbildung . . . . .	5
2.1.1	Geometrische Optik . . . . .	5
2.1.2	Wellenoptik . . . . .	6
2.1.3	Gaußsche Strahlenoptik . . . . .	7
2.1.4	Fourieroptik . . . . .	9
2.1.5	Punktverteilungsfunktion (PSF) und optische Transferfunktion (OTF) . . . . .	11
2.1.6	Auflösung . . . . .	11
2.2	Fluoreszenz . . . . .	14
2.3	Digitale Bilderfassung . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Lokalisationsmikroskopie</b>	<b>21</b>
3.1	Theoretisch erreichbare Genauigkeit bei der Lokalisation einzelner Molekülsignale . . . . .	22
3.2	Der Levenberg-Marquardt-Algorithmus zur Minimierung der quadratischen Abweichung . . . . .	24
3.3	Methoden zur Lokalisation von Einzelmolekülsignalen . . . . .	26
3.3.1	SPDM mit einer geringen Anzahl spektraler Signaturen . . . . .	26
3.3.2	SPDM mit Ausnutzung des reversiblen Photobleichens . . . . .	26
3.3.3	Photoaktivierung einzelner Moleküle . . . . .	27
3.3.4	Photoschalten einzelner Moleküle . . . . .	28
<b>4</b>	<b>Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroskope</b>	<b>31</b>
4.1	Der experimentelle Lokalisationsaufbau . . . . .	31
4.2	Das SMI Vertico . . . . .	34
4.3	Der Zweifarbenaufbau . . . . .	34
4.3.1	Software . . . . .	37
4.3.2	Ansteuerung des Schrittmotors . . . . .	38

<b>5</b>	<b>Algorithmen zur Datenauswertung</b>	<b>41</b>
5.1	Auswertung der Daten . . . . .	41
5.1.1	Datenaufbereitung . . . . .	41
5.1.2	Segmentierung . . . . .	42
5.1.3	Anpassung der Modellfunktion . . . . .	42
5.2	Visualisierungen . . . . .	44
5.2.1	Orte2Bild . . . . .	44
5.2.2	Orte2StdBild . . . . .	45
5.2.3	Orte2WFBild . . . . .	46
5.2.4	Nachbarlabel . . . . .	46
5.3	Weitere Auswertung der Lokalisationsdaten . . . . .	46
5.3.1	Bestimmung der axialen Position der Lokalisationsdaten innerhalb einer Zelle / eines Zellkerns . . . . .	47
5.3.2	Selektion interessanter Bereiche im Lokalisationsbild . . . . .	49
5.3.3	Verfolgung dünner Strukturen im Lokalisationsbild . . . . .	50
5.3.4	Clusteranalyse . . . . .	52
5.3.5	Bestimmung der axialen und lateralen Verschiebung bei sequentiellen Zweifarben-Lokalisationsmessungen . . . . .	57
5.3.6	Zweifarbennachbarlabel . . . . .	60
<b>6</b>	<b>Simulationen zur Clusteranalyse</b>	<b>63</b>
6.1	Simulation der Signalanhäufungen . . . . .	63
6.1.1	Clusterbestimmung durch Schwellwertanpassung . . . . .	64
6.1.2	Clusterbestimmung durch Anpassung eines <i>gaussian mixture models</i> . . . . .	65
6.1.3	Clusterbestimmung durch Nachbarschaftsanalyse . . . . .	65
<b>7</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>73</b>
7.1	Das Tabakmosaikvirus (TMV) . . . . .	73
7.1.1	Probenpräparation . . . . .	74
7.1.2	Aufnahme und Auswertung der Daten . . . . .	75
7.2	Lokalisationsmikroskopie von FISH-markierten Präparaten . . . . .	83
7.2.1	Die verwendeten Proben . . . . .	84
7.2.2	Mikroskopie . . . . .	86
7.2.3	Datenauswertung . . . . .	87
7.3	Untersuchung von Proteinverteilungen im menschlichen Kinetochor . . . . .	91
7.3.1	Centromerprotein A (CENP-A) . . . . .	91
7.3.2	Centromerprotein B (CENP-B) . . . . .	100
7.3.3	Centromerprotein C (CENP-C) . . . . .	108
7.3.4	Untersuchung der relativen Verteilung der Centromerproteine . . . . .	115
7.4	Die Verteilung von Histon-Protein H2A und DNA-Remodeler SNF2h . . . . .	124

---

7.5	Die Verteilung von RNA-Polymerase II und Histonprotein H2B . . .	132
<b>8</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>141</b>
8.1	Zusammenfassung . . . . .	141
8.2	Diskussion . . . . .	142
8.2.1	Lokalisationsmikroskopie . . . . .	142
8.2.2	Zweifارben-Lokalisationsmikroskopie . . . . .	146
8.2.3	Der Zweifarbenaufbau . . . . .	148
8.3	Ausblick . . . . .	149



# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Um fundamentale Zusammenhänge, Wechselwirkungen und Strukturen zu erkennen und quantitativ beschreiben zu können ist es notwendig, präzise Instrumente zu deren Erfassung zu entwickeln. Diese Instrumente müssen in der Lage sein, Objekte in Größenordnungen zu vermessen, welche weit außerhalb des durch menschliche Sinne Erfassbaren liegen. Im Laufe der Geschichte wurden hierfür viele Instrumente entwickelt, welche elektromagnetische Wellen in den unterschiedlichsten Wellenlängenbereichen detektieren und analysieren können, beispielsweise in der Astronomie die Teleskope und in den Lebenswissenschaften die Mikroskope. Allerdings erfolgte die Datenaufnahme mit diesen Instrumenten lange Zeit durch Abzeichnen des Beobachteten oder später durch Belichtung von photoaktiven Materialien, was wieder eine nachträgliche Bearbeitung vonnöten machte. Erst mit der Entwicklung einfacher zu handhabender Detektoren, wie beispielsweise Photodetektoren und CCD-Sensoren (engl. *charge-coupled devices*) konnten quantitative Analysen in hohem Maß durchgeführt werden. Durch aktuelle Datenverarbeitungsmethoden kann man nun eine Vielzahl an Informationen über die beobachteten Objekte sammeln und auswerten. Durch die erhöhte Rate der Datenaufnahme können auch zunehmend komplexere Vorgänge in lebenden Zellen und Zellverbänden mit immer höherer Frequenz und Präzision in immer kleineren Größenordnungen erfasst werden. Dies führt im Zusammenhang mit dem Vergleich der erhaltenen Daten mit den bestehenden und immer weiter entwickelten Modellen von Zellen, zellulären Bestandteilen und Vorgängen zu einem immer besseren Verständnis dieser als elementarer Einheit aller Lebewesen bezeichneten Strukturen.

Die Entwicklung aktueller Mikroskope ist alles andere als abgeschlossen. Die von Ernst Abbe im Jahre 1873 aufgestellte Theorie, nach welcher die zur Beobachtung verwendete Wellenlänge elektromagnetischer Strahlung das Auflösungsvermögen eines Mikroskops begrenzt, hat nach wie vor Gültigkeit. Dies führte dazu, immer kürzere Wellenlängen zu verwenden. In der Röntgenmikroskopie werden derzeit etwa Auflösungen im Bereich von 20 nm erzielt, in der Elektronenmikroskopie sogar Auflösungen im einstelligen Angström-Bereich und damit in der Größenordnung einzelner Moleküle und sogar Atome. Diese Art der Mikroskopie ist also für die Auflösung kleinster zellulärer Strukturen sehr gut geeignet. Aufgrund der physikalischen Natur der hierbei verwendeten Strahlung ist sie für intakte Zellen allerdings

höchst destruktiv und kann momentan nur für speziell präparierte Objekte oder dünne Schnitte angewandt werden. Optische Verfahren im Wellenlängenbereich von sichtbarem Licht sind aufgrund der hohen Durchlässigkeit biologischer Präparate zunächst sehr kontrastarm. Ein entscheidender Vorteil ist, dass sich durch verschiedene Verfahren einzelne Strukturen in biologischen Präparaten selektiv mit unterschiedlichen fluoreszenten Farbstoffen markieren lassen. Dies führt zu einer hohen Spezifität und einem großen Kontrast der Markierung, gleichzeitig wird zumeist die Funktion der markierten Struktur nicht beeinträchtigt, so dass sich derart markierte Zellen für eine Vielzahl von aktuellen Mikroskopietechniken eignen, mit welchen Dynamik und Struktur einzelner Zellkomponenten auch in lebenden Zellen beobachtet und vermessen werden können.

Die von Abbe postulierte Auflösungsgrenze kann allerdings umgangen werden. Hierzu kann man zum einen spezielle Methoden der Beleuchtung anwenden, beispielsweise aufgrund der Kohärenz von Laserstrahlung ein Interferenzmuster in der Fokusebene des Mikroskops abbilden und hierdurch höhere Frequenzterme zugänglich machen. Zum anderen kann man die Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe direkt ausnutzen und diese etwa zur stimulierten Emission anregen oder individuell in verschiedene unterschiedliche Fluoreszenzzustände schalten und hierdurch den Informationsgehalt wesentlich erhöhen. Diese Methoden lassen sich vielfältig miteinander kombinieren und zur Untersuchung der Dynamik sowie kleiner Strukturen im Inneren von Zellen oder anderen biologischen Präparaten einsetzen. Es zeigt sich, dass es beim derzeitigen Stand der Technik nicht ohne weiteres möglich ist, hohe Dynamik und kleinste Strukturen gleichzeitig zu vermessen. Auch sind nicht alle Mikroskopietechniken für alle biologischen Fragestellungen geeignet.

Durch den Einsatz unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierungen können relative Verteilungen unterschiedlicher Molekültypen vermessen werden. Hierdurch kann man Erkenntnisse nicht nur über die Verteilung dieser Moleküle etwa innerhalb der Zelle gewinnen, sondern auch über deren Wechselwirkungen untereinander. In der hier vorliegenden Arbeit wurden Verfahren entwickelt, um mit Hilfe der Lokalisationsmikroskopie, welche aufgrund unterschiedlicher Fluoreszenzzustände einzelner Moleküle deren Unterscheidung und Positionsbestimmung weit unterhalb der Abbe-Grenze ermöglicht, Aussagen über die Struktur und die relativen Verteilungen unterschiedlicher Molekültypen in verschiedenen biologischen Präparaten zu treffen. Hierzu wurden spezielle Algorithmen entwickelt, deren Funktionsweise auf den folgenden Seiten beschrieben wird. Des Weiteren wurde ein Aufbau entwickelt, welcher wesentlich zur Verminderung des chromatischen Fehlers bei der Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierungen mit unterschiedlichen Emissionsspektren beiträgt. Dieser wird ebenfalls in dieser Arbeit beschrieben und charakterisiert, sowie erste Ergebnisse präsentiert.

## 1.2 Stand der Technik

Momentan ist wohl das Konfokalmikroskop (engl. *confocal laser scanning microscope*, CLSM) das am weitesten verbreitete kommerziell erhältliche hochauflösende Fluoreszenzmikroskop. Bei diesem Verfahren wird das zu untersuchende fluoreszenzmarkierte Objekt mittels eines fokussierten Laserstrahls abgerastert. Die Wellenlänge des zur Beleuchtung verwendeten Lasers liegt hierbei meist im Bereich zwischen  $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm} - 850 \text{ nm}$ , die Rasterung kann durch positionsveränderliche Spiegel oder eine rotierende Lochscheiben erfolgen. Als Detektor kommen sowohl Lavinenphotodioden (engl. *avalanche photo diodes*, APD) als auch CCD-Sensoren zum Einsatz. Die Auflösungs- und Kontrastverbesserung erfolgt zum einen durch die Verwendung von Objektiven mit hochnumerischer Apertur, zum anderen durch Abschirmung des von ausserhalb der Fokusebene kommenden Fluoreszenzlichtes durch eine einstellbare Irisblende direkt vor dem Detektor. Das Konfokalmikroskop hat typischerweise ein Auflösungsvermögen von 200 nm in lateraler und 600 nm in axialer Richtung. In den letzten Jahren wurden zudem noch weitere Methoden entwickelt, von denen einige hier kurz vorgestellt werden sollen. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf denjenigen Verfahren, welche eine Verbesserung der Strukturauflösung ermöglichen.

Ein weiteres konfokales Verfahren stellt die 4-Pi-Mikroskopie dar [HS92, HSLC94, HLCS94], bei der das Objekt aus zwei gegenüberliegenden Objektiven mit deckungsgleichem Fokus beleuchtet und das Fluoreszenzlicht durch diese detektiert wird. Die Erhöhung des Raumwinkels führt zu einer verbesserten axialen Auflösung, welche etwa 100 nm beträgt. Bei der STED-Mikroskopie [ERM<sup>+</sup>09, SWP<sup>+</sup>09, MH09] wird ausgenutzt, dass sich spezielle Fluoreszenzmarker durch Laserlicht entsprechender Wellenlänge wieder stimuliert abregen lassen. Dieser Effekt wird nun genutzt, um das Beleuchtungsvolumen des Konfokalmikroskops nachträglich durch einen zweiten, ringförmigen Laserstrahl einzuschränken. Hierdurch können effektive Auflösungen in lateraler Richtung in biologischen Proben von wenigen Nanometern erreicht werden. Des weiteren existieren verschiedene Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie, bei denen die Probe mittels kollimiertem Licht beleuchtet wird. So ist es zum einen möglich, die Intensität des zur Fluoreszenzanregung verwendeten Laserlichts in lateraler oder axialer Richtung zu modulieren. Lateral können hierbei Auflösungen von 100 nm erreicht werden, was durch Ausnutzung nichtlinearer Effekte sogar noch weiter verbessert werden kann [HC99, Gus99, Gus00, Gus05, AFHC01, HJC02]. Axial sind Positions- und Größenbestimmungen bis hin zu wenigen Nanometern möglich [AFHC01, FCC02, FSA<sup>+</sup>02, MFS<sup>+</sup>04, BBW<sup>+</sup>07].

Außerdem ist es möglich, verschiedene Eigenschaften vieler Fluoreszenzfarbstoffe auszunutzen, um diese kontrolliert zwischen verschiedenen fluoreszenten oder auch nicht fluoreszenten Zuständen zu schalten. Auf diese Weise können einzelne Moleküle separat beobachtet und deren Positionen präzise ermittelt werden. Die Vorteile dieser Lokalisationsmikroskopie sind schon seit einiger Zeit publiziert

[BCCD85, Bet95, BSEC98, CEB<sup>+</sup>99]. Dass diese Methode erst in den letzten Jahren effektiv genutzt wird liegt in der Tatsache begründet, dass kontrolliert schaltbare Farbstoffe oder nutzbare Zustände bekannter Fluorophore erst vor relativ kurzer Zeit entwickelt oder entdeckt und mit dieser Methode in Verbindung gebracht wurden [BPS<sup>+</sup>06, HGM06, RBZ06, LGB<sup>+</sup>08, HvdLS<sup>+</sup>08, FBB<sup>+</sup>08, BJC<sup>+</sup>09]. Die Genauigkeit der Positionsbestimmung hängt hierbei wesentlich von der Anzahl der pro Fluoreszenzmolekül emittierter Photonen ab. Bei einer hohen Punktdichte der Signale und entsprechender Genauigkeit der Positionsbestimmung kann eine Strukturauflösung im Nanometerbereich erreicht werden. In dieser Arbeit werden die aktuellen Verfahren der Lokalisationsmikroskopie beschrieben, das Hauptaugenmerk liegt dabei auf dem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Verfahren.

## 2 Grundlagen

In diesem Kapitel sollen die dieser Arbeit zugrunde liegenden Sachverhalte kurz und übersichtlich dargestellt werden. Insbesondere wird die Theorie der Abbildung durch ein optisches System beschrieben, das Phänomen der Fluoreszenz erläutert und gezeigt, wie dies zum Erkenntnisgewinn in den Biowissenschaften genutzt werden kann. Des Weiteren wird das Verfahren der Lokalisationsmikroskopie erklärt und die physikalischen und mathematischen Bedingungen diskutiert. Abschließend sollen die in dieser Arbeit genauer untersuchten biologischen Konstrukte kurz beschrieben werden, ohne hierbei den Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben. Zum bessern Verständnis werden an den entsprechenden Stellen Hinweise auf weiterführende Literatur gegeben.

### 2.1 Die optische Abbildung

Hier soll beschrieben werden, wie ein Bild im Mikroskop zustande kommt. Die grundlegenden Sachverhalte, wie sie auch in der Literatur [Trä07, Hec05, Gu00] beschrieben sind, werden kurz vorgestellt.

#### 2.1.1 Geometrische Optik

Mit Hilfe optischer Elemente wie beispielsweise Linsen und Prismen kann ein Abbild eines Objektes an einer anderen Stelle im Raum erzeugt werden. Hierzu wird das von diesem Objekt ausgesandte Licht mittels der optischen Elemente an der entsprechenden Stelle gebündelt. Dieser Prozess kann mittels der geometrischen Optik beschrieben werden. Eine Lichtquelle wird hierbei als punktförmig angenommen und das von dieser Lichtquelle ausgesandte Licht als Geraden oder Lichtstrahlen angenähert, welche orthogonal zu den Wellenfronten ausgerichtet sind. Da die geometrische Optik den Wellencharakter des Lichtes nicht berücksichtigt, kann sie nur zulässige Vorhersagen treffen, falls die Objekte, welche ein solcher Lichtstrahl passiert, nicht von der Größenordnung der Wellenlänge des entsprechenden Lichtes sind. Die geometrische Optik kann sehr gut zur Beschreibung der Lichtausbreitung in einem optischen System verwendet werden.

### 2.1.2 Wellenoptik

Berücksichtigt man die Wellennatur des Lichtes, kann man dieses als sich ausbreitende elektromagnetische Welle beschreiben. Das mathematische Modell hierfür sind die von Maxwell entwickelten und nach ihm benannten Gleichungen [JF99]:

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \nabla \cdot (\epsilon_0 \mathbf{E} + 4\pi \epsilon_0 \mathbf{P}) = \rho \quad (2.1)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0 \quad (2.2)$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial}{\partial t} \mathbf{B} \quad (2.3)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \left( \mathbf{J} + \frac{\partial}{\partial t} \mathbf{D} \right) \quad (2.4)$$

Hierbei ist  $\mathbf{D}$  die elektrische Flussdichte,  $\epsilon_0$  die elektrische Leitfähigkeit  $\mathbf{E}$  die elektrische Feldstärke,  $\mathbf{P}$  die elektrische Polarisation,  $\mathbf{B}$  die magnetische Flussdichte und  $\mathbf{J}$  die totale Stromdichte. Zwischen diesen Größen besteht außerdem folgender Zusammenhang:

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \epsilon_r \mathbf{E} + \mathbf{P} \quad (2.5)$$

$$\mathbf{B} = \mu_0 \mu_r \mathbf{H} + \mathbf{M} \quad (2.6)$$

mit der magnetischen Polarisation  $\mathbf{M}$ , der magnetischen Leitfähigkeit  $\mu_0$  sowie den materialabhängigen Größen  $\epsilon_r$  und  $\mu_r$ . In differentieller Form lauten die Maxwell-Gleichungen:

$$\oint_{\partial V} \mathbf{D} \cdot d\mathbf{A} = \int_V \rho \cdot dV \quad (2.7)$$

$$\oint_{\partial V} \mathbf{B} \cdot d\mathbf{A} = 0 \quad (2.8)$$

$$\oint_{\partial A} \mathbf{E} \cdot d\mathbf{s} = \frac{\partial}{\partial t} \left( \int_A \mathbf{B} \cdot d\mathbf{A} \right) \quad (2.9)$$

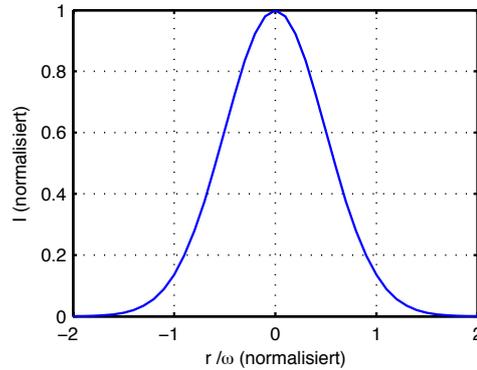
$$\oint_{\partial A} \mathbf{H} \cdot d\mathbf{s} = \int_A \mathbf{J} \cdot d\mathbf{A} + \frac{\partial}{\partial t} \left( \int_A \mathbf{D} \cdot d\mathbf{A} \right) \quad (2.10)$$

Mit Hilfe der Vektoridentität  $\nabla \times (\nabla \times \mathbf{V}) = \nabla(\nabla \cdot \mathbf{V}) - \nabla^2 \mathbf{V}$  erhält man hieraus für die Felder  $\mathbf{E}$  und  $\mathbf{B}$  symmetrische Wellengleichungen

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{E} = 0 \quad (2.11)$$

$$\nabla^2 \mathbf{B} - \frac{n^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \mathbf{B} = 0 \quad (2.12)$$

mit dem Brechungsindex  $n = \sqrt{\epsilon_0 \epsilon_r \mu_0 \mu_r}$  und der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum  $c$ .



**Abbildung 2.1:** Gaußsches Strahlprofil. Aufgetragen ist die Intensität (normiert auf die Maximalintensität) gegen den Radius in Einheiten des minimalen Strahldurchmessers  $\omega_0$ .

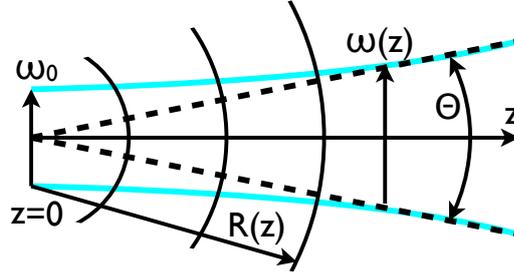
### 2.1.3 Gaußsche Strahlenoptik

Die Gaußsche Strahlenoptik ist eine Erweiterung der geometrischen Optik, welche die Ausbreitung von Gaußförmigen Strahlenbündeln beschreibt. In den in dieser Arbeit beschriebenen Mikroskopaufbauten werden als Lichtquellen Laser verwendet, daher ist eine Beschreibung des Strahlengangs mittels Gaußscher Strahlenoptik angebracht. Es wird eine zur optischen Achse radialsymmetrische Feldverteilung angenommen:

$$E(r, z) = E_0 \frac{\omega_0}{\omega(z)} \exp\left(-\frac{r^2}{\omega^2(z)}\right) \exp\left(-ikz - ik\frac{r^2}{2R(z)} + i\zeta(z)\right) \quad (2.13)$$

$$I(r, z) = \frac{|E(r, z)|^2}{2\eta} = I_0 \left(\frac{\omega_0}{\omega(z)}\right)^2 \exp\left(-\frac{2r^2}{\omega^2(z)}\right) \quad (2.14)$$

Hierbei ist  $E$  die Amplitude des radialsymmetrischen elektrischen Feldes,  $I$  die Intensität (dargestellt in Abbildung 2.1),  $r$  der Abstand von der optischen Achse,  $z$  die axiale Distanz von der Position des minimalen Strahldurchmessers  $\omega_0$ ,  $E_0 = |E(0, 0)|$ ,  $I_0 = I(0, 0)$ ,  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  die Wellenzahl für die Wellenlänge  $\lambda$  und  $\eta$  die Wellenimpedanz im Ausbreitungsmedium. Die Funktionen  $\omega(z)$ ,  $R(z)$  und  $\zeta(z)$  sind



**Abbildung 2.2:** Verlauf eines Gaußstrahls entlang der optischen Achse (z-Achse). An der Stelle  $z = 0$  besitzt der Gaußstrahl seinen minimalen Durchmesser  $\omega_0$ . Krümmungsradius und Divergenzwinkel sind schematisch dargestellt.

Strahlparameter und folgendermaßen definiert:

$$\text{Strahldurchmesser } \left\{ r \mid E(r, z) = \frac{1}{e} E(0, z) \right\}: \quad \omega(z) = \sqrt{1 + \left( \frac{z}{z_R} \right)^2}, \quad (2.15)$$

$$\text{Krümmungsradius:} \quad R(z) = \left[ 1 + \left( \frac{z_R}{z} \right)^2 \right]^2, \quad (2.16)$$

$$\text{Gouy-Phase:} \quad \zeta(z) = \arctan \left( \frac{z}{z_R} \right), \quad (2.17)$$

mit der Rayleighlänge  $z_R = \frac{2\pi\omega_0^2}{\lambda}$ , bei welcher  $\omega(z) = \sqrt{2}\omega_0$  ist. Der Verlauf der Intensität orthogonal zur optischen Achse ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Dies führt zu einer inhomogenen Beleuchtung der Probe und muss berücksichtigt werden.

Die Leistung des Strahls an der Stelle  $z$ , welche in der lateralen Ebene einen Kreis mit dem Radius  $r$  durchläuft, ist

$$P(r, z) = P_0 \cdot \left[ 1 - e^{-\frac{2r^2}{\omega^2(z)}} \right], \quad \text{mit} \quad (2.18)$$

$$P_0 = \frac{1}{2} \pi I_0 \omega_0^2. \quad (2.19)$$

Für  $z \gg z_R$  wächst der Strahldurchmesser linear. Der Divergenzwinkel zwischen dieser Geraden und der optischen Achse beträgt

$$\theta = \frac{\lambda}{\pi\omega_0}, \quad (2.20)$$

die gesamte Winkelaufweitung beträgt  $\Theta = 2\theta$ . Geht man von kleinen Winkeln und

einer punktförmigen Lichtquelle aus, so kann man  $\theta$  auch über die Brennweite  $f$  einer Linse und einen Gaußförmigen Strahldurchmesser  $D$  bestimmen:

$$\Theta \approx \frac{D}{f} \quad (2.21)$$

Damit folgt für den Strahldurchmesser im Fokus:

$$\omega_0 = \frac{2\lambda}{\pi} \frac{f}{D} \quad (2.22)$$

Die Schärfentiefe (engl. *depth of focus*, DOF) entlang der optischen Achse kann durch die Entfernung der Positionen  $z$  beschrieben werden, an welchen  $\omega(z) = \sqrt{2}\omega_0$  ist, also der doppelten Rayleighlänge  $z_R$ :

$$DOF = 2z_R = \frac{2\pi\omega_0^2}{\lambda} = \frac{8\lambda}{\pi} \left(\frac{f}{D}\right)^2 \quad (2.23)$$

Mit Hilfe die Gaußschen Strahlenoptik kann der Fokusdurchmesser genau berechnet werden, welcher entsteht, wenn ein kollimierter Lichtstrahl eine fokussierende Linse passiert. Dies muss etwa beim Aufbau von Kollimatoren und Raumfrequenzfiltern beachtet werden.

### 2.1.4 Fourieroptik

In der Fourieroptik [Goo05] wird die Lichtwelle als Superposition ebener Wellen mit den jeweiligen komplexen Wellenvektoren  $k_i$  beschrieben. Die Beschreibung findet daher im Frequenz- und nicht im Ortsraum statt, deren Koordinaten durch eine Fourier-Transformation ineinander überführt werden können. Jede sich ausbreitende Lichtwelle besitzt also ein charakteristisches Spektrum einheitlicher ebener Wellen. Diese Näherung gilt nur im Fernfeld, im Nahfeld kann die Ausdehnung des Emitters nicht mehr vernachlässigt werden. Die Bedingung für das Fernfeld ist ab einer Entfernung zum Emitter von etwa  $d = \frac{2D^2}{\lambda}$  erfüllt [Sco98], wobei  $D$  die maximale Emitter-Ausdehnung und  $\lambda$  die Wellenlänge der emittierten Strahlung ist. Im Fall von Farbstoffmolekülen, welche Licht im sichtbaren Bereich abstrahlen, erhält man für  $D \approx 0.5nm$  und  $\lambda \approx 500nm$  eine Entfernung von  $10^{-3}nm$ . Die Fernfeld-Bedingung ist also für hochnumerische Objektive mit einem Arbeitsabstand von  $d \approx 100\mu m$  sehr gut erfüllt.

Geht man von einem separablen Feld  $\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}(\mathbf{r})e^{i\omega t}$  aus mit  $\omega = c/\lambda$ , so wird die homogene Wellengleichung 2.12 zur Helmholtzgleichung:

$$\nabla^2 \mathbf{E}(\mathbf{r}) + k^2 \mathbf{E}(\mathbf{r}) = 0, \quad (2.24)$$

mit der Wellenzahl  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$  im Ausbreitungsmedium. Eine generelle Lösung der homogenen elektromagnetischen Wellengleichung in kartesischen Koordinaten kann also als gewichtete Superposition elementarer ebener Wellen geschrieben werden:

$$E(x, y, z) = \iint_{-\infty}^{\infty} E(k_x, k_y) e^{i(k_x x + k_y y)} e^{iz\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}} dk_x dk_y, \quad (2.25)$$

im Fall der paraxialen Näherung  $k_x^2 + k_y^2 \ll k_z^2$ , welche gleichbedeutend mit  $\sin(\theta) = \theta$  ist, mit dem Winkel  $\theta$  zwischen dem Wellenvektor  $\mathbf{k}$  und der optischen Achse (z-Achse).

Die Koordinatentransformation einer Funktion  $f(x, y)$  in den Frequenzraum erfolgt durch die Fourier-Transformation

$$F(k_x, k_y) = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-i(k_x x + k_y y)} dx dy, \quad (2.26)$$

die entsprechende Rücktransformation durch

$$f(x, y) = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{\infty} F(k_x, k_y) e^{i(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y. \quad (2.27)$$

Der Vorteil der Fourier-Optik ist, dass man die Übertragung einer Struktur aus dem Objektraum als Faltung der Struktur  $o(x, y)$  mit der Impulsantwort-Funktion des abbildenden Systems auffassen kann:

$$b(x, y) = PSF(x, y) \otimes o(x, y), \text{ oder} \quad (2.28)$$

$$b(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} PSF(x - x', y - y') o(x', y') dx' dy' \quad (2.29)$$

Die Funktion PSF ist die Impulsantwort oder Punktverteilungsfunktion des abbildenden Systems, auf welche in Abschnitt 2.1.5) noch näher eingegangen wird. Diese Faltung wird beim Übergang in den Frequenzraum nach dem Faltungstheorem zu einer Multiplikation:

$$B(k_x, k_y) = FT(PSF(x, y) \otimes o(x, y)) \quad (2.30)$$

$$= FT(PSF) \cdot FT(o(x, y)) \quad (2.31)$$

$$= OTF \cdot O(k_x, k_y) \quad (2.32)$$

Die Fouriertransformierte der PSF ist die optische Transferfunktion (OTF), welche ebenfalls im nächsten Abschnitt noch genauer beschrieben wird.

### 2.1.5 Punktverteilungsfunktion (PSF) und optische Transferfunktion (OTF)

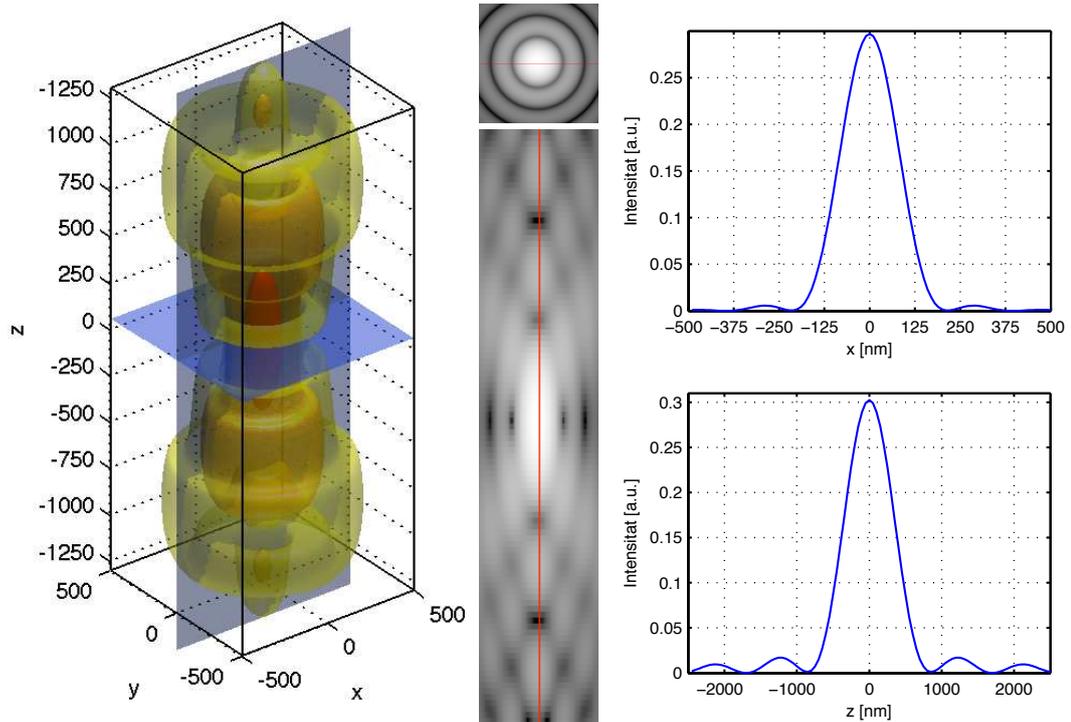
Der Zweck eines Mikroskops ist es, Strukturen aus dem Objektraum mit möglichst geringem Informationsverlust in den Bildraum zu übertragen und dort auf einem geeigneten Detektor abzubilden. Hierzu werden Linsen verwendet, welche die von einem Ausgangspunkt in der Fokusebene ausgesandten elektromagnetischen Wellenfronten derart krümmen, dass diese in einem Bildpunkt auf dem Detektor konstruktiv überlagert werden. Die Position ist dabei abhängig vom Winkel der einfallenden Wellenfront. Durch die Verwendung korrigierter Objektive und Linsen kann man erreichen, dass Fokus- und Bildebene über einen großen Bereich planar sind und optische Aberrationen vermieden werden. Durch den begrenzten Durchmesser der Frontlinse eines Objektivs kommt es zur Beugung der Wellenfronten. Eine punktförmige Lichtquelle wird somit durch das optische System auf eine charakteristische Weise abgebildet. Diese Abbildung nennt man die Punktantwort oder Punktverteilungsfunktion (engl. *point spread function*, PSF) des optischen Systems (siehe hierzu auch Abbildung 2.3). Für die Intensitätsverteilung in der Fokusebene ergibt sich die Airy-Verteilung einer Linse:

$$I(\nu) = (\pi N^2) \left[ \frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right]^2, \quad (2.33)$$

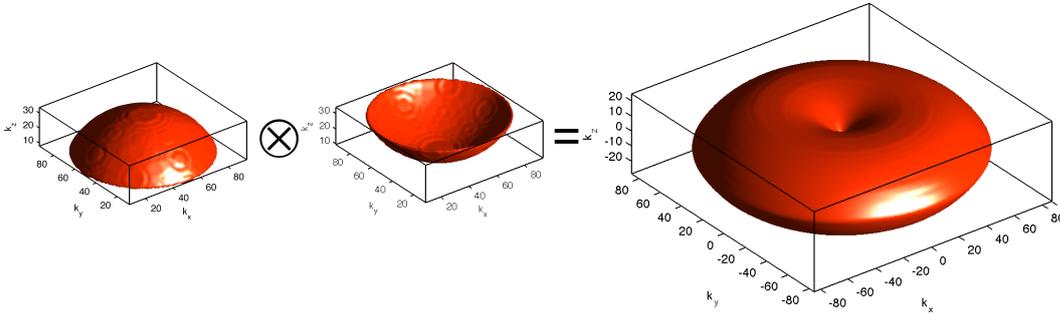
mit der radialen optischen Koordinate  $\nu(r) = \frac{2\pi NA}{\lambda} \cdot r$  bei der Wellenlänge  $\lambda$  und der numerischen Apertur  $NA = n \cdot \sin \alpha$ , der Fresnel-Zahl  $N = \frac{NA^2}{f\lambda}$  ( $f$ : Brennweite) und der Besselfunktion erster Gattung und erster Ordnung  $J_1$ . Die Bildentstehung auf dem Detektor kann als Faltung des Objekts mit der PSF des abbildenden Systems beschrieben werden 2.282.29. Betrachtet man diesen Vorgang im Frequenzraum, so wird aus der PSF die Optische Transferfunktion (OTF) und aus der Faltung eine Multiplikation 2.30 2.32. In Abbildung 2.4 ist eine OTF und ihre Entstehung aus der Faltung des Ewaldkugelsegments mit seinem komplexkonjugierten gezeigt. Im Zentrum ist der *missing cone* zu erkennen, welcher gleichbedeutend mit der geringen Raumfrequenzübertragung in axialer Richtung ist.

### 2.1.6 Auflösung

Aus der Verbreiterung eines Punktes durch ein Mikroskop oder ein sonstiges abbildendes System folgt, dass die Auflösung, also die Distanz zweier als getrennt gerade noch wahrnehmbarer Punkte, begrenzt ist. Ende des 19. Jahrhunderts formulierten Ernst Abbe und Sir Rayleigh ihre Bedingungen für die optische Auflösung [Abb73, Ray96]. Nach Rayleigh muss die Entfernung zwischen zwei punktförmigen Objekten (A und B) mindestens so groß sein, dass das Maximum der Airy-Funktion



**Abbildung 2.3:** Simulation einer 3D-PSF eines Objektivs mit einer numerischen Apertur von  $NA = 1.4$  für Licht der Wellenlänge  $\lambda = 520nm$ . Dargestellt sind drei Ebenen gleicher Intensität bei  $I = 0.02I_{max}$  (gelb),  $I = 0.05I_{max}$  (orange) und  $I = 0.5I_{max}$  (rot). Die in der linken 3D-Darstellung blau markierten Ebenen sind in der Mitte nochmals dargestellt, wobei die Intensität zur besseren Veranschaulichung der Nebenmaxima logarithmisch gestreckt wurde. Rechts sind die rot angedeuteten Linienprofile dargestellt. Die laterale PSF (oben) entspricht der Airy-Funktion.



**Abbildung 2.4:** Die optische Transferfunktion (OTF) beschreibt, bis zu welcher Grenzfrequenz sich elektromagnetische Wellen durch ein optisches Element übertragen lassen. Sie entspricht der Fouriertransformation der PSF. In dieser Abbildung ist die Herleitung der OTF aus der Faltung des Ewaldkugelsegmentes mit dessen komplex konjugiertem dargestellt. Die fehlenden Frequenzen vom Ursprung aus in axialer ( $k_z$ ) Richtung werden auch als *missing cone* bezeichnet. Die Achsen sind mit  $2 \cdot 10^{-4} \text{nm}^{-1}$  skaliert.

(siehe Abbildung 2.3) von Objekt A in das 1. Minimum der Airy-Funktion von Objekt B fällt (siehe auch Abbildung 2.3):

$$d = 1.22 \frac{\lambda}{2NA} = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.34)$$

Der Faktor 1.22 resultiert aus der Position des 1. Minimums der Besselfunktion 0. Ordnung. Nach der Theorie von Abbe erhält man

$$d = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.35)$$

für den Abstand zwischen 0. und 1. Beugungsordnung auf dem Detektor (im Fokusabstand  $f$ ) als Auflösungsgrenze. Das Beugungsmuster wird hierbei von einem Gitter in der vorderen Fokusebene der Linse erzeugt, welches kollimiert beleuchtet wird.

Aus der OTF kann man die maximal übertragbaren Frequenzen ermitteln und somit als Auflösung den Abstand definieren, welcher der Maximalfrequenz entspricht. Diese Frequenzen können in lateraler und axialer Richtung folgendermaßen ermittelt werden [Jäh05]:

$$\nu_{max_{lat}} = \frac{2 \sin \alpha}{\lambda_M} \quad (2.36)$$

$$\nu_{max_{ax}} = \frac{1 - \cos \alpha}{\lambda_M}, \quad (2.37)$$

wobei  $\alpha$  der Öffnungswinkel des Objektivs und  $\lambda$  die Wellenlänge des Lichtes im Medium ist. Hieraus ergeben sich die minimalen Abstände  $d_{min_{lat}} = \frac{1}{\nu_{lat}}$  und  $d_{min_{ax}} = \frac{1}{\nu_{ax}}$ . Dies kann man mit der Lichtwellenlänge im Vakuum  $\lambda_0 = n\lambda_M$  und der Numerischen Apertur  $NA$  noch umschreiben:

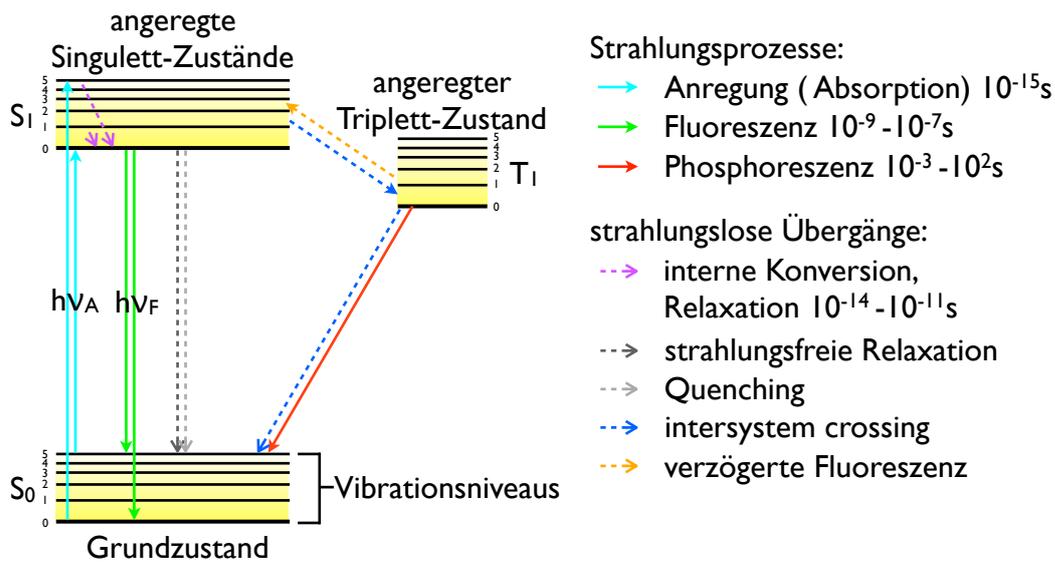
$$d_{min_{lat}} = \frac{1}{\nu_{max_{lat}}} = \frac{\lambda_0}{2NA} \quad (2.38)$$

$$d_{min_{ax}} = \frac{1}{\nu_{min_{ax}}} = \frac{\lambda_0}{NA} \cdot \frac{\sin \alpha}{1 - \cos \alpha}. \quad (2.39)$$

Nimmt man eine numerische Apertur von  $NA = 1.4$  und eine Wellenlänge von  $\lambda_0 = 520nm$  an, so erhält man Grenzfrequenzen von  $\nu_{max_{lat}} = 5.38 \cdot 10^{-3}nm^{-1}$  und  $\nu_{max_{ax}} = 1,72 \cdot 10^{-3}nm^{-1}$ , entsprechend einem Minimalabstand von  $d_{max_{lat}} = 186nm$  und  $d_{max_{ax}} = 583nm$ .

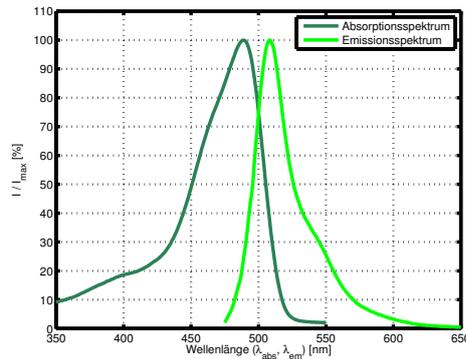
## 2.2 Fluoreszenz

Zur Verstärkung des Kontrasts sowie zur spezifischen Markierung einzelner Komponenten in biologische Präparaten können fluoreszierende Farbstoffmoleküle verwendet werden. Der hierbei zugrundeliegende Prozess [CSW07, VWS02] ist in dem in Abbildung 2.5 gezeigten stark vereinfachten Jabloski-Diagramm dargestellt. Ein Molekül kann verschiedene Energieformen tragen, kinetische sowie potentielle Energie, aus der Elektronenwolkenkonfiguration resultierende elektronische Energie, sowie Rotations- und Vibrationsenergie. Für die Fluoreszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich spielen lediglich die quantenmechanisch erlaubten Zustände der Hüllenelektronen sowie deren Schwingungsenergieniveaus eine Rolle. Aus einem Niveau des Grundzustands  $S_0$  kann ein Elektron durch Absorption eines Photons in einen angeregten Zustand  $S_1 \dots$  angehoben werden. Die Energie des Photons muss hierbei der Energiedifferenz der beiden Zustände entsprechen, also  $\Delta E = h\nu$  gelten. Dieser Vorgang erfolgt im Femtosekundenbereich. Wird das Elektron in einen höheren Zustand als  $S_1$  angeregt, geht dies meist strahlungslos innerhalb weniger Femtosekunden in einen Zustand von  $S_1$  über. Eine Anregung in den Triplet-Zustand aus dem Grundzustand ist quantenmechanisch verboten. Aus einem angeregten Schwingungszustand von  $S_1$  relaxiert das Elektron innerhalb von wenigen Pikosekunden durch Stöße mit benachbarten Molekülen in den Grundzustand von  $S_1$ , welcher eine Fluoreszenzlebensdauer von einigen Nanosekunden besitzt. Von diesem fällt es unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons in einen Schwingungszustand des Grundzustands  $S_0$  zurück und relaxiert wiederum innerhalb von einigen Pikosekunden durch Stöße mit umgebenden Molekülen in den niedrigsten Schwingungszustand von  $S_0$ . Die Energiedifferenz zwischen absorbiertem und emittiertem Photon bezeichnet man als Stokes-shift. Dies spiegelt sich in einer Rotverschiebung der Wellenlänge des emit-



**Abbildung 2.5:** Schematisches Jablonski-Diagramm eines Farbstoff-Moleküls mit den wichtigsten Übergängen. Bei der Fluoreszenz wird ein Elektron aus einem Vibrationsniveau des Grundzustandes durch Absorption eines Photons in einen angeregten Singulett-Zustand angehoben. Innerhalb von diesem kaskadiert es emissionslos in das niedrigste Vibrationsniveau und fällt von diesem unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons auf ein Vibrationsniveau des Grundzustandes zurück.

tierten Photons gegenüber dem absorbierten Photon im Bereich von 20 - 50 nm wieder. Da an Absorption und Emission nicht immer die gleichen Schwingungszustände von  $S_0$  und  $S_1$  beteiligt sind, resultiert dies in einem für jedes Fluoreszenzmolekül typischen Anregungs- und Emissionsspektrum, wie es in Abbildung 2.6 exemplarisch für das grün fluoreszierende Protein GFP (*green fluorescent protein*) [Tsi98] gezeigt ist.



**Abbildung 2.6:** Absorptions- und Emissionsspektrum des grün fluoreszierenden Proteins GFP. Die Intensität ist in Prozent der Maximalintensität angegeben. Gut zu erkennen ist die Rotverschiebung des Emissionsspektrums gegenüber dem Anregungsspektrum.

Durch den Stokesshift ist es möglich Anregungs- und Fluoreszenzlicht spektral voneinander zu trennen. Dies kann durch geeignete optische Filter geschehen.

Neben dem Fluoreszenzzyklus existieren noch andere Möglichkeiten des Energietransfers. Zum einen können die Fluoreszenzmoleküle strahlungsfrei durch Stöße wieder abgeregt werden. Zum anderen ist ein Übergang aus Schwingungszuständen von  $S_1$  in gleich hohe Schwingungszustände des Triplett-Zustandes  $T_1$ , dessen Grundzustand unter dem von  $S_1$  liegt, möglich. Von diesem kann das Elektron erneut in  $S_1$  zurückkehren, es kommt zur verzögerten Fluoreszenz. Oder das Elektron relaxiert in das niedrigste  $T_1$ -Niveau und fällt von dort unter Aussendung eines Phosphoreszenzphotons in den Grundzustand  $S_0$  zurück. Diese konkurrierenden Prozesse führt dazu, dass die Quanteneffizienz der Fluorophore für die Fluoreszenz bei guten Farbstoffen im Bereich von  $\eta \approx 0.8$  liegt.

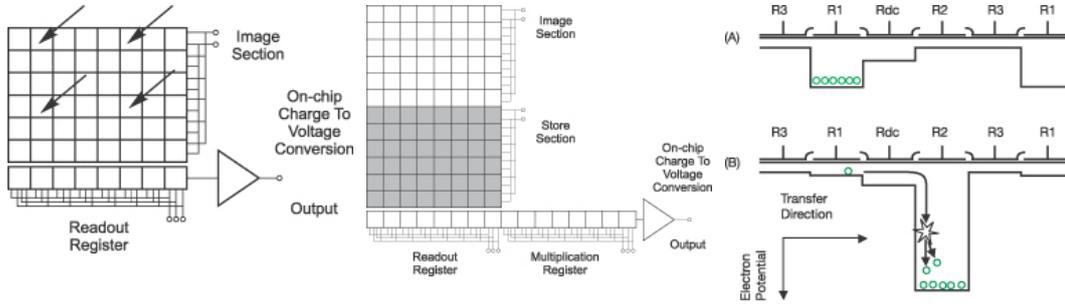
## 2.3 Digitale Bilderfassung

Die Aufnahme des durch das Mikroskop übertragene Bild erfolgt im Fall der konfokalen Aufnahme durch einen einzelnen Detektor, bei simultaner Aufnahme des beobachteten Gesichtsfeldes, wie es bei der Weitfeld-Mikroskopie der Fall ist, durch ein zweidimensionales Detektor-Array. Derartige zweidimensionale Detektoren sind *complementary metal-oxide-semiconductor*-Sensoren (CMOS-Sensoren) oder verschieden Arten von *charge-coupled devices* (CCDs), in welchen einzelne sensitive Flächen in Form einer Matrix angeordnet sind. In den in dieser Arbeit verwendeten Mikroskopaufbauten wurden als Detektoren CCD-Kameras eingesetzt, daher soll hier die Datenaufnahme mit diesen kurz beschrieben werden.

In einem CCD-Sensor liegt über einem dotierten Halbleiter eine elektrische Schicht, auf welcher Elektroden aus einem optisch transparenten Material aufgebracht sind. Häufig wird Silizium als Halbleitermaterial und Siliziumoxid als Isolationsschicht eingesetzt. Durch Anlegung einer Spannung an den Elektroden bildet sich im Halbleiter unterhalb der Isolationsschicht ein Potentialminimum. Trifft ein Photon auf den Halbleiter, kann durch den inneren photoelektrischen Effekt ein Elektron aus dem Valenz- ins Leitungsband gehoben werden, falls die Energie des Photons größer als die Bandlücke ist. Die Wahrscheinlichkeit, mit der dies geschieht bezeichnet man als Quanteneffizienz. Die ausgelösten Photonen werden in den Potentialminima gesammelt und können durch Anlegung unterschiedlicher Spannungen an den Elektroden verschoben werden. Die einzelnen Potentialminima werden als Pixel (*picture elements*) bezeichnet, Sensitivität und Auflösung des Sensors hängen neben den verwendeten Materialien auch von der Wahl der Größe der Pixel ab. Die Pixelgröße der verwendeten CCD-Sensoren lag im Bereich weniger  $\mu\text{m}$ .

Die in den Potentialminima während eines Integrationszyklus gesammelten Elektronen werden sequentiell ausgelesen. Hierzu werden die einzelnen Pixel zeilenweise in ein Ausleseregister bewegt und der Reihe nach ausgelesen. Durch den geschickten Einsatz von Hilfsregistern können Integration und Auslesen simultan erfolgen.

Durch den Einsatz eines verstärkenden Arrays nach dem Ausleseregister, aber vor dem Analog/Digitalwandler kann das Signal im Verhältnis zum Ausleserauschen noch verstärkt werden. Hierzu wird die Potentialdifferenz im Verstärkungsregister so gewählt, dass es beim Bewegen der gesammelten Elektronen zur Stoßionisation kommt und somit weitere Elektronen ausgelöst werden. Hierdurch können besonders schwache Signale, deren Amplitude in der Größenordnung des Ausleserausches oder darunter liegt, zusätzlich verstärkt werden, um diese später vom Ausleserauschen unterscheiden zu können. Hierbei ist Vorsicht geboten, da eine Verstärkung starker Signale zu einer Sättigung des Dynamischen Bereichs und damit zu nichtmehr verwertbaren Aufnahmen führen kann. Folgende Fehlerquellen können bei der Nutzung von CCD-Sensoren auftreten:



**Abbildung 2.7:** Der CCD-Sensor. Links: einfacher Sensor mit Ausleseregister. Mitte: Sensor mit zusätzlichem Speicherregister und Elektronenverstärkung beim Auslesen. Rechts: Schemazeichnung der Elektronenverstärkung. A) Die gesammelten Elektronen werden durch Veränderung der Potentialdifferenz auf dem Sensor bewegt. B) Durch Erhöhung der Potentialdifferenz kommt es zur Stoßionisation beim Bewegen der Ladungsträger. Dies wird in EMCCDs (*electron multiplying CCD*) zur Verstärkung des Signals genutzt [And].

- Photonenrauschen  $\sigma_{Phot}$ :  
Treffen  $N_{Phot}$  Photonen auf einen Detektor mit der Quanteneffizienz  $\eta$ , so erzeugen sie  $N_{e^-} = \eta \cdot N_{Phot}$  Signal-Elektronen mit einem Poissonverteilten Rauschen

$$\sigma_{Phot} = \sqrt{\eta N_{Phot}} \quad (2.40)$$

- Dunkelstromrauschen  $\sigma_{DS}$ :  
Thermisch erzeugte Ladungsträger im Sensor führen zu einem zusätzlichen Signal  $N_{DS}$ , welches proportional zur Integrationszeit ist. Auch dessen Rauschen ist Poissonverteilt:

$$\sigma_{DS} = \sqrt{N_{DS}} \quad (2.41)$$

- Ausleserauschen  $\sigma_{AR}$ :  
Das Ausleserauschen macht in der Regel den Hauptanteil am Gesamtrauschen aus. Es kommt aus der Verstärkung und der Konversion der Photoelektronen in eine Spannung. Das Ausleserauschen ist abhängig von der Auslesegeschwindigkeit. Je höher die Geschwindigkeit, desto höher ist der Auslesefehler aufgrund der größeren benötigten Bandbreite.
- Rauschen durch Elektronenverstärkung  $\sigma_{EM}$ :  
Wird das Signal vor dem Auslesen Verstärkt, kann das sogenannte Stör-rauschen nichtmehr vernachlässigt werden, welches beim Verschieben der gesammelten Ladungsträger zum Ausleseregister entsteht ( $\sigma_{St}$ ). Außerdem kommt

es zu einem Rauschen durch die Verstärkung mittels Stoßionisation. Man kann folgenden Rauschfaktor annehmen, welcher sich aus dem Verhältnis des zusätzlichen Rauschens zur erwarteten Rauschverstärkung zusammensetzt:

$$F^2 = \frac{\sigma_{out}^2}{M^2 \sigma_{in}^2}, \quad (2.42)$$

mit dem Verstärkungsfaktor  $M$ , dem Rauschen vor  $\sigma_{in}$  und nach der Verstärkung  $\sigma_{out}$ . Ein idealer Verstärker hätte also einen Rauschfaktor von  $F = 1$ .

Das Gesamtrauschen setzt sich somit zu  $\sigma_{gesamt} = \sqrt{F^2 M^2 (\sigma_{Phot}^2 + \sigma_{DS}^2 + \sigma_{St}^2) + \sigma_{AR}^2}$  zusammen. Dies ergibt ein Signal-Rausch-Verhältnis von

$$\frac{S}{N} = M \cdot \frac{\eta \cdot N_{Phot}}{\sigma_{gesamt}}. \quad (2.43)$$

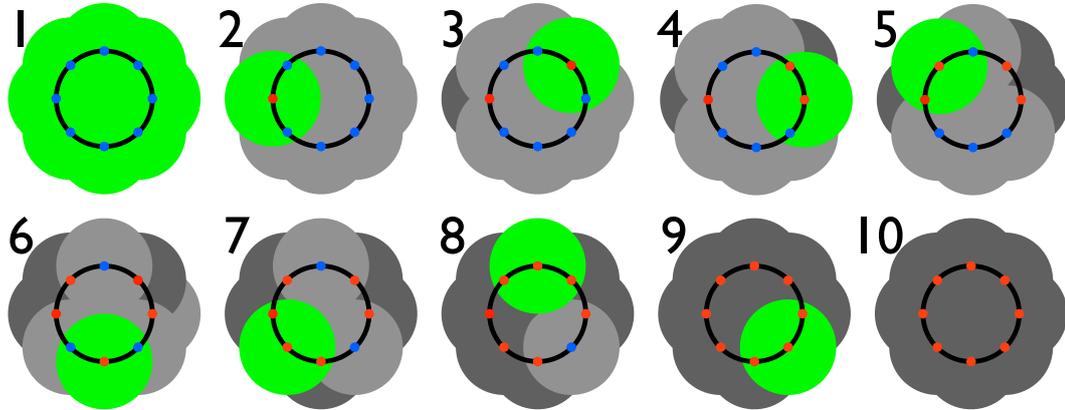


### 3 Lokalisationsmikroskopie

Bei der Lokalisationsmikroskopie werden verschiedenste intrinsische Eigenschaften der einzelnen Fluorophore ausgenutzt, um deren Fluoreszenzsignale unabhängig voneinander sichtbar zu machen. Durch diese Separation können die Positionen der einzelnen Fluoreszenzmoleküle sehr genau bestimmt werden (siehe auch Abbildung 3.1). Die erreichbare Genauigkeit hängt im wesentlichen von der pro Fluorophor emittierten Anzahl von Photonen und dem Hintergrund des Fluoreszenzsignals ab. Mit den momentan genutzten Fluorophoren können Positionsgenauigkeiten in biologischen Präparaten im einstelligen Nanometerbereich erzielt werden.

Um die Fluoreszenzsignale der einzelnen Moleküle voneinander zu trennen ist es zum einen möglich, Fluorophore mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren zu verwenden, des weiteren können photoaktivierbare oder photoschaltbare Farbstoffe eingesetzt werden. Durch die Modifikation der physischen Bedingungen können sogar gewöhnliche Fluorophore derart manipuliert werden, dass sie verschiedene optisch unterscheidbare Zustände einnehmen und somit zur Lokalisation genutzt werden können. Dementsprechend existieren inzwischen viele unterschiedliche Verfahren wie beispielsweise SPDM (engl. *spectral precision distance / position determination microscopy*) [CHBR, BSEC98, EEK<sup>+</sup>00], STORM (engl. *stochastic optical reconstruction microscopy*) [RBZ06] und dSTORM (engl. *direct stochastic optical reconstruction microscopy*) [vdLKHS08, HvdLS<sup>+</sup>08], PALM (engl. *photoactivated localization microscopy*) [BPS<sup>+</sup>06] und fPALM (engl. *fluorescence photoactivated localization microscopy*) [HGM06] oder GSDIM (engl. *ground state depletion microscopy*) [FBB<sup>+</sup>08]. Eine gute Übersicht ist in [CvKL<sup>+</sup>10] gegeben, auf einige dieser Methoden wird in diesem Kapitel noch näher eingegangen.

Im weiteren Verlauf sollen eine Abschätzung zur theoretisch erreichbaren Genauigkeit bei der Lokalisation einzelner Moleküle gegeben, sowie der in dieser Arbeit verwendete Algorithmus zur Positionsbestimmung erläutert werden. Des weiteren werden die verschiedenen Verfahren zur Isolation der Einzelmoleküle von den ersten Konzepten bis zu aktuellen Methoden, wie sie zum Teil auch in dieser Arbeit angewandt wurden, vorgestellt und ihre Vor- und Nachteile diskutiert.



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der Lokalisationsmikroskopie. Eine kreisförmige Struktur ist mit 8 Fluorophoren (blaue Punkte) markiert. Leuchten alle Fluorophore gleichzeitig (1), können die einzelnen Positionen nicht ermittelt werden. Erreicht man eine zeitliche Isolation der einzelnen Fluoreszenzsignale (2-9), beispielsweise durch reversibel gebleichte Zustände (hellgrau), so können deren Positionen bestimmt werden (rote Punkte). Dies kann so lange wiederholt werden, bis alle Fluorophore irreversibel ausgebleicht sind (dunkelgrau).

### 3.1 Theoretisch erreichbare Genauigkeit bei der Lokalisation einzelner Molekülsignale

Sofern es möglich ist, das Fluoreszenzsignal zweier Fluorophore getrennt voneinander zu detektieren, kann man deren Schwerpunkte und somit die lateralen Positionen der einzelnen Photonen emittierenden Fluoreszenzmoleküle bestimmen. Die Genauigkeit der Positionsbestimmung hängt im wesentlichen von der Anzahl an detektierten Photonen  $N$  ab [EC00, TLW02, ORW04]. Der Ort, an welchem ein einzelnes Photon auf dem Detektor auftrifft, ist gegeben durch die PSF des optischen Aufbaus. Die Ungenauigkeit in der Ortsbestimmung ist gegeben durch die Breite der PSF, die Position des Signalursprungs kann man aus dem Mittelwert aller Positionen der einzelnen Photonen bestimmen, der Gesamtfehler ergibt sich aus dem Fehler des Mittelwerts:

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{s^2}{N}. \quad (3.1)$$

Hierbei ist  $\Delta x$  der Lokalisationsfehler, welcher sich aus der Standardabweichung  $s$  der PSF und der Gesamtzahl  $N$  der auf den Detektor treffenden Photonen ergibt. Durch die finite Pixelgröße des Detektors ergibt sich eine zusätzliche Unsicherheit

### 3.1 Theoretisch erreichbare Genauigkeit bei der Lokalisation einzelner Molekülsignale

in der Ortsbestimmung jedes einzelnen Photons. Dies wird durch die Erweiterung von Gleichung 3.1 zu

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} \quad (3.2)$$

berücksichtigt, wobei  $a < s$  die Pixelgröße darstellt, der Faktor  $a^2/12$  ist die Varianz einer Rechteckfunktion, welche in diesem Fall die sensitive Fläche eines Kamerapixels darstellt. Meist ist das ursprüngliche Signal zusätzlich noch von einem zusätzlichen Hintergrundsignal überlagert. Geht man von der Minimierung der quadratischen Abweichung,

$$\chi^2(x) = \sum \frac{(y_i - N_i(x))^2}{\sigma_i^2}, \quad (3.3)$$

aus, mit der erwarteten Zählrate  $N_i(x)$  im Pixel  $i$ , ausgehend von einem Molekül an der Stelle  $x$  und den erwarteten Unsicherheiten  $\sigma_i$  aufgrund des Photonen-Zählfehlers und einem zusätzlichen Hintergrund  $b$ ,

$$\sigma_i^2 = N_i(x) + b^2, \quad (3.4)$$

wobei die Varianz der Photonenzahl dem Zählfehler entspricht, so erhält man durch die Bedingung für ein Minimum,  $d\chi^2/dx = 0$  eine Gleichung für die gemessene Position  $x$  in Abhängigkeit von der Anzahl detektierter Photonen in jedem Pixel. Ausdehnung von  $N_i(x)$  um die tatsächliche Position  $x_0$  und Berücksichtigung von Termen lediglich erster Ordnung in  $\Delta x = x - x_0$  führt zu

$$\Delta x = -\frac{\sum \frac{\Delta y_i N_i'}{\sigma_i^2} \left(1 - \frac{\Delta y_i}{2\sigma_i^2}\right)}{\sum \frac{N_i'^2}{\sigma_i^2} \left(1 - \frac{\Delta y_i}{\sigma_i^2}\right)} \approx -\frac{\sum \frac{\Delta y_i N_i'}{\sigma_i^2}}{\sum \frac{N_i'^2}{\sigma_i^2}}, \quad (3.5)$$

wobei  $N_i'$  die Ableitung von  $N_i$  an der Stelle  $x_0$  und  $\Delta y_i = N_i(x_0) - y_i$  ist. Quadriert man 3.5 und berechnet den Erwartungswert, erhält man die mittlere quadratische Abweichung

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{1}{\sum (N_i'^2/\sigma_i^2)}. \quad (3.6)$$

Mit Hilfe der Näherung

$$N_i = \frac{N}{\sqrt{2\pi}} e^{-i^2(2s^2)} \quad (3.7)$$

und ersetzt man die Summation in Gleichung 3.6 durch eine Integration wird diese im Grenzfall von reinem Photonengeräuschen zu Gleichung 3.1 Falls das Hintergrundgeräuschen dominiert, erhält man

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2}, \quad (3.8)$$

wobei die Pixelgröße  $a$  zum Erhalt der Einheiten dient. Zusätzliches Pixelgeräuschen wurde durch die Ersetzung der Summe durch die Integration (Pixelgröße geht gegen 0) vernachlässigt. Vereint man die beiden Terme für Photonen- und Hintergrundgeräuschen, erhält man als Abschätzung des Fehlers der Ortsbestimmung:

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2}. \quad (3.9)$$

Erweitert man dies auf den Fall eines zweidimensionalen Detektor-Arrays, wie es im Fall einer CCD-Kamera gegeben ist, erhält man:

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4b^2}{a^2N^2}. \quad (3.10)$$

Führt man die Ableitung nicht nach dem Ort  $x$ , sondern der Anzahl an Photonen  $N$  durch, erhält man die Unsicherheit der gesamten Photonenzahl:

$$\langle(\Delta N)^2\rangle = N + \frac{2\sqrt{\pi}sb^2}{a} \quad (3.11)$$

und im zweidimensionalen Fall

$$\langle(\Delta N)^2\rangle = N + \frac{4\pi s^2b^2}{a^2}. \quad (3.12)$$

### 3.2 Der Levenberg-Marquardt-Algorithmus zur Minimierung der quadratischen Abweichung

Der Levenberg-Marquadt-Algorithmus wird hauptsächlich dazu verwendet, um die Summe der quadratischen Abweichungen eines Datensatzes aus  $n$  unabhängigen und abhängigen Variablen  $(x_i, y_i)$  von einer Modellfunktion  $f(x, \mathbf{p})$  mit dem Parametersatz  $\mathbf{p}$ ,

$$S(\mathbf{p}) = \sum_{i=1}^n [y_i - f(x_i, \mathbf{p})]^2, \quad (3.13)$$

### 3.2 Der Levenberg-Marquardt-Algorithmus zur Minimierung der quadratischen Abweichung

zu minimieren. Hierzu wird der Parametersatz  $\mathbf{p}$  ausgehend von passenden Startwerten iterativ optimiert. In jedem Schritt wird  $\mathbf{p}$  durch  $\mathbf{p} + \boldsymbol{\delta}$  ersetzt. Zur Bestimmung von  $\boldsymbol{\delta}$  wird  $f(x, \mathbf{p})$  durch die Linearisierung

$$f(x, \mathbf{p} + \boldsymbol{\delta}) \approx f(x, \mathbf{p}) + J_i \boldsymbol{\delta} \quad (3.14)$$

angenähert, mit dem Gradienten von  $f(x, \mathbf{p})$  bezüglich  $\mathbf{p}$

$$J_i = \frac{\partial f(x_i, \mathbf{p})}{\partial \mathbf{p}} \quad (3.15)$$

und lediglich Terme 1. Ordnung berücksichtigt werden. Im Minimum der Summe der quadratischen Abweichungen  $S$  wird der Gradient von  $S$  bezüglich  $\boldsymbol{\delta}$  gleich Null. Mit 3.14 kann 3.13 folgendermassen geschrieben werden:

$$S(\mathbf{p} + \boldsymbol{\delta}) \approx \sum_{i=1}^n [y_i - f(x_i, \mathbf{p}) - J_i \boldsymbol{\delta}]^2, \quad (3.16)$$

oder in Vektorschreibweise

$$S(\mathbf{p} + \boldsymbol{\delta}) \approx \|\mathbf{y} - \mathbf{f}(x, \mathbf{p}) - \mathbf{J}\boldsymbol{\delta}\|^2, \quad (3.17)$$

mit der Jakobimatrix  $\mathbf{J}$ . Ableitung nach  $\boldsymbol{\delta}$  und Nullsetzen ergibt

$$(\mathbf{J}^T \mathbf{J}) \boldsymbol{\delta} = \mathbf{J}^T [\mathbf{y} - \mathbf{f}(\mathbf{p})]. \quad (3.18)$$

Levenberg fügte dieser Gleichung einen Dämpfungsfaktor  $\lambda$  hinzu:

$$(\mathbf{J}^T \mathbf{J} + \lambda \mathbf{I}) \boldsymbol{\delta} = \mathbf{J}^T [\mathbf{y} - \mathbf{f}(\mathbf{p})], \quad (3.19)$$

wobei  $\mathbf{I}$  die Identitätsmatrix ist. Der nicht-negative Dämpfungsfaktor  $\lambda$  kann bei jedem Iterationsschritt angepasst werden, abhängig vom negativen Kehrwert der Änderungsrate von  $S$ . Der Vorteil hierbei ist, dass die Schrittweite bei kleinem Gradienten erhöht wird. Marquadt fügte dieser Gleichung noch eine Abhängigkeit von der Krümmung hinzu:

$$(\mathbf{J}^T \mathbf{J} + \lambda \cdot \text{diag}(\mathbf{J}^T \mathbf{J})) \boldsymbol{\delta} = \mathbf{J}^T [\mathbf{y} - \mathbf{f}(\mathbf{p})]. \quad (3.20)$$

Dadurch wird die Konvergenz in die Richtungen, in welchen der Gradient kleiner ist, beschleunigt.

Die Fehler der jeweiligen Parameter  $p_i$  kann man aus der Kovarianzmatrix  $\mathbf{K} = (\mathbf{J}^T \mathbf{J})^{-1}$  mit den Einträgen  $k_{i,j}$ ,  $i, j = 1..n$  erhalten:  $\langle (\Delta p_i)^2 \rangle = k_{i,i}$ .

### 3.3 Methoden zur Lokalisation von Einzelmolekülsignalen

An dieser Stelle sollen verschiedene Methoden zur Lokalisation von Einzelmolekülsignalen vorgestellt werden. Für die optische Isolation der individuellen Signale werden verschiedene Verfahren verwendet

#### 3.3.1 SPDM mit einer geringen Anzahl spektraler Signaturen

Durch die Verwendung von Fluorophoren mit unterschiedlichen spektralen Signaturen kann durch die Wahl geeigneter optischer Filter die Überlappung des jeweiligen Fluoreszenzlichtes auf dem Detektor getrennt werden. Dieses Verfahren wurde von der Arbeitsgruppe Cremer entwickelt und als SPDM (engl. *spectral precision distance / position determination microscopy*) bezeichnet [CHBR, BSEC98, EEK<sup>+</sup>00, CvKL<sup>+</sup>10]. Durch die Breite der Emissionsspektren und die damit einhergehende spektrale Überlappung vieler Fluorophore ist die Anzahl an gleichzeitig innerhalb des beugungsbegrenzten Volumens lokalisierbaren Fluorophoren stark begrenzt. Weitere limitierende Faktoren sind die Verwendung vieler unterschiedlicher Beleuchtungsquellen und entsprechender optischer Filter, sowie der verstärkte Einfluss chromatischer Aberrationen durch die Verwendung spektral weit voneinander getrennter Fluorophore. Zusätzlich müssen die gleichen biologischen Strukturen mit verschiedenen Farbstoffen markiert werden, wobei die Labeleffizienz idealerweise für jeden Fluorophortyp gleich sein sollte. All diese Probleme können in aktuellen Anwendungen von SPDM umgangen werden, indem nicht mehr verschiedene Fluorophore verwendet, sondern langlebige Dunkelzustände jeweils eines Fluoreszenzmarkertyps ausgenutzt werden.

#### 3.3.2 SPDM mit Ausnutzung des reversiblen Photobleichens

Ganz ohne spezielle Fluorophore oder angepasste Einbettmedien kommt die in den letzten Jahren entwickelte Lokalisationsmikroskopie konventioneller Fluorophore aus [RBG<sup>+</sup>08, LGB<sup>+</sup>08, LGW<sup>+</sup>09, GER<sup>+</sup>09, KLGW09, BDK<sup>+</sup>10], eine Weiterentwicklung von SPDM. Die Isolation einzelner Signale wird hierbei durch Übergänge der Fluoreszenzmoleküle in langlebige Dunkelzustände erreicht. Fluoreszente Proteine können durch geeignete Anpassung der Beleuchtung in derartige langlebige Dunkelzustände versetzt werden [DCTM97, HFD<sup>+</sup>08, SVHS05, CDC<sup>+</sup>05, MZD<sup>+</sup>05]. Die langen Lebensdauern der nicht fluoreszenten Zustände sind mit reversiblen photochemischen Konformationsänderungen der fluoreszenten Proteine gekoppelt (siehe auch Abbildung 3.2). Geht man von den drei Zuständen 'fluoreszent'  $M_{fl}$ , 'reversibel gebleicht'  $M_{rb}$  und 'irreversibel gebleicht'  $M_{ib}$  des Fluorophors aus, so ergibt

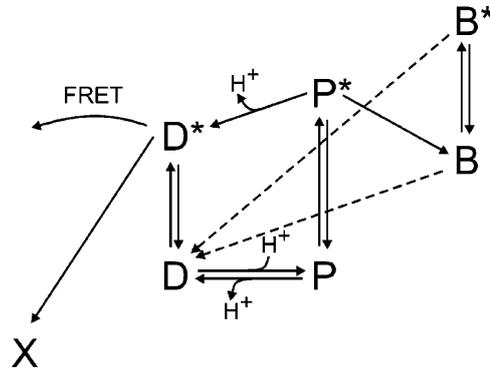


Abbildung 3.2: Übergangsschema fluoreszenter Proteine. Aus [SVHS05].

sich folgendes Übergangsschema:



mit den Übergangsraten  $k_{rb}$  für den Übergang vom fluoreszenten in den reversibel gebleichten Zustand,  $k_{fl}$  vom reversibel gebleichten zurück in den fluoreszenten Zustand und  $k_{bl}$  vom fluoreszenten in den irreversibel gebleichten Zustand. Um die Fluorophore in den reversibel gebleichten Zustand zu treiben, welcher exponentiell zerfällt und Lebensdauern von einigen Millisekunden bis hin zu einigen Minuten aufweist, sind Leistungsdichten der Beleuchtung im Bereich einiger  $kW/cm^2$  vonnöten. Dadurch wird ein Teil der Fluorophore bereits zu Beginn einer Aufnahme irreversibel gebleicht. Ein wesentlicher Vorteil ist, dass Fluorophore, welche aus dem reversibel gebleichten in den fluoreszenten Zustand zurückkehren, den Fluoreszenzzyklus sehr schnell bis zum endgültigen irreversiblen Photobleichen durchlaufen. Dies führt zu einem sehr starken Fluoreszenzsignal und ermöglicht auch die Detektion und Lokalisation einzelner Signale im Inneren biologischer Strukturen aufgrund des guten Signal-Rauschabstandes. Durch Anpassung der Beleuchtungsintensität kann die Anzahl der Farbstoffmoleküle, welche in den reversiblen Zustand getrieben werden und die Verweildauer im fluoreszenten Zustand angepasst werden, nicht die Zerfallsrate des reversibel gebleichten Zustandes, so dass die für eine Aufnahme benötigte Zeit in der Regel nicht verändert werden kann.

### 3.3.3 Photoaktivierung einzelner Moleküle

Eine weitere Methode, die Anzahl der Fluoreszenzlicht emittierenden Moleküle im beugungsbegrenzten Volumen zu kontrollieren ist es, photoaktivierbare Fluorophore

wie beispielsweise photoaktivierbares GFP (paGFP) zu verwenden (PALM, fPALM) [HGM06, BPS<sup>+</sup>06]. Hierbei kann das verwendete Fluorophor (meist durch Bestrahlung mit Licht mit Wellenlängen um  $\lambda_{akt} \approx 400nm$ , oder auch durch Zweiphotonenanregung) durch Abspaltung einer zusätzlichen Molekülgruppe von einem nicht fluoreszenten in einen fluoreszenten Zustand versetzen. In diesem kann es bis zum Photobleichen beobachtet werden. Die Anzahl an Fluorophoren im fluoreszenten Zustand kann durch die Bestrahlungsintensitäten des Aktivierungsstrahls und des Auslesestrahls reguliert werden. Da dieser Prozess irreversibel ist, ist eine Vorselektion der zu beobachtenden Strukturen schwierig, falls der Farbstoff noch nicht aktiviert wurde. Zur Verbesserung des geringen Signal-Rausch-Verhältnisses der Einzelmolekülsignale wird auf Beleuchtung mittels totaler interner Reflexion (TIRF) zurückgegriffen, wodurch eine Untersuchung vieler biologischer Fragestellungen beispielsweise im Inneren von Zellen erschwert wird. Durch diese Methode ist eine sehr genaue Bestimmung der in einer Struktur vorhandenen Fluoreszenzmarkierungen möglich.

#### 3.3.4 Photoschalten einzelner Moleküle

Methoden der Lokalisationsmikroskopie, welche sich das reversible Schalten organischer Farbstoffe zunutze machen, sind die stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (STORM) [RBZ06] und die direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM) [HvdLS<sup>+</sup>08, vdLSH08, vdLKHS08]. Bei diesen Methoden werden einzelne organische Fluorophore mittels zweier Anregungswellenlängen zwischen zwei fluoreszenten Zuständen geschaltet, wobei im Fall von dSTORM hierfür kein zweiter Fluorophor benötigt wird. Als Fluorophore wurden in ersten Versuchen Cy5 ( $\lambda_{ex_{max}} = 649nm$ ,  $\lambda_{em_{max}} = 670nm$ ) und Alexa 647 ( $\lambda_{ex_{max}} = 650nm$ ,  $\lambda_{em_{max}} = 665nm$ ) verwendet [HMK<sup>+</sup>05], welche zwischen ihrem jeweiligen fluoreszenten Zustand und dem nicht fluoreszenten Triplet-Zustand durch simultane Beleuchtung mit Laserlicht der Wellenlänge  $\lambda_{ex} = 514nm$  (unterstützt die Rückkehr in den fluoreszenten Zustand) und  $\lambda_{ex} = 647nm$  (zur Fluoreszenzanregung und zum Ausbleichen) umgeschaltet werden können. Die Verweildauer im fluoreszenten Zustand kann mittels der Laserintensität kontrolliert werden, genau so wie die Anzahl der Moleküle im fluoreszenten Zustand. Die Lebensdauer des Triplet-Zustandes muss durch Sauerstoffabfuhr verlängert werden, damit dieser wesentlich langlebiger als der fluoreszente Zustands des Moleküls ist und somit eine optische Isolation der individuellen Signale erreicht werden kann. Es wurde gezeigt, dass unter Verwendung verschiedener Sauerstoff reduzierender Substanzen für diese Methode alle Rhodamin- und Oxazin- basierten Farbstoffe, sowie Alexa 647, Cy3 und Cy5, deren Absorptionsmaximum im Spektralbereich von  $\lambda_{ex} = 514nm - 700nm$  liegt, geeignet sind [HvdLMS09]. Mehrfarbenexperimente [vdLEM<sup>+</sup>09], sowie Dynamikuntersuchungen *in vitro* und *in vivo* [EvdLW<sup>+</sup>10, WHvdL<sup>+</sup>10], welche aufgrund

des langlebigen Triplet-Zustandes von Alexa 647 unter intrazellulären Bedingungen möglich sind, können mit dieser Methode ebenfalls durchgeführt werden.

Durch das reversible Schalten können die zu untersuchenden Strukturen im Vorfeld der jeweiligen Lokisationsaufnahme beobachtet werden. Bei dicht markierten Strukturen gestaltet sich eine nachträgliche Zuweisung der Einzelmolekülsignale zu einem bestimmten Fluorophor als schwierig.



## 4 Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroskope

An dieser Stelle sollen die während dieser Arbeit verwendeten und zum Teil neu aufgebauten Mikroskopsysteme beschrieben werden. Des Weiteren wird die Software zur Datenerfassung vorgestellt.

### 4.1 Der experimentelle Lokalisationsaufbau

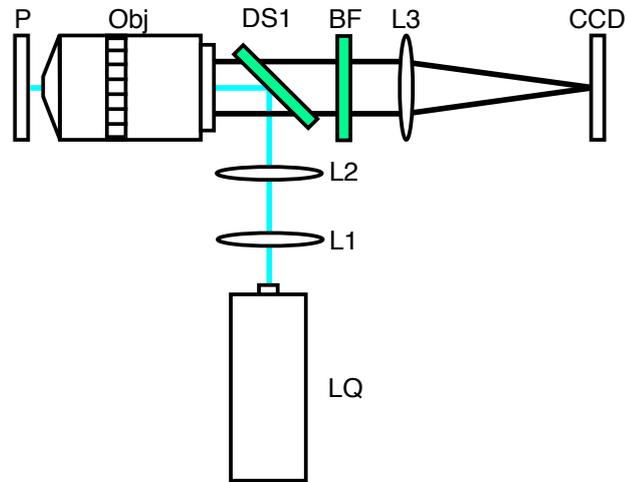
Als erster Aufbau zur Durchführung von Lokalisationsexperimenten wurde der in Abb. 4.1 schematisch dargestellte Aufbau genutzt. Als Lichtquelle stehen hier drei Gaslaser zur Verfügung, ein  $\text{Ar}^+$ -Ionen-Laser, dessen Emissionswellenlänge bei  $\lambda_{em} = 488.0\text{nm}$  liegt (Lexel<sup>1</sup>, Model 95) und weiterhin zwei  $\text{Kr}^+$ -Ionen-Laser (ebenfalls Lexel, Model 95), von denen einer bei  $\lambda_{em} = 568.2\text{nm}$  und der andere bei  $\lambda_{em} = 647.1\text{nm}$  emittiert. Diese Anregungslinien können separat in den Aufbau eingekoppelt werden. Die Linse L2 fokussiert den Strahl in die hintere Brennebene des Objektivs (Leica<sup>2</sup> HCX PL APO 100x/1.40), so dass die Probe kollimiert beleuchtet wird. Zur Erhöhung der Leistungsdichte in der Probe wurde zusätzlich die langbrennweitige ( $f = 350\text{mm}$ ) Linse L1 in den Anregungsstrahlengang gebracht, deren Fokusebene noch vor der hinteren Fokusebene der Linse L2 liegt, was in einer Verkleinerung des Strahldurchmessers in der Fokusebene des Objektivs resultiert. Das dort emittierte Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv detektiert und durch den dichroitischen Strahlteiler (DS1, AHF<sup>3</sup>, F63-488) transmittiert. Ein weiterer optischer Filter (BF) reflektiert eventuelle Reste des Anregungslichtes. Es stehen hierfür mehrere Filter zur Verfügung, welche in ein Filterrad eingebaut wurden. Dieses Filterrad ist von der optischen Bank entkoppelt, um Störungen beim Filterwechsel zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messungen etwa der selben Zelle zu vermeiden. Die entsprechenden Filter sind: 1. Tripel-Bandpass-Filter (AHF, F62-568), 2. GFP-Bandpass-Filter ( $525 \pm 25\text{nm}$ , AHF, F42-017), 3. 580 nm Langpass-Filter (AHF, F42-580), 4. Doppel-Bandpass-Filter (AHF, F54-488). Über die Tubuslinse L3 wird das kollimierte Fluoreszenzlicht auf eine 12 bitCCD-Kamera (pco<sup>4</sup>, SensiCam qe)

<sup>1</sup>LEXEL Laser Division, Cambridge Lasers Laboratories, Inc., Fremont, CA 94539 United States

<sup>2</sup>Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, 35578 Wetzlar

<sup>3</sup>AHF Analysentechnik AG, 72005 Tübingen

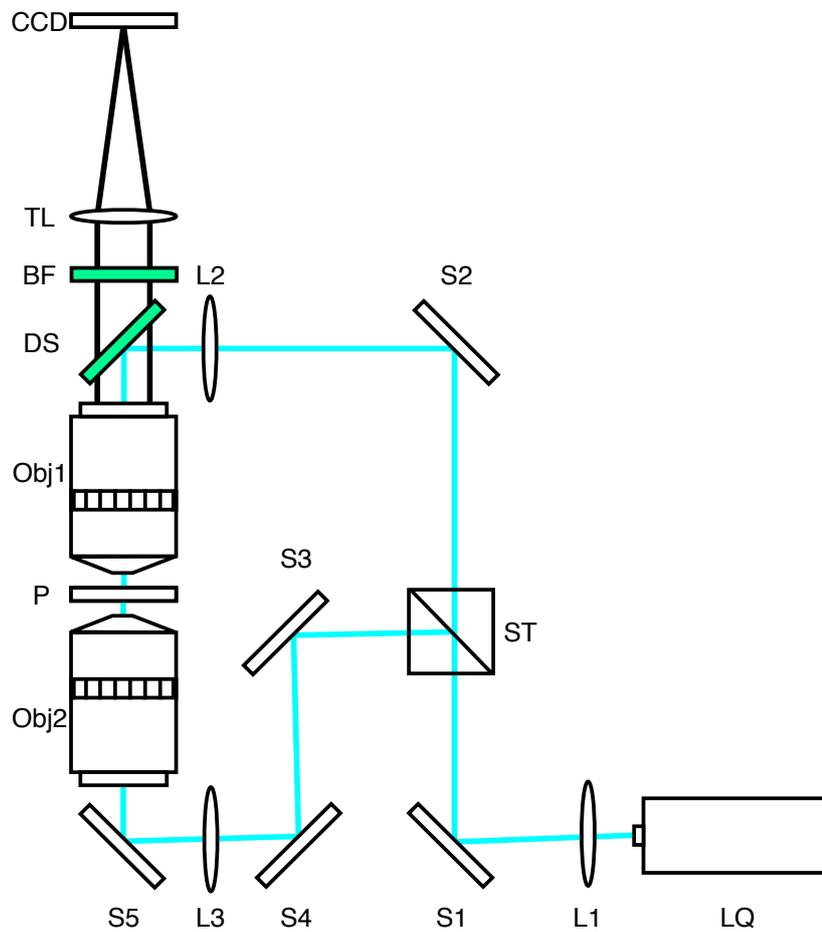
<sup>4</sup>pco AG, 93309 Kelheim



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung des Lokalisationsaufbaus. Das Anregungslicht der Lichtquelle LQ wird über die Linse L2 und den dichroitischen Strahlteiler DS1 in die hintere Fokusebene des Objektivs fokussiert, was zu einer kollimierten Beleuchtung der Probe führt. Mit Hilfe der Linse L1 wird der Durchmesser der Beleuchtung in der objektseitigen Fokusebene des Objektivs reduziert, was zu einer Erhöhung der Leistungsdichte führt. Das Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv detektiert und am dichroitischen Strahlteiler für die Einkopplung der Laseranregung transmittiert. Ein zusätzlicher optischer Filter (BF) verhindert, dass Licht der Anregungswellenlänge in den Detektionsstrahlengang gelangt. Mittels der Tubuslinse L3 wird das Fluoreszenzlicht auf den CCD-Chip der Kamera fokussiert.

mit einer Quanteneffizienz von  $\eta \approx 65\%$  und einem A/D Konversionsfaktor von 2 abgebildet. Die Kamera besitzt  $1376 \times 1040$  quadratische Pixel mit einer Ausdehnung von  $6.45\mu m$ . Durch die  $100\times$  Vergrößerung des Objektivs entspricht die Ausdehnung eines Pixels  $64,5nm$  im Objektraum.

Die Probe kann vor dem Objektiv durch einen durch Schrittmotoren bewegten 3-Achsen-Verschiebetisch (ZSS 42-200, PI<sup>5</sup>, Controller mc2000, ITK<sup>6</sup>) in allen drei Raumrichtungen positioniert werden. Entlang der optischen Achse ist zusätzlich noch die Positionierung durch ein Piezoaktor (PI, Controller P.864.00, PI) möglich.



**Abbildung 4.2:** Schematischer Aufbau des SMI-Vertico. Der Strahlteiler ST teilt das Anregungslicht im Verhältnis 1:1 in einen transmittierten und einen orthogonal zu diesem reflektierten Strahl. Diese werden jeweils über die Linsen L2 und L3 in die hinteren Fokusebenen der gegenüberstehenden Objektivlinsen Obj1 und Obj2 fokussiert, um im Objektraum kollimierte Strahlbündel zu erhalten. Durch vertikales versetzen des Strahlteilers ST und des Spiegels S3 kann eine Angleichung der oberen und unteren optischen Weglänge erfolgen, um die Interferenz beider Strahlen im Objektraum auch bei Anregungslicht mit kurzer Kohärenzlänge zu ermöglichen.

## 4.2 Das SMI Vertico

Das SMI Vertico [Rey08, RBG<sup>+</sup>08, Lem09] (siehe Abb. 4.2) wurde ebenfalls um die Möglichkeit erweitert, Lokalisationsmessungen durchzuführen [KLGW09, LGW<sup>+</sup>09, LGB<sup>+</sup>08]. Hierzu wurde ebenfalls eine langbrennweitige Linse ( $f = 700mm$ ) in den Anregungsstrahlengang gebracht. Für die Anregung stehen hier zwei diodengepumpte Festkörperlaser (Coherent<sup>7</sup>, Sapphire 488 LP und Sapphire 568 LP) zur Verfügung, einer mit  $\lambda_{em} = 488,0nm$  und der andere mit  $\lambda_{em} = 568,0nm$ . Die Besonderheit dieses Aufbaus ist, dass hier die Probe von beiden Seiten kollimiert beleuchtet wird, wobei die beiden gegenläufigen Strahlen an der Position der Probe interferieren und sich ein stehendes Wellenfeld ausbildet, dessen Modulation sinusförmig in Richtung der optischen Achse erfolgt. Die Phase dieses Wellenfeldes kann mit einem Piezoaktor, welcher den Spiegel S2 rechtwinklig zu dessen Spiegelfläche versetzt, eingestellt werden. Zusätzlich kann die Position der Probe in axialer Richtung ebenfalls durch einen Piezoaktor geändert werden. Dies führt zu einer Modulation der beobachteten Objekte. Durch einen Phasenscan kann die Position und durch einen Objektskan die Ausdehnung entlang der optischen Achse bestimmt werden. Die Detektion erfolgt wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, als dichroitischer Strahlteiler wird hier ein Dualband Strahlteiler (AHF, F53-482 und als optischer Filter wahlweise ein GFP-Bandpassfilter( $525 \pm 20nm$ , Laser Components<sup>8</sup>, XF3003) oder ein Dualbandfilter (AHF, F54-568) eingesetzt.

## 4.3 Der Zweifarbenaufbau

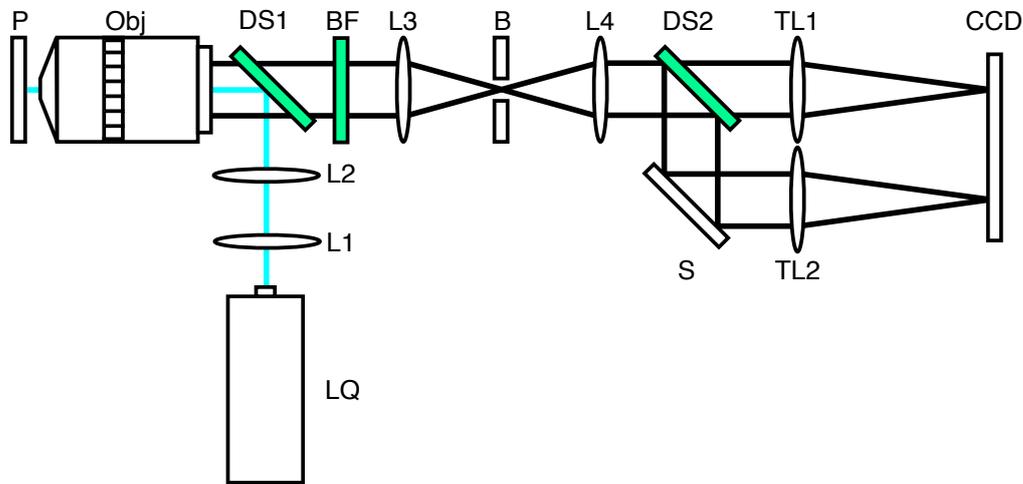
Bisherige Lokalisationsaufnahmen von Präparaten, in denen zwei oder mehr Strukturen gleichzeitig fluoreszenzmarkiert waren, erfolgten bisher sequentiell, da zum einen mit unterschiedlichen Wellenlängen und Anregungsintensitäten angeregt werden musste, zum anderen aufgrund von Überlagerungen der Emissionsspektren und somit gleichzeitiger Detektion in die entsprechenden durch optische Filter auswählbaren Farbkanälen zunächst der Farbstoff ausgebleicht werden musste, der im langwelligeren Emissionsbereich fluoresziert. Auch die Möglichkeit des Förster Resonanz Energietransfers [JEJ03] musste berücksichtigt werden. Falls dieser Effekt auftreten kann, muss ebenfalls zunächst der Akzeptor lokalisiert und damit ausgebleicht werden. Ein weiterer Nachteil resultierte aus der chromatischen Verschiebung bei der Verwendung von Farbstoffen, deren Wellenlängen im Emissionsmaximum um  $\Delta\lambda \approx 100nm$  voneinander getrennt sind, was in einem Versatz von bis zu  $50nm$  lateral und  $250nm$  axial resultieren kann.[HRCS93, EC00, KM00]

<sup>5</sup>Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG, 76228 Karlsruhe/Palmbach

<sup>6</sup>ITK Dr. Kassen GmbH, 35633 Lahnau

<sup>7</sup>Coherent Inc., Santa Clara, CA 95054 USA

<sup>8</sup>Laser Components GmbH, 82140 Olching



**Abbildung 4.3:** Schematische Darstellung des neu entwickelten Zweifarbenaufbaus. Als Lichtquelle (LQ) steht ein  $\text{Ar}^+$ -Ionen Laser zur Verfügung, dessen 488,0 nm - Linie über den dichroitischen Strahlteiler DS1 in das Objektiv Obj eingekoppelt wird. Die Einfokussierlinse L2 und das Objektiv bilden einen Kollimator, über die konvexe Linse L1 wird zusätzlich der Strahldurchmesser auf der Probe minimiert und dadurch die Intensität erhöht. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv detektiert und durch den dichroitischen Strahlteiler DS1 transmittiert. Ein optischer Filter (BF) verhindert zusätzlich, dass Anregungslicht in den Detektionsstrahlengang gelangt. Mit Hilfe der Linsen L3 und L4 wird eine Strahlverkleinerung und damit eine Erhöhung des Dispersionswinkels realisiert. Im Fokus dieser beiden Linsen wird das Fluoreszenzlicht in einem Zwischenbild abgebildet, welches man durch die Blende B beschneiden kann. Über den dichroitischen Strahlteiler DS2 wird das Fluoreszenzlicht wellenlängenabhängig in zwei Anteile zerlegt, welche durch die beiden identischen Tubuslinsen TL1 und TL2 auf dem CCD abgebildet werden.

Um all diese Probleme zu vermeiden, wurde ein neuer Aufbau entwickelt, mit dem zwei Arten von Fluorophoren, deren Emissionsspektren spektral benachbart sind und sich zum Teil auch überlappen, gleichzeitig detektiert und trotzdem voneinander separiert werden können. Schematisch ist dieser Aufbau in Abb. 4.3 dargestellt. Beide Fluorophore werden hierbei mit der selben Lichtquelle zur Fluoreszenz angeregt. Hierzu wurde ein  $\text{Ar}^+$ -Ionen-Laser (Coherent, Innova 310) verwendet, welcher im Resonator keine Wellenlängenselektion implementiert hat, also im *multiline* Mo-

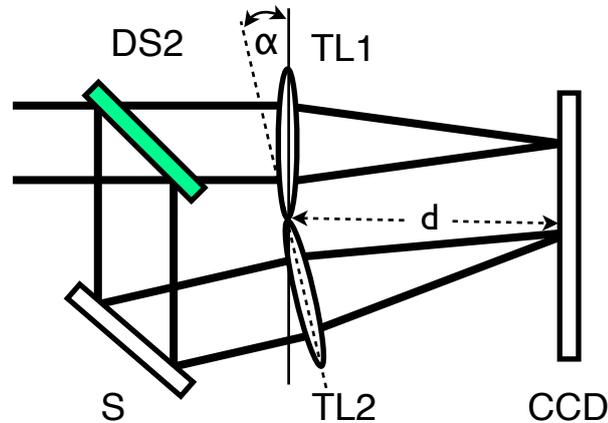


Abbildung 4.4: Winkel zwischen den beiden Tubuslinsen.

dus betrieben wird, verwendet. Mittels eines gleichseitigen Prismas wurde nach dem Auskoppelspiegel die 488,0 nm Linie dieses Lasers selektiert. Hierzu wurde der Laserstrahl, nachdem er das Prisma passiert hatte, entlang des Laserresonators einmal gefaltet und die unerwünschten Emissionswellenlängen blockiert. Über weitere Spiegel, zwei Blenden, einen mechanischen Lasershutter und einem in den Strahlengang einklappbaren Intensitätsfilter (Transmission  $T = 1.46\%$ ) wurde die selektierte Laserlinie dann in den Aufbau eingekoppelt. Der Lasershutter und der Intensitätsfilter sind hierbei über die serielle Schnittstelle eines PCs ansteuerbar oder wahlweise manuell zu bedienen. Es handelt sich hierbei um Eigenbauten aus ausrangierten Leseköpfen von handelsüblichen Computerfestplatten [Lem07, Gun07]. Das kollimierte Anregungslicht wird mittels der Linse L2 in die hintere Fokusebene des Objektivs (Leica, HCX Plan 63x NA 1,4) fokussiert, die Probe (P) wird also kollimiert beleuchtet. Zur Erhöhung der Intensität auf der Probe wird zusätzlich eine langbrennweitige ( $f = 650\text{mm}$ ) Linse (L1) in den Strahlengang gebracht, deren Fokuspunkt etwas vor dem Fokuspunkt der Linse L2 liegt. Dies bewirkt eine Verkleinerung des Strahldurchmessers und damit eine Erhöhung der Anregungsintensität in der Fokusebene des Objektivs. Aufgrund der Selektion der 488nm Linie, sowie durch Leistungsverluste an den Spiegeln und Linsen im Strahlengang beträgt die in der Fokusebene ankommende Laserleistung  $P_{Bel} = 15\text{mW}$  (bei einer Ausgangsleistung des Lasers von  $P_{Laser} = 100\text{mW}$ ). Durch Bündelung mit der zusätzlichen Linse ist diese im Objektraum auf eine Fläche von  $\sim 180\mu\text{m}^2$  konzentriert, was einer Leistungsdichte von  $\sim 848\text{W}/\text{cm}^2$  entspricht ( $\sim 12\text{W}/\text{cm}^2$  mit Intensitätsfilter). Das vom Objektiv detektierte Fluoreszenzlicht passiert den dichroitischen Strahlteiler DS1 (AHF, F33-492), ein optischer Filter (AHF, F42-018) verhindert, dass Anregungslicht in

de Detektionsstrahlengang gelangt. Über das Linsensystem L3 ( $f = 100\text{mm}$ ) und L4 ( $f = 30\text{mm}$ ), deren Fokuspunkte zusammenfallen, wird eine Strahlverkleinerung realisiert, was zu einer Vergrößerung des Dispersionswinkels und damit zu einer Vergrößerung auf dem CCD-Sensor (Andor<sup>9</sup>. iXon<sup>EM</sup> + EMCCD DU-897) führt. Im Fokuspunkt dieser beiden Linsen entsteht ein Zwischenbild, dessen Ausmaße über eine Blende (B) eingeschränkt werden können. Danach wird mit Hilfe des dichroitischen Strahlteilers DS3 (AHF, F48-505) ein Teil des Fluoreszenzlichtes ausgekoppelt. Die beiden identischen Tubuslinsen TL1 und TL2 bilden den transmittierten und den ausgekoppelten Teil des Fluoreszenzlichtes separat auf dem CCD ab. Hierbei ist zu beachten, dass die Öffnung der Blende B im Zwischenbild klein genug gewählt wird, damit die beiden Abbildungen auf dem CCD-Sensor nicht überlagern. Das Bild des ausgekoppelten Strahlengangs ist hierbei leicht gegenüber dem ursprünglichen Bild verzerrt, da dies unter einem Winkel von etwa  $13^\circ$  gegenüber dem Lot auf dem CCD abgebildet wird. Dies muss bei der Positionsbestimmung berücksichtigt werden. Der ausgekoppelte Strahlengang soll nur zur Identifikation des Fluorophors über das Verhältnis in transmittiertem und reflektiertem Kanal verwendet werden. Der gesamte Detektionsstrahlengang wurde mit dem Mikrobank-System (Linos Photonics<sup>10</sup>) realisiert.

Die CCD-Kamera ist eine rückseitig beleuchtete (engl. *back-illuminated*) EM-CCD-Kamera, mit einer Bittiefe von 14/16 bit, abhängig von der gewählten Auslesegeschwindigkeit. Durch die rückseitige Beleuchtung wird ein Intensitätsverlust an den Elektroden vermieden. Somit wird eine Quanteneffizienz von  $\eta > 90\%$  erreicht. Durch die zusätzliche Elektronenverstärkung (siehe auch Abschnitt 2.3) können, bei geringem Hintergrund, sehr lichtschwache Signale beobachtet werden. Der Sensor besteht aus  $512 \times 512$  Pixeln, mit einer jeweiligen Größe von  $16\mu\text{m}$ . Hieraus resultiert, mit der Vergrößerung des Objektivs von  $63\times$  und den Linsen L3 und L4, welche eine Vergrößerung von  $3.33\times$  bewirken, dass eine Ausdehnung eines Pixels der Kamera in x- und y-Richtung  $76.2\text{ nm}$  im Objektraum entspricht. Der gesamte Bildbereich kann mit einer Bildtransferrate von  $35\text{ fps}$  ausgelesen werden, bei der Wahl eines kleineren Bildbereichs ist diese Rate entsprechend höher. Die Positionierung der Probe vor dem Objektiv erfolgt analog zum in Abschnitt 4.1 beschriebenen experimentellen Lokalisationsaufbau (Piezo-Controller E-500, PI). Realisiert und Kalibriert wurde dieser Aufbau zusammen mit Sebastian Pres im Rahmen seiner während dieser Arbeit betreuten Bachelorarbeit [Pre10].

### 4.3.1 Software

Die Ansteuerung der Hardware wurde von Dr. David Baddeley in Python implementiert [Bad07]. Mit dieser Software ('PySMI') ist es möglich, Kamera, Lasershutter,

<sup>9</sup>ANDOR Technology, Belfast BT12 7AL, United Kingdom

<sup>10</sup>Quioptiq, 75647 Paris Cedex 13

Schrittmotor und Piezoaktoren anzusprechen. Die Positionen der Piezoaktoren kann durch Schieberegler gesteuert werden, die Schrittmotoren werden referenziert und können durch einen Joystick bedient werden, dessen Geschwindigkeit sich einstellen lässt. Die Kamera wird im Vorschaumodus permanent ausgelesen und das aktuelle Bild angezeigt, der optimale dynamische Bereich der Anzeige wird automatisch ermittelt, kann aber auch manuell angepasst werden. Mehrfarbenaufnahmen werden durch die sequentielle Aufnahme in einzelne Bildkanäle realisiert, die Anzahl der Kanäle kann von 1-4 eingestellt und die Lasershutter entsprechend konfiguriert werden. Die Belichtungszeit für jeden Farbkanal kann über einen Schieberegler in  $1ms$ -Schritten von  $1ms$  –  $10s$  eingestellt werden. Es ist möglich, einen Bildbereich (engl. *region of interest*, ROI) zu wählen. Als Aufnahmemodi stehen Einzelbildaufnahmen, Zeitserien oder 3D-Bildstapel mit einstellbarer Schrittweite des Piezoaktors entlang der optischen Achse zur Verfügung. Eine Weiterentwicklung, welche die erweiterten Konfigurationsmöglichkeiten des EMCCD-Sensors berücksichtigt, ist die ebenfalls von Dr. Baddeley entwickelte Software 'PyMe'. Hier ist es zusätzlich möglich, die Temperatur des EM-CCD-Sensors festzulegen (bis  $-90^{\circ}C$ ), den Elektronenverstärkungsfaktor zu wählen, die Verschiebefrequenzen in horizontaler und vertikaler Richtung einzustellen, die Daten direkt auf die Festplatte zu schreiben (hierdurch ist die Größe des Datenstapels nicht mehr durch den Arbeitsspeicher begrenzt) und verschiedene Aufnahmeskripte auszuführen.

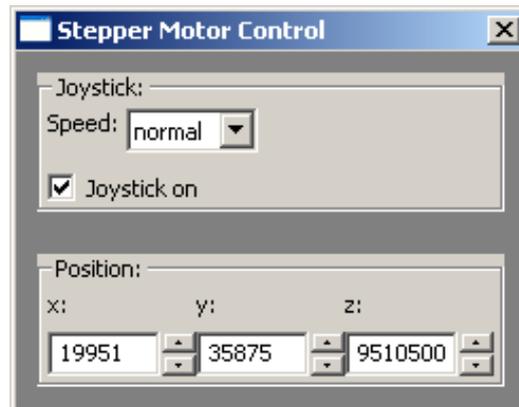
Die Daten können entweder im Khoros Datenformat (kdf) mit zusätzlicher Logdatei oder, im Fall der EMCCD als HDF5-Datei (*hierarchical data format*<sup>11</sup>) gespeichert werden. Die Logdatei enthält Informationen über Start- und Endzeit der Messung, sowie die gewählte ROI der CCD und die Positionen der drei Achsen des Schrittmotors und des Piezoaktors (bei 3D-Messungen noch zusätzlich dessen Schrittweite).

#### 4.3.2 Ansteuerung des Schrittmotors

Die Ansteuerung des Schrittmotorkontrollers wurde in Python neu geschrieben und mit einer grafischen Benutzeroberfläche ausgestattet (Abbildung 4.5). Der Controller wird über die Serielle Schnittstelle (EIA-232) angesprochen. Zunächst werden alle drei Achsen referenziert, indem die Schrittmotoren den Verschiebetisch so lange in negativer Richtung verschieben, bis dieser die jeweiligen Endkontakte auslöst. Hierbei ist in jedem Fall darauf zu achten, dass der Probenhalter nicht auf dem Verschiebetisch platziert ist, um Schäden am Objektiv zu vermeiden. Eine entsprechende Warnmeldung wird vor Ausführung des Prozesses ausgegeben und muss bestätigt werden. Dann wird der Verschiebetisch in positiver Richtung bis zu den jeweiligen zweiten Endkontakten bewegt. Ist dieser Prozess abgeschlossen, ist es möglich, den an den Controller angeschlossenen Joystick zu aktivieren und dessen Geschwindigkeit

---

<sup>11</sup>[www.hdfgroup.org](http://www.hdfgroup.org)



**Abbildung 4.5:** GUI der Schrittmotoransteuerung. Die grafische Benutzeroberfläche (engl. *graphical user interface*) wurde in wxPython implementiert.

einzustellen. In der Benutzeroberfläche sind drei Geschwindigkeitsstufen ('langsam', 'mittel' und 'schnell') auswählbar. Die x-, y- und z-Position wird angezeigt, und kann in der Benutzeroberfläche durch die Pfeiltasten oder direkte Eingabe einer Position an die Schrittmotoren zurückgegeben werden.



# 5 Algorithmen zur Datenauswertung

Um aus den aufgenommenen Rohdaten die Positionsinformationen der Einzelmoleküle zu erhalten, diese in geeigneter Weise darzustellen und aus der Analyse der Daten weitere Informationen zu erhalten, wurden verschiedenen Algorithmen entwickelt und angewandt. Diese sollen in diesem Kapitel vorgestellt und ihre Funktionsweise erklärt werden. Alle Algorithmen wurden mit der Software Matlab (The MathWorks<sup>1</sup>) implementiert und können über Kommandozeilenbefehle aufgerufen werden. Für einige existieren zusätzlich graphische Benutzeroberflächen (engl. *graphical user interfaces*, GUIs).

## 5.1 Auswertung der Daten

Um aus den Rohdaten Positionsinformationen zu extrahieren, müssen diese gegebenenfalls zunächst aufbereitet und um ein eventuell vorhandenes Hintergrundsignal bereinigt werden. Die Daten bestehen aus einer Zeitserie aus in der Regel mehreren tausend sequentiellen Einzelaufnahmen. Jedes Bild dieses Datenstapels wird auf potentielle Einzelmolekülsignale untersucht und deren Position grob bestimmt. An der entsprechenden Stelle wird ein Segment aus dem Datenstapel entnommen, an welches eine Modellfunktion, in diesem Fall eine zweidimensionale Gaußfunktion mit zusätzlichem Hintergrundterm, angepasst wird. Aus den Parametern der Modellfunktion und deren aus der Anpassung resultierenden Fehlern kann man die Positionen und die Ungenauigkeiten der Signale, sowie eine Abschätzung über die Anzahl der detektierten Photonen erhalten. All dies erfolgte mit dem Skript 'spdm' [Lem09].

### 5.1.1 Datenaufbereitung

Nachdem ein Datenstapel in der Arbeitsumgebung von Matlab geladen wurde, kann dieser segmentiert und die Einzelmolekülpositionen bestimmt werden. Bei stark hintergrundbehafteten Signalen empfiehlt es sich, zunächst ein Differenzenbild  $I'$  des Datenstapels  $I$  zu erstellen:

$$I'(x, y, n) = I(x, y, n) - I(x, y, n + 1), \quad n = 1 \dots N-1. \quad (5.1)$$

---

<sup>1</sup>The MathWorks Inc., Natick, MA 01760-2098, United States

Hierbei ist  $N$  die Anzahl der Einzelbilder im Datenstapel. Sind die Daten frei von einem zusätzlichen Hintergrund, kann man auf diesen Schritt verzichten. Um eine korrekte Abschätzung des Signalrauschens zu ermöglichen, wird die von der Kamera ausgegebene Signalstärke  $I_{count}$  noch mit dem Verstärkungsfaktor der Kamera  $c_{CCD}$  in die Anzahl tatsächlich detektierter Photoelektronen  $I_{e^-}$  umgerechnet:

$$I_{e^-}(x, y, n) = c_{CCD} \cdot I_{count}(x, y, n), \quad n = 1 \dots N. \quad (5.2)$$

### 5.1.2 Segmentierung

Die Segmentierung des Datenstapels in einzelne *regions of interest* (ROIs), welche jeweils ein isoliertes Einzelmolekülsignal enthalten, erfolgt mittels einer modifizierten Version des Skriptes 'ofind' [Bad07]. Dies beruht auf dem für die Radioastronomie entwickelten 'clean'-Algorithmus [Hög74, Cla80]. Dabei werden durch einen Bandpassfilter [Jäh05] in einem einzelnen Bild zunächst Strukturen entfernt, welche zu klein sind, als dass sie durch den Aufbau übertragen werden können (Rauschen) und welche wesentlich größer als ein Einzelmolekülsignal sind (Hintergrund):

$$I_{BP} = I \otimes g(\sigma_{rausch}) - I \otimes g(\sigma_{hintergr}), \quad (5.3)$$

wobei  $g(\sigma)$  jeweils ein Gaußkernel ist, dessen Standardabweichung der Größe der zu filternden Struktur entspricht. Der Maximalwert des Bildes und dessen Position werden inkrementell ermittelt und gespeichert und an dieser Stelle die System-PSF mit entsprechender Amplitude subtrahiert:

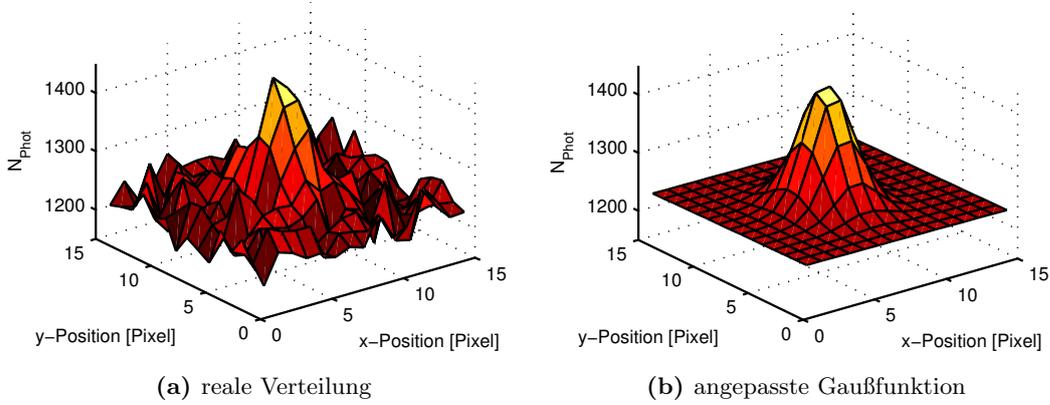
$$I_{BP} = I_{BP} - \max(I_{BP}) \cdot (\delta(x_{max}, y_{max}) \otimes PSF). \quad (5.4)$$

Als Abbruchbedingung wird eine minimale Signalamplitude angegeben. Dieser Algorithmus wurde von Dr. Baddeley noch derart angepasst, dass der Bereich zwischen minimaler Signalamplitude und Maximalwert des Bildes in fünf (oder wahlweise mehr) Bereiche eingeteilt wird, so dass nicht für jedes einzelne Signal die Amplitude bestimmt und die Faltung durchgeführt werden muss. Hierdurch kann die Segmentierung wesentlich beschleunigt werden.

Ein kritischer Parameter bleibt die Abschätzung der minimalen Signalamplitude. Hierfür wurde von Dr. Lemmer eine automatische Schwellwertanpassung implementiert, bei der vor Ausführung von 'spdm' vom Benutzer die Anzahl der Signale pro Bild grob abgeschätzt werden muss. Aus diesem Wert wird der Schwellwert empirisch ermittelt.

### 5.1.3 Anpassung der Modellfunktion

Mit Hilfe des Levenberg-Marquadt-Algorithmus zur Lösung nichtlinearer Ausgleichs-Probleme (siehe Abschnitt 3.2) kann die Position der Einzelmolekülsignale, sowie



**Abbildung 5.1:** Anpassung einer Modellfunktion an die Daten zur Bestimmung der Positionen. Links ist ein aufbereitetes Einzelmolekülsignal zu sehen, rechts die entsprechende Anpassung einer 2D-Gaußfunktion mit zusätzlichem Hintergrundterm. Die Ausdehnung eines Pixels beträgt  $65\text{nm}$  in x- und y-Richtung.

deren Genauigkeit ermittelt werden. Hierzu wird an den zuvor bestimmten Positionen eine ROI von  $15 \times 15$  Pixeln aus dem Datenstapel  $I_{e^-}$  extrahiert und als Modellfunktion eine zweidimensionale Gaußsche Normalverteilung mit zusätzlichem Hintergrundgradienten,

$$f(x, y, \mathbf{p}) = p(1) \cdot \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \left( \frac{x - p(2)}{p(4)} \right)^2 + \left( \frac{y - p(3)}{p(5)} \right)^2 \right) \right] \quad (5.5)$$

$$+ p(6) + p(7)(x - p(2)) + p(8)(y - p(3)),$$

an die Daten angepasst. Als Startparameter werden

$$p(1) = \max(I_{ROI}) - \min(I_{ROI}) \quad \text{Signalamplitude} \quad (5.6)$$

$$p(2) = \{x | I_{ROI}(x, y) = \max(I_{ROI}(x, y))\} \quad \text{x-Position des Maximums} \quad (5.7)$$

$$p(3) = \{y | I_{ROI}(x, y) = \max(I_{ROI}(x, y))\} \quad \text{y-Position des Maximums} \quad (5.8)$$

$$p(4) = p(5) = \frac{1}{2.35} \frac{\lambda}{2NA} \text{pixel}^{-1} \quad \text{Standardabweichung} \quad (5.9)$$

$$p(6) = \min(I_{ROI}) \quad \text{Hintergrund} \quad (5.10)$$

$$p(7) = p(8) = 0.01 \quad \text{Hintergrundgradient} \quad (5.11)$$

gewählt (siehe auch Abbildung 5.1). Anschließend werden die ermittelten Parameter nach folgenden Kriterien gefiltert: Alle Parameter besitzen reale, nicht unendliche

Werte, die Amplitude  $p(1)$  liegt um den Faktor 7 über dem Hintergrundrauschen, die Standardabweichung  $p(4)$  und  $p(5)$  ist in beide Richtungen kleiner als 150 nm, beide Werte weichen nicht um mehr als 40% voneinander ab und die Lokalisationsgenauigkeit  $\frac{p(4)+p(5)}{2}$  liegt unterhalb eines festzulegenden Wertes (maximal 70 nm). Treffen alle diese Bedingungen zu, wird aus der Quanteneffizienz  $\eta$  der Kamera und den Fitparametern die Anzahl der detektierten Photonen abgeschätzt:

$$N_{Phot} = p(1) \cdot \eta^{-1} \cdot \iint \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \left( \frac{x}{p(4)} \right)^2 + \left( \frac{y}{p(5)} \right)^2 \right) \right] dx dy. \quad (5.12)$$

Die Ergebnisse werden in einer Tabelle mit den Spalten

$$(p(1)|p(2)|p(3)|\Delta p(2)|\Delta p(3)|p(4)|p(5)|p(6)|N_{Phot}|n)$$

gespeichert, welche im folgenden als 'Orte-Matrix' bezeichnet wird.

## 5.2 Visualisierungen

Da die Lokalisationsdaten auf Berechnungen zur Positionsbestimmung aufgrund einer Zeitserie basieren, können sie in verschiedener Weise dargestellt werden. Hier sollen die in dieser Arbeit verwendeten Darstellungsmethoden vorgestellt werden, wie sie der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehen [Lem09]. Neben diesen existieren noch weitere Möglichkeiten, Lokalisationsdaten zu visualisieren [BCS10].

### 5.2.1 Orte2Bild

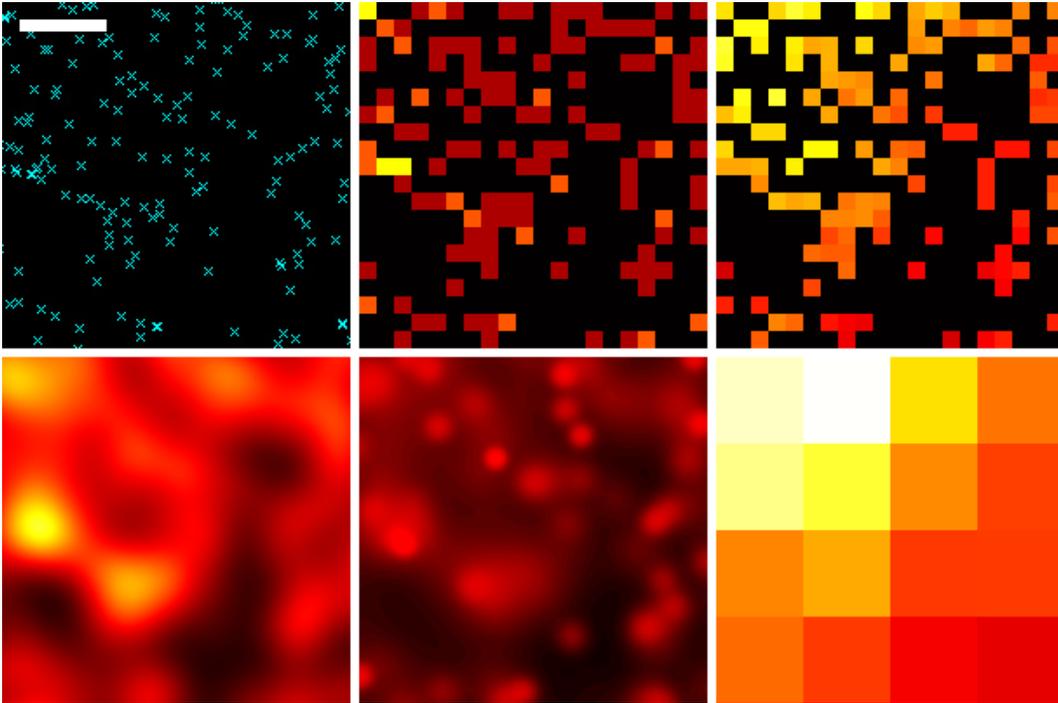
Um aus den  $N$  Positionsinformationen in der Orte-Matrix ein Bild zu erstellen, wird zunächst die Pixelgröße  $pixel$  des Bildes gewählt und dann eine  $m \times n$  Matrix *Bild* mit Nulleinträgen erzeugt, wobei  $m = \max(p(2)/pixel)$  und  $n = \max(p(3)/pixel)$  ist, jeweils auf ganze Zahlen aufwärtsgerundet. Ein Eintrag in dieser Matrix ist dann die Summe der in diesen Pixel fallenden Positionen

$$bild_{i,j} = \sum_{k=1}^N \delta \left( \frac{p(2)}{pixel} - i, \frac{p(3)}{pixel} - j \right), \text{ mit der Deltafunktion} \quad (5.13)$$

$$\delta = \begin{cases} 1 & \text{für } 0 < \frac{p(2)}{pixel} - i \leq 1 \text{ und } 0 < \frac{p(3)}{pixel} - j \leq 1 \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (5.14)$$

In Abbildung 5.2 (obere Reihe Mitte) ist dies beispielhaft für die links daneben gezeigten Positionen dargestellt.

Möchte man die Positions- oder Lokalisationsgenauigkeit ebenfalls in dem Bild repräsentieren, so kann man dieses noch mit einem Gaußkern  $g(\sigma)$  falten, dessen Standardabweichung der mittleren Lokalisationsgenauigkeit (angepasst auf die



**Abbildung 5.2:** Beispiel für die verschiedenen Visualisierungsmöglichkeiten, wie sie im Text beschrieben sind. Obere Reihe: Positionen, Orte2Bild, Nachbarlabel. Untere Reihe: Orte2Bild (mit Repräsentation der Lokalisationsgenauigkeit), Orte2StdBild und Orte2WFBild. Maßstab:100nm.

gewählte Pixelgröße)  $\sigma = \left( \sum_{k=1}^N \frac{p^{(4)}+p^{(5)}}{2} \right) \cdot \text{pixel}^{-1}$  entspricht. Das Lokalisationsbild  $L$  ergibt sich also aus  $L = \text{Bild} \otimes g(\sigma)$ . Dies ist in Abbildung 5.2 (untere Reihe links) beispielhaft gezeigt.

### 5.2.2 Orte2StdBild

Eine weitere Möglichkeit der Darstellung ist es, jede Position durch eine normierte Gauß-Verteilung zu repräsentieren, deren Standardabweichung der Lokalisationsgenauigkeit der individuellen Positionen entspricht. Hierzu wird die Orte-Matrix segmentiert nach Positionsgenauigkeiten von 2-70nm (in 2nm-Schritten) und für jedes Intervall ein Lokalisationsbild mit der entsprechenden Genauigkeit erstellt. Dann

wird über alle Lokalisationsgenauigkeiten summiert:

$$L_{ind} = \sum_{k=1}^{35} Bild_{2k} \otimes g(2k/pixel). \quad (5.15)$$

### 5.2.3 Orte2WFBild

Möchte man die Ergebnisse der Lokalisationsmessung mit einer Weitfeldaufnahme der gleichen Struktur vergleichen, so kann man die Signalstärke  $s$  und den Hintergrund  $b$  aus dem Weitfeldbild abschätzen, mit Orte2Bild ein aus den Lokalisationsdaten berechnetes Bild mit kleiner Pixelgröße  $ps1$  erstellen und dies mit einer entsprechenden Airyscheibe (siehe Abschnitt 2.1.5) falten. Aus diesem kann man ein Bild mit der Pixelgröße  $ps2 = a \cdot ps1$ ,  $a \in \mathbb{N}$ , welche der Pixelgröße des Weitfeldbildes entspricht, erstellen. Dessen Intensitätsbereich kann man dann noch mit der Signalstärke skalieren, einen zusätzlichen Hintergrundterm addieren und Poissonverteiltes Photonen- und normalverteiltes Ausleserauschen hinzufügen. Dies ist beispielhaft in Abbildung 5.2 (untere Reihe rechts) gezeigt.

### 5.2.4 Nachbarlabel

Um eine Information über die lokale Punktdichte in den Bildern darzustellen, ohne Verlust der Positionsinformation durch die Faltung mit einem Gaußkernel, kann man jedem Positionswert die Anzahl an benachbarten Positionen innerhalb eines zu bestimmenden Umgebungsradius  $r_U$  zuweisen. Hierzu faltet man das mit Orte2Bild erstellte Bild mit einem kreisförmigen Kernel  $k$  mit Radius  $r_K = r_U/ps$ . Die Kernelwerte im inneren dieses Radius sind 1, außerhalb 0. Dieses Bild wird elementweise mit einem aus dem ungefalteten Bild erzeugten Binärbild  $BBild$  multipliziert, um lediglich die Nachbarschaftswerte an tatsächlichen Molekülpositionen anzuzeigen. Das Resultat ist das Nachbarlabelbild  $NL$  mit folgenden Einträgen:

$$bbild_{i,j} = \begin{cases} 1 & bild_{i,j} \geq 1 \\ 0 & \text{sonst,} \end{cases} \quad (5.16)$$

$$nl_{i,j} = bbild_{i,j} \cdot (Bild \otimes k)_{i,j}. \quad (5.17)$$

In Abbildung 5.2 ist dies in der oberen Reihe rechts beispielhaft zu sehen.

## 5.3 Weitere Auswertung der Lokalisationsdaten

Um die Informationen, welche man aus der Lokalisation der einzelnen Signalpositionen erhält, weiter zu analysieren, wurden verschiedene Algorithmen entwickelt. So kann die axiale Position des Lokalisationsbild innerhalb einer biologischen Struktur

bestimmt oder interessante Bereiche des Lokalisationsbildes separat analysiert werden. Kommt es zu Signalanhäufungen, können diese mit verschiedenen Methoden detektiert und analysiert werden. Es wird ein Verfahren vorgestellt, sequentiell aufgenommene Lokalisationsdaten in unterschiedlichen spektralen Bereichen durch ein zusätzliches Referenzbild zu kalibrieren und diese auf ihre Nachbarschaftsverhältnisse zu untersuchen.

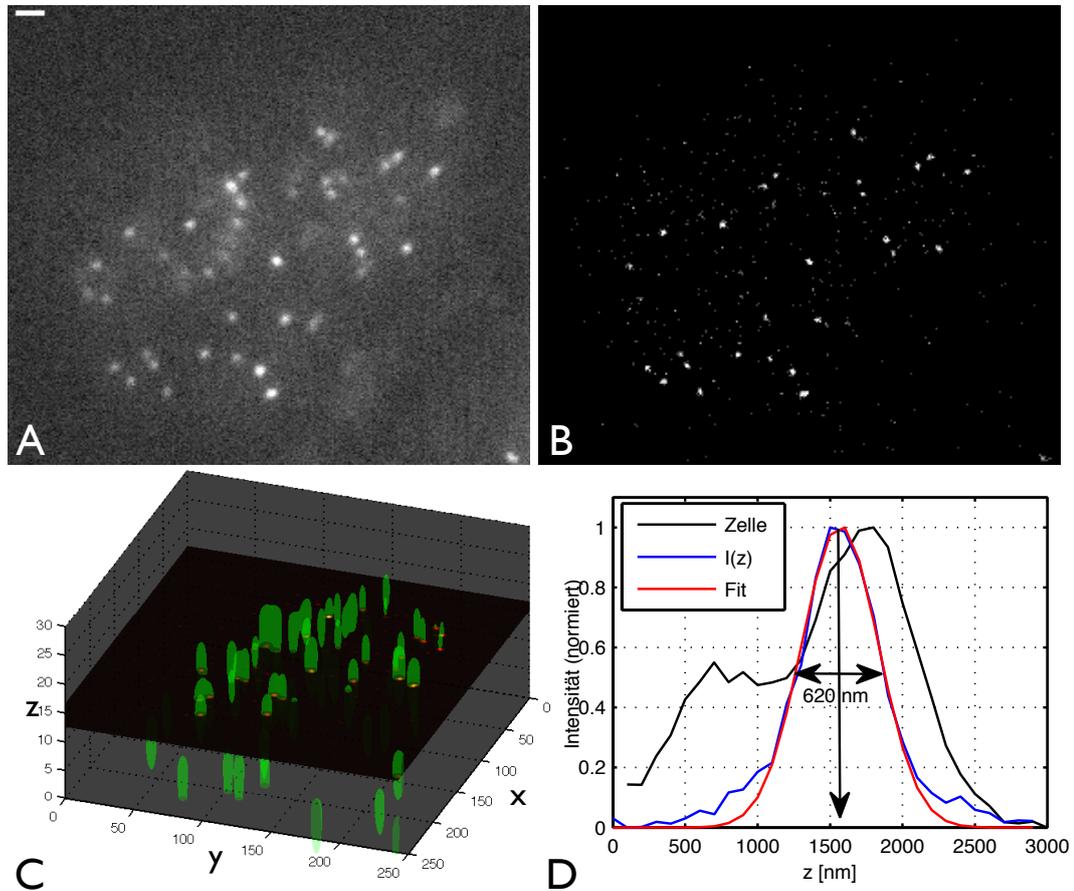
### 5.3.1 Bestimmung der axialen Position der Lokalisationsdaten innerhalb einer Zelle / eines Zellkerns

Es ist möglich, die axiale Position innerhalb der beobachteten Struktur sehr genau zu bestimmen, indem man das Ergebnis der Lokalisationsmessung mit jeder Ebene eines zuvor aufgenommenen 3D-Datenstapels der Struktur vergleicht.

Zu diesem Zweck nimmt man vor der Lokalisationsaufnahme einen 3D-Datenstapel ( $WF$ ) auf, welcher die Struktur, wie etwa einen ganzen Zellkern, enthält (siehe Abschnitt 4.3.1). Um eine gute Abtastung der Daten zu erhalten, sollte man hierbei eine Schrittweite von  $100nm$  oder weniger wählen. Aus den Lokalisationsdaten erstellt man ein Lokalisationsbild ( $L$ ), dessen laterale Pixelgröße der des Weitfeldbildes entspricht. Dies ist in Abbildung 5.3 in der oberen Reihe dargestellt. Links (A) ist die Ebene des Datenstapels  $WF$ , in welcher das Lokalisationsbild aufgenommen wurde, rechts daneben ist das Lokalisationsbild mit der gleichen Pixelgröße wie das Weitfeldbild dargestellt (B). In Abbildung 5.3 C ist die Verteilung einer Struktur im 3D-Datenstapel als Isoebenendarstellung (grün) gezeigt, in rot/schwarz ist die Ebene des Lokalisationsbildes eingetragen. Nun vergleicht man das Lokalisationsbild  $L$  mit jeder Ebene des 3D-Datenstapels  $WF$ . Dazu wird jeder Eintrag einer Ebene ( $z = const.$ ) des Weitfeldbildes  $wf_{x,y,z}$  punktweise mit dem entsprechenden Eintrag des Lokalisationsbildes  $l_{x,y}$  multipliziert:

$$i_z = \sum_{x,y} (wf_{x,y,z} \cdot l_{x,y}). \quad (5.18)$$

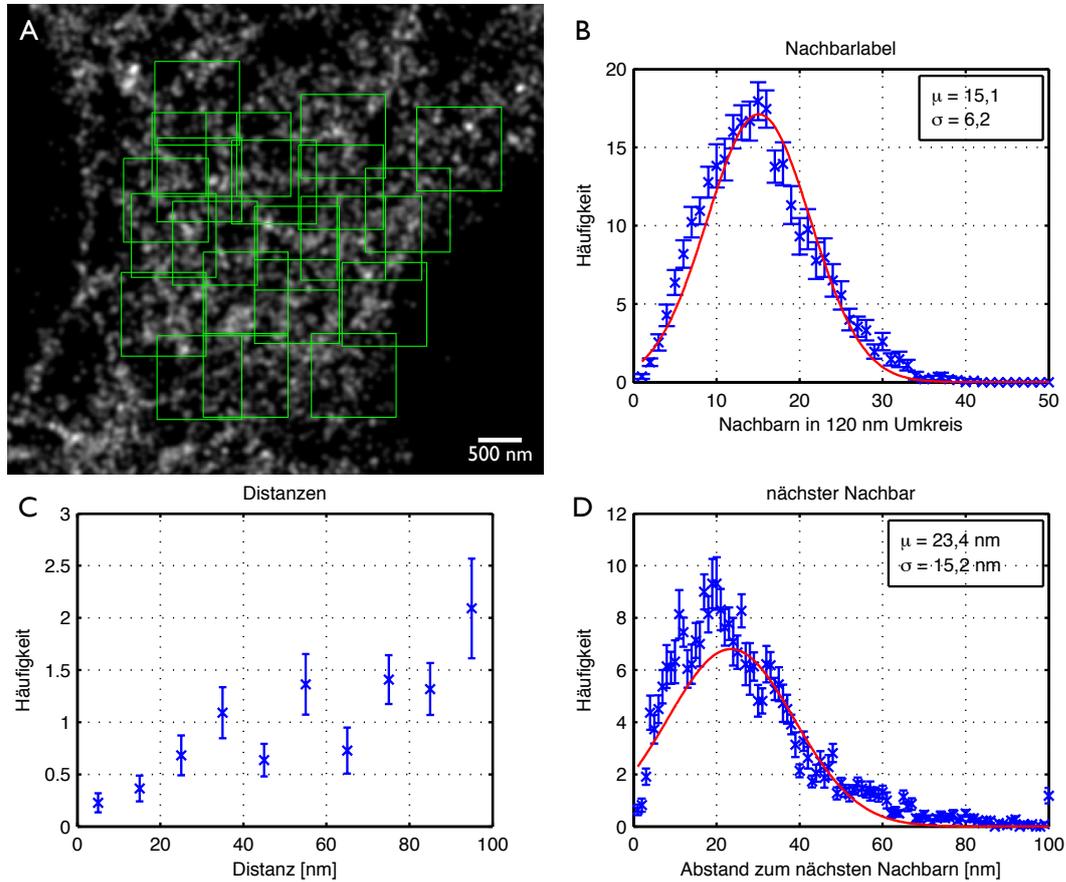
Das Ergebnis ist der aus den Einträgen  $i_z$  bestehende Vektor  $I$ . Dieser wird maximal, wenn Lokalisationsbild und Weitfeldbild übereinstimmen (siehe auch Abbildung 5.3 D). An den Vektor der axialen Übereinstimmung  $I$  kann man eine Gaußsche Normalverteilung anpassen (Abbildung 5.3 C). Anhand dieser Anpassung kann man die Positionsgenauigkeit des Maximums (aus der Kovarianzmatrix der Anpassung) und die axiale Ausdehnung der Übereinstimmung bestimmen. Diese axiale Ausdehnung entspricht bei kleinen Strukturen der axialen Auflösung oder der Schichtdicke, innerhalb welcher Lokalisationspositionen ermittelt werden können. Die Ausdehnung der Zelle oder des Zellkerns erhält man, indem man von jeder Ebene im 3D-Datenstapel von allen lateralen Einträgen  $wf_{x,y,z}$  mit  $z = const.$  den Mittelwert bildet. Die Posi-



**Abbildung 5.3:** Beispiel für die Bestimmung der axialen Position des Lokalisationsbildes. A: Weitfeldaufnahme. B: Lokalisationsaufnahme der gleichen Struktur wie in A mit der gleichen Pixelgröße, um diese miteinander vergleichen zu können. Maßstab 1  $\mu\text{m}$ . C: 3D-Datenstapel als Isoebendarstellung (Flächen gleicher Intensität in grün) mit der Fokusebene, in welcher die Lokalisation durchgeführt wurde (schwarz/rot). Die Schrittweite in axialer Richtung (z) beträgt 100 nm, ein Pixel in lateraler Richtung entspricht 65 nm. D: Ausdehnung der gesamten Struktur (schwarz, 'Zelle') und Überschneidung mit dem Lokalisationsbild (blau, 'Lok.'), sowie die Anpassung einer Normalverteilung an die Überschneidung (FWHM = 620 nm).

tionsgenauigkeit der Struktur in Abbildung 5.3 beträgt 45.7 nm, Die Halbwertsbreite der Normalverteilung 620 nm.

## 5.3.2 Selektion interessanter Bereiche im Lokalisationsbild

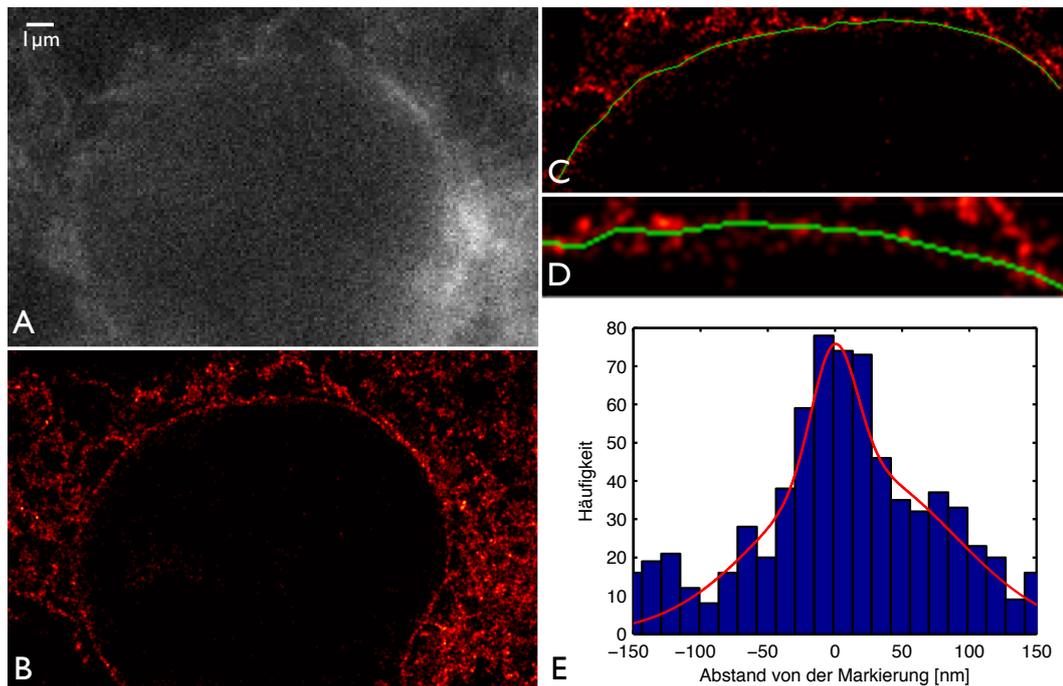


**Abbildung 5.4:** Beispiel für die manuelle Selektion zu untersuchender Bereiche. A: Lokalisationsbild mit grün markierten Regionen, welche für die weitere Untersuchung benutzt wurden. B: Nachbarschaftsanalyse, C: Distanzanalyse und D: Distanzen zum nächsten Nachbarn der in A markierten Regionen.

Um aus einem Lokalisationsbild zu untersuchende Bereiche manuell selektieren zu können, wurde das Skript 'Bereichsauswahl' geschrieben. Dies sollte es ermöglichen, eine Auswahl im Lokalisationsbild vorzunehmen, in welcher die Nachbarschaftsverhältnisse wie der Abstand zur nächsten benachbarten Position, die Anzahl der innerhalb einer wählbaren lokalen Umgebung befindlichen Positionen und die Häufigkeit aller in einem einstellbaren Bereich vorkommenden Distanzen ermittelt werden können. Zunächst wird aus der Positionsmatrix ein Bild zur Übersicht erzeugt. In

diesem können durch Eingabe mit der Maus so lange Positionen markiert werden, bis die Eingabetaste betätigt wird. Um diese Positionen wird mit Hilfe des Skriptes 'OrteEinschränken' die entsprechenden Positionen in einer quadratischen Umgebung vorher wählbarer Größe selektiert. Diese Auswahl wird im Übersichtsbild grafisch angezeigt (siehe Abbildung 5.4 A). Mit den ausgewählten Positionen können die verschiedenen Analysen durchgeführt werden (siehe Abbildung 5.4 B-D).

### 5.3.3 Verfolgung dünner Strukturen im Lokalisationsbild



**Abbildung 5.5:** Beispiel für die Verfolgung einer dünnen Struktur. A: Weitfeldbild. B: Das entsprechende Lokalisationsbild. C: Vergrößerter Bereich des Lokalisationsbildes, in dem eine dünne Struktur markiert wurde. D: Weitere Vergrößerung. E: Histogramm der orthogonalen Distanzen der Lokalisationsdaten von der Markierung. In rot ist die Anpassung zweier überlagerter Gauß-Verteilungen eingezeichnet, die Halbwertsbreite der schmaleren dieser Verteilungen wurde als Maß für die Breite der Struktur gewählt. Diese betrug in diesem Fall  $41\text{nm}$ .

Aufgrund der Punktformigkeit der Lokalisationsdaten ist eine zuverlässige Segmentierung feiner Strukturen nicht immer möglich. Um dennoch eine Abschätzung der Breite in einem nichtlinearen Verlauf, etwa der Kernmembran, zu erhalten, wur-

de das Skript 'Strukturverlauf' geschrieben. Wie bei der Bereichswahl kann auch hier durch den Anwender eine bestimmte Struktur markiert werden, in diesem Fall durch einen selbst bestimmbaren Polygonzug. Die Abstände der Positionen im Übersichtsbild orthogonal zu diesem Polygonzug werden bis zu einem einstellbaren Maximalabstand ermittelt und in ein Histogramm eingetragen. Aus dessen Breite kann man mit der bekannten Lokalisationsgenauigkeit auf die Breite der untersuchten Struktur schliessen. Dies ist beispielhaft in Abbildung 5.5 gezeigt.

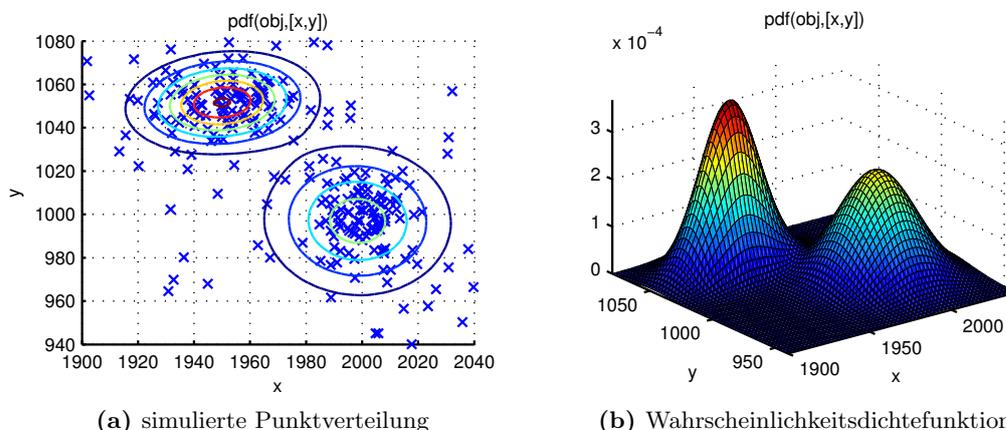
### 5.3.4 Clusteranalyse

Um Signalanhäufungen (Cluster) der aus der Lokalisation der Einzelmoleküle erhaltenen Positionsdaten zu detektieren und zu analysieren wurden verschiedene Verfahren entwickelt, welche hier vorgestellt werden sollen.

#### Anpassung überlagerter Gauß-Verteilungen

Bei vielen Proteinverteilungen im Zellkern kann beobachtet werden, dass diese sich zu Signalclustern anhäufen. Um diese Anhäufungen genauer zu analysieren, wurde das Skript 'GM' geschrieben, welches die Lokalisationsdaten zunächst vorsegmentiert und dann ein *gaussian mixture model* an die Daten annähert. Dies besteht aus einer Superposition mehrerer zweidimensionaler Gauß-Verteilungen mit jeweils unabhängigen Kovarianzmatritzen. Zunächst werden die ungefähren Positionen der Cluster ermittelt. Hierzu werden die einzelnen Positionen in ein Bild eingetragen. Jeder Position wird mittels 'Nachbarlabel' ein Wert zugeordnet, welcher der Anzahl benachbarter Signale innerhalb eines festzulegenden Radius entspricht. Für den Wert dieses Parameters wird die durchschnittliche Größe der zu untersuchenden Strukturen ungefähr abgeschätzt und eingetragen. Dieser Wert muss nicht sehr genau sein, da zunächst nur die Zentren der Signalanhäufungen ermittelt werden sollen. Es werden diejenigen Punkte selektiert, deren Wert über dem Mittelwert benachbarter Signale für alle Positionen liegt. Aus den verbleibenden Punkten wird mit dem Befehl 'closing', welcher eine morphologische Schließung [Jäh05] (mit einem an die Signaldichte angepassten Formparameter) durchführt, eine Maske erstellt. Die einzelnen so entstandenen Strukturen werden registriert ('label') und ihre Schwerpunkte werden bestimmt (durch setzen des Messparameters 'center' im Aufruf von 'measure'). In einer Schleife wird über diese Positionen der Reihe nach iteriert. Aus der Ortematrix werden diejenigen Punkte ausgewählt, welche innerhalb einer einstellbaren Umgebung um das momentane Zentrum liegen. Befindet sich ein weiteres Zentrum innerhalb der Umgebung, wird diese automatisch erweitert. Innerhalb dieser Umgebung wird versucht, ein *gaussian mixture model*, also eine Überlagerung mehrerer Gaußförmiger Wahrscheinlichkeitsverteilungen mit unabhängigen Kovarianzmatritzen anzupassen. Die Anzahl der einzelnen Verteilungen wird hierbei doppelt so hoch gewählt wie die Anzahl der in der Umgebung befindlichen Zentren. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass ein Signalcluster prinzipiell gut durch zwei Gauß-Verteilungen angepasst werden kann. In Abbildung 5.6 ist dies für zwei Gaußförmige Punktverteilungen mit jeweils 100 Positionen simuliert. Zu diesen wurde eine zufällige Verteilung von 50 weiteren Positionen addiert. Diese wurde dann durch ein *gaussian mixture model* angenähert.

Als Clusterbegrenzung wurde der Wert gewählt, für den die Wahrscheinlichkeitsdichte auf 5% des Maximalwertes abgefallen ist. Hierdurch wird eine Fläche begrenzt,

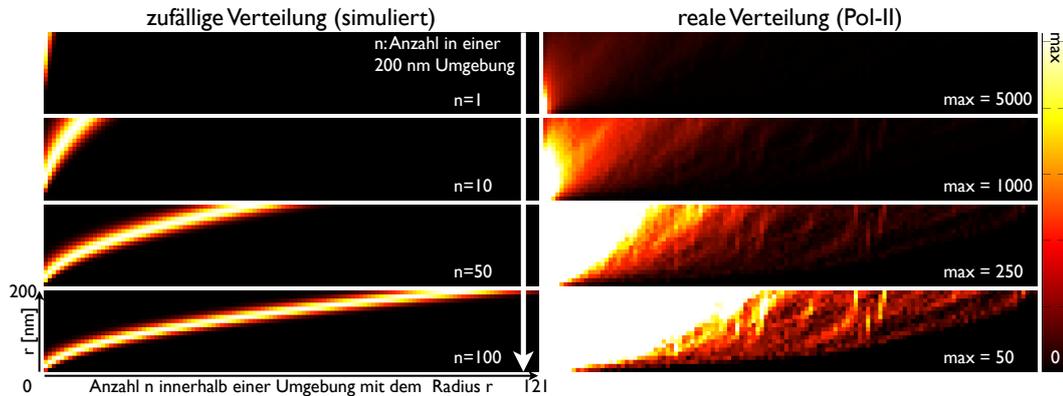


**Abbildung 5.6:** Simulation zweier Signalcluster. In (a) sind zwei normalverteilte Signalanhäufungen mit je 100 Positionen an unterschiedlichen Positionen und mit unterschiedlichen Kovarianzmatrizen simuliert. Zusätzlich wurden 50 Positionen zufällig über das Beobachtungsvolumen verteilt. An diese wurde ein *gaussian mixture model* angenähert, die Konturen geben die entsprechende Wahrscheinlichkeitsdichte wieder. In (b) ist die Wahrscheinlichkeitsdichte für die gleiche Verteilung als Oberflächenplot dargestellt.

welche als Maske verwendet werden kann, um mit dem Befehl 'measure' Eigenschaften des Clusters wie z.B. Ausdehnung, Fläche oder Anzahl der enthaltenen Positionen zu bestimmen.

### Nachbaranalyse

Um Signalanhäufungen zu detektieren, kann man auch den Verlauf der in einer Umgebung um jede Molekülposition vorhandenen Signale bei wachsendem Radius bestimmen (Abbildungen 5.7 und 5.8). Hierzu wird das Skript 'Nachbarlabel' verwendet und der Radius der Umgebung in einem vorgegeben Intervall von  $r_0$  bis  $r_{max}$  variiert. Sind die Signale zufallsverteilt, ergeben sich, je nach Signaldichte, die in Abbildung 5.7 auf der linken Seite gezeigten Verläufe, wobei die Anzahl quadratisch mit dem Radius wächst. In der Darstellung ist noch zusätzlich die Wahrscheinlichkeit farblich kodiert, die wahrscheinlichste Anzahl  $N(r)$  bei einem bestimmten Radius erhält den Farbwert 'weiß', um diesen Wert sind bei konstantem Radius  $r$  die Wahrscheinlichkeiten für eine abweichende Signalzahl normalverteilt, mit einer Standardabweichung von  $\sigma(r) = \sqrt{N(r)}$ . Die Amplitude dieser Verteilung wurde auf 1 normiert, Die Farbwerte sind entsprechend dem rechts gezeigten Farbverlauf eingetragen.



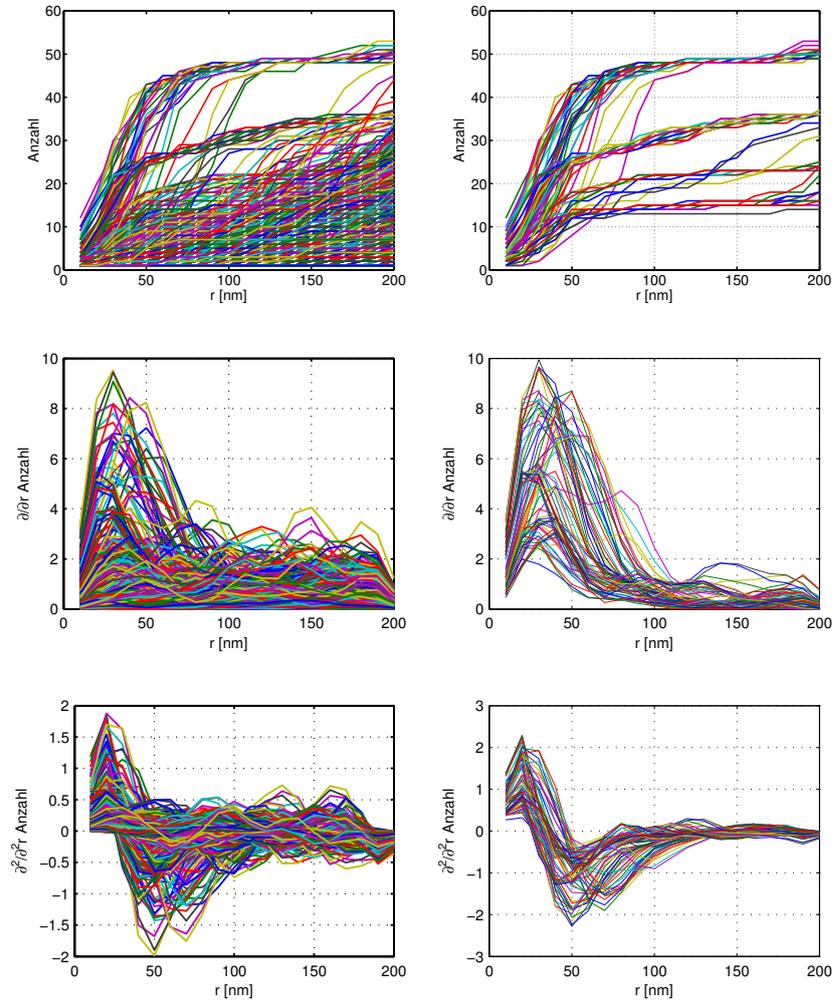
**Abbildung 5.7:** Zusammenhang der Anzahl benachbarter Signale und Radius. Links ist der Verlauf im Falle einer Zufallsverteilung der Signale bei verschiedenen Signaldichten gezeigt. Farblich kodiert ist die Wahrscheinlichkeit, für eine gegebene Signaldichte bei einem bestimmten Radius eine bestimmte Anzahl an Signalen zu erhalten. Weiß entspricht dem höchsten Wert, um diesen sind die Wahrscheinlichkeiten für jeden Radius normalverteilt (siehe Text). Rechts ist eine Tatsächlich gemessene Verteilung gezeigt. Für diese wurde der Dynamische Bereich der Darstellung für verschiedene Bereiche der lokalen Dichte angepasst (entsprechend dem angegebenen Maximalwert und dem Farbverlauf rechts).

Da die Lokale Dichte stark variieren kann, ist es nicht zweckmässig, alle Abweichungen von einem bestimmten Dichteverlauf zu selektieren. Bei lokalen Signalanhäufungen lässt sich ein charakteristischer Verlauf feststellen. Zunächst erfolgt ein Anstieg der Signalzahl mit dem Radius. Sobald der Radius über die Clustergrenze hinaus wächst, knickt die Kurve ab (siehe auch Abbildung 5.8) Dieser Wert liefert eine grobe Abschätzung der Clusterausdehnung. Die Kurve liegt insgesamt über der Kurve einer zufälligen Verteilung, für welche die lokale Dichte bei  $r = r_{max}$  angenommen wird. Als Selektionskriterien müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

- Die Anzahl der benachbarten Signale steigt innerhalb der ersten 50nm sehr stark / die 1. Ableitung in diesem Bereich liegt über einem bestimmten Schwellwert.
- Es gibt einen starken Rechtsknick im Verlauf / die 2. Ableitung hat einen Nulldurchgang und stark ausgeprägte Minima und Maxima.
- Innerhalb der ersten 30nm wird kein Plateau erreicht / die 1. Ableitung in diesem Bereich fällt nicht unter einen bestimmten Schwellwert.

- Innerhalb der ersten 50nm gibt es mehr als 5 Nachbarn / der Verlauf liegt in diesem Bereich über einem bestimmten Schwellwert

Diese Kriterien können auf die gesamte Signaldichte und die jeweiligen Fragestellungen angepasst werden. In Abbildung 5.8 sind einige beispielhafte Verläufe vor und nach der Selektion gezeigt. Die Positionen der derart bestimmten Signale werden als Startpositionen für die weitere Analyse verwendet. Aus der Orte-Matrix wird ein Bereich ausgewählt, dessen Ausdehnung aus der Position des Rechtsknicks des Verlaufs bestimmt wird. Alle weitere Positionen in dies Auswahl, werden ebenfalls berücksichtigt. Die Signalpositionen in diesem Bereich werden in ein Bild eingetragen. Dies wird mit einem Gaußkernel gefaltet, dessen Standardabweichung etwa 2% der abgeschätzten Clusterausdehnung entspricht, um das Bild zu glätten. Mit einem Laplace-Filter [Jäh05] werden die Umrandungen des Clusters ermittelt und mit einem 'measure'-Befehl vermessen. Auch hier werden Ausdehnung, Fläche oder Anzahl der enthaltenen Positionen bestimmt.



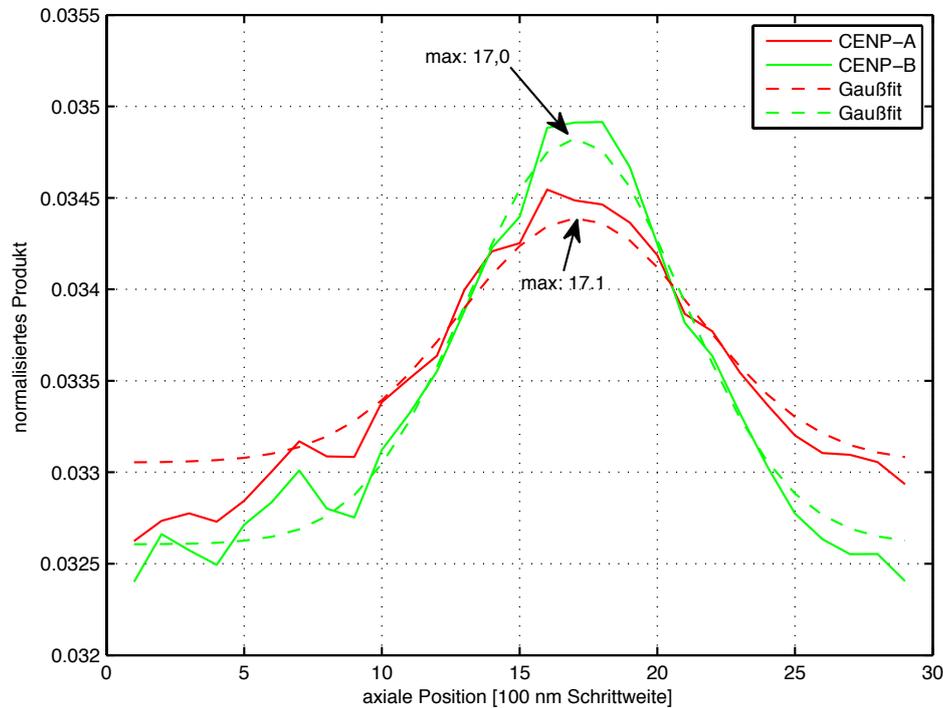
**Abbildung 5.8:** Anzahl benachbarter Signale mit ansteigendem Umgebungsradius. Aus einer Lokisationsaufnahme von RNA-Pol-II-Strukturen wurden, um noch eine gewisse Übersichtlichkeit zu gewährleisten, 1000 Verläufe zufällig ausgewählt (links). Nach der Selektion bleiben die 73 gezeigten Verläufe übrig (rechts). In der oberen Reihe ist der tatsächliche Verlauf, in der mittleren die erste Ableitung und in der unteren die zweite Ableitung dargestellt.

### 5.3.5 Bestimmung der axialen und lateralen Verschiebung bei sequentiellen Zweifarben-Lokalisationsmessungen

Bei der sequentiellen Aufnahme zweier Lokalisationsbilder verschiedener Markierung kann es außer der chromatischen Verschiebung zusätzlich zu einem lateralen und axialen Versatz kommen. Dieser resultiert aus dem mechanischen Drift des Probenhalters, oder aus dem Wechsel des optischen Filters. Das Filterrad, welches zum Wechseln dieser in Abschnitt 4.1 beschriebenen Filter dient, ist von dem optischen Tisch entkoppelt, trotzdem wurde auch weiterhin ein unregelmäßiger Versatz in zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen der selben ROI beobachtet. Dieser lässt sich nachträglich berechnen und korrigieren, wenn vor der eigentlichen Lokalisationsmessung eine simultane 3D-Referenzmessung mit zwei oder mehr Farben durchgeführt wird. Sind die aufgenommenen Strukturen ähnlich oder wurden Referenzobjekte in allen Farbkanälen mit abgebildet, so lässt sich auch der chromatische Versatz bestimmen und korrigieren (siehe Beispiel in Abschnitt 7.4).

Zunächst wird ein 3D-Übersichtsbild der zu untersuchenden Struktur erstellt. Hierzu wird das Aufnahmeskript 'Sequence' verwendet und die gewünschte Anfangs- und Endposition, sowie die gewünschte Schrittweite des Piezoaktors eingetragen. Außerdem werden die Farbkanäle so eingestellt, dass die zur Verfügung stehenden Lasershutter der Reihe nach angesprochen werden. Die Ansteuerung der Shutter erfolgt über die serielle Schnittstelle. Für jeden Kanal werden sinnvolle Integrationszeiten gewählt, um den dynamischen Bereich des Detektors optimal zu nutzen. Das Filterrad wird so eingestellt, dass sich der Tripel-Bandpassfilter im Detektionsstrahlengang befindet (siehe Abschnitt 4.1). Aktiviert man die Aufnahme (durch Klicken auf 'GoGoGo!'), wird der Piezoaktor auf die gewählte Startposition eingestellt, für jeden eingestellten Kanal die Beleuchtung durch Aktivierung oder Deaktivierung der entsprechenden Lasershutter gesetzt und eine Aufnahme gemacht. Sodann wird die Position des Piezoaktors um die eingestellte Schrittweite verfahren und erneut für jeden Kanal eine Aufnahme bei passender Beleuchtung erzeugt. Dies wird so lange wiederholt, bis die gewählte Endposition des Piezoaktors erreicht ist. Man erhält also eine 3D-Aufnahme der Probe für jeden vorher gewählten Kanal. Hierbei ist zu beachten, dass es aufgrund der Filterwahl durchaus zu Überschneidungen der Emissionsspektren kommen kann.

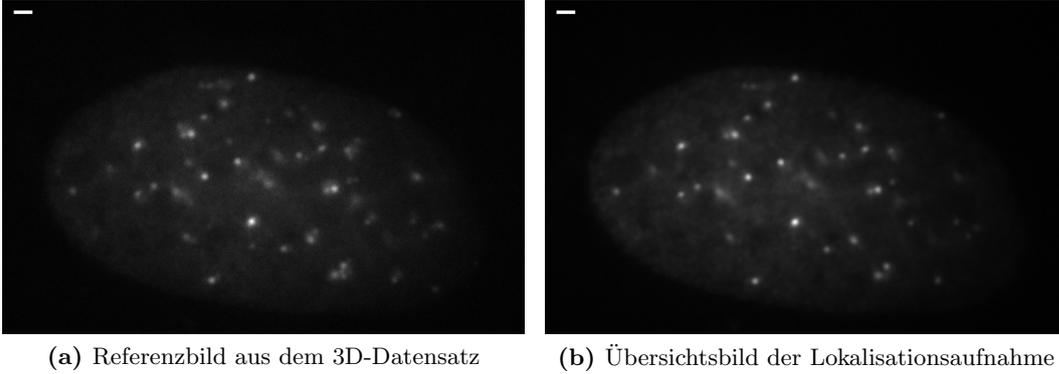
Die Anzahl der Kanäle wird auf eins reduziert und die Wahl der Beleuchtung wieder manuell vorgenommen. Für die Lokisationsaufnahmen wird mit dem Fluorophor begonnen, dessen Emissionsspektrum am langwelligsten ist, um eine unerwünschte Fluoreszenzanregung der Markierung mit dem langwelligeren Fluoreszenzsignal oder FRET-Effekte zu vermeiden. Der Filter wird entsprechend des Farbstoffs eingestellt. Bei der Lokisationsaufnahme erfolgen 20 Aufnahmen bei normaler Intensität (Intensitätsfilter im Strahlengang). Aus diesen 20 Aufnahmen wird durch Mittelwertbildung das Übersichtsbild erstellt. Sodann wird der Intensitätsfilter aus dem



**Abbildung 5.9:** Bestimmung der Verschiebung der Farbkanäle in axialer Richtung am Beispiel einer Messung zweier unterschiedlicher Centromerproteine (CENP-A und CENP-B). Aufgetragen sind die Maximalwerte des punktwisen Produktes aus Referenzbild und jeder Ebene des 3D-Datenstapels. Dies ergibt einen Wert für jede axiale Position. An sie Verläufe wurden jeweils eine Gaußfunktion angepasst (gestrichelte Kurven), um die Positionen der Maxima zu ermitteln.

Strahlengang genommen. Die Fluorophore werden durch die hohe Intensität in den reversibel gebleichten Zustand getrieben wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Nach der ersten Aufnahme wird der Intensitätsfilter wieder in den Anregungsstrahlengang gebracht. Beleuchtung und Filter werden auf den nächsten Farbstoff angepasst. Dies kann gegebenenfalls so lange wiederholt werden, wie voneinander trennbare Farbstoffe und entsprechende Filter zur Verfügung stehen. Die Reihenfolge der Aufnahmen sollte dabei stets von langwelligeren hin zu kurzwelligeren Farbstoffen erfolgen.

Mit Hilfe des Skriptes 'zweifarbenshiftkorr' kann der Versatz der Lokisationsaufnahmen zu dem vorher aufgenommenen 3D-Referenzbild  $R$  bestimmt werden. Hierzu wird für jeden Farbkanal das aus den ersten 20 Bildern der Lokisationsaufnahme

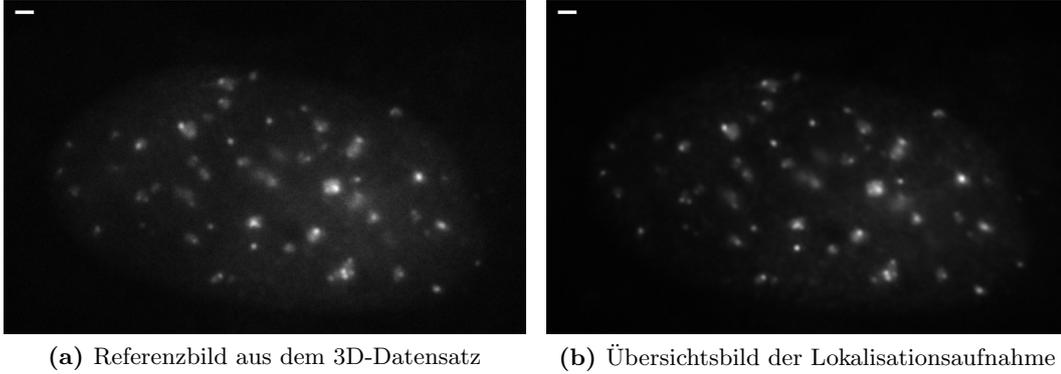


**Abbildung 5.10:** CENP-A, mRFP-markiert. Vergleich zwischen Referenzbild und Übersichtsbild im roten Farbkanal. Maßstab:  $1\mu\text{m}$ .

(aufgenommen mit geschlossenem Intensitätsfilter) erzeugte Übersichtsbild  $U$  punktwise mit allen Bildern der 3D-Referenzaufnahme multipliziert ( $R$  besteht aus den Einträgen  $r_{x,y,z}$ ,  $U$  aus den Einträgen  $u_{x,y}$ ) und der Maximalwert in jeder Fokusebenenposition  $z$  ermittelt:

$$i_z = \max(r_{x,y,z} \cdot u_{x,y}). \quad (5.19)$$

Stimmen die Bilder überein, ist das Produkt  $I$  (mit den Einträgen  $i_z$  für jede axiale Position) maximal. Die so erhaltene axiale Verteilung kann gut mit einer Gaußfunktion angepasst werden, um die genaue axiale Position zu erhalten (siehe auch Abbildung 5.9). Aus der Differenz der Positionen der Maxima erhält man durch Multiplikation mit der bekannten Schrittweite des Piezoaktors die axiale Verschiebung. Aus dem 3D-Stapel wird das Bild gewählt, welches am nächsten bei der Position des Maximums liegt. In Abbildung 5.10 ist dieses Bild und das Übersichtsbild der Lokalisationsmessung für den roten Farbkanal gezeigt, in Abbildung 5.11 entsprechend für den grünen Kanal. Mit dem Befehl 'findshift' kann die laterale Verschiebung zwischen Referenz und Lokalisationsaufnahme bestimmt werden. Diese Verschiebung wird in Pixeln ausgegeben. Mit der bekannten Pixelgröße (z.B. 65 nm am Lokalisationsaufbau) kann die Verschiebung in Nanometern berechnet und die Positionsmatrix für die Lokalisationsaufnahme korrigiert werden ('OrteShift'). Abbildung 5.12 zeigt ein Beispiel für die Verschiebung zwischen dem Referenzbild (lila) und dem aus der Lokalisationsaufnahme erstellten Übersichtsbild (blau) für den roten Farbkanal, Abbildung 5.13 zeigt das gleiche für den grünen Farbkanal. Man kann deutlich erkennen, dass die Kolokalisation im rechten Bild (korrigiert) besser ist. Da diese beiden Bilder bei verschiedenen Filtereinstellungen aufgenommen wurden, können im Referenzbild noch zusätzliche Strukturen auftreten, welche aus der größeren Bandbreite



**Abbildung 5.11:** CENP-B, GFP-markiert. Vergleich zwischen Referenzbild und Übersichtsbild im grünen Farbkanal. Maßstab:  $1\mu\text{m}$

des bei dieser Aufnahme nötigen optischen Filters resultieren, da hierbei ein größerer Anteil der Autofluoreszenz, sowie ein eventuelles Übersprechen der Farbstoffe in dem jeweiligen Farbkanal mit aufgenommen wird.

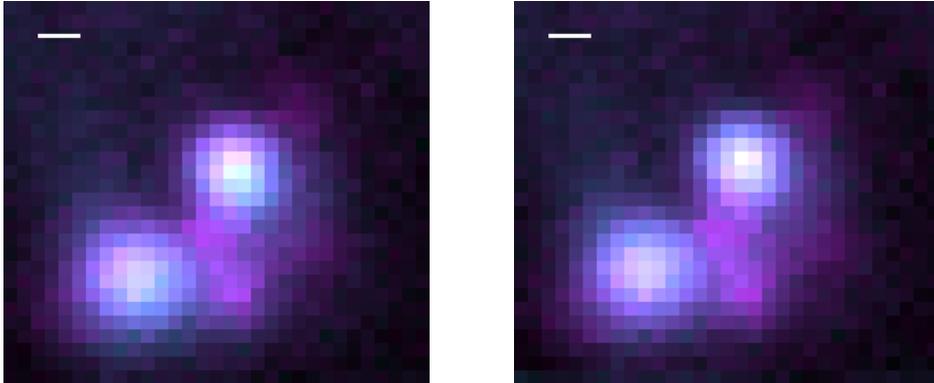
Vergleicht man die Übersichtsbilder vor und nach der Korrektur (Abbildung 5.14), so ist bei einer relativen Verschiebung von 35 nm kein großer Unterschied erkennbar. In den Positionsdarstellungen (Abbildung 5.15) ist zum einen die gesamte und zum andern auch die relative Verschiebung deutlich zu erkennen.

### 5.3.6 Zweifarbenachbarlabel

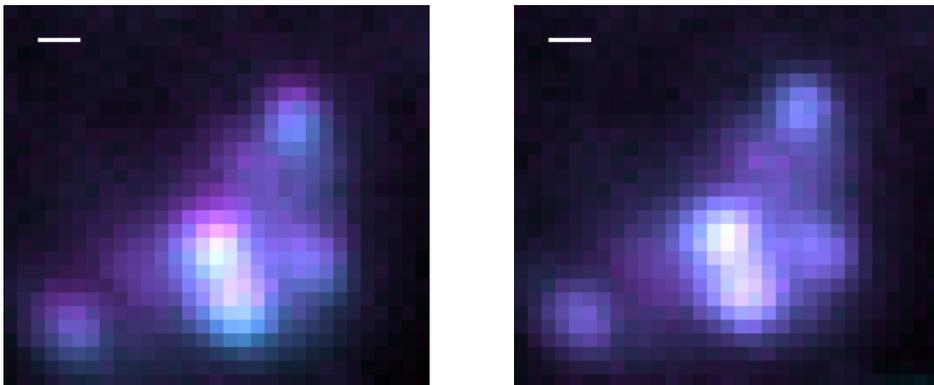
Dieser Algorithmus funktioniert im wesentlichen wie das zuvor beschriebene 'Nachbarlabel', mit dem Unterschied, dass hier die Positionen zweier Verteilungen (zweier Orte-Matrizen) miteinander verglichen werden. Die Positionen der ersten Verteilung dienen hierbei als Referenzpunkte, welche in  $Bild1$  eingetragen werden. Dieses wird mit einer kreisförmigen Maske mit einstellbarem Radius gefaltet, dann aber mit einem zweiten Binärbild  $BBild2$  punktwise multipliziert, in welches die Positionen der zweiten Verteilung eingetragen wurden. Das Resultat ist also, dass jeder Position der Verteilung 1 ein Wert zugewiesen wird, welcher der Anzahl an Positionen der Verteilung 2 innerhalb einer gewissen Nachbarschaft entspricht. Das Zweifarben-Nachbarlabelbild  $ZNL$  setzt sich also folgendermassen zusammen:

$$bbild2_{i,j} = \begin{cases} 1 & bild2_{i,j} \geq 1 \\ 0 & \text{sonst,} \end{cases} \quad (5.20)$$

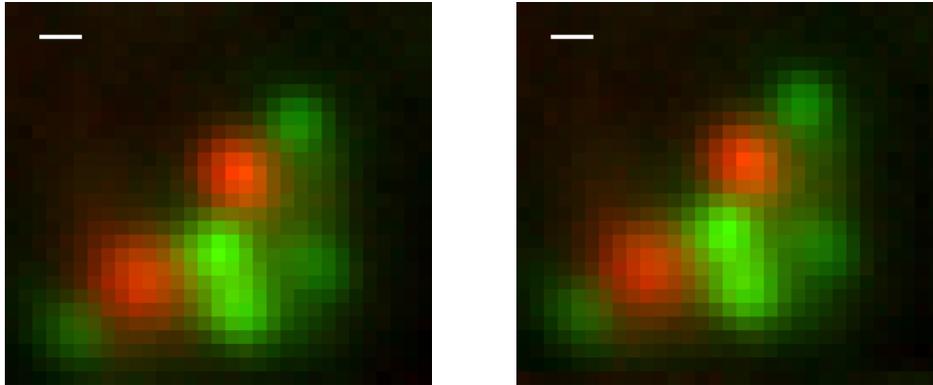
$$znl_{i,j} = bbild2_{i,j} \cdot (Bild1 \otimes k)_{i,j}. \quad (5.21)$$



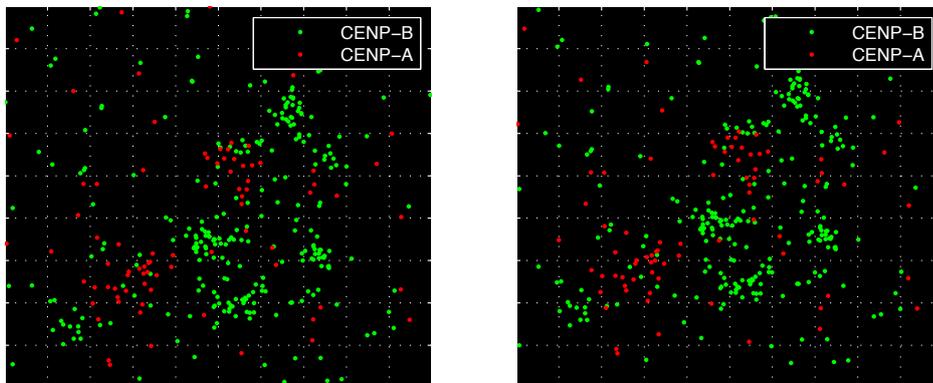
**Abbildung 5.12:** Weitfeldaufnahmen von mRFP-markiertem CENP-A in menschlichen U2OS-Zellen. Überlagerung von Referenzbild (lila) und Übersichtsbild der Lokalisationsaufnahme (blau) des roten Farbkanals vor (links) und nach (rechts) der Verschiebungskorrektur. In diesem Fall beträgt die Verschiebung 18 nm in x-Richtung und 54 nm in y-Richtung. Maßstab: 200 nm



**Abbildung 5.13:** Weitfeldaufnahmen von GFP-markiertem CENP-B in menschlichen U2OS-Zellen. Überlagerung von Referenzbild (lila) und Übersichtsbild der Lokalisationsaufnahme (blau) des grünen Farbkanals vor (links) und nach (rechts) der Verschiebungskorrektur. Man kann die zusätzlichen Strukturen im Referenzbild (lila Strukturen im Bild) erkennen, welche aus der unterschiedlichen Filterwahl resultieren. In diesem Fall beträgt die Verschiebung 22 nm in x-Richtung und 89 nm in y-Richtung. Maßstab: 200 nm



**Abbildung 5.14:** Überlagerung der in Abbildung 5.12 und 5.13 gezeigten roten (CENP-A) und grünen (CENP-B) Farbkanäle. Links ist die Überlagerung vor, rechts nach der Verschiebungskorrektur dargestellt. Bei einer relativen Verschiebung wie in diesem Fall von 35 nm, was etwa einem halben Pixel entspricht, ist kein großer Unterschied im Weitfeldbild zu erkennen. Maßstab: 200 nm.



(a) Überlagerung der zwei Positionskarten ohne Verschiebungskorrektur

(b) Überlagerung wie in (a) nach der Verschiebungskorrektur

**Abbildung 5.15:** Zweifarben-Lokalisationsbild der in Abbildungen 5.12, 5.13 und 5.14 gezeigten Struktur. Rot dargestellt ist die Verteilung von mRFP-markiertem CENP-A, grün die von GFP-markiertem CENP-B, jeweils vor (a) und nach (b) der Verschiebungskorrektur. Hier sind im Gegensatz zum Zweifarben-Übersichtsbild der gemeinsame und der relative Versatz gut zu erkennen. Skala: 200 nm.

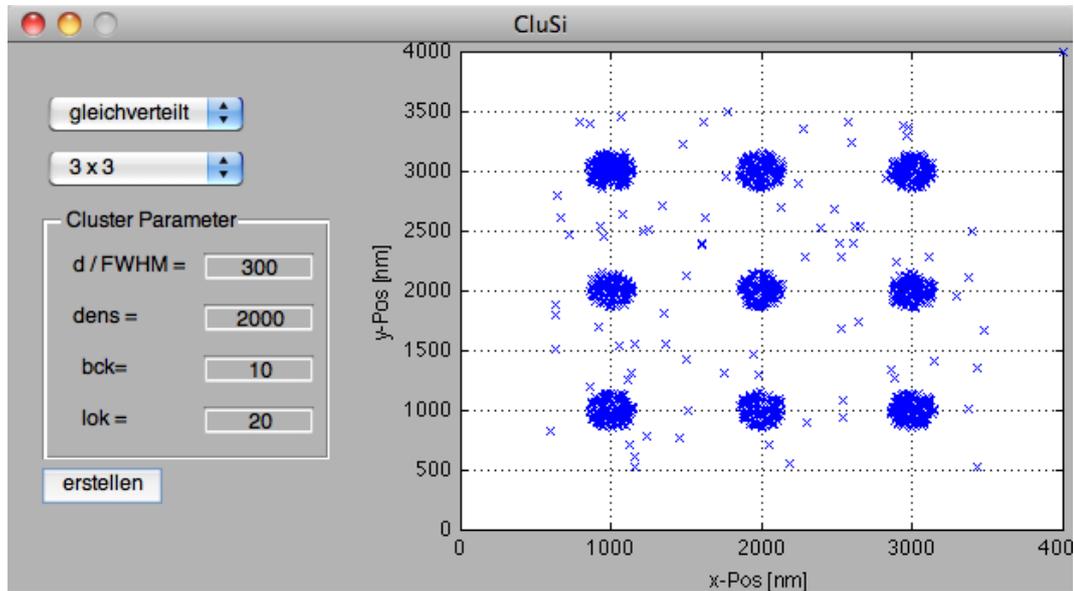
## 6 Simulationen zur Clusteranalyse

### 6.1 Simulation der Signalanhäufungen

Um die Algorithmen zur Clusteranalyse zu testen, wurden verschiedene Signalverteilungen simuliert. Hierzu wurde je eine Orte-Matrix mit den entsprechenden Einträgen erstellt. Als Parameter für die Signalanhäufungen wurden die Art der Verteilung (normal- oder gleichverteilt), die Distanz der Clusterzentren  $dist$  in nm, die Ausdehnung der Cluster (Durchmesser  $d_{cl}$  in nm bei gleichverteilten, Halbwertsbreite  $FWHM$  in nm bei normalverteilten Signalen), die mittlere Signaldichte  $dens$  in  $\mu m^{-2}$  innerhalb der Cluster, eine bestimmte Anzahl gleichverteilter Signale als Hintergrund  $bck$  in  $\mu m^{-2}$  und eine mittlere Lokalisationsgenauigkeit  $lok$  in nm, um welche die Positionen normalverteilt delokalisiert werden, verwendet. Die Cluster wurden auf einem quadratischen Gitter mit dem Abstand  $dist$  verteilt, die Anzahl der Gitterpunkte ist von  $1 \times 1$  bis  $4 \times 4$  wählbar. Für diese Simulation wurde auch das in Abbildung 6.1 gezeigte GUI geschrieben, in welchem die meisten Parameter eingestellt und die entsprechende Orte-Matrix, sowie eine graphische Ausgabe auf Knopfdruck erstellt werden können.

Für die folgenden Simulationen wurden gleich- und normalverteilte Signalanhäufungen mit jeweils 16 Clustern erstellt. Als Parameter für den Durchmesser  $dens$  / die Halbwertsbreite  $FWHM$  wurden 50nm, 100nm, 200nm und 400nm, für die mittlere Signaldichte  $dens$   $1000\mu m^{-2}$ ,  $5000\mu m^{-2}$  und  $10000\mu m^{-2}$ , als Signalhintergrund  $bck$   $1\mu m^{-2}$ ,  $10\mu m^{-2}$  und  $100\mu m^{-2}$  und als Lokalisationsgenauigkeit  $lok$  5nm und 20nm gewählt. Dies ergibt für Cluster mit 50 nm Durchmesser/ $FWHM$  2, 10 und 20 Signale, mit 100nm Durchmesser/ $FWHM$  8, 39 und 79 Signale, mit 200nm Durchmesser 31, 157 und 314 Signale und mit 400nm 126, 628 und 1257 Signale. Signalanhäufungen mit geringem Durchmesser und geringer Signaldichte enthalten also weniger Signalpositionen und sind dadurch sehr schwierig zu detektieren. Dies wird durch den zusätzlichen zufälligen Signalhintergrund noch erschwert.

Die Mittelwerte der Durchmesser/Halbwertsbreiten wurden gebildet und in Diagramme eingetragen, die Fehlerbalken in Abbildungen 6.3 bis 6.7 entsprechen den Fehlern der Mittelwerte.



**Abbildung 6.1:** Graphische Nutzeroberfläche (GUI) der Clustersimulation. Die Clusterparameter können eingestellt werden, bei Auswahl von 'erstellen' wird eine entsprechende Orte-Matrix erzeugt und die Positionen in dem in der GUI enthaltenen Diagramm angezeigt.

### 6.1.1 Clusterbestimmung durch Schwellwertanpassung

Die Ergebnisse der Schwellwertanpassung, wie sie als Vorselektion in Abschnitt 5.3.4 beschrieben ist, sind in Abbildung 6.3 dargestellt. Gezeigt sind die ermittelten minimalen und maximalen Ausdehnungen mit steigender Signaldichte für verschiedene Werte des zufälligen Signalhintergrunds. Bei gleichverteilten Signalen wird die tatsächliche Clustergröße für geringe Signaldichten unterschätzt. Für Signaldichten ab  $5000 \text{ Signalen}/\mu\text{m}^2$  ist die Abschätzung sehr zuverlässig, bei kleinen Ausdehnungen werden bei einem hohen Wert für die Lokalisationsgenauigkeit zu große Werte ermittelt. Auch kann bei zu geringer Signaldichte für kleine Ausdehnungen keine zuverlässige Abschätzung erfolgen. Eine Signaldichte von  $1000 \text{ Signalen}/\mu\text{m}^2$  in einem Cluster mit einem Durchmesser von  $50 \text{ nm}$  ergibt 2 Signale pro Cluster, was nicht mehr als Signalanhäufung betrachtet werden kann. Mit einer Erhöhung der Anzahl der Hintergrundsignale nimmt die Ungenauigkeit der Größenbestimmung zu, bei kleinen Clustergrößen kann nicht mehr zwischen Hintergrund und Cluster unterschieden werden und die Abschätzung wird fehleranfällig. Bei hohen Signaldichten erfolgt eine sehr zuverlässige Abschätzung der tatsächlichen Größe.

Im Fall von normalverteilten Signalanhäufungen ist die Abschätzung der Halbwerts-

breite durch die Schwellwertmethode ungenauer, Minimal- und Maximalwert liegen weiter auseinander, die Ausdehnung ist stark von der Signaldichte und vom zufälligen Hintergrund abhängig.

Diese Methode ist für eine grobe Abschätzung der Clusterausdehnung geeignet, bessere Resultate werden im Fall von gleichverteilten Signalen innerhalb des Clusters erzielt. Bei hohem Hintergrundsignal werden falsche Signalanhäufungen registriert.

### 6.1.2 Clusterbestimmung durch Anpassung eines gaussian mixture models

Da diese Art der Clustergrößenbestimmung speziell auf normalverteilte Signalanhäufungen angepasst ist, können die Größen gleichverteilter Signalanhäufungen nicht zuverlässig bestimmt werden. Auffällig ist, dass die Ausdehnungen zwar systematisch unterschätzt werden, die ermittelten Werte aber konstant sind (siehe Abbildung 6.5). Denkbar wäre die Einführung eines radiusabhängigen Korrekturfaktors. Mit steigender Lokalisationsgenauigkeit nimmt auch die ermittelte Ausdehnung zu. Dies müsste bei einer Berechnung der Ausdehnung aus dem ermittelten Wert ebenfalls berücksichtigt werden.

Für normalverteilte Cluster kann die Halbwertsbreite sehr zuverlässig bestimmt werden, wobei die Genauigkeit mit steigender Signaldichte zunimmt. Für eine geringe Signaldichte wird die Halbwertsbreite unterschätzt. Bei hohem Hintergrundsignal und geringer Signaldichte werden auch hier falsche Signalanhäufungen registriert und vermessen. Der Einfluss der Lokalisationsgenauigkeit ist gering, ist aber bei kleinen Ausdehnungen zu erkennen. Hier wird die Halbwertsbreite leicht überschätzt. Bei geringen Signaldichten und hohen Werten für die Lokalisationsgenauigkeit werden die ermittelten Ausdehnungen ungenau.

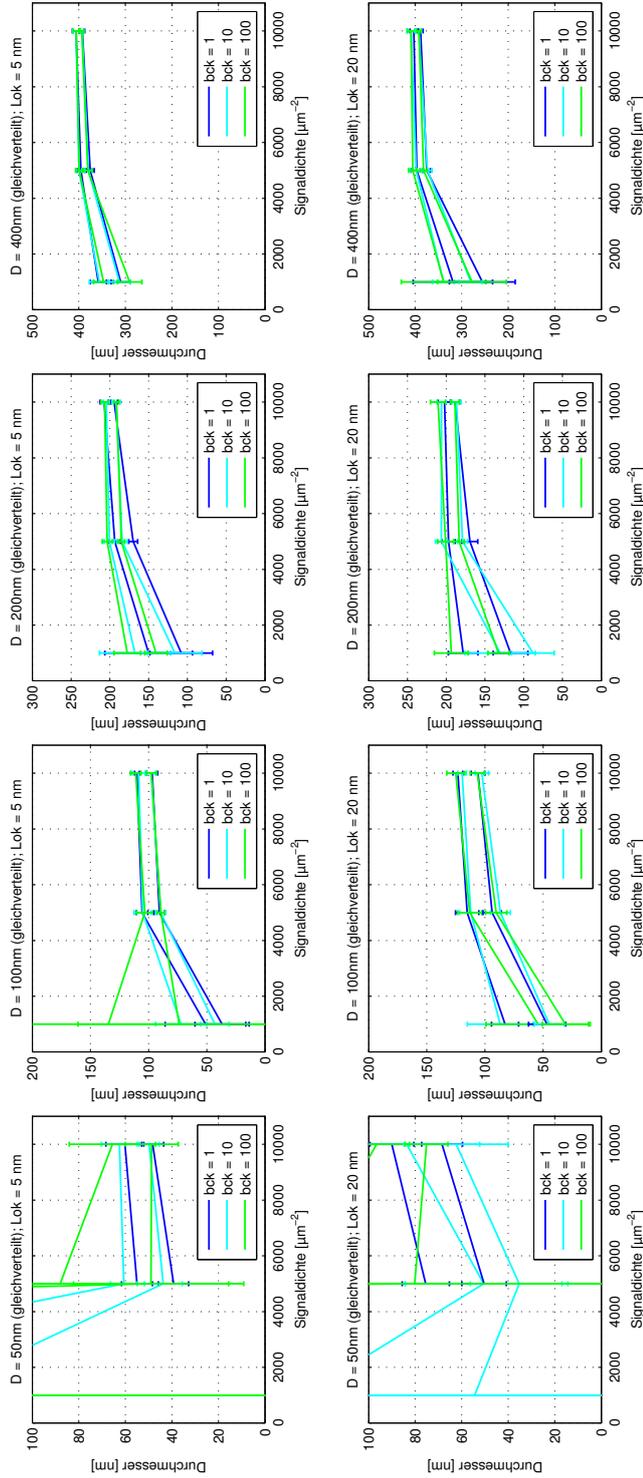
Dieser Algorithmus liefert sehr stabile Abschätzungen der Clustergrößen. Die Art der Verteilung muss berücksichtigt werden, um Aussagen über die Ausdehnungen zu treffen.

### 6.1.3 Clusterbestimmung durch Nachbarschaftsanalyse

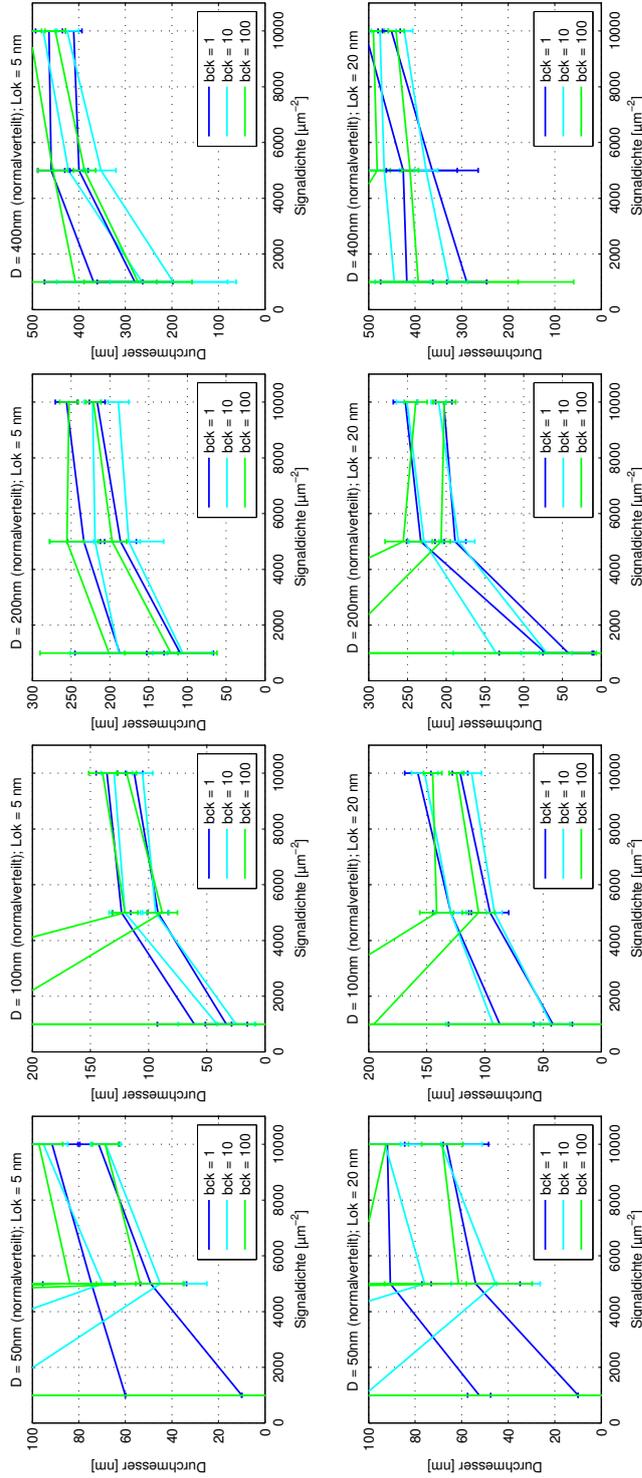
Die Bestimmung der Clustergrößen über das Nachbarschaftsverhältnis ergibt für eine Gleichverteilung innerhalb der Signalanhäufung sehr zuverlässige Werte. Bei kleinen Durchmessern wird bei hohen Werten für die Lokalisationsgenauigkeit die tatsächliche Größe überschätzt und der Einfluss des zufälligen Hintergrunds nimmt zu.

Im Fall normalverteilter Signale innerhalb eines Clusters ist die Methode nicht sehr zuverlässig, die ermittelte Clusterausdehnung ist sehr stark von der Signaldichte abhängig. Die Fluktuation in der Größenbestimmung ist sehr hoch, wie man auch an der Größe der Fehlerbalken in Abbildung 6.7 erkennen kann.

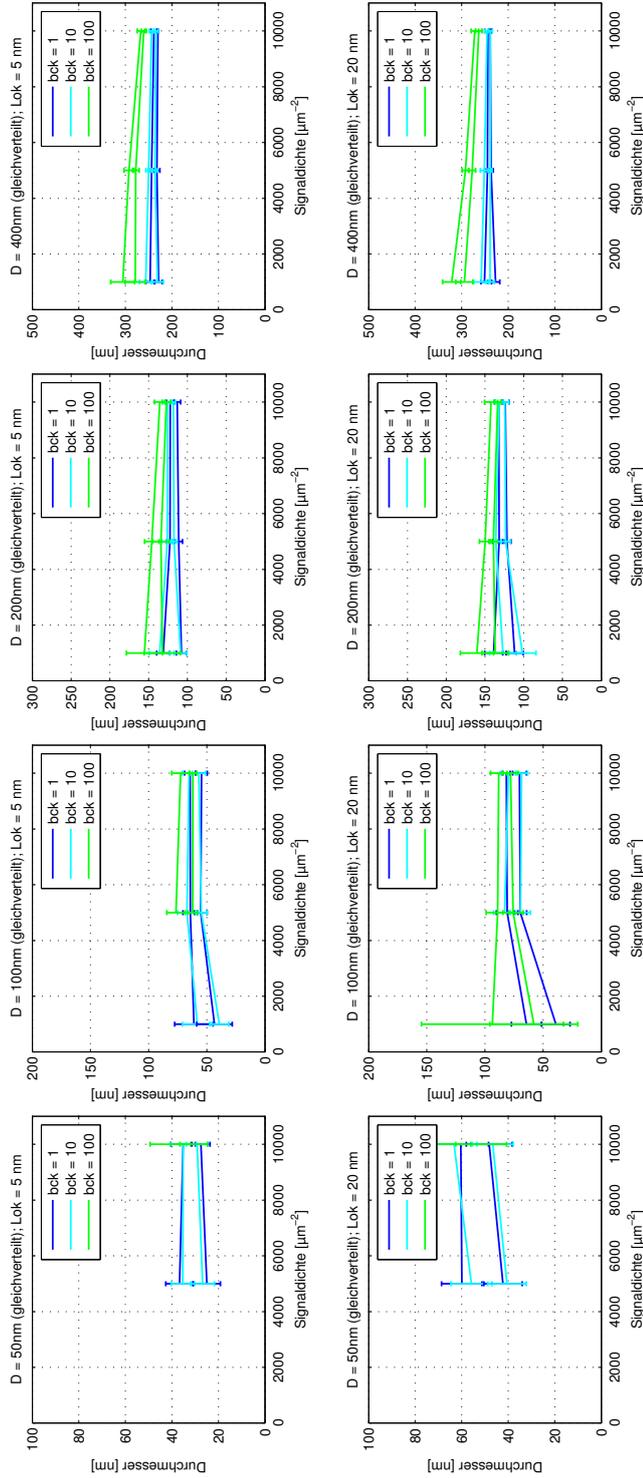
Diese Methode ist für gleichverteilte Signale innerhalb der Cluster geeignet, für normalverteilte Signale ergeben sich keine stabilen Werte.



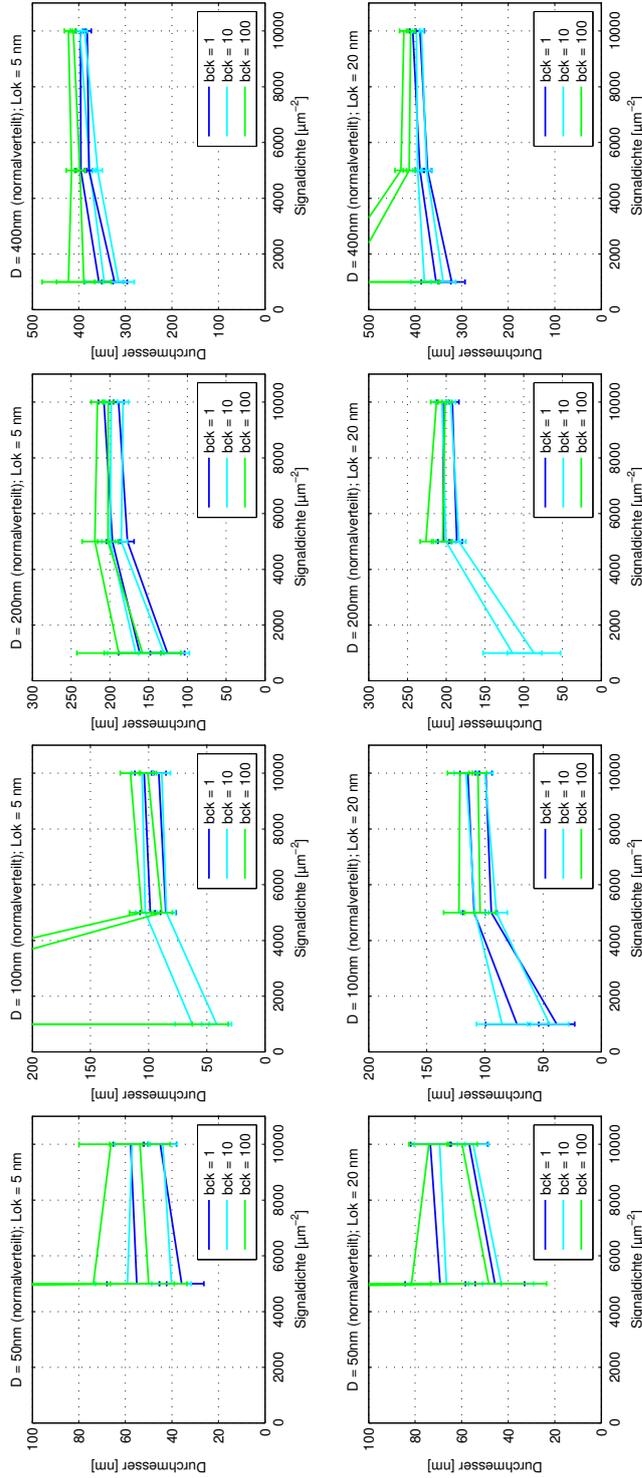
**Abbildung 6.2:** Ergebnisse der Clustergrößenbestimmung an simulierten gleichverteilten Signalanhäufungen durch ein Schwellwert-Verfahren. Der Durchmesser steigt von links nach rechts: 50nm, 100nm, 200nm und 400 nm. In der oberen Reihe beträgt die Positionsgenauigkeit 5nm, in der unteren 25nm. Zusätzlich zu den Signalanhäufungen wurde ein gleichverteiltes Hintergrundsignal ( $bck$  in  $\text{Signale}/\mu\text{m}^2$ ) addiert. Es wurde jeweils die minimale und die maximale Ausdehnung durch den Schwerpunkt bestimmt.



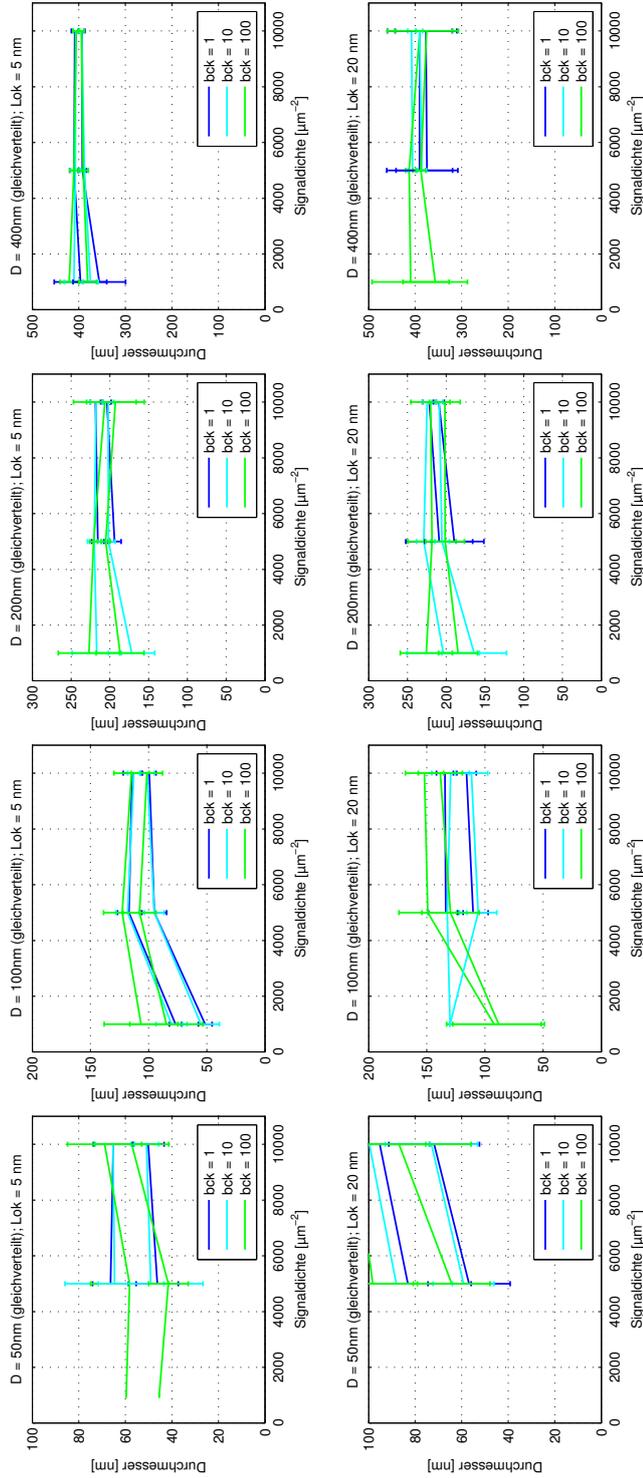
**Abbildung 6.3:** Ergebnisse der Clustergrößenbestimmung an simulierten normalverteilten Signalanhäufungen durch ein Schwellwert-Verfahren. Die Halbwertsbreite steigt von links nach rechts: 50nm, 100nm, 200nm und 400 nm. In der oberen Reihe beträgt die Positionsgenauigkeit 5nm, in der unteren 25nm. Zusätzlich zu den Signalanhäufungen wurde ein gleichverteiltes Hintergrundsignal (*bck* in  $\text{Signale}/\mu\text{m}^2$ ) addiert. Es wurde jeweils die minimale und die maximale Ausdehnung durch den Schwerpunkt bestimmt.



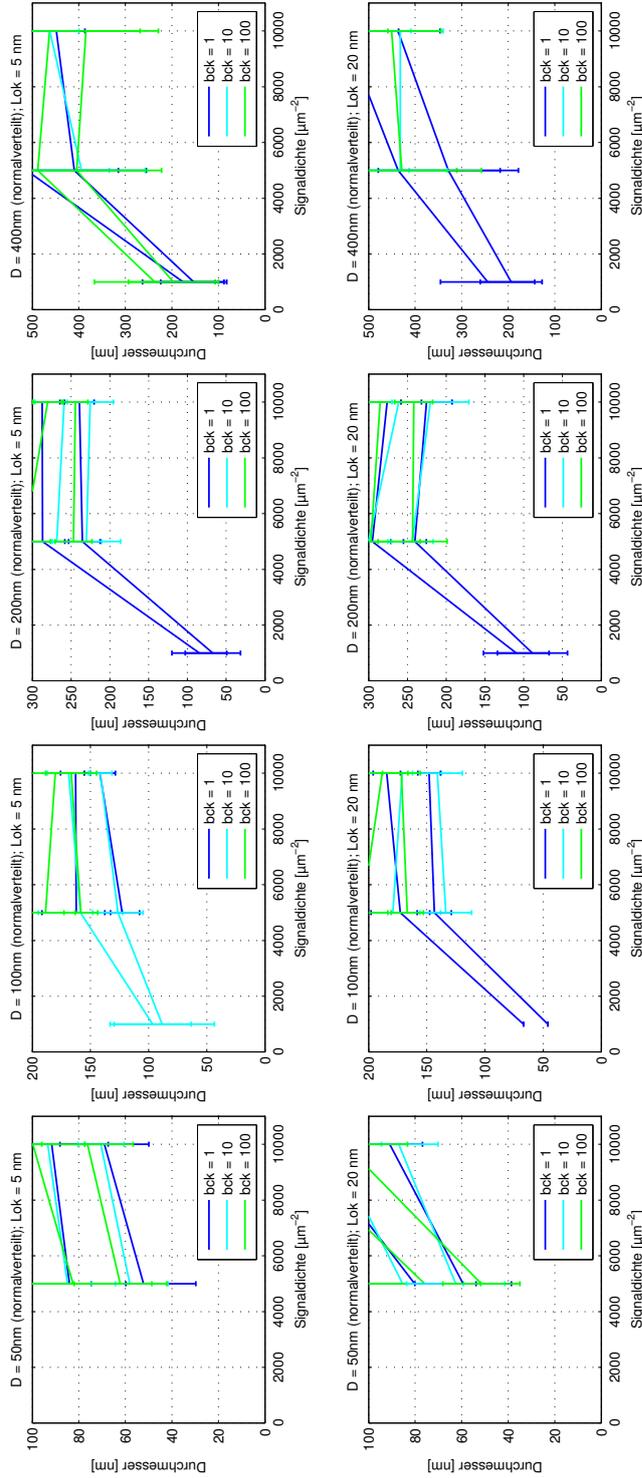
**Abbildung 6.4:** Ergebnisse der Clustergrößenbestimmung an simulierten gleichverteilten Signalanhäufungen durch Anpassung eines *gaussian mixture models*. Der Durchmesser steigt von links nach rechts: 50nm, 100nm, 200nm und 400 nm. In der oberen Reihe beträgt die Positionsgenauigkeit 5nm, in der unteren 25nm. Zusätzlich zu den Signalanhäufungen wurde ein gleichverteiltes Hintergrundsignal (*bck* in  $\text{Signale}/\mu\text{m}^2$ ) addiert. Es wurde jeweils die minimale und die maximale Ausdehnung durch den Schwerpunkt bestimmt.



**Abbildung 6.5:** Ergebnisse der Clustergrößenbestimmung an simulierten normalverteilten Signalanhäufungen durch Anpassung eines *gaussian mixture models*. Die Halbwertsbreite steigt von links nach rechts: 50nm, 100nm, 200nm und 400 nm. In der oberen Reihe beträgt die Positionsgenauigkeit 5nm, in der unteren 25nm. Zusätzlich zu den Signalanhäufungen wurde ein gleichverteiltes Hintergrundsignal (*bck* in  $\text{Signale}/\mu\text{m}^2$ ) addiert. Es wurde jeweils die minimale und die maximale Ausdehnung durch den Schwerpunkt bestimmt.



**Abbildung 6.6:** Ergebnisse der Clustergrößenbestimmung an simulierten gleichverteilten Signalanhäufungen durch lokale Nachbarschaftsanalyse. Der Durchmesser steigt von links nach rechts: 50nm, 100nm, 200nm und 400 nm. In der oberen Reihe beträgt die Positionsgenauigkeit 5nm, in der unteren 25nm. Zusätzlich zu den Signalanhäufungen wurde ein gleichverteiltes Hintergrundsinal ( $bck$  in  $\text{Signale}/\mu\text{m}^2$ ) addiert. Es wurde jeweils die minimale und die maximale Ausdehnung durch den Schwerpunkt bestimmt.



**Abbildung 6.7:** Ergebnisse der Clustergrößenbestimmung an simulierten normalverteilten Signalanhäufungen durch lokale Nachbarschaftsanalyse. Die Halbwertsbreite steigt von links nach rechts: 50nm, 100nm, 200nm und 400 nm. In der oberen Reihe beträgt die Positionsgenauigkeit 5nm, in der unteren 25nm. Zusätzlich zu den Signalanhäufungen wurde ein gleichverteiltes Hintergrundsignal (*bck* in  $\text{Signale}/\mu\text{m}^2$ ) addiert. Es wurde jeweils die minimale und die maximale Ausdehnung durch den Schwerpunkt bestimmt.

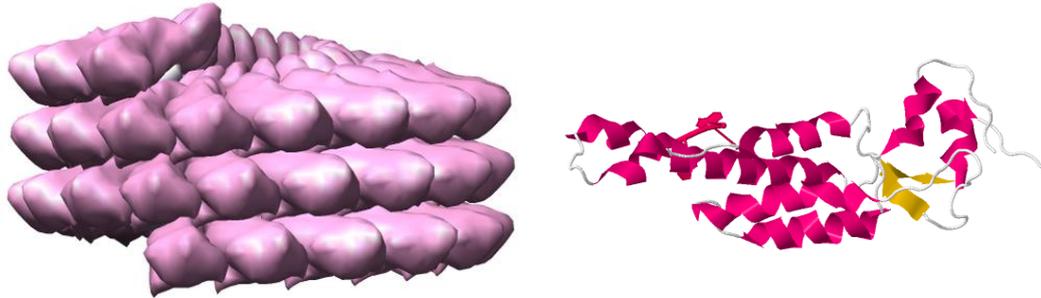
## 7 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden nun einige Ergebnisse der Untersuchung biologischer Strukturen mit Hilfe der Lokalisationsmikroskopie vorgestellt. Dabei kommen die zuvor beschriebenen Algorithmen sowie einige speziell an die Fragestellungen angepassten Methoden zur Auswertung zur Anwendung. Diese angepassten Methoden werden zusammen mit der jeweiligen Fragestellung vorgestellt. Zunächst werden Experimente gezeigt, in welchen jeweils eine Struktur fluoreszenzmarkiert ist, dann Experimente und deren Auswertung mit zwei Fluoreszenzmarkierungen.

### 7.1 Das Tabakmosaikvirus (TMV)

Das Tabakmosaikvirus ist ein zylinderförmiges, robustes, selbstassemblierendes Pflanzenvirus mit einer Länge von  $300nm$  und einem Durchmesser von  $18nm$ . In seinem Inneren hat es einen Kanal mit einem Durchmesser von  $4nm$  [Lew00]. Seine Proteinhülle besteht aus 2130 identischen, helikal angeordneten monomeren Hüllproteinen, welche sich um die virale RNA im Zentrum anlagern. Durch die Länge dieser RNA ist die Gesamtlänge des Viruspartikels festgelegt. TMVs sind vielversprechende Bausteine für verschiedene nanotechnische Anwendungen. Sie wurden bereits als Elektroden in Batterien [GMR08], als Zusätze für Ferrofluide [WMD<sup>+</sup>10, WZM<sup>+</sup>10] oder zur Signalverstärkung von Sensoren [SR10, YWUD08, MLC09] verwendet. Durch biochemische und gentechnische Verfahren konnten verschiedene TMV-ähnliche Nanoröhrchen mit vorgegebenen Größenverhältnissen und Verzweigungen angefertigt werden [MKJW10, Gei10]. Aufgrund von Mutationen der Hüllproteine [DS02, YNL<sup>+</sup>05, LRC05] eignen sie sich gut für chemische Modifikationen, beispielsweise durch kovalente Bindungen an exponierten Stellen dieser Proteine.

Die Viruspartikel tendieren dazu, Oligomer-Aggregate zu bilden. Dabei lagern sie sich entweder aufgrund der inhärenten Interaktionen der einzelnen Hüllproteine Kopf an Schwanz [But99] oder durch Aminosäure-Interaktionen an der Oberfläche der Hüllproteine lateral entlang ihrer Hauptachse aneinander. Daher ist es von großem Interesse, hochaufgelöste Informationen über den Assemblierungszustand der Hüllproteine zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde eine Mutante des TMV (T185K, TMV<sub>Lys</sub>) [Gei10, DS02] fluoreszenzmarkiert und mit Hilfe der Lokalisationsmikroskopie vermessen.



**Abbildung 7.1:** Das Tabakmosaikvirus (TMV). Links: Assemblierung einiger Hüllproteine zu einer helikalen Struktur, welche die virale RNA umgibt. Nach [SCC<sup>+</sup>07], dargestellt mit Jmol[Jmo]. Rechts: Struktur eines einzelnen Hüllproteins des TMV. Nach [CO10], ebenfalls dargestellt mit Jmol.

### 7.1.1 Probenpräparation

Die Mutante TMV<sub>Lys</sub> wurde aus infizierten *Nicotiana tabacum* cv Samsun nn Pflanzen isoliert. Die Hüllproteine wurden durch einen 10fachen Überschuss von Atto 488 Succinimidylester (NHS) (Sigma-Aldrich, München) in 10mM Natrium-Kaliumphosphat Puffer (pH 7,4) markiert. Die Reaktionsmischung wurde 1,5h bei 20°C im Dunkeln bei 600 Umdrehungen geschüttelt (Thermomixer Compact, Eppendorf<sup>1</sup>). Überschüssiger ungebundener Farbstoff wurde durch zweistündige Ultrazentrifugation bei 15°C und 120000g (Sorvall Ultra Pro 80, Thermo Fisher Scientific<sup>2</sup>) entfernt. Das Pallet mit dem modifizierten Virus wurde zweimal erneut in 45µl 10mM NKP pH 7,2 gewaschen. Die Label- und Assemblierungseffizienz der markierten Hüllproteine in die viralen Partikel wurde durch UV-Absorption (NanoDrop ND-1000, PEQLAB<sup>3</sup>) zu 28% bestimmt. In einem 300nm langen Viruspartikel mit 2130 Hüllproteinen sind also etwa 600 markiert.

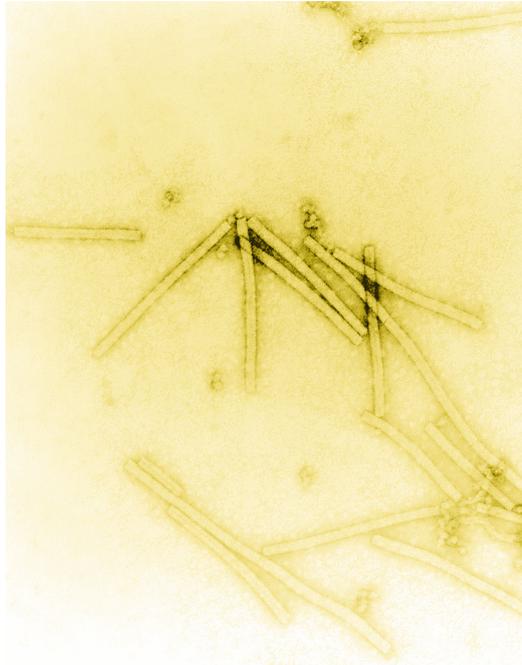
5µl einer 0,1pg/µl Lösung in Wasser wurden auf ein Mikroskopdeckglas (Menzel<sup>4</sup>,

<sup>1</sup>Eppendorf AG, 22339 Hamburg

<sup>2</sup>Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA 02454 USA

<sup>3</sup>PEQLAB Biotechnologie GMBH, 91052 Erlangen

<sup>4</sup>Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, 38116 Braunschweig



**Abbildung 7.2:** TEM-Aufnahme einiger Tabakmosaikviren bei 160 000-facher Vergrößerung [Wik].

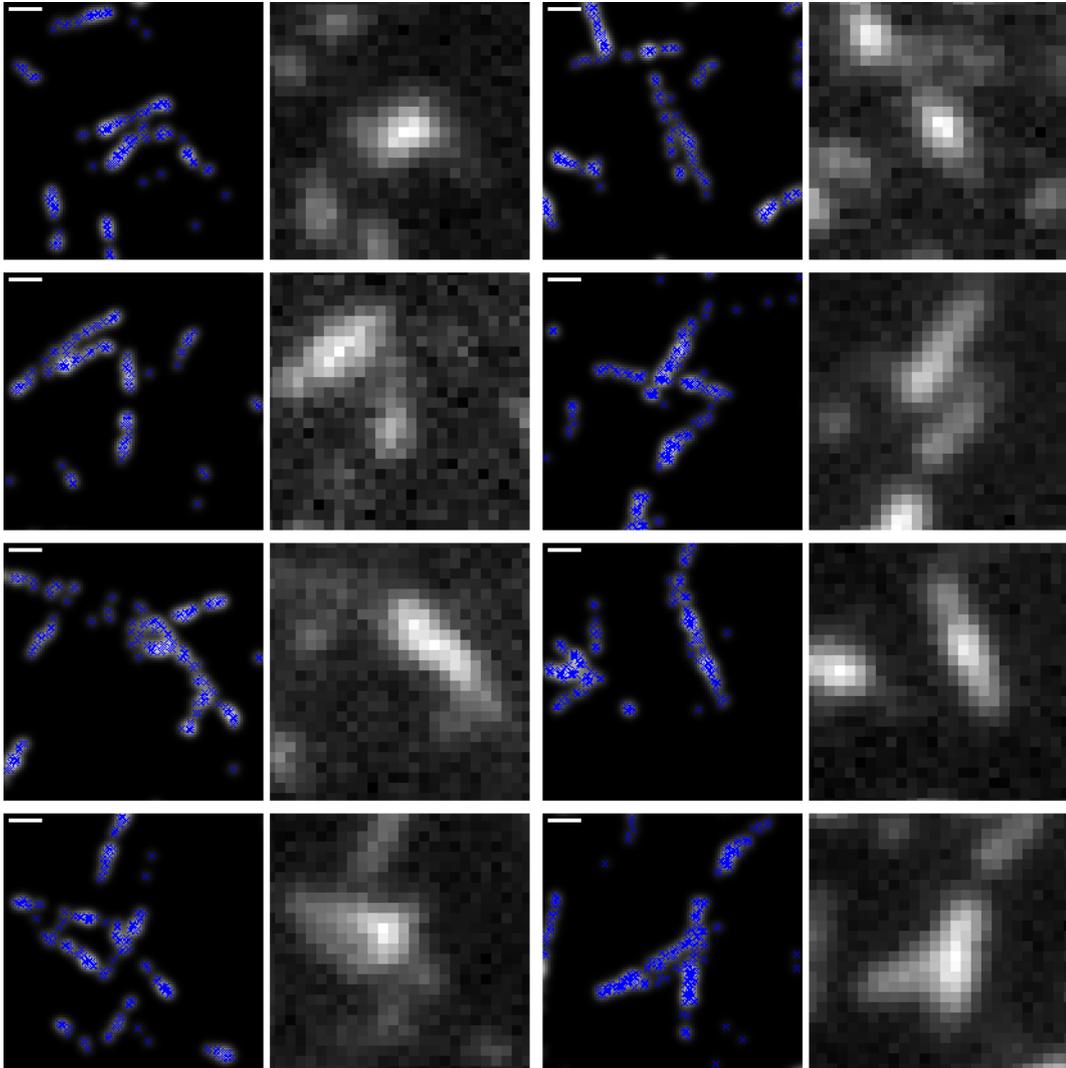
Nr. 1,5,  $175\mu\text{m}$ ) gegeben. Dieses wurden in ein Vakuum gegeben, bis die Flüssigkeit verdampft war, mit ProlongGold (Invitrogen<sup>5</sup>) eingebettet und auf einem Objektträger fixiert.

### 7.1.2 Aufnahme und Auswertung der Daten

Für die Aufnahmen wurden Regionen auf dem Objektträger ausgewählt, in welchen die einzelnen TMV-Partikel offensichtlich isoliert vorlagen. Für die Beleuchtung wurde die  $488\text{nm}$ -Linie des  $\text{Ar}^+$ -Ionen-Lasers verwendet, mit einer Leistungsdichte auf der Probe von  $P/A \approx 11\text{kW}/\text{cm}^2$ . Für jede gewählte Region wurde ein Datenstapel bestehend aus 2000 aufeinanderfolgenden Einzelaufnahmen mit einer jeweiligen Integrationszeit von  $60\text{ms}$  erzeugt. Diese Daten wurden mit Hilfe des 'spdm'-Algorithmus (siehe Abschnitt 5.1) ausgewertet. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit lag bei  $\bar{\sigma}_{lok} = 8\text{nm}$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 4\text{nm}$  (siehe auch Abbildung 7.7). Die so erhaltenen Positionen wurden in einem Lokalisationsbild wie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben eingetragen. Dieses Bild und die zugehörige

---

<sup>5</sup>Invitrogen Cooperation, Carlsbad, California 92008, USA



**Abbildung 7.3:** Verschiedene Beispiele von TMV-Strukturen, dargestellt in zwei Spalten. Auf der linken Seite ist jeweils das Lokalisationsbild zu sehen, die blauen Kreuze markieren die einzelnen Positionen der Atto 488 Fluorophore. In weiß ist die mittlere Lokalisationsgenauigkeit als Gauß-Verteilung dargestellt (siehe Abschnitt 5.2.1). Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt  $200nm$ . Rechts neben jedem Lokalisationsbild ist im selben Maßstab die gleiche Struktur in der Weitfeldaufnahme gezeigt, welche vor der Lokalisationsaufnahme angefertigt wurde.

Orte-Matrix wurden als Grundlage für eine modifizierte Version des Skriptes 'Strukturverlauf' (siehe Abschnitt 5.3.3) verwendet, wobei jeweils Start- und Endposition  $P_1$  und  $P_2$  isolierter TMV-Partikel im Lokalisationsbild durch anklicken mit der Maus ausgewählt werden konnten, welche als Startpunkte für die weitere Auswertung dienten. Aus der Orte-Matrix wurden diejenigen Positionen extrahiert, deren Distanz orthogonal zur Verbindungslinie von  $P_1$  nach  $P_2$  kleiner war als  $100nm$ . An diese Positionen wurde iterativ eine Geradengleichung durch Minimierung des quadratischen Abstandes und biquadratische Wichtung der Distanzen in jeder Iteration angepasst. Folgende Wichtungsfunktion wurde verwendet:

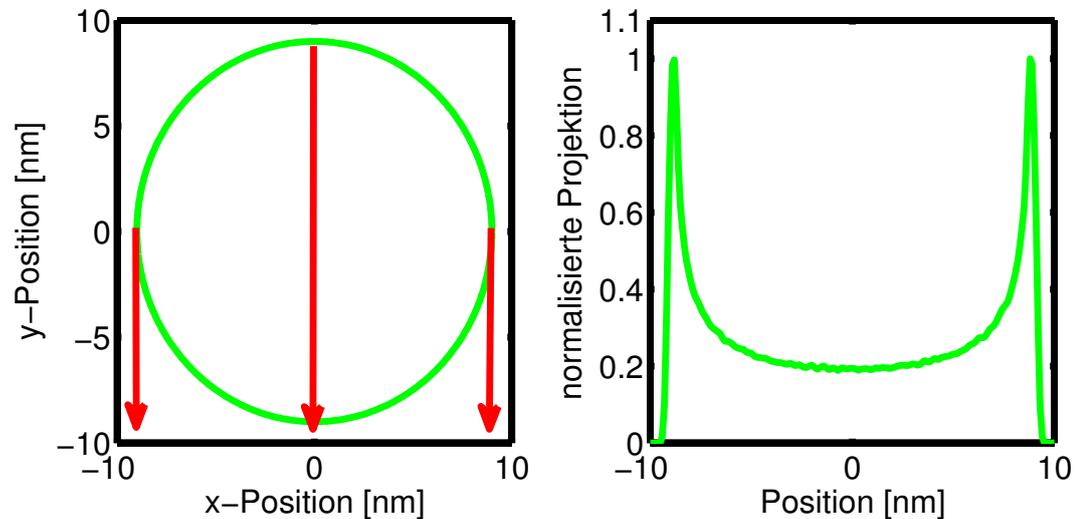
$$w = \left( \left| \frac{r}{r_0} \right| < 1 \right) \cdot \left( 1 - \left( \frac{r}{r_0} \right)^2 \right)^2. \quad (7.1)$$

Dabei ist  $w$  der Wichtungsfaktor,  $r$  das Residuum aus der Minimierung der quadratischen Abweichung und  $r_0$  der Skalierungsfaktor, bis zu welchem Distanzen in der Wichtung berücksichtigt werden sollten (in diesem Fall  $75nm$ ).

Der orthogonale Abstand jeder Position zu der so erhaltenen Gerade wurde bestimmt und in einem Array gespeichert, ebenso wie die Abstände zwischen den einzelnen Positionen parallel zur Geraden. Aus diesen konnte die Gesamtlänge des jeweiligen TMV-Partikels ermittelt werden (siehe auch Abbildung 7.7).

Für die weitere Analyse wurde eine Modellfunktion erstellt, welche die Abstände der Signalpositionen von der Hauptachse der einzelnen TMV-Partikel simuliert. Hierfür wurde angenommen, dass sich die Fluorophore alle im gleichen radialen Abstand von der Hauptachse an die Hüllproteine binden (siehe Abbildung 7.4). Die Hauptachse der TMV-Partikel wird als parallel zur Ebene des Deckglases angenommen, da sich die Partikel bei der Präparation auf dieses abgesetzt haben. Da durch die Aufnahme und Auswertung der Daten eine Projektion der Positionen im Objektraum entlang der optischen Achse erfolgt (da keine Methoden zur Verbesserung der axialen Auflösung verwendet wurden und diese somit bei etwa  $600nm$  liegt), wurde die radiale Verteilung der Fluorophore ebenfalls auf eine laterale Achse projiziert. Für die Breite der Verteilung wurde dabei ein Wert von  $1nm$  angenommen. Hieraus ergibt sich die in Abbildung 7.4 gezeigte Verteilung. Die Ungenauigkeit in der Positionsbestimmung, also die Lokalisationsgenauigkeit, wurde in dem Modell dadurch berücksichtigt, dass diese Verteilung noch zusätzlich mit einer Gaußschen Normalverteilung gefaltet wurde, deren Standardabweichung der mittleren Lokalisationsgenauigkeit entsprach (siehe Abbildung 7.5).

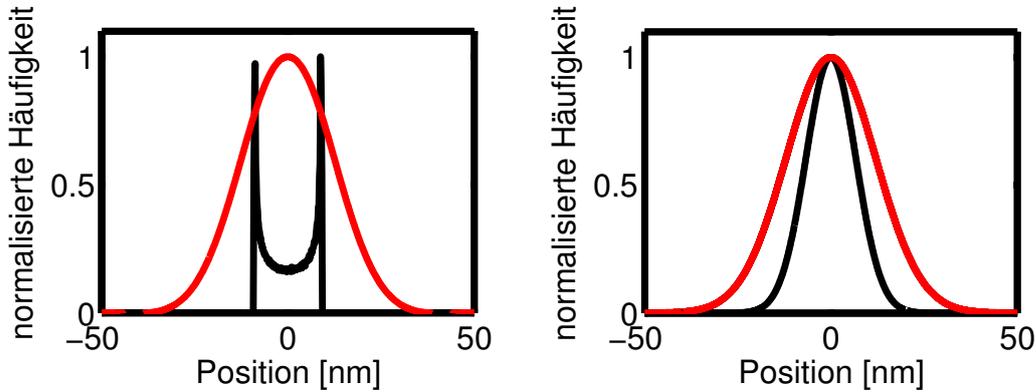
Die Werte der Modellfunktion wurden numerisch bestimmt. Als Funktionsparameter wurden die Amplitude  $A_{Mod}$ , der radiale Abstand der Fluorophore zur Hauptachse des Viruspartikels  $r_{mod}$  und die mittlere Lokalisationsgenauigkeit  $\sigma_{Mod}$  gewählt. Diese Modellfunktion wurde durch Minimierung der quadratischen Abweichung an die ermittelte Verteilung der Abstände der Signalpositionen zu den jeweiligen Haupt-



**Abbildung 7.4:** Modell der Verteilung der Fluorophore in einem TMV-Partikel. Links: Radiale Verteilung der Fluorophore um die Hauptachse. Dieser Verteilung liegt die Annahme zugrunde, dass die Fluorophore jeweils an der selben Stelle der einzelnen Hüllproteine binden. Die Blickrichtung erfolgt in Richtung der Hauptachse des zylinderförmigen TMV-Partikels, so dass alle Fluorophore auf dessen Oberfläche auf einem Kreis um die Hauptachse liegen. Die roten Pfeile geben die Richtung der optischen Achse des Mikroskops an, entlang welcher die Signalverteilung projiziert wird. Rechts: Projektion der Verteilung entlang der optischen Achse, der Maximalwert wurde auf 1 normiert.

achsen der Viruspartikel angenähert. Dies wurde zum einen für 111 Viruspartikel durchgeführt, deren Längebestimmung einen Wert innerhalb des Intervalls von  $250\text{nm}$  bis  $350\text{nm}$  ergab (Abbildung 7.6 links), zum anderen für alle 357 vermessenen Viruspartikel (Abbildung 7.6 rechts). Für die 111 Partikel mit einer Länge zwischen  $250\text{nm}$  und  $350\text{nm}$  ergab sich ein radialer Abstand der Fluorophore von  $r_{Mod} = (8,1 \pm 0,3)\text{nm}$ , für alle 357 Partikel ein radialer Abstand der Fluorophore von  $r_{Mod} = (8,9 \pm 0,2)\text{nm}$ , was gut mit dem Erwartungswert von  $9\text{nm}$  übereinstimmt.

Die Verteilung der Abstände von der Hauptachse wurde zudem durch eine Gaußsche Normalverteilung angenähert. Geht man davon aus, dass sich diese Normalverteilung aus einer ursprünglichen Gauß-Verteilung der Fluorophore und dem entsprechenden Fehler aufgrund der mittleren Lokalisationsgenauigkeit zusammensetzt (Abbildung



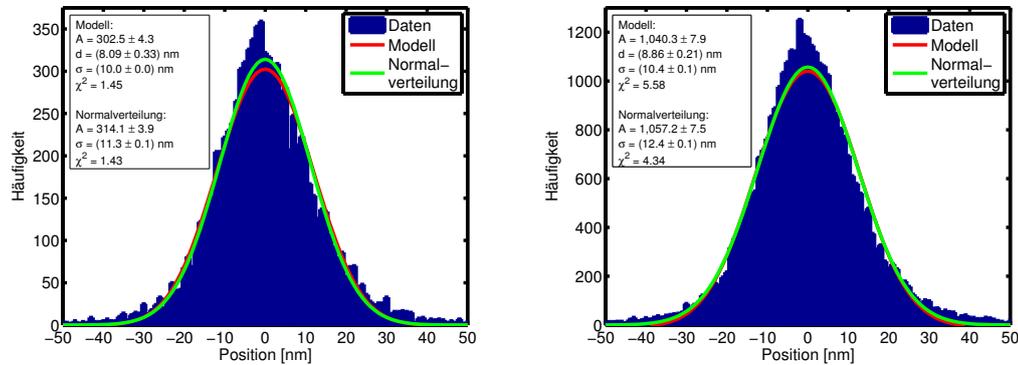
**Abbildung 7.5:** Einfluss der Ungenauigkeit in der Positionsbestimmung (Lokalisationsgenauigkeit). Links: Um den Einfluss der Ungenauigkeit in der Bestimmung der Positionen der einzelnen Fluorophore zu berücksichtigen, wurde die im Text beschriebene Modellverteilung der Fluorophore (schwarz) zusätzlich mit einer Gaußfunktion gefaltet, deren Standardabweichung der mittleren Lokalisationsgenauigkeit entspricht. Das Resultat ist rot dargestellt. Rechts: Nimmt man eine Gaußförmige Verteilung der Fluorophore um die Hauptachse der TMV-Partikel im Lokalisationsbild an (schwarz), so erhält man nach Faltung mit einer Gaußfunktion, deren Standardabweichung der mittleren Lokalisationsgenauigkeit entspricht, die rot dargestellte Normalverteilung.

7.5), so erhält man für die Halbwertsbreite  $FWHM_{Fl}$  der Fluorophorverteilung,

$$FWHM_{Fl} = 2,35 \cdot \sqrt{\sigma_{ges}^2 - \sigma_{lok}^2}, \quad (7.2)$$

mit der Standardabweichung der Gesamtverteilung  $\sigma_{ges}$  und der mittleren Lokalisationsgenauigkeit  $\sigma_{lok}$ . In diesem Fall erhält man für die 111 Partikel mit Längen zwischen  $250nm$  und  $350nm$  einen Wert von  $FWHM_{Fl} = (20,8 \pm 0,2)nm$  (mit  $\sigma_{ges} = (11,3 \pm 0,1)nm$  und  $\sigma_{lok} = 7,0nm$ ) und für alle 357 Partikel einen Wert von  $FWHM_{Fl} = (23,3 \pm 0,2)nm$  (mit  $\sigma_{ges} = (12,4 \pm 0,1)nm$  und  $\sigma_{lok} = 8,0nm$ ). Auch dies passt gut zu der Gesamtbreite von  $18nm$ . Die  $\chi^2$ -Werte sind jeweils für die längeren Partikel schlechter, was damit erklärt werden kann, dass es hier aufgrund der längeren Strukturen entweder zu leichten Krümmungen der Hauptachse oder zu zusätzlichen lateralen Anlagerungen der TMV-Partikel kommen kann. Da aber nur eine einzige lineare Hauptachse an die Daten angepasst wird, wird durch diese Effekte die Verteilung der Abstände von der Hauptachse beeinflusst.

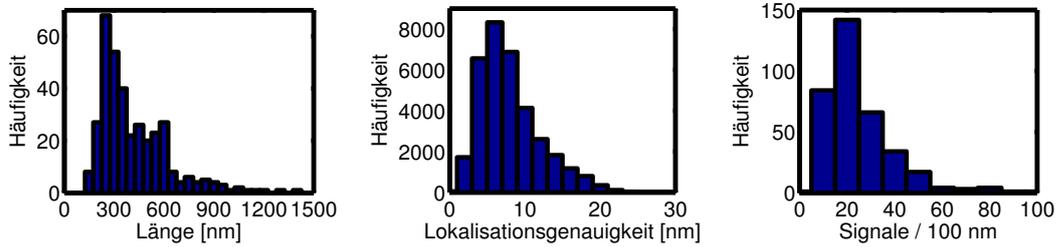
In Abbildung 7.7 ist links die Verteilung der Partikellängen aufgetragen. Deutlich zu erkennen sind ein Maximum bei einer Länge von etwa  $300nm$ , welcher aufgrund der



**Abbildung 7.6:** Verteilung der Abstände von der Hauptachse der TMV-Partikel. Links: Es wurden 111 Partikel berücksichtigt, deren Länge zwischen  $250\text{nm}$  und  $350\text{nm}$  lag. Die angepasste Modellfunktion (siehe Text) ist rot dargestellt, die angepasste Normalverteilung grün. Rechts: Das gleiche für alle 357 ausgewerteten TMV-Partikel.

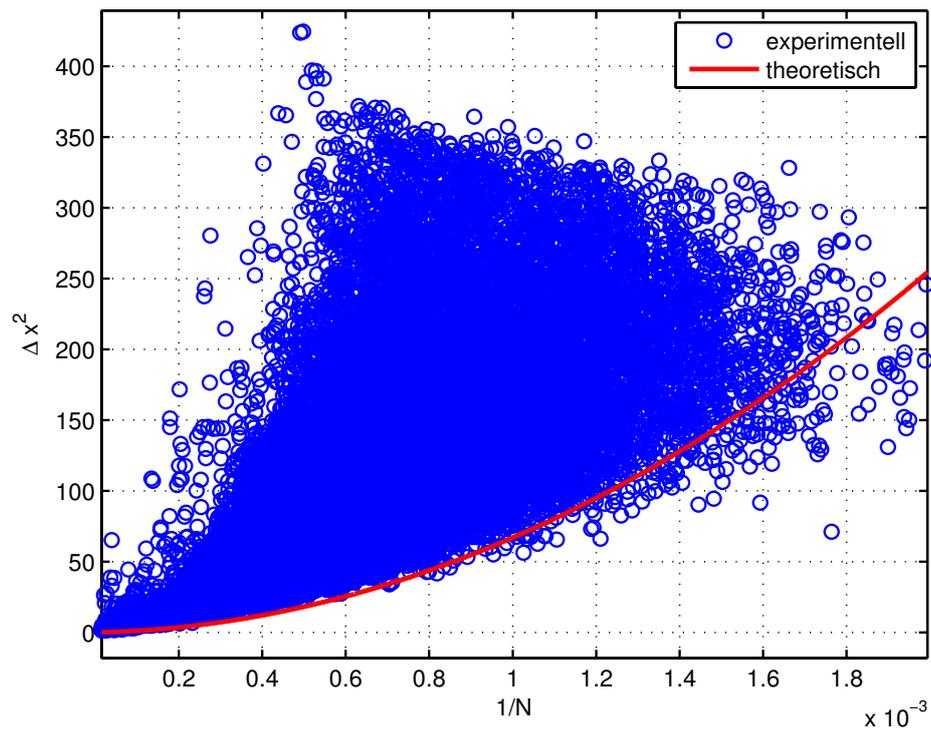
Vorkenntnisse über die TMV-Struktur auch zu erwarten war. Zusätzlich ist auch ein Maximum bei etwa  $600\text{nm}$  zu erkennen, welchen man als eine Struktur aus zwei Viruspartikeln interpretieren kann, welche sich Kopf an Schwanz aneinander gelagert haben. Auch eine Aneinanderlagerung von mehr als zwei Partikeln ist möglich. Die Längenwerte dazwischen können als laterale Anlagerungen von Viruspartikeln mit parallelen Hauptachsen interpretiert werden, deren Start- und Endpunkte gegeneinander verschoben sind. In Abbildung 7.7 ist rechts die Anzahl an Signalpositionen pro  $100\text{nm}$  Virusstruktur aufgetragen. Im Mittel sind dies 25,5, mit einer Standardabweichung von 22,7. Dies entspricht einer mittleren Entfernung zweier Fluorophore entlang der Hauptachse von etwa  $4\text{nm}$ . Für jede  $300\text{nm}$  lange TMV-Struktur wurden im Mittel also etwa 76 Signalpositionen registriert. Bei einer Labeleffizienz von 28 % der 2130 Hüllproteine (entsprechend 596 Fluorophoren pro TMV-Partikel) ergibt dies eine Detektionseffizienz für das verwendete Fluorophor Atto 488 von etwa 13%.

Das Verhältnis der ermittelten Lokalisationsgenauigkeit zur Anzahl der detektierten Photonen ist in Abbildung 7.8 eingetragen. Zum Vergleich ist in dieses Diagramm auch die nach Gleichung 3.12 theoretisch bestimmte Erwartung eingezeichnet (für eine Wellenlänge von  $\lambda = 530\text{nm}$ , ein Pixelrauschen von  $a = 65\text{nm}$  und einen zusätzlichen Hintergrund von  $18\text{counts}$ ). In der Regel entspricht die wie in Abschnitt 5.1 beschrieben ermittelte Lokalisationsgenauigkeit nur im besten Fall der theoretisch erreichbaren. Werden wenige ( $N < 1000$ ) Photonen detektiert, kommt es vereinzelt

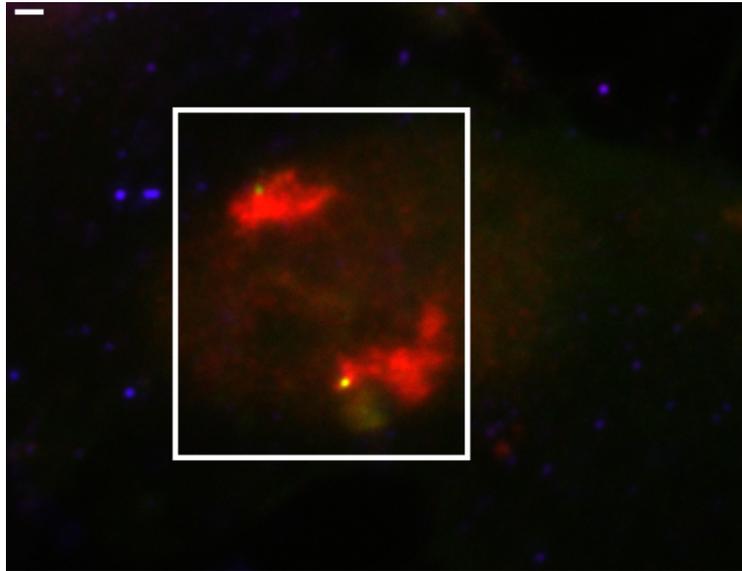


**Abbildung 7.7:** Weitere Auswertungen der TMV-Partikel. Links: Verteilung der Partikellängen. Zusätzlich zu dem Maximum bei etwa  $300\text{nm}$ , welches aufgrund der bekannten Länge eines einzelnen Partikels von  $300\text{nm}$  zu erwarten war, existiert ein weiteres Maximum bei etwa  $600\text{nm}$ . Dies kommt wahrscheinlich aus der Kopf-an-Schwanz-Anlagerung zweier TMV-Partikel. Auch parallele Anlagerungen längs der Hauptachse sind möglich, womit die übrigen Längen erklären werden können. Mitte: Verteilung der Lokalisationsgenauigkeiten der einzelnen Signale. Die Lokalisationsgenauigkeit lag im Mittel bei  $8\text{nm}$ , mit einer Standardabweichung von  $4\text{nm}$ . Rechts: Anzahl der Signale pro  $100\text{nm}$  Viruslänge. Im Mittel wurden etwa 26 Signale innerhalb von  $100\text{nm}$  entlang der Hauptachse der TMV-Partikel (Standardabweichung: 23) detektiert.

zu Abweichungen und die Lokalisationsgenauigkeit wird etwas zu gut abgeschätzt. Eventuell handelt es sich hierbei um eine falsche Abschätzung der Gesamtzahl an Photonen oder das Hintergrundsignal variiert lokal und war in diesem Fall etwas geringer. Die theoretische Kurve beschreibt nur einen globales Hintergrundsignal. Für eine hohe Zahl detektierter Photonen ( $N > 1000$ ) spielt der Hintergrund nur noch eine untergeordnete Rolle, hier ist ein derartiger Effekt nicht zu beobachten.



**Abbildung 7.8:** Verhältnis der Lokalisationsgenauigkeit  $\Delta x$  zur Anzahl der detektierten Photonen. Die experimentellen Daten sind als blaue Kreise, die theoretische Erwartung nach Gleichung 3.12 als rote Kurve eingetragen.

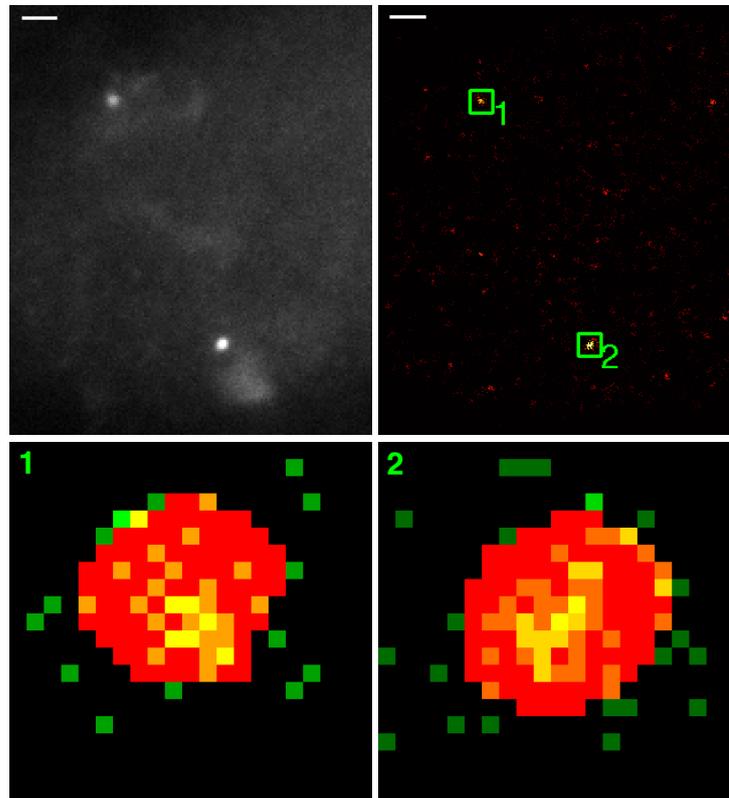


**Abbildung 7.9:** Beispiel für einen Fibroblasten-Zellkern. In rot ist Chromosome-Territorium 15, in grün das Gen *SNRPN* und in blau die BrdU-Markierung zum Nachweis der S-Phase dargestellt. Die Länge des Maßstabes beträgt  $1\mu\text{m}$ . In dem weiß umrandeten Bereich wurde eine Lokalisationsmessung des mit Alexa 488 markierten Gens *SNRPN* durchgeführt (siehe Abbildung 7.10).

## 7.2 Lokalisationsmikroskopie von FISH-markierten Präparaten

Mit Hilfe der Lokalisationsmikroskopie ist es möglich, Präparate zu untersuchen, welche durch Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) [Car96, SC05] markiert wurden [LGW<sup>+</sup>09, MSJ<sup>+</sup>10, YWss]. Durch FISH können spezifisch RNA- oder DNA-Sequenzen *in situ* durch Basenpaarung markiert werden.

Unter der Annahme, dass inaktives Chromatin (fakultatives, konstitutives Heterochromatin) im Kern kompakter vorliegt als transkriptionell aktives (Euchromatin), sollte untersucht werden, ob dies auch auf Genebene zutrifft. Ein einfaches aber elegantes Model für solche Untersuchungen sind geprägte Gene. In jedem Kern findet sich sowohl ein aktives als auch ein inaktives Allel, die jeweils direkt miteinander verglichen werden können. Hier wurde das Gen *SNRPN* in humanen Fibroblasten mittels FISH fluoreszenzmarkiert. *SNRPN* wird ausschließlich auf dem paternal vererbten Chromosom exprimiert. Das maternale Allel ist stillgelegt durch Methylierung der CpG-Inseln in der Imprinting Control Region (ICR). Einflüsse durch Zell-Zell-Variabilitäten z.B. bedingt durch die Zellzyklus-Phase, Präparations-Artefakte,



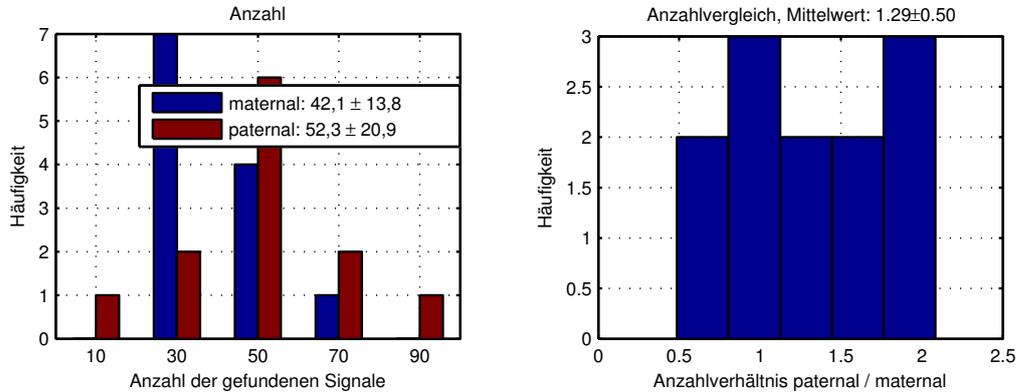
**Abbildung 7.10:** Maternales und paternales Signal. Obere Reihe: Links ist das vor der Lokalisationsaufnahme angefertigte Weitfeldbild dargestellt, rechts daneben ein Lokalisationsbild, bei dem an jeder Signalposition der Helligkeitswert der Anzahl der in einem  $100\text{nm}$  Umkreis benachbarten Signalpositionen entspricht (siehe Abschnitt 5.2.4). Der Maßstab beträgt  $1\mu\text{m}$ . In der Unteren Reihe sind das maternale Signal (1) und das paternale Signal (2) gezeigt, Die einzelnen Signalpositionen sind grün dargestellt, die ermittelte Clusterfläche rot. Die Pixelgröße entspricht  $16,25\text{ nm}$ .

Veränderungen in der Umgebung (neben den beschriebenen natürlich auftretenden Unterschieden zwischen einzelnen Zellen) können so minimiert werden.

### 7.2.1 Die verwendeten Proben

Bei den Zellen handelt es sich um humane Fibroblasten (Zelllinie: GM00118<sup>6</sup>) die ein derivatives Chromosome 15 tragen. Der Karyotyp ist  $46,XX,der(15)(15qter>15p11::$

<sup>6</sup>Coriell Cell Repository, Camdem, New Jersey, USA



**Abbildung 7.11:** Links: Anzahl der Signale innerhalb der maternalen und paternalen Cluster. Rechts: Verhältnis der Anzahl der Signale im paternalen Cluster zu der Anzahl der Signale im maternalen Cluster für jeden Zellkern.

Yq11>Yqter)pat. Ein derivatives Chromosom entsteht durch eine strukturelle Umlagerung zwischen zwei oder mehr Chromosomen. Da es sich um eine weibliche Zelllinie handelt, wurde das derivative Chromosom vom Vater vererbt.

Zum Nachweis der S-Phase wurde eine BrdU-Markierung durchgeführt. Hierzu wurde BrdU in das Medium (Endkonzentration:  $10\mu M$ ) gegeben, danach erfolgt eine Inkubation für 15-30 Minuten. Hierbei wird BrdU (Sigma-Aldrich<sup>7</sup>) anstelle von Thymidin während der Replikation in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Danach erfolgte eine Fixierung mit 4% PFA in PBS für 10 Minuten. BrdU wurde durch Immunfärbung nachgewiesen (primärer Antikörper Maus-anti-BrdU (Roche<sup>8</sup>), sekundärer Antikörper Ziege-anti-Maus-Alexa647 (Invitrogen)).

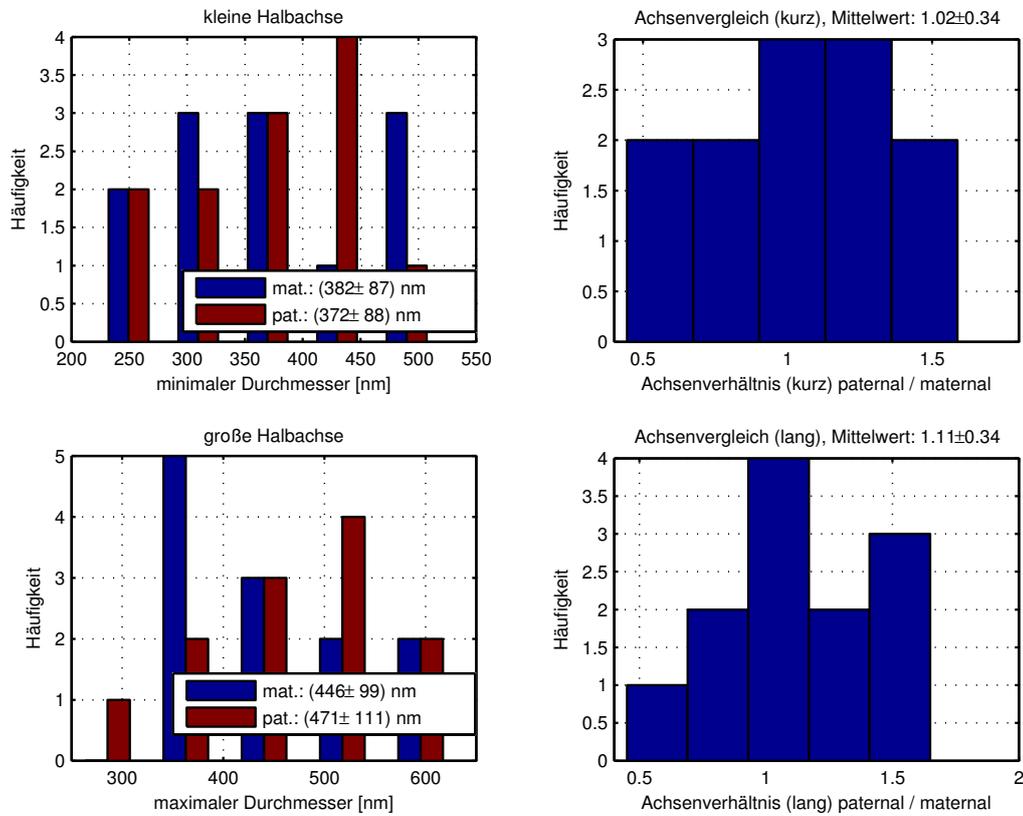
Für die Markierung der Chromosome-Territorien 15 wurden kommerziell erhältliche Painting-Sonden (Whole chromosome paint 15; WCP 15) verwendet, die mit Texas-Red markiert waren. Die Markierung des Gens *SNRPN* erfolgte mit dem BAC-Klon RP11-125E1 (RZPD<sup>9</sup>), der mittels NickTranslation mit AlexaFluor 488 markiert wurde.

Zur Bestimmung des derivativen Chromosoms (d.h. des paternal vererbte Chromosoms) wurde zusätzlich eine Alexa488-markierte Sonde, die spezifisch den Heterochromatin-Block auf Yq12 markiert, hybridisiert (pHY2.1, [CSG82]). Die Ausarbeitung der biologischen Fragestellung erfolgte durch Yanina Weiland, sie hat auch die Proben präpariert.

<sup>7</sup>Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103, USA

<sup>8</sup>F. Hoffmann-La Roche AG, 4070 Basel, Schweiz

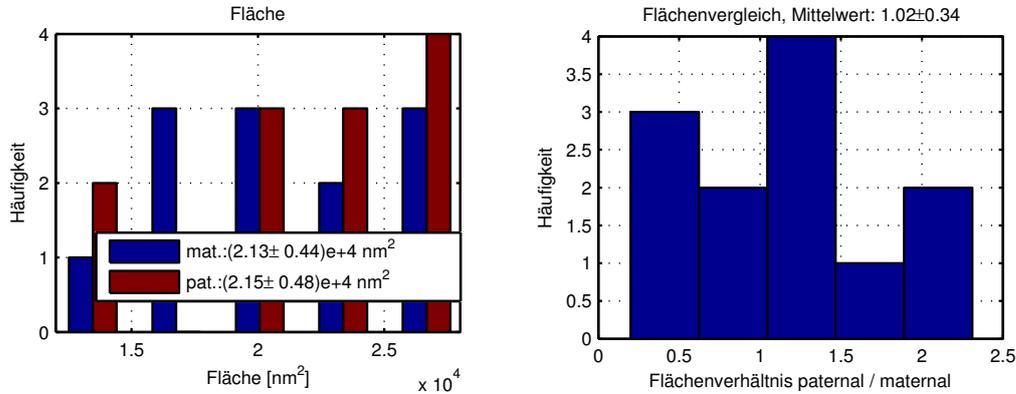
<sup>9</sup>RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, 14059 Berlin



**Abbildung 7.12:** Ausdehnung der Cluster. In der Oberen Reihe ist die Verteilung der minimalen Ausdehnung der Cluster, in der unteren Reihe die der maximalen Ausdehnung aufgetragen. Links ist jeweils die Ausdehnung der maternalen und paternalen Cluster zu sehen, rechts die Verteilung des Ausdehnungsverhältnisses von paternalem zu maternalem Cluster in jedem einzelnen Zellkern.

## 7.2.2 Mikroskopie

Zunächst wurden bei niedriger Intensität der Fluoreszenzanregung je ein Übersichtsbild bei  $\lambda_{ex} = 647nm$  (Doppel-Bandpassfilter) für das BrdU Signal, bei  $\lambda_{ex} = 568nm$  (568nm Langpassfilter) für das Chromosome-Territorium 15 Signal und  $\lambda_{ex} = 488nm$  (GFP-Bandpassfilter) für das *SNRPN* Signal aufgenommen. Eine Überlagerung dieser Aufnahmen ist für ein Beispiel in Abbildung 7.9 gezeigt. BrdU ist blau, Chromosome-Territorium 15 rot und *SNRPN* grün dargestellt. Anschließend wurde eine Lokalisationsmessung durchgeführt. Hierzu wurde die Probe mit  $\lambda_{ex} = 488nm$  bei einer Ausgangsleistung des Lasers von  $P_{ex} = 100mW$  (Leistungs-

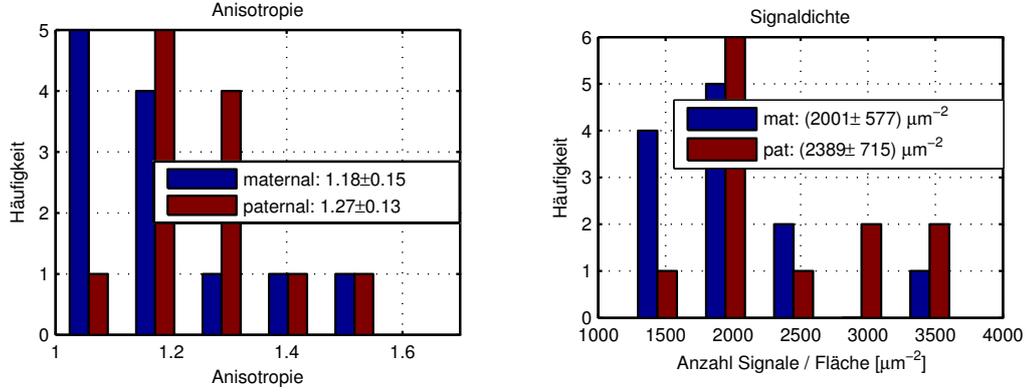


**Abbildung 7.13:** Clusterflächen. Links ist die Verteilung der Fläche aufgetragen, welche das maternale und das paternale Signalcluster im Lokalisationsbild einnehmen. Rechts ist die Verteilung des Flächenverhältnisses von paternalem zu maternalem Cluster in jedem einzelnen Zellkern dargestellt.

dichte in der Probe:  $P/A \approx 11 \text{ kW/cm}^2$ ) beleuchtet, als Filter wurde weiterhin der GFP-Bandpassfilter verwendet. Es wurde eine Zeitserie (Integrationszeit für jedes Einzelbild:  $t_A = 53 \text{ ms}$ , 2000 Einzelbilder) aufgenommen und die Positionen der Einzelmolekülsignale wie in Abschnitt 5.1 beschrieben ermittelt.

### 7.2.3 Datenauswertung

In der oberen Reihe links von Abbildung 7.10 ist der grüne Farbkanal des weiß markierte Bereich des Übersichtsbildes 7.9 gezeigt, in welchem das *SNRPN*-Signal zu erkennen ist. Rechts daneben ist das Resultat der Positionsbestimmung zu sehen, welches mittels des Skriptes 'Nachbarschaftslabel' visualisiert wurde. Ein Pixel hat eine Ausdehnung von  $16,25 \text{ nm}$ , jeder Pixel des Bildes, auf welchen eine Signalposition fällt, erhält als Helligkeitswert die Anzahl der benachbarten Signalpositionen in einem Umkreis von  $100 \text{ nm}$ . Die Signalpositionen (aus der Orte-Matrix) wurden mit dem Skript 'GM' (Abschnitt 5.3.4) auf Signalanhäufungen untersucht. Diese wurden an den gleichen Stellen wie die Signale im Weitfeldbild gefunden. In Abbildung 7.10 sind in der unteren Reihe diese Signalanhäufungen als Vergrößerung aus dem Lokalisationsbild dargestellt. (1: maternal, 2: paternal). Die durch den Auswertalgorithmus bestimmte Fläche ist in dieser Darstellung rot hinterlegt. Für zwölf Zellkerne wurde auf diese Weise die Ausdehnung im Lokalisationsbild des maternalen und des paternalen Signalclusters bestimmt sowie die Anzahl der darin enthaltenen Signale. In Abbildung 7.11 ist links die Verteilung der Signalanzahl für die materna-



**Abbildung 7.14:** Anisotropie. Dargestellt ist die Verteilung des Verhältnisses von maximaler zu minimaler Ausdehnung für die maternalen und paternalen Signalcluster.

len  $N_{mat}$  und paternalen  $N_{pat}$  Signale gezeigt, rechts daneben die Verteilung deren Quotienten  $\frac{N_{pat}}{N_{mat}}$  in jedem einzelnen Zellkern. Für die maternalen Signale innerhalb der Cluster ergab sich ein Mittelwert von  $\bar{N}_{mat} = 42$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{N_{mat}} = 14$ , für die paternalen Signale ein Mittelwert von  $\bar{N}_{pat} = 52$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{N_{pat}} = 21$ . Für das Verhältnis  $\frac{N_{pat}}{N_{mat}}$  ergab sich im Mittel ein Wert von 1,29, mit einer Standardabweichung von 0,50.

In Abbildung 7.12 ist die minimale Ausdehnung  $d_{min}$  aller maternalen und paternalen Signalcluster (im Fall einer Ellipse entspricht dies der kleinen Halbachse) in der oberen Reihe links aufgetragen. Rechts daneben ist das Verhältnis dieses Wertes  $\frac{d_{min-pat}}{d_{min-mat}}$  zwischen paternalem und maternalem Signalcluster jedes einzelnen Zellkerns gezeigt. Für die minimale Ausdehnung der maternalen Cluster ergab sich ein Mittelwert von  $\bar{d}_{min-mat} = 382nm$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{d_{min-mat}} = 87nm$ , für die paternalen Cluster ergab sich ein Mittelwert von  $\bar{d}_{min-pat} = 372nm$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{d_{min-pat}} = 88nm$ . Der Mittelwert des Verhältnisses  $\frac{d_{min-pat}}{d_{min-mat}}$  lag bei 1,02 mit einer Standardabweichung von 0,34. In der unteren Reihe von Abbildung 7.12 ist das gleiche für die maximale Ausdehnung  $d_{max}$  aller maternalen und paternalen Signalcluster gezeigt (welche im Falle einer Ellipse der großen Halbachse entspricht). Für die maximale Ausdehnung der maternalen Cluster ergab sich ein Mittelwert von  $\bar{d}_{max-mat} = 446nm$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{d_{max-mat}} = 99nm$ , für die paternalen Cluster ergab sich ein Mittelwert von  $\bar{d}_{max-pat} = 471nm$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{d_{max-pat}} = 111nm$ . Der Mittelwert des Verhältnisses  $\frac{d_{max-pat}}{d_{max-mat}}$  lag bei 1,11 mit einer

Standardabweichung von 0,34.

Die Verteilung der Flächen  $A_{mat}$  und  $A_{pat}$ , welche die maternalen und paternalen Cluster im Lokalisationsbild einnehmen ist in Abbildung 7.13 links gezeigt, rechts daneben das Flächenverhältnis  $\frac{A_{pat}}{A_{mat}}$  für jeden einzelnen Zellkern. Für die Verteilung von  $A_{mat}$  ergab sich ein Mittelwert von  $\bar{A}_{mat} = 2,13 \cdot 10^4 nm^2$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{A_{mat}} = 0,44 \cdot 10^4 nm^2$ , für die Verteilung von  $A_{pat}$  ein Mittelwert von  $\bar{A}_{pat} = 2,15 \cdot 10^4 nm^2$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{A_{pat}} = 0,48 \cdot 10^4 nm^2$ . Für das Verhältnis der Flächen  $\frac{A_{pat}}{A_{mat}}$  in jedem einzelnen Zellkern ergab sich ein Mittelwert von 1,02 mit einer Standardabweichung von 0,34.

In Abbildung 7.14 ist links die Verteilung der Anisotropie, also des Verhältnisses von  $\frac{d_{max}}{d_{min}}$  für die maternalen und paternalen Signalcluster aufgetragen. Für dieses Verhältnis ergibt sich für die maternalen Signalcluster im Mittel ein Wert von 1,18 mit einer Standardabweichung von 0,15, für die paternalen Signalcluster im Mittel ein Wert von 1,27 mit einer Standardabweichung von 0,13. Rechts ist die Signalfächendichte gezeigt, diese beträgt für die maternalen Signalcluster im Mittel  $2001 \text{Signale}/\mu m^2$  mit einer Standardabweichung von  $577 \text{Signale}/\mu m^2$ , für die paternalen Signalcluster  $2389 \text{Signale}/\mu m^2$  mit einer Standardabweichung von  $715 \text{Signale}/\mu m^2$ .

Tendenziell kann man also erkennen, dass in den paternalen Signalclustern eine höhere Anzahl an Signalen gefunden wird. Die ermittelte Anisotropie der paternalen Cluster ist etwas größer als die der maternalen, die Fläche ist ebenfalls geringfügig größer. Auch die gemessene Signaldichte ist innerhalb der paternalen Signalcluster größer als in den maternalen. Diese Tendenzen sind jedoch nicht statistisch signifikant. Um eine definitive Aussage treffen zu können, ob inaktives Chromatin im Kern kompakter vorliegt als transkriptionell aktives muss die Anzahl der Stichproben erhöht werden.

### Die Weibull-Verteilung

Um bestimmte Eigenschaften einer Verteilung von Messwerten, wie beispielsweise deren Mittelwert  $\mu$  und ihre Standardabweichung  $\sigma$  zu ermitteln, ist es zweckmässig, diese durch bekannte Verteilungen anzunähern. Falls die Messgrößen nicht symmetrisch um ihren Mittelwert verteilt sind (wie dies etwa bei der Gauß-Verteilung der Fall ist) oder Mittelwert und Standardabweichung nicht in direktem Bezug zueinander stehen (wie etwa bei einer Poisson-Verteilung), so muss eine passende Verteilung gefunden werden. Im Laufe dieser Arbeit stellte sich die Weibull-Verteilung

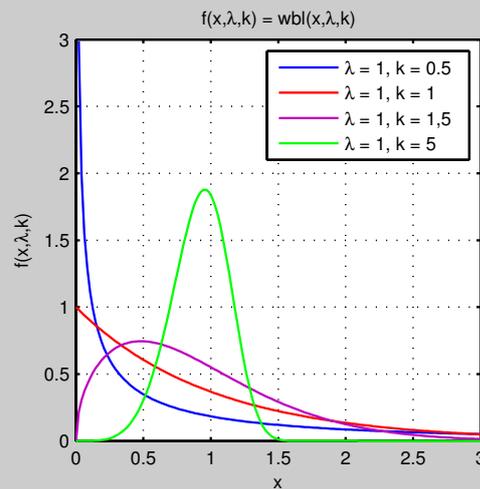
$$f(x, \lambda, k) = \begin{cases} \frac{k}{\lambda^k} \cdot x^{k-1} \cdot e^{-(x/\lambda)^k} & \text{für } x \geq 0 \\ 0 & \text{für } x < 0 \end{cases} \quad (7.3)$$

als geeignet heraus, verschiedenste Verteilungen gut wiederzugeben. Hierbei ist  $\lambda$  der Skalen- und  $k$  der Formparameter. Aus diesen kann man den Mittelwert  $\mu$  und die Standardabweichung  $\sigma$  durch die Beziehung

$$\mu = \lambda \cdot \Gamma\left(1 + \frac{1}{k}\right) \quad (7.4)$$

$$\sigma = \left[ \lambda^2 \cdot \Gamma\left(1 + \frac{2}{k}\right) - \mu^2 \right]^{1/2} \quad (7.5)$$

erhalten. In dem unteren Diagramm ist diese Verteilung für verschiedene Formparameter  $k$  bei gleichem Skalenparameter  $\lambda$  dargestellt. Da diese Verteilung nicht symmetrisch ist, fallen Maximum und Mittelwert nicht zwangsläufig zusammen.



## 7.3 Untersuchung von Proteinverteilungen im menschlichen Kinetochor

Das Kinetochor ist ein Proteinkomplex, welcher an die DNA im Centromer angelagert ist. Es setzt sich aus verschiedenen Centromerproteinen zusammen und stellt die Verbindung zwischen den Chromosomen und den Mikrotubuli während Mitose und Meiose her. Das Kinetochor besteht aus einem inneren und einem äußeren Kinetochor, wobei das innere Kinetochor direkt an die Centromer-DNA angelagert und während des gesamten Zellzyklus präsent ist. Zu diesem zählen unter anderem die Centromerproteine CENP-A und CENP-C [RVD<sup>+</sup>10], welche in dieser Arbeit genauer untersucht wurden. Das äußere Kinetochor bindet an die Mikrotubuli. Es ist ein sehr dynamischer Komplex, welcher sich aus vielen unterschiedlichen Proteine zusammensetzt und der erst während der Zellteilung assembliert und somit funktional ist.

Die Flächenausdehnung (Ausdehnung in lateraler Richtung) der Kinetochore variiert von Chromosom zu Chromosom [CFGB89].

Mit Methoden der Lokalisationsmikroskopie sollte zum einen die Struktur und die Verteilung der jeweiligen Centromerproteine innerhalb des Kinetochors untersucht werden. Zum anderen sollte die relative Position und die Distanzverhältnisse einzelner unterschiedlicher Centromerproteine zueinander untersucht werden.

Sämtliche Präparate wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Diekmann am Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI) in Jena angefertigt.

### 7.3.1 Centromerprotein A (CENP-A)

Centromerprotein A (CENP-A) ist ein 17 kDa großes, Centromer-spezifisches modifiziertes Protein, welches in den Nukleosomen im inneren Kinetochor das Histonprotein H3 ersetzt [POT<sup>+</sup>91, YAM<sup>+</sup>00, OBH<sup>+</sup>08]. Etwa zwei Drittel des Proteins (C-terminales Ende) sind homolog zu H3, das N-terminale Ende ist unterschiedlich zu diesem [SHM94]. Es wird während der G1-Phase am Kinetochor gebunden und in der späten S-Phase abgebaut [HWPH<sup>+</sup>08].

In dieser Arbeit wurde die Verteilung des Centromerproteins CENP-A im Kinetochor menschlicher HEp2-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurde CENP-A als Fusionsprotein mit verschiedenen Fluoreszenz-Proteinen markiert. Im Nachfolgenden werden die einzelnen Ergebnisse vorgestellt und eine Zusammenfassung für jedes Fusionsprotein sowie eine Übersicht über alle Ergebnisse gegeben.

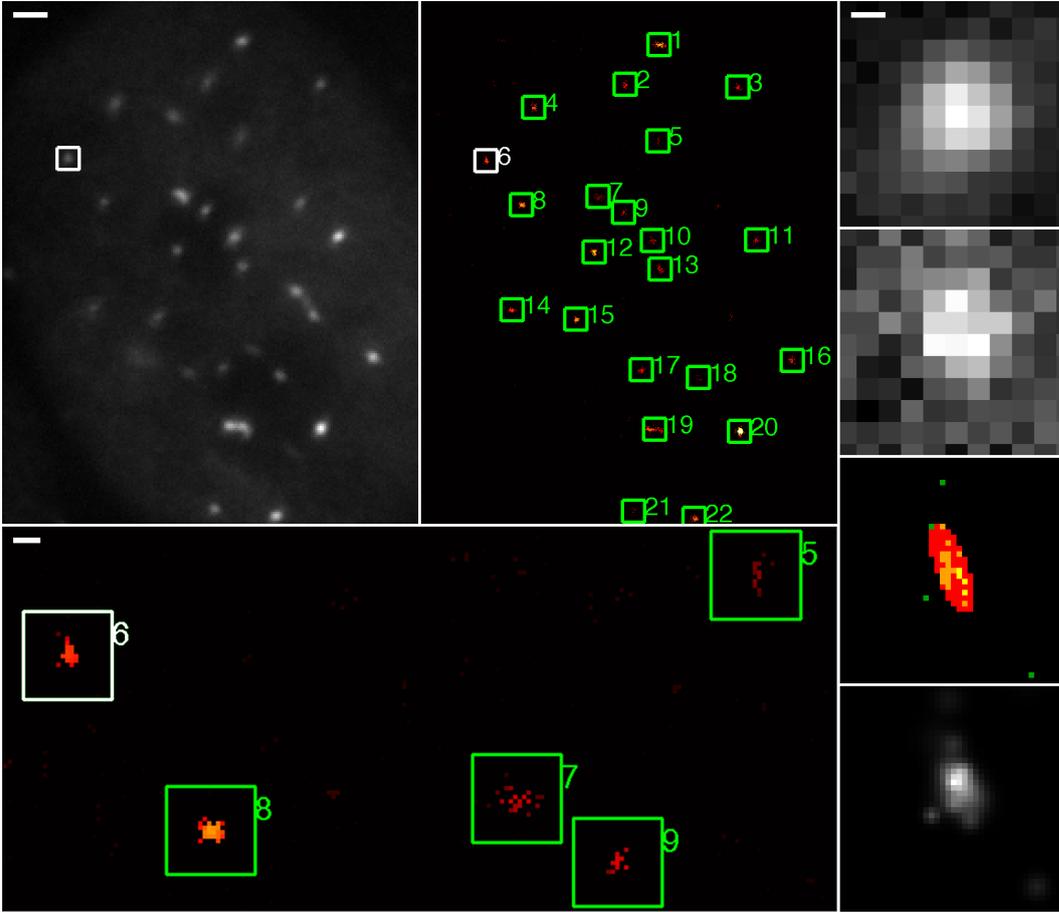
**eGFP-CENP-A in HEp2-Zellen**

**Probe 1** In dieser Probe wurde das Fusionsprotein eGFP-CENP-A exprimiert. Als Einbettmedium wurde ProlongGold (Invitrogen<sup>10</sup>) verwendet. Alle Aufnahmen erfolgten bei einer Anregung mit der Wellenlänge  $\lambda_{ex} = 488nm$ , mit einer Ausgangsleistung von  $P_{\lambda_{ex}} = 100mW$  (Leistungsdichte in der Probe:  $P/A \approx 11kW/cm^2$ ). Pro Zelle wurde ein Datenstapel von 1000 Aufnahmen mit einer Integrationszeit von  $t_A = 50ms$  erstellt. Insgesamt wurden 19 Zellkerne aufgenommen, 12 von diesen konnten zur Auswertung verwendet werden. Bei 7 Zellkernen konnte die Positionsbestimmung nicht erfolgreich durchgeführt werden, in den Lokalisationsbildern waren entweder keine Signale zu erkennen oder die in den Weitfeldbildern erkennbaren Signalanhäufungen waren nicht auszumachen. Die Auswertung erfolgte mit dem in Abschnitt 5.3.4 beschriebenen Algorithmus 'GM'. 109 CENP-A-Cluster wurden identifiziert und ausgewertet. Aufgrund der räumlichen Ausdehnung der Zellkerne liegen nicht alle Kinetochore in der Fokusebene, es wird also jeweils nur eine Teilmenge der gesamten Signalcluster aufgenommen. Zur Kontrolle wurden die ermittelten Cluster automatisch markiert und nummeriert und mit dem entsprechenden Weitfeldbild verglichen, welches vor jeder Lokalisationsmessung aufgenommen wurde. Dies ist beispielhaft für einen Zellkern in Abbildung 7.15 gezeigt. Von allen Clustern wurde die minimale und maximale Ausdehnung ( $d_{min}$  und  $d_{max}$ ) bestimmt sowie die hieraus resultierende Anisotropie  $d_{min}/d_{max}$ . Des Weiteren wurde sowohl die Fläche  $A$  ermittelt, welche von dem Cluster eingenommen wird, als auch die Anzahl  $n$  der innerhalb eines Clusters liegenden Signale. Hieraus wurde die Signaldichte  $n/A$  bestimmt. Diese Werte wurden jeweils in ein Histogramm eingetragen (wie in Abbildung 7.17 für alle fluoreszenzmarkierten Proben mit CENP-A). An die resultierenden Verteilungen konnten jeweils sehr gut mit eine Weibull-Verteilung angepasst werden. Aus Größen- und Strukturparametern dieser Verteilung und deren Fehler konnten die jeweiligen Mittelwerte  $\mu$  und Standardabweichungen  $\sigma$  (diese sind auch über jedem Histogramm angegeben) und deren Fehler durch Gaußsche Fehlerfortpflanzung berechnet werden. Diese wurden in Tabelle 7.1 in der ersten Zeile ('Probe 1') zusammengefasst. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit betrug für alle Messungen  $\bar{\sigma}_{lok} = 31nm$  mit einer Breite von  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 12nm$ .

**Probe 2** Probe 2 wurde auf die gleiche Art wie Probe 1 präpariert, auch die Aufnahmebedingungen waren die gleichen, außer dass für diese Probe jeweils Datenstapel von 500 Bildern aufgenommen wurden. Es wurden insgesamt 5 Aufnahmen erstellt. In 4 von diesen konnten 33 Cluster bestimmt werden. Die weitere Analyse der Daten erfolgte analog zu Probe 1. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.1, Zeile 'eGFP-CENP-A Probe 2' zusammengefasst. Die Lokalisationsgenauigkeit betrug für alle Messungen  $\bar{\sigma}_{lok} = (43 \pm 14)nm$ . Die Werte stimmen sehr gut mit den Ergebnissen von Probe 1

---

<sup>10</sup>Invitrogen Cooperation, Carlsbad, California 92008, USA



**Abbildung 7.15:** eGFP-CENP-A in HEp2-Zellen. Beispiel für die Vermessung der Cluster in Probe 1. Das obere linke Bild ist das Weitfeldbild vor der Lokalisationsaufnahme, rechts daneben ist das Lokalisationsbild in der Nachbarschaftslabel-Darstellung mit einer Pixelgröße von 32.5 nm zu sehen. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt  $1\mu m$ . Die nummerierten Markierungen zeigen die Positionen der in den Lokalisationsdaten ermittelten Cluster. Der Vergleich mit dem Weitfeldbild ergibt eine sehr gute Übereinstimmung. Darunter ist eine Vergrößerung einiger der gefundenen Cluster gezeigt (Maßstab 200 nm). Rechts ist das weiß markierte Cluster Nr. 6 vergrößert dargestellt (Maßstab 100 nm). von oben nach unten: Eine Vergrößerung des Weitfeldbildes. Darunter ist ein simuliertes Weitfeldbild anhand der Lokalisationsdaten gezeigt. Darunter ist das ermittelte Cluster in rot und die einzelnen Signalpositionen in grün dargestellt. Ganz unten ist eine Darstellung der Lokalisationsdaten zu sehen, bei der an jeder Position eine normierte 2D-Gaußfunktion eingetragen ist, deren Standardabweichung der individuellen Positionsgenauigkeit entspricht.

überein. Auch hier ist eine Tendenz zur Anisotropie erkennbar. Pro Cluster wurden im Mittel  $\bar{n}_{GFP-CENP-A} = 13 \pm 7$  Signale gefunden, das sind etwa halb so viele wie in Probe 1.

**Probe 3** Probe 3 unterscheidet sich zu den beiden vorherigen darin, dass für diese als Einbettmedium Mowiol (Merck<sup>11</sup>) verwendet wurde, ansonsten gab es keine Unterschiede. Auch die Aufnahmebedingungen waren die gleichen wie bei den Präparaten zuvor. Insgesamt wurden 17 HEp2-Zellkerne analysiert, in welchen insgesamt 223 Cluster vermessen wurden. Die Analyse erfolgte wie für Probe 1 beschrieben. Die Resultate sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst. Die Ausdehnungen der Cluster wurden in dieser Probe geringfügig kleiner als in den vorherigen bestimmt. Auch hier gibt es eine Tendenz zu einer leichten Anisotropie. Pro Cluster wurden im Mittel  $\bar{n}_{GFP-CENP-A} = 24 \pm 18$  Signale gefunden. Die Lokalisationsgenauigkeit betrug für alle Messungen  $\bar{\sigma}_{lok} = 25nm$  mit einer Breite von  $\sigma_{\sigma_{lok}} 16nm$ .

**Zusammenfassung eGFP-CENP-A** Die Ergebnisse aller Auswertungen der Lokalisationsmessungen des eGFP-CENP-A sind in Tabelle 7.1 (Zeile 'eGFP-CENP-A gesamt') eingetragen. Die Parameter der jeweiligen Verteilungen konnten durch Anpassen einer Weibull-Verteilung bestimmt werden. Aus diesen und deren Fehlern wurden die entsprechenden Mittelwerte  $\mu$  und Standardabweichungen  $\sigma$  und deren Fehler bestimmt.

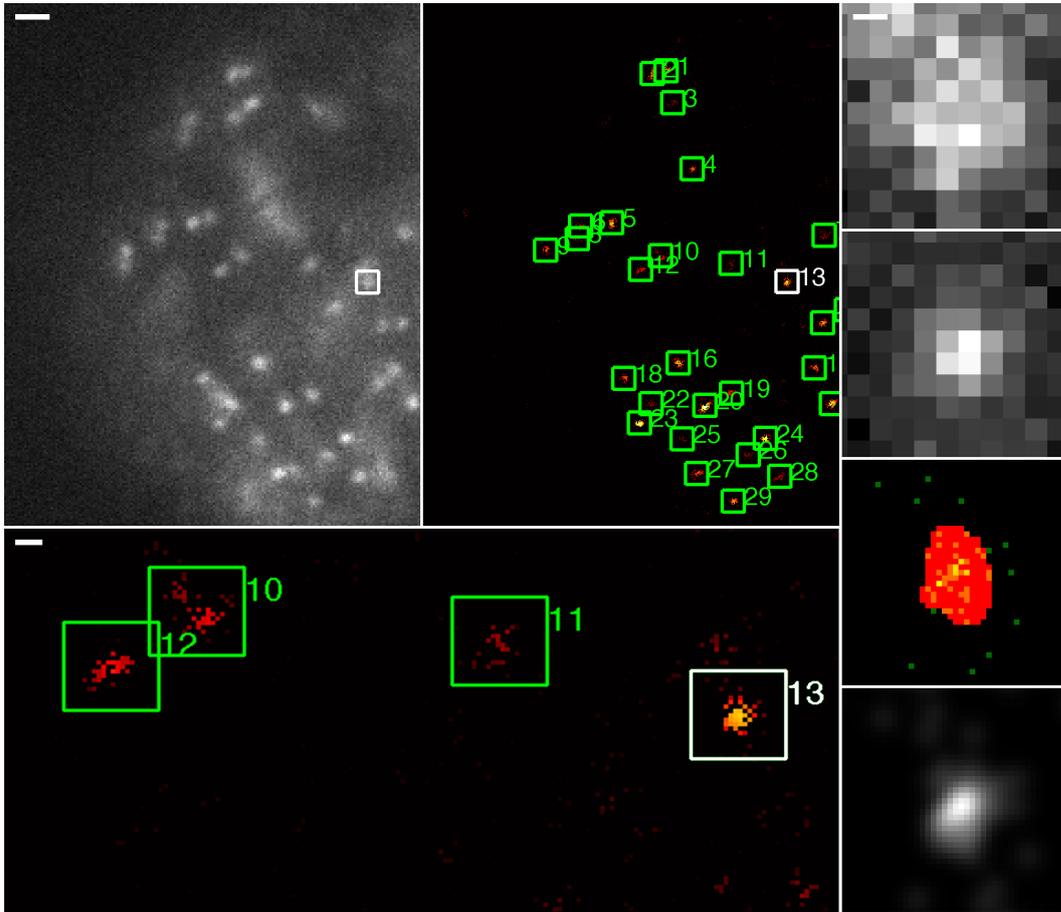
### mRFP-CENP-A in HEp2-Zellen

**Probe 1** In dieser Probe wurde das Fusionsprotein mRFP-CENP-A exprimiert. Als Einbettmedium wurde ProlongGold verwendet. Alle Aufnahmen erfolgten bei einer Anregung mit der Wellenlänge  $\lambda_{ex} = 568nm$ , mit einer Ausgangsleistung von  $P_{\lambda_{ex}} = 100mW$  (Leistungsdichte in der Probe:  $P/A \approx 11kW/cm^2$ ). Pro Zelle wurde ein Datenstapel von 2000 Aufnahmen mit einer Integrationszeit von  $t_A = 60ms$  erstellt. Es wurden 4 Zellkerne aufgenommen. In diesen wurden mit dem in Abschnitt 5.3.4 beschriebenen Algorithmus 133 CENP-A-Cluster identifiziert und ausgewertet. Die Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 7.3.1, Probe 1, beschrieben. In Abbildung 7.16 ist beispielhaft der vierte aufgenommene Zellkern und die darin gefundenen Cluster gezeigt. Die Resultate der Auswertung sind in Tabelle 7.1, Zeile fünf zusammengestellt. Die Lokalisationsgenauigkeit betrug für alle Messungen  $\bar{\sigma}_{lok} = 37nm$  mit einer Breite von  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 8nm$ .

**Probe 2** Probe 2 wurde auf die gleiche Art wie Probe 1 präpariert, auch die Aufnahmebedingungen waren die gleichen, außer dass für diese Probe jeweils Datenstapel

---

<sup>11</sup>Merck KGaA, 64293 Darmstadt



**Abbildung 7.16:** mRFP-CENP-A in HEp2-Zellen. Beispiel für die Vermessung der Clustereigenschaften in Probe 1. Das obere linke Bild ist das Weitfeldbild vor der Lokalisationsaufnahme, rechts daneben ist das Lokalisationsbild in der Nachbarschaftslabel-Darstellung mit einer Pixelgröße von 32.5 nm zu sehen. Der Maßstab beträgt  $1\mu\text{m}$ . Die nummerierten Markierungen zeigen die Positionen der in den Lokalisationsdaten ermittelten Cluster. Der Vergleich mit dem Weitfeldbild ergibt eine sehr gute Übereinstimmung. Darunter ist eine Vergrößerung einiger der gefundenen Cluster gezeigt (Maßstab 200 nm). Rechts ist das weiß markierte Cluster Nr. 13 vergrößert dargestellt (Maßstab 100 nm). Oben: Eine Vergrößerung des Weitfeldbildes. Darunter ist ein simuliertes Weitfeldbild anhand der Lokalisationsdaten gezeigt. Darunter ist das ermittelte Cluster in rot und die einzelnen Signalpositionen in grün dargestellt. Ganz unten ist eine Darstellung der Lokalisationsdaten zu sehen, bei der an jeder Position eine normierte 2D-Gaußfunktion eingetragen ist, deren Standardabweichung der individuellen Positionsgenauigkeit entspricht.

von 1500 Bildern aufgenommen wurden. Es wurden insgesamt 10 Zellkerne aufgenommen, in denen 95 Cluster ausgewertet werden konnten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst. Die Lokalisationsgenauigkeit betrug für alle Messungen im Mittel  $\bar{\sigma}_{lok} = 39nm$ , mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 9nm$ . Für die Größenabschätzung ergaben sich Werte von  $\bar{d}_{min} = 255nm$ ,  $\sigma_{d_{min}} = 102nm$  und  $\bar{d}_{max} = 385nm$ ,  $\sigma_{d_{max}} = 136nm$ . Diese Werte sind ein wenig größer als bei den vorherigen Proben. Auch ist hier die Anisotropie weniger stark ausgeprägt. Pro Cluster wurden im Mittel  $\bar{n}_{mRFP-CENP-A} = 31$  Signale gefunden, mit einer Standardabweichung von  $\sigma_n = 15$ .

**Probe 3** Der Unterschied von Probe 3 zu den beiden vorherigen ist, dass für diese als Einbettmedium Mowiol verwendet wurde. Für jeden Zellkern wurde ein Datenstapel mit 2000 Einzelaufnahmen bei einer Integrationszeit von 50 ms aufgenommen. Alle anderen Bedingungen waren identisch zu den vorherigen Aufnahmen. Insgesamt wurden 12 HEp2-Zellkerne aufgenommen, von denen 10 ausgewertet werden konnten. In diesen wurden zusammengenommen 137 Cluster vermessen. Die Resultate sind in Tabelle 7.1 zusammengefasst. Die Ausdehnungen bestimmten sich zu  $\bar{d}_{min} = 171nm$ ,  $\sigma_{d_{min}} = 104nm$  und  $\bar{d}_{max} = 261nm$ ,  $\sigma_{d_{max}} = 130nm$ , was gut mit den vorherigen Ergebnissen übereinstimmt. Auch hier gibt es eine Tendenz zu einer leichten Anisotropie. Pro Cluster wurden  $\bar{n}_{mRFP-CENP-A} = 32$  Signale gefunden, mit einer Standardabweichung von  $\sigma_n = 18$ . Für die mittlere Lokalisationsgenauigkeit ergab sich ein Wert von  $\bar{\sigma}_{lok} = 36nm$  mit einer Breite von  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 10nm$ .

**Zusammenfassung mRFP-CENP-A** Fasst man die Ergebnisse aller Lokalisationsdaten von mRFP-CENP-A in menschlichen HEp2-Zellen zusammen, kommt man zu den in Tabelle 7.1 eingetragenen Verteilungen. An diese wurde jeweils eine Weibull-Verteilung angepasst, aus deren Parametern und deren Ungenauigkeiten die Mittelwerte und Standardabweichungen und deren Fehler für die minimale und maximale Ausdehnung ( $d_{min}$  und  $d_{max}$ ) sowie die hieraus resultierende Anisotropie  $d_{min}/d_{max}$ , die von dem Cluster eingenommen Fläche  $A$ , die Anzahl  $n$  der innerhalb eines Clusters liegenden Signale und die Signaldichte  $n/A$  berechnet wurden.

### Zusammenfassung CENP-A

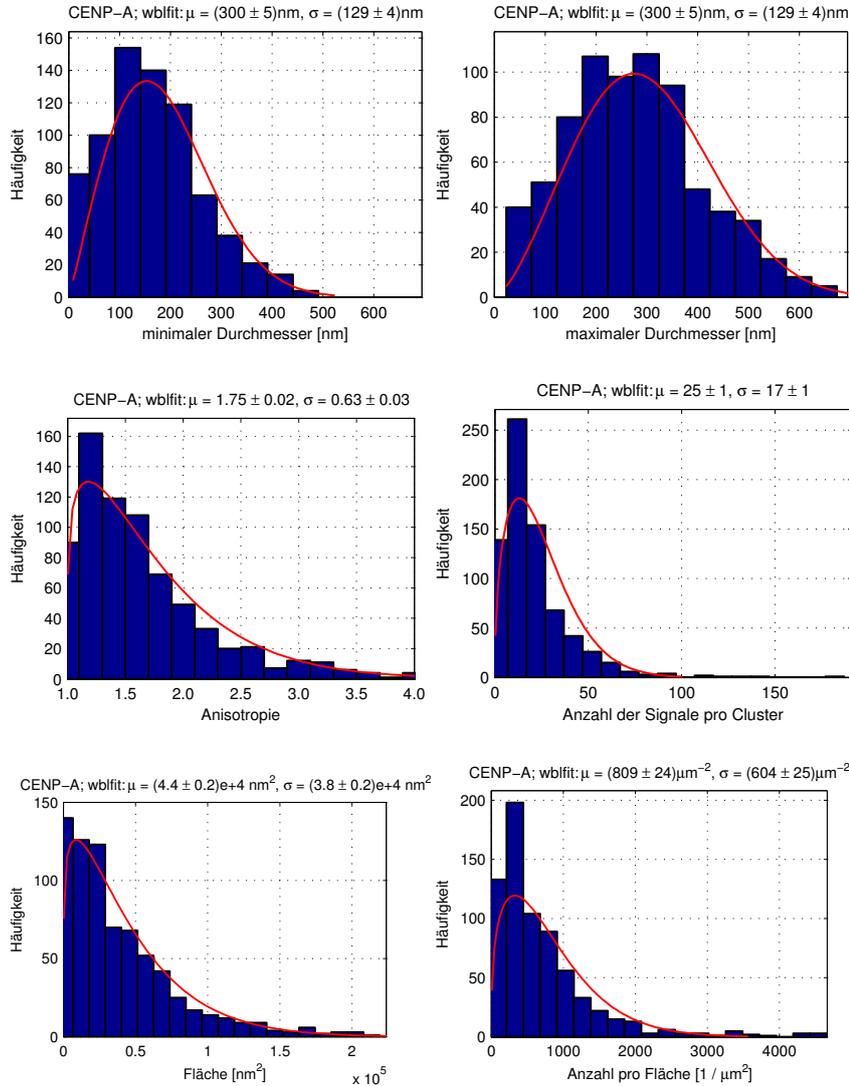
Insgesamt wurden 729 CENP-A-Cluster in 57 HEp2-Zellen ausgewertet. Fasst man alle diese Auswertungen zusammen, ergeben sich für die Verteilung des Centromerproteins in HEp2-Zellen die in Abbildung 7.17 gezeigten Resultate, welche in Tabelle 7.1 zusammengestellt sind. Für die Ausdehnung der CENP-A-Cluster ergibt sich eine breite Verteilung, wobei die mittlere Ausdehnung im Fall der eGFP-Markierung etwas kleiner als im Fall der mRFP-Markierung abgeschätzt wird. Die Ausdehnung wird in minimalem und maximalem Durchmesser angegeben, wobei etwa im Fall

einer elliptischen Verteilung der minimale Durchmesser der kleinen und der maximale Durchmesser der großen Halbachse entspricht. Das Ergebnis für den minimalen Durchmesser liegt im gleichen Bereich wie bei Untersuchungen des selben Proteins mittels SMI-Mikroskopie [Bad07], bei welchen eine mittlere Ausdehnung von etwa  $180nm$  ermittelt wurde (hier  $187nm$ ). Die maximale Ausdehnung ist im Mittel größer ( $300nm$ ). Hieraus ergibt sich eine Anisotropie der Ausdehnung der CENP-A-Cluster von 1,7. Dies kann aus einer nicht sphärischen, abgeflachten Form der Signalcluster resultieren, was bei der Projektion entlang der optischen Achse durch die geringe axiale Auflösung zu einer elliptischen Verteilung führt. Die hohe Varianz in der Ausdehnung war zu erwarten, da die Größe der Kinetochore nicht konstant ist. Im Mittel wurden 25 CENP-A Signale innerhalb der Cluster gefunden (eGFP-Markierung: 24, mRFP-Markierung: 26). Dies ist eine untere Abschätzung des gesamten Anteils an CENP-A innerhalb der Cluster, da zum einen auch endogene Proteine eingebaut werden, zum anderen nur ein gewisser Prozentsatz der tatsächlich vorhandenen Fluorophore auch detektiert wird, bevor diese irreversibel bleichen. Für eine Auflösung einer eventuell vorhandenen internen Struktur sind Signalanzahl und -dichte zu gering.

**Tabelle 7.1:** Zusammenfassung aller Messungen mit Centromerprotein CENP-A. Eingetragen sind die Mittelwerte der Messgrößen und deren Fehler sowie die Standardabweichungen und deren Fehler, wie sie aus den wie in Abbildung 7.17 beispielhaft gezeigten Verteilungen bestimmt wurden.

Probe	Anzahl der Zellkerne #ZK	Anzahl der Cluster #CL	Mittelwert der min. Ausdehnung $\bar{d}_{min}$ [nm]	Std. der min. Ausdehnung $\sigma_{d_{min}}$ [nm]	Mittelwert der max. Ausdehnung $\bar{d}_{max}$ [nm]	Std. der max. Ausdehnung $\sigma_{d_{max}}$ [nm]	mittlere Anisotropie d. Ausdehnung $\left(\frac{d_{min}}{d_{max}}\right)$	Std. der Anisotropie der Ausdehnung $\sigma_{\frac{d_{min}}{d_{max}}}$	Mittelwert der Anzahl Signale pro Cluster $\bar{n}$	Std. der Anzahl Signale pro Cluster $\sigma_n$	mittlere Clusterfläche $\bar{A}$ [10 <sup>4</sup> nm <sup>2</sup> ]	Std. der Clusterfläche $\sigma_A$ [10 <sup>4</sup> nm <sup>2</sup> ]	mittlere Signaldichte $\left(\frac{n}{A}\right)$ [1/μm <sup>2</sup> ]	Std. der Signaldichte $\sigma_{\frac{n}{A}}$ [1/μm <sup>2</sup> ]	mittlere Lokalisationsgenauigkeit $\bar{\sigma}_{lok}$ [nm]	Std. der Lok.genauigkeit $\sigma_{\sigma_{lok}}$ [nm]
1	eGFP-CENP-A	12	195.0±10.0	102.8±8.7	303.9±12.5	131.6±10.0	1.670±0.056	0.537±0.064	28.1±2.1	20.4±2.2	4.85±0.46	4.35±0.57	818±48	484±44	31	12
2	eGFP-CENP-A	4	167.4±16.5	92.4±15.0	295.7±23.0	133.0±19.6	1.991±0.136	0.728±0.142	13.6±1.2	6.9±1.0	3.91±0.69	3.57±0.89	742±120	628±142	43	14
3	eGFP-CENP-A	17	161.0±4.2	63.8±3.3	273.5±7.2	109.5±5.6	1.779±0.052	0.714±0.069	23.7±1.3	18.4±1.4	3.06±0.15	2.11±0.15	756±32	449±29	25	16
4	eGFP-CENP-A	33	172.3±4.3	81.5±3.5	285.5±6.2	118.9±4.8	1.768±0.037	0.657±0.045	24.1±1.0	18.5±1.1	3.70±0.17	3.01±0.19	774±27	480±25	-	-
5	mRFP-CENP-A	4	192.2±7.7	89.2±6.6	320.7±10.4	122.5±8.0	1.886±0.063	0.680±0.070	17.9±0.8	9.1±0.7	4.61±0.31	3.34±0.34	576±34	372±32	37	8
6	mRFP-CENP-A	10	254.8±10.3	102.4±8.4	384.5±13.5	136.0±10.6	1.551±0.041	0.375±0.042	30.5±1.6	15.4±1.3	7.71±0.56	5.25±0.60	561±42	381±40	39	9
7	mRFP-CENP-A	10	170.5±9.2	104.2±8.9	260.6±11.1	130.2±9.9	1.698±0.057	0.618±0.072	31.6±1.6	17.7±1.4	3.99±0.40	4.14±0.57	1348±105	1067±119	36	10
8	mRFP-CENP-A	24	200.3±5.5	105.0±5.0	314.5±7.1	137.6±5.9	1.727±0.033	0.594±0.039	26.4±0.8	15.5±0.8	5.19±0.26	4.56±0.33	839±41	705±47	-	-
9	CENP-A gesamt	57	186.5±3.5	94.4±3.0	300.2±4.7	129.2±3.8	1.747±0.025	0.626±0.030	25.3±0.7	17.4±0.7	4.45±0.15	3.83±0.19	809±24	604±25	-	-

### 7.3 Untersuchung von Proteinverteilungen im menschlichen Kinetochor



**Abbildung 7.17:** Auswertung aller Lokalisationsdaten von 57 HEp2-Zellen mit fluoreszenzmarkiertem CENP-A. Insgesamt konnten 729 Cluster von CENP-A Proteinen ermittelt werden. Die Histogramme zeigen die minimalen und maximalen Durchmesser  $d_{min}$  und  $d_{max}$  (obere Reihe), die Anisotropie  $d_{min}/d_{max}$  und die Anzahl  $n$  der Signale pro Cluster (mittlere Reihe) sowie die Clusterfläche  $A$  und die Signaldichte  $A/n$  (untere Reihe). Über den Histogrammen sind die Ergebnisse aus der Anpassung einer Wibull-Verteilung (wblfit) angegeben.

### 7.3.2 Centromerprotein B (CENP-B)

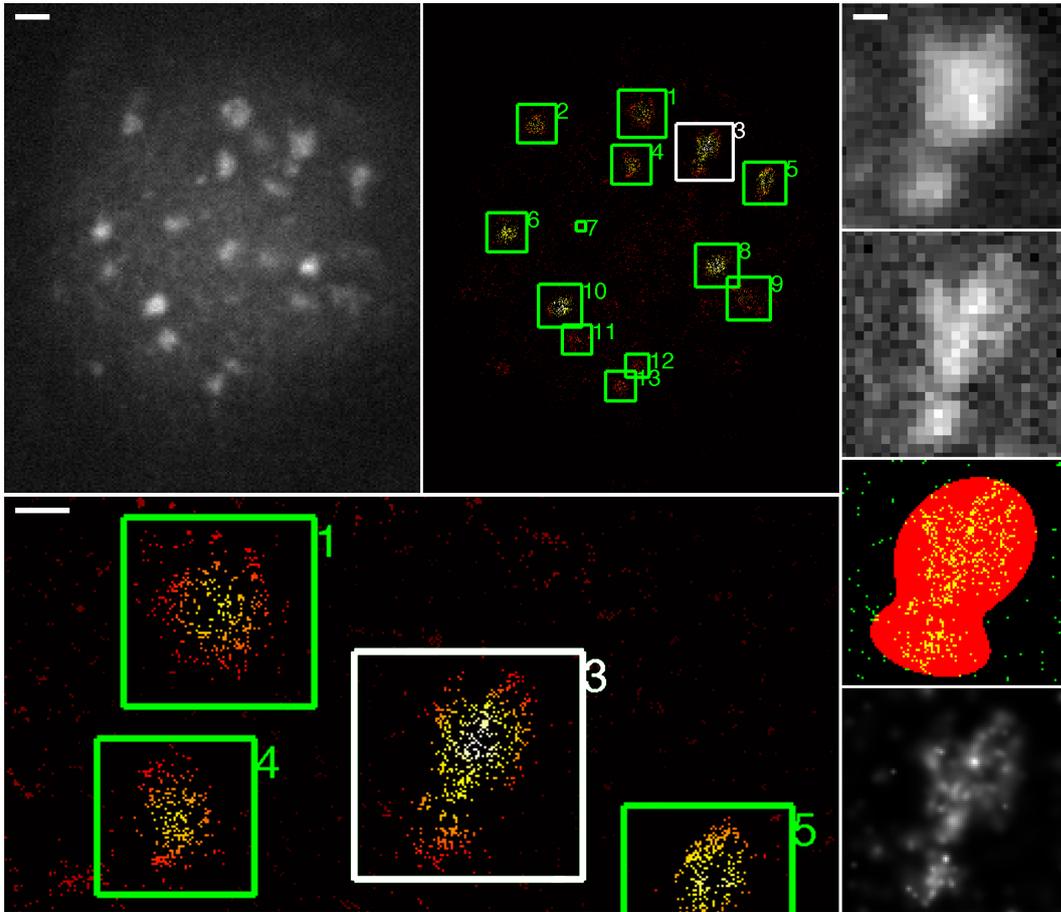


**Abbildung 7.18:** Kristallstruktur des Centromerproteins CENP-B nach [TNK<sup>+</sup>01], dargestellt mit Jmol.

Centromerprotein CENP-B ist ein  $80kD$  großes Protein des äußeren Kinetochors, welches an eine 17bp-Sequenz der *alpha*-Satelliten-DNA, die CENP-B-Box, bindet [CBE90]. Diese kommt in den meisten Wiederholungen der *alpha*-Satelliten-DNA vor. CENP-B ist verantwortlich für die Positionierung der Nukleosomen um die CENP-B-Box [YAO<sup>+</sup>98]

#### eGFP-CENP-B in HEp2-Zellen

**Probe 1** In dieser Probe wurde das Fusionsprotein eGFP-CENP-B untersucht. Als Einbettmedium wurde ProlongGold verwendet. Es wurde jeweils ein Datenstapel mit 1500 Bildern erstellt, bei einer Integrationszeit von  $t_A = 50ms$ . Die Beleuchtung der Probe erfolgte bei  $\lambda_{ex} = 488nm$ , mit einer Ausgangsleistung des  $Ar^+$ -Ionen-Laser von  $P_{\lambda_{ex}} = 20mW$  (Leistungsdichte in der Probe:  $P/A \approx 2kW/cm^2$ ). Es wurden 10 Zellkerne aufgenommen, von welchen 9 ausgewertet werden konnten. In diesen wurden 94 CENP-B-Cluster ermittelt. Ein Beispiel ist in Abbildung 7.19 gezeigt. Die Übersicht beinhaltet ein Weitfeldbild und das entsprechende Lokalisationsbild in der Nachbarschaftslabel-Darstellung, welche auch zur Segmentierung der Daten (wie in Abschnitt 7.15 beschrieben) verwendet wurde. Außerdem ist eine Vergrößerung dieses Lokalisationsbildes mit einer Markierung der hier gefundenen Cluster zu sehen. Eines dieser Cluster ist vergrößert auf der rechten Seite abgebildet, zum einen das vor



**Abbildung 7.19:** eGFP-CENP-B in HEP2-Zellen. Beispiel für die Vermessung der Clustereigenschaften in Probe 1. Das obere linke Bild ist das Weitfeldbild vor der Lokisationsaufnahme, rechts daneben ist das Lokalisationsbild in der Nachbarschaftslabel-Darstellung mit einer Pixelgröße von 16.25 nm zu sehen. Der Maßstab beträgt  $1\mu\text{m}$ . Die nummerierten Markierungen zeigen die Positionen der in den Lokalisationsdaten ermittelten Cluster. Der Vergleich mit dem Weitfeldbild ergibt eine sehr gute Übereinstimmung. Darunter ist eine Vergrößerung einiger der gefundenen Cluster gezeigt (Maßstab 400 nm). Rechts ist das weiß markierte Cluster Nr. 3 vergrößert dargestellt (Maßstab 250 nm). Oben: Eine Vergrößerung des Weitfeldbildes. Darunter ist ein simuliertes Weitfeldbild anhand der Lokalisationsdaten gezeigt. Darunter ist das ermittelte Cluster in rot und die einzelnen Signalpositionen in grün dargestellt. Ganz unten ist eine Darstellung der Lokalisationsdaten zu sehen, bei der an jeder Position eine normierte 2D-Gaußfunktion eingetragen ist, deren Standardabweichung der individuellen Positionsgenauigkeit entspricht.

der Lokalisationsmessung aufgenommene Weitfeldbild, ein anhand der Lokalisationsdaten simuliertes Weitfeldbild sowie ein Positionsbild mit der durch den Algorithmus ermittelten Clusterfläche und ein Lokalisationsbild mit einer Repräsentation der individuellen Lokalisationsgenauigkeit durch eine entsprechende 2D-Gaußfunktion. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit war für alle Aufnahmen  $\sigma_{lok} = 41.5nm$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 14.3nm$ . Die Ergebnisse für minimalen und maximalen Durchmesser der Cluster ( $d_{min}$  und  $d_{max}$ ), die hieraus resultierende Anisotropie  $d_{min}/d_{max}$ , die Anzahl der Signale pro Cluster  $n$ , die Clusterfläche  $A$  und die Signaldichte  $n/A$  sind in Tabelle 7.2, Zeile 'eGFP-CENP-B Probe 1' zusammengefasst. Eingetragen sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen mit Fehlern, wie sie sich aus den an die Daten angepassten Weibull-Verteilungen berechnen.

**Probe 2** Auch diese Probe wurde mit Laserlicht der Wellenlänge  $\lambda_{ex} = 488nm$  angeregt, als Ausgangsleistung wurde  $P_{\lambda_{ex}} = 100mW$  gewählt (Leistungsdichte in der Probe:  $P/A \approx 11kW/cm^2$ ). Es wurden insgesamt 5 Zellkerne aufgenommen mit jeweils 2000 Einzelbildern mit einer Integrationszeit von 40 ms. Von diesen wurden 2 für die Clusteranalyse verwendet, in denen 24 CENP-B-Cluster bestimmt wurden. Wie für Probe 1 sind die Ergebnisse in Tabelle 7.2, Zeile 'eGFP-CENP-B Probe 2' eingetragen. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit lag bei  $\sigma_{lok} = 30.6nm$  (Standardabweichung von  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 9.1nm$ ).

**Probe 3** Diese Probe entspricht weitestgehend den vorherigen, ausser dass als Einbettmedium Mowiol verwendet wurde. Die Aufnahmebedingungen für Probe 3 entsprechen denen für Probe 1. Es wurden Lokalisationsaufnahmen von 15 Zellkernen erstellt, 11 von diesen wurden für die Clusteranalyse verwendet. In diesen wurden 164 Cluster ausgewertet, die Ergebnisse sind wie für die vorherigen Proben in Tabelle 7.2, Zeile 'eGFP-CENP-B Probe 3' zusammengestellt. Für dieses Präparat ergab sich eine mittlere Lokalisationsgenauigkeit von  $\sigma_{lok} = 32.9nm$  und eine Standardabweichung von  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 11.8nm$ .

**Probe 4** Für Probe 4 wurde ebenfalls Mowiol als Einbettmedium verwendet. Die Aufnahmen fanden bei einer Laserleistung von  $P_{\lambda_{ex}} = 50mW$  statt, es wurden für jeden Zellkern 2000 Einzelbilder mit einer Integrationszeit von 50 ms aufgenommen. Die restlichen Bedingungen entsprachen denen der vorherigen Proben. 12 Zellkerne wurden aufgenommen, 7 von diesen zur Auswertung verwendet. Es konnten 119 Cluster analysiert werden, die Ergebnisse sind in Tabelle 7.2, Zeile 'eGFP-CENP-B 4' eingetragen. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit betrug  $\sigma_{lok} = 29.4nm$  und ihre Standardabweichung  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 10.5nm$ .

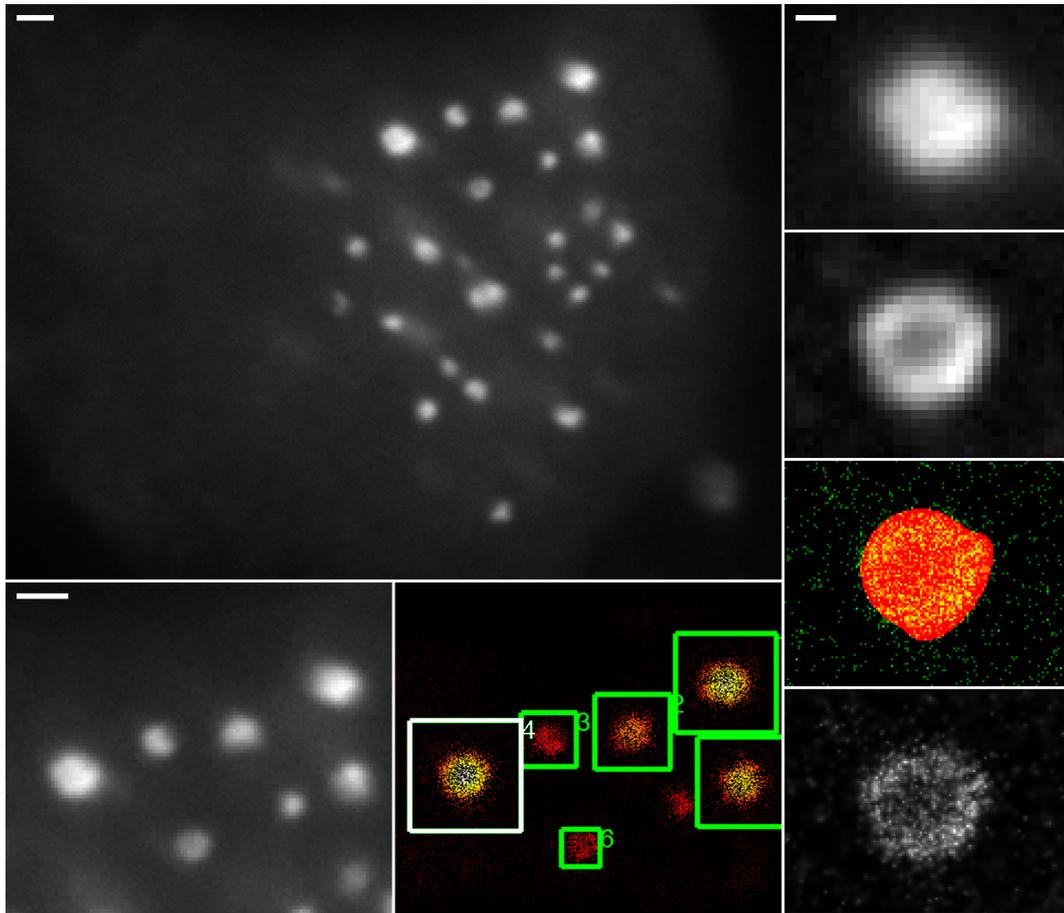
**Zusammenfassung GFP-CENP-B** In Tabelle 7.2 sind alle Ergebnisse der Untersuchung von eGFP-CENP-B eingetragen. Die Werte jeder Einzelmessung wurden in ein Histogramm eingetragen und durch eine Weibull-Verteilung angepasst, aus deren Parametern und deren Ungenauigkeiten die Mittelwerte und Standardabweichungen und deren Fehler für die minimale und maximale Ausdehnung ( $d_{min}$  und  $d_{max}$ ) sowie die hieraus resultierende Anisotropie  $d_{min}/d_{max}$ , die von dem Cluster eingenommen Fläche  $A$ , die Anzahl  $n$  der innerhalb eines Clusters liegenden Signale und die Signaldichte  $n/A$  berechnet wurden.

### eYFP-CENP-B in HEp2-Zellen

**Probe 1** In dieser Probe wurde das Centromerprotein CENP-B fusioniert mit dem Fluoreszenzprotein eYFP exprimiert. Als Einbettmedium wurde ProlongGold verwendet. Es wurde jeweils ein Datenstapel mit 2000 Bildern erstellt bei einer Integrationszeit von  $t_A = 60ms$ . Die Beleuchtung der Probe erfolgte bei  $\lambda_{ex} = 488nm$ , mit einer Ausgangsleistung des  $Ar^+$ -Ionen-Laser von  $P_{\lambda_{ex}} = 100mW$  (Leistungsdichte in der Probe:  $P/A \approx 11kW/cm^2$ ). Es wurden 11 Zellkerne aufgenommen mit 79 CENP-B-Clustern. Ein Beispiel ist in Abbildung 7.19 gezeigt. Die Lokalisationsgenauigkeit lag bei  $\sigma_{lok} = 30.3nm$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 10.6nm$ . Die Ergebnisse der Clusteranalyse sind in Tabelle 7.2, Zeile 'eYFP-CENP-B Probe 1' eingetragen.

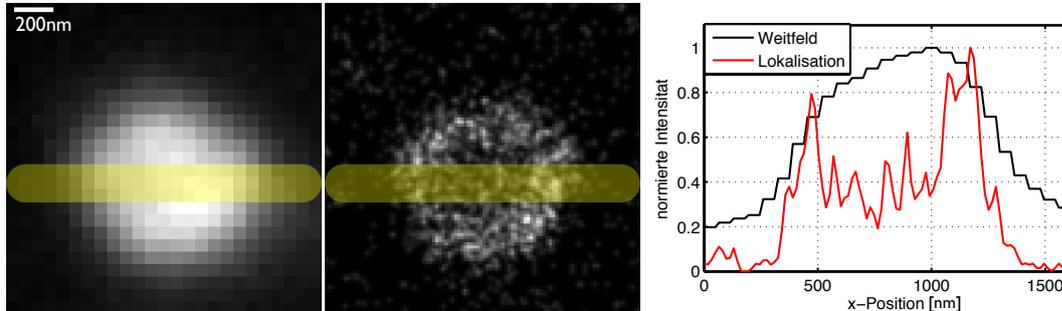
**Probe 2** Die Aufnahmebedingungen für Probe 2 entsprechen denen für Probe 1. Es wurden Lokisationsaufnahmen von 4 Zellkernen erstellt. In diesen wurden 25 Cluster ausgewertet, die Ergebnisse sind wie für die vorherigen Proben in Tabelle 7.2, Zeile 'eYFP-CENP-B Probe 2' zusammengestellt. Für dieses Präparat ergab sich eine mittlere Lokalisationsgenauigkeit von  $\sigma_{lok} = 13.3nm$  und eine Standardabweichung von  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 4.4nm$ .

**Zusammenfassung eYFP-CENP-B** Es wurden 15 HEp2-Zellkerne vermessen, welche eYFP-CENP-B enthielten. In diesen wurden 104 CENP-B-Cluster ausgewertet. Fasst man die Ergebnisse zusammen, kommt man zu den in Tabelle 7.2, Zeile 'eYFP-CENP-B gesamt' eingetragenen Werten. Die Resultate der Clusteranalyse wurden jeweils in ein Histogramm eingetragen und durch eine Weibull-Verteilung angepasst, aus deren Parametern und deren Ungenauigkeiten die Mittelwerte und Standardabweichungen und deren Fehler für die minimale und maximale Ausdehnung ( $d_{min}$  und  $d_{max}$ ) sowie die hieraus resultierende Anisotropie  $d_{min}/d_{max}$ , die von dem Cluster eingenommen Fläche  $A$ , die Anzahl  $n$  der innerhalb eines Clusters liegenden Signale und die Signaldichte  $n/A$  berechnet wurden.



**Abbildung 7.20:** eYFP-CENP-B in HEp2-Zellen. Beispiel für die Vermessung der Clustereigenschaften in Probe 1. Das obere linke Bild ist das Weitfeldbild vor der Lokalisationsaufnahme, darunter ist eine Vergrößerung des Weitfeldbildes und das Lokalisationsbild in der Nachbarschaftslabel-Darstellung mit einer Pixelgröße von 16,25 nm zu sehen. Der Maßstab (Balken) beträgt  $1\mu m$ . Die nummerierten Markierungen zeigen die Positionen der in den Lokalisationsdaten ermittelten Cluster. Rechts ist das weiß markierte Cluster Nr. 4 vergrößert dargestellt (Maßstab 250 nm). Oben: Eine Vergrößerung des Weitfeldbildes. Darunter ist ein simuliertes Weitfeldbild anhand der Lokalisationsdaten gezeigt. Darunter ist das ermittelte Cluster in rot und die einzelnen Signalpositionen in grün dargestellt. Ganz unten ist eine Darstellung der Lokalisationsdaten zu sehen, bei der an jeder Position eine normierte 2D-Gaußfunktion eingetragen ist, deren Standardabweichung der individuellen Positionsgenauigkeit entspricht.

## Zusammenfassung CENP-B



**Abbildung 7.21:** Querschnitt durch einen CENP-B-Cluster. Links ist das Weitfeldbild, in der Mitte das Lokalisationsbild zu sehen. Der gelb markierte Bereich kennzeichnet den Bereich, über welchen das rechts gezeigte Linienprofil erstellt wurde. Die Intensität (für das Weitfeldbild die Anzahl der auf dem Detektor ausgelösten Photoelektronen, für das Lokalisationsbild die als Gauß-Verteilung dargestellten Positionen, siehe Abschnitt 5.2.1) wurde normiert (Maximum = 1).

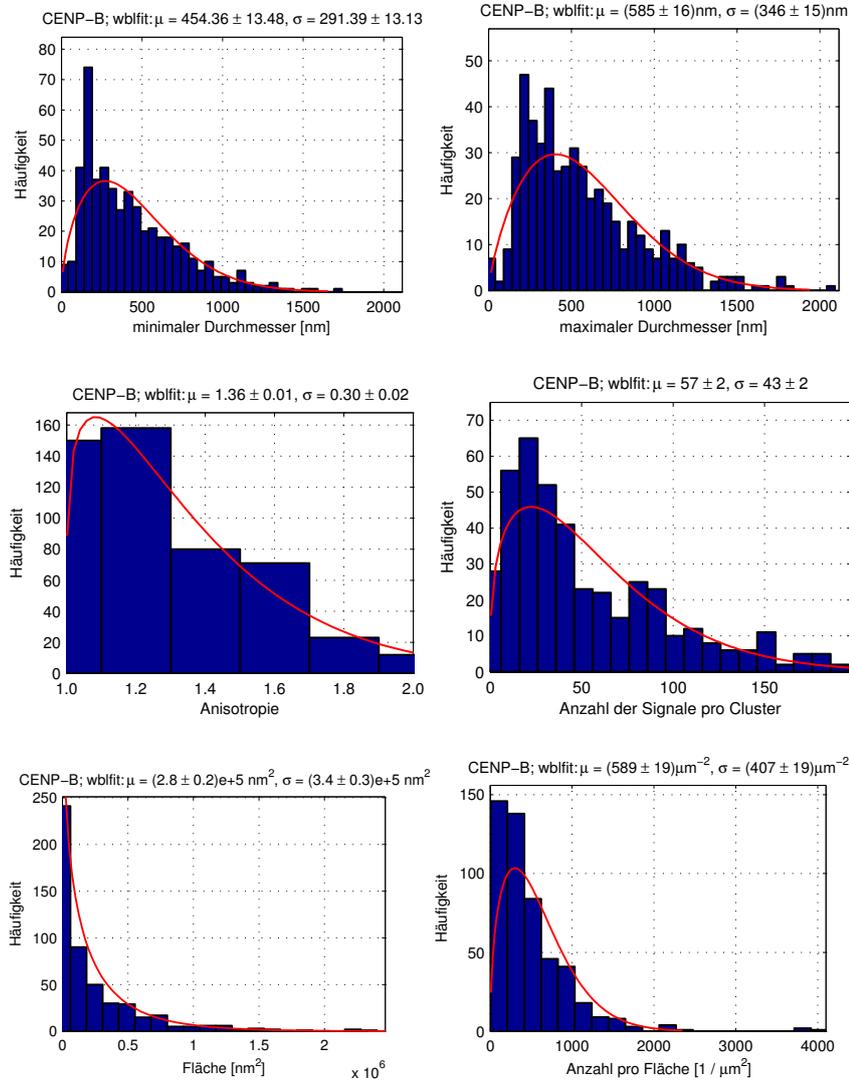
Insgesamt wurden 505 CENP-B-Cluster in 44 HEP2-Zellen ausgewertet. Fasst man alle diese Auswertungen zusammen, ergeben sich für die Verteilung des Centromerproteins in HEP2-Zellen die in Abbildung 7.22 gezeigten Resultate, welche in Tabelle 7.2 zusammengestellt sind.

Die Ausdehnung der CENP-B-Komplexe variiert stark, sowohl für die Fluoreszenzmarkierung mit eGFP, als auch für die mit eYFP, wobei Letztere im Mittel fast doppelt so groß ist wie im Fall der eGFP-Markierung. Dies kann zum einen daran liegen, dass die Centomere zu jeder Zellzyklus-Phase aufgenommen wurden. Kommt es dabei zu Konformationsänderungen oder wird zusätzliches CENP-B eingelagert oder abgebaut, beeinflusst dies die Ausdehnung. Auch der Grad der Überexpression könnte die Größe beeinflussen. Die Anisotropie der Ausdehnung ist relativ gering und variiert nicht sehr mit der Größe. Im Mittel werden 57 Signale in einem CENP-B-Cluster gefunden, die Signaldichte ist kleiner als dies bei den CENP-A-Clustern der Fall war, die Breite dieser Verteilung ist aber ebenfalls sehr hoch. Ein interessantes Phänomen ist das Auftreten ringförmiger Verteilungen (wie in Abbildung 7.21 zu sehen), was in einigen CENP-B-Clustern beobachtet werden konnte.

**Tabelle 7.2:** Zusammenfassung aller Messungen mit Centromerprotein CENP-B. Eingetragen sind die Mittelwerte der Messgrößen und deren Fehler sowie die Standardabweichungen und deren Fehler, wie sie aus den wie in Abbildung 7.22 beispielhaft gezeigten Verteilungen bestimmt wurden.

Probe	Anzahl der Zellkerne #ZK	Anzahl der Cluster #CL	Mittelwert der min. Ausdehnung $\bar{d}_{min}$ [nm]	Std. der min. Ausdehnung $\sigma_{d_{min}}$ [nm]	Mittelwert der max. Ausdehnung $\bar{d}_{max}$ [nm]	Std. der max. Ausdehnung $\sigma_{d_{max}}$ [nm]	mittlere Anisotropie d. Ausdehnung $\left(\frac{d_{min}}{d_{max}}\right)$	Std. der Anisotropie der Ausdehnung $\sigma_{\frac{d_{min}}{d_{max}}}$	Mittelwert der Anzahl Signale pro Cluster $\bar{n}$	Std. der Anzahl Signale pro Cluster $\sigma_n$	mittlere Clusterfläche $\bar{A}$ [10 <sup>4</sup> nm <sup>2</sup> ]	Std. der Clusterfläche $\sigma_A$ [10 <sup>4</sup> nm <sup>2</sup> ]	mittlere Signaldichte $\left(\frac{n}{A}\right)$ [1/μm <sup>2</sup> ]	Std. der Signaldichte $\sigma_{\frac{n}{A}}$ [1/μm <sup>2</sup> ]	mittlere Lokalisationsgenauigkeit $\bar{\sigma}_{lok}$ [nm]	Std. der Lok.genauigkeit $\sigma_{\sigma_{lok}}$ [nm]
1 eGFP-CENP-B Probe 1	9	94	479.1±23.5	238.9±20.2	632.6±30.7	299.8±25.7	1.356±0.030	0.274±0.034	76.4±5.3	44.9±5.0	2.78±0.28	2.49±0.36	532±40	363±36	41.5	14.3
2 eGFP-CENP-B Probe 2	2	24	785.9±68.5	337.2±55.5	1001.9±92.1	450.2±74.6	1.287±0.044	0.202±0.046	97.1±10.2	43.4±8.5	7.00±1.30	5.77±1.5	291±30	146±25	30.6	9.1
3 eGFP-CENP-B Probe 3	11	164	214.1±7.8	99.1±5.9	312.8±10.9	139.7±8.3	1.49±0.024	0.298±0.023	30.9±1.5	18.5±1.4	0.56±0.04	0.48±0.047	778±36	451±33	32.9	11.8
4 eGFP-CENP-B Probe 4	7	119	412.2±17.2	189.1±14.5	550.2±24.2	265.0±20.3	1.350±0.029	0.295±0.035	56.9±4.3	43.5±4.8	2.04±0.18	1.84±0.23	397±32	321±33	29.4	10.5
5 eGFP-CENP-B gesamt	29	401	372.1±11.9	239.8±11.2	502.9±15.3	298.1±13.9	1.404±0.016	0.298±0.017	51.6±2.1	39.1±2.4	1.88±0.13	2.25±0.20	580±22	419±22	—	—
6 eYFP-CENP-B Probe 1	11	79	737.7±35.3	315.7±27.5	883.0±39.8	358.0±30.9	1.215±0.024	0.199±0.033	103.7±7.8	41.8±6.3	5.89±0.55	4.55±0.60	723±35	312±28	30.3	10.6
7 eYFP-CENP-B Probe 2	4	25	871.7±47.1	247.2±36.8	967.4±50.8	267.4±39.8	1.122±0.038	0.159±0.072	113.7±8.4	31.8±7.1	7.16±0.76	3.77±0.70	298±18	94±12	13.3	4.4
8 eYFP-CENP-B gesamt	15	104	769.6±29.7	307.7±23.0	902.9±32.9	342.6±25.3	1.192±0.022	0.201±0.033	106.8±6.0	39.4±4.8	6.20±0.47	4.47±0.49	623±32	324±28	—	—
9 CENP-B gesamt	44	505	454.4±13.5	291.4±13.1	585.5±15.8	346.0±14.6	1.359±0.014	0.302±0.018	57.0±2.2	43.0±2.5	2.76±1.71	3.39±2.79	589±19	407±19	—	—

### 7.3 Untersuchung von Proteinverteilungen im menschlichen Kinetochor



**Abbildung 7.22:** Auswertung aller Lokalisationsdaten von 56 HEp2-Zellen mit fluoreszenzmarkiertem CENP-B. Insgesamt konnten 505 Cluster von CENP-B Proteinen ermittelt werden. Die Histogramme zeigen die minimalen und maximalen Durchmesser  $d_{min}$  und  $d_{max}$  (obere Reihe), die Anisotropie  $d_{min}/d_{max}$  und die Anzahl  $n$  der Signale pro Cluster (mittlere Reihe) sowie die Clusterfläche  $A$  und die Signaldichte  $A/n$  (untere Reihe).

### 7.3.3 Centromerprotein C (CENP-C)

Das Centromerprotein CENP-C spielt eine wesentliche Rolle bei der Segregation der Chromosomen, seine genaue Funktion ist jedoch nicht bekannt [TCKW09]. Offenbar ist CENP-C an der Rekrutierung essentieller Kinetochorproteine beteiligt.

#### eGFP-CENP-C in HEp2-Zellen

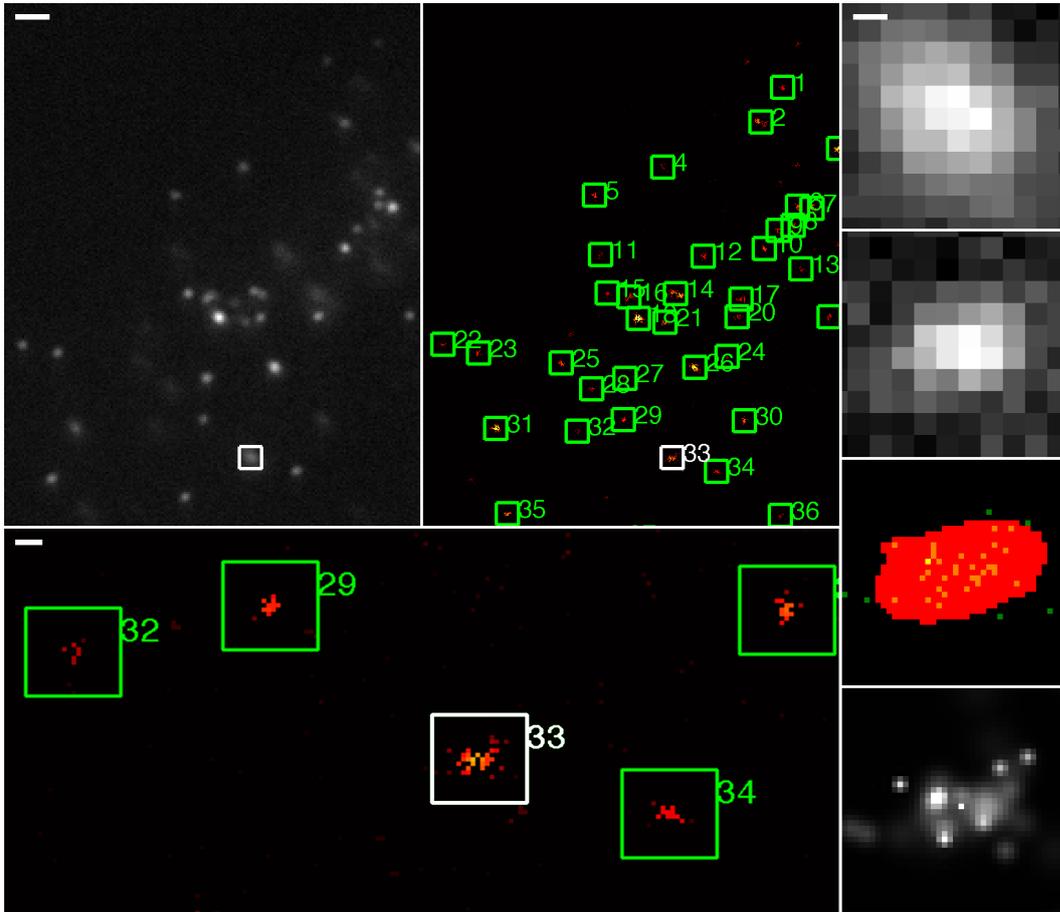
**Probe 1** In Probe 1 wurde in menschlichen HEp2-Zellen das Kinetochorprotein Centromerprotein-C (CENP-C) als Fusionsprotein mit eGFP exprimiert. Die Proben wurden auf gewöhnlichen Deckgläsern präpariert und mit ProlongGold eingebettet. Zur Anregung wurde ein  $Ar^+$ -Ionen-Laser bei  $\lambda_{ex} = 488nm$  verwendet, dessen Ausgangsleistung auf  $P_{\lambda_{ex}} = 100mW$  (Leistungsdichte in der Probe:  $P/A \approx 11kW/cm^2$ ) eingestellt war. Es wurden 2 Zellkerne aufgenommen, von jedem wurde ein Datenstapel mit 2000 Einzelbildern bei einer Integrationszeit von  $t_A = 60ms$  aufgenommen. Es wurden mit der in Abschnitt 5.3.4 beschriebenen Clusteranalyse 30 Cluster registriert und ausgewertet (siehe Tabelle 7.4). Die mittlere Positionsgenauigkeit der Lokalisationsdaten betrug  $\sigma_{lok} = 14.4$ , die Standardabweichung  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 4.1$ .

**Probe 2** Das zweite Präparat mit eGFP-CENP-C in menschlichen HEp2-Zellen wurde analog zum ersten präpariert und in Mowiol eingebettet. Die Ausgangsleistung des Lasers betrug hier  $P_{\lambda_{ex}} = 20mW$ , es wurden 9 Zellkerne aufgenommen mit jeweils 1500 Einzelbildern bei einer Integrationszeit von  $t_A = 50ms$ . Von diesen konnten 8 analysiert werden, in diesen wurden 194 CENP-C-Cluster registriert und ausgewertet. Die Resultate sind in Tabelle 7.4 eingetragen. In Abbildung 7.23 ist beispielhaft ein Weitfeldbild und das entsprechende Lokalisationsbild sowie verschiedene Vergrößerungen eines der Cluster für Zellkern 1 gezeigt.

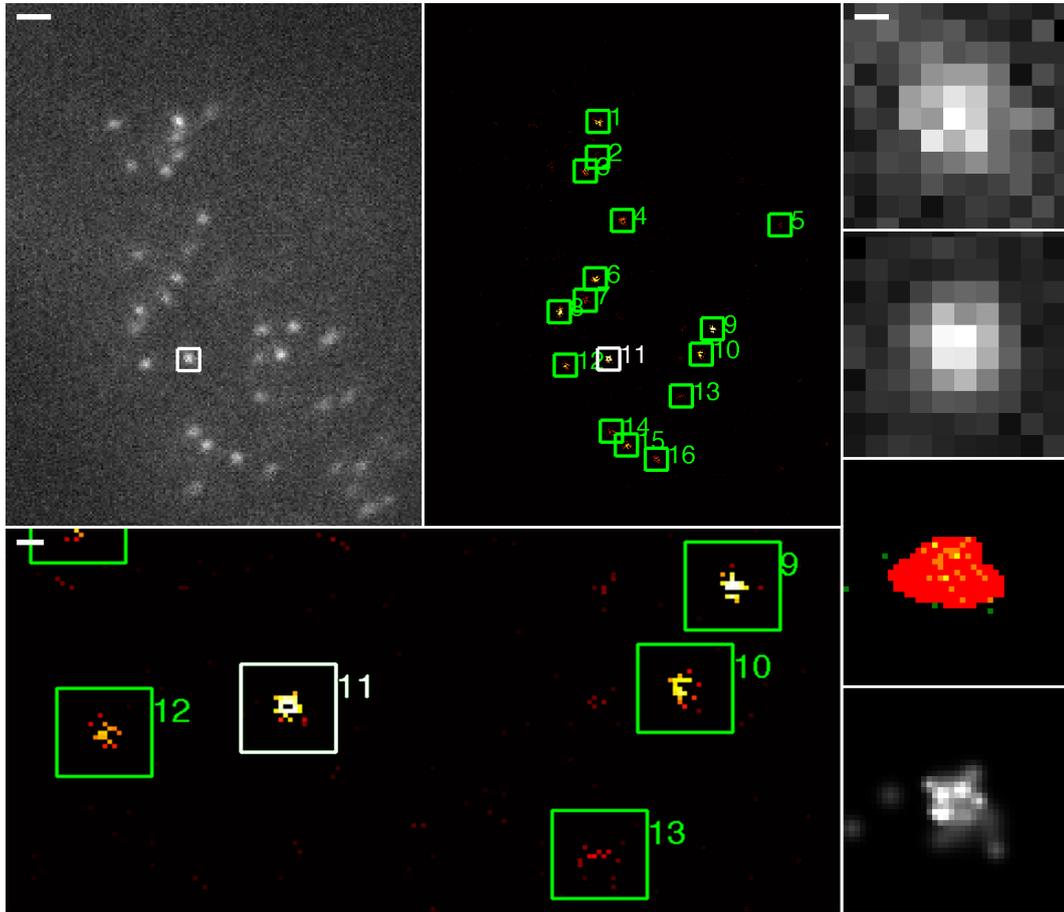
**Zusammenfassung eGFP-CENP-C** In 10 HEp2-Zellkernen, in denen eGFP-CENP-C exprimiert wurde, konnten 224 CENP-C-Cluster detektiert werden. Von diesen wurden die minimale und maximale Ausdehnung ( $d_{min}$  und  $d_{max}$ ) sowie die hieraus resultierende Anisotropie  $d_{min}/d_{max}$ , die von dem Cluster eingenommene Fläche  $A$ , die Anzahl  $n$  der innerhalb eines Clusters liegenden Signale und die Signaldichte  $n/A$  bestimmt und die Mittelwerte und Standardabweichungen der entsprechenden Verteilungen in Tabelle 7.4 eingetragen.

#### eYFP-CENP-C in HEp2-Zellen

**Probe 1** In Probe 1 wurde CENP-C mit eYFP als Fusionsprotein exprimiert. Als Einbettmedium wurde ProlongGold verwendet. Es wurden 4 Zellkerne aufgenommen, für jeden ein Datenstapel von 2000 Einzelbildern mit einer Integrationszeit



**Abbildung 7.23:** eGFP-CENP-C in HEP2-Zellen. Beispiel für die Vermessung der Clustereigenschaften in Probe 1. Das obere linke Bild ist das Weitfeldbild vor der Lokalisationsaufnahme, rechts daneben ist das Lokalisationsbild in der Nachbarschaftslabel-Darstellung mit einer Pixelgröße von 32.5 nm zu sehen. Der Maßstab (Balken) beträgt  $1\mu\text{m}$ . Die nummerierten Markierungen zeigen die Positionen der in den Lokalisationsdaten ermittelten Cluster. Der Vergleich mit dem Weitfeldbild ergibt eine sehr gute Übereinstimmung. Darunter ist eine Vergrößerung einiger der gefundenen Cluster gezeigt (Maßstab 200 nm). Rechts ist das weiß markierte Cluster Nr. 33 vergrößert dargestellt (Maßstab 100 nm). Oben: Eine Vergrößerung des Weitfeldbildes. Darunter ist ein simuliertes Weitfeldbild anhand der Lokalisationsdaten gezeigt. Darunter ist das ermittelte Cluster in rot und die einzelnen Signalpositionen in grün dargestellt. Ganz unten ist eine Darstellung der Lokalisationsdaten zu sehen, bei der an jeder Position eine normierte 2D-Gaußfunktion eingetragen ist, deren Standardabweichung der individuellen Positionsgenauigkeit entspricht.



**Abbildung 7.24:** eYFP-CENP-C in HEP2-Zellen. Beispiel für die Vermessung der Clustereigenschaften in Probe 1. Das obere linke Bild ist das Weitfeldbild vor der Lokisationsaufnahme, rechts daneben ist das Lokalisationsbild in der Nachbarschaftslabel-Darstellung mit einer Pixelgröße von 32.5 nm zu sehen. Die Länge des Maßstabsbalkens beträgt  $1\mu m$ . Die nummerierten Markierungen zeigen die Positionen der in den Lokalisationsdaten ermittelten Cluster. Der Vergleich mit dem Weitfeldbild ergibt eine sehr gute Übereinstimmung. Darunter ist eine Vergrößerung einiger der gefundenen Cluster gezeigt (Maßstab 200 nm). Rechts ist das weiß markierte Cluster Nr. 11 vergrößert dargestellt (Maßstab 100 nm). Oben: Eine Vergrößerung des Weitfeldbildes. Darunter ist ein simuliertes Weitfeldbild anhand der Lokalisationsdaten gezeigt. Darunter ist das ermittelte Cluster in rot und die einzelnen Signalpositionen in grün dargestellt. Ganz unten ist eine Darstellung der Lokalisationsdaten zu sehen, bei der an jeder Position eine normierte 2D-Gaußfunktion eingetragen ist, deren Standardabweichung der individuellen Positionsgenauigkeit entspricht.

von  $t_A = 60ms$  bei einer Anregung mit  $\lambda_{ex} = 488nm$ . Die Ausgangsleistung des Lasers wurde auf  $P_{\lambda_{ex}} = 100mW$  (Leistungsdichte in der Probe:  $P/A \approx 11kW/cm^2$ ) eingestellt. In Abbildung 7.24 sind exemplarisch Weitfeldbild, Lokalisationsbild und Vergrößerungen eines CENP-C-Clusters für Zellkern 2 gezeigt. Die Ergebnisse der Clusteranalyse, bei der in allen Zellkernen 73 Cluster gefunden wurden, sind in Tabelle 7.4, Zeile 'eYFP-CENP-C Probe 1' eingetragen. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit betrug  $\sigma_{lok} = 30,0nm$  bei einer Standardabweichung von  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 10,1nm$ .

**Probe 2** Die Präparation der zweiten Probe erfolgte genau wie für Probe 1. Auch die Aufnahmebedingungen waren die gleichen. Es wurden 10 Zellkerne aufgenommen, von diesen wurden 8 ausgewertet. Die Ergebnisse der 119 gefundenen CENP-C-Cluster sind in Tabelle 7.4, Zeile 'eYFP-CENP-C Probe 2' zusammengefasst. Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit war in diesem Fall  $\sigma_{lok} = 13.2nm$ , die Standardabweichung  $\sigma_{\sigma_{lok}} = 4.4nm$ .

**Zusammenfassung eYFP-CENP-C** Es wurden 18 HEp2-Zellkerne vermessen, welche eYFP-CENP-C enthielten. In diesen wurden 192 CENP-C-Cluster ausgewertet. Fasst man die Ergebnisse zusammen, kommt man zu den in Tabelle 7.4 eingetragenen Werten. An die Verteilungen der einzelnen Messgrößen wurde jeweils eine Weibull-Verteilung angepasst, aus deren Parametern und deren Ungenauigkeiten die Mittelwerte und Standardabweichungen und deren Fehler für die minimale und maximale Ausdehnung ( $d_{min}$  und  $d_{max}$ ) sowie die hieraus resultierende Anisotropie  $d_{min}/d_{max}$ , die von dem Cluster eingenommenen Fläche  $A$ , die Anzahl  $n$  der innerhalb eines Clusters liegenden Signale und die Signaldichte  $n/A$  berechnet wurden.

#### Zusammenfassung CENP-C

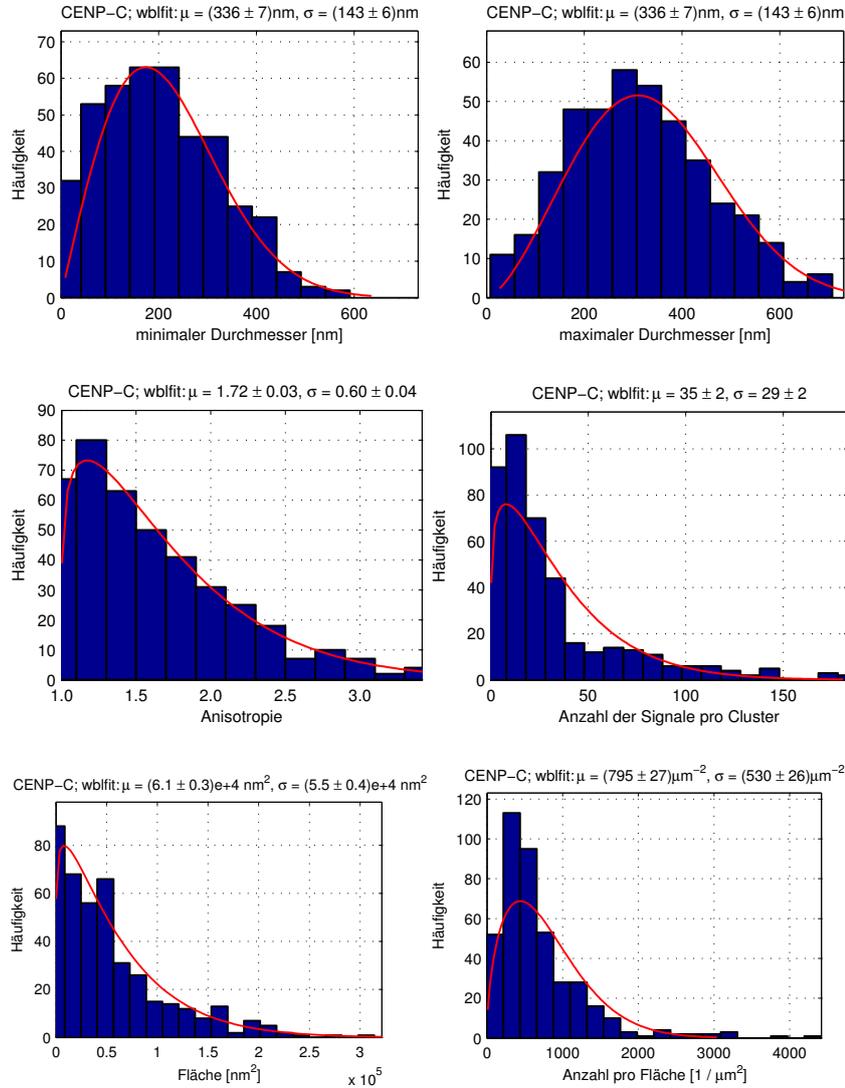
Insgesamt wurden 416 CENP-C-Cluster in 22 HEp2-Zellen ausgewertet. Fasst man alle diese Auswertungen zusammen, ergeben sich für die Verteilung des Centromerproteins in HEp2-Zellen die in Abbildung 7.25 gezeigten Resultate, welche in Tabelle 7.4 zusammengestellt sind.

Die minimale Ausdehnung der CENP-C-Cluster liegt im Mittel bei etwa  $220nm$ , die maximale bei etwa  $340nm$ . Diese Werte sind vergleichbar mit denen für CENP-A. Auch die Anisotropie liegt im selben Bereich. Im Mittel wurden 35 Signale pro Cluster gefunden, dieser Wert variiert jedoch abhängig von der Art der Markierung. So wurden für eGFP-CENP-C im Mittel etwa 22 Signale pro Cluster gemessen, für eYFP jedoch 50. Auch für CENP-B war die Anzahl der gefundenen Signale etwa doppelt so hoch für eYFP wie für eGFP, allerdings war dort auch die Variation der Clusterausdehnungen größer.

**Tabelle 7.3:** Zusammenfassung aller Messungen mit Centromerprotein CENP-C. Eingetragen sind die Mittelwerte der Messgrößen und deren Fehler sowie die Standardabweichungen und deren Fehler, die aus den wie in Abbildung 7.25 beispielhaft gezeigten Verteilungen bestimmt wurden.

Probe	Anzahl der Zellkerne #ZK	Anzahl der Cluster #CL	Mittelwert der min. Ausdehnung $\bar{d}_{min}$ [nm]	Std. der min. Ausdehnung $\sigma_{d_{min}}$ [nm]	Mittelwert der max. Ausdehnung $\bar{d}_{max}$ [nm]	Std. der max. Ausdehnung $\sigma_{d_{max}}$ [nm]	mittlere Anisotropie d. Ausdehnung $\left(\frac{d_{min}}{d_{max}}\right)$	Std. der Anisotropie der Ausdehnung $\sigma_{\frac{d_{min}}{d_{max}}}$	Mittelwert der Anzahl Signale pro Cluster $\bar{n}$	Std. der Anzahl Signale pro Cluster $\sigma_n$	mittlere Clusterfläche $\bar{A}$ [ $10^4 nm^2$ ]	Std. der Clusterfläche $\sigma_A$ [ $10^4 nm^2$ ]	mittlere Signaldichte $\left(\frac{n}{A}\right)$ [ $1/\mu m^2$ ]	Std. der Signaldichte $\sigma_{\frac{n}{A}}$ [ $1/\mu m^2$ ]	mittlere Lokalisationsgenauigkeit $\bar{\sigma}_{lok}$ [nm]	Std. der Lok.genauigkeit $\sigma_{\sigma_{lok}}$ [nm]
1	eGFP-CENP-C Probe 1	2	204.1 ± 16.1	90.1 ± 14.5	323.8 ± 19.9	113.2 ± 16.3	1.790 ± 0.127	0.639 ± 0.1478	22.5 ± 3.0	15.6 ± 3.0	5.09 ± 0.69	3.61 ± 0.78	700 ± 121	600 ± 136	14.4	4.1
2	eGFP-CENP-C Probe 2	8	177.9 ± 6.6	90.9 ± 5.7	307.9 ± 9.7	135.8 ± 7.8	1.895 ± 0.050	0.661 ± 0.055	21.3 ± 1.0	12.9 ± 0.9	4.15 ± 0.28	3.57 ± 0.33	779 ± 36	480 ± 33	33.9	13.5
3	eGFP-CENP-C gesamt	10	181.5 ± 6.1	91.5 ± 5.3	310.0 ± 8.8	133.6 ± 7.1	1.881 ± 0.047	0.660 ± 0.052	21.5 ± 0.9	13.3 ± 0.8	4.28 ± 0.26	3.61 ± 0.31	769 ± 35	506 ± 33	–	–
4	eYFP-CENP-C Probe 1	4	180.6 ± 12.4	103.6 ± 11.7	286.3 ± 16.2	139.0 ± 14.2	1.760 ± 0.070	0.562 ± 0.075	18.9 ± 1.6	13.1 ± 1.6	4.50 ± 0.58	4.49 ± 0.82	823 ± 93	718 ± 111	30.0	10.1
5	eYFP-CENP-C Probe 2	8	310.2 ± 9.5	107.2 ± 7.3	417.6 ± 11.7	132.1 ± 8.8	1.382 ± 0.031	0.317 ± 0.037	70.2 ± 3.8	40.1 ± 3.5	10.56 ± 0.60	10.56 ± 0.58	822 ± 39	419 ± 32	13.2	4.4
6	eYFP-CENP-C gesamt	12	260.4 ± 8.9	123.9 ± 7.8	366.7 ± 10.4	148.2 ± 8.5	1.526 ± 0.036	0.455 ± 0.043	50.3 ± 3.2	40.9 ± 3.8	8.23 ± 0.53	6.82 ± 0.64	826 ± 43	558 ± 41	–	–
7	CENP-C gesamt	22	218.3 ± 5.7	114.5 ± 5.1	336.4 ± 6.9	143.3 ± 5.6	1.718 ± 0.032	0.601 ± 0.038	34.7 ± 1.6	29.4 ± 1.8	6.12 ± 0.30	5.52 ± 0.38	795 ± 27	530 ± 26	–	–

### 7.3 Untersuchung von Proteinverteilungen im menschlichen Kinetochor



**Abbildung 7.25:** Auswertung aller Lokalisationsdaten von 29 HEP2-Zellen mit fluoreszenzmarkierten CENP-C. Insgesamt konnten 416 Cluster von CENP-C Proteinen ermittelt werden. Die Histogramme zeigen die minimalen und maximalen Durchmesser  $d_{min}$  und  $d_{max}$  (obere Reihe), die Anisotropie  $d_{min}/d_{max}$  und die Anzahl  $n$  der Signale pro Cluster (mittlere Reihe) sowie die Clusterfläche  $A$  und die Signaldichte  $A/n$  (untere Reihe).

**Tabelle 7.4:** Zusammenfassung aller Messungen der Centromerprotein CENP-A, CENP-B und CENP-C. Eingetragen sind die Mittelwerte der Messgrößen und deren Fehler sowie die Standardabweichungen und deren Fehler.

Probe	Anzahl der Zellkerne #ZK	Anzahl der Cluster #CL	Mittelwert der min. Ausdehnung $\bar{d}_{min}$ [nm]	Std. der min. Ausdehnung $\sigma_{d_{min}}$ [nm]	Mittelwert der max. Ausdehnung $\bar{d}_{max}$ [nm]	Std. der max. Ausdehnung $\sigma_{d_{max}}$ [nm]	mittlere Anisotropie d. Ausdehnung $\left(\frac{d_{min}}{d_{max}}\right)$	Std. der Anisotropie der Ausdehnung $\sigma_{\frac{d_{min}}{d_{max}}}$	Mittelwert der Anzahl Signale pro Cluster $\bar{n}$	Std. der Anzahl Signale pro Cluster $\sigma_n$	mittlere Clusterfläche $\bar{A}$ [ $10^4 nm^2$ ]	Std. der Clusterfläche $\sigma_A$ [ $10^4 nm^2$ ]	mittlere Signaldichte $\left(\frac{n}{A}\right)$ [ $1/\mu m^2$ ]	Std. der Signaldichte $\sigma_{\frac{n}{A}}$ [ $1/\mu m^2$ ]
1 eGFP-CENP-A gesamt	33	364	172.3± 4.3	81.5± 3.5	285.5± 6.2	118.9± 4.8	1.768± 0.037	0.657± 0.045	24.1± 1.0	18.5± 1.1	3.70± 0.17	3.01± 0.19	774± 27	480± 25
2 mRFP-CENP-A gesamt	24	365	200.3± 5.5	105.0± 5.0	314.5± 7.1	137.6± 5.9	1.727± 0.033	0.594± 0.039	26.4± 0.8	15.5± 0.8	5.19± 0.26	4.56± 0.33	839± 41	705± 47
3 CENP-A ge- samt	57	729	186.5± 3.5	94.4± 3.0	300.2± 4.7	129.2± 3.8	1.747± 0.025	0.626± 0.030	25.3± 0.7	17.4± 0.7	4.45± 0.15	3.83± 0.19	809± 24	604± 25
4 eGFP-CENP-B gesamt	29	401	372.1± 11.9	229.8± 11.2	502.9± 15.3	298.1± 13.9	1.404± 0.016	0.298± 0.017	51.6± 2.1	39.1± 2.4	1.88± 0.13	2.25± 0.20	580± 22	419± 22
5 eYFP-CENP-B gesamt	15	104	769.6± 29.7	307.7± 23.0	902.9± 32.9	342.6± 25.3	1.192± 0.022	0.201± 0.033	106.8± 6.0	39.4± 4.8	6.20± 0.47	4.47± 0.49	623± 32	324± 28
6 CENP-B ge- samt	44	505	454.4± 13.5	291.4± 13.1	585.5± 15.8	346.0± 14.6	1.359± 0.014	0.302± 0.018	57.0± 2.2	43.0± 2.5	2.76± 1.71	3.39± 2.79	589± 19	407± 19
7 eGFP-CENP-C gesamt	10	224	181.5± 6.1	91.5± 5.3	310.0± 8.8	133.6± 7.1	1.881± 0.047	0.660± 0.052	21.5± 0.9	13.3± 0.8	4.28± 0.26	3.61± 0.31	769± 35	506± 33
8 eYFP-CENP-C gesamt	12	192	260.4± 8.9	123.9± 7.8	366.7± 10.4	148.2± 8.5	1.526± 0.036	0.455± 0.043	50.3± 3.2	40.9± 3.8	8.23± 0.53	6.82± 0.64	826± 43	558± 41
9 CENP-C ge- samt	22	416	218.3± 5.7	114.5± 5.1	336.4± 6.9	143.3± 5.6	1.718± 0.032	0.601± 0.038	34.7± 1.6	29.4± 1.8	6.12± 0.30	5.52± 0.38	795± 27	530± 26

### 7.3.4 Untersuchung der relativen Verteilung der Centromerproteine

Um mit Hilfe der Lokalisationsmikroskopie zu untersuchen, wie die verschiedenen Centromerproteine innerhalb der Centromere verteilt sind, wurden in menschlichen HEp2-Zellen verschiedene Centromerproteine gleichzeitig fluoreszenzmarkiert. Durch geeignete Wahl der optischen Filter und sequentielle Aufnahme konnten so Lokalisationsaufnahmen erstellt werden. Diese wurden auf Größen- und Positionsverhältnisse der Cluster, das Verhältnis der enthaltenen Signalpositionen und die Distanzverhältnisse der einzelnen Positionen untereinander untersucht. Es stellte sich im Verlauf der Experimente heraus, dass eine für die Lokalisationsmikroskopie geeignete Doppelmarkierung nicht in jedem Fall erreicht werden konnte. So ergab sich bei der Rekonstruktion der Daten, dass oft nur ein von zwei Farbkanälen erfolgreich rekonstruiert werden konnte. Diese Ergebnisse wurden für die oben aufgeführte Analyse der Einfarbenmessungen verwendet. Im Fall der gleichzeitigen Fluoreszenzmarkierung von mRFP-CENP-A und eGFP-CENP-B konnten jedoch einige Aufnahmen für beide Farbkanäle rekonstruiert werden. Die Ergebnisse werden hier vorgestellt. Für die Lokalisationsmessung wurde zuerst der rote Farbkanal aufgenommen. Hierzu wurde der 580nm Langpassfilter (siehe Abschnitt 4.1) gewählt und die Probe mit  $\lambda_{ex} = 568nm$  bei einer Ausgangsleistung am Laser von  $P_{\lambda_{ex}} = 100mW$  (Leistungsdichte in der Probe:  $P/A \approx 11kW/cm^2$ ) beleuchtet (die ersten 20 Aufnahmen erfolgten mit Intensitätsfilter, siehe Abschnitt 5.3.5). Es wurden 2000 Aufnahmen bei einer Integrationszeit der Kamera von  $t_A = 60ms$  aufgenommen. Waren nach der ersten Aufnahme noch Fluoreszenzsignale von Einzelmolekülen vorhanden, wurde ein zweiter Datenstapel ebenso aufgenommen. Daraufhin wurde die Beleuchtung durch Schließen des entsprechenden Lasershutters abgeblockt und manuell der Filter auf den GFP-Bandpassfilter (siehe Abschnitt 4.1) gewechselt. Die Probe wurde mit  $\lambda_{ex} = 488nm$  bei einer Ausgangsleistung am Laser von  $P_{\lambda_{ex}} = 100mW$  (Leistungsdichte in der Probe:  $P/A \approx 11kW/cm^2$ ) beleuchtet, die ersten 20 Aufnahmen erfolgten mit dem Intensitätsfilter im Strahlengang. Es wurden 2000 Aufnahmen bei einer Integrationszeit der Kamera von  $t_A = 40ms$  aufgenommen. Auch hier wurde ein zweiter Datenstapel aufgenommen, falls noch Einzelmolekülsignale zu erkennen waren.

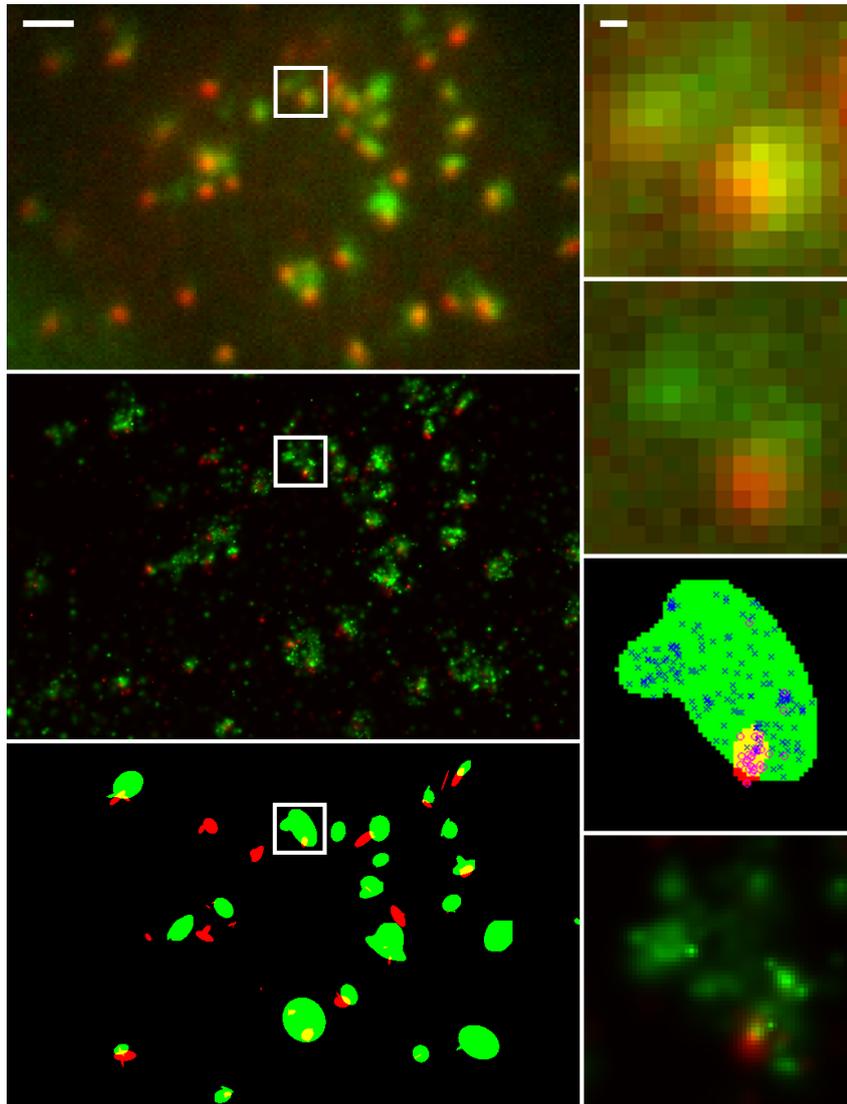
Die einzelnen Positionen wurden wie in Abschnitt 5.1 beschrieben ermittelt, die Clusteranalyse erfolgte wie in Abschnitt 5.3.4 beschrieben durch Anpassung eines *gaussian mixture models*. Die ersten Aufnahmen erfolgten ohne eine Korrektur der Verschiebung wie in Abschnitt 5.3.5 beschrieben, so dass hier nur die Ergebnisse für die Größenverhältnisse und die relative Anzahl der Signale sinfolle Werte liefern. Daraufhin wurde vor jeder Messung eine Referenzmessung wie in Abschnitt 5.3.5 beschrieben durchgeführt, so dass auch Positionen miteinander verglichen werden konnten.

**CENP-A - CENP-B ohne Korrektur**

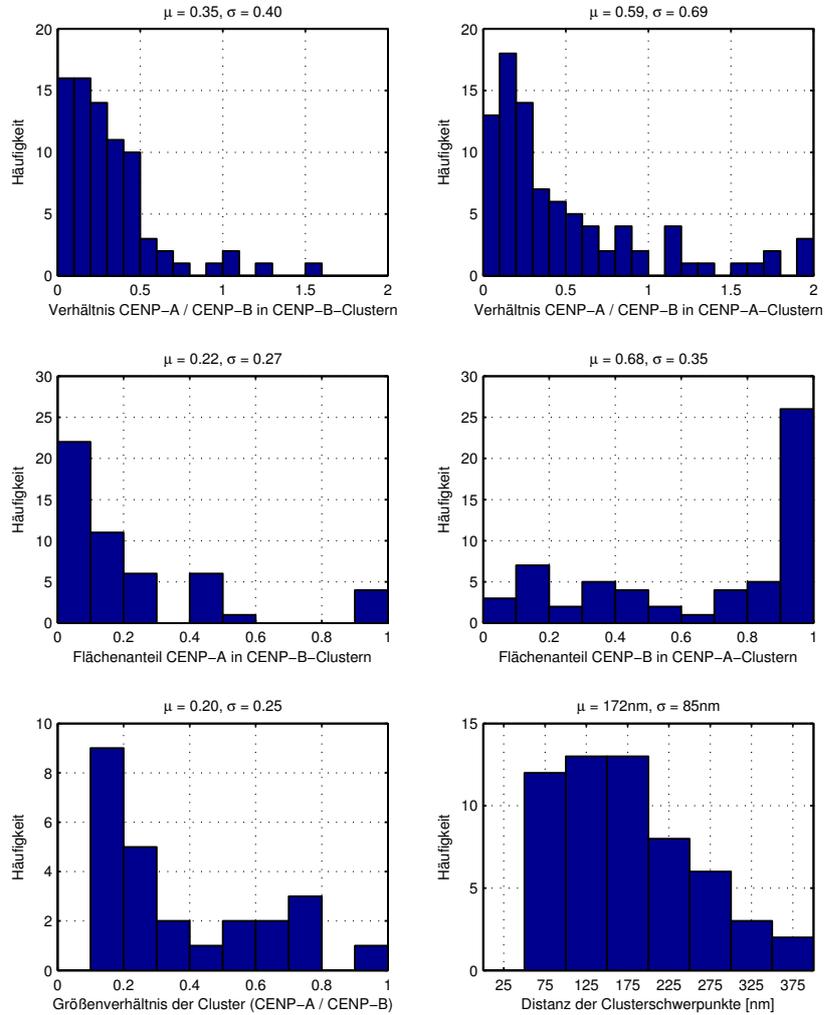
In Abbildung 7.26 ist ein Beispiel für eine Zweifarbenaufnahme ohne Korrektur gezeigt. In der linken Spalte ist oben eine Überlagerung der Weitfeldaufnahmen für beide Farbkanäle zu sehen, in der Mitte die gleiche Überlagerung für das Lokalisationsbild und unten die Flächen der mittels des *gaussian mixture models* bestimmten Cluster. In der rechten Spalte sind Vergrößerungen des links durch ein weißes Quadrat markierten Bereichs dargestellt. Oben ist eine Vergrößerung des Weitfeldbildes zu sehen, als zweites der gleiche Bereich als aus den Lokalisationsdaten simuliertes Weitfeldbild. Als drittes ist die anhand der Lokalisationsdaten ermittelte Clusterfläche im selben Bereich in grün (eGFP) und rot (mRFP) und die darin befindlichen Signalpositionen für mRFP-CENP-A als magenta Kreise und für eGFP-CENP-B als blaue Kreuze eingetragen. Unten ist eine Vergrößerung des Lokalisationsbildes zu sehen, wobei die einzelnen Positionen als Gauß-Verteilungen eingetragen sind, deren Standardabweichung der mittleren Lokalisationsgenauigkeit entspricht.

Es wurde das Verhältnis von CENP-A- zu CENP-B-Signalen in sechs Zellkernen innerhalb der Cluster von CENP-A und CENP-B bestimmt (siehe Abbildung 7.27, obere Reihe). Hierfür ergaben sich ein Wert von 0,35 im Mittel für das Verhältnis in CENP-B-Clustern mit einer Standardabweichung von 0,40, in CENP-A-Clustern im Mittel 0,59, Standardabweichung 0,69. Die relativen Flächenanteile der CENP-A-Cluster innerhalb der CENP-B-Cluster und umgekehrt wurden bestimmt (Abbildung 7.27, mittlere Reihe), für den Flächenanteil von CENP-A innerhalb von CENP-B ergibt sich im Mittel 22% (27% Standardabweichung), für den Flächenanteil von CENP-B-Clustern innerhalb von CENP-A-Clustern ergibt sich 68% (Standardabweichung 35%). Vergleicht man die Gesamtfläche eines CENP-B-Clusters mit dem zugehörigen CENP-A-Cluster, so ergibt sich für das Verhältnis  $\frac{A_{CENP-A}}{A_{CENP-B}} = 0,20$  (Standardabweichung 0,25). Für die Distanz der Clusterschwerpunkte erhält man im Mittel einen Wert von  $\bar{d} = 172nm$  (Standardabweichung 85nm).

Die Nachbarschaftsverhältnisse sind in Abbildung 7.28 zusammengefasst. In der oberen Reihe sind die Histogramme für die Abstände zum jeweils nächsten Nachbarn der anderen Molekülsorte gezeigt. Für die Verteilung der Abstände einer CENP-B-Position zur nächsten CENP-A-Position ergab sich ein Mittelwert von 93nm (Standardabweichung 77nm), für die Verteilung der Abstände einer CENP-A-Position zur nächsten CENP-B-Position ein Mittelwert von 42nm (Standardabweichung 47nm). Die Anzahl benachbarter Signale des jeweils anderen Typs wurde mit Hilfe des Skriptes 'Zweifarbennachbarn' (Abschnitt 7.28) in einem Umkreis von 50nm bestimmt (untere Reihe der Abbildung 7.28). Um jede CENP-B-Position befinden sich innerhalb dieses Radius im Mittel 5,3 CENP-A-Positionen (Standardabweichung 6,7), um jedes CENP-A im Mittel 6,9 CENP-B Positionen (Standardabweichung 7,3).

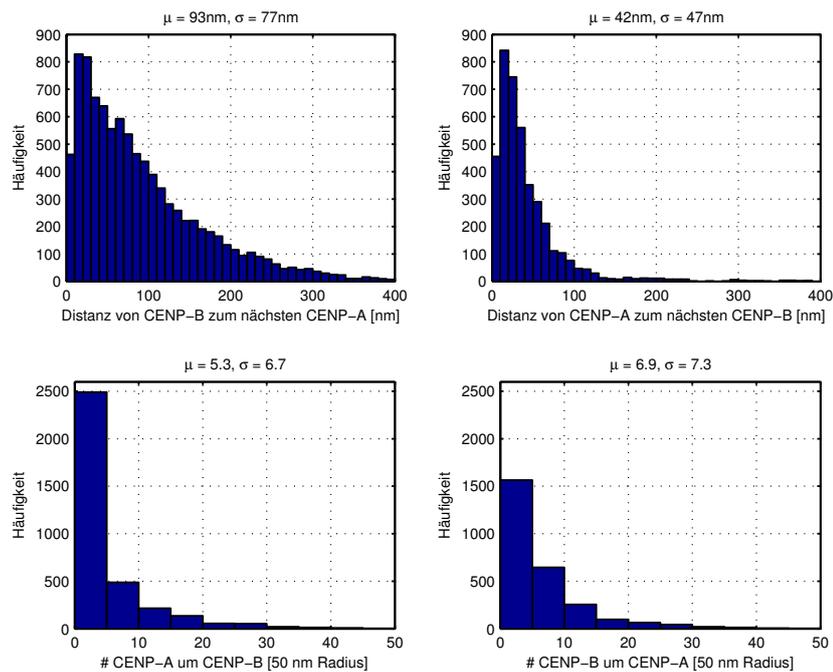


**Abbildung 7.26:** Zweifarben-Aufnahmen von mRFP-CENP-A (rot) und eGFP-CENP-B (grün) in menschlichen HEp2-Zellen. Oben links: Überlagerung der beiden Weitfeldaufnahmen. Maßstab:  $1\mu\text{m}$ . Darunter: Überlagerung der Lokalisationsbilder, gleicher Maßstab. Unten links: Maske der gefundenen Cluster. Rechts: Vergrößerungen der durch die weiße Box angedeutete Region. Maßstab 100 nm. Oben das Weitfeldbild, darunter ein simuliertes Weitfeldbild aus den Lokalisationsdaten. Darunter eine Maske der gefundenen Cluster, die CENP-A-Positionen sind als magenta Kreise und die CENP-B-Positionen als blaue Kreuze eingetragen. Unten: Lokalisationsbild mit Repräsentation der Ungenauigkeit durch eine 2D-Gaußfunktion.



**Abbildung 7.27:** Obere Reihe: Verhältnis der Anzahl der Centromerproteine innerhalb der Cluster. Mittlere Reihe: Flächenanteil des CENP-A-Clusters innerhalb des CENP-B-Clusters und umgekehrt. Unten links: Größenverhältnis der CENP-A-Cluster zu den zugehörigen CENP-B-Clustern. Unten rechts: Distanz der zugehörigen Clusterschwerpunkte.

### 7.3 Untersuchung von Proteinverteilungen im menschlichen Kinetochor



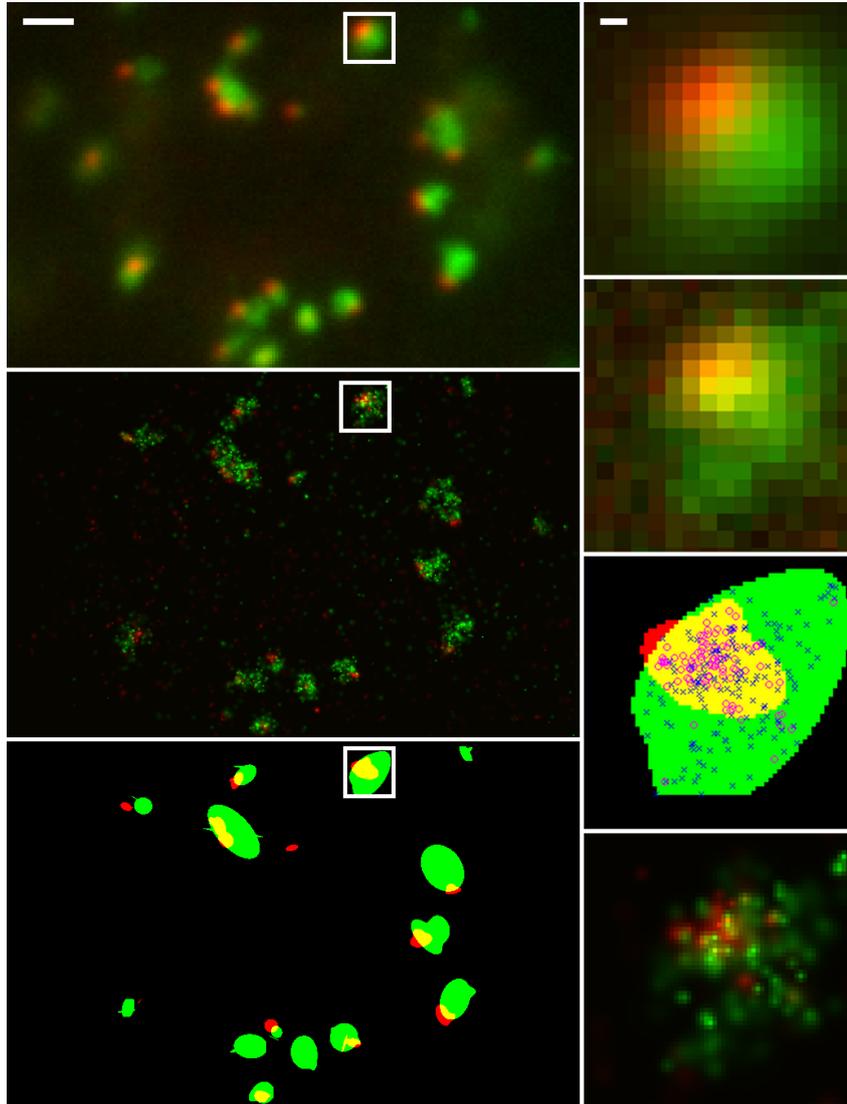
**Abbildung 7.28:** Obere Reihe: Histogramm der Entfernung einer CENP-B-Position zur nächsten CENP-A-Position und umgekehrt innerhalb aller CENP-A- und CENP-B-Cluster. Untere Reihe: Verteilung der Anzahl der zu jeder CENP-B-Position benachbarten Positionen von CENP-A. Als Radius für die Nachbarschaftsumgebung wurde eine Entfernung von maximal  $50\text{nm}$  gewählt.

**CENP-A - CENP-B mit Korrektur**

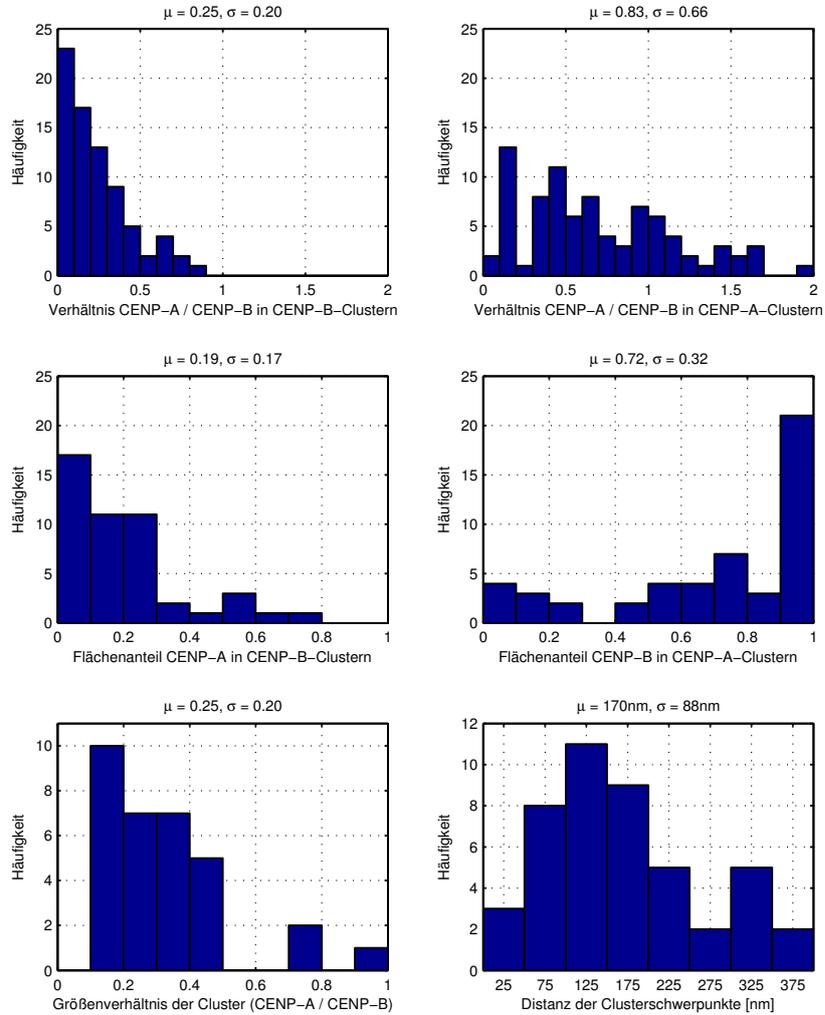
Für vier weitere Zellkerne wurde vor den Lokisationsaufnahmen eine Referenzmessung durchgeführt, so dass eine Korrektur des Versatzes zwischen den beiden Farbkanälen wie in Abschnitt 5.3.5 beschrieben möglich war. Präparat und Aufnahmebedingungen waren die gleichen wie im Fall ohne Referenzmessung (siehe vorherigen Abschnitt). Ein Beispiel ist in Abbildung 7.29 dargestellt. In der linken Spalte ist oben die Überlagerung der beiden Weitfeldbilder für mRFP-CENP-A (rot) und eGFP-CENP-B (grün) dargestellt, in der Mitte das entsprechende Lokalisationsbild (die Lokalisationsgenauigkeit ist durch eine Gauß-Verteilung repräsentiert, deren Standardabweichung der mittleren Lokalisationsgenauigkeit entspricht), unten sind die ermittelten Clusterflächen eingefärbt. In der rechten Spalte ist oben die Vergrößerung des weiß markierten Bereiches des Weitfeldbildes zu sehen, als zweites der gleiche Bereich als anhand der Lokalisationsdaten simuliertes Weitfeldbild, als drittes die ermittelten Clusterflächen des gleichen Bereiches in rot (mRFP-CENP-A) und grün (eGFP-CENP-B), die Signalpositionen sind für mRFP-CENP-A als magenta Kreise und für eGFP-CENP-B als blaue Kreuze eingetragen. Unten ist der gleiche Bereich als Vergrößerung aus dem Lokalisationsbild dargestellt.

Für das Verhältnis der Signalanzahlen von CENP-A zu CENP-B innerhalb der CENP-B-Cluster ergibt sich im Mittel ein Wert von 0,25 mit einer Standardabweichung von 0,20, für das gleiche Verhältnis innerhalb der Cluster von CENP-A ein Mittelwert von 0,83 mit einer Standardabweichung von 0,66 (siehe Abbildung 7.30, obere Reihe). Das Verhältnis der Clusterflächen von CENP-A zu CENP-B innerhalb der jeweiligen Cluster ist in der mittleren Reihe von Abbildung 7.30 dargestellt. Für CENP-B ergibt sich ein Mittelwert von 0,19 (Standardabweichung 0,17), für CENP-A ein Mittelwert von 0,72 (Standardabweichung 0,32). Die relative Größe (Verhältnis der Flächen zugehöriger CENP-A- und CENP-B-Cluster  $\frac{A_{CENP-A}}{A_{CENP-B}}$ ) beträgt im Mittel 0,25, mit einer Standardabweichung von 0,20 (siehe Abbildung 7.30 unten rechts). Die Entfernung zweier zugehöriger Clusterschwerpunkte von CENP-A und CENP-B innerhalb eines Kinetochors beträgt im Mittel  $170nm$  mit einer Standardabweichung von  $88nm$ .

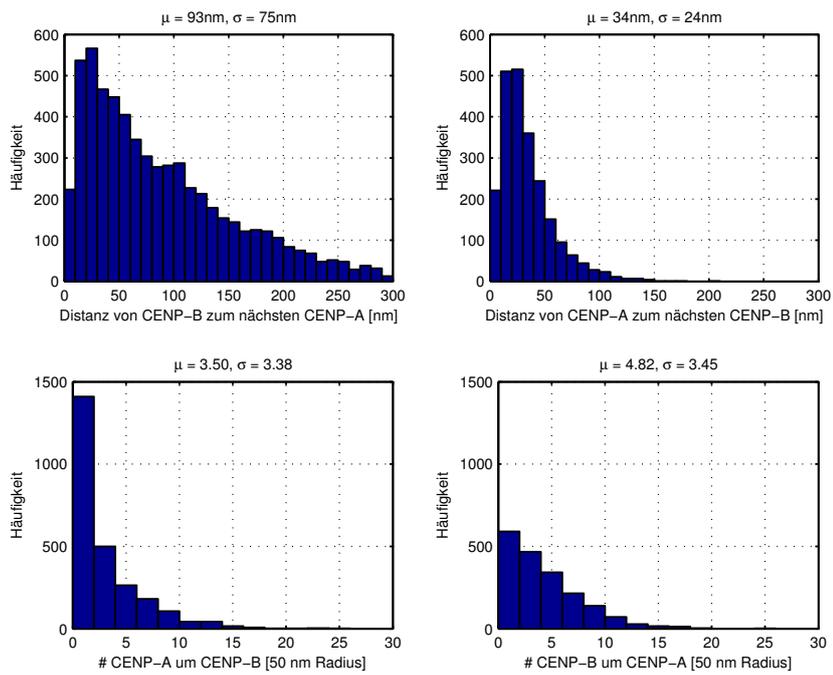
Die Analyse der Nachbarschaftsverhältnisse ergibt, dass das die nächste benachbarte Position eines CENP-A-Signals von einem CENP-B-Signal aus im Mittel  $93nm$  entfernt ist, die Standardabweichung dieser Verteilung beträgt  $75nm$ . Im umgekehrten Fall beträgt die mittlere Entfernung  $34nm$ , mit einer Standardabweichung von  $24nm$  (Abbildung 7.31, obere Reihe). Die Anzahl der CENP-A-Signalpositionen um jede CENP-B-Position in einem Umkreis von  $50nm$  beträgt im Mittel 3,50 mit einer Standardabweichung von 3,38, die der CENP-B-Signalpositionen um jede CENP-A-Position 4,82 (Standardabweichung 3,54). Die entsprechenden Verteilungen sind in der unteren Reihe von Abbildung 7.31 dargestellt.



**Abbildung 7.29:** Zweifarben-Aufnahmen von mRFP-CENP-A (rot) und eGFP-CENP-B (grün) in menschlichen HEp2-Zellen. Oben links: Überlagerung der beiden Weitfeldaufnahmen. Maßstab:  $1\mu\text{m}$ . Darunter: Überlagerung der Lokalisationsbilder, gleicher Maßstab. Unten links: Maske der gefundenen Cluster. Rechts: Vergrößerungen der durch die weiße Box angedeutete Region. Maßstab 100 nm. Oben das Weitfeldbild, darunter ein simuliertes Weitfeldbild aus den Lokalisationsdaten. Darunter eine Maske der gefundenen Cluster, die CENP-A-Positionen sind als magenta Kreise und die CENP-B-Positionen als blaue Kreuze eingetragen. Unten: Lokalisationsbild mit Repräsentation der Ungenauigkeit durch eine 2D-Gaußfunktion.



**Abbildung 7.30:** Obere Reihe: Verhältnis der Anzahl der Centromerproteine innerhalb der Cluster. Mittlere Reihe: Flächenanteil des CENP-A-Clusters innerhalb des CENP-B-Clusters und umgekehrt. Unten links: Größenverhältnis der CENP-A-Cluster zu den zugehörigen CENP-B-Clustern. Unten rechts: Distanz der zugehörigen Clusterschwerpunkte.

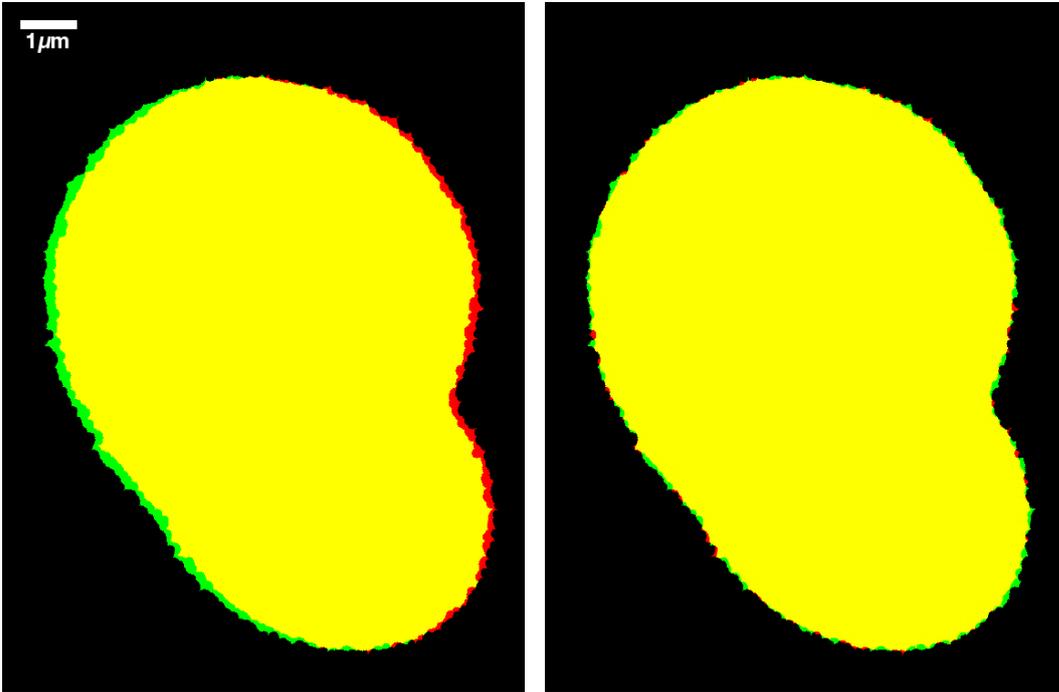


**Abbildung 7.31:** Obere Reihe: Histogramm der Entfernung einer CENP-B Position zur nächsten CENP-A-Position und umgekehrt innerhalb aller CENP-A und CENP-B-Cluster. Untere Reihe: Verteilung der Anzahl der zu jeder CENP-B-Position benachbarten Positionen von CENP-A. Als Radius für die Nachbarschaftsumgebung wurde eine Entfernung von maximal  $50\text{nm}$  gewählt.

## 7.4 Die Verteilung von Histon-Protein H2A und DNA-Remodeler SNF2h

Mit Hilfe der Zweifarben-Lokalisationsmikroskopie lässt sich die Organisation der DNA im Nukleus eukariotischer Zellen untersuchen [GER<sup>+</sup>09]. Diese wird von Histon-Proteinen zum Chromatin gepackt. Eines der zentralen Elemente des Chromatins ist das Nukleosom, ein Oktamer aus je zwei Kopien der Histon-Proteine H2A, H2B, H3 und H4. Die Histon-Proteine sind im Nukleosom derart angeordnet, dass sich eine zylindrische Form mit  $11\text{nm}$  Durchmesser und  $5\text{nm}$  Höhe ergibt. Um diese ist die DNA mit 1,67 Umdrehungen gewunden [LMR<sup>+</sup>97, WG10]. Die Nukleosomen können von von biomolekularen Maschinen, dem *chromatin remodeling complex* [BH02, Cai07], entlang der DNA unter ATP-Hydrolyse verlagert werden. Um mit Methoden der Lokalisationsmikroskopie zu untersuchen, wie diese *chromatin remodeling complexes* um die DNA verteilt sind, wurden in menschlichen U2OS-Zellen das Histonproteins H2A und die ATPase Untereinheit SNF2h [RSR<sup>+</sup>07, LB01, CPK<sup>+</sup>02] des *chromatin remodeling complex* fluoreszenzmarkiert. Hierzu wurden diese Proteine als Fusionsproteine H2A-mRFP1 und SNF2h-GFP exprimiert. Die Lokisationsaufnahmen für die beiden Markierungen wurden sequentiell ausgeführt. Zunächst wurde die Probe mit Licht der Wellenlänge  $\lambda_{ex} = 568\text{nm}$  mit einer Leistungsdichte von  $P/A \approx 50\text{kW/cm}^2$  bestrahlt. Als Filter wurde der Tripel-Bandpass-Filter (siehe Abschnitt 4.1) gewählt. Bei einer Integrationszeit von  $60\text{ms}$  wurden so lange Datenstapel mit 1500 aufeinanderfolgenden Einzelaufnahmen erzeugt, bis das Aufleuchten einzelner Moleküle in der Probe bis auf wenige ( $< 5$ ) Ereignisse pro Einzelbild abgenommen hatte. Dann wurde der optische Filter im auf den GFP-Bandpass-Filter (siehe Abschnitt 4.1) gewechselt und die Probe mit Licht der Wellenlänge  $\lambda_{ex} = 488\text{nm}$  mit einer Leistungsdichte von  $P/A \approx 40\text{kW/cm}^2$  beleuchtet. Erneut wurden Datenstapel mit 1500 aufeinanderfolgenden Einzelaufnahmen bei einer Integrationszeit von  $60\text{ms}$  erzeugt, bis weniger als etwa 5 Einzelmolekülsignale pro Einzelbild erkennbar waren.

Die so entstandenen Aufnahmen wurden wie in Abschnitt 5 beschrieben analysiert. Aufgrund der hohen Punktdichte in den Lokalisationsbildern konnte der Rand des Zellkerns sehr genau bestimmt werden. Hierzu wurde mit dem Skript 'Nachbarlabel' die Anzahl der benachbarten Signale (näher als  $100\text{nm}$ ) für jeden Punkt bestimmt und manuell ein Schwellwert gesetzt, so dass die Signale im innern des Zellkerns erhalten blieben. Dann wurde eine morphologische Schließung [Jäh05] durchgeführt mit einem Radius, welcher in etwa dem doppelten mittleren Signalabstand entsprach. Hierdurch konnte die Fläche, welche die einzelnen Zellkerne im Lokalisationsbild einnehmen, sehr gut bestimmt werden. Dies ermöglichte es, die Ergebnisse zweier aufeinanderfolgender Messungen aufeinander anzugleichen. Der kombinierte mechanische und chromatische Versatz zweier Messungen der gleichen Struktur



**Abbildung 7.32:** Typisches Beispiel für den chromatischen und mechanischen Versatz bei der sequentiellen Lokisationsaufnahme zweier unterschiedlicher Spektren im gleichen Zellkern. Die Verteilungen von H2A-mRFP (rot) und SNF2h-GFP (grün) wurden in ein Lokisationsbild eingetragen. Durch eine morphologische Schließung wurde je eine Maske erstellt. Links ist die Überlagerung der beiden Masken vor, rechts nach der Korrektur der Verschiebung dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass sich die beiden Strukturen entsprechen. In diesem Fall betrug der kombinierte chromatische und mechanische Versatz  $130\text{nm}$  in X- und  $16\text{nm}$  in Y-Richtung, also insgesamt  $131\text{nm}$ .

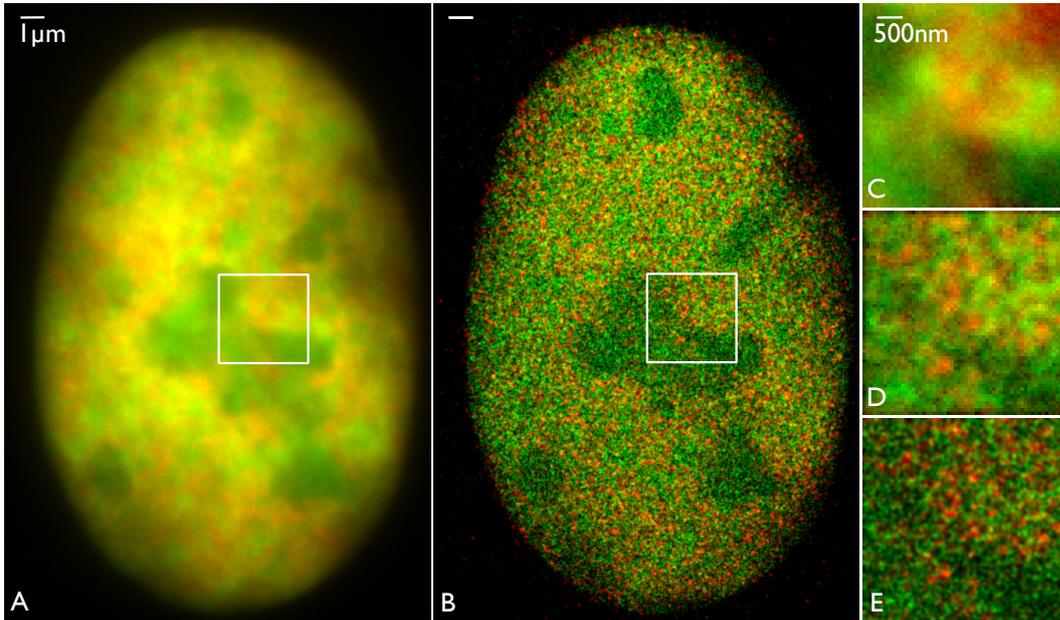
konnte somit bestimmt und ausgeglichen werden (siehe auch Abbildung 7.32). In Tabelle 7.5 sind in der ersten Zeile die Anzahl der im jeweiligen Zellkern ermittelten H2A-Histonproteine  $N_{H2A}$ , in der zweiten Zeile die Anzahl der SNF2h-Proteine  $N_{SNF2h}$ , in der dritten Zeile die Fläche des Zellkerns  $A_{Zellkern}$  in  $\mu\text{m}^2$ , in der vierten Zeile die mittlere Lokisationsgenauigkeit der ermittelten H2A-Signalpositionen  $\sigma_{H2A}$  und in der fünften Zeile die mittlere Lokisationsgenauigkeit der ermittelten SNF2h-Signalpositionen  $\sigma_{SNF2h}$  eingetragen. Als Wert für die mittleren Lokisationsgenauigkeiten wurde der Mittelwert der jeweiligen Verteilung und als Fehler deren Standardabweichung angegeben. In der sechsten Spalte ist die Signaldichte  $\rho_{H2A}$  der

**Tabelle 7.5:** Zusammenfassung der Ergebnisse für die einzelnen Zellkerne.

	Zellkern	1	2	3	4	5
1	$N_{H2A}$	63769	62372	51884	34469	96024
2	$N_{SNF2h}$	310263	61115	42762	122096	92355
3	$A_{Zellkern}[\mu m^2]$	336	373	295	186	243
4	$\sigma_{H2A}$	44,7 $\pm 13,7$	34,5 $\pm 9,4$	24,1 $\pm 4,8$	26,8 $\pm 6,8$	20,5 $\pm 5,4$
5	$\sigma_{SNF2h}$	29,0 $\pm 12,5$	28,0 $\pm 10,0$	23,4 $\pm 8,1$	19,6 $\pm 9,2$	20,5 $\pm 9,1$
6	$\rho_{H2A}[\mu m^{-2}]$	190	167	176	185	395
7	$\rho_{SNF2h}[\mu m^{-2}]$	923	164	145	656	380

H2A-Signale im Zellkern eingetragen, in der siebten die der SNF2h-Signale  $\rho_{SNF2h}$ . Auffällig ist, dass die Signaldichte nicht konstant ist, wobei die Dichte der SNF2h-Signale wesentlich breiter gestruet ist als die der H2A-Signale. Dies kann durch unterschiedliche Effizienz bei der Expression der jeweiligen Fusionsproteine erklärt werden. Die Lokalisationsgenauigkeit für die Fluoreszenzsignale der GFP-Moleküle ist besser als die der mRFP-Moleküle, da von diesen mehr Photonen emittiert wurden (siehe Abschnitt 3.1). Auch ist zu beobachten, dass die mittleren Lokalisationsgenauigkeiten für die beiden Fluorophortyp variieren, wobei jedoch die Lokalisationsgenauigkeiten für GFP stets besser als diejenigen für mRFP sind. Dies könnte durch unterschiedliche axiale Positionen der gewählten Fokusebene bedingt werden, da sich bei Brechungsindexunterschieden die effektive numerische Apertur verkleinert je tiefer die Fokusebene in der Probe liegt, wodurch sich die Anzahl der detektierten Photonen für jedes Fluorophor verringert und damit die Positionsbestimmung ungenauer wird.

Anhand der korrigierten Daten wurden verschiedene Nachbarschaftsanalysen durchgeführt. Die Anzahl der benachbarten Signale gleicher Markierung innerhalb eines Radius von  $100nm$  wurden für die Verteilungen der SNF2h- und der H2A-Signale bestimmt. Dies ist beispielhaft in Abbildung 7.34a gezeigt. Zusätzlich wurde die gleiche Anzahl an SNF2h- und H2A-Signale zufällig über den gesamten Zellkern verteilt, dessen Fläche wie zuvor bei der Bestimmung des chromatischen und mechanischen Versatzes ermittelt wurde und auch für diese Verteilungen die Anzahl benachbarter Signale gleichen Typs innerhalb einer  $100nm$ -Umgebung ermittelt. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 7.34b dargestellt. Die Anzahl benachbarter Signale des jeweils anderen Typs innerhalb einer  $100nm$ -Umgebung wurden für die reale Verteilung und die simulierte zufällige Gleichverteilung bestimmt (als Beispiel siehe Abbil-



**Abbildung 7.33:** Typisches Beispiel für einen Zellkern einer menschlichen U2OS-Zelle, in welchem die Fusionsproteine H2A-mRFP (rot dargestellt) und SNF2h-GFP (grün dargestellt) exprimiert wurden. A: Zweifarben-Epifluoreszenzbild. B: Rekonstruktion der Lokisationsaufnahme. Die einzelnen Positionen wurden durch Gauß-Verteilungen dargestellt, deren Standardabweichung der mittleren Lokisationsgenauigkeit des jeweiligen Molekültyps entspricht. Insgesamt wurden in diesem Zellkern mit einer Fläche von  $337\mu\text{m}^2$  310 263 SNF2h-Positionen mit einer mittleren Genauigkeit von  $29\text{nm}$  und 63769 H2A-Positionen mit einer mittleren Genauigkeit von  $45\text{nm}$  ermittelt. C: Vergrößerung des in A markierten Ausschnitts. D: Anhand der Lokisationsdaten simuliertes Weitfeldbild des gleichen Ausschnitts wie in C. E: der gleiche Ausschnitt wie C und D aus dem Lokisationsbild B.

dung 7.34c und d). Für beide Verteilungen wurde der Abstand jedes Signalpunktes zum nächsten Signalpunkt der jeweils anderen Markierung, also der Abstand eines H2A-Signals zum nächstgelegenen SNF2h-Signal und umgekehrt bestimmt (beispielfhaft in Abbildung 7.34e und f gezeigt). Die Ergebnisse dieser Messungen für fünf aufgenommene Zellkerne sind in Tabelle 7.6 zusammengestellt, die Ergebnisse für die gleichverteilte Anzahl an Signalpunkten über die Fläche des jeweiligen Zellkerns in Tabelle 7.7. In der ersten Zeile ist der Mittelwert  $\bar{N}_{H2A}$  der Verteilung der Anzahl benachbarter H2A-Signale im  $100\text{nm}$ -Umkreis um jede H2A-Position eingetragen, in der zweiten Zeile die zugehörige Standardabweichung  $\sigma_{N_{H2A}}$ . Zeilen drei und vier

**Tabelle 7.6:** Nachbarschaftsverhältnisse der experimentell ermittelten H2A- und SNF2h-Positionen.

	Zellkern	1	2	3	4	5
1	$\bar{N}_{H2A}$	10.54	9.01	10.56	11.44	18.72
2	$\sigma_{N_{H2A}}$	5.03	4.76	6.10	5.89	7.37
3	$\bar{N}_{SNF2h}$	41.04	8.25	8.41	29.53	16.71
4	$\sigma_{N_{SNF2h}}$	13.16	4.09	4.52	9.88	5.94
5	$\bar{N}_{SNF2humH2A}$	39.41	6.54	5.70	27.39	14.76
6	$\sigma_{N_{SNF2humH2A}}$	13.41	3.85	3.73	9.57	5.48
7	$\bar{N}_{H2AumSNF2h}$	8.25	6.94	6.69	8.05	15.40
8	$\sigma_{N_{H2AumSNF2h}}$	4.71	4.28	4.74	5.27	7.06
9	$\bar{d}_{nextSNF2h}$	18.32	48.73	57.21	23.92	30.02
10	$\sigma_{d_{nextSNF2h}}$	23.16	42.34	53.49	40.64	29.19
11	$\bar{d}_{nextH2A}$	41.01	46.29	55.62	46.53	32.25
12	$\sigma_{d_{nextH2A}}$	30.13	41.91	59.15	46.04	39.91

enthalten das gleiche für die Verteilung der SNF2h-Signale ( $\bar{N}_{SNF2h}$  und  $\sigma_{N_{SNF2h}}$ ). In den Zeilen fünf und sechs sind Mittelwert ( $\bar{N}_{SNF2humH2A}$ ) und Standardabweichung ( $\sigma_{N_{SNF2humH2A}}$ ) der Verteilung der Anzahl benachbarter SNF2h-Positionen im 100nm-Umkreis um jede H2A-Position eingetragen, in Zeile sieben und acht Mittelwert ( $\bar{N}_{H2AumSNF2h}$ ) und Standardabweichung ( $\sigma_{N_{H2AumSNF2h}}$ ) der Verteilung der Anzahl benachbarter H2A-Positionen im 100nm-Umkreis um jede SNF2h-Position. Zeile neun enthält den Mittelwert der Verteilung der Distanzen von jeder H2A-Position zur nächsten SNF2h-Position ( $\bar{d}_{nextSNF2h}$ ), Zeile zehn die Standardabweichung ( $\sigma_{d_{nextSNF2h}}$ ) dieser Verteilung, Zeile elf den Mittelwert der Verteilung der Distanzen von jeder SNF2h-Position zur nächsten H2A-Position ( $\bar{d}_{nextH2A}$ ) und Zeile zwölf deren Standardabweichung ( $\sigma_{d_{nextH2A}}$ ).

Aus dem Vergleich der realen Verteilungen mit den zufälligen Verteilungen der Signalpositionen über die gleiche Zellkernfläche kann man den Schluss ziehen, dass die H2A- und die SNF2h-Signalpositionen nicht zufällig im Zellkern verteilt sind, sondern in gewissen Regionen dichter gepackt vorliegen. Hierfür spricht die Zunahme der Anzahl benachbarter Signalpositionen in einem 100nm-Umkreis (gleichbedeutend mit einer lokalen Flächendichte) sowohl für die Population der H2A-Signale ( $\bar{N}_{H2A}$ ) als auch für die der SNF2h-Signale ( $\bar{N}_{SNF2h}$ ), wenn man diese mit der Gleichverteilung über den ganzen Zellkern vergleicht. Außerdem nimmt die Breite der jeweiligen Verteilung ( $\sigma_{N_{H2A}}$  und  $\sigma_{N_{SNF2h}}$ ), verglichen mit der zufälligen Verteilung zu, woran man ebenfalls die erhöhte Heterogenität in der Verteilung der realen

**Tabelle 7.7:** Nachbarschaftsverhältnisse für simulierte gleichverteilte Signalpositionen innerhalb der gleichen Zellkerne wie in Tabelle 7.6 aufgeführt. Die Anzahl der zufälligen Positionen entspricht dabei der Anzahl der tatsächlich im Zellkern ermittelten Positionen.

	Zellkern	1	2	3	4	5
1	$\bar{N}_{H2A}$	8.34	7.54	7.88	8.19	16.41
2	$\sigma_{N_{H2A}}$	2.69	2.59	2.65	2.67	3.97
3	$\bar{N}_{SNF2h}$	36.94	7.37	6.64	26.58	15.81
4	$\sigma_{N_{SNF2h}}$	6.19	2.57	2.40	5.20	3.91
5	$\bar{N}_{SNF2humH2A}$	36.06	6.40	5.68	25.69	14.86
6	$\sigma_{N_{SNF2humH2A}}$	6.17	2.54	2.37	5.23	3.90
7	$\bar{N}_{H2AumSNF2h}$	7.42	6.53	6.88	7.26	15.45
8	$\sigma_{N_{H2AumSNF2h}}$	2.70	2.58	2.64	2.67	3.98
9	$\bar{d}_{nextSNF2h}$	16.54	39.24	41.68	19.64	25.75
10	$\sigma_{d_{nextSNF2h}}$	8.66	20.42	21.67	13.57	13.47
11	$\bar{d}_{nextH2A}$	36.39	39.09	38.02	36.68	25.22
12	$\sigma_{d_{nextH2A}}$	19.06	21.64	19.84	19.21	13.17

lokalen Dichten gegenüber der zufälligen Verteilung feststellen kann.

Während die Anzahl der benachbarten Signale des jeweils anderen Molekültyps ( $\bar{N}_{SNF2humH2A}$  und  $\bar{N}_{H2AumSNF2h}$ ) im gleichen Bereich liegt, wie dies bei einer zufälligen Verteilung der Fall ist, nimmt der mittlere Abstand zum nächsten Signal des jeweils anderen Molekültyps ( $\bar{d}_{nextSNF2h}$  und  $\bar{d}_{nextH2A}$ ) verglichen mit einer zufälligen Verteilung zu, gleichzeitig wird diese Verteilung breiter als dies für gleichverteilte Positionen der Fall wäre ( $\sigma_{d_{nextH2A}}$  und  $\sigma_{d_{nextSNF2h}}$ ).

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests kann man überprüfen, ob die realen und die simulierten Verteilungen übereinstimmen. Hierfür wurde die Nullhypothese 'die Verteilungen stimmen überein' mit einem Signifikanzlevel von  $\alpha = 0,001$  (oder 0,1%) überprüft. In jedem Fall wurde die Hypothese abgewiesen, der Signifikanzwert (p-Wert) lag immer bei  $p = 0$ . Dies bedeutet, dass die experimentell ermittelten Verteilungen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht übereinstimmen. Als Maß für die Abweichung von der simulierten Verteilung kann die maximale Abweichung der normierten kumulativen Verteilungsfunktionen für die reale und die simulierte Signalverteilung innerhalb der Zellkerne genommen werden. Diese Werte sind in Tabelle 7.8 eingetragen. Hieran kann man erkennen, dass die Signalverteilungen der Positionen im gesamten Zellkern am stärksten von der Zufallsverteilung abweichen, wobei die Abweichung im Fall der H2A-Signale am stärksten ist. Die Verteilung der

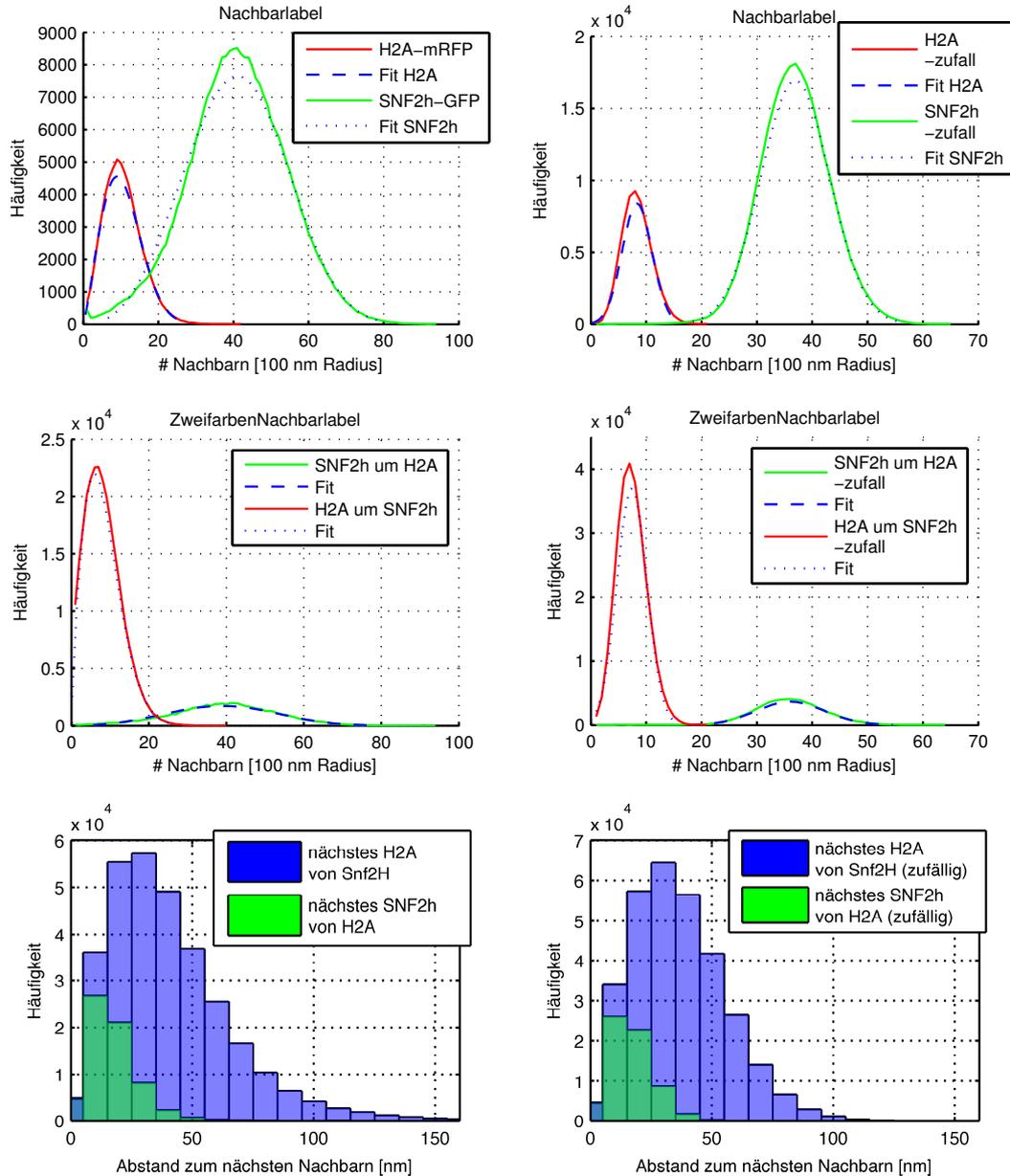
**Tabelle 7.8:** Maximaler Abstand zwischen den normierten kumulativen Verteilungsfunktionen der realen und der simulierten Verteilung.

	Zellkern	1	2	3	4	5
1	H2A	0,2623	0,2024	0,2776	0,3512	0,2299
2	SNF2h	0,2820	0,1543	0,2370	0,2459	0,1256
3	SNF2h um H2A	0,2658	0,1242	0,1463	0,1915	0,0955
4	H2A um SNF2h	0,1564	0,1193	0,2006	0,1750	0,1553
5	nächstes SNF2h (von H2A aus)	0,0296	0,1080	0,1494	0,0583	0,0432
6	nächstes H2A (von SNF2h aus)	0,0683	0,0822	0,1763	0,0818	0,1147

benachbarten Signalpositionen des jeweils anderen Signaltyps weicht immer noch stark von der Zufallsverteilung ab, jedoch nicht so stark wie die Verteilung im gesamten Zellkern. Die Distanz zur nächsten Signalposition unterscheidet sich immer noch signifikant von einer Zufallsverteilung, hier sind die Abweichungen jedoch am geringsten.

Aus all diesen Ergebnissen kann man schliessen, dass SNF2h und H2A nicht zufällig im Zellkern verteilt sind (erhöhte Heterogenität der jeweiligen Flächendichte gegenüber einer Zufallsverteilung), wobei sie gemeinsam in den gleichen globalen Strukturen vorliegen (Anzahl der Signale des jeweils anderen Typs in einer  $100nm$ -Umgebung ist vergleichbar mit der einer Zufallsverteilung der Signale im Zellkern). Gleichzeitig ist zu beobachten, dass sie nicht kolokalisieren, sondern einen gewissen Abstand zueinander wahren (größerer Abstand zum nächsten Nachbarn des anderen Signaltyps verglichen mit der Zufallsverteilung).

## 7.4 Die Verteilung von Histon-Protein H2A und DNA-Remodeler SNF2h



**Abbildung 7.34:** Beispiele für verschiedene Nachbarschaftsverhältnisse des in Abbildung 7.33 gezeigten Zellkerns. Auf der linken Seite sind jeweils die Auswertungen der realen Verteilung, rechts die für die zufällige Signalverteilung gezeigt. Obere Reihe: Anzahl der in einer 100nm-Umgebung enthaltenen Signalpositionen gleichen Typs. Mittlere Reihe: Anzahl der in einer 100nm-Umgebung um jede Signalposition enthaltenen Signalpositionen des anderen Typs. Untere Reihe: Abstand von jeder Signalposition zur nächsten Signalposition des jeweils anderen Typs.

## 7.5 Die Verteilung von RNA-Polymerase II und Histonprotein H2B

Um zu untersuchen, an welchen Stellen die Transkription im Zellkern erfolgt und wie die Verteilung der dabei beteiligten Proteine ist, wurde die Verteilung der RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) und des Histonproteins H2B im Nukleus von HeLa-Zellen mit Zweifarben-Lokalisationsmikroskopie untersucht [MGS<sup>+</sup>ss]. H2B ist ein weiterer Bestandteil des Nukleosoms, wie in Abschnitt 7.4 beschrieben. RNA-Polymerasen katalysieren die Synthese von RNA bei der Transkription der DNA, wobei RNA-Pol II die Bildung von prä-mRNA, snoRNA und einiger snRNA katalysiert. RNA-Pol II besteht hauptsächlich aus den zwei Untereinheiten RPB1 und RPB2 und zehn weiteren Untereinheiten [JIMC98, KSC02]. Die carboxylterminale-Domäne (CTD) der RPB1 Untereinheit besteht aus multiplen Heptapeptid- Wiederholungen (52 in Säugetierzellen) der Aminosäuresequenz Y-S-P-T-S-P-S. An der CTD erfolgen posttranslationale Modifizierungen, unter anderem auch die Phosphorylierung der Aminosäure Serin 2 und Serin 5. Verschieden Phosphorylierungszustände repräsentieren verschiedene Stufen und Ereignisse im Transkriptionszyklus. Bei der primären Form von RNA-Pol II ist beispielsweise Serin 5 phosphoryliert (Ser5P) und bindet an die Promotor-Sequenz von Genen, während bei der verlängerten (aktiven) Form Serin 2 stärker phosphoryliert ist (Ser2P). Nach der Transkription wird die Phosphorylierung von Serin 5 durch die Serin 5-Phosphatase Rtr1 entfernt [MPC<sup>+</sup>09], während Ser2P RNA-Pol II am 3'-Ende des Gens akkumuliert. Für diese Untersuchungen wurde RNA-Pol II verwendet, bei der Serin 5 phosphoryliert war. Ziel der Experimente war es, die Verteilung von RNA-Pol II im Zellkern zu bestimmen und dabei auch zu untersuchen, ob es zur Ausbildung von RNA-Pol-II-Clustern kommt und gegebenenfalls deren Größe zu bestimmen. Die Präparate wurden von Yolanda Markaki aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Cremer am Biozentrum der Ludwig-Maximilians-Universität in München angefertigt. In menschlichen HeLa-Zellen wurde das Fusionsprotein H2B-GFP stabil exprimiert, Ser5P-RNA-Pol II wurde durch Immunfärbung mit primären und sekundären Antikörpern markiert, wobei der sekundäre Antikörper mit Alexa 568 fluoreszenzmarkiert war. Die Aufnahmen erfolgten auf die gleiche Weise wie in Abschnitt 7.4 beschrieben, mit einer Ausgangsleistung am  $Kr^+$ -Ionen-Laser bei  $\lambda_{ex} = 568nm$  von  $P_{\lambda_{ex}} = 150mW$  (Leistungsdichte in der Probe:  $P/A \approx 17kW/cm^2$ ) und einer Ausgangsleistung am  $Ar^+$ -Ionen-Laser bei  $\lambda_{ex} = 488nm$  von  $P_{\lambda_{ex}} = 80mW$  (Leistungsdichte in der Probe:  $P/A \approx 9kW/cm^2$ ). Die Integrationszeit für die Aufnahmen mit Alexa 568 betrug  $t_A = 150ms$ , für GFP  $t_A = 60ms$ .

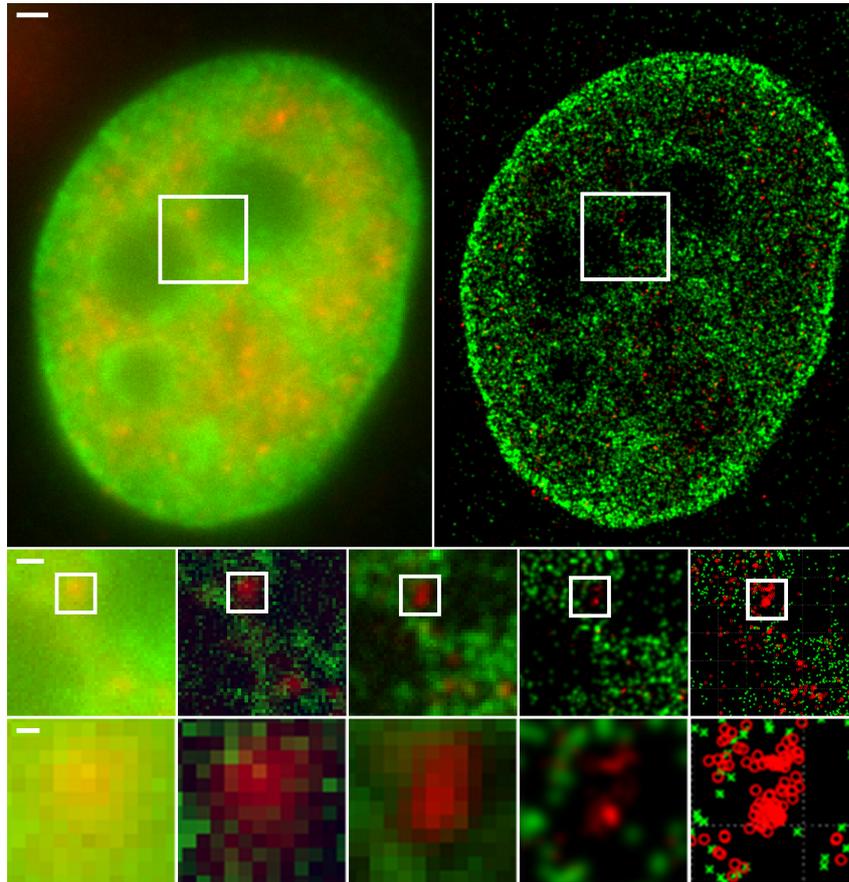
Es wurden sieben Zellkerne aufgenommen. Die Anzahl der pro Zellkern detektierten H2B- und RNA-Pol-II-Signale  $N_{H2B}$  und  $N_{RNA-PolII}$  sowie die mittleren Lokalisationsgenauigkeiten  $\bar{\sigma}_{H2B}$  und  $\bar{\sigma}_{RNA-PolII}$  und deren Standardabweichungen  $\sigma_{\sigma_{H2B}}$

**Tabelle 7.9:** Ergebnisse der Lokalisationsmessungen von sieben HeLa Zellkernen, in welchen RNA-Pol II mit Alexa 568 und H2B mit GFP fluoreszenzmarkiert war.

Zellkern #	1	2	3	4	5	6	7
$N_{H2B}$	23 731	24 706	24 927	23 670	21 795	23 981	22 248
$\bar{\sigma}_{H2B} [nm]$	27	26	32	34	28	33	27
$\sigma_{\sigma_{H2B}} [nm]$	9	9	12	12	10	12	9
$N_{RNA-PolII}$	18 982	18 210	13 876	16 854	14 955	11 854	19 751
$\bar{\sigma}_{RNA-PolII} [nm]$	23	24	24	24	23	22	20
$\sigma_{\sigma_{RNA-PolII}} [nm]$	7	8	8	7	7	7	6

und  $\sigma_{\sigma_{RNA-PolII}}$  sind in Tabelle 7.9 eingetragen. Ein typisches Beispiel ist in Abbildung 7.35 gezeigt. In der oberen Reihe ist links eine Überlagerung der beiden Weitfeldbilder zu sehen. Rechts daneben ist das Lokalisationsbild dieses Zellkerns im gleichen Maßstab. Als Pixelgröße wurde hier 16.25 nm gewählt (1/4 der Pixelgröße des Weitfeldbildes). Die Positionen wurde mit einem Gaußkernel gefaltet, dessen Standardabweichung der mittleren Lokalisationsgenauigkeit entspricht. Dies dient einerseits zur Veranschaulichung der Positionsungenauigkeit der individuellen Signale und andererseits zur besseren Strukturierung mit dem Auge. In der zweiten Reihe ist links der im Weitfeldbild markierte Ausschnitt vergrößert dargestellt. Rechts daneben ist der gleiche Bildausschnitt zu sehen, hier wurde allerdings mit einem Langpassfilter [Jäh05] das Hintergrundsignal abgezogen. Hierzu wurde das Weitfeldbild mit einem Gaußkernel gefaltet, dessen Standardabweichung 500 nm entsprach. Das Ergebnis wurde vom ursprünglichen Bild subtrahiert. In der Mitte ist ein aus den Lokalisationsdaten simuliertes Weitfeldbild (siehe Abschnitt 5.2.3) des gleichen Ausschnitts abgebildet. Daneben ist die entsprechende Vergrößerung aus dem Lokalisationsbild zu sehen und ganz rechts der gleiche Ausschnitt mit Markierungen für die einzelnen Signalpositionen. In der dritten Reihe sind weitere Vergrößerungen der in den Ausschnitten darüber markierten weißen Quadrate dargestellt.

Die Anzahl der in einer 100nm-Umgebung vorhandenen Signalpositionen sowohl des gleichen, als auch des jeweils anderen Typs wurden für jede Signalposition bestimmt. Die Ergebnisse sind beispielhaft in Abbildung 7.36 dargestellt und sind in Tabelle 7.10 zusammengefasst. In der ersten Zeile stehen die Mittelwerte der Verteilung der benachbarten RNA-Pol II-Signale innerhalb eines Radius von 100nm um jede RNA-Pol-II-Position  $\bar{N}_{PolII}$ , in der zweiten Zeile die Standardabweichung  $\sigma_{N_{PolII}}$  dieser Verteilung. In Zeile drei und vier ist das gleiche für die Verteilung der benachbarten H2B-Signale im 100nm-Umkreis um jede H2B-Signalposition eingetra-

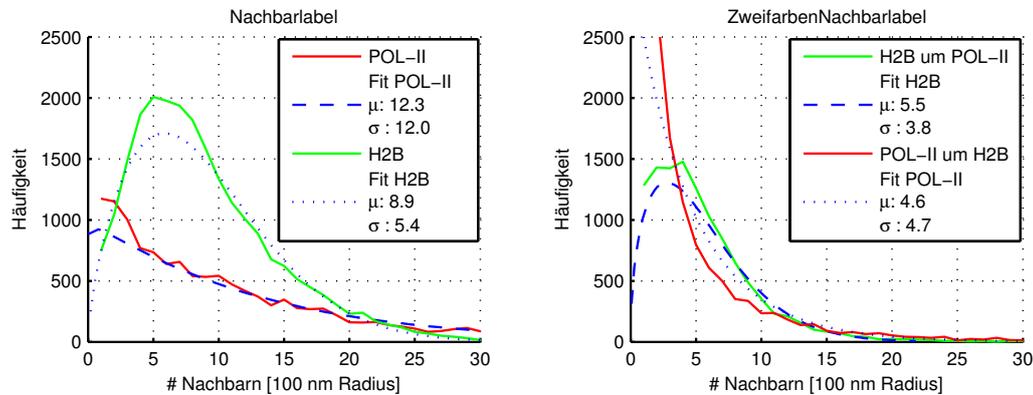


**Abbildung 7.35:** Beispiel für einen HeLa-Zellkern, in welchem das Fusionsprotein H2B-GFP stabil exprimiert wurde (in allen Bildern grün dargestellt) und zusätzlich die RNA-Polymerase-Protein Ser5P-RNA-Pol II durch Alexa 568-markierte Antikörper angefärbt wurde (in allen Bildern rot dargestellt). Obere Reihe: Überlagerung der Weitfeldbilder (links) und Lokalisationsbilder (rechts). Der Maßstab beträgt  $1\mu\text{m}$ . Mittlere Reihe: Vergrößerung des oben weiß umrandeten Bereiches (Maßstab 500 nm). 1. Bild: vergrößerter Ausschnitt. 2. Bild: das gleiche Bild, der Hintergrund wurde mit Hilfe eines Langpassfilters abgezogen. 3. Bild: aus den Lokalisationsdaten simuliertes Weitfeldbild. 4. Bild: Vergrößerung des Lokalisationsbildes. 5. Bild: Positionsbild ohne Repräsentation der Lokalisationsgenauigkeit die einzelnen Positionen sind als grüne Kreuze (H2B) und rote Kreise (RNA-Pol II) dargestellt. Untere Reihe: Vergrößerung des weiß umrandeten Bereiches im jeweiligen Bild darüber (Maßstab 100 nm).

gen ( $\bar{N}_{H2B}$  und  $\sigma_{N_{H2B}}$ ). Zeilen fünf und sechs enthalten Mittelwert ( $\bar{N}_{PolIIumH2B}$ ) und Standardabweichung ( $\sigma_{N_{PolIIumH2B}}$ ) der Verteilung der Anzahl von RNA-Pol-II-Signalen in einer 100nm-Umgebung um jede H2B-Position und Zeilen sieben und acht Mittelwert ( $\bar{N}_{H2BumPolII}$ ) und Standardabweichung ( $\sigma_{N_{H2BumPolII}}$ ) der Verteilung der Anzahl von H2B-Signalen in einer 100nm-Umgebung um jede RNA-Pol-II-Position. In Zeile neun ist das Verhältnis  $\frac{\bar{N}_{PolII}}{\bar{N}_{PolIIumH2B}}$  der Mittelwerte der RNA-Pol-II-Verteilung (aus Zeile eins) zur RNA-Pol-II-Verteilung um die H2B-Positionen (aus Zeile fünf) eingetragen in Zeile zehn das der entsprechenden Standardabweichungen  $\frac{\sigma_{N_{PolII}}}{\sigma_{N_{PolIIumH2B}}}$  (aus Zeile zwei und sechs). In Zeile elf und zwölf sind die gleichen Verhältnisse  $\frac{\bar{N}_{H2B}}{\bar{N}_{H2BumPolII}}$  und  $\frac{\sigma_{N_{H2B}}}{\sigma_{N_{H2BumPolII}}}$  für die H2B Verteilung eingetragen (aus Zeile drei und sieben sowie vier und acht).

Die benachbarten RNA-Pol-II-Positionen um die H2B-Positionen sind um den Faktor 2,7 geringer als dies für alle RNA-Pol-II-Signale im Zellkern der Fall ist. (Zeile neun). Auch ist die Verteilung wesentlich schmaler (Zeile zehn). Dies weist zum einen darauf hin, dass ein Großteil der H2B-Signale in einem Gebiet geringer RNA-Pol-II-Dichte vorliegt, zum anderen, dass die RNA-Pol-II-Signale dazu tendieren, zu sich selbst benachbart zu sein, wobei die Anzahl der Nachbarn über einen weiten Bereich verteilt ist. Die mittlere Anzahl benachbarter H2B-Signale um die RNA-Pol-II-Signale ist um den Faktor 1,7 geringer als dies für die gesamten H2B-Signale im Zellkern der Fall ist (Zeile elf). Auch die Breite der Verteilung ist in der Nähe von RNA-Pol II um den Faktor 1,5 geringer (Zeile zwölf), woraus man schließen kann, dass RNA-Pol II vorzugsweise in einer Region mit einer spezifischen H2B-Dichte angesiedelt ist.

Für die RNA-Pol-II-Signale sind im Lokalisationsbild (Abbildung 7.35) Signalanhäufungen zu erkennen. Mit Hilfe des Algorithmus 'Nachbarlabel' wurde die Verteilung der Alexa 568 Signalpositionen in diesen Anhäufungen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.37 zusammengestellt. In den sieben Zellkernen wurden insgesamt 255 Cluster untersucht. Der minimale und maximale Durchmesser der Cluster wurde bestimmt sowie das Verhältnis dieser beiden Werte zueinander, also die Anisotropie. Als Mittelwert für den minimalen Durchmesser erhält man einen Wert von  $\bar{d}_{min} = 87,5nm$ , die Verteilung hat eine Standardabweichung von  $\sigma_{d_{min}} = 30,2nm$ . Der Mittelwert der Verteilung der maximalen Durchmesser liegt bei  $\bar{d}_{max} = 112,3nm$ , die entsprechende Standardabweichung bei  $\sigma_{d_{max}} = 39,0nm$ . Es ergab sich eine mittlere Anisotropie in der Ausdehnung der Cluster von  $\frac{\bar{d}_{max}}{\bar{d}_{min}} = 1,31$  mit einer Standardabweichung von  $\sigma_{\frac{d_{max}}{d_{min}}} = 0,26$ . Die Cluster enthielten im Mittel 33 Alexa 568 Signale mit einer Standardabweichung von 17 Signalen. In der Literatur [MFS<sup>+</sup>04] findet man ebenfalls Größenbestimmungen von Ser2P-RNA-Pol-II-Clustern, welche zum einen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM), zum anderen mit SMI-Mikroskopie ermittelt wurden. Für die TEM-Messungen ergaben sich Werte von 5nm



**Abbildung 7.36:** Nachbarschaftsverteilungen im ersten Zellkern. Auf der linken Seite sind die mit dem Skript 'Nachbarlabel' ermittelten Verteilungen der Anzahl innerhalb eines Radius von  $100\text{nm}$  liegenden Signalpositionen des gleichen Typs für die RNA-Pol-II- und die H2B-Signale gezeigt, auf der rechten Seite die mit dem Skript 'Zweifarbennachbarlabel' ermittelten Verteilungen der Anzahl innerhalb eines Radius von  $100\text{nm}$  liegenden Signalpositionen des jeweils anderen Typs für die RNA-Pol-II- und die H2B-Signale.

bis  $85\text{nm}$ , mit einem Mittelwert von  $45\text{nm}$ . Die SMI-Messungen ergaben Durchmesser von  $6\text{nm}$  bis  $124\text{nm}$ , mit einem Mittelwert von  $80\text{nm}$ . Beim Vergleich dieser Werte muss man jedoch die Wahl der Methode beachten. So ist die Markierungsdichte für die TEM-Messungen in der Regel sehr gering, was zu einer Unterschätzung der Ausdehnung führen kann. Die SMI-Mikroskopie liefert sinnvolle Größenbestimmungen (abhängig vom Signal-Rausch-Verhältnis und der verwendeten Wellenlänge) im Bereich von  $10\text{nm}$  bis  $200\text{nm}$ . Auch bei der Lokalisationsmikroskopie ist die Markierungsdichte von Bedeutung, jedoch kann hier eine höhere Signaldichte als für TEM erreicht werden.

Etwa 10 % der RNA-Pol-II-Signale lagen innerhalb der ermittelten Cluster, der Rest ausserhalb, woraus man folgern kann, dass ein Großteil der Transkription außerhalb von sogenannten *transcription factories* stattfindet.

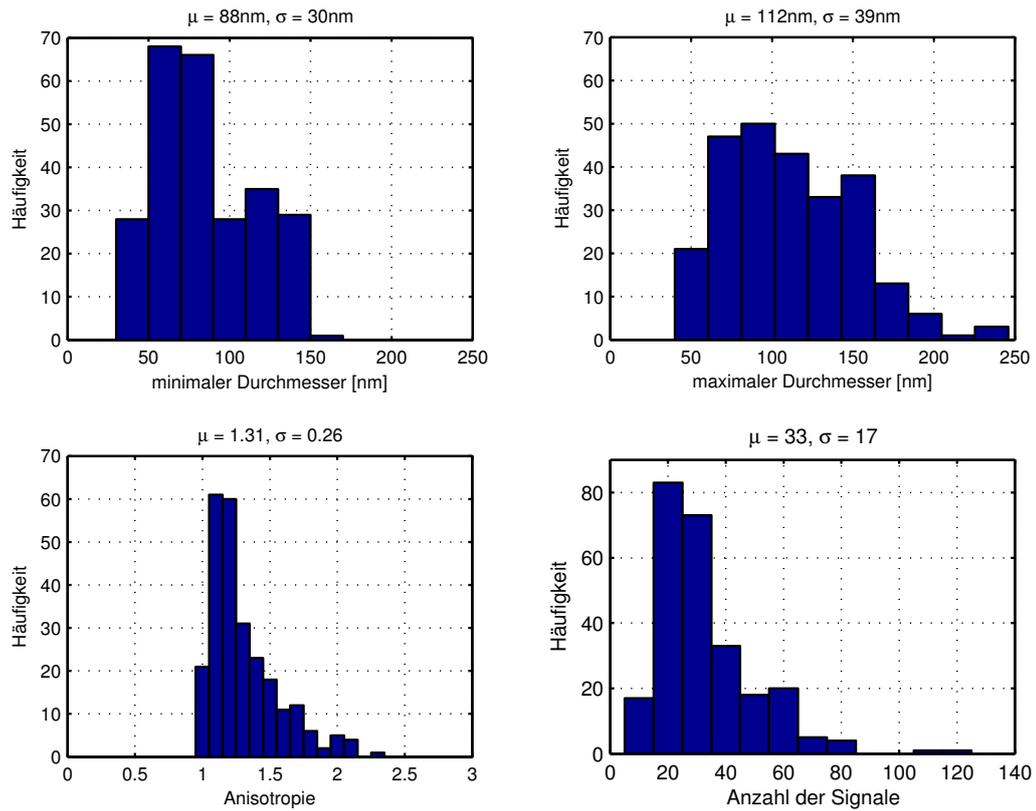
In Abbildung 7.38 ist die mittlere Fläche, welche ein Signalpunkt innerhalb der RNA-Pol-II-Cluster einnimmt (Kehrwert der Flächendichte) gegen die Gesamtfläche des Clusters aufgetragen. Geht man von einer sphärischen Ausdehnung der Cluster aus in welcher die einzelnen Signale gleichverteilt sind, so müsste diese mit steigender Clusterfläche abnehmen, da die Fläche quadratisch mit dem Radius zunimmt, die mittlere Fläche pro Signal aufgrund der Projektion entlang der optischen Achse aber umgekehrt proportional zum Radius ist. Wie man aus dem Diagramm erkennen

**Tabelle 7.10:** Anzahl der benachbarten Signalpositionen in einer Umgebung mit 100nm Radius für 7 aufgenommene HeLa-Zellkerne.

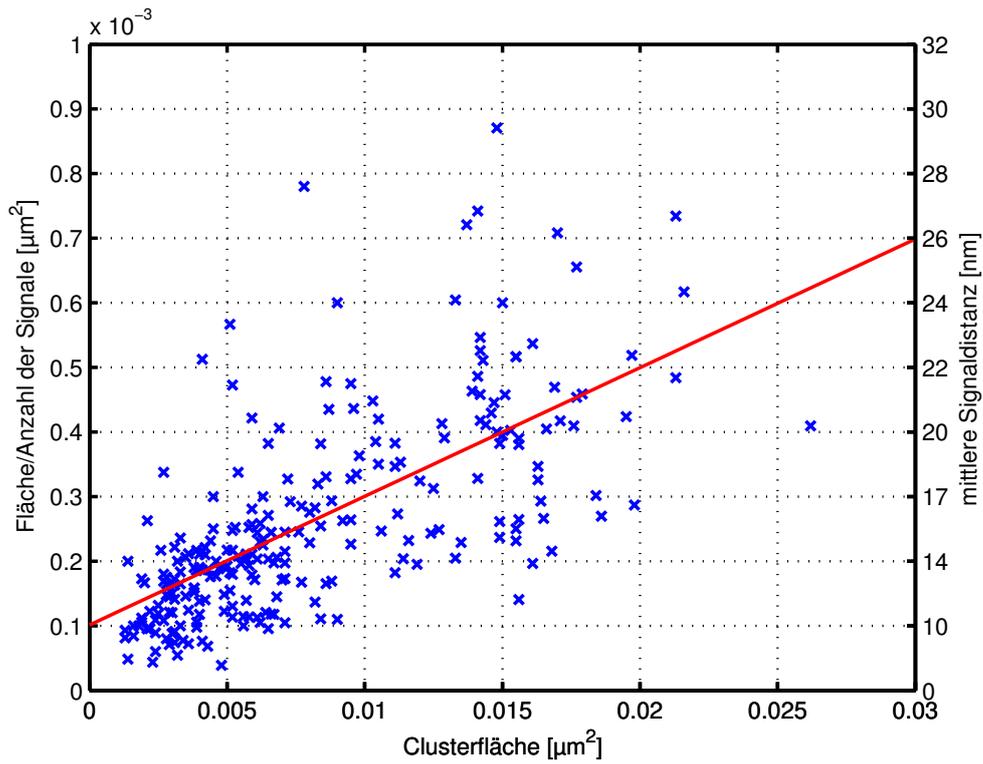
	Zellkern #	1	2	3	4	5	6	7	Mittelwert $\mu$
1	$\overline{N}_{PolII}$	15.7	12.4	13.6	14.7	12.8	12.3	14.6	$13.73 \pm 1.31$
2	$\sigma_{N_{PolII}}$	15.9	11.9	12.8	13.2	12.5	12.0	13.2	$13.07 \pm 1.35$
3	$\overline{N}_{H2B}$	8.5	7.3	11.9	9.8	7.7	8.9	8.2	$8.90 \pm 1.55$
4	$\sigma_{N_{H2B}}$	5.2	4.3	8.0	6.0	4.7	5.4	4.6	$5.46 \pm 1.26$
5	$\overline{N}_{PolIIumH2B}$	5.3	4.7	4.9	5.5	4.7	4.6	5.4	$5.01 \pm 0.38$
6	$\sigma_{N_{PolIIumH2B}}$	5.6	4.8	5.0	5.7	4.8	4.7	5.6	$5.17 \pm 0.44$
7	$\overline{N}_{H2BumPolII}$	5.1	4.5	6.5	5.5	4.9	5.5	4.9	$5.27 \pm 0.65$
8	$\sigma_{N_{H2BumPolII}}$	3.4	2.9	4.7	3.8	3.3	3.8	3.2	$3.59 \pm 0.59$
9	$\frac{\overline{N}_{PolII}}{\overline{N}_{PolIIumH2B}}$	2.96	2.64	2.76	2.67	2.72	2.676	2.70	$2.74 \pm 0.11$
10	$\frac{\sigma_{N_{PolII}}}{\sigma_{N_{PolIIumH2B}}}$	2.84	2.48	2.56	2.32	2.60	2.55	2.36	$2.53 \pm 0.17$
11	$\frac{\overline{N}_{H2B}}{\overline{N}_{H2BumPolII}}$	1.67	1.62	1.83	1.78	1.57	1.62	1.67	$1.68 \pm 0.09$
12	$\frac{\sigma_{N_{H2B}}}{\sigma_{N_{H2BumPolII}}}$	1.53	1.48	1.70	1.58	1.42	1.42	1.44	$1.51 \pm 0.10$

kann, nimmt die mittlere Fläche pro Signal jedoch zu, woraus man schlussfolgern kann, dass die Cluster im Zentrum dichter gepackt sind als am Rand. Nimmt die Größe zu, so verteilen sich die RNA-Pol-II-Moleküle weiter voneinander. An die Verteilung wurde eine Ausgleichsgerade durch Minimierung der quadratischen Abstände angepasst, wobei die Distanzen wie in Abschnitt 7.1.2 biquadratisch mit der Wichtungsfunktion 7.1 gewichtet wurden ( $r_0 = 2 \cdot 10^{-4} \mu m^{-2}$ ). Für die Gerade ergab sich  $A_{Cl}/\#_{CL} = 2 \cdot 10^{-2} \cdot A_{Cl} + 0,1$  mit der Clusterfläche  $A_{Cl}$  in  $\mu m$  und der Signalanzahl  $\#_{Cl}$ .

Für die Bestimmung der Clustergrößen und der Verteilung innerhalb der Cluster ist die Label- und Detektionseffizienz wesentlich. So ist es möglich, dass Cluster aufgrund einer zu geringen Anzahl detektierter Positionen nicht erkannt werden. Auch die Art der Verteilung innerhalb der Cluster kann bei einer erhöhten Anzahl an Signalen besser bestimmt werden.



**Abbildung 7.37:** Auswertung der RNA-Pol-II-Cluster. Obere Reihe: Bestimmung des Clusterdurchmessers. Links ist die Verteilung des minimalen, rechts die des maximalen Clusterdurchmessers gezeigt. Untere Reihe links: Anisotropie der Cluster; rechts: Anzahl von RNA-Pol-II-Signalen innerhalb der Cluster.



**Abbildung 7.38:** Verhältnis der Clusterfläche zur Signalanzahl (entspricht der inversen Flächendichte der Signale innerhalb der Cluster) aufgetragen gegen die Clusterfläche. Auf der Ordinate rechts ist der entsprechende mittlere Abstand der einzelnen Signale aufgetragen, daher ist diese nicht linear skaliert.



# 8 Diskussion und Ausblick

## 8.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Lokalisationsmikroskopie mit einer und mehreren Farben weiter entwickelt und in biologischen Proben angewandt. Um die dadurch erhaltenen Daten auszuwerten und interpretieren zu können wurden verschiedene Algorithmen entwickelt und mit Hilfe der Software Matlab angewandt. So ist nun möglich, in einem Lokalisationsbild interessante Bereiche zu markieren, um innerhalb von diesen Informationen über die Distanzverteilung der einzelnen Positionen zueinander sowie die Distanzen zur nächsten benachbarten Position und die Anzahl benachbarter Signale innerhalb der eingestellten Umgebung zu erhalten. Es wurde ein Verfahren entwickelt, mit welchem es möglich ist, die axiale Position des Lokalisationsbildes innerhalb einer fluoreszenzmarkierten biologischen Probe mit einer Genauigkeit im Bereich von  $50\text{nm}$  zu ermitteln und ein weiteres, um die Ausdehnung dünner filamentartiger Strukturen zu bestimmen. Zur Detektion und Vermessung von Signalanhäufungen oder -clustern kann zum einen ein *gaussian mixture model* an die Lokalisationsdaten angepasst werden, zum anderen kann die Variation der lokalen Dichte bei anwachsendem Umgebungsradius untersucht werden, um Signalanhäufungen zu erfassen. Um diese Algorithmen zu testen wurden verschiedene Signalanhäufungen simuliert, wobei als Parameter für die simulierten Cluster die Art der Verteilung innerhalb der Cluster, Clustergröße, Anzahl der enthaltenen Signale und ein zufälliger Hintergrund unspezifischer Signale gewählt wurden.

Die entwickelten Verfahren wurden zur Analyse biologischer Präparate verwendet. Für die Verteilung der Fluoreszenzsignale in Virus-Partikeln wurde ein Modell entwickelt und an die experimentellen Daten angepasst. Dadurch konnten Größenparameter für diese Struktur extrahiert werden, welche den elektronenmikroskopischen Beobachtungen entsprechen. Signalanhäufungen in FISH-markierten Präparaten wurden automatisch erfasst und auf ihre Ausdehnung und Signaldichte hin untersucht. Die Signalanhäufungen einzelner Centromerproteine im menschlichen Kinetochor wurden ebenfalls automatisch erkannt und auf ihre Ausdehnung, Form und Signalinhalt hin untersucht. Die jeweiligen Ergebnisse sind in den entsprechenden Kapiteln zusammengefasst.

Die Zweifarben-Lokalisationsmikroskopie wurde etabliert und verschiedene Algorithmen zur Kompensation des mechanischen Versatzes des Probenhalters während der Aufnahme, des Versatzes zweier aufeinanderfolgender Aufnahmen, etwa durch un-

beabsichtigte Stöße am Aufbau durch den Wechsel der Detektionsfilter, sowie zur Korrektur der chromatischen Verschiebung zwischen Aufnahmen unterschiedlicher Spektralbereiche entwickelt.

Um verschiedene Eigenschaften des von der Probe emittierten Fluoreszenzsignals, wie beispielsweise unterschiedliche Polarisationsrichtungen oder verschiedene Spektralbereiche, voneinander zu trennen und simultan auf einem einzigen Detektor abzubilden wurde ein neuer Mikroskopaufbau realisiert, in welchem durch die Wahl geeigneter optischer Filter das Fluoreszenzsignal entsprechend aufgespalten und in zwei verschiedenen Bereichen des Detektors abgebildet werden kann. Durch die Abbildung in einem Zwischenbild kann durch eine geeignete Blende die Größe des Bildes auf dem Detektor eingeschränkt werden, so dass sich die beiden Abbildungen nicht überlagern.

Durch die Zweifarben-Lokalisationsmikroskopie ist es möglich, relative Verteilungen innerhalb von biologischen Strukturen nicht nur qualitativ über das aus der Superposition der Einzelmolekülsignale resultierende Gesamtfluoreszenzsignal zu untersuchen, sondern direkt aus der Position und Anzahl der Einzelmolekülsignale Rückschlüsse zu ziehen. Dies wurde an verschiedenen biologischen Präparaten durchgeführt. Es wurde die relative Verteilung unterschiedlicher Centromerproteine im menschlichen Kinetochor untersucht. Die Verteilung eines am Umbau der DNA beteiligten Proteins im Verhältnis zu Strukturproteinen der DNA wurde ermittelt und mit simulierten zufälligen Verteilungen innerhalb der gleichen Struktur verglichen. Außerdem wurde die Verteilung eines bei der RNA-Replikation beteiligten Proteins im Verhältnis zu einem DNA-Strukturprotein bestimmt und die Signalanhäufungen dieses Replikationsproteins hinsichtlich ihrer Ausdehnung und des Signalgehaltes vermessen. Die Ergebnisse sind in den jeweiligen Kapiteln vorgestellt.

## 8.2 Diskussion

### 8.2.1 Lokalisationsmikroskopie

Um periodische Strukturen mit Methoden der Lokalisationsmikroskopie zu untersuchen ist es notwendig, dass diese mit einer Markierung versehen sind, welche sich zwischen mindestens zwei gut unterscheidbaren Zuständen schalten lässt. In dieser Arbeit wurden hierfür fluoreszenzmarkierte biologische Präparate verwendet. Für die Markierung können zum einen gewöhnliche oder photoaktivierbare bzw. photoschaltbare fluoreszente Proteine verwendet werden, zum anderen können organische Farbstoffe an die zu untersuchende Struktur gekoppelt werden. Sogar Autofluoreszenzeigenschaften funktionaler Proteine in biologischen Präparaten können genutzt werden. Es existieren Fluorophore, welche sich gezielt durch Anregung in einem bestimmten Wellenlängenbereich, welcher nicht zur Fluoreszenzanregung dient, reversibel oder irreversibel schalten lassen. Andere vollziehen bei bestimmten Intensitäten

der zur Fluoreszenzanregung genutzten Wellenlänge einen reversiblen Übergang in einen nicht fluoreszenten Zustand. Ebenso vielfältig wie die zur Verfügung stehenden Fluorophore sind die Methoden zur Fluoreszenzmarkierung der zu untersuchenden biologischen Struktur. Für bestimmte Fluorophortypen existieren unterschiedliche Markierungsmethoden. Zusätzlich können die Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe wie die Anzahl der emittierten Photonen oder die Schaltfrequenz chemisch durch die geeignete Wahl eines Einbettmediums beeinflusst werden.

In dieser Arbeit wurden als Fluoreszenzmarkierungen für die Lokalisationsmikroskopie konventionelle Farbstoffe verwendet, welche mit etablierten Verfahren an die biologischen Strukturen gekoppelt wurden. Die chemische Umgebung wurde nicht modifiziert, als Einbettmedien wurden kommerzielle Medien verwendet. Als Fluorophore wurden die Fluoreszenzproteine GFP, YFP und mRFP, sowie die organischen Farbstoffe Atto 488, Alexa 488 und Alexa 568 eingesetzt. Bei der Datenaufnahme wurden Laserintensität und Integrationszeit der Kamera so eingestellt, dass die Fluoreszenzsignale der Fluorophore eine geeignete optische Isolation auf dem Detektor aufwiesen und die emittierten Photonen idealerweise innerhalb eines Integrationszyklus des Detektors auf diesem auftreffen. Für die fluoreszenten Proteine lagen die Integrationszeiten, innerhalb welcher alle Photonen emittiert wurden, zumeist im Bereich von  $50ms$ . Eine optische Isolation der Signale durch reversibles Photobleichen erfolgte bereits bei Leistungsdichten auf der Probe von  $P/A \approx 2kW/cm^{-2}$  für GFP und YFP und ab  $P/A \approx 10kW/cm^{-2}$  für mRFP. Die Lokalisationsgenauigkeiten lagen im Bereich von etwa  $20 - 30nm$  für GFP und YFP und etwa  $30 - 40nm$  für mRFP, waren jedoch von Probe zu Probe nicht konstant. Dies kann durch Einfluss der lokalen Umgebung auf das jeweilige Fluorophor und die unterschiedlich starken Hintergrundsignale in unterschiedlichen Proben aufgrund von Autofluoreszenz oder durch Fluoreszenzemission ausserhalb der Fokusebene erklärt werden. Zusätzlich kann durch Brechungsindexunterschiede innerhalb des Präparats die effektive numerische Apertur verkleinert werden. Dieser Effekt wird umso größer, je tiefer die Fokusposition im Inneren der beobachteten Struktur liegt. Dadurch nimmt die Gesamtzahl der detektierten Photonen ab und dementsprechend verschlechtert sich die Lokalisationsgenauigkeit. Für die organischen Farbstoffe konnte eine optische Isolation der Signale ab einer Leistungsdichte von  $P/A \approx 10kW/cm^{-2}$  beobachtet werden, meist wurde jedoch eine höhere Leistungsdichte gewählt, um einen Großteil der Fluoreszenzphotonen innerhalb einer Integrationszeit im Bereich von  $60ms$  zu detektieren. Die mittleren Lokalisationsgenauigkeiten lagen innerhalb von biologischen Präparaten im Bereich von  $20nm$ . Für die Tabakmosaikviren lag die mittlere Lokalisationsgenauigkeit des Fluoreszenzsignals von Atto 488 bei  $8nm$ . Eine Begründung hierfür ist, dass diese so präpariert wurden, dass sie direkt am Deckglas angelagert waren, wodurch die effektive numerische Apertur optimal war. Zudem gab es keinen zusätzlichen autofluoreszenten Hintergrund und damit kein zusätzliches Signalrauschen. Dennoch sind die Lokalisationsgenauigkeiten in der Regel schlechter, als man

dies theoretisch anhand der Gesamtzahl der detektierten Photonen erwarten würde (siehe auch Abbildung 7.8). Dies kann man durch lokal variierendes Hintergrundrauschen oder Fehler bei der Abschätzung der Gesamtphotonenzahl erklären. Der Effekt wird umso kleiner, je mehr Photonen detektiert werden, je besser also das Signal-Rausch-Verhältnis ist.

Durch die Intensität der Beleuchtung, welche bei dieser Methode nötig ist um die Fluorophore in einen reversibel gebleichten Zustand zu treiben, kommt es auch zum irreversiblen Ausbleichen eines gewissen Anteils der Fluorophore. Dies führt dazu, dass alle Angaben zur Anzahl der Fluorophore innerhalb bestimmter Strukturen Mindestabschätzungen sind. Zusammen mit der Markierungseffizienz, also dem Maß, wie viele Elemente der Zielstruktur tatsächlich fluoreszenzmarkiert sind, ergibt dies eine Unterabtastung [SGGB08]. Aus Signaldichte und Lokalisationsgenauigkeit kann man die Strukturauflösung bestimmen. Sind Struktur und Labeldichte bekannt, kann man die Detektionseffizienz bestimmen und den jeweiligen Farbstoff kalibrieren. Dies war bei der Untersuchung der Tabakmosaikviren der Fall, hier betrug die Detektionseffizienz 13%.

Zur Strukturuntersuchung wurden verschiedene Methoden entwickelt. Zum einen konnten interessante Strukturen direkt per Hand im Lokalisationsbild markiert werden und so Rückschlüsse über lokale Dichten, Nachbarschaftsabstände oder charakteristische Distanzen ermittelt werden. Dies ist beispielhaft in Abschnitt 5.3.2 gezeigt. Dünne Strukturen können markiert und deren Dicke bestimmt werden (Abschnitt 5.3.3). Dies wurde bei der Analyse der Dicke von Tabakmosaikviren genutzt. Ein Modell für die Verteilung der Fluorophore in den einzelnen Tabakmosaikvirus-Partikeln wurde entwickelt (Abschnitt 7.1.2) und an die Daten angepasst. Dadurch wurde die Dicke der Partikel zu  $16nm$  bestimmt, was gut mit den elektronenmikroskopischen Daten (Durchmesser  $18nm$ ) [Lew00] zusammenpasst. Ein kritischer Parameter bei der Anpassung des Modells ist die Lokalisationsgenauigkeit, welche in diesem Fall im Mittel bei  $8nm$  lag. Bei höheren Werten für die Lokalisationsgenauigkeit wäre die Ermittlung der Ausdehnung in diesem Bereich durch die Anpassung einer Modellfunktion nicht möglich gewesen. Auch die Länge der viralen Partikel wurde gemessen. Diese lag bei etwa  $300nm$ , was ebenfalls gut mit den bekannten Werten übereinstimmt. Im Mittel wurden etwa 76 Signale in einem  $300nm$  langen Partikel detektiert, in welchem insgesamt etwa 600 von 2130 Hüllproteinen markiert waren.

Durch die automatische Segmentierung der Lokalisationsdaten können diese auf Signalanhäufungen hin untersucht werden und Informationen über diese Signalanhäufungen wie deren Ausdehnung, Anisotropie und Signaldichte ermittelt werden (siehe Abschnitt 5.3.4). Dabei muss man jedoch die Art der Verteilung innerhalb der Signalcluster beachten. An den Ergebnissen für die Simulation verschiedener Verteilungen (Abschnitt 6) kann man erkennen, dass für normalverteilte Signale innerhalb der Cluster die Anpassung eines *gaussian mixture models* verlässliche Werte

liefert, während für gleichverteilte Signalverteilungen die Größenabschätzung durch die Nachbarschaftsanalyse zuverlässiger war. Dieses Verfahren wurde für die Analyse unterschiedlicher biologischer Fragestellungen verwendet.

In menschlichen Fibroblasten wurde das maternale und paternale Allel des Gens *SN-RPN* auf dessen Ausdehnung und Kompaktierungsgrad untersucht. Die Ausdehnung betrug in beiden Fällen etwa  $400\text{nm}$ , wobei die Anisotropie des paternalen Allels leicht größer war als die des maternalen (1,3 zu 1,2). Die Signaldichte lag im paternalen Allel bei etwa  $2390\text{ Signalen}/\mu\text{m}^2$ , im maternalen bei etwa  $2000\text{ Signalen}/\mu\text{m}^2$ . Diese Ergebnisse zeigen jedoch nur Tendenzen und sind nicht signifikant. Um genauere Aussagen zu treffen, müssen mehr Zellkerne aufgenommen werden.

Die Signalcluster von den Centromerproteinen CENP-A, CENP-B und CENP-C im menschlichen Kinetochor wurden untersucht. Für CENP-A wurden 729 Cluster in 57 HEp2-Zellen ausgewertet (Abschnitt 7.3.1). Für die Ausdehnung der CENP-A-Cluster ergibt sich eine breite Verteilung, wobei die mittlere Ausdehnung im Fall der eGFP-Markierung etwas kleiner als im Fall der mRFP-Markierung abgeschätzt wird. Das Ergebnis für den minimalen Durchmesser liegt im gleichen Bereich wie bei Untersuchungen des selben Proteins mittels SMI-Mikroskopie [Bad07], bei welchen eine mittlere Ausdehnung von etwa  $180\text{nm}$  ermittelt wurde (hier  $187\text{nm}$ ). Die maximale Ausdehnung ist im Mittel größer ( $300\text{nm}$ ). Hieraus ergibt sich eine Anisotropie der Ausdehnung der CENP-A-Cluster von 1,7. Dies kann aus einer nicht sphärischen, abgeflachten Form der Signalcluster resultieren, was bei der Projektion entlang der optischen Achse durch die geringe axiale Auflösung zu einer elliptischen Verteilung führt. Elektronenmikroskopisch wurde die Ausdehnung der CENP-A-Cluster zu  $150\text{nm}$  bis  $235\text{nm}$  bestimmt, also im gleichen Bereich wie die hier ermittelten Größen [MMC08]. Die hohe Varianz in der Ausdehnung war zu erwarten, da die Größe der Kinetochore nicht konstant ist. Im Mittel wurden 25 CENP-A Signale innerhalb der Cluster gefunden (eGFP-Markierung: 24, mRFP-Markierung: 26). Für eine Auflösung einer eventuell vorhandenen internen Struktur sind Signalanzahl und -dichte zu gering.

Für CENP-B wurden insgesamt 505 Cluster in 44 HEp2-Zellen ausgewertet (Abschnitt 7.3.2). Die Ausdehnung der CENP-B-Komplexe variiert stark, sowohl für die Fluoreszenzmarkierung mit eGFP, als auch für die mit eYFP, wobei Letztere im Mittel fast doppelt so groß ist wie im Fall der eGFP-Markierung. Dies kann daran liegen, dass die Centomere zu jeder Zellzyklus-Phase aufgenommen wurden. Kommt es dabei zu Konformationsänderungen oder wird zusätzliches CENP-B eingelagert oder abgebaut, beeinflusst dies die Ausdehnung. Auch der Grad der Überexpression könnte die Größe beeinflussen. Die Anisotropie der Ausdehnung ist relativ gering und variiert nicht sehr mit der Größe. Im Mittel werden 57 Signale in einem CENP-B-Cluster gefunden, die Signaldichte ist kleiner als dies bei den CENP-A-Clustern der Fall war, die Breite dieser Verteilung ist aber ebenfalls sehr hoch. Ein interessantes Phänomen ist das Auftreten ringförmiger Verteilungen (wie in Abbildung

7.21 zu sehen), was in einigen CENP-B-Clustern beobachtet werden konnte. Eine Erklärung für all diese Effekte könnte sein, dass CENP-B an die  $\alpha$ -Sateliten-DNA bindet, welche in der Centromer-Region eines Chromosoms in vielen Wiederholungen vorliegt [CBE90].

Für CENP-C wurden 416 Cluster in 22 HEP2-Zellen ausgewertet (Abschnitt 7.3.3). Die minimale Ausdehnung der CENP-C-Cluster liegt im Mittel bei etwa  $220nm$ , die maximale bei etwa  $340nm$ . Diese Werte sind vergleichbar mit denen für CENP-A. Auch die Anisotropie liegt im selben Bereich. Dies war zu erwarten, da sich CENP-C vorzugsweise in CENP-A-reichen Regionen anlagert [RVD<sup>+</sup>10]. Im Mittel wurden 35 Signale pro Cluster gefunden, dieser Wert variiert jedoch abhängig von der Art der Markierung. So wurden für eGFP-CENP-C im Mittel etwa 22 Signale pro Cluster gemessen, für eYFP jedoch 50. Auch für CENP-B war die Anzahl der gefundenen Signale etwa doppelt so hoch für eYFP wie für eGFP, allerdings war dort auch die Variation der Clusterausdehnungen größer.

### 8.2.2 Zweifarben-Lokalisationsmikroskopie

Durch die Lokalisation von Fluorophoren mit unterschiedlichen Fluoreszenzspektren können in der gleichen Probe unterschiedliche Strukturen getrennt voneinander beobachtet und mit Methoden der Lokalisationsmikroskopie vermessen werden. Die Analyse der so erhaltenen Daten ist jedoch nicht ohne Korrekturen möglich, da es zu mechanischen und chromatischen Verschiebungen kommen kann. Diese müssen vor jeder weiteren Datenauswertung zunächst korrigiert werden. Hierzu sind in dieser Arbeit verschiedene Verfahren entwickelt worden. Der mechanische Versatz (meist im Bereich von etwa  $100nm$ ), welcher durch unbeabsichtigte Stöße am Aufbau etwa beim Wechsel der optischen Filter oder einen Drift des Probenhalters entsteht, kann in x-, y- und z-Richtung durch Aufnahme einer 3D-Referenzmessung für alle Spektralbereiche vor der eigentlichen Lokalisationsmessung kompensiert werden. Die Genauigkeit in der Korrektur in lateraler Richtung beträgt dabei wenige Nanometer, da hier der Versatz zweier identischer Bilder durch Korrelation dieser miteinander bestimmt wird, axial kann die Position mit einer Genauigkeit von etwa  $50nm$  ermittelt werden. Durch eine Korrelation der Lokalisationsdaten kann auch der laterale chromatische Versatz abgeschätzt werden (der meist im Bereich von  $50 - 100nm$  liegt), falls die beobachteten spektral getrennten Objekte strukturelle Gemeinsamkeiten, wie beispielsweise dieselbe Umrandung, aufweisen. Sind die Strukturen grundlegend verschieden, kann der chromatische Versatz durch geeignete Referenzobjekte, welche gleichzeitig in den entsprechen Spektralbereichen fluoreszieren, durch die gleichen Verfahren bestimmt und kompensiert werden.

Ist eine Korrektur erfolgt, können relative Verteilungen der ermittelten Signalpositionen bestimmt werden. Der Vorteil ist hierbei, dass Informationen über die einzelnen Positionen (mit der Ungenauigkeit der Positionsbestimmung) vorliegen, was lokale

quantitative Analysen in biologischen Strukturen ermöglicht. Auch der Vergleich der Verteilung der einzelnen Signalpositionen mit einer zufälligen Verteilung ist möglich. Für die Verteilung der Centromerproteine CENP-A und CENP-B wurde in vier Zellkernen die relative Verteilung von 86 Cluster-Paaren bestimmt (Abschnitt 7.3.4). Die Signalcluster überlagern sich teilweise, wobei im Mittel 83% der Signalanhäufung von CENP-A innerhalb der von CENP-B liegt. Umgekehrt werden im Mittel nur 25% des CENP-B-Clusters von CENP-A überlagert. Die Signalanhäufung von CENP-A nimmt im Lokalisationsbild nur etwa 20% der Fläche des CENP-B-Clusters ein. Die Schwerpunkte der Cluster sind im Mittel  $170nm$  voneinander entfernt. Dies wurde auch in sechs weiteren Zellkernen mit 68 Cluster-Paaren gemessen, für welche keinerlei Korrekturen durchgeführt wurden. Hier wurden vergleichbare Werte erzielt, was für einen geringen Gesamtversatz spricht.

Die realen Verteilungen eines DNA-Strukturproteins (H2A) und eines am DNA-Umbau beteiligten Proteins (SNF2h) wurden mit den zufälligen Verteilungen der Signalpositionen über die gleiche Zellkernfläche verglichen (Abschnitt 7.4). Man kann den Schluss ziehen, dass die H2A- und die SNF2h-Signalpositionen nicht zufällig im Zellkern verteilt sind, sondern in gewissen Regionen dichter gepackt vorliegen. Hierfür spricht die Zunahme der mittleren Anzahl benachbarter Signalpositionen in einem  $100nm$ -Umkreis sowohl für die Population der H2A- als auch der SNF2h-Signale, verglichen mit der simulierten Gleichverteilung über den ganzen Zellkern. Außerdem nimmt die Breite der jeweiligen Verteilung, verglichen mit der zufälligen Verteilung zu, woran man ebenfalls die erhöhte Heterogenität in der Verteilung der realen lokalen Dichten gegenüber der zufälligen Verteilung feststellen kann. Während die mittlere Anzahl der benachbarten Signale des jeweils anderen Molekültyps im gleichen Bereich liegt, wie dies bei einer zufälligen Verteilung der Fall ist, nimmt der mittlere Abstand zum nächsten Signal des jeweils anderen Molekültyps verglichen mit einer zufälligen Verteilung zu. Gleichzeitig wird diese Verteilung breiter als dies für normalverteilte Positionen der Fall wäre. Als Maß für die Abweichung von der simulierten Verteilung wurde die maximale Abweichung der normierten kumulativen Verteilungsfunktionen für die reale und die simulierte Signalverteilung innerhalb der Zellkerne gewählt (Tabelle 7.8). Aus diesen Ergebnissen kann man schliessen, dass SNF2h und H2A gemeinsam in den gleichen globalen Strukturen vorliegen. Gleichzeitig ist zu beobachten, dass sie nicht kolokalisieren, sondern einen gewissen Abstand zueinander wahren [BH02].

Bei der Untersuchung Verteilung eines DNA-Strukturproteins (H2B) zu einem bei der RNA-Replikation beteiligten Protein (RNA-Pol II) wurden die Nachbarschaftsverhältnisse und die im Fall von RNA-Pol II die Ausbildung von Signalclustern untersucht (Abschnitt 7.5). Aus dem Vergleich der benachbarten Signale des gleichen und des jeweils anderen Molekültyps (Tabelle 7.10) kann man schliessen, dass ein Großteil der H2B-Signale in einem Gebiet geringer RNA-Pol-II-Dichte vorliegt und dass die RNA-Pol-II-Signale dazu tendieren, zu sich selbst benachbart zu sein.

RNA-Pol II ist vorzugsweise in einer Region mit einer spezifischen H2B-Dichte angesiedelt. In sieben Zellkernen wurden insgesamt 255 RNA-Pol-II-Cluster untersucht. Für die Ausdehnung ergab sich im Mittel ein Wert von etwa  $100nm$ , mit einer Anisotropie von 1,3. Die Cluster enthielten im Mittel 33 Alexa 568 Signale. In der Literatur [MFS<sup>+</sup>04] findet man ebenfalls Größenbestimmungen von Ser2P-RNA-Pol II Clustern, welche zum einen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM), zum anderen mit SMI-Mikroskopie bestimmt wurden. Die TEM-Messungen ergaben einen Mittelwert von  $45nm$ , die SMI-Messungen ergaben Durchmesser von im Mittel  $80nm$ . Die Überschneidung der Größenabschätzungen bei diesen Messungen liegt in einem Bereich von etwa  $40-80nm$ , die Unterschiede können methodisch bedingt sein. Etwa 10 % der RNA-Pol-II- Signale lagen innerhalb der ermittelten Cluster, woraus man folgern kann, dass ein Teil der Transkription auch außerhalb von sogenannten *transcription factories* stattfindet. Dies steht im Kontrast zu anderen Studien, nach welchen 90 bis 99% der Transkription innerhalb der *transcription factories* stattfindet. Da die Lokalisationsmikroskopie eine sehr sensitive Methode ist, ist es möglich, auch Signale unspezifisch gebundener einzelner Fluorophore im Zellinneren zu detektieren, welche die biologische Interpretation der Ergebnisse beeinflussen können. Hier sind weitere Experimente nötig, um diese Frage zu klären.

### 8.2.3 Der Zweifarbenaufbau

Um zwei unterschiedliche spektrale Signaturen gleichzeitig aufzunehmen, wurde ein Mikroskopaufbau realisiert, welcher das von der Probe emittierte Fluoreszenzsignal je nach eingebautem optischen Element in zwei Anteile zerlegt. Momentan ist ein dichroitischer Strahlteiler eingebaut, welcher das Fluoreszenzlicht bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 505nm$  trennt. Die prinzipielle Funktionsweise des Aufbaus wurde getestet und ist in [Pre10] dokumentiert. Das Signal wird zunächst in einem virtuellen Zwischenbild abgebildet, dessen Ausmaße durch eine Lochblende derart reduziert werden können, dass sich die anschließenden Abbildungen auf der CCD-Kamera nicht überlappen. Die Linse, welche das Zwischenbild erzeugt und die nachgeschaltete Linse bilden gleichzeitig einen Kollimator, welcher für eine Verkleinerung des Strahldurchmessers und dadurch eine Vergrößerung des Dispersionswinkels sorgt, wodurch eine zusätzliche Vergrößerung des Bildes auf der CCD-Kamera erreicht wird. Dies ist nötig, da die Pixelgröße der Kamera mit  $16\mu m$  zu einer ungünstigen Abtastung des Fluoreszenzsignals führt. Durch die zusätzliche Vergrößerung entspricht ein Pixel nun  $76,2nm$  im Objektraum. Dies ist von Bedeutung, um beispielsweise ein Einzelmolekülsignal, welches bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 500nm$  und einer numerischen Apertur des Objektivs von  $NA = 1,4$  eine Halbwertsbreite von etwa  $220nm$  besitzt, genügend oft abtasten zu können.

## 8.3 Ausblick

Die während dieser Arbeit begonnenen lokalisationsmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass diese Methode sich gut zur Untersuchung biologischer Fragestellungen eignet. Die hier vorgestellten Projekte können auf vielfältige Art fortgesetzt werden.

Bei den Tabakmosaikviren ist es möglich, Virus-Partikel aus mit spektral unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen versehenen Hüllproteinen zu erzeugen. Dies würde einerseits eine weitere Charakterisierung der Zweifarbenlokalisation ermöglichen und eine gute Abschätzung chromatischer Fehler bei der Positionsbestimmung einzelner Fluorophorsignale liefern. Zum anderen erhält man durch die spezifische Markierung und Positionsgenauigkeit im Nanometerbereich Informationen über die Art der Assemblierung, die durch Elektronenmikroskopie oder konventionelle optische Verfahren nicht zugänglich sind. Durch eine gute Kalibrierung der Detektionseffizienz weiterer Farbstoffe kann die Gesamtanzahl der Fluorophore in verschiedenen Strukturen besser abgeschätzt werden.

Das menschliche Kinetochor besteht aus mehr als drei Proteintypen. Hier kann die Zweifarben-Lokalisationsmikroskopie zum weiteren Verständnis des Kinetochoraufbaus auch während verschiedener Zeitpunkte im Zellzyklus eingesetzt werden.

Da die Lokalisationsmikroskopie eine Methode der Weitfeldmikroskopie ist und für die hier vorgestellte Variante keine speziellen Fluorophore eingesetzt werden, kann sie mit anderen Weitfeldmethoden, wie beispielsweise der Strukturierten Beleuchtung (*structured illumination microscopy*, SIM) oder der Räumlich Modulierten Beleuchtung (*spatially modulated illumination*, SMI) kombiniert werden [Lem09]. Nutzt man zuverlässig photoschaltbare Moleküle mit wohldefinierten Verweilzeiten im fluoreszenten Zustand, so wäre es denkbar, Aufnahmen des selben Fluorophors in mehrere Fokusebenen anzufertigen und dadurch die axiale Positionsbestimmung zu verbessern. Die Ausnutzung des SMI-Prinzips würde hierbei zusätzlich zu einer besseren Lokalisation in Richtung der optischen Achse führen.

Zur Abschätzung des chromatischen Versatzes können photostabile Referenzobjekte, welche in allen beobachteten Spektralbereichen fluoreszieren, in der Nähe der beobachteten Strukturen platziert und mit aufgenommen werden. In Kombination mit den hier vorgestellten Verfahren zur Korrektur des Versatzes zwischen zwei Aufnahmen kann eine präzise Überlagerung der Aufnahmen durchgeführt werden, auch wenn keine sonstigen Referenzmerkmale wie beispielsweise eine gemeinsame Zellkernumrandung vorhanden sind.

Die hier vorgestellte Mikroskopiemethode kann ohne großen Aufwand in handelsüblichen Mikroskopen eingesetzt werden. Durch eine schnellere Implementierung der hier vorgestellten Algorithmen bildet dies die Grundlage für eine relativ einfach zu handhabende Methode der Erfassung und quantitativen Auswertung nicht nur biologischer Präparate.



## Literaturverzeichnis

- [Abb73] E Abbe. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–418, 1873.
- [AFHC01] B Albrecht, Antonio Virgilio Failla, Rainer Heintzmann, and Christoph Cremer. Spatially modulated illumination microscopy: online visualization of intensity distribution and prediction of nanometer precision of axial distance measurements by computer simulations. *J. Biomed. Opt.*, 6(3):292–9, Jul 2001.
- [And] Andor. [www.andor.com](http://www.andor.com).
- [Bad07] David Baddeley. *Precision measurements with SMI and 4Pi Microscopy*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2007.
- [BBW<sup>+</sup>07] David Baddeley, Claudia Batram, Yanina Weiland, Christoph Cremer, and Udo J Birk. Nanostructure analysis using spatially modulated illumination microscopy. *Nat Protoc*, 2(10):2640–6, Jan 2007.
- [BCCD85] D Burns, J Callis, G Christian, and E Davidson. Strategies for attaining superresolution using spectroscopic data as constraints. *Appl. Opt.*, Jan 1985.
- [BCS10] David Baddeley, Mark B Cannell, and Christian Soeller. Visualization of localization microscopy data. *Microsc Microanal*, 16(1):64–72, Feb 2010.
- [BDK<sup>+</sup>10] Manfred Bohn, Philipp Diesinger, Rainer Kaufmann, Yanina Weiland, Patrick Müller, Manuel Gunkel, Alexa von Ketteler, Paul Lemmer, Michael Hausmann, Dieter W Heermann, and Christoph Cremer. Localization microscopy reveals expression-dependent parameters of chromatin nanostructure. *Biophys J*, 99(5):1358–67, Sep 2010.
- [Bet95] E Betzig. Proposed method for molecular optical imaging. *Opt Lett*, 20(3):237–9, Feb 1995.
- [BH02] Peter B Becker and Wolfram Hörz. Atp-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem*, 71:247–73, Jan 2002.

- [BJC<sup>+</sup>09] David Baddeley, Isuru D Jayasinghe, Christoph Cremer, Mark B Cannell, and Christian Soeller. Light-induced dark states of organic fluorochromes enable 30 nm resolution imaging in standard media. *Biophys J*, 96(2):L22–4, Jan 2009.
- [BPS<sup>+</sup>06] Eric Betzig, George H Patterson, Rachid Sougrat, O Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S Bonifacino, Michael W Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Harald F Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–5, Sep 2006.
- [BSEC98] Harald Bornfleth, Sätzler, C Eils, and Christoph Cremer. High-precision distance measurements and volume-conserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three-dimensional confocal . . . . *J Microsc*, Jan 1998.
- [But99] P J Butler. Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*, 354(1383):537–50, Mar 1999.
- [Cai07] Bradley R Cairns. Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat Struct Mol Biol*, 14(11):989–96, Nov 2007.
- [Car96] NP Carter. Fluorescence in situ hybridization-state of the art. *Bioimaging*, 4(2):41–51, 1996.
- [CBE90] C A Cooke, R L Bernat, and W C Earnshaw. Cenp-b: a major human centromere protein located beneath the kinetochore. *The Journal of Cell Biology*, 110(5):1475–88, May 1990.
- [CDC<sup>+</sup>05] G Chirico, A Diaspro, F Cannone, M Collini, S Bologna, V Pellegrini, and F Beltram. Selective fluorescence recovery after bleaching of single e2gfp proteins induced by two-photon excitation. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 6(2):328–35, Feb 2005.
- [CEB<sup>+</sup>99] C. Cremer, P. Edelmann, H. Bornfleth, G. Kreth, H. Muench, H. Luz, and M. Hausmann. Principles of spectral precision distance confocal microscopy for the analysis of molecular nuclear structure. In B. Jähne, H. Haußecker, and P. Geißle, editors, *Handbook of Computer Vision and Applications*, volume 3, pages 839–857. Academic Press San Diego, 1999.

- [CFGB89] L M Cherry, A J Faulkner, L A Grossberg, and R Balczon. Kinetochore size variation in mammalian chromosomes: an image analysis study with evolutionary implications. *J Cell Sci*, 92 ( Pt 2):281–9, Feb 1989.
- [CHBR] Christoph Cremer, Michael Hausmann, J. Brandl, and B. Rinke. Method and device for measuring distances between object structures, deutsche patentanmeldung nr. 196.54.824.1/de, 23.12.1996, europäisches patent ep 1997953660, 08.04.1999, japanisches patent jp 1998528237, 23.06.1999, united states patent 09331644, 25.08.1999.
- [Cla80] B Clark. An efficient implementation of the algorithm 'clean'. *Astronomy and Astrophysics*, Jan 1980.
- [CO10] Daniel K Clare and Elena V Orlova. 4.6a cryo-em reconstruction of tobacco mosaic virus from images recorded at 300 kev on a 4k x 4k ccd camera. *J Struct Biol*, 171(3):303–8, Sep 2010.
- [CPK<sup>+</sup>02] Nadine Collins, Raymond A Poot, Iwao Kukimoto, Custodia García-Jiménez, Graham Dellaire, and Patrick D Varga-Weisz. An acf1-iswi chromatin-remodeling complex is required for dna replication through heterochromatin. *Nat Genet*, 32(4):627–32, Dec 2002.
- [CSG82] H J Cooke, J Schmidtke, and J R Gosden. Characterisation of a human y chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates. *Chromosoma*, 87(5):491–502, Jan 1982.
- [CSW07] C. Czeslik, H. Seemann, and R. Winter. *Basiswissen physikalische Chemie*. Teubner BG GmbH, 2007.
- [CvKL<sup>+</sup>10] Christoph Cremer, Alexa von Kottler, Paul Lemmer, Rainer Kaufmann, Yanina Weiland, Patrick Mueller, Michael Hausmann, Manuel Gunkel, Thomas Ruckelshausen, David Baddeley, and Roman Amberger. Far-field fluorescence microscopy of cellular structures at molecular optical resolution. In Alberto Diaspro, editor, *Nanoscopy and Multidimensional Optical Fluorescence Microscopy*, pages 3–1 – 3–35. Chapman and Hall, 2010.
- [DCTM97] Robert M Dickson, A B Cubitt, R Y Tsien, and W E Moerner. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 388(6640):355–8, Jul 1997.
- [DS02] M Demir and M Stowell. A chemoselective biomolecular template for assembling diverse nanotubular materials. *Nanotechnology*, Jan 2002.

- [EC00] P Edelman and Christoph Cremer. Improvement of confocal spectral precision distance microscopy (spdm). *Proc SPIE*, 3921:313–320, 2000.
- [EEK<sup>+</sup>00] A Esa, P Edelman, G Kreth, L Trakhtenbrot, N Amariglio, G Rechavi, M Hausmann, and Christoph 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(Pt 2):96–105, Aug 2000.
- [ERM<sup>+</sup>09] Christian Eggeling, Christian Ringemann, Rebecca Medda, Günter Schwarzmann, Konrad Sandhoff, Svetlana Polyakova, Vladimir N Belov, Birka Hein, Claas von Middendorff, Andreas Schönle, and Stefan W Hell. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature*, 457(7233):1159–62, Feb 2009.
- [EvdLW<sup>+</sup>10] Ulrike Endesfelder, Sebastian van de Linde, Steve Wolter, Markus Sauer, and Mike Heilemann. Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy of myosin-actin motility. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 11(4):836–40, Mar 2010.
- [FBB<sup>+</sup>08] Jonas Fölling, Mariano L Bossi, Hannes Bock, Rebecca Medda, Christian A Wurm, Birka Hein, Stefan Jakobs, Christian Eggeling, and Stefan W Hell. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat Methods*, 5(11):943–5, Nov 2008.
- [FCC02] Antonio Virgilio Failla, Antonio Cavallo, and Christoph Cremer. Sub-wavelength size determination by spatially modulated illumination virtual microscopy. *Appl. Opt*, 41(31):6651–9, Nov 2002.
- [FSA<sup>+</sup>02] Antonio Virgilio Failla, Udo Spoeri, Benno Albrecht, Alexander Kroll, and Christoph Cremer. Nanosizing of fluorescent objects by spatially modulated illumination microscopy. *Appl. Opt*, 41(34):7275–83, Dec 2002.
- [Gei10] Fanja Geiger. *Tabakmosaikvirus-Hüllproteinvarianten als Bausteine für die Nano-und Arraytechnologie*. Dissertation, Universität Stuttgart, 2010.
- [GER<sup>+</sup>09] Manuel Gunkel, Fabian Erdel, Karsten Rippe, Paul Lemmer, Rainer Kaufmann, Christoph Hörmann, Roman Amberger, and Christoph Cremer. Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. *Biotechnol J*, 4(6):927–38, Jun 2009.

- 
- [GMR08] K Gerasopoulos, M McCarthy, and E Royston. Nanostructured nickel electrodes using the tobacco mosaic virus for microbattery applications. *Journal of . . .*, Jan 2008.
- [Goo05] J. W. Goodman. *Introduction to fourier optics*. Roberts & Co, 2005.
- [Gu00] Min Gu. *Advanced optical imaging theory*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Jan 2000.
- [Gun07] Manuel Gunkel. Weiterentwicklung eines zweiphotonenaufbaus zur aktivierung und lokalisation einzelner moleküle. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2007.
- [Gus99] Mats G L Gustafsson. Extended resolution fluorescence microscopy. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(5):627–34, Oct 1999.
- [Gus00] Mats G L Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc*, 198(Pt 2):82–7, May 2000.
- [Gus05] Mats G L Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(37):13081–6, Sep 2005.
- [HC99] R Heintzmann and C Cremer. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. *Proc SPIE*, Jan 1999.
- [Hec05] E. Hecht. *Optik*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 2005.
- [HFD<sup>+</sup>08] Jelle Hendrix, Cristina Flors, Peter Dedecker, Johan Hofkens, and Yves Engelborghs. Dark states in monomeric red fluorescent proteins studied by fluorescence correlation and single molecule spectroscopy. *Biophys J*, 94(10):4103–13, May 2008.
- [HGM06] Samuel T Hess, Thanu P K Girirajan, and Michael D Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J*, 91(11):4258–72, Dec 2006.
- [HJC02] Rainer Heintzmann, Thomas M Jovin, and Christoph Cremer. Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, 19(8):1599–609, Aug 2002.

- [HLCS94] Stefan W Hell, S Lindek, Christoph Cremer, and Ernst H K Stelzer. Measurement of the 4pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution. *Applied Physics Letters*, 64:1335, 1994.
- [HMK<sup>+</sup>05] Mike Heilemann, Emmanuel Margeat, Robert Kasper, Markus Sauer, and Philip Tinnefeld. Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch. *J Am Chem Soc*, 127(11):3801–6, Mar 2005.
- [Hög74] J Högbom. Aperture synthesis with a non-regular distribution of interferometer baselines. *Astronomy and Astrophysics Supplement Series*, Jan 1974.
- [HRCS93] S Hell, G Reiner, C Cremer, and E Stelzer. Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. *J Microsc*, Jan 1993.
- [HS92] S Hell and E Stelzer. Properties of a 4pi confocal fluorescence microscope. *Journal of the Optical Society of America A*, Jan 1992.
- [HSLC94] Stefan W Hell, E H Stelzer, S Lindek, and Christoph Cremer. Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-b 4pi confocal microscopy. *Opt Lett*, 19(3):222, Feb 1994.
- [HvdLMS09] Mike Heilemann, Sebastian van de Linde, Anindita Mukherjee, and Markus Sauer. Hochauflösende mikroskopie mit kleinen organischen farbstoffen. *Angewandte Chemie*, 121(37):7036–7041, 2009.
- [HvdLS<sup>+</sup>08] Mike Heilemann, Sebastian van de Linde, Mark Schüttpelz, Robert Kasper, Britta Seefeldt, Anindita Mukherjee, Philip Tinnefeld, and Markus Sauer. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(33):6172–6, Jan 2008.
- [HWPH<sup>+</sup>08] Peter Hemmerich, Stefanie Weidtkamp-Peters, Christian Hoischen, Lars Schmiedeberg, Indri Erliandri, and Stephan Diekmann. Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells. *The Journal of Cell Biology*, 180(6):1101–14, Mar 2008.
- [Jäh05] Bernd Jähne. *Digitale Bildverarbeitung*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Jan 2005.
- [JEJ03] Elizabeth A Jares-Erijman and Thomas M Jovin. Fret imaging. *Nat Biotechnol*, 21(11):1387–95, Nov 2003.
- [JF99] J.D. Jackson and R.F. Fox. *Classical electrodynamics*. Wiley, 1999.

- [JIMC98] D A Jackson, F J Iborra, E M Manders, and P R Cook. Numbers and organization of rna polymerases, nascent transcripts, and transcription units in hela nuclei. *Mol Biol Cell*, 9(6):1523–36, Jun 1998.
- [Jmo] Jmol. Ein open-source java betrachter für chemische strukturen in 3d. <http://www.jmol.org/>.
- [KLGW09] Rainer Kaufmann, Paul Lemmer, Manuel Gunkel, and Yanina Weiland. Spdm: single molecule superresolution of cellular nanostructures. *Proc SPIE*, Jan 2009.
- [KM00] M Kozubek and P Matula. An efficient algorithm for measurement and correction of chromatic aberrations in fluorescence microscopy. *J Microsc*, 200(Pt 3):206–17, Dec 2000.
- [KSC02] Hiroshi Kimura, Kimihiko Sugaya, and Peter R Cook. The transcription cycle of rna polymerase ii in living cells. *J Cell Biol*, 159(5):777–82, Dec 2002.
- [LB01] Gernot Längst and Peter B Becker. Nucleosome mobilization and positioning by iswi-containing chromatin-remodeling factors. *J Cell Sci*, 114(Pt 14):2561–8, Jul 2001.
- [Lem07] Paul Lemmer. Optimierung eines smi-mikroskops für hochpräzise größen- und lokalisationsbestimmungen an in vivo systemen. Diplomarbeit, Ruprecht Karls Universität Heidelberg, 2007.
- [Lem09] Paul Lemmer. *Lichtmikroskopische Untersuchungen konventionell markierter Präparate weit unterhalb der Beugungsgrenze*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2009.
- [Lew00] DJ Lewandowski. Genus tobamovirus. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses*. MHV van Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop, EB Carstens, MK Estes, SM Lemon, J. Maniloff, MA Mayo, DJ McGeoch, CR Pringle, and RB Wickner, eds. Academic Press, San Diego, pages 889–894, 2000.
- [LGB<sup>+</sup>08] Paul Lemmer, Manuel Gunkel, David Baddeley, Rainer Kaufmann, A Urich, Yanina Weiland, Jürgen Reymann, Patrick Müller, Michael Hausmann, and Christoph Cremer. Spdm: light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 93(1):1–12, 2008.

- [LGW<sup>+</sup>09] Paul Lemmer, Manuel Gunkel, Yanina Weiland, Patrick Müller, David Baddeley, Rainer Kaufmann, A Urich, H Eipel, Roman Amberger, Michael Hausmann, and Christoph Cremer. Using conventional fluorescent markers for far-field fluorescence localization nanoscopy allows resolution in the 10-nm range. *J. Microsc*, 235(2):163–71, Aug 2009.
- [LMR<sup>+</sup>97] K Luger, A W Mäder, R K Richmond, D F Sargent, and T J Richmond. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648):251–60, Sep 1997.
- [LRC05] S Lee, E Royston, and J Culver. . . . Improved metal cluster deposition on a genetically engineered tobacco mosaic virus template. *Nanotechnology*, Jan 2005.
- [MFS<sup>+</sup>04] Sonya Martin, Antonio Virgilio Failla, Udo Spöri, Christoph Cremer, and Ana Pombo. Measuring the size of biological nanostructures with spatially modulated illumination microscopy. *Mol Biol Cell*, 15(5):2449–55, May 2004.
- [MGS<sup>+</sup>ss] Yolanda Markaki, Manuel Gunkel, Lothar Schermelleh, Sven Beichmann, Jürgen Neumann, Martin Heidemann, Heinrich Leonhardt and Dirk Eick, Christoph Cremer, and Thomas Cremer. Functional nuclear organization of transcription and dna replication. *Cold Spring Harbour Symposia*, in press.
- [MH09] Gael Moneron and Stefan W Hell. Two-photon excitation sted microscopy. *Optics Express*, 17(17):14567–73, Aug 2009.
- [MKJW10] Anna Mueller, Anan Kadri, Holger Jeske, and Christina Wege. In vitro assembly of tobacco mosaic virus coat protein variants derived from fission yeast expression clones or plants. *J Virol Methods*, 166(1-2):77–85, Jun 2010.
- [MLC09] Chuanbin Mao, Aihua Liu, and Binrui Cao. Virus-based chemical and biological sensing. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(37):6790–810, Jan 2009.
- [MMC08] Owen J Marshall, Alan T Marshall, and K H Andy Choo. Three-dimensional localization of cenp-a suggests a complex higher order structure of centromeric chromatin. *J Cell Biol*, 183(7):1193–202, Dec 2008.
- [MPC<sup>+</sup>09] Amber L Mosley, Samantha G Pattenden, Michael Carey, Swaminathan Venkatesh, Joshua M Gilmore, Laurence Florens, Jerry L Work-

- man, and Michael P Washburn. Rtr1 is a ctd phosphatase that regulates rna polymerase ii during the transition from serine 5 to serine 2 phosphorylation. *Mol Cell*, 34(2):168–78, Apr 2009.
- [MSJ<sup>+</sup>10] Patrick Müller, Eberhard Schmitt, Anette Jacob, Jörg Hoheisel, Rainer Kaufmann, Christoph Cremer, and Michael Hausmann. Combofish enables high precision localization microscopy as a prerequisite for nanostructure analysis of genome loci. *Int J Mol Sci*, 11(10):4094–105, Jan 2010.
- [MZD<sup>+</sup>05] Tim B McAnaney, Wei Zeng, Camille F E Doe, Nina Bhanji, Stuart Wakelin, David S Pearson, Paul Abbyad, Xinghua Shi, Steven G Boxer, and Clive R Bagshaw. Protonation, photobleaching, and photoactivation of yellow fluorescent protein (yfp 10c): a unifying mechanism. *Biochemistry*, 44(14):5510–24, Apr 2005.
- [OBH<sup>+</sup>08] Sandra Orthaus, Christoph Biskup, Birgit Hoffmann, Christian Hoi-schen, Sabine Ohndorf, Klaus Benndorf, and Stephan Diekmann. Assembly of the inner kinetochore proteins cenp-a and cenp-b in living human cells. *Chembiochem*, 9(1):77–92, Jan 2008.
- [ORW04] Raimund J Ober, Sripad Ram, and E Sally Ward. Localization accuracy in single-molecule microscopy. *Biophys J*, 86(2):1185–200, Feb 2004.
- [POT<sup>+</sup>91] D K Palmer, K O’Day, H L Trong, H Charbonneau, and R L Margolis. Purification of the centromere-specific protein cenp-a and demonstration that it is a distinctive histone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9):3734–8, May 1991.
- [Pre10] Sebastian Pres. Aufbau und kalibrierung eines zweifarbenlokalisationsmikroskops. Bachelorarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2010.
- [Ray96] L. Rayleigh. On the theory of optical images, with special reference to the microscope. *Philosophical Magazine*, 42:167–195, 1896.
- [RBG<sup>+</sup>08] Jürgen Reymann, David Baddeley, Manuel Gunkel, Paul Lemmer, Werner Stadter, Thibaud Jegou, Karsten Rippe, Christoph Cremer, and Udo J Birk. High-precision structural analysis of subnuclear complexes in fixed and live cells via spatially modulated illumination (smi) microscopy. *Chromosome Res*, 16(3):367–82, Jan 2008.

- [RBZ06] Michael J Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nat Methods*, 3(10):793–5, Oct 2006.
- [Rey08] Jürgen Reymann. *Entwicklung eines SMI-Mikroskops zur Präzisions-Strukturanalyse in vitalen biologischen Systemen*. Dissertation, Universität Bielefeld, 2008.
- [RSR<sup>+</sup>07] Karsten Rippe, Anna Schrader, Philipp Riede, Ralf Strohner, Elisabeth Lehmann, and Gernot Längst. Dna sequence- and conformation-directed positioning of nucleosomes by chromatin-remodeling complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(40):15635–40, Oct 2007.
- [RVD<sup>+</sup>10] Susana Abreu Ribeiro, Paola Vagnarelli, Yimin Dong, Tetsuya Hori, Bruce F McEwen, Tatsuo Fukagawa, Cristina Flors, and William C Earnshaw. A super-resolution map of the vertebrate kinetochore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, May 2010.
- [SC05] Michael R Speicher and Nigel P Carter. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*, 6(10):782–92, Oct 2005.
- [SCC<sup>+</sup>07] Carsten Sachse, James Z Chen, Pierre-Damien Coureux, M Elizabeth Stroupe, Marcus Fändrich, and Nikolaus Grigorieff. High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus. *J Mol Biol*, 371(3):812–35, Aug 2007.
- [Sco98] Craig Scott. *Introduction to Optics and Optical Imaging*. Wiley, 1998.
- [SGGB08] Hari Shroff, Catherine G Galbraith, James A Galbraith, and Eric Betzig. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat Methods*, 5(5):417–23, May 2008.
- [SHM94] K F Sullivan, M Hechenberger, and K Masri. Human cenp-a contains a histone h3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *The Journal of Cell Biology*, 127(3):581–92, Nov 1994.
- [SR10] Carissa M Soto and Banahalli R Ratna. Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 21(4):426–38, Aug 2010.

- 
- [SVHS05] Daniel Sinnecker, Philipp Voigt, Nicole Hellwig, and Michael Schaefer. Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins. *Biochemistry*, 44(18):7085–94, May 2005.
- [SWP<sup>+</sup>09] Roman Schmidt, Christian A Wurm, Annedore Punge, Alexander Egner, Stefan Jakobs, and Stefan W Hell. Mitochondrial cristae revealed with focused light. *Nano Lett*, 9(6):2508–10, Jun 2009.
- [TCKW09] Koichi Tanaka, Hui Li Chang, Ayano Kagami, and Yoshinori Watanabe. Cenp-c functions as a scaffold for effectors with essential kinetochore functions in mitosis and meiosis. *Dev Cell*, 17(3):334–43, Sep 2009.
- [TLW02] Russell E Thompson, Daniel R Larson, and Watt W Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J*, 82(5):2775–83, May 2002.
- [TNK<sup>+</sup>01] Y Tanaka, O Nureki, H Kurumizaka, S Fukai, S Kawaguchi, M Ikuta, J Iwahara, T Okazaki, and S Yokoyama. Crystal structure of the cenp-b protein-dna complex: the dna-binding domains of cenp-b induce kinks in the cenp-b box dna. *EMBO J*, 20(23):6612–8, Dec 2001.
- [Trä07] F. Träger. *Springer handbook of lasers and optics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
- [Tsi98] R Y Tsien. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67:509–44, Jan 1998.
- [vdLEM<sup>+</sup>09] Sebastian van de Linde, Ulrike Endesfelder, Anindita Mukherjee, Mark Schüttpelz, Gerd Wiebusch, Steve Wolter, Mike Heilemann, and Markus Sauer. Multicolor photoswitching microscopy for subdiffraction-resolution fluorescence imaging. *Photochem Photobiol Sci*, 8(4):465–9, Apr 2009.
- [vdLKHS08] Sebastian van de Linde, Robert Kasper, Mike Heilemann, and Markus Sauer. Photoswitching microscopy with standard fluorophores. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, Jan 2008.
- [vdLSH08] Sebastian van de Linde, Markus Sauer, and Mike Heilemann. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging of proteins in the mitochondrial inner membrane with photoswitchable fluorophores. *J Struct Biol*, 164(3):250–4, Dec 2008.
- [VWS02] B. Valeur, J. Wiley, and I. Sons. *Molecular fluorescence*. Wiley-VCH Weinheim, 2002.

- [WG10] Christopher L Woodcock and Rajarshi P Ghosh. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5):a000596, May 2010.
- [WHvdL<sup>+</sup>10] Richard Wombacher, Meike Heidbreder, Sebastian van de Linde, Michael P Sheetz, Mike Heilemann, Virginia W Cornish, and Markus Sauer. Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. *Nat Methods*, 7(9):717–9, Sep 2010.
- [Wik] Wikipedia. <http://www.wikipedia.org/>.
- [WMD<sup>+</sup>10] Zhenyu Wu, Anna Mueller, Sven Degenhard, S Emil Ruff, Fania Geiger, Alexander M Bittner, Christina Wege, and Carl E Krill. Enhancing the magnetoviscosity of ferrofluids by the addition of biological nanotubes. *ACS Nano*, 4(8):4531–8, Aug 2010.
- [WZM<sup>+</sup>10] Z Wu, R Zierold, A Mueller, S Ruff, and C Ma. . . . Preparation and magnetoviscosity of nanotube ferrofluids by viral scaffolding and ald on porous templates. *physica status solidi . . .*, 2010.
- [YAM<sup>+</sup>00] Kinya Yoda, S Ando, S Morishita, K Houmura, K Hashimoto, K Takeyasu, and T Okazaki. Human centromere protein a (cenp-a) can replace histone h3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(13):7266–71, Jun 2000.
- [YAO<sup>+</sup>98] K Yoda, S Ando, A Okuda, A Kikuchi, and T Okazaki. In vitro assembly of the cenp-b/alpha-satellite dna/core histone complex: Cenp-b causes nucleosome positioning. *Genes Cells*, 3(8):533–48, Aug 1998.
- [YNL<sup>+</sup>05] Hyunmin Yi, Saira Nisar, Sang-Yup Lee, Michael A Powers, William E Bentley, Gregory F Payne, Reza Ghodssi, Gary W Rubloff, Michael T Harris, and James N Culver. Patterned assembly of genetically modified viral nanotemplates via nucleic acid hybridization. *Nano Lett*, 5(10):1931–6, Oct 2005.
- [YWss] Christoph Cremer Yanina Weiland, Paul Lemmer. Combining fish with localization microscopy. *Chromosome Res*, in press.
- [YWUD08] Mark Young, Debbi Willits, Masaki Uchida, and Trevor Douglas. Plant viruses as biotemplates for materials and their use in nanotechnology. *Annu Rev Phytopathol*, 46:361–84, Jan 2008.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen herzlich danken, die in vielfältiger Weise zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders danke ich:

Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer für die Möglichkeit, in einem der meines Erachtens momentan interessantesten Bereiche der Biophysik zu forschen und das große Interesse, die stete Betreuung, Beratung und Unterstützung während meiner Dissertation.

Prof. Dr. Markus Sauer für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe im Fachbereich 'Angewandte Laserphysik & Laserspektroskopie' und die unkomplizierte Betreuung.

Margund Bach, die mir bei jedem Problem weiterhelfen konnte und mich während der ganzen Zeit tatkräftig unterstützte.

Dr. Roman Amberger und Dr. David Baddeley für viele gute Ratschläge, Diskussionen und Ideen.

Prof. Dr. Michael Hausmann für seine Unterstützung und immer hilfreiche konstruktive Kritik.

Allen meinen Mitarbeitern für viele fachbezogene und ein paar fachfremde Diskussionen, vielfältige Unterstützung mit Rat und Tat und ein erstklassiges Arbeitsklima (alphabetisch nach Vornamen geordnet): Christoph Hörmann, Daniel Paech, Gerrit Best, Dr. Götz Pilarczyk, Heinz Eipel, Dr. Jürgen Reymann, Dr. Jutta Schwarz-Finsterle, Patrick Müller, Dr. Paul Lemmer, Rainer Kaufmann, Sebastian Pres, Sven Beichmanis, Thomas Ruckelshausen, Wei Jiang, Wlaldimir Schaufler, Yanina Weiland und Yiming Li.

Allen externen Kooperationspartnern, mit denen ich während meiner Dissertation zusammenarbeiten durfte, für ihr Interesse an meiner Arbeit, interessanten Einblicken in ihre Forschungsgebiete und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Daniela Hellwig, Christian Weber, Volker Döring und Prof. Dr. Diekmann, Fa-

bian Erdel und Prof. Dr. Karsten Rippe, Yolanda Markarki, Dr. Hilmar Strickfaden und Prof. Dr. Thomas Cremer, sowie Sven Degenhardt und Dr. Christina Wege.

Meinen Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung, ohne welche diese Dissertation nie hätte zustande kommen können.

Meiner lieben Steffi.