

# Inaugural Dissertation

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

vorgelegt von

**Thomas Ruckelshausen**

aus Darmstadt

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 2011



**Lichtoptische Nanoskopie von Biostrukturen mit fokussierter, strukturierter und homogener Beleuchtung**

Diese Doktorarbeit wurde von Thomas Ruckelshausen ausgeführt am

**Kirchhoff-Institut für Physik in Heidelberg**

**Gutachter:**

**Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer**

**Prof. Dr. Michael Hausmann**





## Kurzfassung

### Lichtoptische Nanoskopie von Biostrukturen mit fokussierter, strukturierter und homogener Beleuchtung

Es wurden in jüngster Vergangenheit verschiedene Methoden der laseroptischen Fernfeldmikroskopie entwickelt, mit denen es möglich ist, biologische Strukturen zu analysieren, die deutlich unterhalb der klassischen optischen Auflösungsgrenze liegen. In dieser Arbeit wurden die drei physikalisch unterschiedlichen Verfahren 4Pi-Mikroskopie, „Spatially Modulated Illumination“ (SMI)-Mikroskopie und Lokalisationsmikroskopie angewandt. Es wurden die Abbildungseigenschaften des 4Pi-Mikroskops an fluoreszenten Nanokugeln und biologischen Präparaten charakterisiert. Mithilfe von SMI-Mikroskopie konnte die Ausdehnung von Rezeptoranhäufungen in *Escherichia coli*-Bakterien in Richtung der optischen Achse untersucht werden. Intrinsische Eigenschaften der Fluorophore konnten in der Lokalisationsmikroskopie mit einer Anregungswellenlänge von 488 bzw. 647nm dazu genutzt werden, deren Signale zeitlich voneinander zu trennen und ihre laterale Position zu bestimmen. Mit dieser Methode wurden statistische Distanzanalysen an unterschiedlichen Rezeptorproteinen in *Escherichia coli*-Bakterien im Vergleich mit simulierten Zufallsverteilungen durchgeführt. Die kleinsten gemessenen intermolekularen Distanzen lagen im Bereich von einigen zehn Nanometern. Die Standardabweichungen der Mittelwerte der Distanzverteilungen lagen dabei im einstelligen Nanometerbereich. Am Motorproteinkomplex der Flagellen von *Escherichia coli*-Bakterien wurden die Größen zweier Ringstrukturen (ca. 25 und 40nm im Durchmesser) statistisch untersucht. Durch Simulationen der Motorproteinverteilungen wurde der Einfluss der Lokalisationsgenauigkeit und der Detektionseffizienz analysiert. Bei Membrananalysen an *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten erhielt man mithilfe von Bildverarbeitung von Daten der Lokalisationsmikroskopie eine Abschätzung der Distanz zwischen innerem Membrankomplex und äußerer Membran in diesen Parasiten in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen aus der Elektronenmikroskopie. Bei der Analyse der Verteilung der Histon H3 Tri-methylierung an Lysin 9 in embryonalen Stammzellen der Maus wurden Vergleiche zwischen einer Wildtyp-Zelllinie und einer *knockout*-Zelllinie des *Polycomb*-Gens EED realisiert.

---

## Abstract

### Photo-optical nanoscopy of biological structures with focussed, structured and homogeneous illumination

Recently different methods of laser optical far field microscopy have been developed, which make it possible to analyze biological structures beyond the classical limit of optical resolution. In this thesis the three physically different approaches 4Pi-microscopy, „Spatially Modulated Illumination“ (SMI)-microscopy and localization microscopy have been used. The imaging properties of the 4Pi-microscope were characterized on fluorescent nanospheres and biological samples. With SMI-microscopy the extension of clusters of receptor proteins in *Escherichia coli* bacteria could be examined in direction of the optical axis. Intrinsic properties of the fluorophores could be used in localization microscopy with wavelength of the excitation light of 488 or 647nm to separate their signal in time and to determine their lateral position. With this method statistical distance analysis of different receptor proteins in *Escherichia coli* bacteria in comparison with simulated random distributions have been performed. The smallest resolved inter molecule distances measured were in the range of few tens of nanometer. The standard deviations of the mean distances were in the range of single-digit nanometers. At the motor protein complex of the flagella of *Escherichia coli* the size of two ring structures (ca. 25 and 40nm in diameter) were statistically examined. The influence of localization accuracy and detection efficiency were analyzed by simulations of the motor protein distribution. Membrane analysis of *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten by image processing of localization microscopy data lead to an estimation for the distance between the inner membrane complex and the outer membrane in these parasites in good agreement with results of electron microscopy. By analysis of the distribution of the histone H3 tri-methylation at lysine 9 in embryonal mice cells comparative studies between a wild type cell line and a *knockout* cell line of the *Polycomb*-gene EED were realized.

---

„Willst du dich am Ganzen erquicken,  
So mußt du das Ganze im Kleinsten erblicken.“  
*Johann Wolfgang von Goethe*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Motivation . . . . .	1
1.2. Von konfokaler Laserrastermikroskopie zu hochauflösenden Mikroskopie-Methoden . . .	2
<b>2. Physikalische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1. Punktbildfunktion und Auflösung . . . . .	3
2.1.1. Die Punktbildfunktion der Weitfelddetektion . . . . .	3
2.1.2. Die klassische Beugungsgrenze der optischen Auflösung . . . . .	3
2.2. Optische Transferfunktion und Frequenzraum . . . . .	5
2.3. Fluoreszenz . . . . .	6
2.4. Hochauflösende Mikroskopiemethoden . . . . .	8
2.4.1. Konfokale Mikroskopie . . . . .	8
2.4.2. 4PI-Mikroskopie . . . . .	9
2.4.3. SMI-Mikroskopie . . . . .	15
2.4.4. Lokalisationsmikroskopie . . . . .	17
<b>3. Biologische Grundlagen</b>	<b>25</b>
3.1. Molekülmarkierung in der Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	25
3.1.1. Fluoreszente Proteine . . . . .	25
3.1.2. Immunfluoreszenz . . . . .	27
3.2. Aktinfilamente als Bestandteil des Cytoskeletts . . . . .	29
3.3. Kernporenkomplexe . . . . .	31
3.4. Chemotaxis in <i>Escherichia coli</i> . . . . .	32
3.5. <i>Toxoplasma gondii</i> Tachyzoiten . . . . .	35
<b>4. Nanoskopie mit fokussierter Beleuchtung: 4Pi Mikroskopie</b>	<b>37</b>
4.1. Messungen an fluoreszenten Nanokugeln . . . . .	37
4.2. Physikalisch technische Herausforderungen . . . . .	41
4.3. Messungen an biologischen Präparaten . . . . .	44
4.3.1. Messungen von F-Aktin . . . . .	44
4.3.2. Messungen von Kernporenkomplexen in MCF7-Zellen . . . . .	46
<b>5. Nanoskopie mit strukturierter Beleuchtung: SMI</b>	<b>53</b>
5.1. Experimenteller Aufbau des SMI Vertico . . . . .	53
5.2. SMI Mikroskopie . . . . .	54
5.2.1. Rezeptorproteine in <i>E. coli</i> Bakterien . . . . .	54

<b>6. Nanoskopie mit homogener Beleuchtung: Lokalisationsmikroskopie</b>	<b>57</b>
6.1. Rezeptorproteine in <i>E. coli</i> Bakterien . . . . .	57
6.1.1. Untersuchung der Substruktur von Rezeptorclustern des Proteins CheZ . . . . .	57
6.1.2. Distanzverteilung des Rezeptorproteins CheW . . . . .	60
6.1.3. Distanzverteilung des Rezeptorproteins CheA . . . . .	64
6.1.4. Distanzverteilung bei Negativkontrollen . . . . .	68
6.2. Motorproteine in <i>E. coli</i> Bakterien . . . . .	74
6.3. Simulationen zu Motorproteinen in <i>E. coli</i> Bakterien . . . . .	83
6.4. Alexa Fluor 647 Succinimidyl Ester an Deckglas gebunden . . . . .	86
6.5. Membrananalysen an <i>Toxoplasma gondii</i> Tachyzoiten . . . . .	89
6.6. Analyse der Verteilung der Histon H3 Tri-methylierung an Lysin 9 in embryonalen Stammzellen der Maus . . . . .	94
<b>7. Zusammenfassung und Diskussion</b>	<b>99</b>
<b>8. Ausblick</b>	<b>105</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>107</b>
A.1. Protokoll der Präparation von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	107
A.1.1. Ansetzen der Bakterienkultur . . . . .	107
A.1.2. Objektpräparation auf Agarose . . . . .	107
A.1.3. Objektpräparation mit Poly-L-Lysin . . . . .	108
A.1.4. Fixierung mit Paraformaldehyd . . . . .	108
A.2. Leica TCS 4Pi- Spezifikationen . . . . .	109
Literaturverzeichnis . . . . .	119

# 1. Einleitung

## 1.1. Motivation

Jegliche Form lebender Organismen basiert auf einem komplexen Zusammenschluss einzelner Zellen und auf ihrer Wechselwirkung im Zellverband. Daher ist man im Bereich der Lebenswissenschaften von jeher an dem Verständnis dieser Grundbausteine und ihrer einzelnen Kompartimente interessiert. Die Größenordnung von Zellen liegt im Mikrometerbereich, weshalb die Mikroskopie seit ihrer Entdeckung eine wesentliche Rolle bei der Erweiterung der Kenntnisse über zellinterne Strukturen spielt. Die erreichbare Auflösung ist jedoch bei optischer Fernfeld-Mikroskopie aufgrund der Wellennatur des Lichts durch die Beugung begrenzt. Diese Auflösungsgrenze, die bereits im Jahr 1873 von Ernst Abbe [Abb73] theoretisch beschrieben wurde, ist proportional zur Hälfte der Wellenlänge der elektro-magnetischen Strahlung. Eine Möglichkeit, die Auflösung abbildender System zu verbessern, besteht demnach darin, die Wellenlänge der Strahlung zu verringern. Dieser Ansatz wird bei der Elektronenmikroskopie verfolgt. Die Wellenlänge von Materiewellen ist abhängig von ihrem Impuls. Damit lassen sich in der Elektronenmikroskopie Auflösungen im einstelligen Angström-Bereich erzielen, was in der Größenordnung einzelner Moleküle liegt. Für eine Vielzahl biologischer Fragestellungen besitzt die Elektronenmikroskopie (EM) jedoch einige Nachteile gegenüber optischer Mikroskopie. So erfordert sie das Betrachten der Probe im Vakuum und ist bei Transmissions-EM auf sehr dünne Zellschnitte beschränkt, was die Analyse strukturell intakter Systeme sowie dynamischer Prozesse ausschließt. Somit bestand auch nach der Entwicklung der Elektronenmikroskopie noch der Bedarf an alternativen optischen Mikroskopieverfahren. Zumal bereits in einem Größenbereich, welcher geringfügig unterhalb der klassischen Auflösungsgrenze liegt, biologisch ungeklärte Fragen auftreten.

Der mit klassischer optischer Durchlichtmikroskopie erreichbare Kontrast ist von intrinsischen absorbierenden Eigenschaften der Probe abhängig. Zur Beobachtung von Objekten mit geringem Amplitudenkontrast wurde die Phasenkontrastmikroskopie entwickelt. Aber auch hierbei lässt sich der Kontrast einzelner Zellkompartimente nicht beeinflussen. Erst die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie machte es möglich, einzelne zellinterne Strukturen mit fluoreszenten Farbstoffen zu markieren, sie mit Laserlicht der entsprechenden Absorptionswellenlänge zur Fluoreszenz anzuregen und mit sensitiven Kameras zu detektieren. Das bestehende Interesse an Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie zeigt sich an der Tatsache, dass die Verfahren zur spezifischen Fluoreszenzmarkierung biologischer Strukturen konsequent weiterentwickelt wurden. So ermöglicht die Fluoreszenz In-Situ-Hybridisierung (FISH) zum Beispiel die direkte Markierung von spezifischen Gensequenzen der DNA [BFA95], [SBW96]. Damit kann durch gentechnische Veränderungen die Zelle dazu veranlasst werden, das zu beobachtende Protein mitsamt der Fluoreszenzmarkierung selbst herzustellen. Diese Methode erspart das Einbringen fluoreszenter Proteine von außen in die Zelle [LSP03]. Ermöglichen diese Fortschritte die Fluoreszenzmarkierung einzelner Moleküle, so verlangen sie optische Abbildungssysteme, die diese Strukturen auflösen können. Im nächsten Abschnitt werden verschiedene Verfahren vorgestellt, mit denen Strukturen untersucht werden können, deren Größe unterhalb der konventionellen Beugungsgrenze liegt.

## 1.2. Von konfokaler Laserrastermikroskopie zu hochauflösenden Mikroskopie-Methoden

Die laterale Auflösung ist proportional zur reziproken Numerischen Apertur (NA)<sup>1</sup>, welche als Produkt von Brechungsindex und halbem Öffnungswinkel des Objektivs definiert ist. Eine grundlegende Auflösungsverbesserung kann somit durch den Einsatz von hochnumerischen Objektiven und die Verwendung von Öl als Immersionsmedium zwischen Deckglas und Objektiv erreicht werden. Mithilfe des konfokalen Laserrastermikroskops (engl.: *Confocal Laser-Scanning Microscope*, CLSM) war es erstmalig möglich, das von außerhalb der Fokusebene kommende Fluoreszenzlicht abzublocken und somit eine Erhöhung des Kontrasts zu erreichen. Zudem erlaubt das CLSM die Aufnahme optischer Schnitte und mit der damit möglichen dreidimensionalen Rekonstruktion Einblicke in die räumliche Struktur der markierten Proteine. Allerdings ist die Auflösung des Konfokalmikroskops auf etwa 200nm in lateraler und ca. 550nm in axialer Richtung beschränkt [Paw95]. Zur Visualisierung noch kleinerer Strukturen wurde eine Reihe lichtoptischer Abbildungsmethoden entwickelt.

Beim 4Pi-Mikroskop wird die NA durch den zusätzlichen Einsatz eines zweiten Objektivs weiter erhöht, indem die Foki der beiden Objektive überlagert werden. Dies führt zu einer erhöhten axialen Auflösung von ca. 110nm. Bei Methoden der strukturierten Beleuchtung wie SWM oder SMI wird durch eine räumlich modulierte Beleuchtung der vom Objekt übertragene Bereich an Raumfrequenzen erhöht, was den Informationsgehalt über kleine Strukturen des Objekts steigert. Mit der SMI-Mikroskopie können Größen mit einer effektiven Sensitivität von 30-200nm bestimmt und relative axiale Positionen und Distanzen präzise gemessen werden [AFHC01], [FSA<sup>+</sup>02], [HRS<sup>+</sup>05], [MFS<sup>+</sup>04], [MBW<sup>+</sup>06]. Mit lateral strukturierter Beleuchtung wird eine Auflösungsverbesserung um den Faktor von ungefähr zwei erreicht [HC99], [Gus99], [Gus00], [Gus05].

Außerdem können nichtlineare Prozesse der Fluoreszenz dazu genutzt werden, eine Auflösungsverbesserung zu erreichen. So kann bei strukturierter Beleuchtung durch Sättigung der Fluoreszenz eine Verbesserung der Auflösung erzielt werden [HJC02]. Bei STED wird der nichtlineare Effekt der stimulierten Emission dazu verwendet, die Breite der Punktbildfunktion des optischen Systems zu verringern. Hierbei werden die am Rand des Fokus liegenden Fluorophore nach ihrer Anregung durch eine darauffolgende Beleuchtung mit einem torus-förmigen Laserstrahl wieder stimuliert abgeregt.

Bei Methoden der Lokalisationsmikroskopie werden die Positionen einzelner Fluoreszenzmoleküle gemessen, indem die Farbstoffe nacheinander in den fluoreszenten Zustand gebracht werden. Hierbei hängt die Genauigkeit in der Positionsbestimmung hauptsächlich von der Anzahl der pro Molekül detektierten Photonen ab. Ist die Ereignisdichte hoch genug, kann bei entsprechend guter Lokalisationsgenauigkeit eine Strukturauflösung im Nanometerbereich erzielt werden.

---

<sup>1</sup>die axiale Auflösung ist proportional zu  $1/NA^2$



## 2. Physikalische Grundlagen

### 2.1. Punktbildfunktion und Auflösung

#### 2.1.1. Die Punktbildfunktion der Weitfelddetektion

In der Mikroskopie werden Objekte aus der Objektebene in die Bildebene abgebildet. Da die hierbei verwendeten Linsen stets einen begrenzten Durchmesser besitzen, kommt es aufgrund der Wellennatur des Lichts zur Beugung an dieser Apertur. Ein Punkt des Objektes kann daher nicht als Punkt, sondern nur als Beugungsscheibe, die sogenannte Airy-Disk, abgebildet werden. Diese Abbildung wird auch als Punktbildfunktion (engl.: *Point Spread Function*, PSF) bezeichnet. Es muss bei der Betrachtung der Punktbildfunktion zwischen lateraler (senkrecht) und axialer (parallel zur optischen Achse des Systems) Richtung unterschieden werden. In lateraler Richtung wird die PSF durch

$$\rho = \frac{2 \cdot \pi \cdot NA \cdot (r - r_0)}{\lambda} \quad (2.1.1)$$

$$I_{lat}|_{z=0} = \left( \frac{2 \cdot J_1(\rho)}{\rho} \right)^2 \quad (2.1.2)$$

mit dem Abstand  $r$ , der Position des Maximums  $r_0$ , der Numerische Apertur  $NA$  und der Wellenlänge  $\lambda$  beschrieben [Gu00]. Hierbei ist  $J_1$  die Besselfunktion erster Ordnung. Die PSF in axialer Richtung entspricht hingegen einer sinc-Funktion [Gu00]:

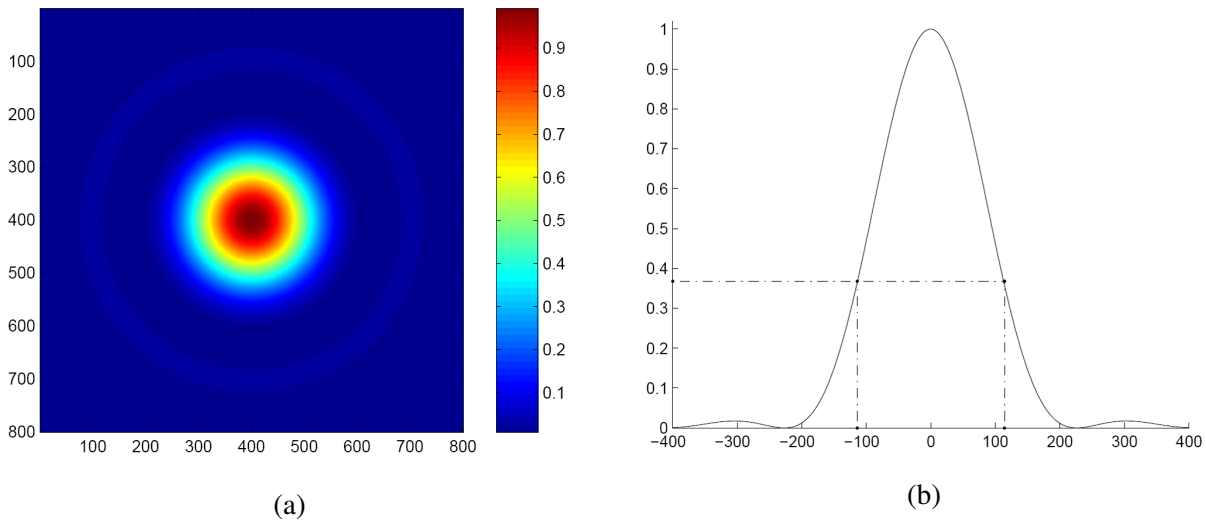
$$\varrho = \frac{2 \cdot \pi \cdot NA^2 \cdot (z - z_0)}{\lambda \cdot n_{medium}} \quad (2.1.3)$$

$$I_{ax}|_{r=0} = \left( \frac{\sin\left(\frac{\varrho}{4}\right)}{\frac{\varrho}{4}} \right)^2 \quad (2.1.4)$$

Abbildung 2.1.1 zeigt eine simulierte PSF bei Weitfelddetektion. Für die, aus dieser Verwischung der Objekte folgenden, klassischen Beugungsgrenze der optischen Auflösung gibt es verschiedene Definitionen, auf die im nächsten Abschnitt eingegangen werden soll.

#### 2.1.2. Die klassische Beugungsgrenze der optischen Auflösung

Aufgrund dieser Tatsache, dass ein Punkt durch ein optisches System nicht als idealer Punkt abgebildet werden kann, gibt es einen minimalen Abstand  $\Delta d$ , bei dem zwei Punkte noch als getrennte Objekte wahrgenommen werden können. Da in der Praxis eine stetige Änderung des Kontrastes vorherrscht, gibt es einen kontinuierlichen Übergang von strikt trennbaren bis hin zu nicht unterscheidbaren Objekten.



**Abbildung 2.1.1.:** (a) Simulierte laterale Punktbildfunktion (PSF) bei Weitfelddetektion mit  $NA=1,4$ ,  $\lambda = 520\text{nm}$ ,  $n=1,48$  (Fläche:  $800 \times 800\text{nm}^2$ ) und (b) laterale Intensitätsverteilung durch das Maximum der PSF [Amb08].

Aus diesem Grund gibt es in der Praxis keine universal gültige Formulierung der Auflösungsgrenze. Es gibt jedoch Kriterien, die ein Maß für die theoretisch erreichbare Auflösung sind.

Die von Ernst Abbe und Sir Rayleigh formulierten Grenzen der optischen Auflösung stammen bereits aus dem Ende des 19. Jahrhunderts [Abb73], [Ray96]. Nach dem *Kriterium von Abbe* ist die Grenze der beugungsbegrenzten Auflösung optischer Systeme gegeben durch die Relation:

$$\Delta d \geq \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (2.1.5)$$

und somit definiert über die Wellenlänge  $\lambda$ , den Brechungsindex  $n$  und den halben Öffnungswinkel  $\alpha$  der verwendeten Linse.

Nach dem *Rayleigh-Kriterium* sind zwei Punkte gerade noch voneinander zu trennen, wenn das Maximum der einen PSF auf dem ersten Minimum der PSF des anderen Punktes liegt. Diese Formulierung führt zu den Bedingungen:

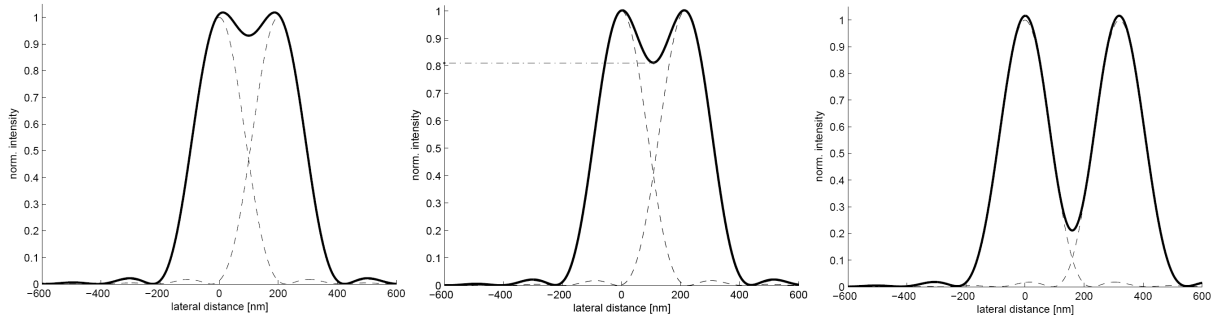
$$\Delta d_{lat} = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (2.1.6)$$

für die laterale und

$$\Delta d_{ax} = 2 \cdot \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (2.1.7)$$

für die axiale Richtung. Die Vorfaktoren sind durch die ersten Nullstellen der Besselfunktion von (2.1.2) bzw. von  $\text{sinc}(z)$  in (2.1.4) gegeben. Eine Veranschaulichung des Rayleigh-Kriterium zeigt Abbildung 2.1.2

Außerdem gibt es noch das *Sparrow-Kriterium* [Spa16], nach dem die erste und zweite Ableitung der



**Abbildung 2.1.2.:** Überlagerung der Intensitätsverteilungen zweier punktförmiger Objekte mit einem Abstand zueinander im Bereich der Auflösungsgrenze. Von links nach rechts ist das Rayleigh-Kriterium: nicht erfüllt, gerade erreicht und erfüllt [Amb08].

Intensität im Mittelpunkt zwischen den beiden punktförmigen Objekten verschwinden muss. Dies ist der Fall, wenn der Intensitätsabfall an dieser Stelle verschwindet.

An diesen Kriterien für die optische Auflösungsgrenze erkennt man, dass eine Auflösungsverbesserung im klassischen Sinne ausschließlich durch Verringerung der Wellenlänge und Vergrößerung der Numerischen Apertur möglich ist. Ersteres wird beim Einsatz von Elektronenmikroskopie umgesetzt und Letzteres durch die Verwendung von hochnumerischen Öl- oder Glyzerin-Objektiven.

Eine alternative Methode, das Auflösungsvermögen zu charakterisieren, ist durch die Halbwertsbreite (engl.: *full width at half maximum*, FWHM) der PSF gegeben. In der Astronomie spricht man hierbei vom Houston Kriterium [JBHS95]. Die FWHM sind definiert durch:

$$FWHM_{lat} = 0,52 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (2.1.8)$$

in lateraler und

$$FWHM_{ax} = 1,77 \cdot \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (2.1.9)$$

in axialer Richtung. Dies bedeutet anschaulich, dass Strukturen, die kleiner als ca. die halbe Wellenlänge des Anregungslichts sind, mit klassischen optischen Verfahren nicht mehr aufgelöst werden können.

## 2.2. Optische Transferfunktion und Frequenzraum

Die im vorhergehenden Abschnitt betrachtete Punktbildfunktion (PSF) ist die Abbildung eines unendlich kleinen Punktes durch das optische System. Ein Objekt kann nun als Zusammensetzung von einzelnen Punkten betrachtet werden, von denen jeder einzelne mit der PSF abgebildet wird. Bei der Abbildung durch das optische System wird demnach eine Kopie der PSF an jedem Punkt des Objektes mit dessen Amplitude gewichtet. Mathematisch kann dies durch die Faltung der PSF(x,y) mit dem Objekt o(x,y) beschrieben werden. Das Bild b(x,y) ergibt sich somit aus [Jäh05]:

$$b(x, y) = PSF(x, y) \otimes o(x, y), \text{ oder} \quad (2.2.1)$$

$$b(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} PSF(x - x', y - y') o(x', y') dx' dy' \quad (2.2.2)$$

Alternativ zur Betrachtung im Ortsraum, kann man das System auch im Frequenzraum beschreiben. Hierbei betrachtet man die vom System übertragenen Ortsfrequenzen. Der Übergang in den Frequenzraum geschieht über die Fouriertransformation, die beschrieben ist durch:

$$F(k_x, k_y) = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-i(k_x x + k_y y)} dx dy. \quad (2.2.3)$$

Während die entsprechende Rücktransformation durch

$$f(x, y) = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{\infty} F(k_x, k_y) e^{i(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y \quad (2.2.4)$$

definiert ist. Die Fouriertransformierte der PSF ist die Frequenzantwort, die sogenannte optische Transferfunktion (engl.: *Optical Transfer Function*, OTF) des Systems. Einer der Vorteile der Betrachtung im Frequenzraum ist, dass die Faltung im Ortsraum zur Multiplikation im Fourierraum wird. Mit Hilfe des Faltungstheorems gilt:

$$B(k_x, k_y) = FT(PSF(x, y) \otimes o(x, y)) \quad (2.2.5)$$

$$= FT(PSF) \cdot FT(o(x, y)) \quad (2.2.6)$$

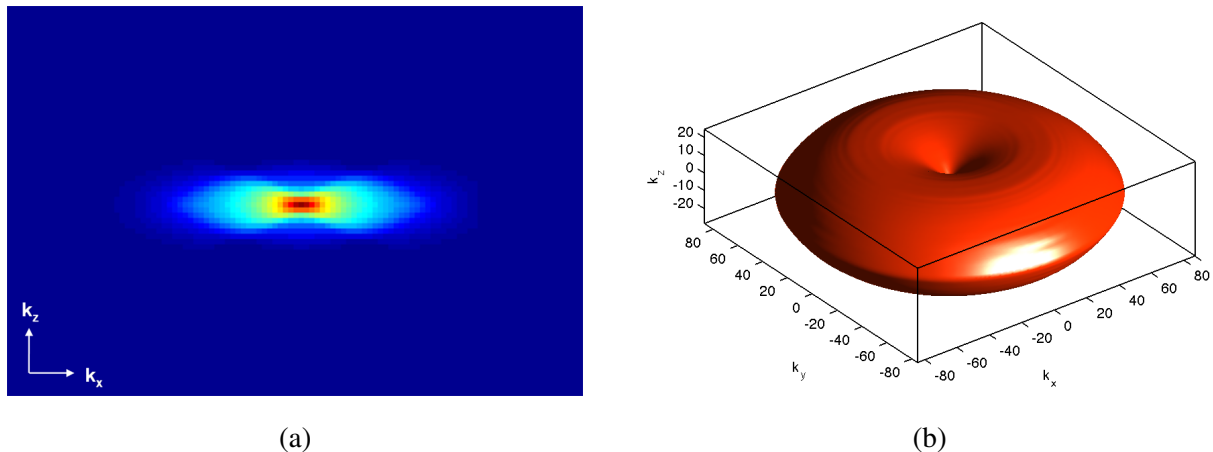
$$= OIF \cdot O(k_x, k_y) \quad (2.2.7)$$

Eine 3d-Simulation der OTF bei Weitfeld-Detektion findet sich in Abbildung 2.2.1. Deutlich zu erkennen ist die zum Ursprung spitz zulaufende Torus-Form der OTF. Raumfrequenzen, deren Wellenvektoren einen kleinen Winkel zur optischen Achse ( $k_z$ ) haben, werden nicht übertragen. Dies wird als 'missing-cone'-Problem bezeichnet und kann im Bereich der Strukturierten Beleuchtung z.B durch Dreistrahlinterferenz behoben werden [Uri08].

Betrachtet man die Auflösung eines optischen Systems im Ortsraum, so ist die Auflösung des Systems umso besser, je schärfer die zugehörige PSF ist, d.h. je weniger die einzelnen Punkte bei der Abbildung verschmiert werden. Betrachtet man die Auflösung hingegen im Frequenzraum, so ist das umgekehrte der Fall. Je breiter die OTF, d.h. je mehr Raumfrequenzen übertragen werden, desto detailgetreuer wird das Objekt abgebildet. Dies ist der Fall, da die Information über die kleinen Strukturen und scharfen Kanten in den hohen Frequenzen steckt.

## 2.3. Fluoreszenz

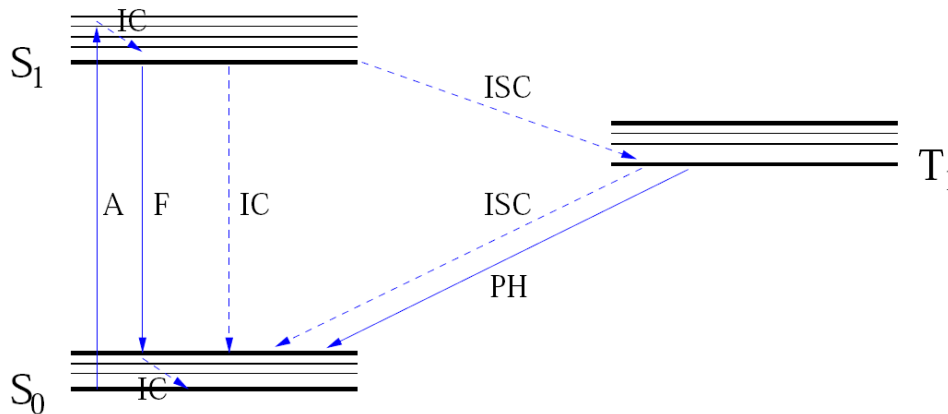
Mit Hilfe der Fluoreszenz ist es in der optischen Mikroskopie biologischer Präparate möglich, unabhängig vom in der konventionellen Durchlichtmikroskopie erforderlichen Amplituden- bzw. Phasen-



**Abbildung 2.2.1.:** (a)  $k_x$ - $k_z$ -Schnitt einer konfokalen Optischen Transferfunktion (OTF) (b) 3d-Simulation einer OTF bei Weitfeld-Detektion. Die OTF gibt an welche Raumfrequenzen durch das optische System übertragen werden (Achsen um  $2,2 \cdot 10^{-4} \text{nm}^{-1}$  skaliert) [Gun11].

kontrast (in der Phasenkontrastmikroskopie) des Präparates, gezielt bestimmte Proteine innerhalb der Zelle zu markieren und zu untersuchen. Der hierbei zugrundeliegende Prozess [CSW07], [VWS02] ist in dem vereinfachten Jablonski-Energiediagramm in Abbildung 2.3.1 schematisch dargestellt. Die quantenmechanisch erlaubten Übergänge sind mit Pfeilen markiert. Bei Einfall eines Photons, dessen Energie der Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand  $S_0$  und einem der energetisch höher liegenden Schwingungszustände  $S_1$  entspricht, kann dieses absorbiert werden, indem das Farbstoffmolekül von  $S_0$  in den entsprechenden Energiezustand  $S_1$  übergeht. Für die Energie des Photons muss demnach die Bedingung  $\Delta E = h\nu$  erfüllt sein. Diese Absorption erfolgt innerhalb von Femtosekunden. Bei Zimmertemperatur gibt das Molekül innerhalb von Picosekunden durch Stöße Energie an Nachbarmoleküle oder Atome ab und relaxiert in den energieärmsten Schwingungszustand von  $S_1$ . Von dort kann es über den umgekehrten Prozess durch spontane Emission eines Fluoreszenzphotons in einen beliebigen Schwingungszustand von  $S_0$  zurückkehren. Hierbei entspricht die Energie des emittierten Photons wiederum der Energiedifferenz der beiden beteiligten Energieniveaus. Der Prozess dieser spontanen Emission erfolgt im Bereich von Nanosekunden, wohingegen die Relaxation aus einem  $S_0$ -Schwingungszustand in den Grundzustand innerhalb von Picosekunden geschieht. Durch den durch Stöße erfolgten Energieverlust, besitzt das emittierte Photon eine etwas geringere Energie als das einfallende Photon. Diese Energiedifferenz zeigt sich in der Rotverschiebung des Emissionslichts um ca. 20-50nm gegenüber dem Anregungslicht. Dieser als *Stokes-Verschiebung* bezeichnete Effekt wird in der Fluoreszenzmikroskopie dazu verwendet, um das Fluoreszenzlicht vor der Detektion mit entsprechenden dichroitischen Filtern spektral vom Anregungslicht zu trennen.

Neben der spontanen Emission eines Photons existieren noch strahlungslose Übergänge. Das Molekül kann entweder über innere Konversion (IC) vom  $S_1$ -Zustand in den Grundzustand zurückkehren oder über das sogenannte *Inter System Crossing* (ISC) in den Triplettzustand  $T_1$  übergehen, der aufgrund der quantenmechanischen Auswahlregeln nicht direkt vom Grundzustand aus erreichbar ist. Von dort gibt es wiederum die Möglichkeit des strahlungsfreien Übergangs durch ISC zurück in den Grundzustand oder der Übergang unter Aussendung eines Phosphoreszenz-Photons. Aufgrund dieser alternativen Prozesse zur Fluoreszenz liegt die Quanteneffizienz der Fluorophore bei einem Wert von  $\eta \approx 0,8$ .



**Abbildung 2.3.1.:** Jablonski-Energiediagramm eines organischen Farbstoffmoleküls. Die quantenmechanisch erlaubten Übergänge zwischen dem Grundzustand  $S_0$ , dem 1. angeregten Zustand  $S_1$  und dem Tripletzustand  $T_1$  und ihren Schwingungsniveaus sind mit Pfeilen markiert. Strahlungsprozesse sind mit durchgezogenen Pfeilen markiert, während gestrichelte Linien strahlungslose Übergänge symbolisieren. (A: Absorptionsvorgänge, F: Fluoreszenz, PH: Phosphoreszenz, IC: Innere Konversion und ISC: Inter System Crossing [Rey07]).

## 2.4. Hochauflösende Mikroskopiemethoden

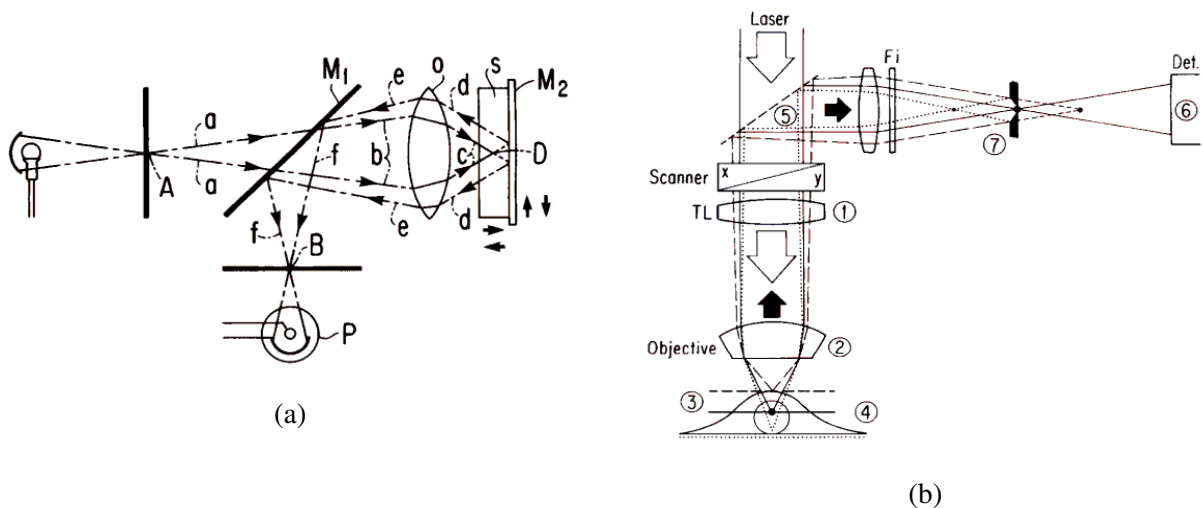
In jüngster Vergangenheit wurden eine Reihe von Methoden entwickelt, um Strukturen unterhalb der klassischen optischen Auflösungsgrenze abzubilden. In diesem Kapitel sollen die in dieser Arbeit verwendete Methode, die 4PI-, die SMI- sowie die Lokalisations-Mikroskopie genauer beschrieben werden. Eine der ersten Mikroskopiemethoden mit verbesserter Auflösung und erhöhtem Kontrast war die bereits 1957 von Minsky entwickelte konfokale Mikroskopie [Min]. Aufgrund ihrer weiten Verbreitung in der heutigen biologischen Anwendung und ihrer Bedeutung für nachfolgende Verfahren der hochauflösenden Mikroskopie mit fokussierter Beleuchtung, wird zunächst auf das Grundprinzip der konfokalen Mikroskopie eingegangen.

### 2.4.1. Konfokale Mikroskopie

Nach dem Patent von Minsky dauerte es noch bis in die siebziger Jahre, bis detaillierte Untersuchungen der Abbildungseigenschaften der konfokalen Mikroskopie zeigten, dass die laterale Auflösung im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie um den Faktor 1,4 besser ist [SC77]. 1979 veröffentlichte Brakenhoff die ersten konfokalen Aufnahmen mit Objektiven hoher numerischer Apertur [BBB79]. Die ersten Überlegungen einer Anwendung von Lasern auf fluoreszierende Objekte wurden 1978 von Cremer et al. [CC78] und 1982 von Cox et al. [CSW82] veröffentlicht. Das erste Laserraster-Mikroskop (engl.: *Confocal Laser-Scanning Microscope*, CLSM) und die erste Anwendung auf biologische Präparate wurde 1985 von Brakenhoff et al. [BVS<sup>+</sup>85] und Carlsson et al. [Car85] vorgestellt.

Im Unterschied zur konventionellen Mikroskopie wird in der konfokalen Mikroskopie das Objekt punktweise abgerastert. Abbildung 2.4.1 zeigt den konfokalen Strahlengang im Epi-Mikroskop (a) und im CLSM (b) im Vergleich. Die Konfokalität im Strahlengang (Abb. 2.4.1 a) besteht zwischen der Eintrittspupille A, dem Punkt D in der Probe S und der Austrittspupille B. Der Beleuchtungsstrahl a-b-c wird durch den dichroitischen Spiegel M1 transmittiert, während der Strahl d-e, der die Probe durchleuchtet

hat und vom Spiegel M2 reflektiert wurde, von M1 zum Detektor (die Photozelle P.) reflektiert wird. Nur das Licht, welches aus dem Fokus D kommt, gelangt durch die Austrittspupille B und wird von der Photozelle P. detektiert. Hierdurch wird Licht, welches aus Regionen außerhalb des Fokus kommt, abgeblockt, während es in konventioneller Mikroskopie nur verschmiert wird [SW78]. Diese Eigenschaft der Tiefendiskriminierung ermöglicht es, durch eine schrittweise axiale Verschiebung und erneute Rasterung der Probe einen Bildstapel aufzunehmen. Anhand dieses Bildstapels lässt sich eine 3-dimensionale Aufnahme des Objektes rekonstruieren.



**Abbildung 2.4.1.:** (a) Skizze des optischen Weges im konfokalen Mikroskop mit epi-Beleuchtung (nach [Min]). (b) Das Prinzip der Konfokalität erzeugt im Strahlengang eines konfokalen Laserraster-Mikroskops (engl.: *Confocal Laser-Scanning Microscope*, CLSM) eine Tiefendiskriminierung (Bild von Dr. Kapitza, Carl Zeiss, Oberkochen).

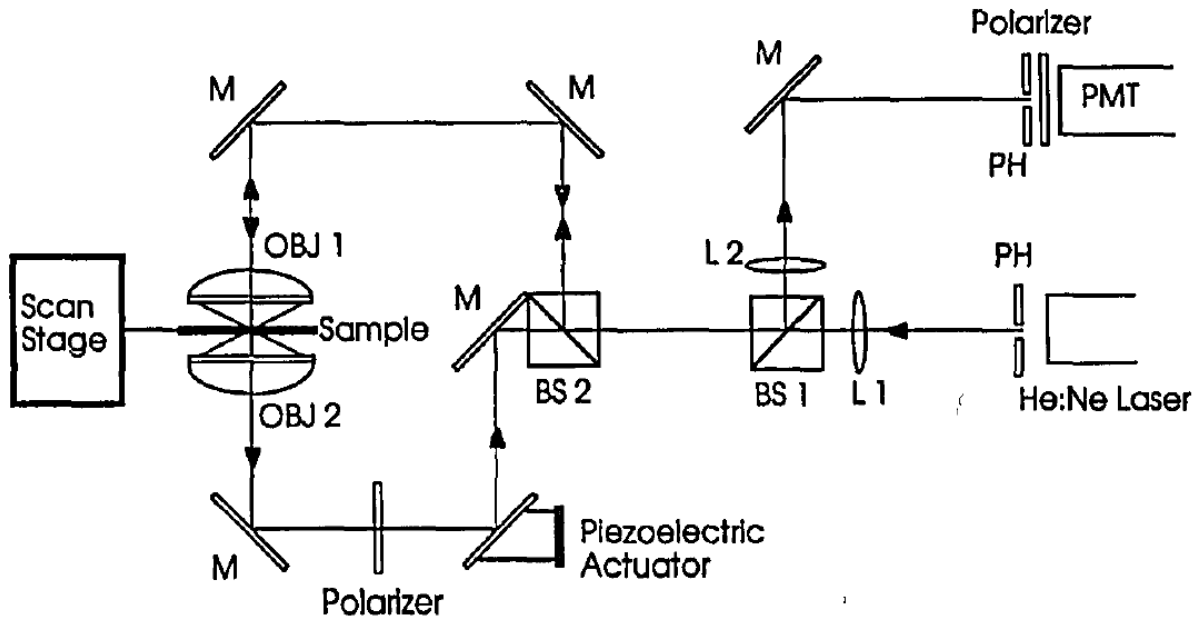
### 2.4.2. 4PI-Mikroskopie

Die 4PI-Mikroskopie ist eine Abbildungsmethode mit fokussierter Beleuchtung, bei der die Probe abgerastert wird. Es werden bei der 4PI-Mikroskopie die Foki zweier gegenüberliegender Mikroskopobjektive überlagert, wodurch der effektive Öffnungswinkel und somit die Numerische Apertur (NA) des Systems erhöht wird. Eine fundierte Beschreibung dieser Mikroskopietechnik findet sich u.a. in [HS92b], [HS92a] und [HLC94]. Der im Jahr 1994 in [HSLC94] beschriebene Versuchsaufbau ist in Abb. 2.4.2 abgebildet. Hierbei handelte es sich um ein 4Pi-Mikroskop Typ B.

**Tabelle 2.4.1.:** Unterschiede zwischen den drei 4Pi-Varianten.

	Anregung	Detektion
<b>4Pi Typ A</b>	kohärent	konfokal
<b>4Pi Typ B</b>	konfokal	kohärent
<b>4Pi Typ C</b>	kohärent	kohärent

Man unterscheidet beim 4PI-Mikroskop zwischen Typ A, B und C je nachdem, ob die Anregung und/oder die Detektion kohärent ist. Eine Zusammenstellung der Unterschiede findet sich in der



**Abbildung 2.4.2.:** Versuchsaufbau des in [HSLC94] beschriebenen 4Pi-Mikroskops Typ B (BS: Strahlteiler; L: Linse; M: Spiegel; PH: Lochblende; PMT: Photovervielfacher-Tubus).

Tabelle 2.4.1. Beim in [HSLC94] beschriebenen Aufbau wird das Anregungslicht eines der beiden Strahlengänge mithilfe eines Polfilters, der senkrecht zur Polarisation des Laserlichts orientiert ist, abgeblockt. Die kohärente Detektion des Fluoreszenzlichts erfordert räumliche und zeitliche Kohärenz des Detektionslichts. Um die zeitliche Kohärenz zu garantieren, muss der Unterschied in der optischen Weglänge zwischen den beiden Strahlengängen kleiner sein als die Kohärenzlänge des Fluoreszenzlichts. Die Anpassung der optischen Weglänge zwischen den beiden Strahlengängen erfolgt über einen Spiegel, der auf einem piezoelektrischen Aktuator montiert ist. Die räumliche Kohärenz ist eine inhärente Eigenschaft des konfokalen Mikroskops [WS84].

Die PSF der kohärenten Addition zweier fokussierter zirkular polarisierter Laserstrahlen (die 4Pi PSF) ist gegeben durch [NH01]:

$$h_{exc/det4Pi}(u, v) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} d\Phi |E_1(u, v, \Phi) + E_2(u, v, \Phi)|^2 \quad (2.4.1)$$

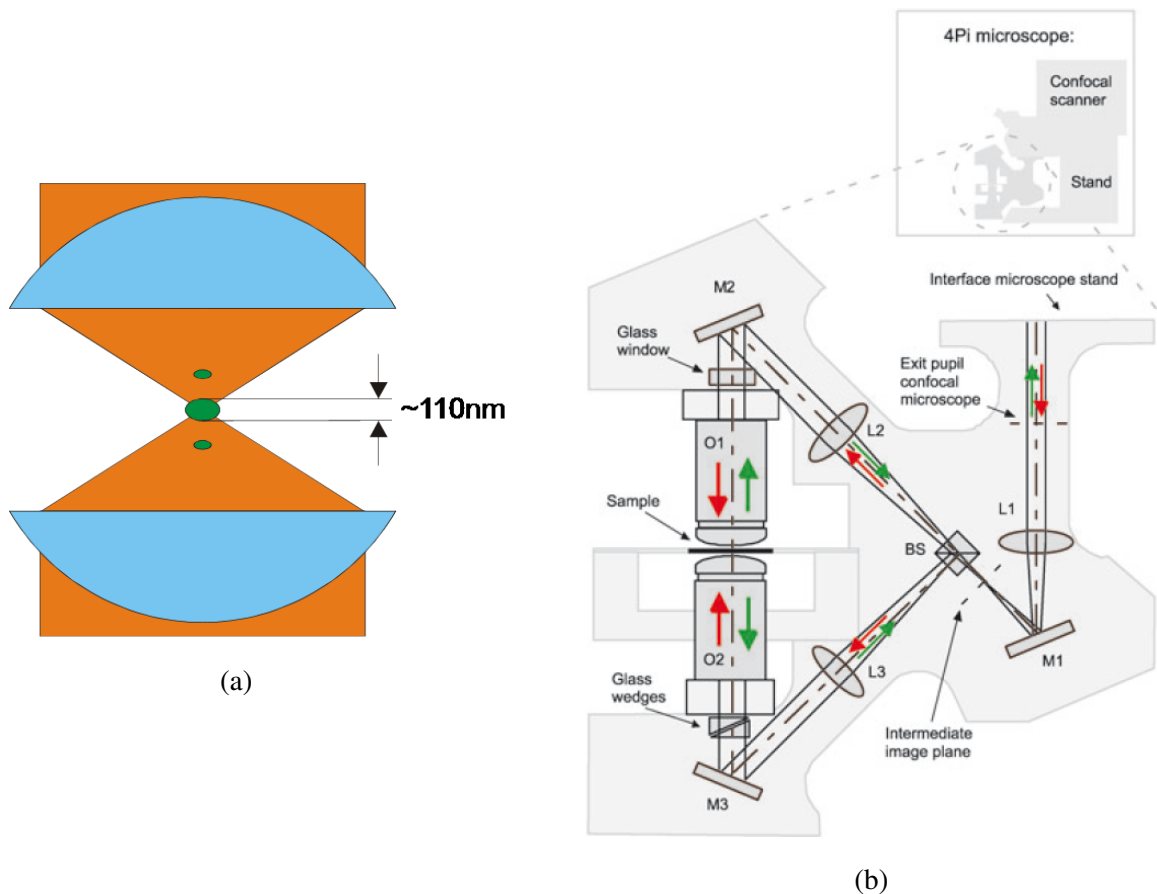
$$= 4A^2 [(ReI_0)^2 + 2(ImI_1)^2 + (ReI_2)^2] \quad (2.4.2)$$

, wobei

$$E_2(u, v, \Phi) = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} E_1(-u, v, -\Phi) \text{ gilt.} \quad (2.4.3)$$

dabei sind  $u$  und  $v$  optische Koordinaten,  $A$  ist eine Konstante und  $\Phi$  ist der Azimuthwinkel.  $E_1$  und  $E_2$  sind die elektrischen Felder der beiden Linsen im Fokus, während  $Re$  und  $Im$  Real- und Imaginärteil bezeichnen.





**Abbildung 2.4.3.:** (a) Schemazeichnung der beiden überlagerten Foki im 4PI-Mikroskop. (b) Schemazeichnung des optischen Weges im Leica TCS 4PI-Mikroskop. Das Anregungslicht wird vom Strahlteiler (BS) geteilt und von den beiden gegenüber liegenden Objektiven O1 und O2 auf den gleichen Punkt fokussiert. Die Korrektur der Dispersion wird durch bewegliche optische Keile im unteren Interferometerarm sichergestellt. Ihre Dicke wird im oberen Arm durch eine Glasplatte kompensiert. Rote Pfeile: Anregungslicht, grüne Pfeile: Fluoreszenzlicht [BEH06].

Der Arbeitsgruppe von Professor Cremer steht seit 2005 ein kommerzielles 4Pi-Mikroskop vom Typ A (Leica<sup>1</sup> TCS 4PI) zur Verfügung. Abbildung 2.4.3 zeigt eine Schemazeichnung des optischen Weges im Leica TCS 4PI-Mikroskop. Bei dieser 4PI-Variante ist ausschließlich die Anregung kohärent, sodass die axiale optische Auflösung bei  $\sim 110\text{nm}$  liegt und somit etwa 5 mal besser als bei konventioneller CLS-Mikroskopie ist. Es handelt sich hierbei im Gegensatz zur Auflösung bei der SMI- oder Lokalisationsmikroskopie um eine reale und nicht ausschließlich um eine effektive Auflösungsverbesserung. Allerdings ist es nicht möglich den gesamten Raumwinkel von  $4\pi$  steradian abzudecken. Diese Tatsache führt zu Nebenmaxima der 4PI-PSF und damit zu den für 4PI-Aufnahmen charakteristischen sogenannten Geisterbildern. Einen Vergleich der 4PI-PSF und -OTF von Typ A und C, sowie von der konfokalen Mikroskopie zeigt Abbildung 2.4.4. Es ist deutlich, dass die Halbwertsbreite (engl.: *Full Width at Half Maximum*, FWHM) der konfokalen PSF in Richtung der optischen Achse breiter ist, als diejenige des Hauptmaximums von 4PI Typ A, welche wiederum breiter ist als die FWHM von 4Pi

<sup>1</sup>Wetzlar, <http://www.leica-microsystems.com>

Typ C. Dies entspricht der Reihenfolge der Auflösungsverbesserung, welches auch an der in dieser Reihenfolge ansteigenden Ausdehnung der OTF in Richtung  $k_z$  deutlich wird. Ebenso sieht man jedoch auch, dass die 4PI-OTF nicht im gesamten Bereich der übertragenen Raumfrequenzen eine homogene Amplitude aufweist. Dies ist das Äquivalent zu den Nebenmaxima in der 4PI-PSF. Eine Verbesserung kann nur durch 2-Photonenanregung erreicht werden. Die quadratische Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Anregungsintensität führt zu niedrigeren Nebenmaxima und die längere Wellenlänge des Anregungslichts verschiebt diese weiter vom Zentrum der Detektions-PSF weg [DSW90]. Der Effekt, dass die PSF aufgrund dieser quadratischen Abhängigkeit schmaler wird, wird durch die längere Wellenlänge bei 2-Photonen-Anregung wieder aufgehoben. Ein Nachteil der 2-Photonen-Anregung ist, neben der Erfordernis eines zusätzlichen Infrarotlasers, ein schnelleres Ausbleichen der Fluorophore aufgrund der höheren Intensitäten. Lang et al. zeigten 2007, dass mit Ölimmersionsobjektiven mit einem Aperturwinkel von  $\geq 74^\circ$  4PI-Mikroskopie vom Typ A mit 1-Photonenanregung möglich ist. Sie erreichten Höhen der Nebenmaxima von  $< 50\%$ , womit von den Nebenmaxima erzeugte Artefakte aus den Bilddaten entfernt werden können [LMEH07]. Aus diesem Grund wurden am 4PI-Mikroskop der Arbeitsgruppe von Prof. Cremer während meiner Arbeit die vorher eingesetzten Glycerinobjektive durch Ölobjektive ersetzt. Dies erspart auch den Einsatz von speziellen und daher teuren Quarzdeckgläsern. Darauf wird noch näher im Kapitel 4 eingegangen.

Um die Sensitivität zu erhöhen werden im kommerziellen 4PI-Mikroskop Stoßentladungs-Photodioden (engl.: *Avalanche Photo Diode*, APD) für die Detektion verwendet. Ein Nachteil dabei ist, dass die AP-Dioden einen sehr niedrigen dynamischen Bereich haben ( $\sim 3\text{bit}$ ). Daher ist eine Überabtastung der Bilder bei der Aufnahme sowie eine anschließende Blur-Filterung vor der Datenevaluation üblich. Typischerweise wird hierfür ein Gaussfilter benutzt.

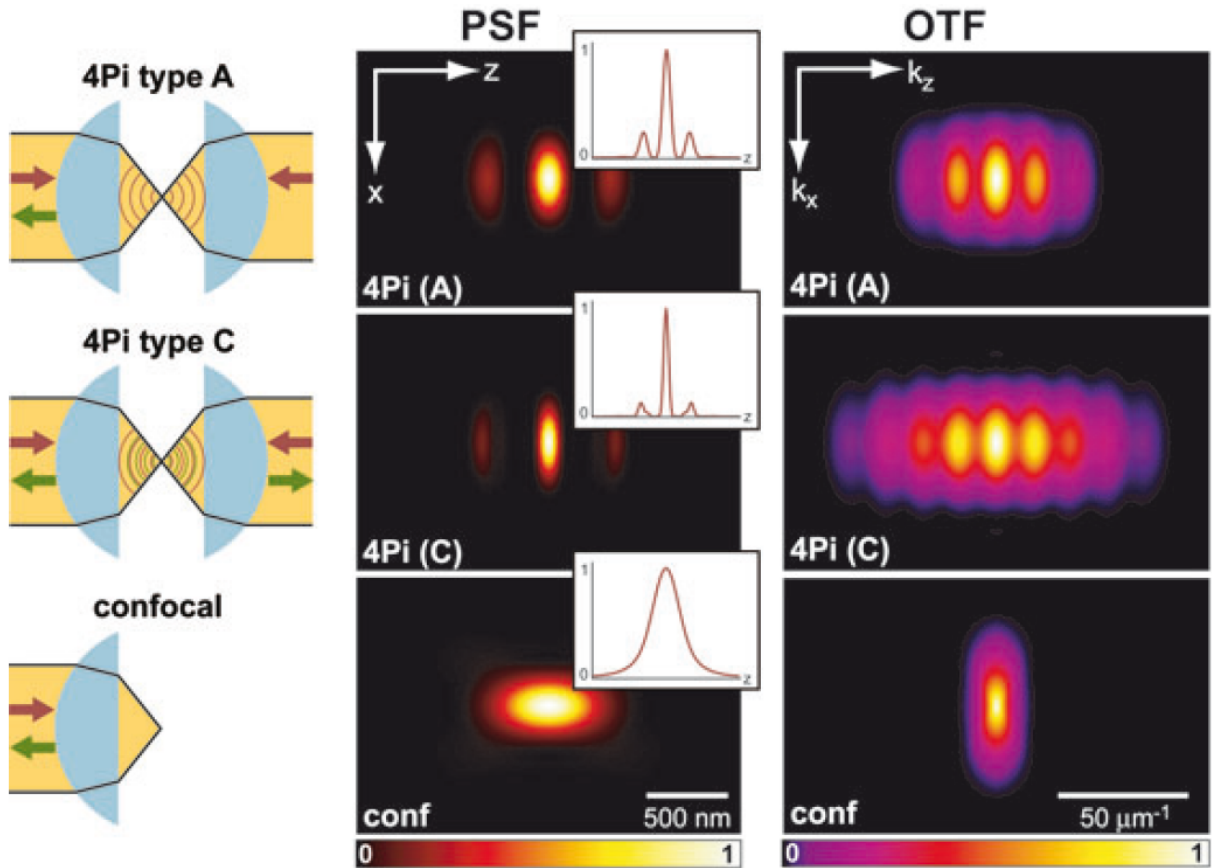
### Entfernung der Nebenmaxima durch lineare Punkt-Entfaltung

Die für 4PI-Aufnahmen charakteristischen Nebenmaxima, bzw. Geisterbilder, müssen, um ein eindeutiges artefaktfreies Bild zu erhalten, bei der Bildnachbearbeitung mathematisch entfernt werden [SHvdV98]. Hierfür stehen unterschiedliche Methoden der Bildverarbeitung wie 3- bzw. 5-Punktentfaltung, Wiener-Filterung oder „*Maximum-Likelihood*“-Entfaltung zur Verfügung. Eine Erörterung der unterschiedlichen Methoden findet sich in [Bad07] und [Ste06]. An dieser Stelle soll ausschließlich auf die für die Entfaltung der in dieser Arbeit vorgestellten 4PI-Aufnahmen verwendete Methode der 3- bzw. 5-Punkt-Filterung eingegangen werden.

Da die Leica 4PI-Software keine Anpassung der Länge des inversen Filters und die Entfaltung von simulierten Daten signifikante Artefakte produzierte, wurde von Dr. David Baddeley im Rahmen seiner Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Cremer eine eigene Entfaltungssoftware geschrieben [BCC06]. Mit dieser Entfaltungsmethode ist es auch möglich Bilder mit einer asymmetrischen PSF zu entfalten. Die PSF des 4Pi-Mikroskops kann in guter Näherung in einen axialen Anteil  $h_{ax}(z)$  und einen radialen Anteil  $c(r)$  separiert werden [HSHS95], [SKBH98]:

$$h_{4Pi}(r, z) \cong c(r)h_{ax}(z). \quad (2.4.4)$$

Daher lassen sich die Nebenmaxima durch eine eindimensionale lineare Entfaltung in z-Richtung entfer-



**Abbildung 2.4.4.:** Punktbildfunktion (PSF) und Optische Transferfunktionen (OTF) bei 2-Photonen-Anregung von 4Pi Typ A und C im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie (Wasserimmersionsobjektive, 1.20 NA,  $\lambda_{exc} = 870$  nm,  $\lambda_{det} = 510$  nm, Lochblendendurchmesser 1 Airy). Die Kombination von Interferenz bei der Anregung als auch bei der Detektion im Fall von Typ C führt zu niedrigeren Nebenmaxima und zu einer um  $\sim 30\%$  verbesserten axialen Auflösung im Vergleich zu Typ A. Die Auflösungsverbesserung kann neben den schmaleren 4PI-PSFs auch an den breiteren 4PI-OTFs verglichen mit der konfokalen Variante gesehen werden. Niedrige Nebenmaxima in der PSF sind die Bedingung dafür, dass die OTF sowie frei von niedrigen Amplituden als auch frei von fehlenden Frequenzen innerhalb des Übertragungsbereichs ist [BEH06].

nen. Der axiale Anteil lässt sich näherungsweise als Faltung der Funktion  $h_{peak}(z)$ , welche die Form eines einzelnen Maximums definiert, und einer Funktion  $l(z)$  beschreiben [NH01]. Die Funktion  $l(z)$  enthält die Information über die Position und die relative Höhe der Maxima und ist eine Summe von mit den Koeffizienten  $a_i$  gewichteten Deltafunktionen an den Positionen  $d_i$ :

$$h_{ax}(z) \cong h_{peak}(z) \otimes l(z) \quad (2.4.5)$$

$$l(z) = \sum_i a_i \delta(z - d_i) \quad (2.4.6)$$

Für ein Bild  $b$  des Objektes  $o$  gilt somit aufgrund der Assoziativität der Faltungsoperation:

$$b = o \otimes [c(r)(h_{peak}(z) \otimes l(z))] \quad (2.4.7)$$

$$= [o \otimes (c(r)h_{peak}(z))] \otimes l(z) \quad (2.4.8)$$

Zur Entfernung der interferenzbedingten Nebenmaxima muss somit die Faltung mit  $l(z)$  invertiert werden. Die Faltung mit  $l(z)$  kann im diskreten zweidimensionalen Fall als Multiplikation mit der zugehörigen Toeplitzmatrix  $L$  beschrieben werden [NH01]. Die Matrix  $L$  enthält die Koeffizienten der Deltafunktionen in den Diagonalen. Bei einer Höhe der Nebenmaxima erster Ordnung von 45% des Hauptmaximums liegen die Koeffizienten zweiter Ordnung bei unter 1% und höhere Ordnungen können vernachlässigt werden [NH01]. In diesem Fall spricht man von 5-Punkt-Entfaltung und die Toeplitzmatrix  $L$  hat folgende Gestalt (5 dimensionales Beispiel):

$$L = \begin{pmatrix} l_0 & l_1 & l_2 & 0 & 0 \\ l_{-1} & l_0 & l_1 & l_2 & 0 \\ l_{-2} & l_{-1} & l_0 & l_1 & l_2 \\ 0 & l_{-2} & l_{-1} & l_0 & l_1 \\ 0 & 0 & l_{-2} & l_{-1} & l_0 \end{pmatrix} \quad (2.4.9)$$

Werden nur die Nebenmaxima erster Ordnung berücksichtigt nennt man es 3-Punkt-Entfaltung. Die Matrix  $L$  ist eine invertierbare, dünn besetzte Bandmatrix. Die Nebenmaxima lassen sich somit durch eine Multiplikation des Bildes mit der Inversen  $L^{-1}$  entfernen. Bei niedrigen Nebenmaxima und der Entfaltung großer Bilder, bei denen Randeffekte vernachlässigt werden können, kann die Matrizenmultiplikation durch eine Filterung mit dem Filter  $l^{-1}$  substituiert werden. Der Filter  $l^{-1}$  entspricht dabei der mittleren Spalte der Inversen  $L^{-1}$ .

## Probenpräparation für die 4PI-Mikroskopie

Da in der 4PI-Mikroskopie die Probe von beiden Seiten beleuchtet wird, ist eine spezielle Form der Probenpräparation nötig. Anstatt, wie sonst in der optischen Mikroskopie üblich, Objektträger zu verwenden, wird das biologische Präparat hier zwischen zwei Deckgläsern präpariert. Hierfür sind spezielle Metallhalter und runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 30cm erforderlich. Da der Arbeitsabstand beider Objektive gewahrt werden muss, darf der Abstand zwischen beiden Deckgläsern ca. 50µm nicht überschreiten. Ein axialer Durchschnitt eines 4PI-Präparates ist in schematischer Darstellung in Abbildung 2.4.5 zu sehen. Die 4PI-PSF ist sehr anfällig gegen Brechungsindexvariationen. Deshalb muss der Brechungsindex des Einbettungsmediums vor dem Eindecken der Probe mit einem Refraktometer bestimmt und korrigiert werden. Bei den auf Glycerin korrigierten Objektiven wurde ein spezielles Einbettungsmedium mit einem Brechungsindex von  $n = 1,460$  bei Raumtemperatur aus Glycerol (ca. 83%) und Wasser (ca. 17%) hergestellt. Bei den anschließend installierten Öobjektiven wurde TDE (Thiodiethanol) als Einbettungsmedium verwendet.

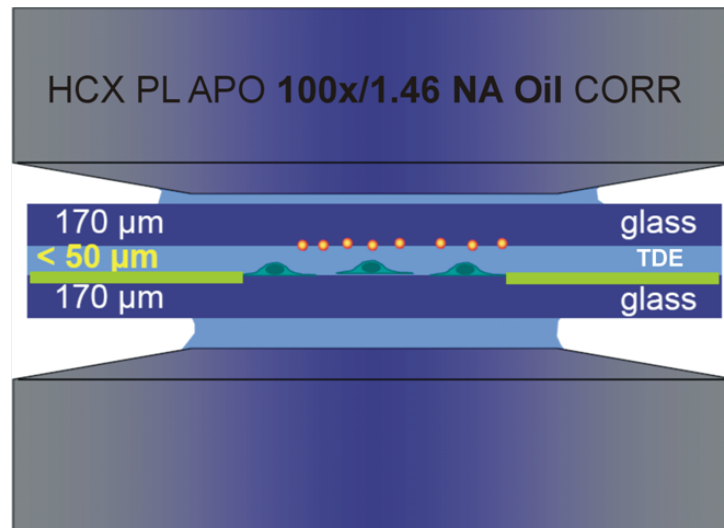


Abbildung 2.4.5.: Schematischer Querschnitt durch ein Präparat der 4PI-Mikroskopie [Mic05].

### 2.4.3. SMI-Mikroskopie

Das in der Arbeitsgruppe Cremer entwickelte und etablierte Verfahren der SMI-Mikroskopie (engl.: *Spatially Modulated Illumination*) basiert auf der SW-Mikroskopie (engl.: *Standing Wave*) ([BFTL93], [LTW86]). Im Gegensatz zur 4PI-Mikroskopie ist die SMI-Mikroskopie ein Verfahren, bei dem mit Weitfeld-Anregung und -Detektion gearbeitet wird. Die SMI-Mikroskopie liefert zwar im strengen Sinne keine Auflösungsverbesserung, jedoch kann mit ihrer Hilfe, wenn Zusatzinformation über die Objektform vorhanden ist, eine Verbesserung der Messgenauigkeit erreicht werden. Somit können mit den entsprechenden Auswertalgorithmen axiale Ausdehnungen optisch isolierter Objekte in einem Bereich von etwa 30-200nm, was ca. 1/20 der Anregungswellenlänge entspricht, sowie Objektpositionen sehr genau bestimmt werden.

Da der theoretische Hintergrund der SMI-Mikroskopie bereits in vorangehenden Arbeiten ([Alb02], [Spö04], [Wag04], [Bad07], [Rey07]) behandelt wurde, wird in dieser Arbeit nur auf die wesentlichen Aspekte eingegangen.

#### Theorie der SMI-Mikroskopie

Das SMI-Mikroskop ist ein Fluoreszenzmikroskop mit Weitfelddetektion und strukturierter Beleuchtung in axialer Richtung. Zur Erzeugung dieser Beleuchtungsstruktur werden zwei gegeneinander laufende, linear polarisierte, kohärente und kollimierte Laserstrahlen im Objektraum zur Interferenz gebracht. Das Intensitätsprofil des so erzeugten stehenden Wellenfeldes besitzt äquidistante Intensitätsmaxima und -minima entlang der optischen Achse und erfüllt die Bedingung [Sch99]:

$$I(z) = I_0 \cos^2 \left[ k_z z + \frac{\Delta\Phi}{2} \right] \quad (2.4.10)$$

mit  $k_z = 2\pi n \cos(\Theta) / \lambda_{exc}$ . Die  $\cos^2$ -Form des Wellenfeldes ist somit abhängig von der Vakuumwellenlänge des Anregungslichts  $\lambda_{exc}$ , dem Brechungsindex  $n$  der Probe, der Distanz  $z$  entlang der optischen Achse, dem Winkel  $\Theta$  zwischen den interferierenden Strahlen, sowie deren Phasendifferenz  $\Delta\Phi$ .

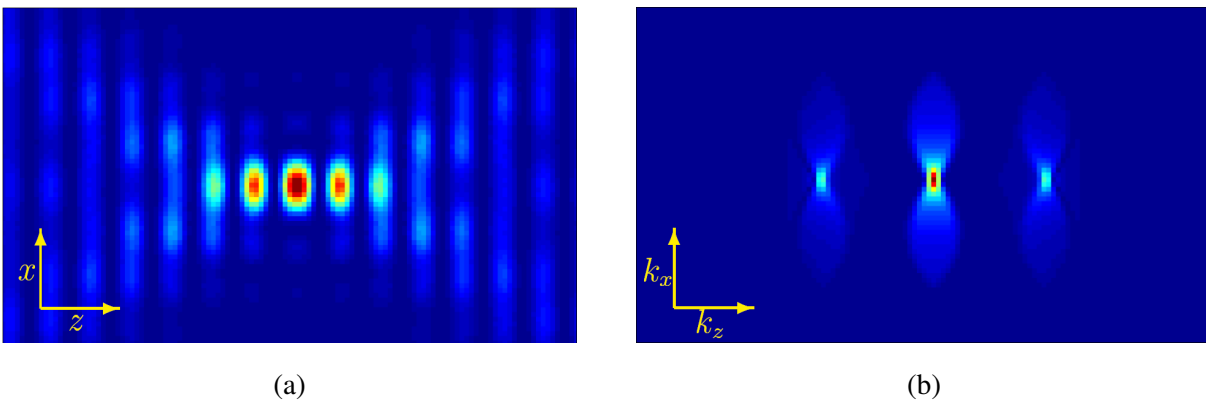
Das zu beobachtende Objekt wird nun in axialer Richtung durch dieses Beleuchtungswellenfeld und somit ebenfalls durch den Mikroskopfokus gefahren, wobei an jeder Position mit einer CCD-Kamera (engl.: *Charge-Coupled Device*) ein Weitfeldbild aufgenommen wird. Das Ergebnis ist ein 3D-Bildstapel mit einer PSF, die der Multiplikation einer Weitfeld-PSF mit dem SMI-Wellenfeld entspricht. Für die Gesamt-PSF gilt demnach:

$$h_{axial}(z) = h_{det}(z) \cdot h_{exc}(z) = h_0 \cdot \text{sinc}^2 \left[ \frac{\nu_{ax}(z)}{4} \right] \cdot \cos^2 \left[ k_z(z) + \frac{\Delta\Phi}{2} \right] \quad (2.4.11)$$

mit der axialen optischen Koordinate  $\nu_{ax}(z)$  und der Vereinfachung  $\text{sinc}(x)=\sin(x)/x$ . Demnach ergibt sich die Optische Transferfunktion (OTF) des SMI-Mikroskops zu:

$$H(k) = H_{det}(k) \otimes H_{exc}(k) \quad (2.4.12)$$

Die sinusoidale Beleuchtungsstruktur wird in der Fouriertransformation zu 3 Delta-Funktionen bei  $k' = 0$  und  $k' = \pm 2k_z$ . Die OTF setzt sich somit zusammen aus drei Kopien der Weitfeld-OTF an den Positionen der Delta-Funktionen. Simulationen der PSF sowie der OTF sind in Abbildung 2.4.6 dargestellt. Aufgrund der Erweiterung des detektierbaren Frequenzraums um  $k' = \pm 2k_z$ , können zusätzliche Informationen über Position und Größe des Objekts extrahiert werden. Allerdings befinden sich zwischen den Kopien der Weitfeld-OTF Bereiche, in denen die SMI-OTF gleich null ist, d.h. es werden keine Informationen über das Objekt mit diesen Raumfrequenzen übertragen. Aus diesem Grund ist es erforderlich gewisse Zusatzinformationen über das Objekt, wie zum Beispiel Annahmen über die Objektform, in die Auswertelgorithmen mit einfließen zu lassen. Daraus folgt desweiteren die Einschränkung, dass mit der SMI-Mikroskopie nur optisch isolierte Objekte eindeutig untersucht werden können, d.h. dass der Abstand zweier zu vermessender Objekte größer als die Halbwertsbreite der zugehörigen PSF sein muss.



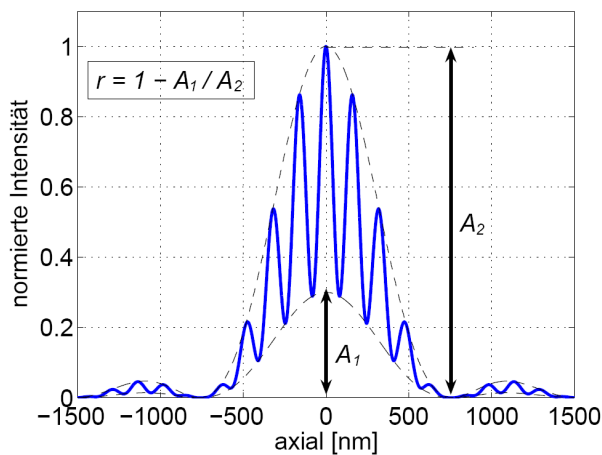
**Abbildung 2.4.6.:** PSF (a) und OTF (b) des SMI-Mikroskops [Bad07].

Aus dem erzeugten 3d-Bildstapel kann anschließend für jedes fluoreszierende Objekt, welches in dem mit SMI-Mikroskopie detektierbaren Größenintervall liegt, eine axiale Intensitätsverteilung (engl.: *Axial Intensity Distribution*, AID) extrahiert werden. Die simulierte AID einer 100nm großen Kugel ist in Abb. 2.4.7 abgebildet. Die Information über die Größe des Objektes erhält man nun aus der Modulationstiefe, die wie folgt definiert ist [Rey07]:

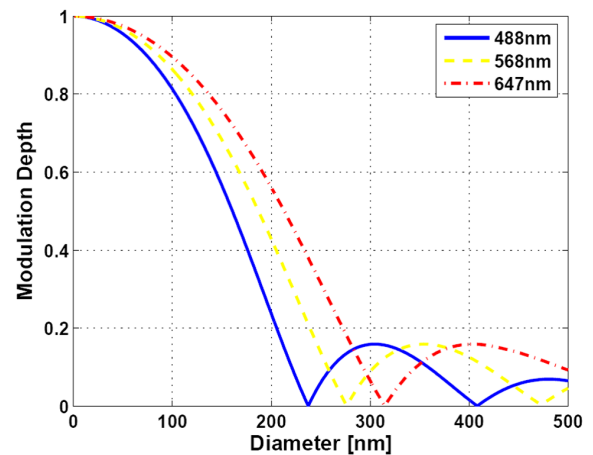


$$r := \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max}} = 1 - \frac{A_1}{A_2} \quad (2.4.13)$$

wobei  $A_1$  und  $A_2$  die Amplituden der inneren und äußeren Einhüllenden der AID bezeichnen. Die so definierte Modulationstiefe  $r$  verringert sich für größere Objekte und umgekehrt. Bei gegebener Objektform ist es damit möglich, das Verhältnis zwischen Modulationstiefe und Objektgröße zu bestimmen, indem die Faltung zwischen der axialen Projektion des Objekts mit dem axialen Profil der PSF berechnet wird [Wag04]. Dies führt zu sogenannten R-S-Kurven, anhand derer das gemessene Verhältnis  $R = A_1/A_2$  direkt mit der Objektgröße  $S$  in Relation gesetzt werden kann (siehe Abbildung 2.4.8).



**Abbildung 2.4.7.:** Die SMI-Messung ergibt für jedes Objekt eine charakteristische axiale Intensitätsverteilung (engl.: axial intensity distribution, AID). Die Modulationstiefe  $r$  der AID ist proportional zum Verhältnis der Amplituden  $A_1$  und  $A_2$  der inneren und äußeren Einhüllenden des Intensitätsprofils (abgebildet ist die simulierte AID eines 100nm Objekts mit  $r=0,70$ ) [Rey07].



**Abbildung 2.4.8.:** Über die Modulationstiefe kann auf den Durchmesser des Objektes geschlossen werden. Abgebildet ist der Zusammenhang zwischen dem Durchmesser und der Modulationstiefe für ein kugelförmiges Objekt für die drei am SMI-Aufbau verfügbaren Wellenlängen (Brechungsindex: 1,47, vollständige Interferenz und ein angenommener Winkel von  $0^\circ$  zwischen den beiden Strahlen) [Bad07].

#### 2.4.4. Lokalisationsmikroskopie

Die Lokalisationsmikroskopie liefert, ebenso wie die SMI-Mikroskopie, keine Auflösungsverbesserung im klassischen Sinn. Auch bei dieser Methode wird die Strukturinformation unterhalb der Beugungsgrenze erst durch eine nachträgliche Analyse der aufgenommenen Rohdaten erhalten. Im Gegensatz zur 4PI- und zur SMI-Mikroskopie erhält man mit der Lokalisationsmikroskopie verbesserte Strukturinformation in lateraler Richtung. Beruhen die beiden anderen Methoden auf dem Prinzip der Interferenz, so wird bei der Lokalisationsmikroskopie ein anderes Prinzip angewendet. Anstatt die PSF des optischen Systems zu verändern, werden hier Einzelmoleküle, deren Abstand zueinander unterhalb der Beugungsgrenze liegt, über eine zeitliche Diskriminierung voneinander getrennt. Diese Methode geht auf das Verfahren von SPDM (engl.: *Spectral Precision Distance/ Position Determination Microscopy*) zurück, bei dem eine spektrale Diskriminierung der Einzelmoleküle durch Markierung mit

Farbstoffen unterschiedlicher spektraler Signatur vorgenommen wird [CHBR], [BSEC], [EEK<sup>+</sup>00]. Lokalisationsmikroskopie mit photoschaltbaren Farbstoffen wurde 2006 unter dem Akronym PALM (engl.: *Photoactivated Localization Microscopy*) [BPS<sup>+</sup>06] veröffentlicht. Bei dieser Methode befinden sich die photoschaltbaren Fluorophore zunächst in einem nicht fluoreszenten Zustand und werden erst durch die Bestrahlung mit einem Laser im UV-Wellenlängenbereich aktiviert. Dadurch wird eine zusätzliche Molekülgruppe der Fluorophore abgespalten, was sie in den fluoreszenten Zustand bringt. In diesem können sie durch Bestrahlung mit ihrer regulären Anregungswellenlänge lokalisiert werden. In den fluoreszenten Zustand gebrachte Moleküle, werden so lange beleuchtet, bis sie irreversibel ausgebleicht sind und der Vorgang durch Aktivierung weiterer Fluorophore wiederholt wird. Der Vorgang wird so lange wiederholt, bis alle Farbstoffmoleküle lokalisiert wurden. Dies ist ein statistischer Prozess, da die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung von der Leistung des UV-Lasers abhängt. Diese wird so gewählt, dass die Wahrscheinlichkeit, zwei oder mehrere Moleküle innerhalb eines Beugungsvolumens gleichzeitig zu aktivieren, möglichst gering ist. Der gesamte Prozess des Aktivierens und Ausbleichens ist irreversibel, was eine visuelle Vorauswahl der zu vermessenden Region schwierig macht. Das Verfahren wurde mit fPALM (engl.: *Fluorescence Photoactivated Localization Microscopy*) [HGM06] weiterentwickelt.

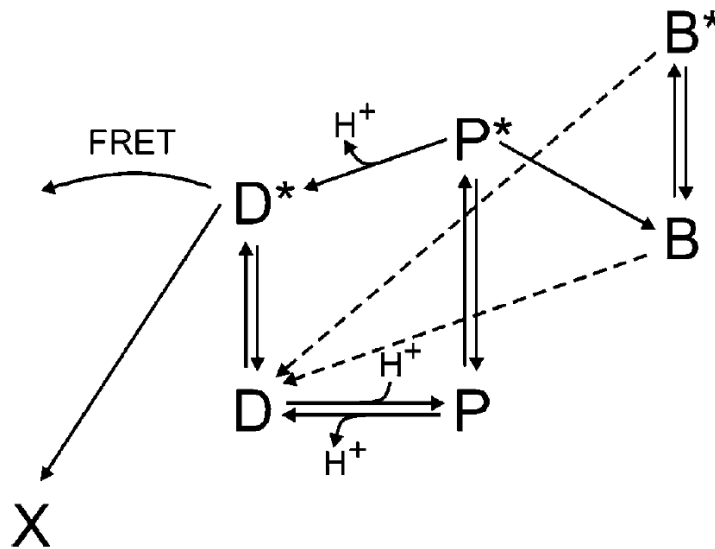
Eine ähnliche Methode ist STORM (engl.: *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) [RBZ06], bei der die Farbstoffe durch einen strahlungslosen Energietransfer von einem in den anderen Zustand übergehen. Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist dSTORM (engl.: *Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) [vdLKHS08], [HvdLS<sup>+</sup>08]. Neben den genannten Methoden der Lokalisationsmikroskopie gibt es noch GSDIM (engl.: *Ground State Depletion Microscopy*) [FBB<sup>+</sup>08]. Eine Übersicht über die Methoden findet sich in [CvKL<sup>+</sup>10]. Die in der Arbeitsgruppe von Prof. Cremer angewandte Methode der Lokalisationsmikroskopie ist eine Weiterentwicklung des ursprünglichen SPDM-Verfahrens und beruht auf dem Effekt des reversiblen Photobleichens. Auf diesen Effekt wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

### Der Effekt des reversiblen Photobleichens

Im Jahr 2005 wurde von Sinnecker et al. der Effekt des reversiblen Photobleichens an einer Variante des grün fluoreszierenden Proteins (engl.: *enhanced green fluorescent proteins*, eGFP) entdeckt [SVHS05]. Eine Zusammenfassung findet man z.B. in [vb09]. Anhand von CFP zeigten Sinnecker et al., dass die Fluoreszenzintensität bei einer Messung mit der Zeit abnimmt. Bestrahlt man die Probe aber eine Zeitlang nicht, so regeneriert sie wieder auf annähernd die ursprüngliche Intensität. Der selbe Effekt konnte erzielt werden, wenn die Probe mit einer Wellenlänge bestrahlt wurde, die sich außerhalb des Absorptionsspektrums des verwendeten Farbstoffes befand. Zusätzlich konnte dem Entstehen dieses Phänomens eine pH-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurde ein Modell erstellt, welches Übergänge eines fluoreszenten Proteins zwischen Zuständen unterschiedlicher spektraler Signaturen beschreibt. Nach dem Modell (Abb.:2.4.9) gibt es zwei verschiedene Zustände, einen protonierten (P) und einen deprotonierten (D), die miteinander in einem pH-abhängigen Gleichgewicht stehen. Darüber hinaus gibt es noch einen reversibel (B) und einen irreversibel gebleichten Zustand (X). Der klassische Fluoreszenz-Zyklus startet mit der Anregung des deprotonierten Zustandes (D nach D<sup>\*</sup>). Ebenso kann aber auch der protonierte Grundzustand angeregt werden (P nach P<sup>\*</sup>). Dieser geht in den irreversibel gebleichten Zustand B über. Der Übergang P<sup>\*</sup>



nach  $D^*$  ist prinzipiell möglich, ist aber aufgrund der pH-Abhängigkeit und des Anregungsspektrums unwahrscheinlich. Der reversibel gebleichte Zustand B kann entweder direkt in den fluoreszierenden Grundzustand D zurückkehren, oder aber zuerst in den angeregten reversibel gebleichten Zustand  $B^*$  übergehen, um dann in den fluoreszenten Grundzustand überzugehen. Zweites ist wahrscheinlicher, da die Regeneration durch Bestrahlung beschleunigt wird.



**Abbildung 2.4.9.:** Modell der Zustände und ihrer Übergänge eines fluoreszierenden Proteins nach [SVHS05]).

### Lokalisationsmikroskopie mit konventionellen Fluorophoren

Im Jahr 2008 wurde der Effekt des reversiblen Photobleichens erstmals in der Lokalisationsmikroskopie ausgenutzt. Seitdem wurden bereits eine ganze Reihe von Arbeiten zu dieser Weiterentwicklung von SPDM veröffentlicht [PGB<sup>+</sup>08], [LGW<sup>+</sup>09], [KLG<sup>+</sup>09b], [BDK<sup>+</sup>10]. Auch Zweifarben-Messungen wurden bereits mit dieser Methode verwirklicht [GER<sup>+</sup>09]. Bei dieser Methode werden die Fluorophore durch Bestrahlung mit einer im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie erhöhten Laserleistung in langlebige Dunkelzustände gebracht [DCTM97], [HFD<sup>+</sup>08], [SVHS05], [MZD<sup>+</sup>05]. Hierbei liegen die erforderlichen Leistungsdichten der Anregungsstrahlung im Bereich von einigen  $\text{kW}/\text{cm}^2$ . Dieser Übergang funktioniert ebenfalls mit zwei-Photonen-Anregung [CDC<sup>+</sup>05]. Das in Abbildung 2.4.9 gezeigte Modell der Übergänge fluoreszenter Proteine kann durch das Übergangsschema zwischen den drei Zuständen *fluoreszent* ( $M_{fl}$ ), *reversibel gebleicht* ( $M_{rb}$ ) und *irreversibel gebleicht* ( $M_{ib}$ ) vereinfacht dargestellt werden. Für die Übergänge zwischen den drei Zuständen gilt die Beziehung:



mit den Übergangswahrscheinlichkeiten  $k_{rb}$  für den Übergang vom fluoreszenten in den reversibel gebleichten Zustand,  $k_{fl}$  vom reversibel gebleichten zurück in den fluoreszenten Zustand und  $k_{ib}$  vom fluoreszenten in den irreversibel gebleichten Zustand. Die Anzahl der Fluorophore, die reversibel gebleicht werden, sowie die Lebensdauer des fluoreszenten Zustandes, kann durch die Intensität des Anregungslichts beeinflusst werden. Die Zerfallsrate des reversibel gebleichten Zustandes ist dadurch hingegen nicht zu beeinflussen, was einen limitierenden Faktor bei der Beschleunigung des Verfahrens darstellt.

Hat man die Farbstoffmoleküle innerhalb des Beugungsvolumens durch eines der genannten Verfahren der Lokalisationsmikroskopie dazu gebracht nacheinander zu fluoreszieren, kann man ihre jeweilige Position bestimmen. In dieser Arbeit wurde hierfür der von Paul Lemmer geschriebene 'SPDM'-Algorithmus verwendet [Lem09], bzw. der darauf aufbauende Algorithmus 'autoSPDM' von Rainer Kaufmann. Bei diesem Algorithmus werden bei Verwendung der Differenzmethode zunächst die jeweils aufeinanderfolgenden Bilder voneinander abgezogen, um die idealerweise in nur wenigen aufeinanderfolgenden Einzelbildern auftretenden Signale vom Hintergrund zu trennen. Anschließend wird jeweils eine Gaußfunktion an die einzelnen Signale angepasst und über deren Schwerpunkt die laterale Position des zugehörigen Einzelmoleküls bestimmt. Die fundamentalen Grenzen, die der mikroskopische Abbildungsprozess der Genauigkeit von Volumen- und Distanzmessungen stellt, wurden bereits in [BSEC] evaluiert. Die Genauigkeit hängt hierbei im Wesentlichen von der Anzahl  $N$  der detektierten Photonen ab [EC00], [TLW02], [ORW04].

Für die Abschätzung des Fehlers der Ortsbestimmung gilt:

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2}. \quad (2.4.15)$$

mit der Standardabweichung  $s$  der PSF, der Pixelgröße  $a$  und dem Hintergrund  $b$ . Hierbei entspricht der erste Term dem Photonen- und der zweite Term dem Hintergrundrauschen. Im zweidimensionalen Fall, wie im Falle einer CCD-Kamera, wird die Beziehung zu:

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2}. \quad (2.4.16)$$

Ist man an der Unsicherheit der gesamten Photonenzahl interessiert, so gilt für diese:

$$\langle(\Delta N)^2\rangle = N + \frac{2\sqrt{\pi}s b^2}{a} \quad (2.4.17)$$

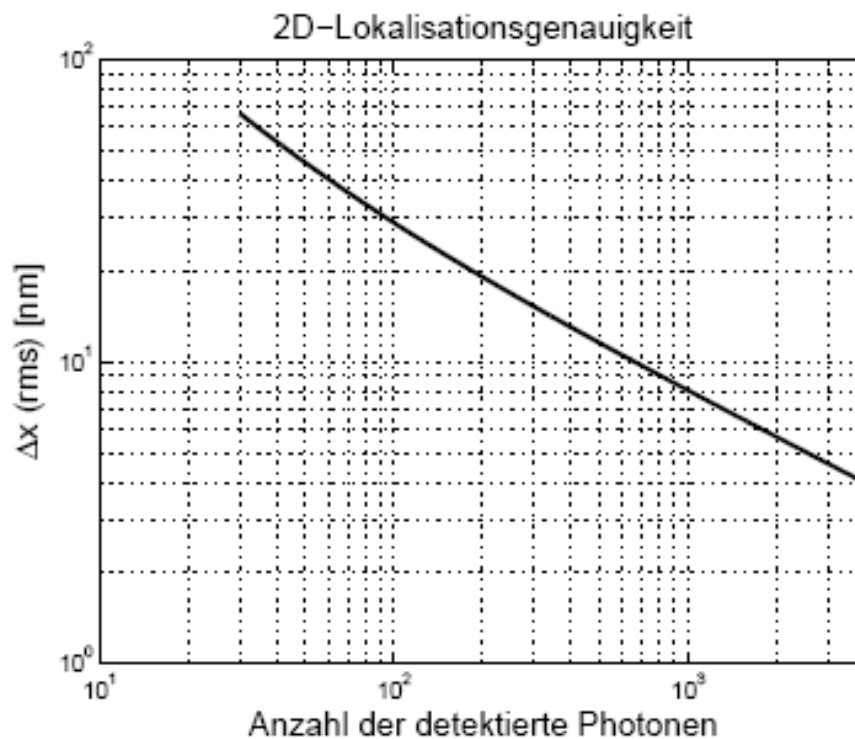
bzw. im zweidimensionalen Fall:

$$\langle(\Delta N)^2\rangle = N + \frac{4\pi s^2 b^2}{a^2}. \quad (2.4.18)$$

Eine Herleitung der Gleichungen findet sich auch in [TLW02].

Als Abschätzung für die Anzahl der detektierten Photonen können folgende Überlegungen dienen [Amb08]. Ein Objektiv mit einer Numerischen Apertur von 1,4 deckt ca. 30% des Raumwinkels

ab. Nimmt man eine Transmission durch das Objektiv von 85% an, schätzt die durch die Tubuslinse mit 90% ab, nimmt den für Interferenzfilter typischen Wert der Transmission von 95% und geht von einer Quanteneffizienz der CCD-Kamera von 90% aus, so ergibt sich, dass nur ungefähr 10% aller emittierten Photonen von der Kamera detektiert werden. Abbildung 2.4.10 zeigt den Zusammenhang zwischen Anzahl detektierter Photonen und Lokalisationsgenauigkeit für typische Werte der Detektion. Man bedenke aber, dass diese Einschränkung für jegliche Techniken der Fluoreszenzmikroskopie, die mit vergleichbarem Detektionsstrahlengang arbeiten, gelten. Bei verbreiteten Fluorophoren liegt die Photonenausbeute pro Molekül bei ca.  $10^6$  Photonen. Dabei ist zu beachten, dass dieser Wert sowohl vom Farbstoff als auch von dessen Mikroumgebung abhängt [TM01].



**Abbildung 2.4.10.:** Zusammenhang zwischen Anzahl detektierter Photonen und Lokalisationsgenauigkeit für 250nm FWHM der PSF, 65nm Pixelgröße und 30% Rauschen [TLW02].

Der Vorteil der Lokalisationsmikroskopie gegenüber anderen hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopietechniken ist die Kenntnis der Positionen der Einzelmoleküle. Eine zusammenfassende Darstellung des Prozesses der Lokalisationsmikroskopie von der Datenaufnahme bis hin zur Datenanalyse ist in Abbildung 2.4.11 zu sehen. Bei der Datenaufnahme wird die fluoreszenzmarkierte Probe mithilfe von Schrittmotoren und einem Objektpiezo in den Fokus des hochnumerischen Objektivs gebracht. Die Intensität des Anregungslichts (in Abb. 2.4.11 von rechts kommend) wird durch die Linse L1 erhöht, um die Fluorophore in den reversiblen Dunkelzustand zu bringen. Das durch den Dichroiten DM1 vom Anregungslicht getrennte Fluoreszenzlicht wird von einer hochsensitiven CCD-Kamera detektiert. Der komplette bei den Messungen verwendete optische Aufbau wird in Kapitel 5.1 detailliert vorgestellt. Von der Probe wird ein zeitlicher Bilddatenstapel aufgenommen und kann an die Bildverarbeitungssoftware übergeben werden. Diese bestimmt in jedem Einzelbild die Positionen der nacheinander

aufgeleuchteten Fluoreszenzmoleküle, z.B. durch Anpassung von Gaussfunktionen an die einzelnen Fluoreszenzsignale und Bestimmung der Maximapositionen. Die Koordinaten der in allen Einzelbildern gefundenen Molekülpositionen werden zusammen mit einer Abschätzung der Photonenzahl und den Fehlern der lateralen Positionsbestimmung in einer Matrix gespeichert (bei dem von uns verwendeten *SPDM*-Algorithmus ist das die sogenannte *Orte*-Datei). Die Kenntnis über die Molekülpositionen ermöglicht anschließend die Durchführung unterschiedlicher Bildgebungsverfahren wie Verwischung der Molekülpositionen mit der Lokalisationsgenauigkeit oder dem Abstand zum benachbarten Molekül sowie die Darstellung durch Triangulation [BCS10]. Zudem lassen sich an den Einzelmolekül-daten verschiedene statistische Analysen durchführen. So können zum Beispiel die Verteilungen der Lokalisationsgenauigkeiten, die Distanzen aller Moleküle oder die Distanzen zu den benachbarten Molekülen untersucht, sowie die Anhäufung (engl.: *cluster*) von Einzelmolekülen analysiert werden. Derartige statistische Analysen sind mit anderen hochauflösenden Mikroskopiemethoden aufgrund der fehlenden Einzelmolekül-daten nicht durchführbar.

In dieser Arbeit werden die Begriffe Lokalisationsmikroskopie und SPDM als Synonyme verwendet.

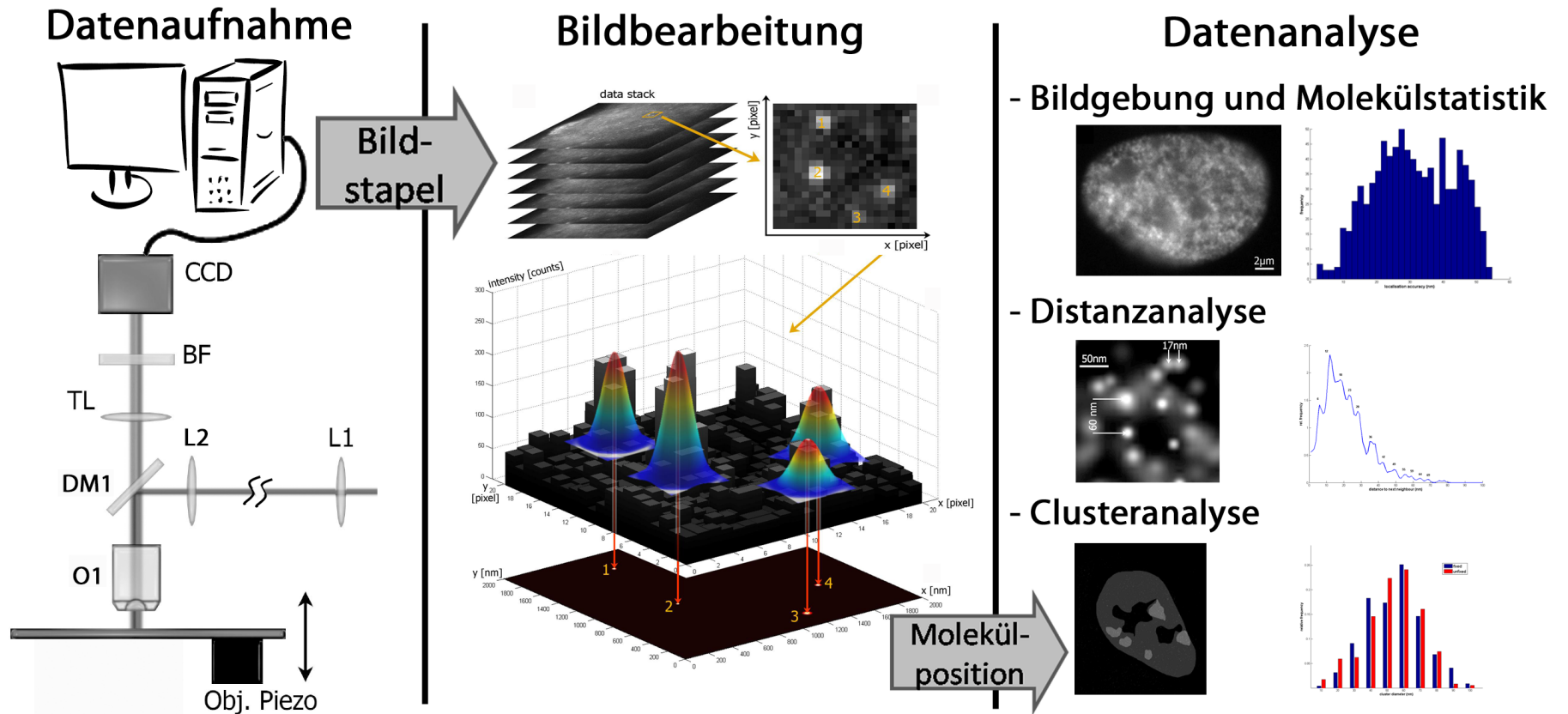


Abbildung 2.4.11.: Der Prozess der Lokalisationsmikroskopie von der Datenaufnahme bis hin zur Datenanalyse. (Teilweise aus [KLG<sup>+</sup>09a]).



## 3. Biologische Grundlagen

### 3.1. Molekülmarkierung in der Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.1.1. Fluoreszente Proteine

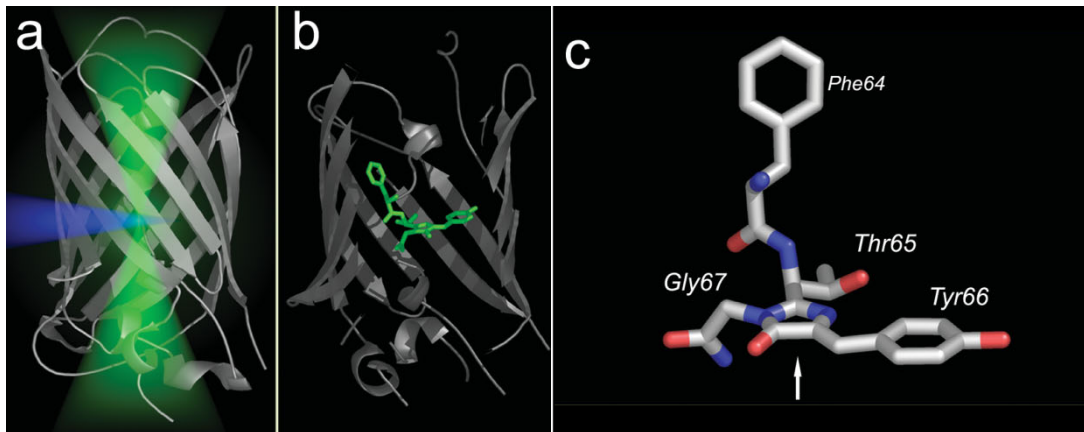
Eine Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung funktionierender Proteine in intakten Zellen besteht durch Kopplung mit Varianten des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), welches ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt. Die Verwendung von fluoreszenten Proteinen als molekulare Marker erlaubte es erstmals komplexe biochemische Prozesse mit den Funktionen der markierten Proteine in Verbindung zu setzen. Fluoreszente Proteine können an jegliche Proteine der Zelle gebunden werden, deren intrazelluläre Lage analysiert werden soll. Da sie die Proteinmarkierung in lebenden Zellen ermöglichen, erlauben sie auch die Untersuchung von Proteindynamik. Damit sind sie eine wichtige Anwendung, die zum Verständnis von Proteinfunktionen beiträgt, nachdem die Gensequenz vieler Organismen entschlüsselt wurde.

Nach der Aufreinigung von GFP aus der Qualle, entdeckte man, dass GFP bei Anregung selbst ohne andere Substrate oder Koenzyme fluoresziert [Tsi98]. Nach dem Klonieren des GFP-Gens [PEW<sup>+</sup>92] führte dessen Expression in anderen Organismen als der Qualle zu einem funktionierenden fluoreszierenden Protein [CTE<sup>+</sup>94]. Damit war klar, dass das Gen von GFP alle notwendigen Informationen für eine vollständige Synthese des Fluorophores enthält. Das Wildtyp(wt)-GFP Chromophor besteht aus einem Tripeptid zusammengesetzt aus Ser<sup>65</sup>, Tyr<sup>66</sup> und Gly<sup>67</sup> (Abb. 3.1.1). Im Jahre 1996 enthüllten röntgenkristallographische Untersuchungen die dreidimensionale Struktur des GFP [OCK<sup>+</sup>96]. Das Chromophor sitzt innerhalb einer  $\alpha$ -Helix in der 11-strängigen aus 238 Aminosäuren zusammengesetzten  $\beta$ -Tonne von GFP [FGJ96] (Abb. 3.1.1 B). Durch mutationsgenetische Untersuchungen wurden Varianten von GFP mit verbesserten Eigenschaften entwickelt. Das so genannte EGFP (engl.: *enhanced GFP*) besitzt eine verbesserte Expression in Säugetierzellen [Tsi98], beinhaltet eine im Vergleich zum Wildtyp etwa sechs mal hellere und stabile Mutante [HCT95] und besitzt eine geringere Temperatursensitivität im Vergleich zum Wildtyp [CVF96]. Zudem sind die Maxima der Spektren auf  $\lambda_{Abs} = 488\text{nm}$  und  $\lambda_{Em} = 511\text{nm}$  verschoben, so dass das zellschädigende Absorptionsmaximum im UV-Bereich entfällt [VV05].

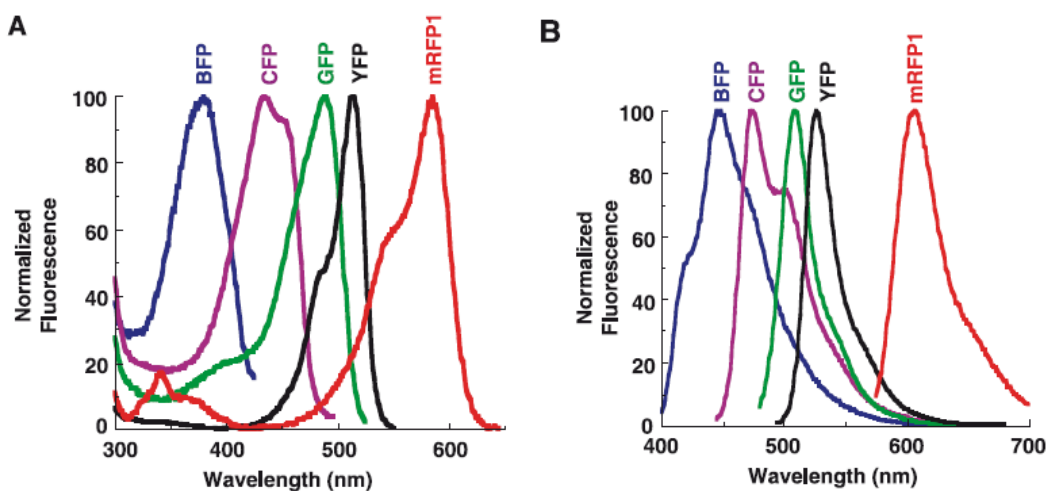
Außer EGFP wurden auch Varianten mit stärker verschobenen Absorptions- und Emissionsspektren entwickelt. Dies ermöglicht die gleichzeitige Markierung unterschiedlicher Proteine innerhalb einer Zelle mit verschiedenen Varianten fluoreszenter Proteine. Durch Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen und spektraler Trennung mithilfe von dichroitischen Filtern im Detektionsstrahlengang können somit Mehrfarbenbilder von Zellen aufgenommen werden. Aufgrund seiner deutlich von EGFP unterscheidbaren Spektren war das blau fluoreszierende Protein (BFP) eines der ersten, welches für Mehrfarbenaufnahmen verwendet wurde [RBDG<sup>+</sup>96], [HT96]. Da BFP verhältnismäßig schwach fluoresziert und schnell photobleicht, wurden alternative Paare fluoreszenter Proteine für Mehrfarbenmessungen entwickelt. Hierbei sind das cyan (CFP) [HPT94] und das gelb (YFP) [Oea96] fluoreszierende Proteine die

gebräuchlichsten. YFP kann mit der 514nm Linie des Argon-Ionen-Lasers angeregt werden und besitzt sein Emissionsmaximum bei ca. 530nm. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen an *E. coli*-Bakterien wurden die jeweiligen Proteine mit YFP markiert.

Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass sich auch spektral nah beieinander liegende fluoreszente Proteine voneinander unterscheiden lassen. Dies geschieht über das Verhältnis von Transmission und Reflexion an einem dichroitischen Strahlteiler [Gun11]. Die Anregungs- und Emissionsspektren verschiedener fluoreszenter Proteine sind in Abbildung 3.1.2 zu sehen.



**Abbildung 3.1.1.:** (a) Sekundärstruktur des grün fluoreszierenden Quallenproteins (GFP) aus *Aequorea victoria*, ein 11-strängiger  $\beta$ -Tonne mit coaxialer  $\alpha$ -Helix. (b) Zentrales Chromophor des GFP (grün). (c) Chromophor der Ser<sup>65</sup>Thr Mutante von GFP. Für die Fluoreszenz essentiell sind zwei coplanare Ringe, die das Elektronenresonanzsystem bilden. Der erste Ring (Pfeil) wird von Glycin<sup>67</sup> und Threonin<sup>65</sup> gebildet, deren Zyklisierungsreaktion vom Protein selbst katalysiert wird. Tyrosin<sup>66</sup> bildet den zweiten Ring [VV05].



**Abbildung 3.1.2.:** (A) Anregungs- und (B) Emissionsspektren der fluoreszenten Proteine: blau (BFP), cyan (CFP), grün (GFP), gelb (YFP) und rot (mRFP1) [LSP03].



### Organelle/Cellular Lights<sup>TM</sup>

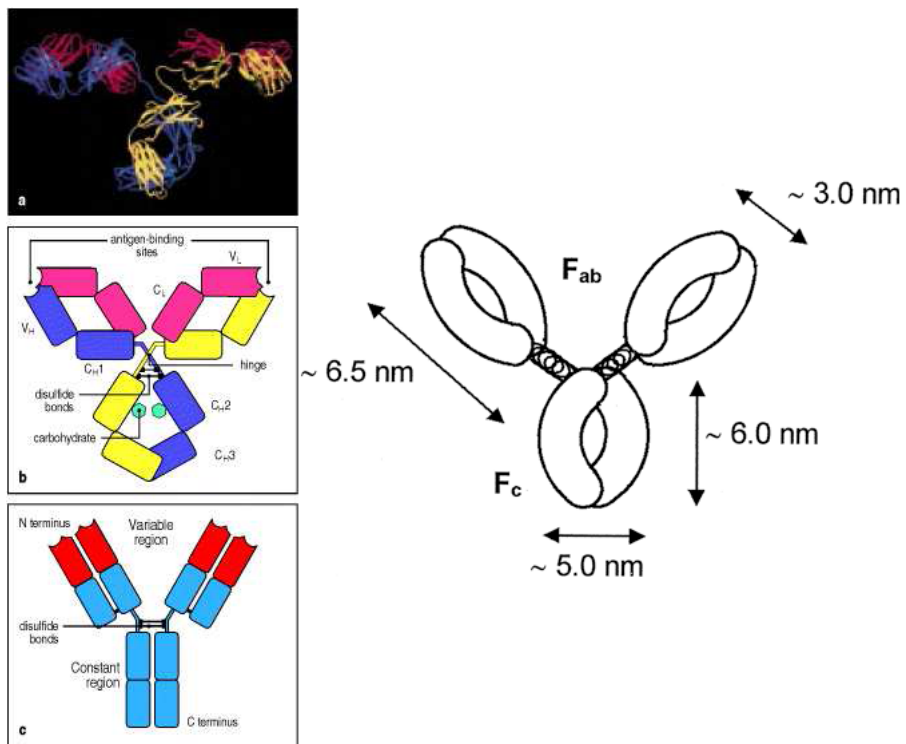
Eine Möglichkeit bestimmte Zellkompartimente mit fluoreszenten Proteinen zu markieren besteht mit den kommerziell erhältlichen Organelle/Cellular Lights<sup>TM</sup> Reagenzien (Invitrogen<sup>1</sup>). Das Konstrukt aus fluoreszentem Protein und Signalprotein ist bei dieser Markierungsmethode in einem Baculovirus kloniert. Der Baculovirus ist ein Insektenvirus. Die Verwendung des Baculovirus zum Einbringen von Genen in Säugetierzellen wird als *BacMam*-Technologie bezeichnet [KCJ05], [KC02]. Hierbei sorgt der Virus für eine effiziente Transfektion der Zellen.

#### 3.1.2. Immunfluoreszenz

Gelangen körperfremde Substanzen, sog. Antigene, in den Körper, so bildet dessen Immunsystem Antikörper zu deren Abwehr. In der Fluoreszenzmikroskopie kann die hohe Affinität der Antikörper zu den entsprechenden Antigenen zur Fluoreszenzmarkierung verwendet werden. Bei einer direkten Immunfluoreszenzmarkierung werden an die Antikörper gegen das zu untersuchende Protein ein oder mehrere Fluorophore gebunden. Darüber hinaus existiert auch noch die Möglichkeit einer indirekten Färbung. Dabei binden an die unmarkierten primären Antikörper einer Spezies fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper einer anderen Spezies. Dieses mehrstufige System dient zum Einen der Verbesserung des Signals, da meist mehrere sekundäre Antikörper an unterschiedliche Epitope des primären Antikörpers binden können, und zum Anderen erhöht es die Flexibilität bei der Auswahl der Fluorophore. Ein Nachteil einer zwei- oder mehrstufigen Markierung ist die Tatsache, dass das detektierte Fluorophor aufgrund der Größe der Antikörper weiter von der Zielstruktur entfernt ist. Die Größe der Antikörper liegt für vollständig gestreckte Moleküle bei ungefähr 12nm, woraus bei einem zweistufigen System ein Abstand von bis zu 24nm zwischen Fluorophor und markiertem Molekül folgt. Diese Distanz ist umso stärker zu berücksichtigen, je besser die Auflösung des optischen Abbildungssystems ist. Abbildung 3.1.3 zeigt die Struktur eines humanen Antikörpers.

---

<sup>1</sup>Invitrogen, Carlsbad, USA, <http://www.invitrogen.com>



**Abbildung 3.1.3.:** Kristallstruktur und schematische Diagramme, welche die funktionelle Struktur und die Ausdehnung eines Antikörpers (hier des humanen IgG) verdeutlichen [SPG00], [SPG00].

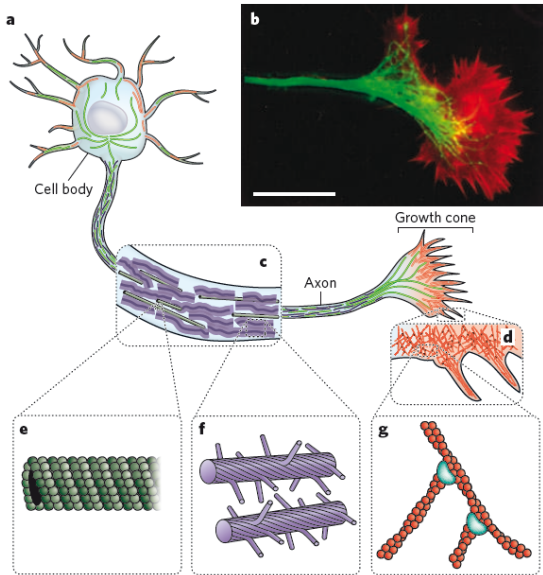
## 3.2. Aktinfilamente als Bestandteil des Cytoskeletts

Aktinfasern spielen als Bestandteil des Cytoskeletts eine wesentliche Rolle für die Zellstabilität und bei der Zellbewegung. Zellbewegung ist entscheidend bei einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie zum Beispiel bei der Entwicklung eines Organismus, Wundheilung, Metastasenbildung bei Krebs oder bei der Immunabwehr. Auch wenn Schwimmen von manchen Zellen, wie zum Beispiel von einigen Bakterien, u.a. von *Escherichia coli*, zur Fortbewegung benutzt wird, ist Kriechen bei den meisten mobilen eukariotischen Zellen die Form der Fortbewegung.

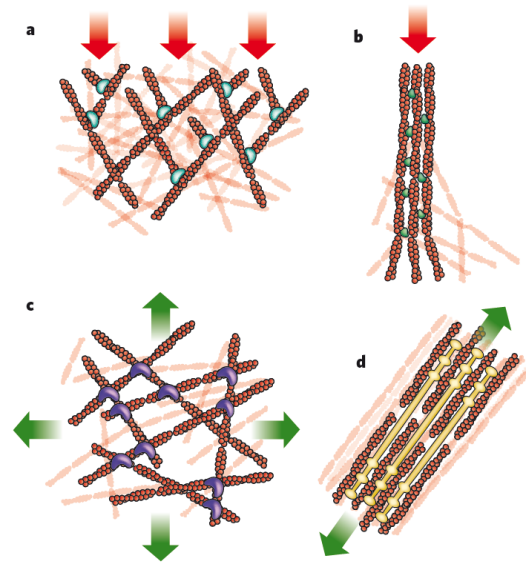
Bei der Fortbewegung erfährt die Zelle externe Kräfte, wie zum Beispiel durch den Widerstand des umgebenden Mediums, und interne Kräfte, die durch das Cytoskelett erzeugt werden. Das Cytoskelett ist ein Netzwerk aus Polymeren, welches aus drei unterschiedlichen Arten von Biopolymeren besteht: Aktin, Mikrotubuli und intermediäre Filamente. Abbildung 3.2.1 zeigt die Elemente des Cytoskeletts am Beispiel eines Axons. Die drei Bestandteile unterscheiden sich primär durch ihre Flexibilität. Am flexibelsten sind die Mikrotubuli, die geringste Flexibilität besitzen die intermediären Filamente und dazwischen liegen die Aktin-Filamente. Aktin-Filamente sind aus Dimeren von globulären Aktin-Monomeren aufgebaut und haben einen Durchmesser von  $\sim 7\text{nm}$  [NLH08]. Sie besitzen eine funktional polare Natur, was bedeutet, dass sie ein langsam wachsendes und ein schnell wachsendes Ende haben. Erreicht die Konzentration von Aktin-Monomeren an einem Ende einen kritischen Wert, so bindet das Filament Monomere und wächst durch Polymerisation. Im umgekehrten Fall schrumpft das Filament durch Depolymerisation.

Das Cytoskelett wird aufgebaut durch Kreuzverknüpfungen und Bündelung dieser Polymere, sowie durch Bindung von Motoren und anderen Proteinen. Damit ist das Cytoskelett eine organisierte Struktur, welche der Zelle Stabilität und Anpassungsfähigkeit bei gleichzeitiger Möglichkeit zur Fortbewegung verleiht. Die Architektur des Cytoskeletts passt sich an die lokal gegebenen Kräfteverhältnisse und Anforderungen an. Abbildung 3.2.2 zeigt an die vorherrschenden Kräfte angepasste Strukturen des Cytoskeletts.

Netzwerke mit Kreuzverknüpfungen zwischen kurzen Aktin-Fasern findet man in erster Linie an vorantreibenden Kanten der Zelle [HL94]. Bündel von parallelen dicht gepackten Aktin-Filamenten, sogenannte Stressfasern, verbinden entfernte Haftungspunkte der Zelle und ermöglichen der Zelle damit die für die Fortbewegung erforderlichen Kräfte durch die Zelle und auf den Untergrund zu übertragen [HL94].



**Abbildung 3.2.1.:** Komponenten des Cytoskeletts am Beispiel eines Neurons (a). Im Fluoreszenz-Mikrograph (b [RDB99]) sind die Mikrotubuli in grün und das Netzwerk der Aktin-Filamente in rot markiert (Skalierungsbalken: 20µm). (c) Im neuronalen Axon bilden Neurofilamente eine strukturelle Matrix, die Mikrotubuli enthält, welche Material vom Zellkörper zum Ende des Axons transportieren. (d) Der Konus enthält dendritische Netzwerke aus Aktinfilamenten und parallele Aktinfilament Filopodia. (e) Mikrotubuli bestehen aus 13 Protofilamenten aus Tubulin-Dimeren, welche eine hohle Röhre formen. (f) Neurofilamente besitzen flexible Polymerarme, welche benachbarte Neurofilamente abstoßen und den Radius des Axons bestimmen. (g) Die Netzwerke der Aktinfilamente können eine unterschiedliche Architektur aufweisen. Die Verzweigungen werden von Arp2/3 Komplexen (hier blau dargestellt) gebildet [FM10].



**Abbildung 3.2.2.:** Die variable Struktur des Cytoskeletts passt sich an die vorherrschenden inneren und äußeren Kräfte an (rote Pfeile: Kompression; grüne Pfeile: Spannung). (a) Verzweigte Netzwerke von Aktinfilamenten drücken gegen die Plasmamembran und externe Barrieren beim Erzeugen von Ausstülpungen und arbeiten dabei einer nach innen gerichteten Kompression entgegen. (b) Zu Filopodia gebündelte Filamente generieren ebenfalls Kräfte, die einer Kompression entgegenwirken. (c) Cortical (nicht ausgerichtete) Netzwerke unterhalb der Plasmamembran widerstehen aus unterschiedlichen Richtungen kommenden Spannungen. (d) Sogenannte Stressfasern, die aus Bündeln von Aktin- und Myosinfasern bestehen, erzeugen Spannungen zwischen Haftungspunkten der extrazellulären Matrix [FM10].

### 3.3. Kernporenkomplexe

Die Membranen des Zellkerns sowie die Kernlamina sind von Kernporenkomplexen durchsetzt. Als makromolekulare Anordnung besteht der NPC aus etwa 30 verschiedenen Proteinen, wovon jedes in mehrfacher Ausführung existiert [HSP<sup>+</sup>05], und ist für einen Großteil des Transports zwischen Kern und Zytoplasma verantwortlich. Analog einer Schleuse, läßt er bestimmte Moleküle, z.B. solche, die genetische Information tragen, selektiv passieren. Jeder Kernporenkomplex ist sowohl auf der zytoplasmatischen Seite als auch auf der Kernseite mit 8 feinen Filamenten ausgestattet, die sich mit einer Länge von etwa 50nm ringförmig ins Zytoplasma erstrecken bzw. an den Enden im Zellkerninneren so miteinander zusammenhängen, dass sie eine etwa 150nm lange korbähnliche Form annehmen [KGH<sup>+</sup>05]. Mit seiner achtfachen Rotationsymmetrie [WFP<sup>+</sup>01] besitzt der NPC eine diaphragmaähnliche Struktur. Eine schematische Darstellung des Kernporenkomplexes ist in Abbildung 3.3.1 zu sehen. Acht annähernd kugelförmige Moleküle bilden einen speichenartigen Ring mit einem Durchmesser von ca. 120nm und umgeben einen etwa 70nm langen Zentralkanal [HSP<sup>+</sup>05]. In diesem Kanal, der bei aktiven Zellen als Stätte eines regen Austausches zwischen Zellkern und Zytoplasma fungiert, befindet sich ein ca. 10nm langes zentrales Körperchen mit einem Durchmesser von ca. 45nm [KGH<sup>+</sup>05]. An dieser Stelle finden ribosomale Komponenten ihren Weg ins Zytoplasma, während zahlreiche Kernproteine hier in den Kern gelangen. Dabei können Moleküle mit einer Größe von bis zu 9nm frei durch den Kanal diffundieren. An diesem Ort befindet sich auch der fix positionierte p62-Komplex, dessen laterale Ausdehnung durch das Zentrum des NPCs begrenzt ist. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten 4Pi-Messungen an den Zellen der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 war das Protein p62 des Kernporenkomplexes mit Alexa 488 antikörpermarkiert um die Anzahl an Kernporenkomplexen pro Kern zu untersuchen.

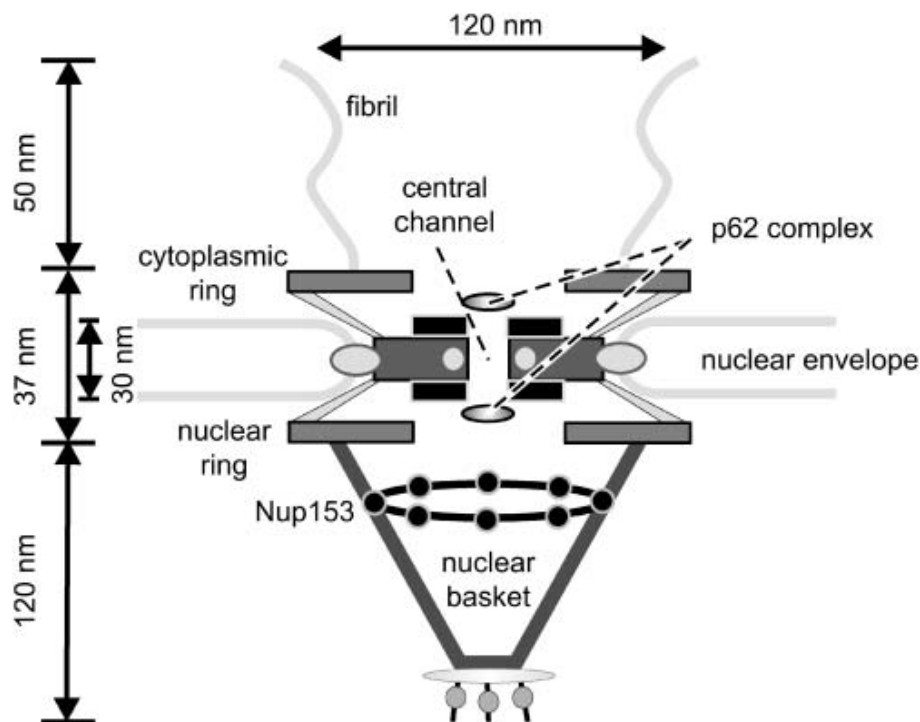


Abbildung 3.3.1.: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes [SFA99].

### 3.4. Chemotaxis in *Escherichia coli*

Chemotaxis in *Escherichia coli* (*E. coli*) ist eine der am Besten studierten Modellsysteme für Signaltransduktion. Obgleich die Chemotaxis auf der genetischen und biochemischen Ebene intensiv untersucht wurde, bleibt das Antwortverhalten weitestgehend unerklärt. Fortschritte in Computermodellierung und in quantitativer experimenteller Analyse lassen vermuten, dass kooperative Proteininteraktion in Rezeptorclustern eine entscheidende Rolle in der Signalprozessierung bei der bakteriellen Chemotaxis spielt [SB00b], [SB04]. Die ungefähre Größe der Rezeptorcluster wird auf 100-200nm geschätzt [MS93], [SB00a] und liegt damit gerade unterhalb der Auflösungsgrenze von konfokalen Laserrastermikroskopen (CLSM, engl.: Confocal Laser Scanning Microscope). In dieser Arbeit wurde optische Nanoskopie dazu verwendet, Strukturinformation von Rezeptorcluster unterhalb dieser Auflösungsgrenze zu erhalten.

Chemische Schreck- und Lockstoffe aus der Zellumgebung werden von Rezeptoren wahrgenommen. *E. coli*-Bakterien haben insgesamt fünf unterschiedliche Rezeptorproteine, wobei jeweils zwei Monomereinheiten eines Rezeptortyps einen Dimer bilden, welcher sich wiederum mit Dimeren anderer Rezeptoren zu Clustern zusammenfügt. Etwa 10 bis 30 solcher Cluster bilden große sensorische Multiprotein-Komplexe und lokalisieren an den Zellpolen oder an zukünftigen Teilungsstellen [MS93], [SB00a]. Dadurch kann ein Bakterium Einzelmolekülsensitivität erreichen. Die Gesamtzahl der bis zu 10000 Rezeptoren ist stark individuumsabhängig [GGRD92], [MS93].

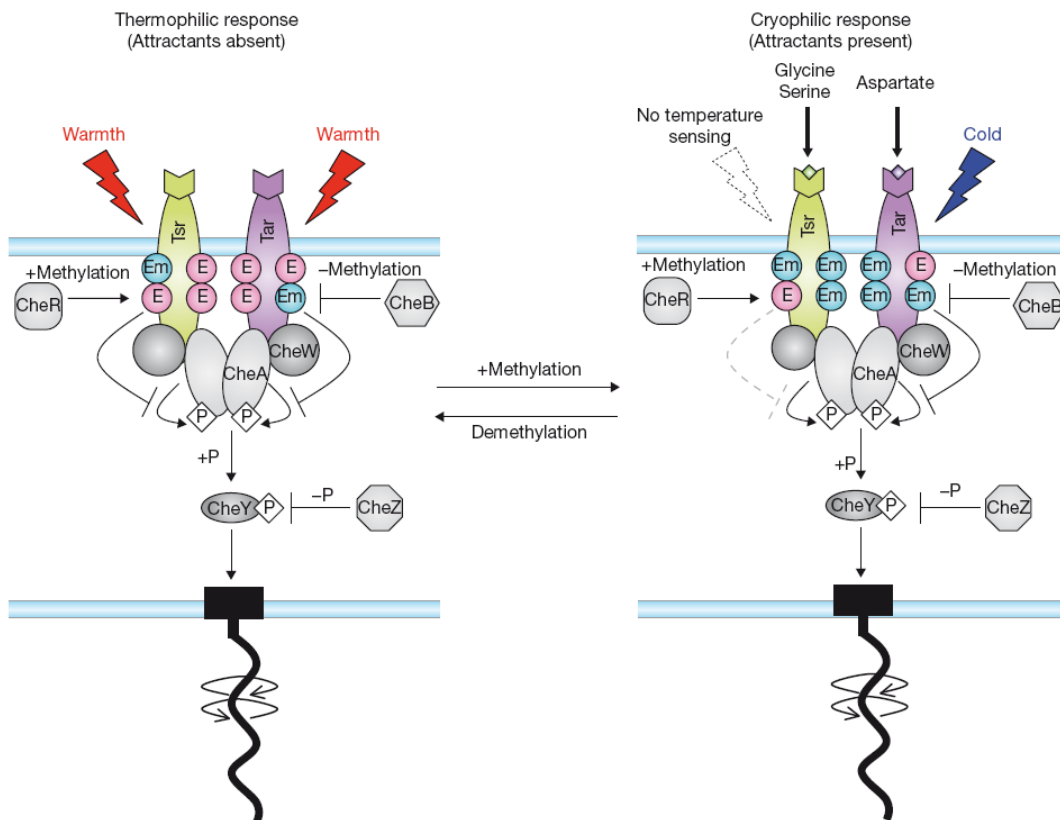
Die Bindung von Schreckstoffen erhöht die Autophosphorylierungsrate der Histidin-Kinase CheA, welche über das Adapterprotein CheW an die Rezeptoren gekoppelt ist (Abb. 3.4.1). CheA-P gibt seine Phosphatgruppe an den Antwortregulator CheY weiter, wodurch die Konzentration von CheY-P steigt. CheY-P kann an das flagellare Schalterprotein FLiM am bakteriellen Motorkomplex binden, wodurch eine Rotation des Flagellum im Uhrzeigersinn begünstigt induziert wird. Die Flagellen sind sich selbst aufbauende molekulare Komplexe und sorgen aufgrund ihrer helikalen Struktur ausschließlich bei Drehung gegen den Uhrzeigersinn für eine geradlinige Fortbewegung. Ist die Drehrichtung im Uhrzeigersinn führt dies zu ungerichtetem Taumeln des Bakteriums. Ohne Einfluss von Schreck- oder Lockstoffen, ist die Wahrscheinlichkeit für beide Drehrichtungen in etwa gleich, was zu einem unkorrelierten Wechsel zwischen Schwimmen und Taumeln des Bakteriums führt. Mit der Konzentration von CheY-P steigt somit auch die Wahrscheinlichkeit des Taumelns und damit erhöht sich bei steigender Schreckstoffkonzentration die Wahrscheinlichkeit, dass sich die Schwimmrichtung ändert. Würde CheY-P nicht aktiv abgebaut werden, bliebe dessen Konzentration auch wenn keine Schreckstoffmoleküle mehr vorhanden sind, lange konstant, was ein Verbleib im Taumelmodus zur Folge hätte. Allerdings sorgt die Phosphatase CheZ im Signalpfad für eine schnelle Dephosphorylierung von CheY-P.

Binden hingegen Lockstoffe an die Rezeptoren, sinkt die Autophosphorylierungsrate von CheA und die Konzentration von CheY-P nimmt ab.

Ohne weitere Komponenten in der Signalübertragung, wie die Proteine CheB und CheR, könnte das Bakterium zwar aus nährstoffarmen Regionen heraus erhöhten Lockstoffkonzentrationen folgen, würde aber bei gleichbleibender Sensorempfindlichkeit nicht in optimaler Umgebung bleiben. Da in optimaler Umgebung weiterhin Lockstoffe vorhanden sind, bliebe der Modus des Schwimmens gegenüber dem Taumelmodus begünstigt. Eine Anpassung der Sensorempfindlichkeit ermöglichen die Adapterenzyme CheR und CheB durch Methylierung bzw. Demethylierung der Rezeptoren. Die Methylierung der Rezeptoren erfolgt durch das Chemotaxisprotein CheR. Die Rezeptormethylierung sorgt bei hoher

Lockstoffkonzentration für die Abnahme der Rezeptorempfindlichkeit und für die Wiederherstellung des Ausgangszustandes (Abb. 3.4.1 rechts). Der umgekehrte Prozess der Demethylierung wird von dem Adapterenzym CheB hervorgerufen. Autophosphoryliertes CheA phosphoryliert neben CheY auch CheB. CheB-P wiederum demethyliert die Rezeptoren, wodurch deren Empfindlichkeit gegenüber Lockstoffen erhöht wird.

Dieses System der Signaltransduktion ermöglicht es dem Bakterium Lockstoffgradienten zu lokalen Konzentrationsmaxima hin zu folgen. Detaillierte Untersuchungen der Chemotaxis in *E. coli*-Bakterien finden sich u.a. in [SB00a], [SB04], [KLvB<sup>+</sup>05], [LvKS07] und [SRT<sup>+</sup>08].

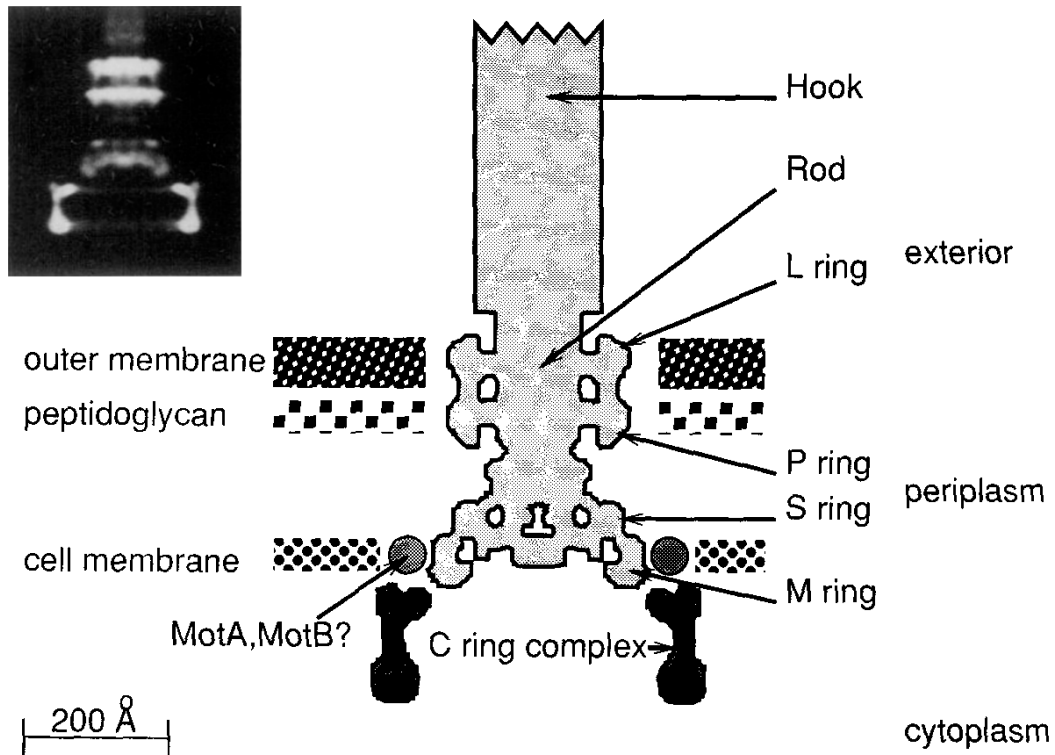


**Abbildung 3.4.1.:** Der Signalweg der Chemotaxis in *Escherichia coli* [SW07]. Bei Abwesenheit von Lockstoffen ist die Rezeptorempfindlichkeit hoch, was durch ein niedriges Niveau an mittlerer Methylierung der Rezeptoren (Em) hervorgerufen wird (links). Bei hoher Konzentration von Lockstoffen sinkt die Rezeptorempfindlichkeit durch den Anstieg der methylierten Rezeptoren (rechts). Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen wurden das Adapterprotein CheW, die Histidin-Kinase CheA und die Phosphatase CheZ fluoreszenzmarkiert.

Neben den Rezeptorproteinen wurden ebenfalls lokalisationsmikroskopische Untersuchungen an Motorproteinen der Flagellen durchgeführt. Eine schematische Skizze des molekularen Motorproteinkomplexes von *Escherichia coli* findet sich in Abbildung 3.4.2. Ein funktionelles Flagellum kann in einen Motor, einen Haken und ein Filament aufgeteilt werden. Der Rotor besteht aus einem basalen Körper und einem zyttoplasmatischen Schaltkomplex. Der basale Körper ist über den L-Ring mit der äußeren Membran, über den P-Ring mit der Zellwand und über den MS-Ring mit der inneren Membran verbunden (Abb. 3.4.2). Der Schaltkomplex besitzt ebenfalls eine ringförmige Struktur, die aus drei Proteinen besteht, die



FliG, FliM und FliN heißen. FliM und FliN bilden zusammen eine zyttoplasmatische glockenförmige Struktur, den sogenannten C-Ring, an den der phosphorierte Antwortregulator CheY bindet und die Rotationsrichtung des Motors anpasst.



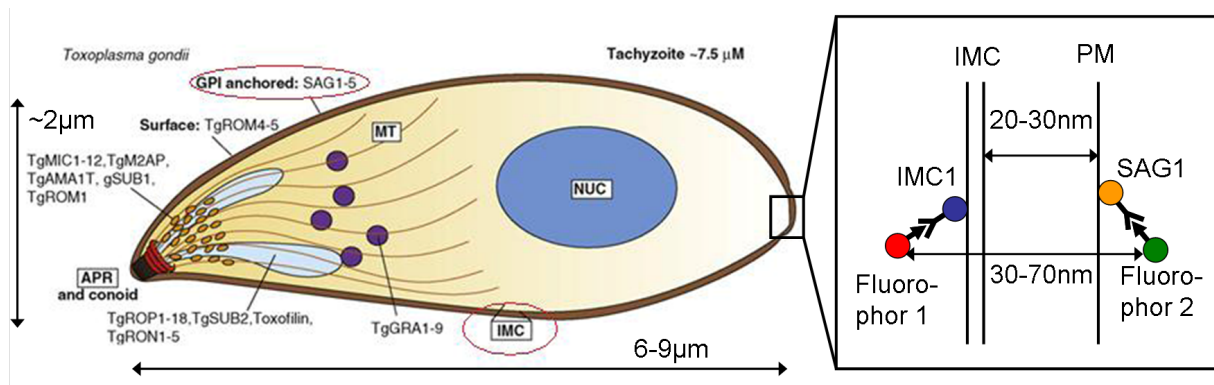
**Abbildung 3.4.2.:** Schemazeichnung und Elektronenmikroskop-Aufnahme des Motorproteinkomplexes von *Escherichia coli* [FSTD94]. In dieser Arbeit wurden die Proteine FliM vom C-Ring und FliF vom MS-Ring untersucht.



### 3.5. *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. F. Frischknecht (Parasitologie, Universität Heidelberg<sup>2</sup>) wurden Messungen an extrazellulären *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten durchgeführt. *Toxoplasma gondii* ist ein Parasit und der Erreger der Infektionskrankheit Toxoplasmose. Sein Endwirt sind Katzen. Als Zwischenwirt für den Erreger dienen alle anderen Säugetiere, einschließlich des Menschen. Etwa 60% der Bevölkerung in Deutschland besitzt Antikörper gegen *Toxoplasma gondii*, waren also bereits einmal mit dem Parasiten infiziert. Die Erkrankung verläuft meist symptomfrei. Im Stadium, welches der Parasit im Zwischenwirt einnimmt, in dem er sich schnell vermehrt, wird er *Tachyzoit* genannt. Es handelt sich um den invasivsten Status des Lebenszyklus, der alle Zellen mit Nucleus befallen kann. Der *Tachyzoit* ist halbmondförmig und hat eine Länge von 6-9  $\mu\text{m}$ . Das spitze apikale Ende beinhaltet spezialisierte sekretorische Organellen für die Zellinvasion. Für die Parasitologie ist *Toxoplasma gondii* aufgrund seiner nahen Verwandtschaft mit *Plasmodium*, dem Erreger der Malaria, interessant.

Erste Messungen und Analysen können in der Masterarbeit von Yiming Li nachgelesen werden [Li10]. Bei den Messungen wurde der innere Membrankomplex (engl.: *Inner Membrane Complex*, IMC) und das Oberflächen Protein SAG1 (engl.: *Surface Antigen*) markiert. Der IMC ist ein spezifisches Organell, das in 20-30nm Abstand zur Plasmamembran (PM) liegt (Abb. 3.5.1 rechts). Es stützt den Parasit mit der notwendigen Stabilität aus, damit er mechanischem Stress, z.B. bei Gleitbewegung, standhalten kann [ANea09]. Die Kraft für die Gleitbewegung und die Invasion stammen von einem Aktinmyosinmotor, der in dem Spalt zwischen IMC und Plasmamembran liegt. Um die Bewegungskräfte von Myosin in Fortbewegung des Parasiten umzuwandeln, muss der Motorkomplex fest in der Membran des IMC verankert sein [Bea08]. Über SAG1 ist noch nicht viel bekannt, außer dass es die gesamte Oberfläche des Parasiten bedeckt. Die meisten der humanen Antigene richten sich gegen dieses Protein. Diese beiden Proteine des IMC bzw. der Plasmamembran wurden markiert, um den Abstand zwischen ihnen zu analysieren. Abbildung 3.5.1 zeigt eine schematische Zeichnung der Zellmorphologie von *Toxoplasma*.



**Abbildung 3.5.1.:** Schemazeichnung der Zellmorphologie von *Toxoplasma Gondii* Tachyzoites (Bild teilweise aus [Bea08])

<sup>2</sup><http://www.medizinische-fakultaet-hd.uni-heidelberg.de/Malaria-3-Frischknecht.100117.0.html>



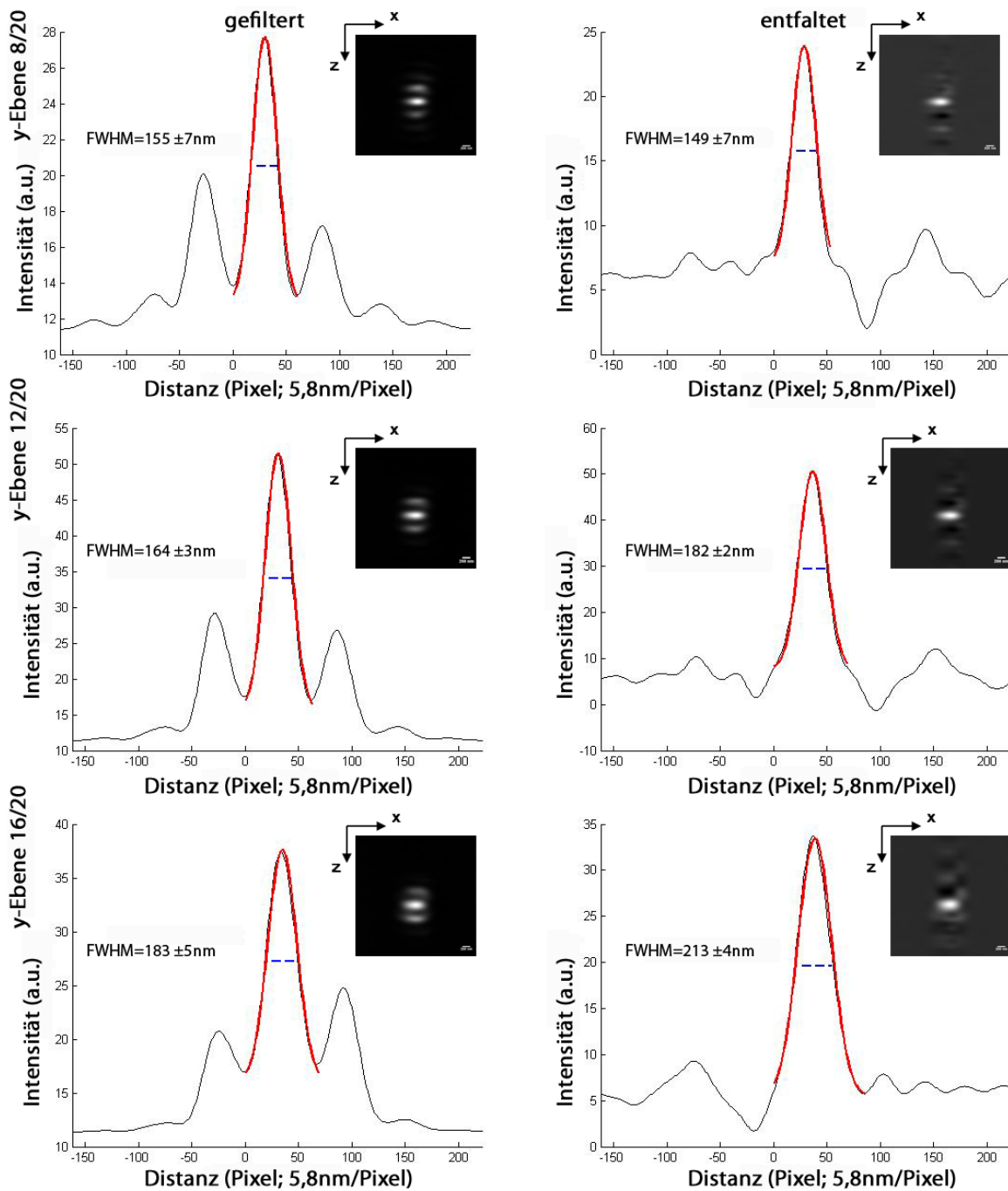
## 4. Nanoskopie mit fokussierter Beleuchtung: 4Pi Mikroskopie

### 4.1. Messungen an fluoreszenten Nanokugeln

Die durch die Nebenmaxima entstehenden sogenannten 'Geisterbilder', die typisch für 4Pi-Bilder sind, können theoretisch mithilfe von Entfaltung entfernt werden. Bedingung für ein vollständiges Entfernen der Nebenmaxima ist zum einen eine maximale relative Höhe der Nebenmaxima von  $\sim 45\%$  (vom Hauptmaximum) und zum anderen im Idealfall auch die gleiche Höhe der beiden Nebenmaxima. Messungen von fluoreszenten Nanokugeln (Beads) zeigten, dass diese Bedingungen in der experimentellen Realität nicht einfach zu erfüllen sind. Selbst bei sorgfältiger Probenpräparation mit Anpassung des Brechungsindex des Einbettungsmediums können lokale Änderungen des Brechungsindex nicht komplett vermieden werden und führen zu lateralen und axialen Phasendifferenzen. Zur Kompensation des axialen Phasenschubs implementierte Leica eine zusätzliche Phasenkompensation. Die zusätzliche Justage der Phasenkompensation zur ohnehin zeitaufwendigen 4Pi-Justage vor dem Start der eigentlichen Messung führt zu einem weiteren Ausbleichen der Probe, was nicht akzeptabel ist. Dies muss auch vor dem Hintergrund des ohnehin höheren Ausbleichproblems von fokussierenden Abbildungsverfahren im Vergleich zu Weitfeldbeleuchtung gesehen werden. Des Weiteren bringt das für die Anpassung des Brechungsindex nötige Einbettungsmedium TDE (Thiodiethanol; für Ölobjektive) eine geringere Effizienz der Fluoreszenz vieler gemeinhin gebräuchlichen Fluoreszenzfarbstoffe mit sich [SLM<sup>+</sup>07]. Bei der Auswertung der 4Pi-Aufnahmen einer grün fluoreszierenden Nanokugel (Abb. 4.1.1) zeigt sich der laterale Phasenschub daran, dass sich das Verhältnis von linken zu rechtem Nebenmaximum innerhalb von acht y-Schritten von 1,5 auf 0,7 ändert (Tabelle 4.1.1). In allen drei y-Ebenen können die Nebenmaxima durch 5-Punkt-Entfaltung entfernt werden (Abb. 4.1.1 rechte Spalte). Die unterschiedlich hohen Nebenmaxima führen jedoch zu Artefakten bei der Entfaltung. Die an das Hauptmaximum angepassten Gaussfunktionen zeigen Halbwertsbreiten von minimal  $155 \pm 7\text{nm}$  vor und  $149 \pm 7\text{nm}$  nach der Entfaltung. Es zeigt sich, dass sich die Halbwertsbreite durch die Entfaltung um mehrere zehn Nanometer ändern kann.

Abbildung 4.1.2 zeigt die mit einem Blurfilter bearbeitete 4Pi-Aufnahme eines 100nm großen grün fluoreszierenden Beads, welcher mit auf Ölimmersion korrigierten Objektiven und Einphotonen-Anregung aufgenommen wurde. Die Halbwertsbreite des Hauptmaximums von ca. 110nm macht deutlich, dass 4Pi-Mikroskopie mit Ölobjektiven und Einphotonen-Anregung prinzipiell möglich ist. Die in diesem Fall hohen Nebenmaxima von 70 bzw. 81% machten jedoch eine Entfaltung unmöglich.

An 4Pi-Aufnahmen von sechs Mikrometer großen Beads wurde neben dem lateralen auch der axiale Phasenschub untersucht. Abbildung 4.1.3 zeigt die 4Pi-Bilder eines 6 $\mu\text{m}$  großen Beads an drei unterschiedlichen y-Positionen sowie die zugehörigen axialen Intensitätsprofile durch die Mitte des Beads.

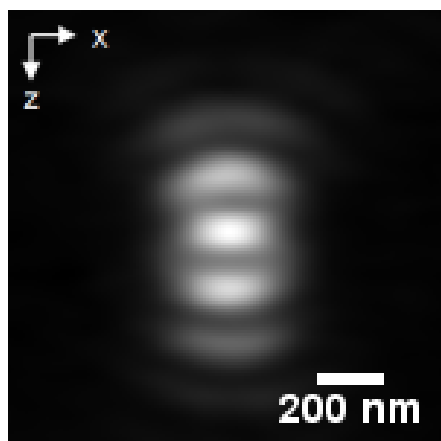


**Abbildung 4.1.1.:** Drei verschiedene y-Ebenen eines 4Pi-Bildstapels einer 100nm grün fluoreszierenden Nanokugeln (bzw. Cluster solcher Kugeln) mit Anpassung einer Gaussfunktion an das zentrale Maximum. Der laterale Phasenschub sorgt für unterschiedliche Verhältnisse der Nebenmaxima an den unterschiedlichen y-Positionen (100x Glycerol korr. Objektive, NA 1,35, Quarzdeckgläser; Einbettung: 83% Glycerol,  $n=1,460$ ; 2-Photonenanregung).

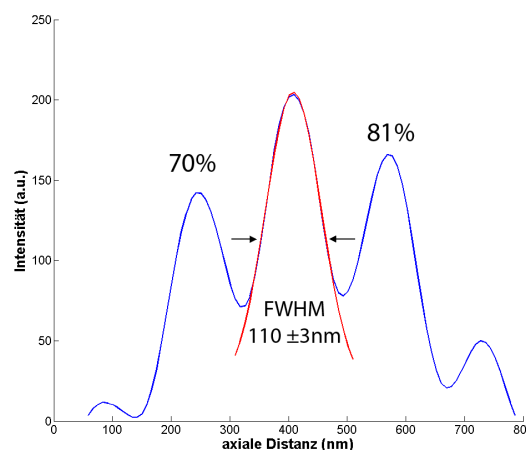
Die linke Spalte zeigt die mit einem Blurfilter bearbeiteten Rohdaten, während in der rechten Spalte die entfaltenen Bilder zu sehen sind. Die Aufnahmen belegen, dass sich der axiale Phasenschub, zu sehen an einem unterschiedlichen Höhenverhältnis der Nebenmaxima zwischen oberer und unterer Beadkante, bereits innerhalb eines Bildstapels ändert. Die von Leica eingebaute Phasenkompensation lässt sich

**Tabelle 4.1.1.:** Vergleich der Höhen der Nebenmaxima in Prozent des Hauptmaximums von den 4Pi-Aufnahmen in Abb.4.1.1. Am variablen Verhältnis von linkem zu rechtem Nebenmaximum erkennt man den lateralen Phasenschub.

Y-Ebene	Linkes Nebenmaximum (%)	Rechtes Nebenmaximum (%)	Verhältnis Linkes/Rechtes Nebenmaximum
8	54	35	1,5
12	45	38	1,2
16	36	51	0,7



(a)

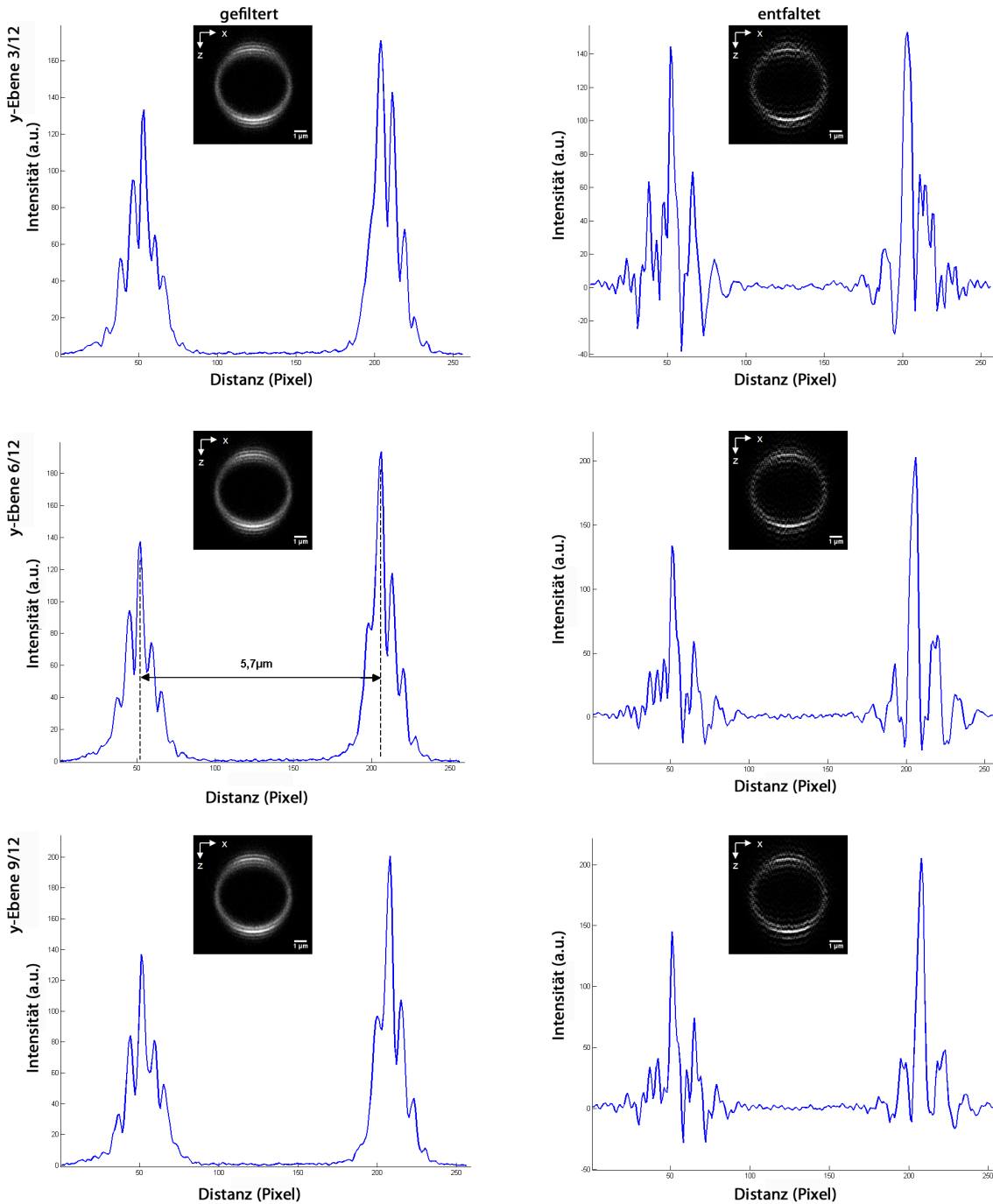


(b)

**Abbildung 4.1.2.:** (a) Mit einem Blurfilter bearbeitetes 4Pi-Bild eines 100nm grün fluoreszierenden Beads; aufgenommen mit Öbobjektiven. (b) Intensitätsprofil in z-Richtung APD-Detektion (100x Öl korr. Objektiv, NA 1,46, 488nm Anregung).

allerdings nur für ein bestimmtes Phasenverhältnis vornehmen. Auch bei diesen Messungen zeigt sich ein lateraler Phasenschub an dem sich mit der lateralen Position ändernden Verhältnis der Nebenmaxima. Die hohen Nebenmaxima und die nicht ganz auf das Hintergrundniveau runter gehenden Minima sorgen für Artefakte bei der Entfaltung der 4Pi-Bilder (Abbildung 4.1.3 rechts). Mithilfe einer Distanzmessung zwischen den beiden Hauptmaxima der Beadkanten an einem 4Pi-Bild vor der Entfaltung konnte der axiale Durchmesser des 6µm-Beads bis auf dreihundert Nanometer genau bestimmt werden.

Ein weiteres Problem der Justage der Phasenkompensation ist die Tatsache, dass es aufgrund von lokalen Änderungen des Brechungsindex erforderlich ist, die Korrektur in der ROI (engl.: Region Of Interest) selbst vorzunehmen. Dies führt zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis der eigentlichen Aufnahme. Zudem erfordert es Strukturen der biologischen Probe, die eine im Vergleich zur Punktbildfunktion geringe axiale Ausdehnung haben und zugleich hell genug sind. Diese Bedingung wird nicht von allen biologischen Proben erfüllt, wie im nächsten Kapitel (4.3) anhand eines Beispiels gezeigt wird.

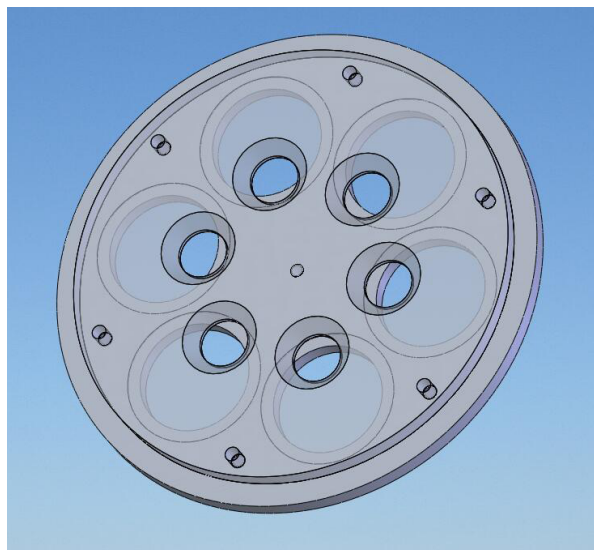


**Abbildung 4.1.3.:** 4Pi-xz-Schnitte eines  $6\mu\text{m}$  Beads: mit Blurfilter bearbeitet (links) und 5-Punkt-entfaltet (rechts). Aufnahmen an unterschiedlichen y Positionen (von oben nach unten Ebene: 3, 6, 9; Schrittweite: 30nm). Intensitätslinienprofile in z Richtung gemittelt über 20 Pixel (Pixelgröße: 37nm) in x um die Mitte des Beads. Deutlich zu erkennen ist die laterale und axiale Variation der Phase. Die gemessene Distanz zwischen den Hauptmaxima beträgt  $5,95\mu\text{m}$ . Die Nebenmaxima von  $<50\%$  führen zu Artefakten bei der Entfaltung. (100x Glycerol korr. Objektive, NA 1,35, Quarzdeckgläser; Einbettung: 83% Glycerol,  $n=1,460$ ; 2-Photonenanregung)

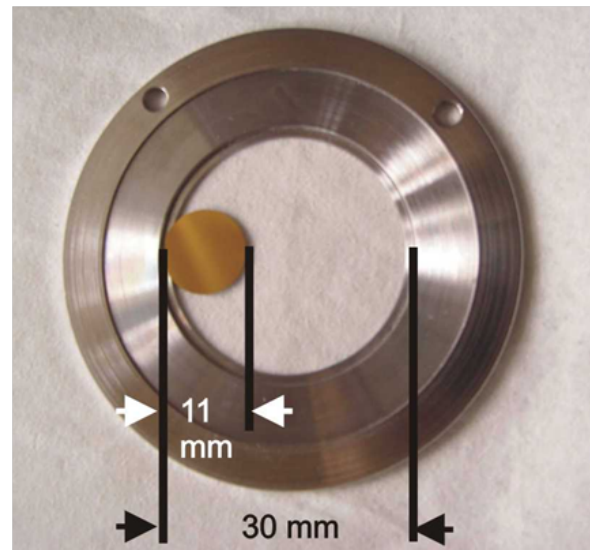
## 4.2. Physikalisch technische Herausforderungen

### Reflexionsbeschichtung der 4Pi-Deckgläser

Wie bereits in Kapitel 2.4.2 erwähnt wurden während meiner Doktorarbeit die Glycerin-Objektive am 4Pi-Mikroskop durch Öbobjektive ersetzt. Dieser Wechsel wurde durchgeführt, um zum einen 4Pi-Mikroskopie mit 1-Photonenanregung zu ermöglichen und zum anderen, um den Einsatz von teuren Quarzgläsern zu ersparen. Der Umbau wurde zwar von der Firma Leica unterstützt, allerdings bieten sie keine für die 4Pi-Mikroskopie erforderlichen Deckgläser mit Reflexionsbeschichtung aus BK7-Glas an. Aus diesem Grund wurden runde Standarddeckgläser ( $\varnothing$  30mm, # 1, Resolab<sup>1</sup>) in Kooperation mit den Angestellten des institutsinternen Reinraums selbst mit einer Reflexionsbeschichtung versehen. Um mehrere Deckgläser gleichzeitig beschichten zu können, wurde in Zusammenarbeit mit der mechanischen Werkstatt des Instituts eine spezielle Halterung der Deckgläser für die Bespatterungsanlage angefertigt. Die Form der Halterung verhindert, dass die gesamte Fläche der Deckgläser beschichtet wird. Eine CAD-Skizze der Baugruppe ist in Abbildung 4.2.1 (a) dargestellt. Die Reflexionsbeschichtung besteht aus einer 30nm dicken Titanschicht als Verbindung für eine 300nm Goldschicht. Die Maske ist so konstruiert, dass ein Vollkreis von 11mm Durchmesser tangential am Deckglasrand beschichtet wird (Abb.4.2.1 (b)). Damit ist gewährleistet, dass man die Position der Reflexionsschicht mit den Objektiven erreicht, ohne einen zu großen Flächenanteil des Deckglases für die eigentliche 4Pi-Messung zu verlieren.



(a)



(b)

**Abbildung 4.2.1.:** (a) CAD-Modell der in Zusammenarbeit mit der mechanischen Werkstatt und des Reinraums entwickelten Baugruppe zur Bespatterung der 4Pi-Deckgläser. (b) Foto eines mit der zur Justage erforderlichen Reflexionsschicht versehenen Deckglases im 4Pi-Halter.

<sup>1</sup>Bad Oeynhausen, <http://www.resolab.de>

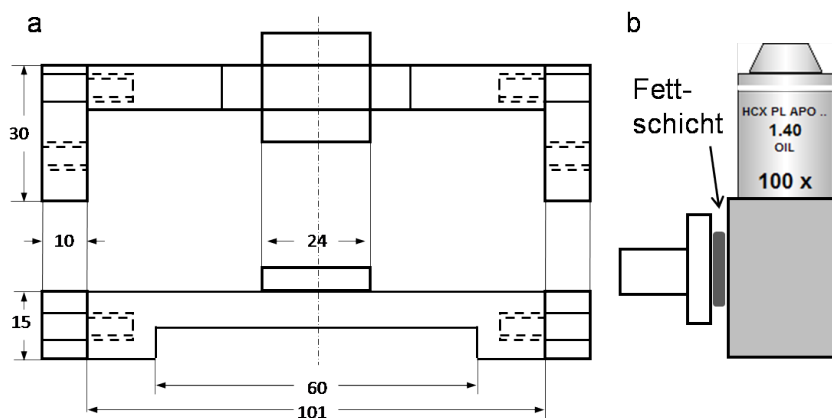


## Vibrationen am unteren Objektiv

Seit der Inbetriebnahme des 4Pi-Mikroskops in der AG von Prof. Cremer im Jahre 2005, war das Leica TCS-4Pi-Mikroskop mehrmalig für lange Zeitspannen (bis zu mehreren Monaten) aufgrund von technischen Problemen außer Betrieb. Diese reichten von gewöhnlichen Reparaturarbeiten bis hin zu spezifischen Problemen des Leica 4Pi-Mikroskops. Die aufgetretenen Probleme sollen nicht Schwerpunkt dieser Arbeit sein, da sie jedoch mit erheblichem Zeitaufwand verbunden waren, sollen die schwerwiegendsten Probleme kurz dargestellt werden.

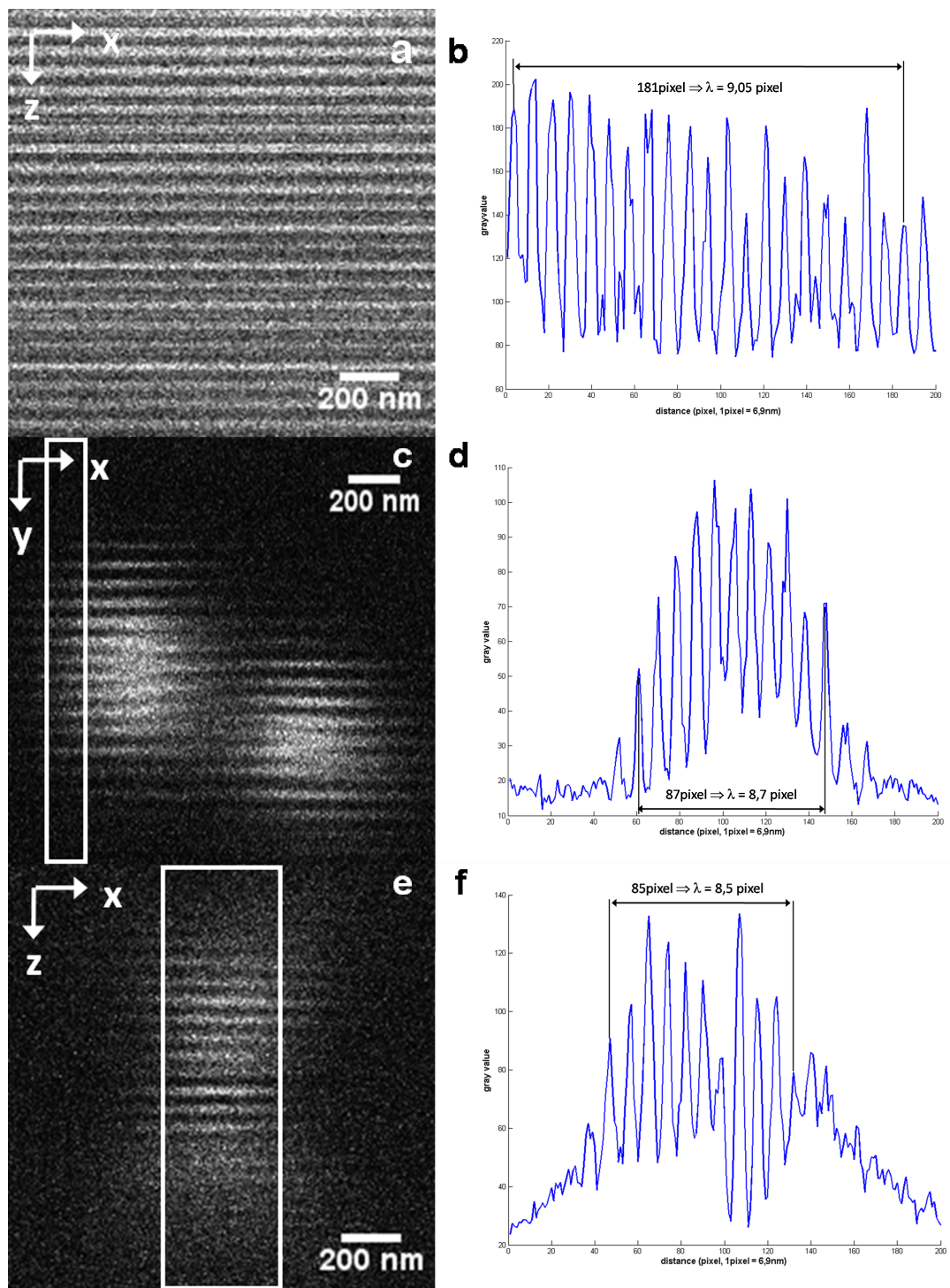
Eines der wiederkehrenden Hauptprobleme waren auftretende Artefakte der Intensitätsmodulation, deren Ursache vermutlich in Vibrationen des unteren Objektivs liegen. Während die ersten Artefakte durch den Ersatz des x-Galvometers beseitigt werden konnten, konnte die Quelle von weiterhin auftretenden Vibrationsproblemen nicht eindeutig bestimmt werden. Dieses Problem konnte bis jetzt nicht von Leica beseitigt werden. Ein Beispiel einer Messung mit erheblichen Artefakten ist in Abbildung 4.2.3 zu sehen. Die Intensitätsartefakte treten sowohl im Reflexionsmodus, als auch im Fluoreszenzmodus auf. Somit ist auszuschließen, dass die Ursache in Bewegungen des Objekts liegt. Desweiteren tritt die Intensitätsmodulation in beiden Rasterrichtungen auf, so dass die Ursache auch nicht in einem der Piezoelemente liegen kann. Es wurde eine Störfrequenz von  $\sim 45\text{Hz}$  gemessen.

Dem Rat von Dr. Engelhardt (Gruppenleiter am DKFZ) folgend, brachten wir ein zusätzliches Dämpfungsmodul an das untere Objektiv an. Mit dieser Methode ließen sich die Artefakte zu einem Minimum reduzieren, so dass Messungen prinzipiell wieder möglich sind. Eine technische Zeichnung des Moduls ist in Abbildung 4.2.2 zu sehen.



**Abbildung 4.2.2.:** In der Studentenwerkstatt angefertigtes Modul zur zusätzlichen Dämpfung des unteren Objektivs mithilfe einer Fettschicht. (a) Technische Zeichnung mit Vorderansicht (oben) und Draufsicht (unten). (b) Schematische Darstellung der Anbringung am Objektivhalter (Seitenansicht).

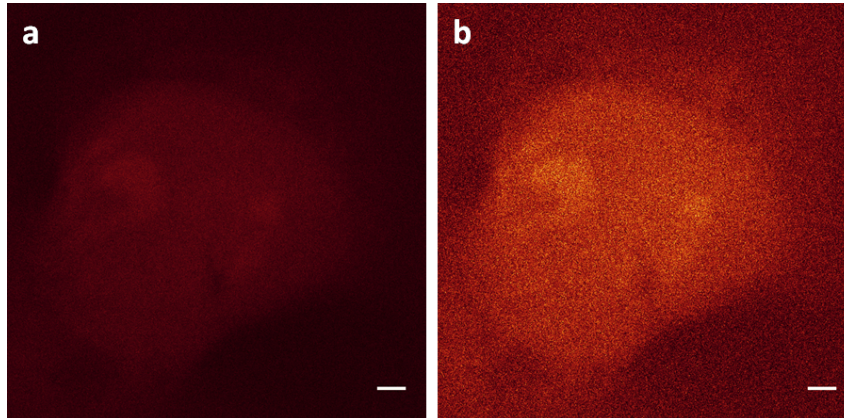




**Abbildung 4.2.3.:** Artefakte der Intensitätsmodulation aufgrund von Vibrationen des unteren Objektivs. (a) xz-Ebene im Reflexionsmodus. (c, e) 100nm grün fluoreszierende Nanokugel in xy-Ebene (c) und xz-Ebene (e). (b, d, f) Intensitätsprofile in x-Richtung gemittelt über gesamtes Bild (a) bzw. über weißes Rechteck (c, e). Mittlere Wellenlänge der Störfrequenz ist 8,8 Pixel, was einer Frequenz von  $\sim 45\text{Hz}$  entspricht (100x Öl korrr. Objektive, NA 1,46, 488nm Anregung, Rasterfrequenz 400Hz).

## Intensitätsunterschiede zwischen beiden Objektiven

Ein weiteres Problem des 4Pi-Mikroskops, welches bereits in einem der ersten Serviceberichte von Leica erwähnt wird (Herr Fiala, 17.02.2006), jedoch nie gelöst wurde, ist die unterschiedliche Intensitätsverteilung zwischen den beiden Objektiven. Auch wenn eine komplett identische Aufteilung der Intensität nicht möglich sein wird, ist das Maß an Ungleichheit an unserem Aufbau inakzeptabel (Abb. 4.2.4).



**Abbildung 4.2.4.:** Unbearbeitete Konfokalbilder einer fluoreszenzmarkierten adhärenen Zelle mit identischen Aufnahmeparametern mit (a) oberem und (b) unterem Objektiv. Deutlich erkennbar ist die unterschiedliche Intensität vom Faktor  $\sim 2,4$  ( $1\mu\text{m}$  bar, 100x Öl korr. Objektive, NA 1,46, 488nm Anregung).

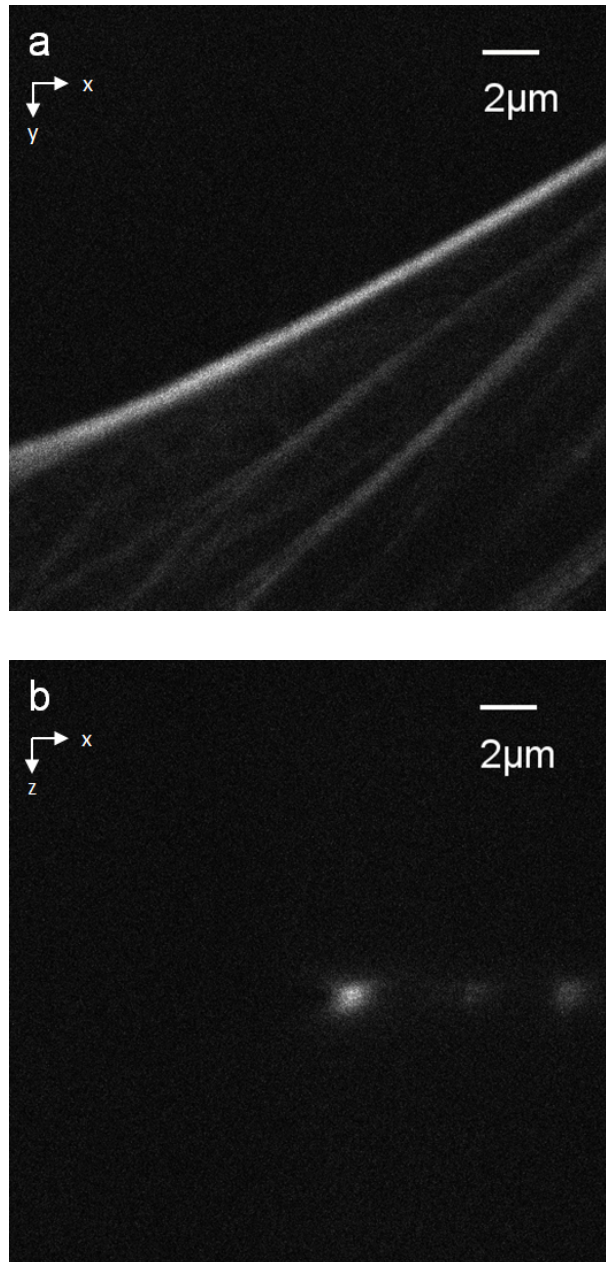
## 4.3. Messungen an biologischen Präparaten

### 4.3.1. Messungen von F-Aktin

Aktin ist ein Strukturprotein, welches in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Als einzelnes Molekül (monomer) wird Aktin als G-Aktin (globuläres Aktin) bezeichnet und ist ca. 42 kDa groß (375 Aminosäuren). In der polymerisierten Form wird es F-Aktin (filamentöses Aktin) genannt und bildet den Hauptbestandteil der Mikrofilamente. Der Polymerisationsvorgang zu F-Aktin als auch dessen Abbau kann sehr dynamisch den aktuellen Erfordernissen angepasst werden. Diese Filamente sind Bestandteil des Zytoskeletts und dienen damit der Stabilisierung der äußeren Zellform, sind an intrazellulären Transporten beteiligt und sind wesentlicher Bestandteil des Kontraktionsapparats der Muskeln.

Die Aktinfilamente schienen eine ausreichend feine Struktur zu sein, um die Abbildungscharakteristik des 4Pi-Mikroskops an einem biologischen Präparat zu testen. Markiert wurden die Filamente mit einer Phalloidin-Alexa 488 Färbung. Die Beispielaufnahme in 4.3.1 zeigt einen xy-Schnitt (a) und einen xz-Schnitt (b) eines 4Pi-Datenstapels von F-Aktin. Im lateralen xy-Schnitt sind deutlich einzelne Aktinfilamente zu erkennen. Am xz-Schnitt der Aufnahme sind keine Nebenmaxima der 4Pi-PSF zu erkennen. Daraus folgt, dass keine Bestimmung der Phase und somit keine Entfaltung der Bilddaten möglich ist. Dies ist ein grundsätzliches Problem der 4Pi-Mikroskopie, da ohne Entfaltung der Bilddaten die axiale Auflösungsverbesserung des Mikroskops nicht genutzt werden kann. Fluoreszente Beads mit Hilfe derer die Bestimmung der PSF erfolgen kann, müssen aufgrund von nicht zu vermeidenden lokalen

Schwankungen des Brechungsindex nah an der zu vermessenden Struktur liegen und können diese damit überstrahlen.

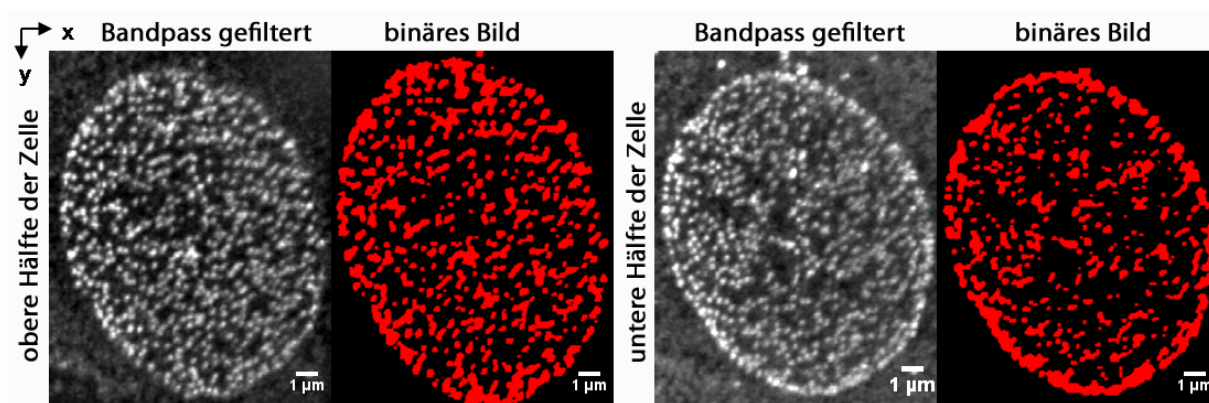


**Abbildung 4.3.1.:** F-Aktin mit einer Phalloidin-Alexa 488 Färbung. (a) xy-Ebene (b) xz-Ebene (100x Öl kor. Objektiv, NA 1,46, 488nm Anregung).

### 4.3.2. Messungen von Kernporenkomplexen in MCF7-Zellen

In eukariotischen Zellen ist das genetische Material von einer doppelten Membran eingeschlossen. Diese schützt für die Zelle essentielle Lese- und Kontrollprozesse der genetischen Information durch den Ausschluss der Mehrzahl von Molekülen im Cytoplasma vom Zellkern. Der Austausch von Makromolekülen zwischen diesen beiden wesentlichen Zellkompartimenten, Zellkern auf der einen und Cytoplasma auf der anderen Seite, wird von Kernporenkomplexen ermöglicht und kontrolliert. Die Kontrolle des Molekülaustauschs kann hierbei einerseits über selektive Filtermechanismen und andererseits über die Anzahl von Kernporenkomplexen erfolgen [SFA99]. Die Kenntnis über die Anzahl von Kernporenkomplexen ist somit ein wesentlicher Baustein für das Verständnis grundlegender zellinterner Prozesse.

Es wurden 4Pi-Messungen von Kernporenkomplexen (engl.: *nuclear pore complex (NPC)*) in MCF-7-Zellen durchgeführt. MCF-7 ist eine Mammakarzinomzelllinie epithelialen Ursprungs. Der molekulare Aufbau von Kernporenkomplexen wurde in Kapitel 3.3 erläutert. In den untersuchten MCF-7-Zellen wurde das Kernporenprotein p62 mit Alexa 488 antikörpermarkiert. Die Markierung sowie die Präparation der Zellen wurde von Dipl.-Physikerin Kathrin Maecken durchgeführt. In ihrer Arbeit finden sich die Ergebnisse weiterer Messungen [Mae07].



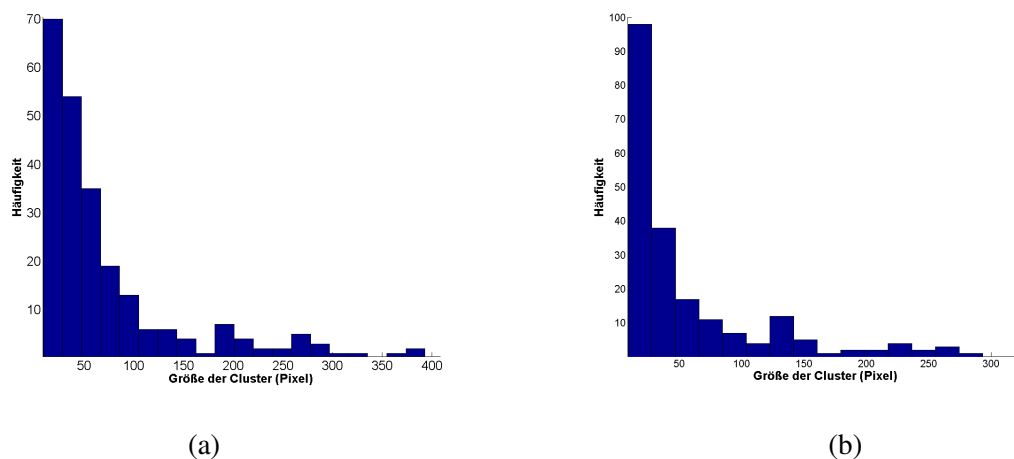
**Abbildung 4.3.2.:** Z-Projektionen der oberen bzw. unteren Hälfte eines 4Pi-Datenstapels einer MCF-7-Zelle mit Alexa 488-Färbung des Kernporenproteins p62. Jeweils links mit einem Bandpass gefiltert und rechts die erzeugte binäre Karte (100x Glycerol korrr. Objektive, NA 1,35, Quarzdeckgläser; Einbettung: 83% Glycerol,  $n=1,460$ ; 2-Photonenanregung).

Es wurde mit den 4Pi-Daten eine Analyse der Anzahl der Kernporenkomplexe unternommen. Hierfür wurde der Bildstapel in der Hälfte der Zelle geteilt und für beide Hälften eine Projektion in Richtung der optischen Achse vorgenommen. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurde an den entstandenen Bildern eine Bandpassfilterung vorgenommen. Ein gaussgefiltertes Bild mit Kernel 50 wurde von einem gaussgefilterten Bild mit Kernel 1 subtrahiert. Von dem so gefilterten Bild wurde ein binäres Bild erzeugt, indem alle Werte mit einem Grauwert von  $> 10$  auf 1 gesetzt wurden. Die gefilterten und binären Bilder der beiden Hälften einer Zelle sind in Abbildung 4.3.2 zu sehen. Auf das entstandene binäre Bild wurde eine morphologische Öffnung („imopen“-Algorithmus des MatLab<sup>2</sup>-Moduls „DIPimage“ [HvVR<sup>+</sup>02]) mit einer Maske von 3 Pixel angewendet, um dicht beieinander liegende Komplexe, die als eine zusammenhängende Fläche erscheinen, voneinander zu

<sup>2</sup><http://www.mathworks.de>

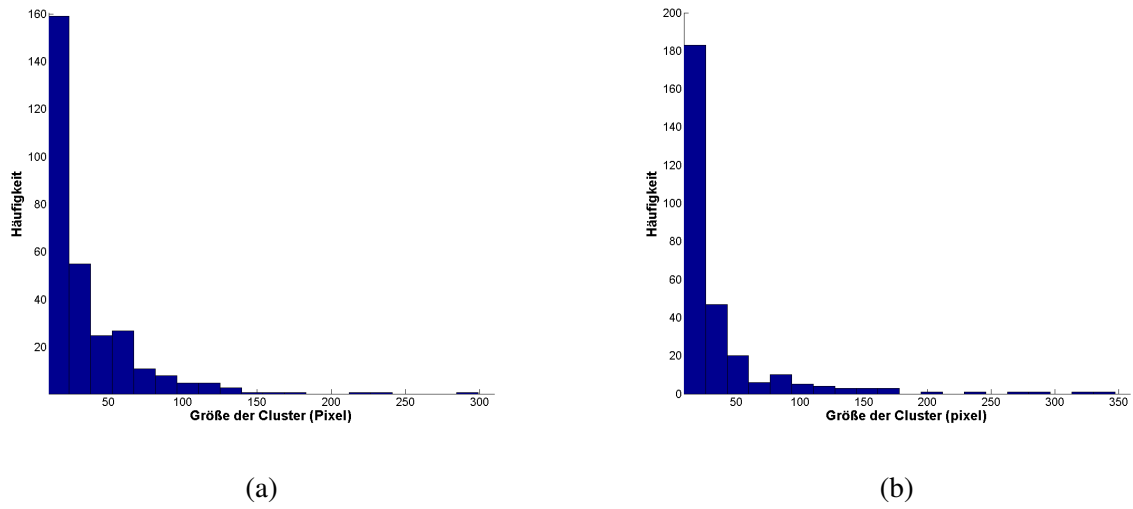


trennen. Anschließend wurde mit „DIPmeasure“ (von „DIPimage“) die Anzahl sowie die Fläche der NPCs bestimmt. Trotz der durchgeführten morphologischen Öffnung lässt es sich nicht vermeiden, dass sich insbesondere am Rand des Zellkerns durch die Projektion mehrere NPCs überschneiden. Um eine systematische Überschätzung der Größe bzw. eine Unterschätzung der Anzahl durch diesen Effekt zu vermeiden, wurden anhand der Histogramme 4.3.3-4.3.5 Schwellwerte für die Fläche der einzelnen NPCs bestimmt. Die Anzahl der NPCs in der Projektion wurde nun durch die Division der Gesamtfläche (in Abb.4.3.2 rot) durch die so bestimmte Fläche eines einzelnen NPC bestimmt. Nun wurde noch eine Abschätzung des Anteils an NPCs im Rand hinzugezählt. Diese Abschätzung erfolgte, indem die Zelle als Zylinder mit elliptischer Grundfläche angenähert wurde. Die Abmessungen (lange und kurze Achse, Höhe) des Zylinders wurden am jeweiligen Datenstapel abgemessen. Der Anteil des Zylindermantels an der Gesamtoberfläche wurde mit der über die Projektion bestimmte Anzahl multipliziert und zur Anzahl hinzugezählt. Die nach diesem Verfahren ermittelte mittlere Anzahl der Kernporenkomplexe pro Kern ist demnach  $1240 \pm 300$ . Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3.1 zusammengefasst.

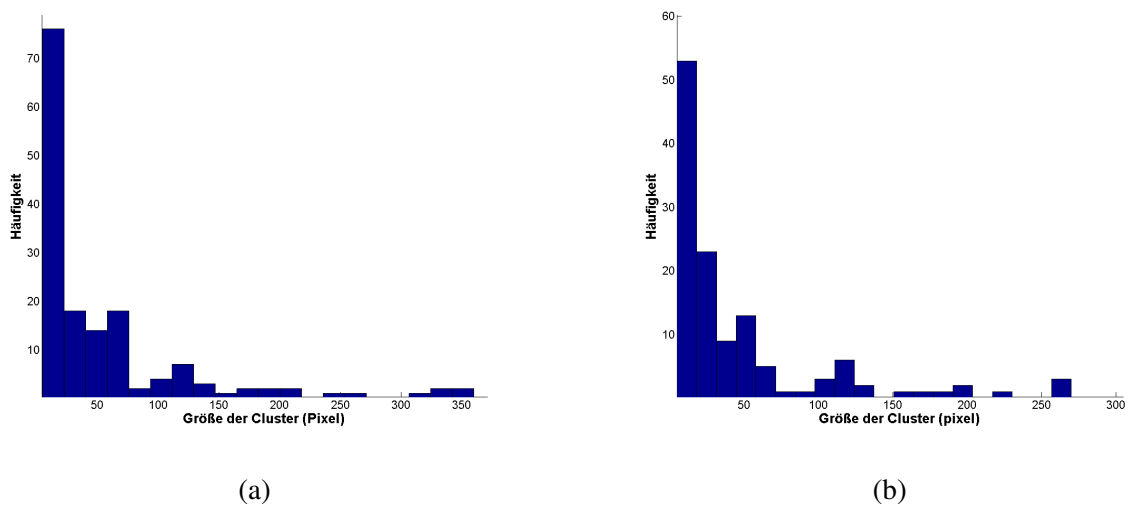


**Abbildung 4.3.3.:** Histogramm über Größe (Fläche) der Kernporenkomplexe (p62) in erster MCF7-Zelle in oberer Hälfte (a) und in unterer Hälfte (b) (Pixelgröße:  $2928 \text{nm}^2$ ).

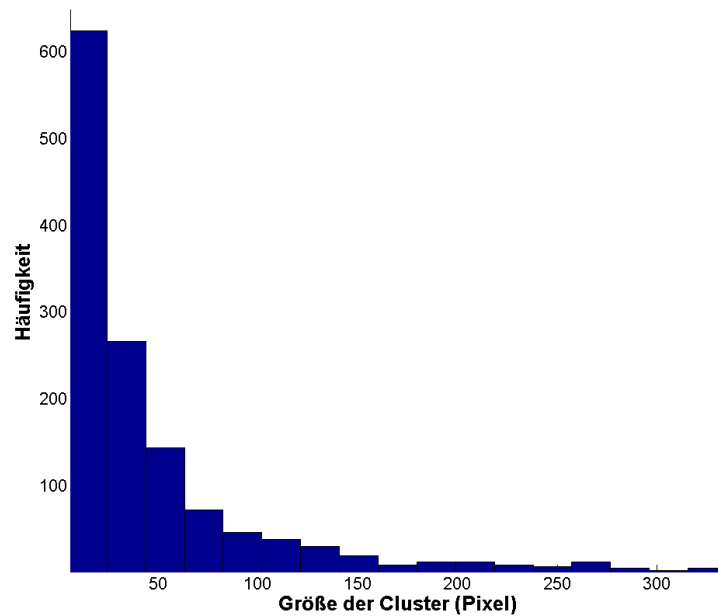
Abbildung 4.3.9 zeigt eine 3d-Rekonstruktion der 4Pi-Aufnahme einer MCF-7-Zelle mit Alexa 488-Markierung des Kernporenproteins p62. In der dreidimensionalen Darstellung 4.3.10 wurde nur der Mittelteil derselben MCF-7-Zelle rekonstruiert. Deutlich erkennbar ist eine Einstülpung der Kernmembran in Richtung der optischen Achse. Einen xz-Schnitt durch diese Ebene zeigt Abbildung 4.3.7(a), wohingegen in 4.3.7(b) das Intensitätsprofil der Einstülpung der Kernmembran (Markierung 1 nach 1') in Richtung der optischen Achse zu sehen ist. Die Proteine sitzen so dicht, dass sich die einzelnen 4Pi-Punktbildfunktionen überlagern. Abbildung 4.3.8 (a) zeigt das axiale Intensitätsprofil von Markierung 2 nach 2'. Die Höhen der Nebenmaxima betragen ca. 60 bzw. 52% des Hauptmaximums und sind somit zu groß für eine Entfaltung mit erfolgreicher Entfernung der Nebenmaxima. Dies bestätigt sich im Intensitätsprofil von Markierung 3 nach 3'. An dieser Stelle betragen die Nebenmaxima ca. 74 bzw. 39% des Hauptmaximums. An dem unterschiedlichen Verhältnis zwischen den beiden Nebenmaxima erkennt man die axiale Phasendifferenz zwischen den Positionen zwei und drei. An der Position zwei ist das linke Nebenmaximum um den Faktor 1,2 größer als das rechte, während dieser Faktor an der Position drei mit 1,9 deutlich höher liegt. Diese axiale Phasendifferenz ist ein zusätzliches Problem bei der Entfaltung der 4Pi-Bilddaten.



**Abbildung 4.3.4.:** Histogramm über Größe (Fläche) der Kernporenkomplexe (p62) in zweiter MCF7-Zelle in oberer Hälfte (a) und in unterer Hälfte (b) (Pixelgröße: 2928nm<sup>2</sup>).



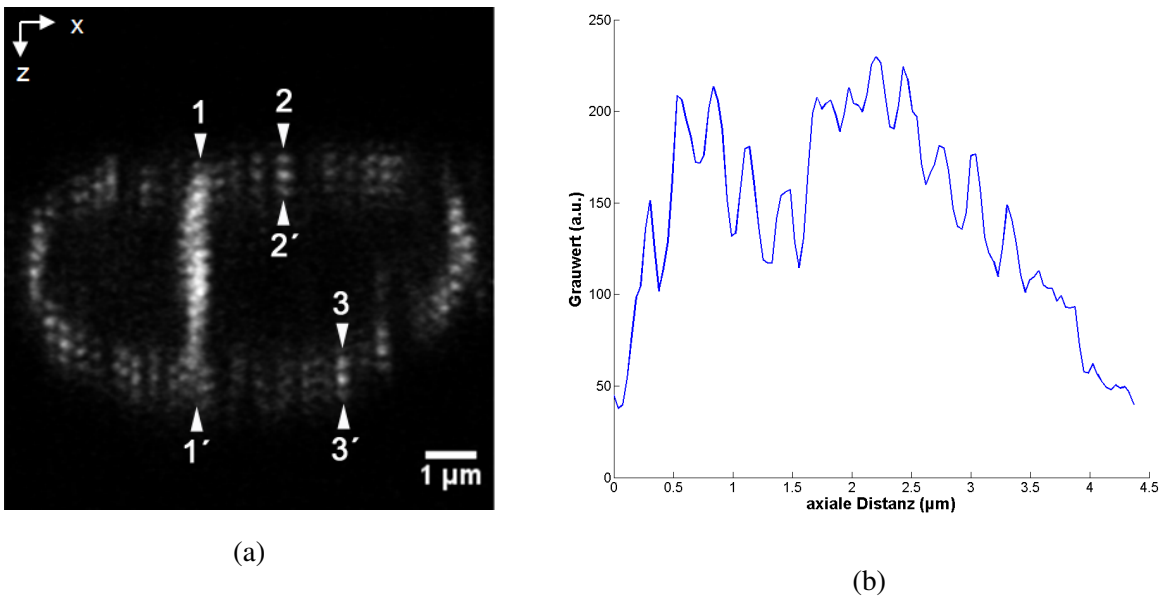
**Abbildung 4.3.5.:** Histogramm über Größe (Fläche) der Kernporenkomplexe (p62) in dritter MCF7-Zelle in oberer Hälfte (a) und in unterer Hälfte (b) (Pixelgröße: 2928nm<sup>2</sup>).



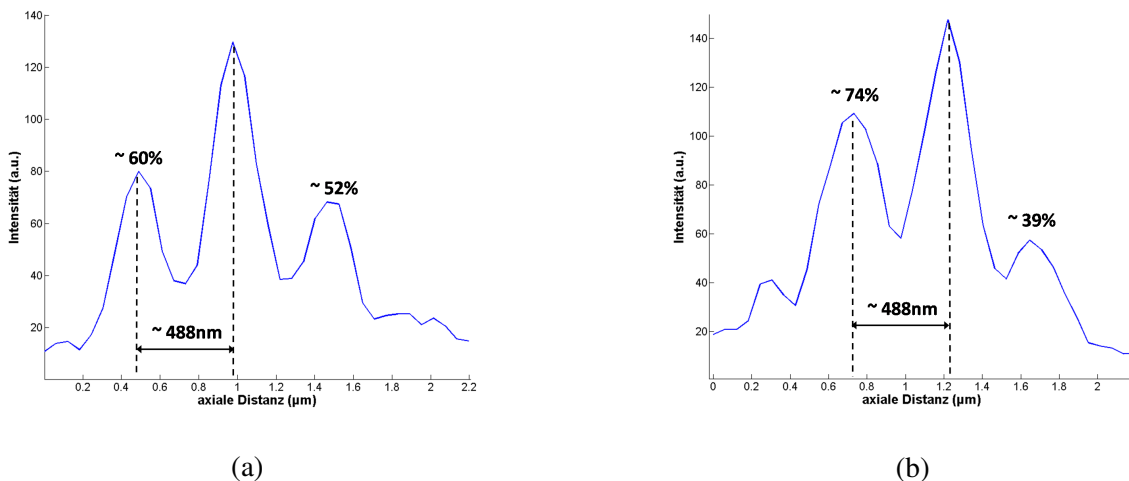
**Abbildung 4.3.6.:** Histogramm über Größe (Fläche) der Kernporenkomplexe (p62) aller drei MCF7-Zellen (Pixelgröße:  $2928\text{nm}^2$ ).

**Tabelle 4.3.1.:** Quantitative Analyse von Kernporenkomplexen (p62) mit 4Pi-Mikroskopie. Mittlere ermittelte Anzahl von NPCs pro Kern ist  $1240 \pm 300$  (Clustergröße von 100 Pixel  $\equiv$  Fläche von  $100 \times 2928\text{nm}^2$ ).

	Mittlere Fläche von kleinen NPCs (Pixel; $48 \times 61\text{nm}^2$ )	Summe der NPC-Fläche (Pixel)	Zahl der NPCs M/S	Gesamtzahl der NPCs pro Kern
Zelle 1, obere Hälfte	< 40: 20 < 60: 24	<600: 11151 <200: 10393	558 Mean: 433 496	496 + 506 + 1/5 (oben+unten) = <b>1202 ± 300</b>
Zelle 1, untere Hälfte	< 40: 18 < 60: 21	<600: 10586 <200: 8907	588 Mean: 424 506	
Zelle 2, obere Hälfte	< 40: 22 < 50: 26	<600: 18818 <300: 15477	855 Mean: 595 725	725 + 453 + 1/6 (oben+unten) = <b>1374 ± 300</b>
Zelle 2, untere Hälfte	< 40: 21 < 60: 24	<300: 11661 <175: 8416	555 Mean: 350 453	
Zelle 3, obere Hälfte	< 40: 16 <100: 30	<600: 10535 <300: 7069	658 Mean: 236 447	447 + 316 + 1/2 (oben+unten) = <b>1145 ± 300</b>
Zelle 3, untere Hälfte	< 40: 16 <100: 25	<600: 6341 <300: 5903	396 Mean: 236 316	



**Abbildung 4.3.7.:** (a) xz-Schnitt einer 4Pi-Aufnahme von einer MCF-7-Zelle mit Alexa488-Markierung des Kernporenproteins p62. Man erkennt die für 4Pi-Mikroskopie charakteristischen Nebenmaxima. (b) Intensitätsprofil der Einstülpung (Markierung 1 nach 1') der Kernmembran in Richtung der optischen Achse. Die Proteine sitzen so dicht, dass sich die einzelnen 4Pi-Punktbildfunktionen überlagern (100x Glycerol korr. Objektive, NA 1,35, Quarzdeckgläser; Einbettung: 83% Glycerol, n=1,460; 2-Photonenanregung).

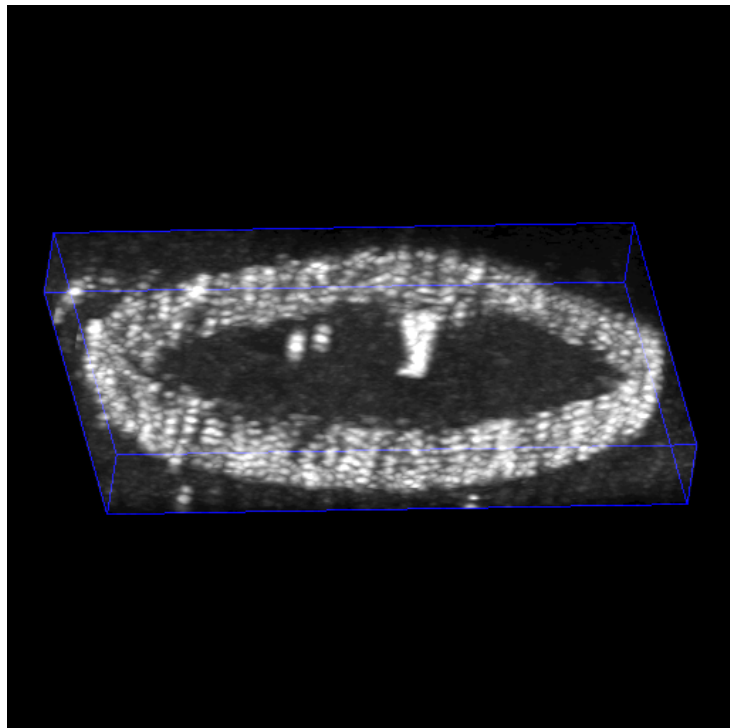


**Abbildung 4.3.8.:** (a) Axiales Intensitätsprofil von Markierung 2 nach 2' in Bild 4.3.7 a der Kernmembran. (b) Axiales Intensitätsprofil von Markierung 3 nach 3' in Bild 4.3.7 a der Kernmembran. Eingetragen sind die Höhen der Nebenmaxima in Prozent des Hauptmaximums. Die Nebenmaxima sind zu hoch für eine Entfaltung. Man erkennt die axiale Phasendifferenz zwischen den Positionen 2 und 3. Der Abstand vom ersten Nebenmaximum zum Hauptmaximum beträgt jeweils ca. 488nm (100x Glycerol korr. Objektive, NA 1,35, Quarzdeckgläser; Einbettung: 83% Glycerol, n=1,460; 2-Photonenanregung).





**Abbildung 4.3.9.:** 3d-Rekonstruktion einer 4Pi-Aufnahme von einer MCF-7-Zelle mit Alexa488-Markierung des Kernporenproteins p62. Deutlich erkennbar ist eine Einstülpung der Kernmembran in Richtung der optischen Achse (100x Glycerol korr. Objektive, NA 1,35, Quarzdeckgläser; Einbettung: 83% Glycerol,  $n=1,460$ ; 2-Photonenanregung).



**Abbildung 4.3.10.:** 3d-Rekonstruktion des Mittelteils der MCF-7-Zelle mit Alexa488-Markierung des Kernporenproteins p62 aus Abbildung 4.3.9. (100x Glycerol korr. Objektive, NA 1,35, Quarzdeckgläser; Einbettung: 83% Glycerol,  $n=1,460$ ; 2-Photonenanregung).



# 5. Nanoskopie mit strukturierter Beleuchtung: SMI

## 5.1. Experimenteller Aufbau des SMI Vertico

Die im Rahmen meiner Arbeit durchgeführten SMI-Aufnahmen, als auch der Großteil der SPDM-Aufnahmen, wurde am sogenannten SMI Vertico durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung dieses Aufbaus findet sich in vorangehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe (u.a. [Rey07], [Lem09]). Es wurden seitdem einige Veränderungen vorgenommen. Abbildung 5.1.1 zeigt eine schematische Skizze der aktuellen Version des SMI Vertico. Die bisher verwendeten Gaslaser wurden durch diodengepumpte Festkörperlaser ersetzt. Da diese im Gegensatz zu den Gaslasern passiv gekühlt werden, erzeugen sie keine Vibrationen und konnten direkt auf demselben optischen Tisch installiert werden. Es stehen die drei Wellenlängen 405nm (BFi OPTiLAS<sup>1</sup>), 488nm (Coherent, Modell „Saphire 488-200“<sup>2</sup>) und 568nm (Coherent, Modell „Saphire“<sup>3</sup>) zur Verfügung. Wobei zur Zeit noch kein passender Filtersatz zur Verwendung der 405nm Wellenlänge am SMI Vertico vorhanden ist. Diese kommt nur an dem benachbarten TIRF-Mikroskop (engl.: total internal reflection fluorescence) zum Einsatz, in welches die selben Laserlinien eingekoppelt werden können. Zusätzlich ist es möglich eine rote Laserlinie von 647nm über eine Glasfaser vom Nachbarlabor am SMI Vertico auszukoppeln. In der experimentellen Praxis stellte sich jedoch heraus, dass die durch die Faser transmittierte Laserleistung zumindest für die SPDM-Aufnahmen nicht ausreicht. Die Laserlinien werden mit den dichroitischen Spiegeln (DM) 1-3 zusammengeführt und im Kollimator um den Faktor 2,5 aufgeweitet. Die Lokalisationslinse (LL) mit einer Brennweite von 500mm wird nur für den Gebrauch des Mikroskops im SPDM-Modus in den Strahlengang geführt und sorgt für die erforderliche Erhöhung der Laserleistung im Objektraum. Bei den mit dem fluoreszenten Protein YFP markierten Präparaten wurden bei den SPDM-Messungen Leistungsdichten von ca.  $2\text{kW}/\text{cm}^2$  verwendet. Bei Präparaten mit einer Fluoreszenzmarkierung mit organischen Farbstoffen waren höhere Leistungsdichten von ca.  $10\text{kW}/\text{cm}^2$  erforderlich, um die Farbstoffe in den reversibel gebleichten Zustand zu versetzen. Der Strahlteiler (BS) teilt den kollimierten Laserstrahl 50:50 für die SMI-Messungen notwendige interferometrische Einheit auf. Mit den beiden Linsen L1 und L2 werden die Teilstrahlen in die jeweilige hintere Fokusebene der beiden hochnumerischen Objektive O1 und O2 (Leica<sup>3</sup>, HCX PL APO, 63x, NA=0,7-1,4) fokussiert, so dass die beiden kollimierten Laserstrahlen im SMI-Modus zwischen den Objektiven ein stehendes Wellenfeld in axialer Richtung erzeugen. Wird das Mikroskop im SPDM-Modus betrieben, so wird der untere Strahlengang geblockt. Die auf einem Standardobjektträger präparierte Probe kann mit drei einachsigen Schrittmotoren (Physical Instruments<sup>4</sup>) und einem einachsigen Piezoaktuator (Physical Instruments) im Fokus positioniert bzw. durch das stehende Wellenfeld

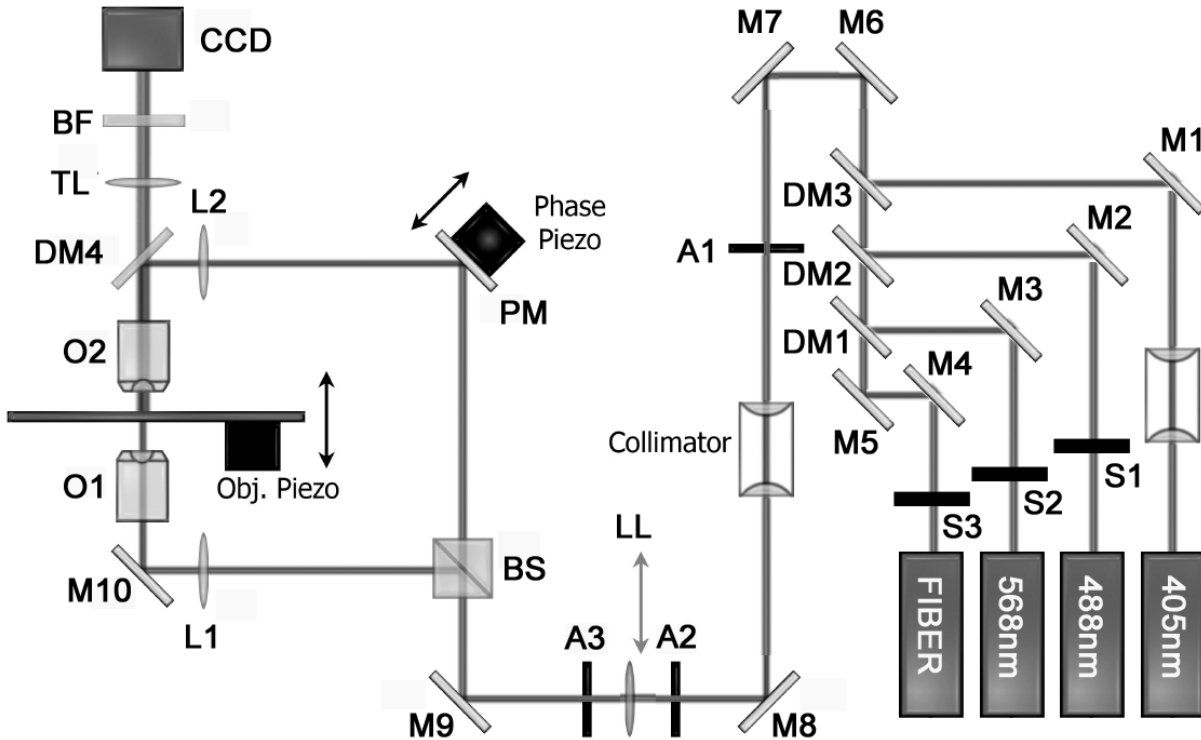
<sup>1</sup>Dietzenbach, <http://www.bfioptilas.de>

<sup>2</sup>Santa Clara, USA, <http://www.coherent.com>

<sup>3</sup>Wetzlar, <http://www.leica-microsystems.com>

<sup>4</sup>Karlsruhe, <http://www.pi.de>

gefahren werden. Der Dichroid DM4 (AHF<sup>5</sup>, F63-488) trennt das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht, welches mit einer CCD-Kamera (PCO<sup>6</sup> „SensiCam qe“) detektiert wird. Diese ist hochsensitiv, d.h. sie besitzt im relevanten Spektrum eine Quantenausbeute von bis zu 65%.



**Abbildung 5.1.1.:** Skizze des Vertico-SMI-Aufbaus, an dem die SMI-Aufnahmen als auch ein Großteil der SPDM-Aufnahmen dieser Arbeit gemacht wurden. Im SMI-Modus wird durch Interferenz der beiden entgegengerichteten kollimierten Strahlen zwischen den beiden Objektiven ein stehendes Wellenfeld erzeugt, durch welches das Objekt mit Hilfe des Objektpiezos axial durch das Wellenfeld (Objektrasterung), bzw. umgekehrt die Phase des Wellenfeldes mit Hilfe des Phasenpiezos (Phasenrasterung) durch das Objekt gefahren wird. Im SPDM-Modus wird mit der Linse LL die Intensität im Objekt erhöht und der untere Strahlengang abgeblockt (Bild aus [KLG<sup>+</sup>09a] modifiziert).

## 5.2. SMI Mikroskopie

### 5.2.1. Rezeptorproteine in *E. coli* Bakterien

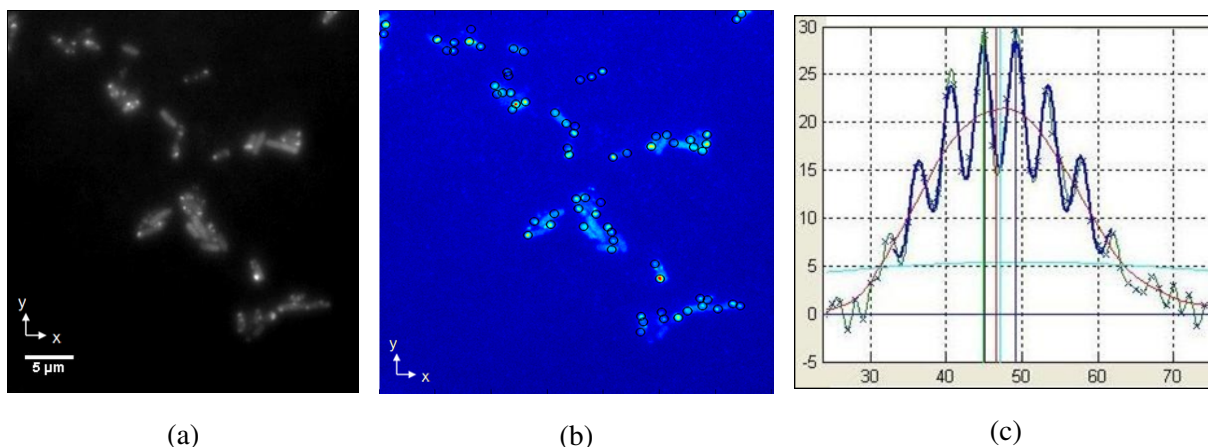
Eine der in dieser Arbeit verwendeten unfokussierten hochauflösenden Mikroskopie-Methode, ist die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte SMI Mikroskopie (SMI, engl.: Spatially Modulated Illumination). Das Prinzip dieser Mikroskopie-Methode wurde in Kapitel 2.4.3 genauer erklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der SMI-Mikroskopie das mit YFP (engl.: Yellow Fluorescent Protein) markierte Rezeptorprotein CheZ in *E. coli*-Bakterien untersucht. Eine Beispielaufnahme ist in Abbildung 5.2.1 zu sehen. Abbildung 5.2.1(a) zeigt das zugehörige Weitfeldbild, während in 5.2.1(b) die

<sup>5</sup>Tübingen, <http://www.ahf.de>

<sup>6</sup>Kehlheim, <http://www.pco.de>

entsprechende Bildausgabe nach Anwendung der von Dr. David Baddeley geschriebenen Analysesoftware zu sehen ist. In dieser Bildausgabe werden die vom Algorithmus gefundenen Objekte mit Kreisen markiert. Abbildung 5.2.1(c) zeigt schließlich eine beispielhafte Axiale Intensitätsverteilung eines der gefundenen Objekte. Es ist deutlich die für eine SMI-Aufnahme typische axiale Intensitätsmodulation zu sehen. Desweiteren erkennt man die beiden Einhüllenden deren Intensitätskontrast zur Berechnung der Objektgröße dient.



**Abbildung 5.2.1.:** SMI-Daten von YFP markiertem Rezeptorprotein CheZ. (a) Weitfeldbild (b) Bild der identischen Region nach Anwendung der Analysesoftware mit Markierungen der gefundenen Objekte (c) Axiale Intensitätsverteilung eines Objektes. (Software von Dr. David Baddeley)

**Tabelle 5.2.1.:** Quantitative Analyse der SMI-Daten von *E. coli*-Bakterien mit YFP markiertem Rezeptorprotein CheZ (30µM IPTG, 140mW Laserleistung, 100ms Integrationszeit).

Bildstapel	Anzahl der Signale	Mittlere Größe (nm)	Standardabw. (nm)	Standardabw. (%)
1	31	<b>148</b>	34	23
2	19	<b>162</b>	25	15
3	14	<b>201</b>	59	29
4	12	<b>171</b>	29	17
5	7	<b>177</b>	26	15
6	22	<b>165</b>	38	23
7	88	<b>175</b>	42	24
8	51	<b>177</b>	43	24
(Mittelwert) gesamt	244	<b>171</b>	39	22

Die Ergebnisse der SMI-Analysen sind in den Tabellen 5.2.1 und 5.2.2 zusammengefasst. Hierbei wurde das Rezeptorprotein bei der ersten Messreihe mit 30 M IPTG induziert, während bei der zweiten Messreihe 50µM IPTG verwendet wurde. Die Aufnahmen erfolgten am sogenannten Vertico-SMI, dessen Aufbau im Kapitel 2.4.3 vorgestellt wurde. Die Aufnahmen wurden mit einer Ausgangsleistung des Argon-Krypton-Ionenlasers (Coherent) von 140mW bei einer Wellenlänge von 488nm durchgeführt. Es sind keine unterschiedlichen Größen der Cluster von Rezeptorproteinen bei unterschiedlicher IPTG-Induzierung zu erwarten. Dies konnte durch die Messungen bestätigt werden, da die Mittelwerte inner-

**Tabelle 5.2.2.:** Quantitative Analyse der SMI-Daten von *E. coli*-Bakterien mit YFP markiertem Rezeptorprotein CheZ (50 $\mu$ M IPTG, 140mW Laserleistung, 193ms Integrationszeit).

Bildstapel	Anzahl der Signale	Mittlere Größe (nm)	Standard-abw. (nm)	Standard-abw. (%)
1	6	<b>176</b>	56	32
2	11	<b>196</b>	74	38
3	21	<b>165</b>	56	34
4	8	<b>147</b>	38	26
5	13	<b>171</b>	49	29
6	29	<b>151</b>	39	26
7	9	<b>156</b>	50	32
8	12	<b>176</b>	66	38
9	6	<b>143</b>	68	48
(Mittelwert) gesamt	115	<b>164</b>	53	34

halb der Standardabweichung miteinander übereinstimmen. Der Mittelwert für die Größe der Rezeptorproteincluster für die Messreihe mit 30 $\mu$ M IPTG liegt bei 171  $\pm$ 39nm, während der mit 50 $\mu$ M IPTG bei 164  $\pm$ 53nm liegt. Es ist zu beachten, dass für die Analyse eine kugelförmiger Objektform angenommen wurde.

## 6. Nanoskopie mit homogener Beleuchtung: Lokalisationsmikroskopie

### 6.1. Rezeptorproteine in *E. coli* Bakterien

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sind Lokalisationsmikroskopie Messungen an unterschiedlichen Proteinen in *Escherichia coli* Bakterien. Es wurden sowohl Rezeptorproteine als auch Motorproteine untersucht. Wie in Kapitel 3.4 erläutert, bilden die Chemotaxisrezeptoren Multiproteinkomplexe. Ziel der Messungen war es, diese Proteinkomplexe mithilfe der Lokalisationsmikroskopie zu detektieren und auf ihre Größe und Substruktur hin zu untersuchen. Ergänzend zu den mit SMI erhaltenen axialen Größen der Komplexe, wurden hierbei insbesondere laterale Einzelmoleküldistanzen mit den Distanzen innerhalb von Zufallsverteilungen verglichen. Zudem wurde der Einfluss von Zellfixierung auf die innerbakteriellen Proteinverteilungen untersucht. Die Zellkultur wurde in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe von Dr. Victor Sourjik (ZMBH<sup>1</sup>) durchgeführt (Protokolle befinden sich im Anhang A).

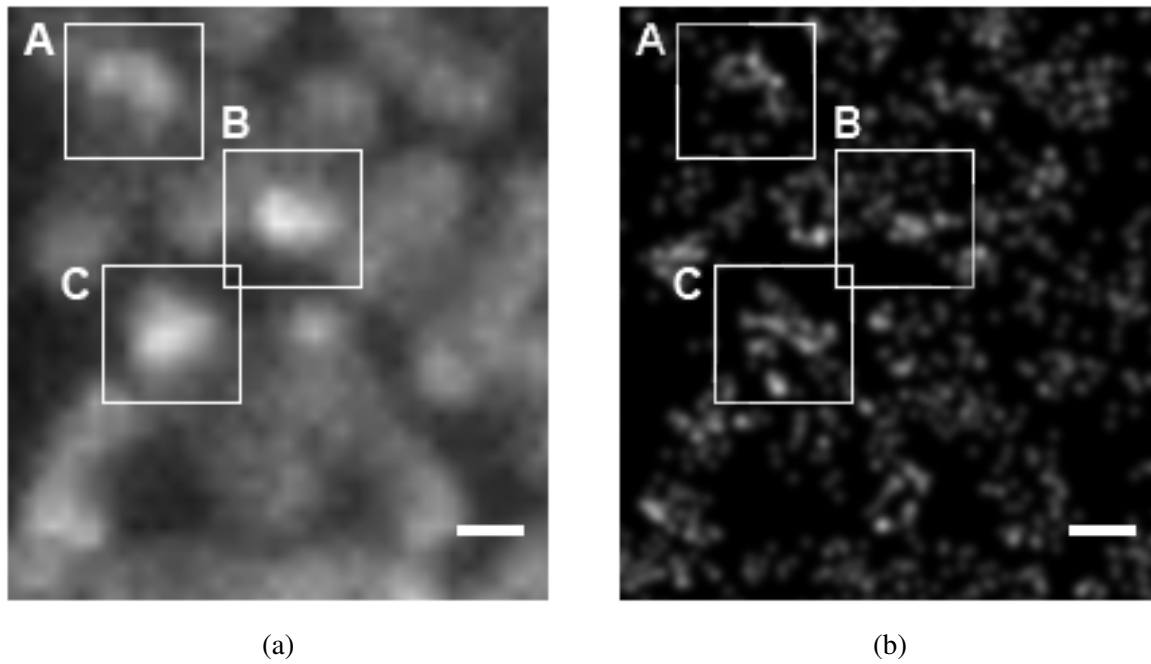
#### 6.1.1. Untersuchung der Substruktur von Rezeptorclustern des Proteins CheZ

Die ersten lokalisationsmikroskopischen Aufnahmen an *E. coli* Bakterien wurden an dem Rezeptorprotein CheZ realisiert. Abbildung 6.1.1 zeigt eine Beispielaufnahme der Messungen. Die bereits im Weitfeldbild (6.1.1 a) erkennbaren Cluster des Rezeptorproteins CheZ, sind auch im SPDM-Bild zu erkennen. Die bessere Strukturauflösung zeigt sich in der genaueren Analyse der mit weißen Rechtecken markierten Cluster A, B und C. Vergrößerte Abbildungen der ROI (engl.: *Region Of Interest*) A finden sich in Abbildung 6.1.2 (a) und (b). Abbildung 6.1.2 (c) zeigt die zugehörigen Intensitätsprofile in Richtung der längeren Seite des eingezeichneten Rechtecks gemittelt über die kürzere Seite ( $\sim 100\text{nm}$ ). Beim Vergleich der Intensitätsprofile zeigt sich die verbesserte Strukturauflösung der SPDM-Aufnahme im Vergleich zum Weitfeldbild. Die Anpassung einer Gaussverteilung an eine der Substrukturen innerhalb des Clusters besitzt eine Halbwertsbreite von  $137 \pm$  mit einem Fehler der Anpassung von 2nm. Der geringe Fehler liegt hierbei daran, dass bei der SPDM-Darstellung Gaussfunktionen mit der Lokalisationsgenauigkeit als Standardabweichung verwendet werden. Die gleiche Analyse wurde an der ROI B (Abb. 6.1.3) und ROI C (Abb. 6.1.4) vorgenommen. Die an eine Substruktur in ROI B angepasste Gaussfunktion zeigt eine Halbwertsbreite von  $85 \pm 2\text{nm}$  und in ROI C von  $102 \pm 2\text{nm}$ . Dies ergibt einen Mittelwert der Halbwertsbreiten der gemessenen Substrukturen innerhalb der Cluster des Rezeptorproteins CheZ von  $108 \pm 2\text{nm}$ .

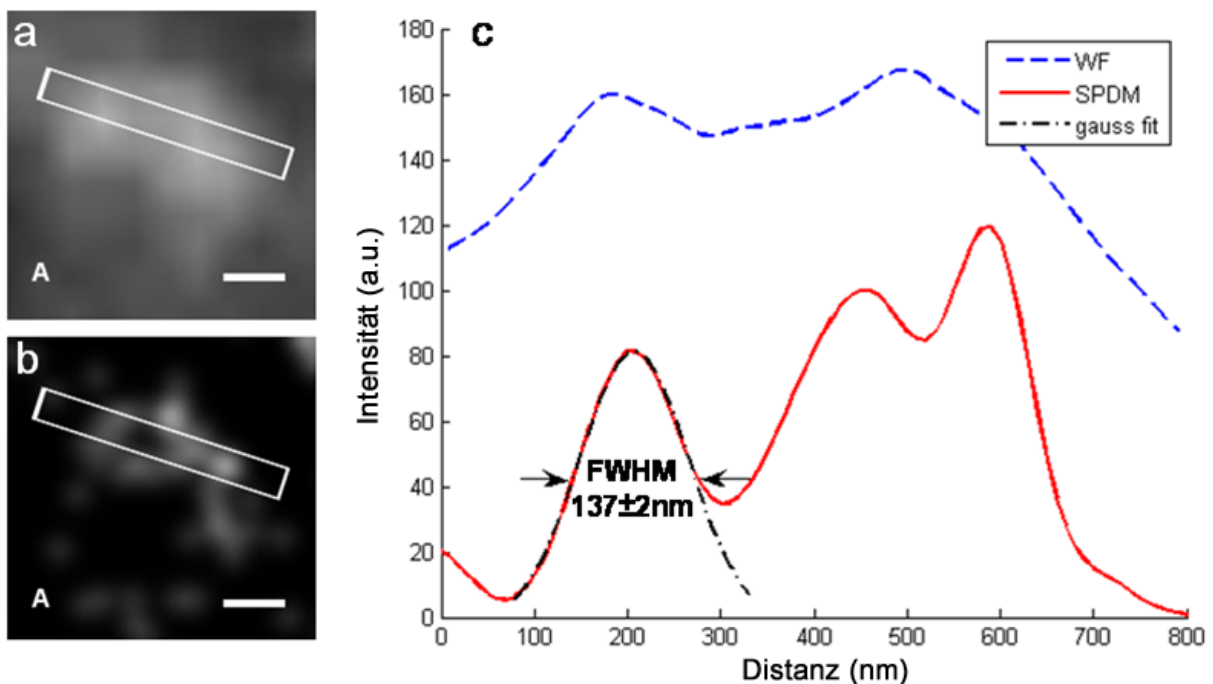
Zur genaueren Untersuchung der Substrukturen innerhalb der Rezeptorcluster wurden Distanzanalysen an dem Rezeptorprotein CheW vorgenommen.

---

<sup>1</sup>Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg

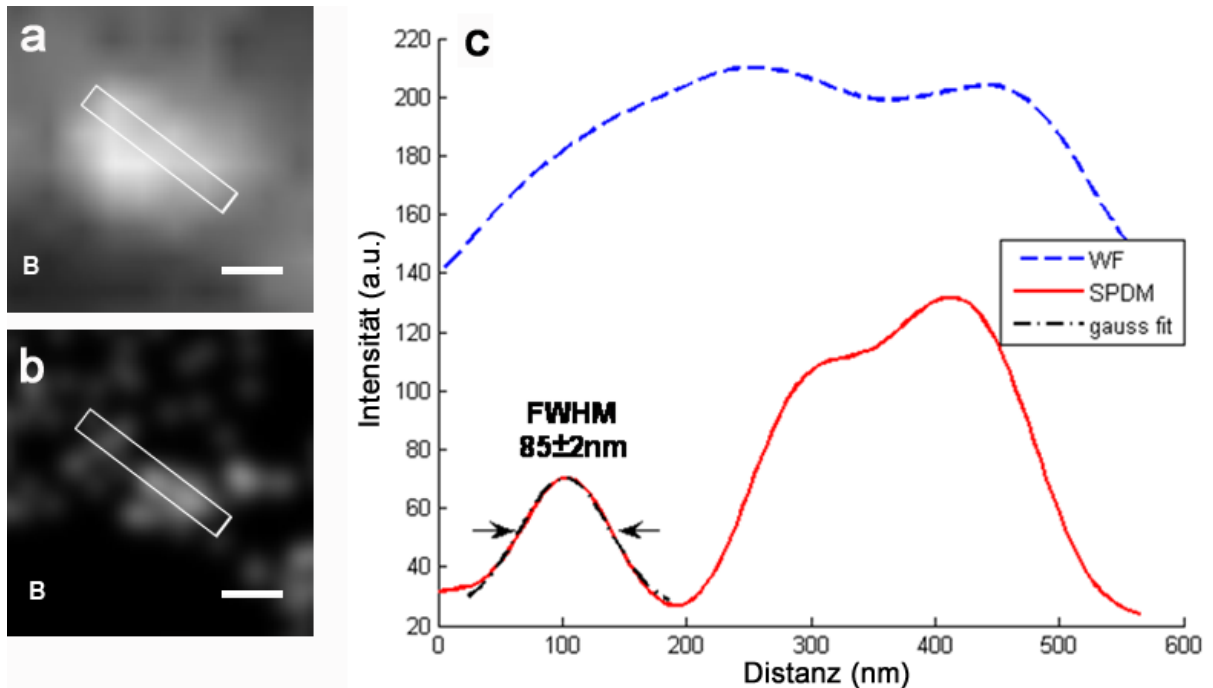


**Abbildung 6.1.1.:** Weitfeld- (a) und SPDM-Bild (Einzelsignale mit mittlerer Lokalisationsgenauigkeit verschmiert) (b) von *E. coli* Bakterien mit YFP markiertem Rezeptorprotein CheZ. Die Rezeptorcluster sind deutlich auch im SPDM-Bild zu erkennen. Die Cluster A, B und C wurden genauer untersucht (Skalierungsbalken: 500nm).

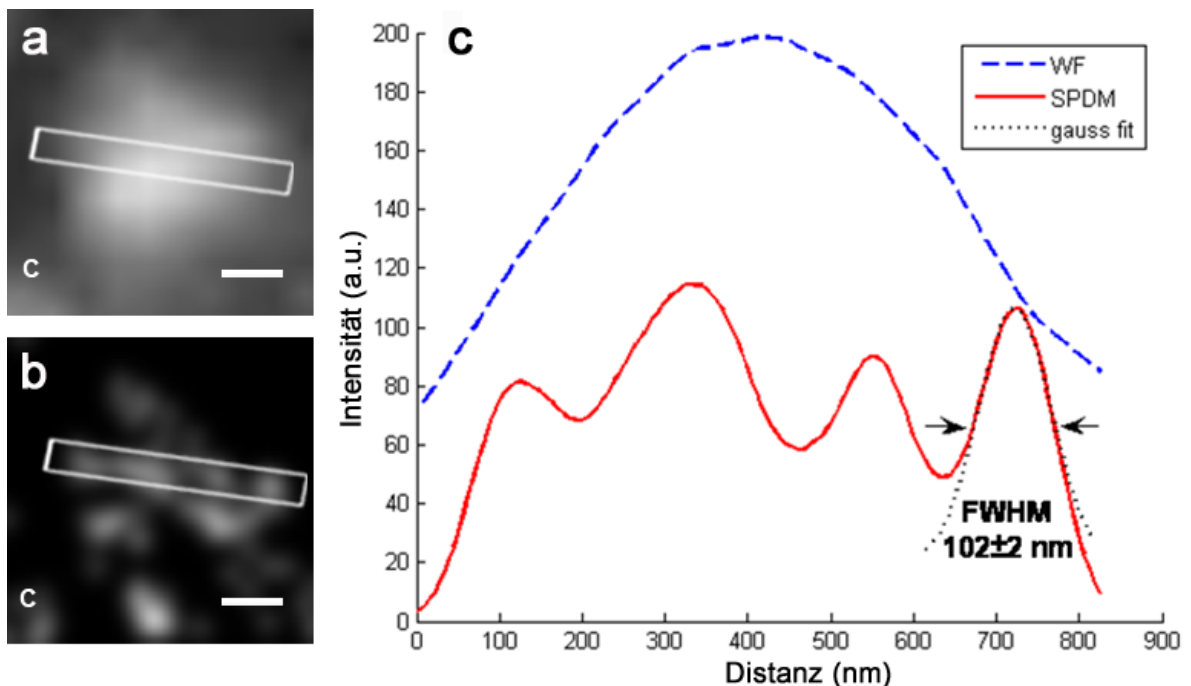


**Abbildung 6.1.2.:** Weitfeld- (a) und SPDM-Bild (b) von Cluster A aus Abb.6.1.1. (c) Intensitätsprofile über die längere Seite der weißen Rechtecke (gemittelt über die kürzere Seite,  $\sim 100 \text{ nm}$ ). Die angepasste Gaussfunktion besitzt eine Halbwertsbreite von  $132 \pm 2 \text{ nm}$  (Skalierungsbalken: 200nm).





**Abbildung 6.1.3.:** Weitefeld- (a) und SPDM-Bild (b) von Cluster B aus Abb.6.1.1. (c) Intensitätsprofile über die längere Seite der weißen Rechtecke (gemittelt über die kürzere Seite,  $\sim 100$ nm). Die angepasste Gaussfunktion besitzt eine Halbwertsbreite von  $85 \pm 2$ nm (Skalierungsbalken: 200nm).

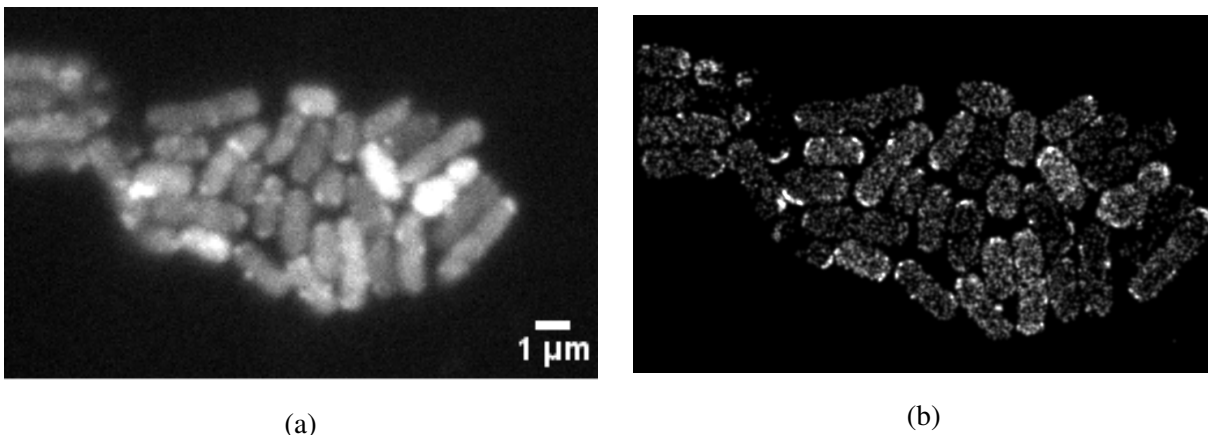


**Abbildung 6.1.4.:** ]

Weitefeld- (a) und SPDM-Bild (b) von Cluster C aus Abb.6.1.1. (c) Intensitätsprofile über die längere Seite der weißen Rechtecke (gemittelt über die kürzere Seite,  $\sim 100$ nm). Die angepasste Gaussfunktion besitzt eine Halbwertsbreite von  $102 \pm 2$ nm (Skalierungsbalken: 200nm).

### 6.1.2. Distanzverteilung des Rezeptorproteins CheW

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse der Messungen am Rezeptorprotein CheW vorgestellt werden. Für die Beispielaufnahme in Abbildung 6.1.5 wurden *E. coli*-Bakterien vom Stamm VS102 verwendet. In diesem ist das Protein CheW mit YFP markiert (engl.: Yellow Fluorescent Protein). Die Probenpräparation erfolgte nach dem im Anhang (A.1) befindlichen Protokoll. Bei dieser Probe wurde mit  $10\mu\text{M}$  IPTG<sup>2</sup> induziert und das Präparat unfixiert in Fluoromount (Sigma-Aldrich) eingebettet. Es sind sowohl im Weitfeldbild (a), als auch in der SPDM-Aufnahme deutlich die Cluster der Rezeptorproteine zu erkennen. Man ist an den Distanzen zwischen den Rezeptorproteinen interessiert, um die Substruktur der Rezeptorcluster zu charakterisieren.

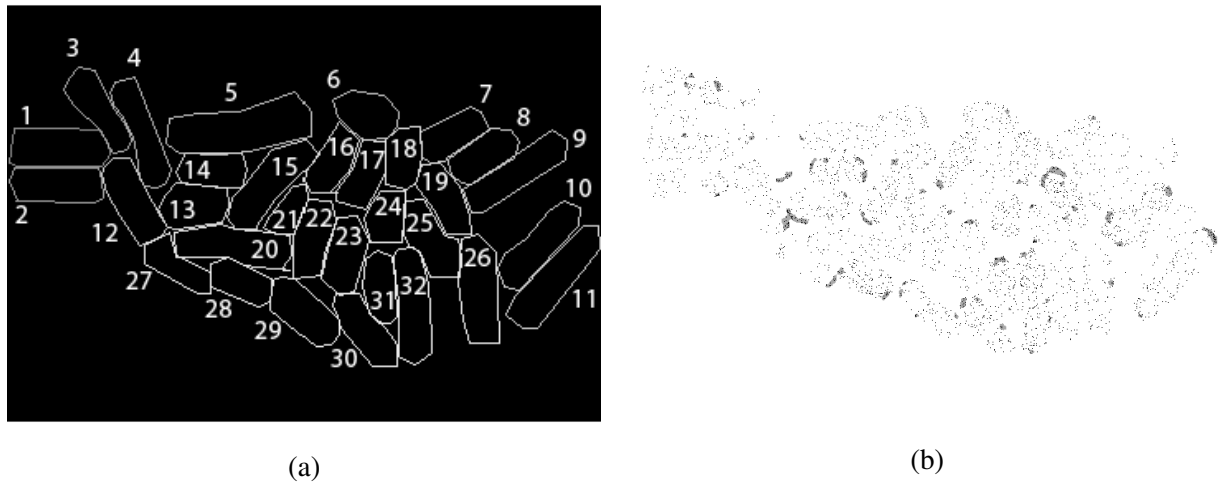


**Abbildung 6.1.5.:** Weitfeld- (a) und SPDM-Bild (b) von unfixierten *E. coli*-Bakterien mit YFP markiertem Rezeptorprotein CheW. Die Rezeptorcluster sind deutlich auch im SPDM-Bild zu erkennen.

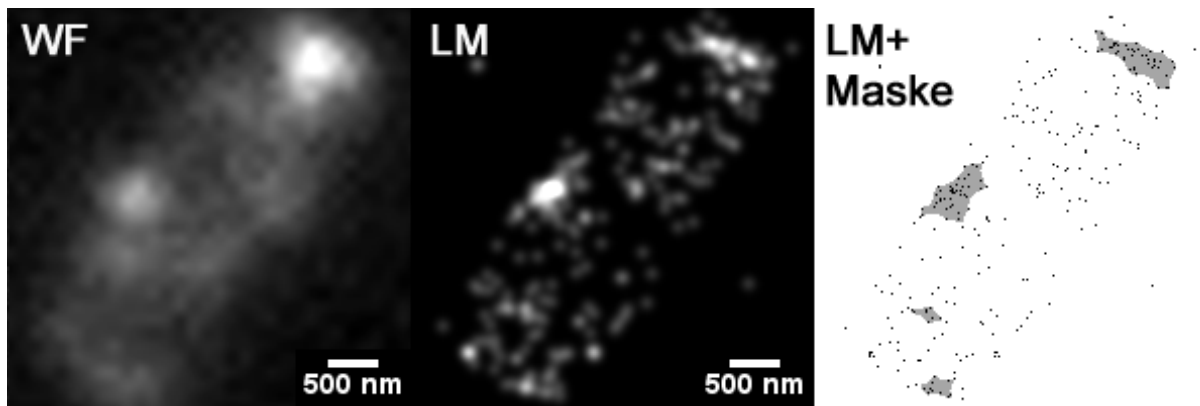
Mit einer Aufnahme werden stets mehrere Zellen gleichzeitig aufgenommen. Um die Analyse nicht durch Distanzen zwischen unterschiedlichen Zellen zu verfälschen, wurden die einzelnen Zellen mithilfe der Matlab-Subroutine „SPDMFreistellen“ [Lem09] aus der Koordinatendatei der Einzelmoleküle („Orte“) separiert. Die Auswahl der Zellen von der Aufnahme aus Abbildung 6.1.5 ist in Abbildung 6.1.6(a) zu sehen. In Abbildung 6.1.6(b) sind die Regionen mit einer Ereignisdichte von mindestens 12 Ereignissen innerhalb eines Radius von 60nm grau markiert. Zur Bestimmung der Cluster wurde die Matlab-Subroutine „Clusters“ [KMH<sup>+</sup>11] von Dipl. Phys. Rainer Kaufmann verwendet. Dieses Auswerteprogramm wird im nächsten Kapitel (6.2) näher erläutert. Abbildung 6.1.7 zeigt die vergrößerte Aufnahme eines *E. coli*-Bakteriums mit YFP-Markierung des ChW-Proteins. Die Aufnahme der Lokalisationsmikroskopie (LM) zeigt eine verbesserte Strukturauflösung im Vergleich zum Weitfeldbild (WF). Die Einzelmoleküle sind im Ausgabebild des Cluster-Algorithmus (LM+Maske) als schwarze Punkte dargestellt. Die grau markierten Regionen besitzen eine Dichte von mind. 7 Ereignisse innerhalb von einem Radius von 80nm.

Es wurden Distanzverteilungen des Rezeptorproteins CheW im Vergleich von PFA-fixierten und unfixierten Proben untersucht, sowie mit unterschiedlichen Negativkontrollen verglichen. Die Proteine wurden jeweils mit dem im gelben Spektralbereich fluoreszierenden Protein YFP markiert.

<sup>2</sup>Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid



**Abbildung 6.1.6.:** (a) Auswahl der einzelnen Zellen aus dem Gesamtbild (Abb. 6.1.5) und (b) Bildausgabe des Clusteralgorithmus. Die grau markierten Regionen haben eine Ereignisdichte von mindestens 12 innerhalb eines Radius von 60nm und wurden als Cluster gewertet.



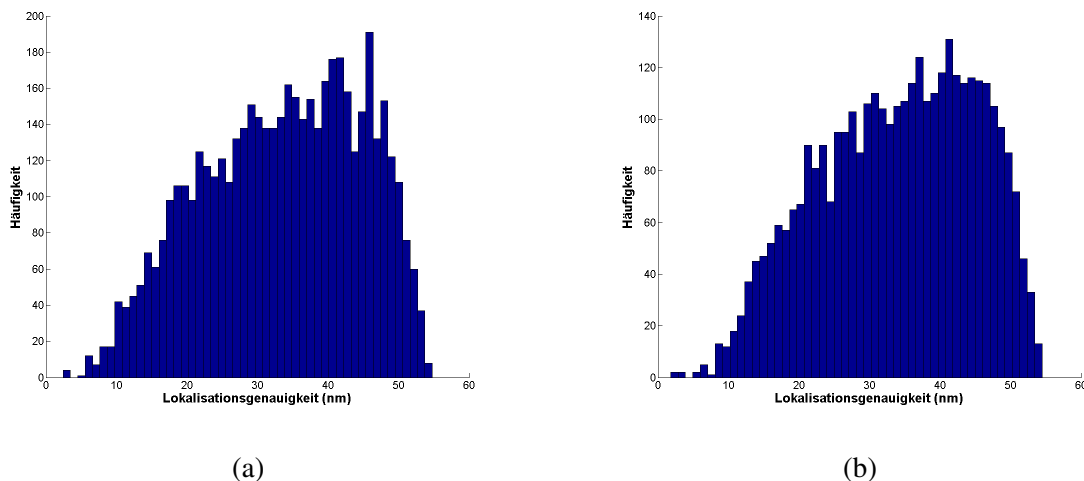
**Abbildung 6.1.7.:** Weitfeld- (WF) und SPDM-Aufnahme (LM) einer PFA-fixierten *E. coli*-Zelle mit YFP-markiertem Rezeptorprotein CheW. Im Ausgabebild des Cluster-Algorithmus (LM+Maske) sind die Einzelmoleküle als schwarze Punkte dargestellt. Regionen mit einer Dichte von mind. 7 Ereignisse innerhalb von einem Radius von 80nm sind grau markiert.

In den unfixierten Proben wurden in 23 Zellen 3580 Signale mit einer mittleren Lokalisationsgenauigkeit von  $34,0 \pm 0,2\text{nm}$  detektiert. Dies entspricht einer mittleren Anzahl von 156 Signalen pro Zelle. Bei den PFA-fixierten Präparaten wurden mit einer mittleren Anzahl von 431 Signalen pro Zelle deutlich mehr Signale detektiert. In diesem Fall wurden in 8 Zellen 3450 Signale mit einer mittleren Genauigkeit in der Positionsbestimmung von  $33,5 \pm 0,2\text{nm}$  detektiert (Tabelle 6.1.1). Die Histogramme der Lokalisationsgenauigkeiten sind in Abbildung 6.1.8 zu sehen. Die Histogramme zu den gemessenen Distanzverteilungen der CheW-Proteine sind in Abb. 6.1.9 für die unfixierten und in 6.1.10 für die fixierten Präparate abgebildet. Bei den Distanzen bis maximal 500nm zwischen allen CheW-Proteinen ergab sich ein Mittelwert von  $262,4 \pm 0,4\text{nm}$ . Betrachtet man ausschließlich die Distanzen zu den am nächsten liegenden Nachbarmolekülen, so ergibt sich ein Mittelwert von  $33,2 \pm 0,4\text{nm}$ . Bei dem Vergleich mit einer simulierten Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte zeigt sich, dass beide Mittelwerte größer sind, was zeigt, dass sich die CheW-Proteine in Rezeptorclustern

zusammenfügen. Bei der Zufallsverteilung ergab sich als Mittelwert für alle Distanzen bis maximal 500nm  $327,1 \pm 0,4\text{nm}$  und als Mittelwert der Distanzen zu den benachbarten Ereignissen  $50,4 \pm 0,4\text{nm}$ . Die gleichen Analysen an den PFA-fixierten Proben zeigen, dass hier der Mittelwert aller Distanzen bis 500nm mit  $276,1 \pm 0,5\text{nm}$  etwas größer ist als bei den unfixierten Proben. Betrachtet man jedoch den Mittelwert zu den benachbarten CheW-Molekülen ist dieser mit  $31,2 \pm 0,5\text{nm}$  nur zwei nm kleiner als bei den unfixierten Proben. Die größeren Mittelwerte bei der zum Vergleich simulierten Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte zeigen wieder die Existenz der Rezeptorcluster. Die Mittelwerte der Messdaten sind in Tabelle 6.1.2 zusammengefasst.

**Tabelle 6.1.1.:** Anzahl detektierter CheW-Moleküle und ihre mittlere Lokalisationsgenauigkeit (LG) im Vergleich zwischen unfixierten und PFA-fixierten Präparaten.

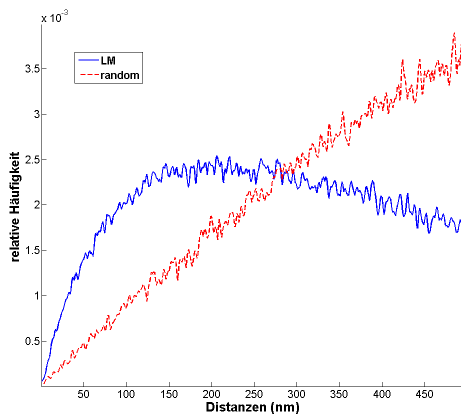
	# Signale	# Zellen	# Signale/Zelle	mittlere LG (nm)	Fehler (nm)
<b>CheW, unfixiert</b>	3580	23	156	34	0,2
<b>CheW, fixiert</b>	3450	8	431	33,5	0,2



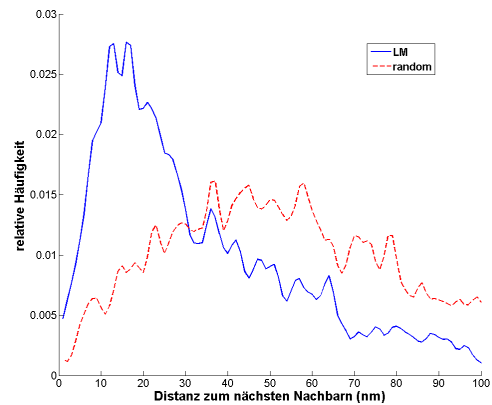
**Abbildung 6.1.8.:** Histogramme der Lokalisationsgenauigkeiten (LG) der detektierten CheW-Proteine. Bei den PFA-fixierten Proben (a) ergibt sich ein Mittelwert der LG von  $33,5 \pm 0,2\text{nm}$  und bei den unfixierten Proben (b) von  $34,0 \pm 0,2\text{nm}$ .

**Tabelle 6.1.2.:** Mittlere Distanzen des Rezeptorproteins CheW bei unfixierten und PFA-fixierten Präparaten im Vergleich zu den mittleren Distanzen in einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (Std.: Standardabweichung; \*Standardabweichung des Mittelwertes; nN-Distanzen: Distanzen zum nächsten Nachbarn).

	Mittelwert aller Distanzen (nm)	Std. (nm)	Fehler* (nm)	Mittelwert der nN-Distanzen (nm)	Std. (nm)	Fehler* (nm)
<b>CheW, unfixiert</b>	<b>262,4</b>	130,0	0,4	<b>33,2</b>	23,1	0,4
<b>Zufallsverteilung</b>	327,1	119,5	0,4	50,4	24,2	0,4
<b>CheW, fixiert</b>	<b>276,1</b>	135,5	0,5	<b>31,2</b>	24,0	0,5
<b>Zufallsverteilung</b>	326,1	119,7	0,6	60,7	25,3	0,5

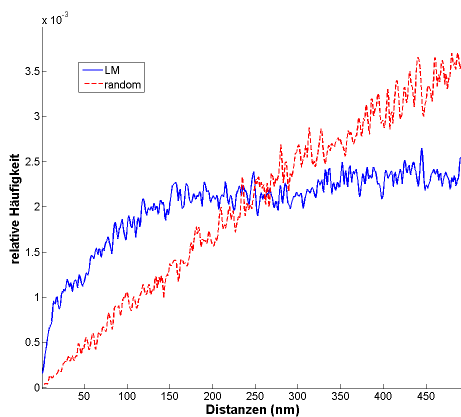


(a)

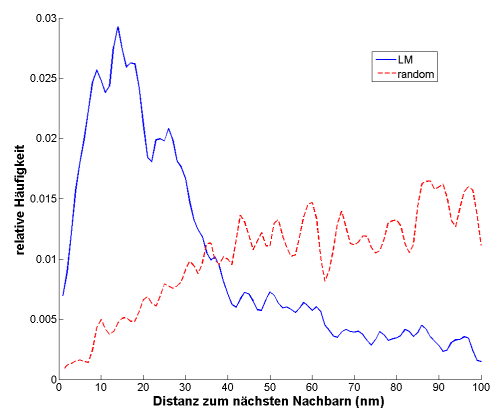


(b)

**Abbildung 6.1.9.:** Histogramme über die Distanzen der CheW-Proteine bei den unfixierten Proben im Vergleich zu einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (random). Für alle Distanzen bis max. 500nm (a) ergibt sich ein Mittelwert von  $262,4 \pm 0,4$ nm und bei der Zufallsverteilung von  $327,1 \pm 0,4$ nm. Für die Distanzen zum benachbarten Molekül bis 100nm (b) ergibt sich ein Mittelwert von  $33,2 \pm 0,4$ nm und bei der Zufallsverteilung von  $50,4 \pm 0,4$ nm.



(a)



(b)

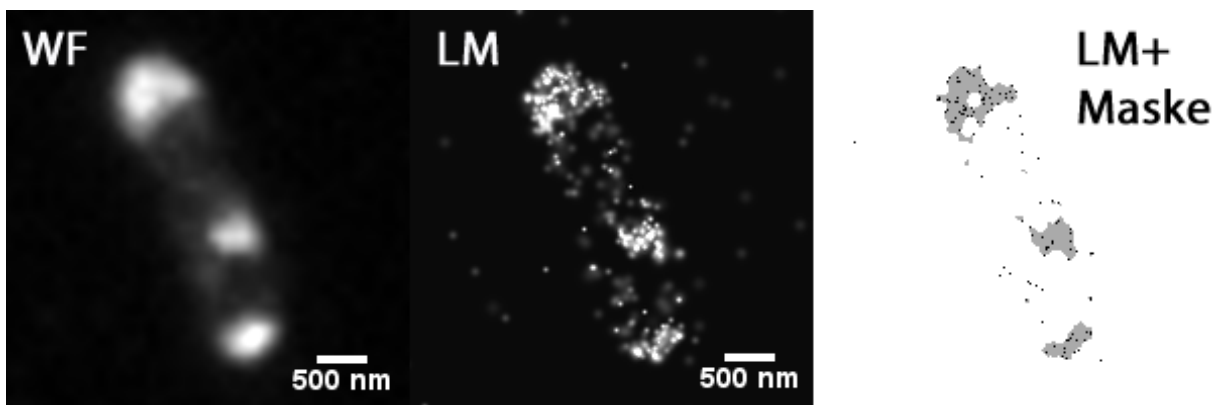
**Abbildung 6.1.10.:** Histogramme über die Distanzen der CheW-Proteine bei den PFA-fixierten Proben im Vergleich zu einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (random). Für alle Distanzen bis max. 500nm (a) ergibt sich ein Mittelwert von  $276,1 \pm 0,5$ nm und bei der Zufallsverteilung von  $326,1 \pm 0,6$ nm. Für die Distanzen zum benachbarten Molekül bis 100nm (b) ergibt sich ein Mittelwert von  $31,2 \pm 0,5$ nm und bei der Zufallsverteilung von  $60,7 \pm 0,5$ nm.

### 6.1.3. Distanzverteilung des Rezeptorproteins CheA

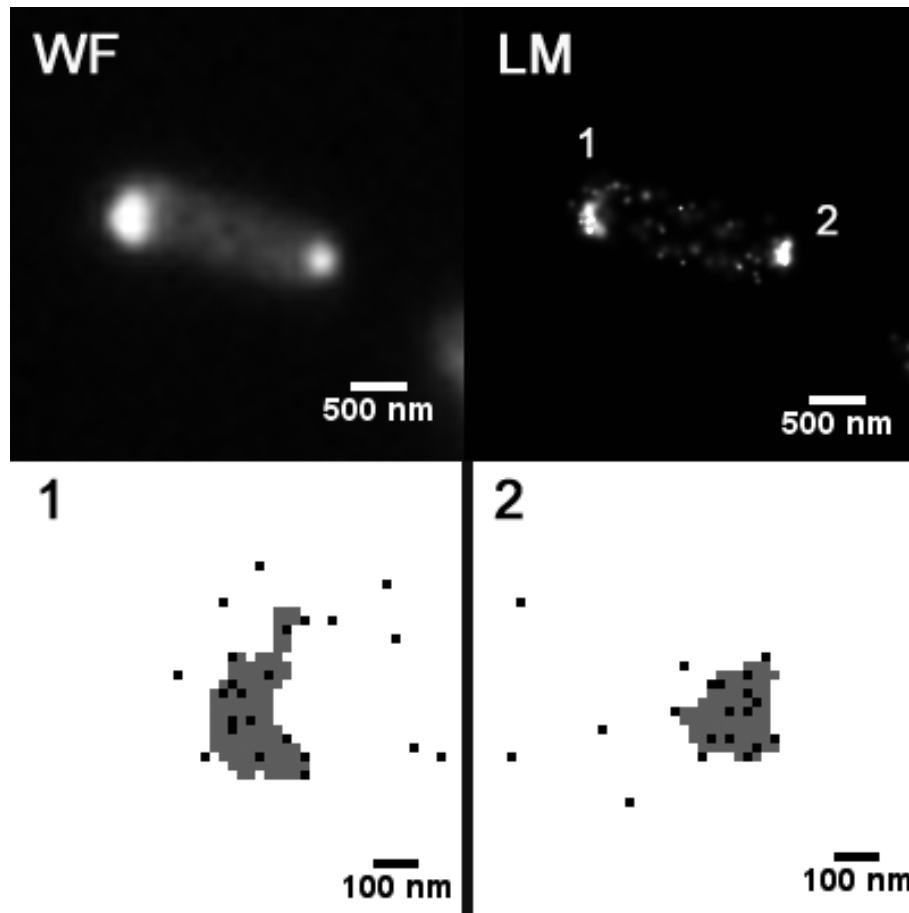
Die gleichen Distanzanalysen, die in Kapitel 6.1.2 für das Rezeptorprotein CheW vorgestellt wurden, wurden auch an Präparaten von *E. coli*-Bakterien mit YFP-Markierung des Rezeptorproteins CheA durchgeführt.

In 11 unfixierten Zellen wurden insgesamt 2790 Signale detektiert, was einer mittleren Anzahl an Signalen pro Zelle von 254 entspricht. Die Positionen der CheA-Moleküle wurden mit einer mittleren Genauigkeit der Lokalisation von  $34,2 \pm 0,2\text{nm}$  bestimmt. Bei den PFA-fixierten Proben wurden vom SPDM-Algorithmus mehr Signale gefunden. Bei diesen Präparaten wurden in 8 Zellen 4382 Signale detektiert, was einer mittleren Anzahl von 548 Signalen pro Zelle entspricht. Die Moleküle wurden hierbei mit einer Genauigkeit von  $34,4 \pm 0,2\text{nm}$  lokalisiert (Tabelle 6.1.3). Die Histogramme der Lokalisationsgenauigkeiten finden sich in Abbildung 6.1.14. Abbildung 6.1.15 zeigt die Histogramme über die Distanzverteilungen bei den unfixierten Präparaten und Abbildung 6.1.16 diejenigen der PFA-fixierten Proben. Bei den unfixierten Zellen wurde ein Mittelwert der Distanzen bis 500nm von  $262,6\text{nm} \pm 0,4\text{nm}$  gemessen und eine mittlere Distanz zum benachbarten Molekül von  $31,1 \pm 0,5\text{nm}$ . Damit stimmt der Mittelwert über alle Distanzen der CheA-Moleküle mit dem gemessenen Mittelwert der CheW-Moleküle innerhalb des Fehlers überein und der Mittelwert der Distanz zum nächsten Nachbarn weicht zwischen CheA- und CheW-Molekül nur um ca. zwei Nanometer voneinander ab. Somit passen die Messungen zu dem in Kapitel 3.4 vorgestellten Modell der Rezeptorcluster, nach welchem das Chemotaxisprotein CheW an das Protein CheA bindet. Die simulierte Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte besitzt höhere Mittelwerte der Distanzen, was die Clusterung der CheA-Proteine belegt.

Bei den PFA-fixierten Zellen wurden  $277,1 \pm 0,4\text{nm}$  als Mittelwert aller Distanzen bis 500nm gemessen. Damit liegt der Wert um ca. 15nm höher als bei den unfixierten Proben. Der Mittelwert der Distanzen zum benachbarten CheA-Molekül war hingegen mit  $28,3 \pm 0,4\text{nm}$  bei den fixierten Proben um ca. drei Nanometer kleiner als bei den unfixierten Proben. Auch diese Mittelwerte stimmen bis auf wenige Nanometer mit den beim Chemotaxis-Protein CheW gemessenen Mittelwerten überein. Auch bei den Distanzmessungen bei den fixierten *E. coli*-Bakterien mit YFP-Markierung des CheA-Proteins zeigt die Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte im Vergleich höhere Mittelwerte der Distanzen. Eine Zusammenstellung der Mittelwerte der gemessenen Distanzen zwischen den CheA-Proteinen findet man in Tabelle 6.1.4.



**Abbildung 6.1.11.:** Weitfeld- (WF) und Lokalisationsmikroskopie-Aufnahme (LM) eines PFA-fixierten *E. coli*-Bakteriums mit YFP-Markierung des Rezeptorproteins CheA. Im Positionsbild (LM+Maske) sind die Einzelmoleküle als schwarze Punkte eingetragen.



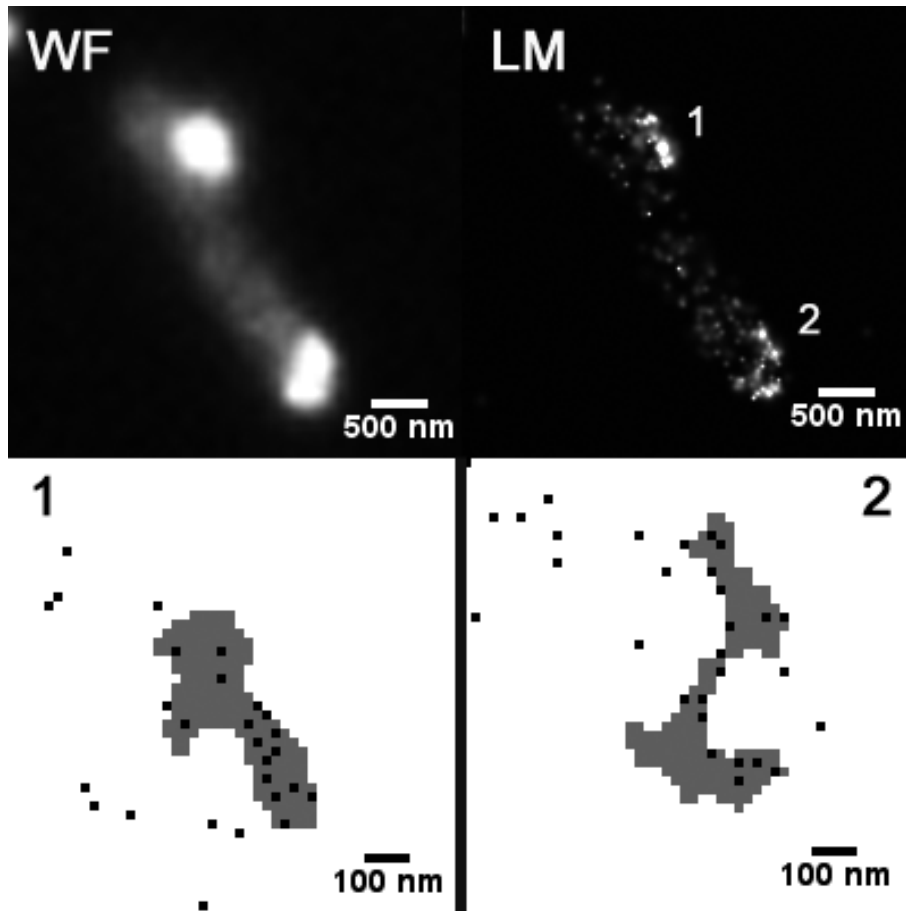
**Abbildung 6.1.12.:** Weitfeld- (WF) und Lokalisationsmikroskopie-Aufnahme (LM) eines unfixierten *E. coli*-Bakteriums mit YFP-Markierung des Rezeptorproteins CheA. In den vergrößerten Positionsbildern der beiden Rezeptorcluster sind die Einzelmoleküle als schwarze Punkte eingetragen.

**Tabelle 6.1.3.:** Anzahl detektierter CheA-Moleküle und ihre mittlere Lokalisationsgenauigkeit (LG) im Vergleich zwischen unfixierten und PFA-fixierten Präparaten.

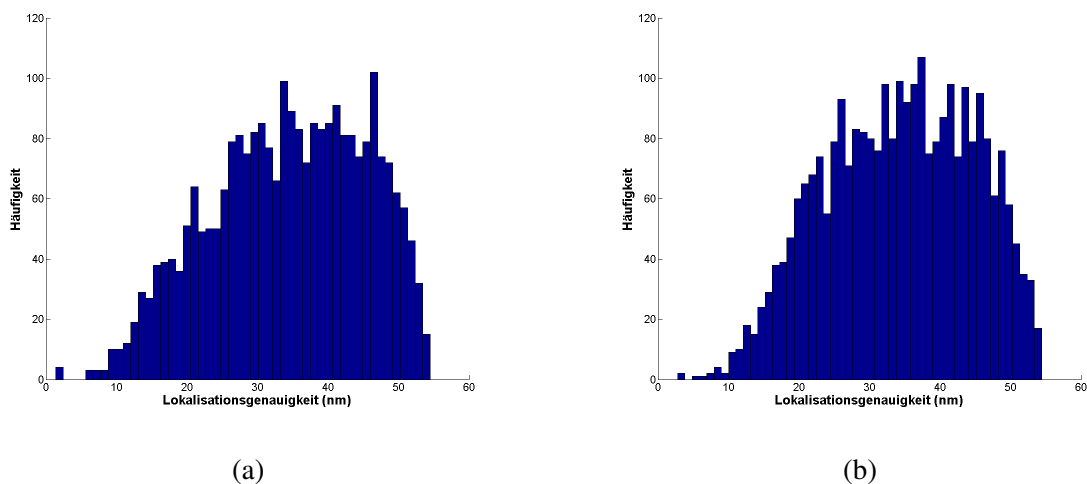
	# Signale	# Zellen	# Signale/Zelle	mittlere LG (nm)	Fehler (nm)
<b>CheA, unfixiert</b>	2790	11	254	34,2	0,2
<b>CheA, fixiert</b>	4382	8	548	34,4	0,2

**Tabelle 6.1.4.:** Mittlere Distanzen des Rezeptorproteins CheA bei unfixierten und PFA-fixierten Präparaten im Vergleich zu den mittleren Distanzen in einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (Std.: Standardabweichung; \*Standardabweichung des Mittelwertes; nN-Distanzen: Distanzen zum nächsten Nachbarn).

	Mittelwert aller Distanzen (nm)	Std. (nm)	Fehler* (nm)	Mittelwert der nN-Distanzen (nm)	Std. (nm)	Fehler* (nm)
<b>CheA, unfixiert</b>	<b>262,6</b>	133,9	0,4	<b>31,1</b>	22,7	0,5
<b>Zufallsverteilung</b>	326,0	119,6	0,4	51,8	23,2	0,5
<b>CheA, fixiert</b>	<b>277,1</b>	129,8	0,4	<b>28,3</b>	21,7	0,4
<b>Zufallsverteilung</b>	329,2	118,6	0,6	61,3	24,3	0,5

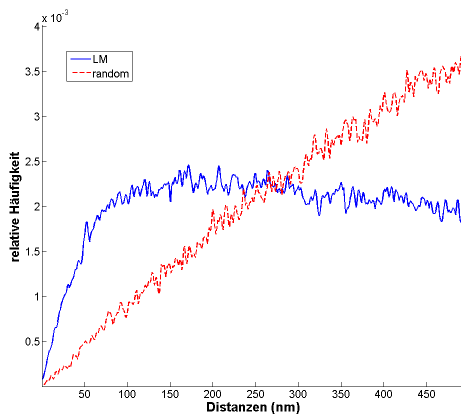


**Abbildung 6.1.13.:** Weitfeld- (WF) und Lokalisationsmikroskopie-Aufnahme (LM) eines weiteren unfixierten *E. coli*-Bakteriums mit YFP-Markierung des Rezeptorproteins CheA. In den vergrößerten Positionsbildern der beiden Rezeptorcluster sind die Einzelmoleküle als schwarze Punkte eingetragen.

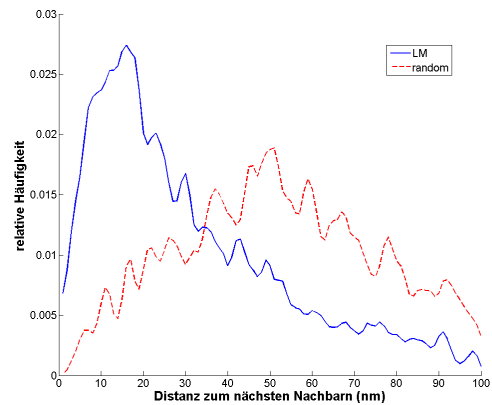


**Abbildung 6.1.14.:** Histogramme der Lokalisationsgenauigkeiten der detektierten CheA-Proteine. Bei den PFA-fixierten Proben (a) ergibt sich ein Mittelwert der LG von  $34,2 \pm 0,2$ nm und bei den unfixierten Proben (b) von  $34,4 \pm 0,2$ nm.



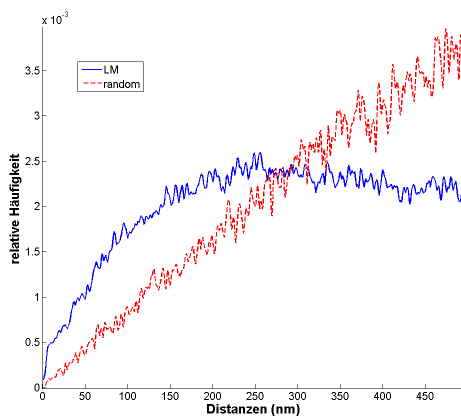


(a)

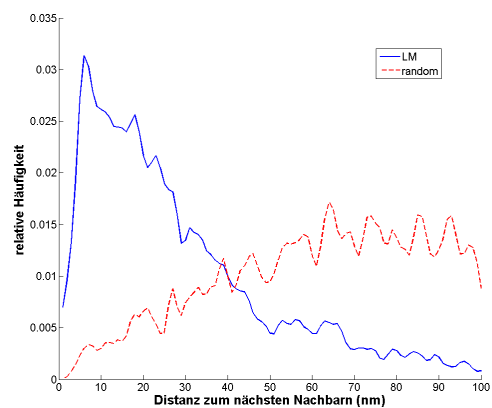


(b)

**Abbildung 6.1.15.:** Histogramme über die Distanzen der CheA-Proteine bei den unfixierten Proben im Vergleich zu einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (random). Für alle Distanzen bis max. 500nm (a) ergibt sich ein Mittelwert von  $262,6 \pm 0,4$ nm und bei der Zufallsverteilung von  $326,0 \pm 0,4$ nm. Für die Distanzen zum benachbarten Molekül bis 100nm (b) ergibt sich ein Mittelwert von  $31,1 \pm 0,5$ nm und bei der Zufallsverteilung von  $51,8 \pm 0,5$ nm.



(a)

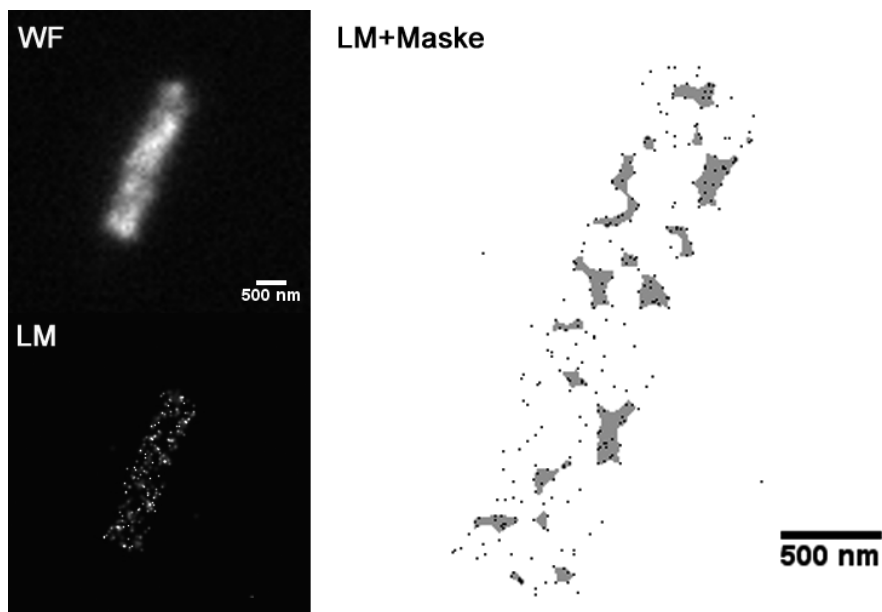


(b)

**Abbildung 6.1.16.:** Histogramme über die Distanzen der CheA-Proteine bei den PFA-fixierten Proben im Vergleich zu einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (random). Für alle Distanzen bis max. 500nm (a) ergibt sich ein Mittelwert von  $277,1 \pm 0,4$ nm und bei der Zufallsverteilung von  $329,2 \pm 0,6$ nm. Für die Distanzen zum benachbarten Molekül bis 100nm (b) ergibt sich ein Mittelwert von  $28,3 \pm 0,4$ nm und bei der Zufallsverteilung von  $61,3 \pm 0,5$ nm.

### 6.1.4. Distanzverteilung bei Negativkontrollen

Zum Vergleich mit den Distanzanalysen an den Rezeptorproteinen CheW und CheA wurden die gleichen Analysen auch an zwei unterschiedlichen Negativkontrollen der *E. coli*-Bakterien durchgeführt, zum einen an *E. coli*-Bakterien mit *flhC-knockout* und zum anderen an Bakterien des Stamms RP437. In den *E. coli*-Bakterien mit *flhC-knockout* werden keine Flagellen- und Chemotaxis-Gene exprimiert, so dass keine Rezeptorcluster vorhanden sind. Das mit YFP markierte Rezeptorprotein CheW wird vom Plasmid exprimiert und liegt frei im Cytosol vor. Beim Stamm RP437 handelt es sich um *E. coli*-Bakterien, in denen YFP frei im Cytosol vorliegt.



**Abbildung 6.1.17.:** Weitfeld- (WF) und Lokalisationsmikroskopie-Aufnahme (LM) eines unfixierten *E. coli*-Bakteriums mit *flhC-knockout* und YFP-Markierung des Rezeptorproteins CheW. Im vergrößerten Positionsbild sind die Einzelmoleküle als schwarze Punkte eingetragen. Die Regionen mit einer Ereignisdichte von 4 Ereignissen innerhalb eines Radius von 70nm sind über das ganze Bakterium verteilt.

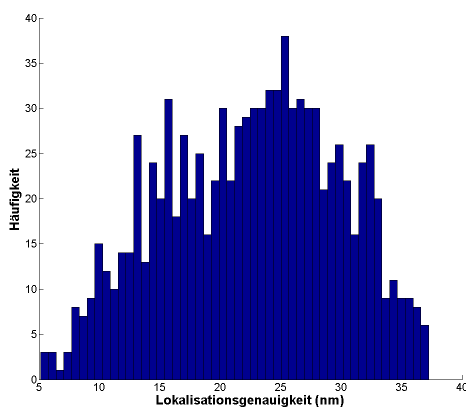
Wie in der Beispielaufnahme 6.1.17 zu sehen, sind die CheW-Moleküle in den *E. coli*-Bakterien mit *flhC-knockout* im ganzen Cytosol verteilt. Abbildung 6.1.17 zeigt in die Weitfeldaufnahme (WF) und in die zugehörige Lokalisationsmikroskopie(LM)-Aufnahme. Bei den unfixierten *E. coli*-Bakterien mit *flhC-knockout*(KO) wurden in 7 Zellen 1046 Signale detektiert, was einer mittleren Anzahl von 149 Signalen pro Zelle entspricht. Die Signale wurden mit einer mittleren Lokalisationsgenauigkeit von  $27,0 \pm 0,3\text{nm}$  detektiert. In den 6 PFA-fixierten Bakterien wurden 965 Signale mit einer mittleren Genauigkeit von  $22,6 \pm 0,2\text{nm}$  lokalisiert. Dies entspricht einer mittleren Anzahl von 161 CheW-Molekülen pro Zelle (Tabelle 6.1.5). Abbildung 6.1.18 zeigt die Histogramme der Lokalisationsgenauigkeiten der detektierten Ereignisse.

Als Mittelwert aller Distanzen bis 500nm zwischen den CheW-Molekülen in unfixierten Bakterien mit *flhC-knockout* wurden  $306,4 \pm 0,5\text{nm}$  gemessen. Dieser Wert ist um 44nm deutlich größer als bei der positiven Probe, was darauf hindeutet, dass die Verteilung der Ereignisse bei der Negativkontrolle (*flhC-knockout*) einer Zufallsverteilung näher ist. Dies wird beim Vergleich mit einer simulierten

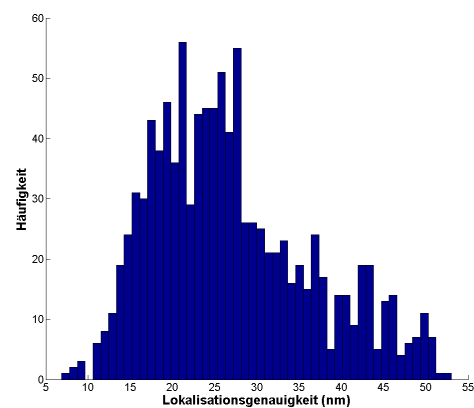
Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte bestätigt, da die Differenz der beiden Mittelwerte aller Distanzen zwischen der Negativkontrolle (*flhC-knockout*) und der Zufallsverteilung mit 14nm deutlich geringer ist, als dies bei der positiven Probe der Fall ist. Der höhere Mittelwert aller Distanzen bei der Negativkontrolle (*flhC-knockout*) im Vergleich zur positiven Probe kann auch nicht durch eine geringere Dichte erklärt werden, da die Anzahl an Signalen pro Zelle bei der Negativkontrolle nur um sechs Signale kleiner ist. Betrachtet man ausschließlich die Abstände zu den benachbarten Molekülen, so kommt man hier auf einen Mittelwert von  $34 \pm 0,7\text{nm}$ . Hierbei ist die Differenz zum Mittelwert bei der Zufallsverteilung mit ungefähr zehn Nanometern ebenfalls kleiner als bei der positiven Probe. Ähnliche Ergebnisse erhält man bei der Auswertung der fixierten Proben. Auch bei diesen Negativproben ist die Differenz der Mittelwerte zur Zufallsverteilung geringer. Bei den Mittelwerten aller Distanzen beträgt der Unterschied ca. 12nm, während er bei der positiven Probe ca. 50nm beträgt. Bei den Mittelwerten der Distanzen zu den benachbarten Molekülen beträgt der Unterschied zur Zufallsverteilung bei der Negativkontrolle ca. 8nm, während er bei der positiven Probe ca. 29nm groß ist. Die Ähnlichkeiten mit den Zufallsverteilungen lassen sich auch an den Histogrammen der Distanzen (6.1.19 für die unfixierten und 6.1.20 für die PFA-fixierten Proben) erkennen. Die größere Nähe zur Zufallsverteilung sieht man auch an den Distanzverteilungen im Vergleich zu den Histogrammen der CheW-Distanzen des Stamms ohne *flhC-knockout* (Abbildungen 6.1.9 und 6.1.10).

**Tabelle 6.1.5.:** Anzahl detektierter Moleküle bei Negativkontrollen und ihre mittlere Lokalisationsgenauigkeit (LG) im Vergleich zwischen unfixierten und PFA-fixierten Präparaten.

	# Signale	# Zellen	# Signale/Zelle	mittlere LG (nm)	Fehler (nm)
<b>CheW, flhC-KO, unfixiert</b>	1046	7	149	27	0,3
<b>CheW, flhC-KO, fixiert</b>	965	6	161	22,6	0,2
<b>RP437, pVS132, unfixiert</b>	4523	40	113	35,9	0,2
<b>RP437, pVS132, fixiert</b>	3360	17	198	33,2	0,2

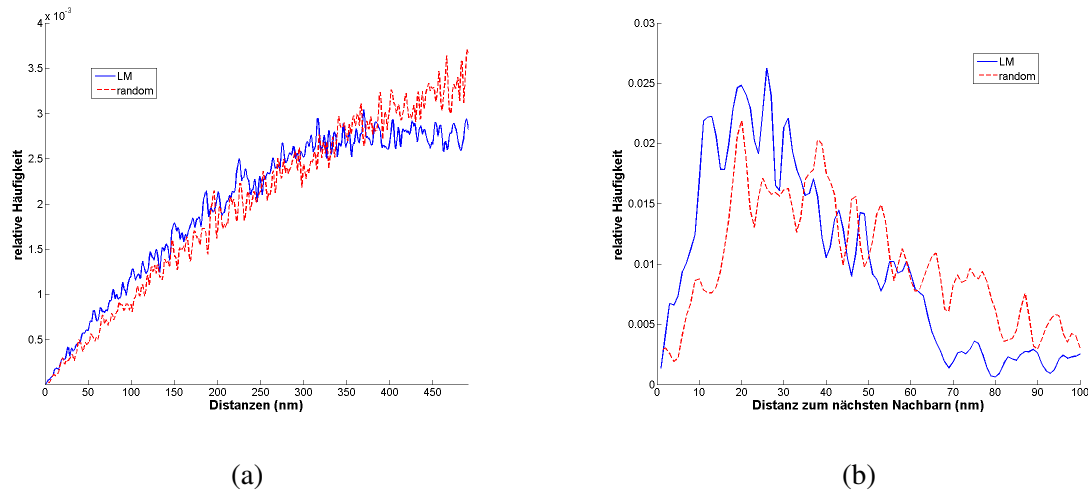


(a)



(b)

**Abbildung 6.1.18.:** Histogramme der Lokalisationsgenauigkeiten der detektierten CheW-Proteine in den *E. coli*-Bakterien mit *flhC-KO*. Bei den PFA-fixierten Proben (a) ergibt sich ein Mittelwert der LG von  $22,6 \pm 0,2\text{nm}$  und bei den unfixierten Proben (b) von  $27,0 \pm 0,2\text{nm}$ .



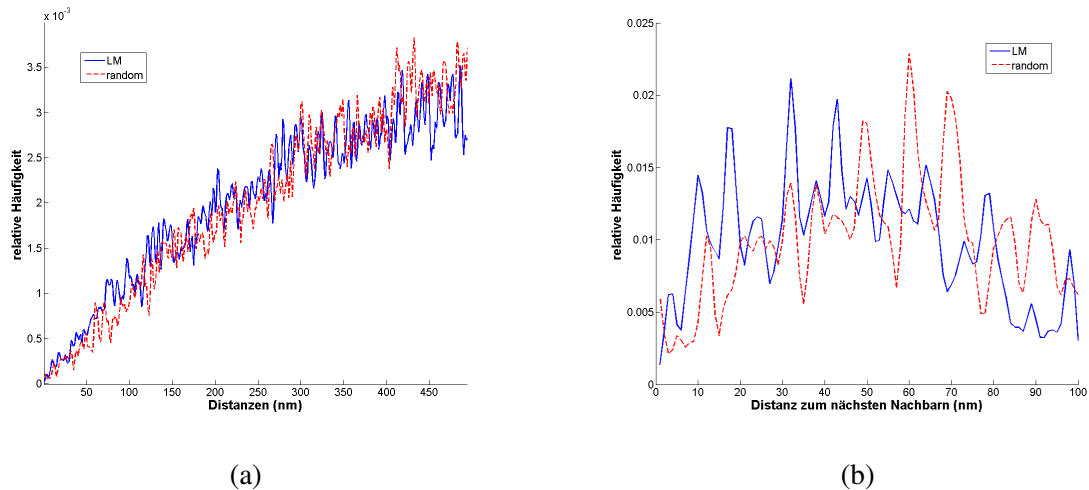
**Abbildung 6.1.19.:** Histogramme über die Distanzen der Ereignisse bei der unfixierten Negativkontrolle (flhC-knockout) im Vergleich zu einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (random). Für alle Distanzen bis max. 500nm (a) ergibt sich ein Mittelwert von  $306,4 \pm 0,5\text{nm}$  und bei der Zufallsverteilung von  $320,9 \pm 0,8\text{nm}$ . Für die Distanzen zum benachbarten Molekül bis 100nm (b) ergibt sich ein Mittelwert von  $34,0 \pm 0,7\text{nm}$  und bei der Zufallsverteilung von  $44,6 \pm 0,8\text{nm}$ .

**Tabelle 6.1.6.:** Mittlere Distanzen bei der Negativkontrolle (Stamm flhC-knockout) bei unfixierten und PFA-fixierten Präparaten im Vergleich zu den mittleren Distanzen in einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (Std.: Standardabweichung; \*Standardabweichung des Mittelwertes; nN-Distanzen: Distanzen zum nächsten Nachbarn).

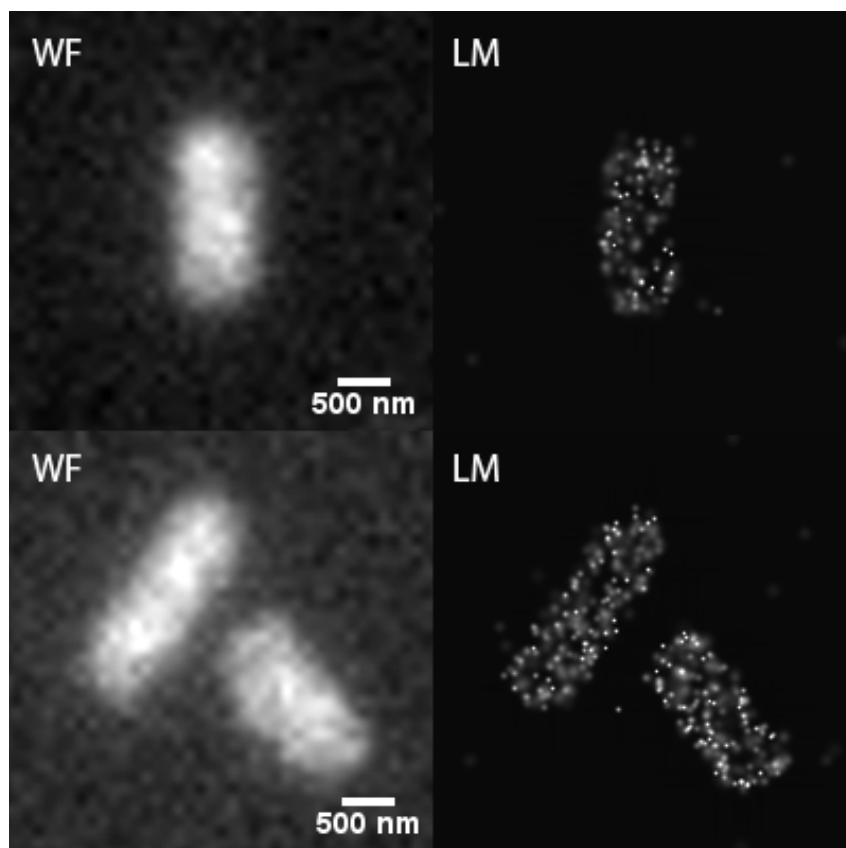
	Mittelwert aller Distanzen (nm)	Std. (nm)	Fehler* (nm)	Mittelwert der nN-Distanzen (nm)	Std. (nm)	Fehler* (nm)
<b>CheW, flhC-KO, unfix.</b>	<b>306,4</b>	122,3	0,5	<b>34,0</b>	20,7	0,7
<b>Zufallsverteilung</b>	320,9	120,5	0,8	44,6	23,7	0,8
<b>CheW, flhC-KO, fixiert</b>	<b>310,6</b>	123,6	0,8	<b>46,7</b>	24,9	0,9
<b>Zufallsverteilung</b>	322,3	120,7	1,0	54,5	24,8	1,0

Als zweite Negativkontrolle wurden *E. coli*-Bakterien vom Stamm RP437, in denen die YFP-Moleküle ungebunden im Cytosol vorliegen, untersucht. Auch bei dieser Negativkontrolle sind die detektierten Signale, wie in Abbildung 6.1.21 an den Weitfeldbildern (WF) und Lokalisationsmikroskopie-Aufnahmen (LM) zu sehen, in den ganzen *E. coli*-Bakterien verteilt. Von der Negativkontrolle des Stamms RP437 wurden 40 unfixierte Zellen vermessen. In diesen liegt das YFP-Protein ungebunden vor. Es wurden 4523 Signale detektiert, was einer mittleren Anzahl von 113 Signalen pro Zelle entspricht (Tabelle 6.1.5). Die YFP-Moleküle wurden mit einer mittleren Genauigkeit der Positionsbestimmung von  $35,9 \pm 0,2\text{nm}$  lokalisiert.

Bei der Analyse der Distanzen bis 500nm ergab sich bei den unfixierten Proben ein Mittelwert von  $303 \pm 0,3\text{nm}$ , während die simulierte Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte einen um ca. 25nm höheren Wert besitzt. Vergleicht man die Mittelwerte der Distanzen zum benachbarten Molekül, so zeigt sich, dass der Mittelwert der Negativkontrolle (RP437) mit  $40,9 \pm 0,4\text{nm}$  um 17nm kleiner ist als derjenige der Zufallsverteilung. Es wurden 17 PFA-fixierte Zellen der Negativkontrolle des Stamms RP437 ver-



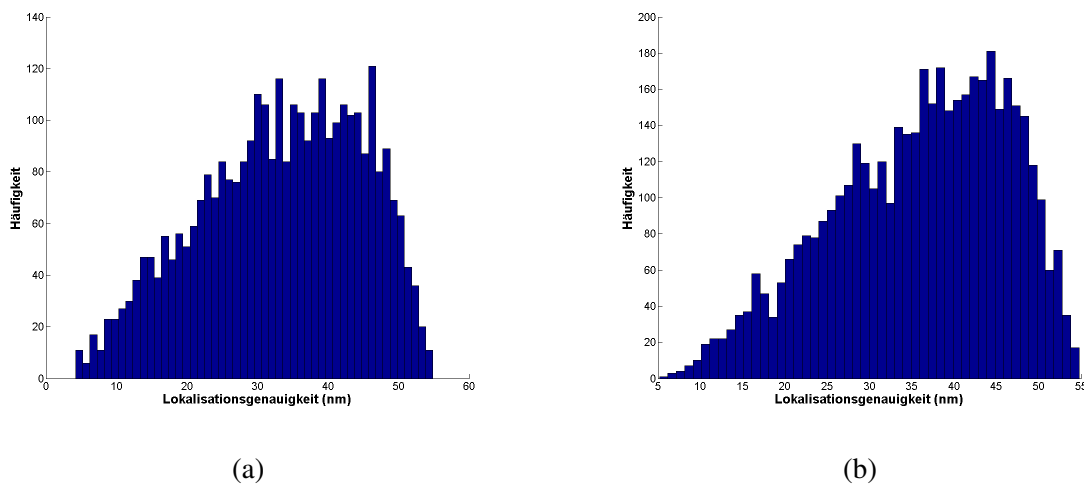
**Abbildung 6.1.20.:** Histogramme über die Distanzen der Ereignisse bei der PFA-fixierten Negativkontrolle (*flhC-knockout*) im Vergleich zu einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (random). Für alle Distanzen bis max. 500nm (a) ergibt sich ein Mittelwert von  $310,6 \pm 0,8\text{nm}$  und bei der Zufallsverteilung von  $322,3 \pm 1,0\text{nm}$ . Für die Distanzen zum benachbarten Molekül bis 100nm (b) ergibt sich ein Mittelwert von  $46,7 \pm 0,9\text{nm}$  und bei der Zufallsverteilung von  $54,5 \pm 1,0\text{nm}$ .



**Abbildung 6.1.21.:** Zwei Weitfeld- (WF) und Lokalisationsmikroskopie-Aufnahmen (LM) von *E. coli*-Bakterien (vom Stamm RP437) mit ungebundenem YFP als Negativkontrolle (PFA-fixiert). Die YFP-Moleküle sind in der ganzen Zelle verteilt und bilden keine Cluster.

messen. Hierbei wurden die 3360 detektierten Moleküle mit einer mittleren Lokalisationsgenauigkeit von  $33,2 \pm 0,2\text{nm}$  lokalisiert. Die Mittelwerte bei den fixierten Bakterien der Negativkontrolle (RP437) sind nur jeweils ca. drei Nanometer größer als bei den unfixierten Präparaten. Die gleiche Ereignisdichte bei fixierten und unfixierten Präparaten zeigt sich in den innerhalb der Fehler identischen Mittelwerten der simulierten Zufallsverteilungen. Die Mittelwerte der Distanzen bei dieser Negativkontrolle sind in Tabelle 6.1.7 zusammengefasst. Die Histogramme der Distanzverteilungen der unfixierten Proben der Negativkontrolle (RP437) sind in Abbildung 6.1.23 zu sehen, während die Histogramme in Abbildung 6.1.24 die Distanzverteilungen in den PFA-fixierten Präparaten zeigen. Auch bei dieser Negativkontrolle zeigen die Distanzverteilungen eine größere Nähe zur Zufallsverteilung als bei der Positivprobe (Abbildungen 6.1.9 und 6.1.10).

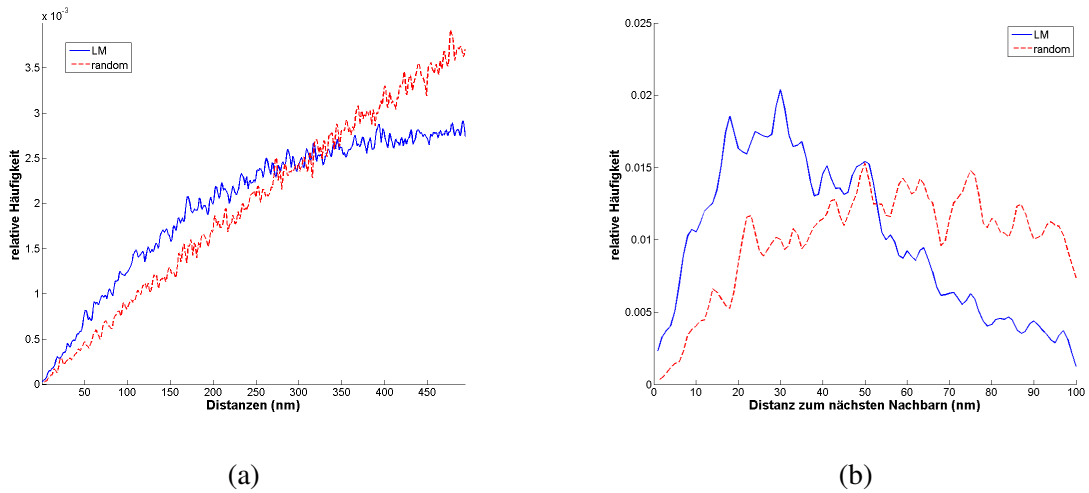
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Negativkontrolle des Stamms *flhC-knockout* einer Zufallsverteilung am nächsten ist und die Distanzverteilungen der CheW-Moleküle am stärksten von der Zufallsverteilung abweicht, die Moleküle somit Cluster bilden. Die Distanzverteilungen bei der Negativkontrolle des Stamms RP437 liegt was die Nähe zu einer Zufallsverteilung angeht zwischen den anderen beiden Präparaten.



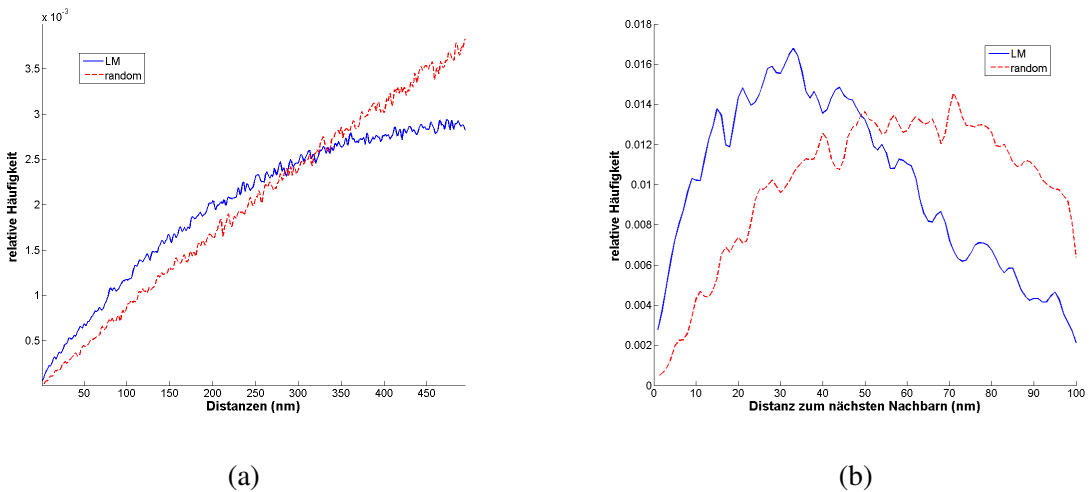
**Abbildung 6.1.22.:** Histogramme der Lokalisationsgenauigkeiten der detektierten frei im Cytosol der *E. coli*-Bakterien vorliegenden YFP-Moleküle (Stamm RP437). Bei den PFA-fixierten Proben (a) ergibt sich ein Mittelwert der LG von  $33,2 \pm 0,2\text{nm}$  und bei den unfixierten Proben (b) von  $35,9 \pm 0,2\text{nm}$ .

**Tabelle 6.1.7.:** Mittlere Distanzen der YFP-Negativkontrolle bei unfixierten und PFA-fixierten Präparaten im Vergleich zu den mittleren Distanzen in einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (Std.: Standardabweichung; \*Standardabweichung des Mittelwertes; nN-Distanzen: Distanzen zum nächsten Nachbarn).

	Mittelwert aller Distanzen (nm)	Std. (nm)	Fehler* (nm)	Mittelwert der nN-Distanzen (nm)	Std. (nm)	Fehler* (nm)
<b>RP437, pVS132, unfix.</b>	<b>303,0</b>	124,4	0,3	<b>40,9</b>	23,0	0,4
<b>Zufallsverteilung</b>	328,5	119,0	0,4	57,0	24,6	0,4
<b>RP437, pVS132, fixiert</b>	<b>306,1</b>	124,7	0,2	<b>43,3</b>	24,0	0,2
<b>Zufallsverteilung</b>	328,9	119,0	0,2	57,2	24,3	0,2



**Abbildung 6.1.23.:** Histogramme über die Distanzen der Ereignisse bei der unfixierten Negativkontrolle mit freiem YFP (Stamm RP437) im Vergleich zu einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (random). Für alle Distanzen bis max. 500nm (a) ergibt sich ein Mittelwert von  $303,0 \pm 0,3\text{nm}$  und bei der Zufallsverteilung von  $328,5 \pm 0,4\text{nm}$ . Für die Distanzen zum benachbarten Molekül bis 100nm (b) ergibt sich ein Mittelwert von  $40,9 \pm 0,4\text{nm}$  und bei der Zufallsverteilung von  $57,2 \pm 0,2\text{nm}$ .



**Abbildung 6.1.24.:** Histogramme über die Distanzen der Ereignisse bei der PFA-fixierten Negativkontrolle mit freiem YFP (Stamm RP437) im Vergleich zu einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte (random). Für alle Distanzen bis max. 500nm (a) ergibt sich ein Mittelwert von  $306,1 \pm 0,2\text{nm}$  und bei der Zufallsverteilung von  $328,5 \pm 0,4\text{nm}$ . Für die Distanzen zum benachbarten Molekül bis 100nm (b) ergibt sich ein Mittelwert von  $43,3 \pm 0,2\text{nm}$  und bei der Zufallsverteilung von  $57,2 \pm 0,2\text{nm}$ .

## 6.2. Motorproteine in *E. coli* Bakterien

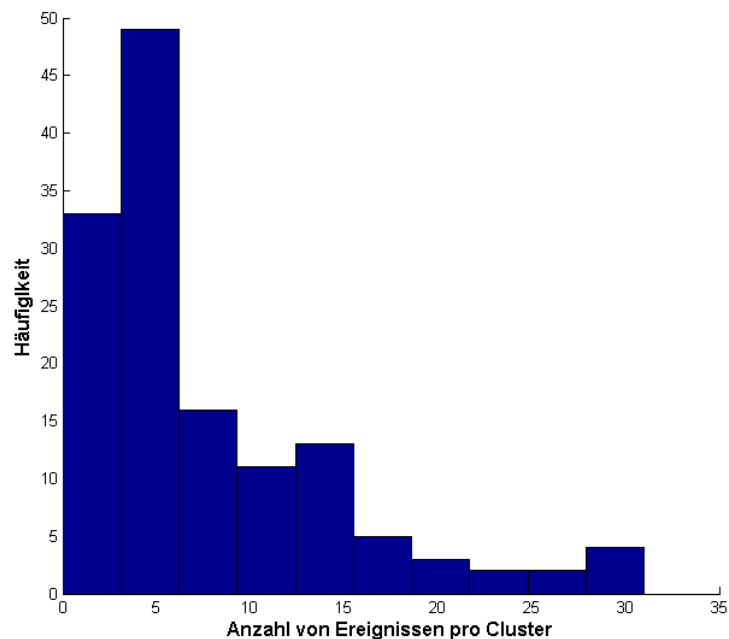
Neben den Messungen an den Rezeptorproteinen wurden ebenfalls lokalisationsmikroskopische Untersuchungen an Motorproteinen der Flagella durchgeführt. Ziel war es hierbei die Größen der beiden Ringstrukturen, C-Ring und MS-Ring (Abb. 3.4.2 in Kapitel 3.4), des Motorproteinkomplexes zu untersuchen. Zum einen wurden *E. coli*-Zellen mit YFP markiertem Motorprotein FliM (C-Ring) vermessen und zum anderen *E. coli*-Bakterien mit einer YFP-Markierung des Proteins FliF (MS-Ring). Die Untersuchungen erfolgten sowohl an fixierten als auch an unfixierten Präparaten. Somit konnte ein Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Präparationsmethoden, deren Protokolle im Anhang (A) zu finden sind, vorgenommen werden.

Zunächst erfolgte die Positionsbestimmung der Einzelmoleküle mit dem Matlab-Skript „SPDM“ (bzw. „autoSPDM“ für die Auswertung aller Rohdaten innerhalb eines Ordners). Hierbei werden die x- und y-Positionen der Moleküle mit ihrem entsprechenden Fehler in der Lokalisation in eine sogenannte „Orte“-Matrix gespeichert. Die Größenbestimmung der Anhäufungen (engl.: *cluster*) von Einzelmolekülen innerhalb der beobachteten Ringstrukturen erfolgte mithilfe des Matlab-Skripts „clusters“ (bzw. „auto\_clusters“ für die Auswertung aller „Orte“-Matrizen innerhalb eines Ordners). Beide Programme wurden von Dipl. Phys. Rainer Kaufmann zur Verfügung gestellt und wurden in [KMH<sup>+</sup>11] erläutert. Mit diesen Analyseprogrammen können Regionen mit einer Ereignisdichte, die oberhalb eines vom Benutzer definierbaren unteren Schwellwertes liegen, als Cluster gewertet werden. Dieser untere Schwellwert wird über die Vorgabe einer Mindestanzahl von benachbarten Ereignissen innerhalb eines angegebenen Radius eingestellt. Zusätzlich kann noch ein oberer Schwellwert für die Clustergröße, definiert über die Anzahl an Ereignissen innerhalb des Clusters, angegeben werden. Es ist bei allen Auswertungen mit dieser Analysesoftware zu beachten, dass die Ergebnisse für die Clustergrößen von den Eingabeparametern abhängig sind. Es sollte demnach darauf geachtet werden, dass die Eingabeparameter an die jeweilige biologische Fragestellung angepasst sind. Zusätzlich kann an Bildausgaben des Algorithmus kontrolliert werden, dass die Regionen als Cluster definiert wurden, deren Größe bestimmt werden soll.

Um die Eingabeparameter für die Anwendung des Cluster-Algorithmus auf die SPDM-Daten der Motorproteine zu finden, mit denen die Anhäufungen dieser Proteine vermessen werden, wurde die Abhängigkeit der Ergebnisse von den Eingabeparametern untersucht. Es sollte die Größe einzelner Motorproteinkomplexe bestimmt werden. Um zu vermeiden, dass die Größe durch die Messung von Agregaten von mehreren solcher Komplexe überschätzt wird, wurde ein oberer Grenzwert für die Anzahl an Ereignissen innerhalb der Cluster gesetzt. Zur Bestimmung des oberen Grenzwertes, der Aggregate mehrerer Komplexe ausschließt ohne große Motorkomplexe zu verwerfen, wurde der Cluster-Algorithmus ohne oberen Schwellwert angewendet. Abbildung 6.2.1 zeigt das Histogramm der Anzahl gefundener Ereignisse pro Motorkomplex. Als Cluster zählte eine Region mit einer Dichte von mindestens drei Ereignissen in einem Radius von 50nm. Das Histogramm zeigt neben dem Maximum bei fünf Ereignissen pro Cluster noch ein zweites kleineres Maximum bei ca. 14 Ereignissen pro Cluster. Dieses Maximum wurde Agregaten mehrerer Motorkomplexe zugeordnet, so dass der obere Grenzwert in den Folgemessungen auf 10 Ereignisse pro Cluster gesetzt wurde. Als Nächstes wurde die Abhängigkeit der Größenbestimmung vom Radius, innerhalb dessen vom Algorithmus nach den Ereignissen gesucht wird, untersucht. Der Graph des bestimmten Cluster-Durchmessers über den Radius der Clusterdefinition (Abb.6.2.2) zeigt einen Wendepunkt bei ca. 70nm. Dieser Wert wurde



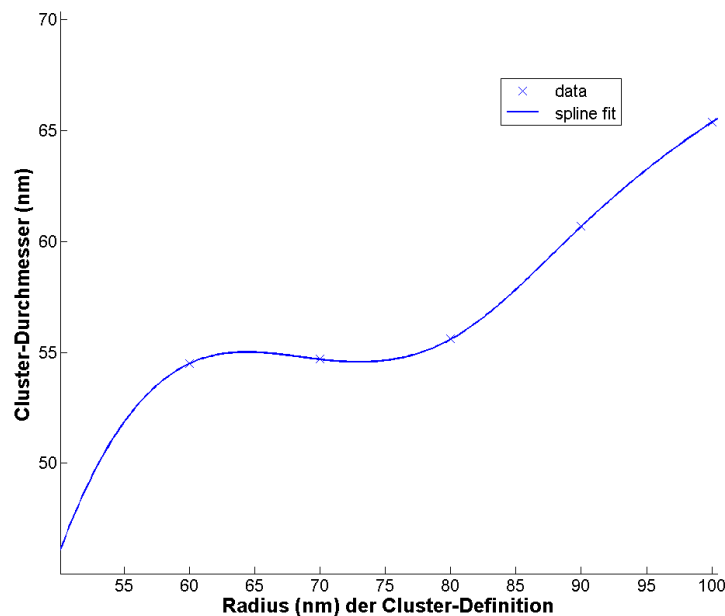
im Folgenden für den Radius der Clusterdefinition verwendet. Abbildung 6.2.3 zeigt von vier *E. coli*-Zellen mit YFP-Markierung des Motorproteins FliF (MS-Ring) das jeweilige Weitfeldbild (WF), die Lokalisationsmikroskopie-Aufnahme (LM) und die zugehörige Positionskarte (weiß). Bei einigen Strukturen, die im Weitfeldbild als eine einzige geschlossene Struktur erscheinen, zeigt sich in der LM-Aufnahme, dass es sich um mehrere getrennte Strukturen handelt. Besonders deutlich ist dies im *E. coli*-Bakterium, welches in Abbildung 6.2.3 links unten dargestellt ist, zu erkennen. In der Positionskarte sind die detektierten Einzelmoleküle als schwarze Punkte eingetragen. Vom Algorithmus als Cluster gewertete Regionen sind in der Positionskarte hellgrau markiert. Es ist deutlich zu sehen, dass die Anhäufungen an Einzelmolekülen vom Algorithmus als Cluster erkannt werden.



**Abbildung 6.2.1.:** Histogramm über die Anzahl der gefundenen Ereignisse pro Motorproteinkomplex ohne oberen Grenzwert für diese Anzahl bei der Analyse. Als Cluster zählte eine Region mit einer Dichte von mindestens 3 Ereignissen in einem Radius von 50nm.

Die identischen Analysen wurden auch an *E. coli*-Bakterien durchgeführt, bei denen das Motorprotein FliM der C-Ring-Struktur mit YFP markiert war. Um den Einfluss der Fixierung auf die biologischen Strukturen zu analysieren, wurden für beide Proteine vergleichende Untersuchungen von fixierten und unfixierten Präparaten vorgenommen. Die Fixierung erfolgte nach im Anhang befindlichem Protokoll durch zehnmündige Einwirkung mit vierprozentiger Paraformaldehyd-Lösung (PFA). Bei allen Präparaten wurde *Fluoromount* (Sigma-Aldrich<sup>3</sup>) als Einbettungsmedium verwendet. Bei den fixierten Präparaten mit Markierung der C-Ring-Struktur wurden in 60 vermessenen *E. coli*-Bakterien 219 Cluster detektiert, was einer mittleren Anzahl von vier Clustern pro Bakterium entspricht. Deren mittlerer Durchmesser wurde zu  $54,5 \pm 1,2\text{nm}$  bestimmt. Bei den unfixierten Präparaten mit markierter C-Ring-Struktur wurden in 104 Zellen 336 Cluster detektiert, woraus eine mittlere Anzahl von drei Clustern pro Zelle folgt. Hierbei wurde ein mittlerer Durchmesser der Cluster von  $52,7 \pm 0,9\text{nm}$

<sup>3</sup><http://www.sigmaldrich.com>

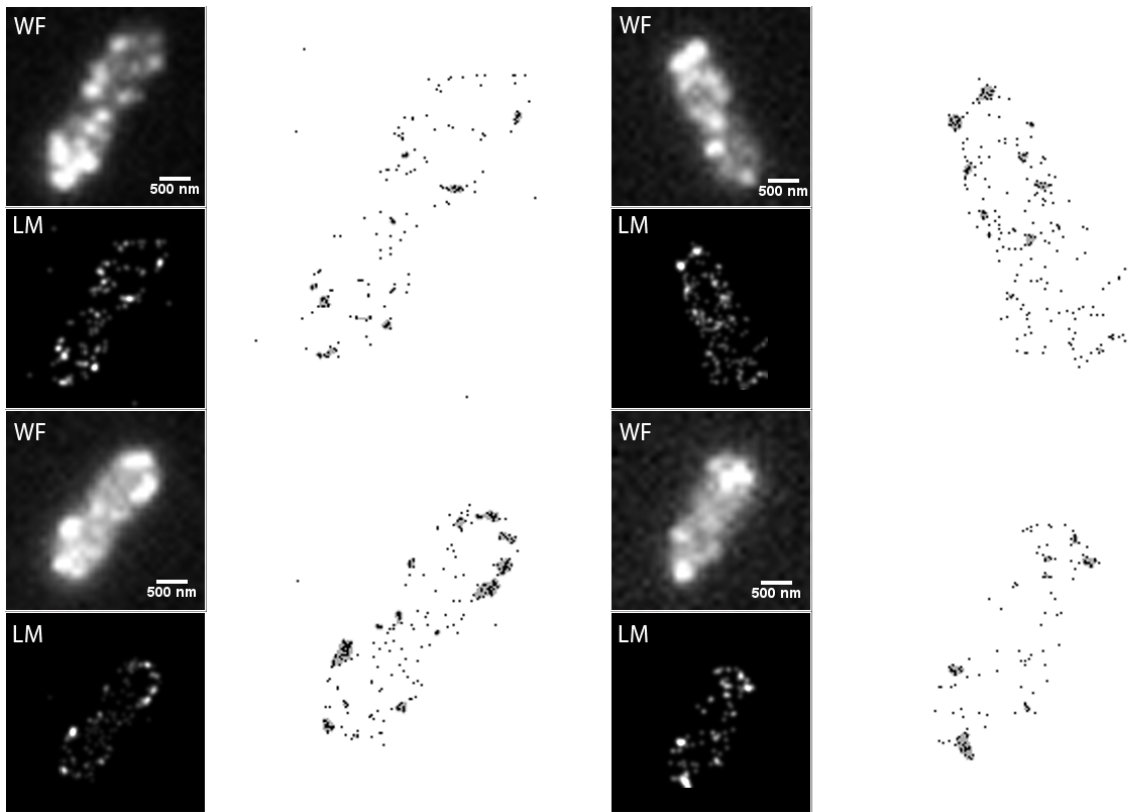


**Abbildung 6.2.2.:** Abhängigkeit des mittleren Durchmessers der als Cluster bestimmten Regionen vom Radius, innerhalb dessen der Algorithmus die Anzahl benachbarter Ereignisse ermittelt. Ein Radius von 70nm erweist sich als sinnvoller Wert, da hier ein Plateau vorliegt.

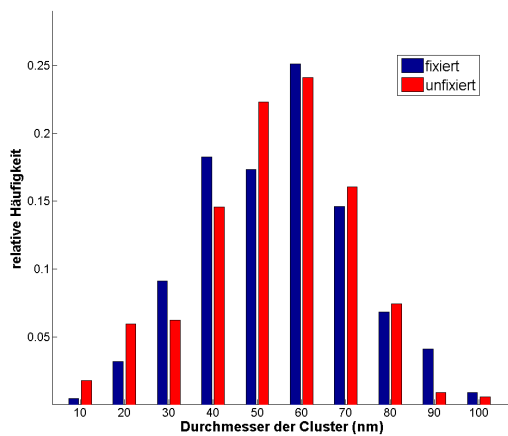
gemessen. Die gemessenen mittleren Durchmesser der C-Ring-Struktur liegen im Vergleich zwischen fixierten und unfixierten Präparaten somit 1,8nm auseinander, was einem Unterschied von drei Prozent des Durchmessers entspricht und innerhalb des zweifachen Fehlers liegt. Nimmt man alle Messungen zusammen, so kommt man auf einen mittleren Durchmesser von  $53,4 \pm 0,7\text{nm}$ .

Man würde erwarten, dass die Anzahl von Clustern pro Zelle für die Proben mit Markierung des MS-Rings gleich hoch ist wie bei markierter C-Ringstruktur, da beides Bestandteile des Motorkomplexes sind. Dies hat sich in den Ergebnissen außer bei den fixierten Proben mit MS-Ring-Markierung bestätigt. Bei diesen war die Anzahl mit im Mittel sieben Clustern pro Zelle etwas höher. Die mittleren Durchmesser lagen nur geringfügig unter denen der C-Ring-Struktur. Bei den fixierten Proben wurde ein mittlerer Durchmesser von  $53,0 \pm 1,3\text{nm}$  gemessen, bei den unfixierten Präparaten betrug er im Mittel  $52,8 \pm 0,6$ . Somit liegen die Werte zwischen fixierten und unfixierten Proben innerhalb des einfachen Fehlers auseinander. Berechnet man den Mittelwert des Clusterdurchmessers über alle Proben, so kommt man auf  $52,9 \pm 0,5\text{nm}$ . Die zugehörigen Histogramme der Durchmesser der Ring-Strukturen im Vergleich zwischen PFA-fixierten und unfixierten Präparaten sind in [Abbildung 6.2.4](#) für den C-Ring und in [Abbildung 6.2.5](#) für den MS-Rings zu sehen. Die Ergebnisse sind in [Tabelle 6.2.1](#) zusammengefasst. Betrachtet man die mittlere Anzahl an Signalen pro Cluster, so kommt man beim C-Ring auf 4,5 und für den MS-Ring ergibt sich ein Mittelwert von 3,4 Signalen pro Cluster. Die zugehörigen Histogramme sieht man in [Abbildung 6.2.6](#).

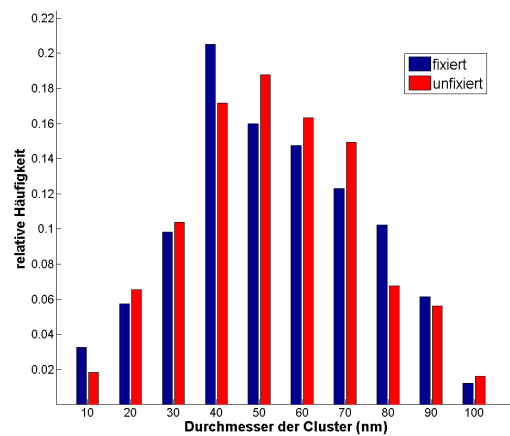
Es wurde untersucht, inwieweit das Setzen eines oberen Schwellwertes für die Ungenauigkeit der Lokalisation sowie für die Distanz zu den nächstgelegenen Molekülen eine Verbesserung der Ergebnisse mit sich bringt. Das Histogramm in [Abbildung 6.2.7](#) zeigt die Lokalisationsgenauigkeiten der 859



**Abbildung 6.2.3.:** Weitfeldbild (WF), Lokalisationsmikroskopie-Aufnahme (LM) und Positionskarte (weiß) von vier *E. coli*-Zellen mit YFP-Markierung des Motorproteins FliF (MS-Ring). Die hellgrauen Regionen in der Positionskarte werden als Cluster gewertet.



**Abbildung 6.2.4.:** Histogramme der Durchmesser des C-Rings; PFA-fixiert sowie unfixiert. Bei den fixierten Proben ergibt sich ein Mittelwert von  $54,5 \pm 1,2$ nm, bei den unfixierten beträgt der Mittelwert  $52,7 \pm 0,9$ nm

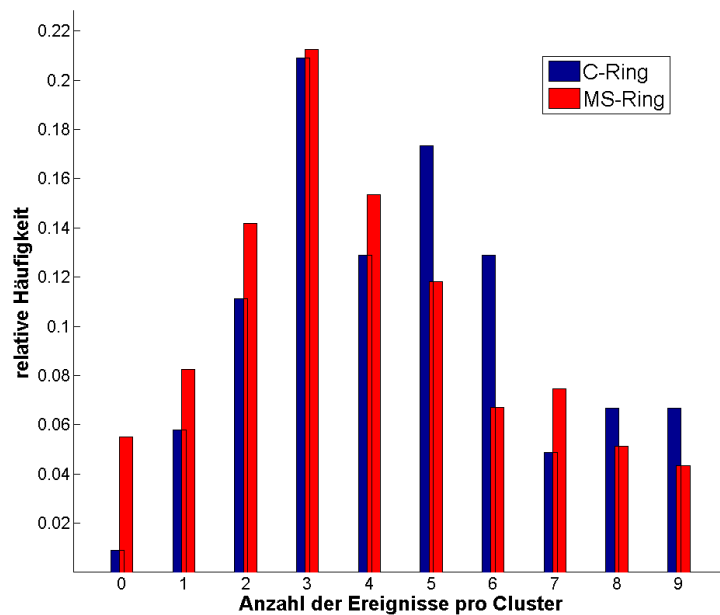


**Abbildung 6.2.5.:** Histogramme der Durchmesser des MS-Rings; PFA-fixiert sowie unfixiert. Bei den fixierten Proben ergibt sich ein Mittelwert von  $53,0 \pm 1,3$ nm, bei den unfixierten beträgt der Mittelwert  $52,8 \pm 0,6$ nm

Signale innerhalb von acht *E. coli*-Bakterien mit YFP-Markierung des FlIM-Proteins (C-Ring). Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit liegt bei  $31,0 \pm 0,4$ nm. Das Histogramm zeigt jedoch zwei Maxima,

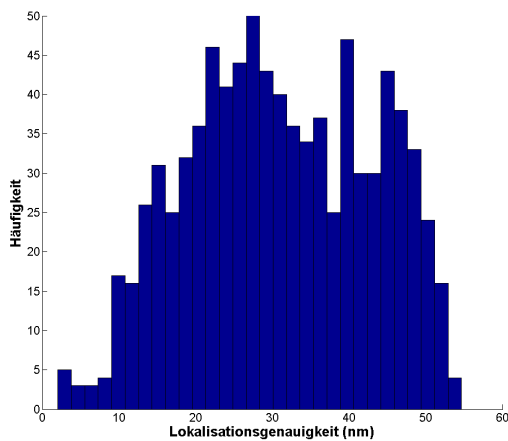
**Tabelle 6.2.1.:** Vergleich der mittleren Durchmesser von C-Ring und MS-Ring PFA-fixiert und unfixiert.

	Mittlerer Durchmesser (nm)	Fehler (nm)	# Zellen	# Cluster	Cluster pro Zelle
<b>C-Ring fixiert</b>	54,5	1,2	60	219	4
<b>C-Ring unfixiert</b>	52,7	0,9	104	336	3
<b>C-Ring (alle)</b>	53,4	0,7	164	555	3
<b>MS-Ring fixiert</b>	53,0	1,3	36	244	7
<b>MS-Ring unfixiert</b>	52,8	0,6	337	1299	4
<b>MS-Ring (alle)</b>	52,9	0,5	373	1543	4

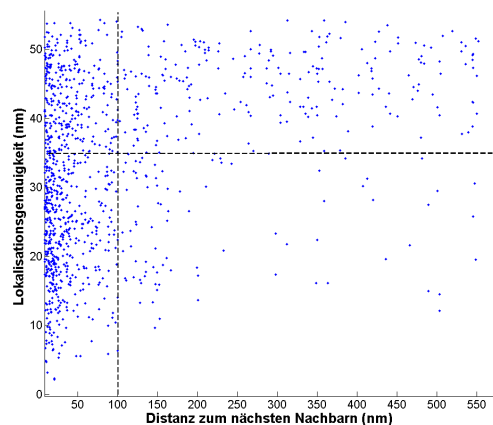
**Abbildung 6.2.6.:** Vergleich der Anzahl der detektierten Ereignisse pro Cluster zwischen C-Ring und MS-Ring. Mittelwerte sind 4,5 (C-Ring) bzw. 3,4 (MS-Ring). Als Cluster zählte eine Region mit einer Dichte von mindestens 3 Ereignissen in einem Radius von 70nm.

bei ca. 27nm und bei ca. 46nm. Die Vermutung war, dass die Signale mit schlechterer Genauigkeit der Positionsbestimmung hauptsächlich aus dem Hintergrundrauschen stammen und somit ein oberer Schwellwert für die Ungenauigkeit der Positionsbestimmung zu einer Verbesserung des Ergebnisses führt. In Abbildung 6.2.8 sind die Einzelmolekül-Ereignisse mit ihrer jeweiligen Lokalisationsgenauigkeit und ihrer Distanz zum nächstgelegenen Einzelereignis aufgetragen. Hieran sieht man, dass Ereignisse in Regionen mit einer geringeren Ereignisdichte, also einem größeren Abstand zum nächstgelegenen Molekül, überwiegend eine höhere Ungenauigkeit in ihrer Positionsbestimmung aufweisen. In Regionen mit höherer Ereignisdichte, also kürzeren Abständen zu den benachbarten Einzelereignissen sind hingegen alle Lokalisationsgenauigkeiten von ca. 10nm bis 55nm (wurde bei der Auswertung als oberer Schwellwert gesetzt) gleichermaßen vertreten. Die gestrichelten Linien zeigen die für die weitere Analysen gesetzten Grenzwerte von 35nm für die Lokalisationsgenauigkeit und 100nm für den Abstand zum benachbarten Molekül. In Abbildung 6.2.9 sind die Ergebnisse der

Cluster-Analyse im Vergleich zwischen C-Ring und MS-Ring als Histogramm präsentiert. Mit diesen Einschränkungen für die Ungenauigkeit in der Positionsbestimmung und einem maximalen Abstand zum nächsten Molekül ergeben sich Mittelwerte für die bestimmten Durchmesser von  $51,9 \pm 2,4\text{nm}$  für den C-Ring und  $53,2 \pm 2,7\text{nm}$  für den MS-Ring. Damit weichen die Ergebnisse nur geringfügig von den bisherigen Ergebnissen ab. Das Ergebnis für den Durchmesser der im Vergleich zum C-Ring kleineren Struktur des MS-Rings ist mit den eingeschränkten Daten größer als der bestimmte Durchmesser des C-Rings. Dies kann an dem im Vergleich zu der Auswertung mit den uneingeschränkten Rohdaten größeren Fehler des Mittelwertes liegen, der durch die schlechtere Statistik aufgrund einer geringeren Anzahl an Signalen entsteht. Dass auch Signale innerhalb der Cluster eine schlechtere Lokalisationsgenauigkeit als  $35\text{nm}$  aufweisen und somit durch die Einführung des Schwellwertes verworfen werden, zeigt sich bei einer farblichen Darstellung der Lokalisationsgenauigkeit. Dies ist in Abbildung 6.2.10 exemplarisch für zwei *E. coli*-Zellen mit YFP markiertem Motorprotein FliM (C-Ring) dargestellt.



**Abbildung 6.2.7.:** Histogramm der Lokalisationsgenauigkeit (LG) von 859 Signalen in 8 *E. coli*-Bakterien (YFP-Markierung des C-Rings). Die mittlere LG liegt bei  $31,0 \pm 0,4\text{nm}$ .

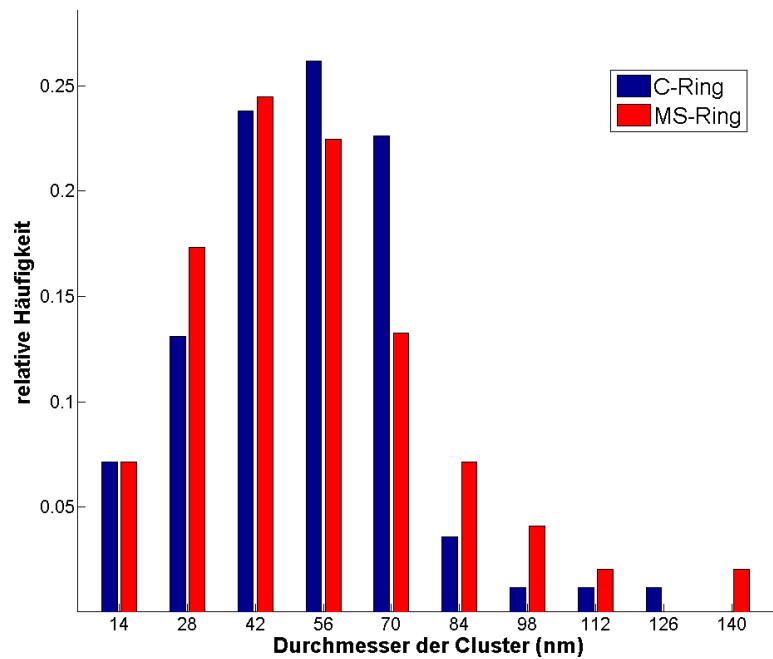


**Abbildung 6.2.8.:** Lokalisationsgenauigkeit über den Distanzen zu den nächsten Nachbarn

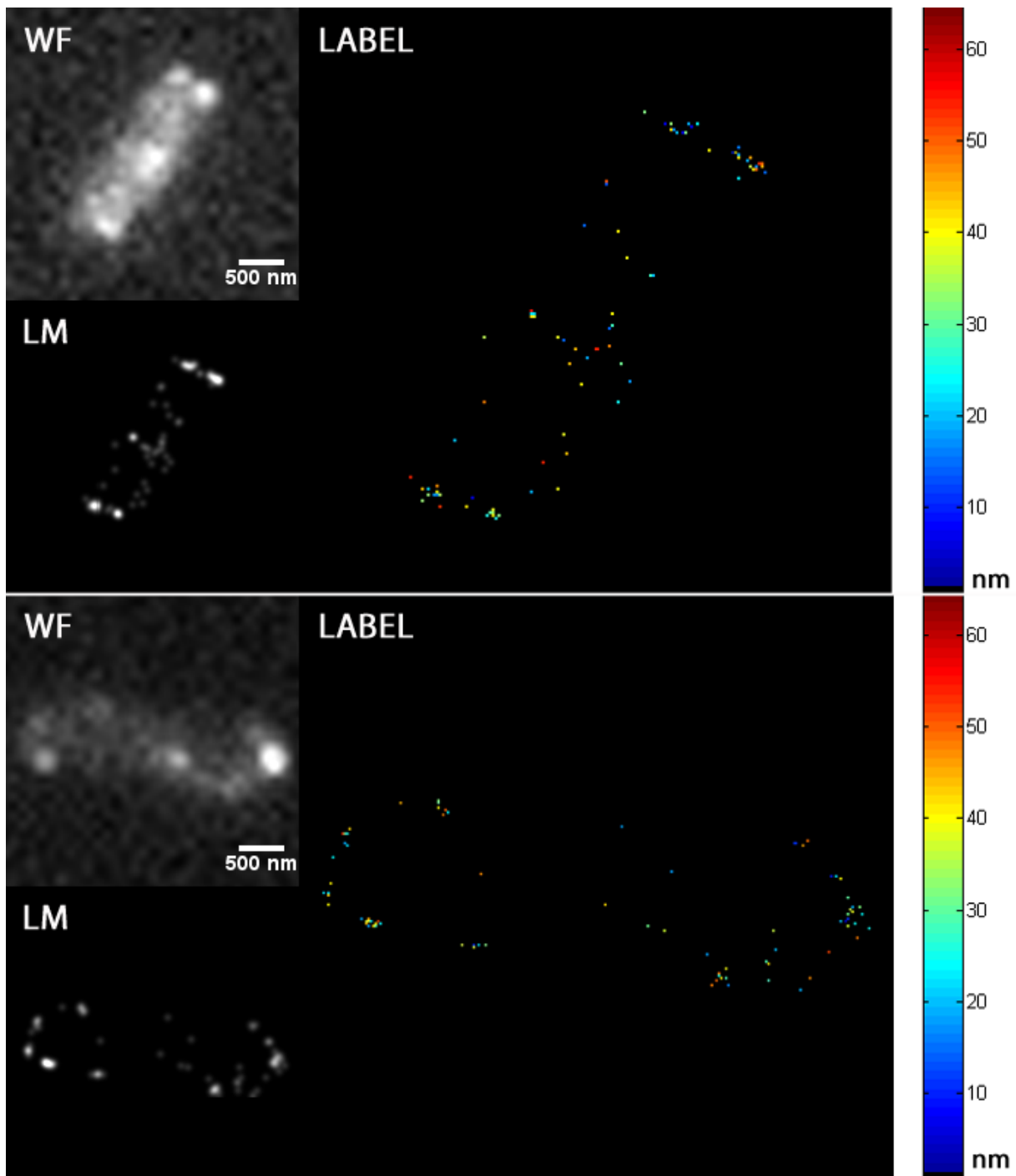
Die Anzahl an detektierten Ereignissen wurde mit Ergebnissen der Durchflusszytometrie (engl.: *Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) verglichen, um eine Abschätzung der Detektionseffizienz der Lokalisationsmikroskopie zu erhalten. Tabelle 6.2.2 zeigt eine Zusammenstellung der Werte. Für beide Markierungen, sowohl für C-Ring, als auch für MS-Ring, wurden 26 PFA-fixierte *E. coli*-Bakterien vermessen. Im Mittel wurden bei den Zellen mit YFP-Markierung des Motorproteins FliM (LL22) des C-Rings 102 Ereignisse pro Bakterium detektiert. Dies entspricht  $5,2\%$  der mit FACS gezählten Moleküle. Bei den Bakterien, bei denen das Protein FliF der MS-Ring-Struktur mit YFP markiert war, wurden im Mittel 155 Ereignisse pro Bakterium detektiert. Dies sind  $2,8\%$  der mit FACS bestimmten Molekülanzahl pro Zelle. Hierbei handelte es sich um einen *knockout*-Stamm, der mit  $5\mu\text{M}$  IPTG induziert wurde.

**Tabelle 6.2.2.:** Anzahl an detektierten Ereignissen pro Bild und pro Zelle sowie Detektionseffizienz in Prozent von FACS-Daten für C-Ring und MS-Ring im Vergleich.

Bild	C-Ring, YFP-FliM LL22, 26 PFA-fixierte Zellen		MS-Ring, YFP-FliFKO, 5 $\mu$ M IPTG, 26 PFA-fixierte Zellen	
	# Ereignisse pro Zelle	Det.Eff. (%)	# Ereignisse pro Zelle	Det.Eff. (%)
1	226	11,6	-	-
2	48	2,5	258	4,6
3	92	4,7	170	3,1
4	175	9	117	2,1
5	58	3	182	3,3
6	165	8,5	140	2,5
7	86	4,4	124	2,2
8	30	1,5	142	2,6
9	123	6,3	72	1,3
10	95	4,9	126	2,3
11	72	3,7	287	5,2
12	63	3,2	165	3
13	114	5,8	-	-
14	91	4,7	101	1,8
15	128	6,6	135	2,4
16	113	5,8	-	-
17	87	4,5	-	-
18	83	4,3	-	-
19	93	4,8	-	-
<b>Mittelwert</b>	<b>102</b>	<b>5,2</b>	<b>155</b>	<b>2,8</b>



**Abbildung 6.2.9.:** Vergleich der Durchmesser der Cluster zwischen C-Ring und MS-Ring bei ausschließlicher Berücksichtigung von Ereignissen mit einer Lokalisationsgenauigkeit von  $<35\text{nm}$  und einem Abstand zum nächsten Nachbarn von  $<100\text{nm}$ . Mittelwerte sind  $51,9 \pm 2,4$  (C-Ring) bzw.  $53,2 \pm 2,7$  (MS-Ring). Als Cluster zählte eine Region mit einer Dichte von mindestens 3 Ereignissen in einem Radius von  $70\text{nm}$ .



**Abbildung 6.2.10.:** Zwei *E. coli*-Zellen mit YFP markiertem Motorprotein FliM (C-Ring). Gezeigt ist jeweils das Weitfeld- (WF) und das Lokalisationsmikroskopiebild (LM) sowie die farbliche Darstellung der Lokalisationsgenauigkeit der detektierten Einzelereignisse (LABEL, Werte in nm).



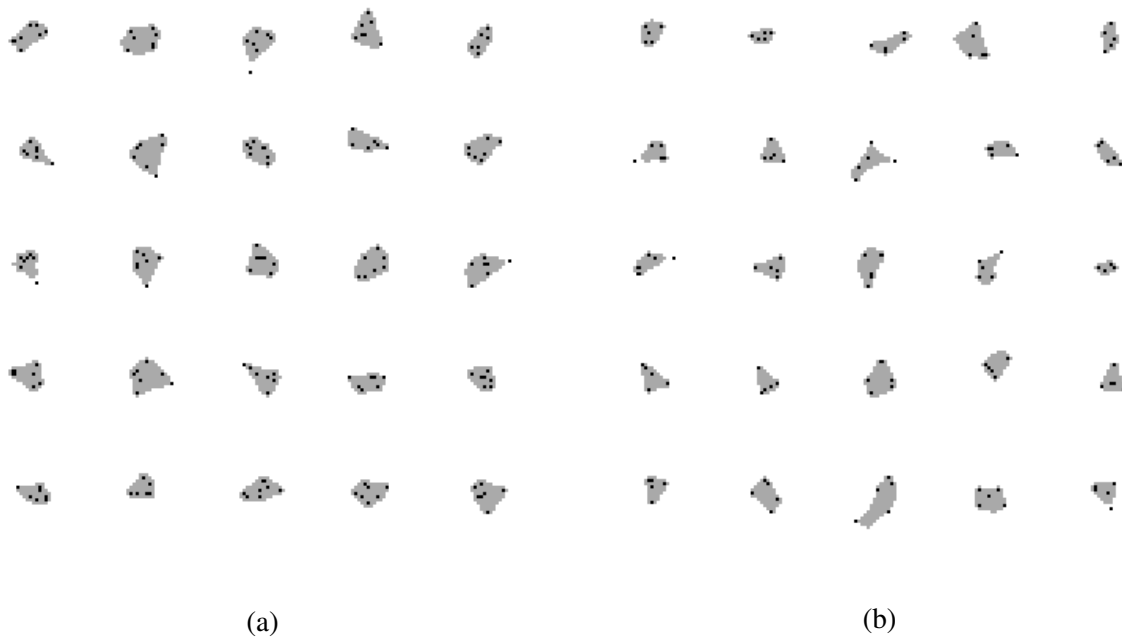
### 6.3. Simulationen zu Motorproteinen in *E. coli* Bakterien

Zur Untersuchung, ob theoretisch eine Unterscheidung der beiden Ringstrukturen innerhalb der Motorproteine in *E. coli* möglich ist, wurden verschiedene Simulationen durchgeführt. Hierfür wurde eine in Kooperation mit Dipl. Phys. Rainer Kaufmann geschriebene Matlab-Routine verwendet.

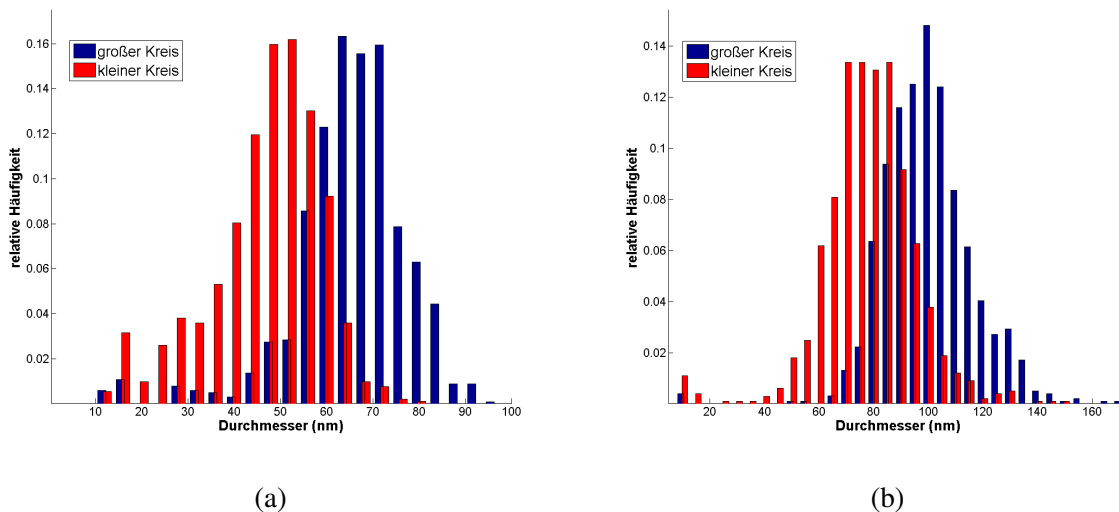
Mit Hilfe des Programms kann eine vom Benutzer definierbare Anzahl an Punkten auf einer Kreisfläche zufällig verteilt werden. Anschließend werden die einzelnen Punkte mit einer Ungenauigkeit delokalisiert. Die Wahrscheinlichkeit dieser Ungenauigkeit entspricht einer Gaussverteilung um den Wert, der vom Benutzer definierbaren Lokalisationsgenauigkeit. Dieses Verfahren wird für eine anzugebende Zahl von Durchläufen wiederholt und zu einem Einzelbild zusammengesetzt. Das entstandene Bild kann nun mit Hilfe des Matlab-Skripts „Bild2Orte“ (von Dipl. Phys. R. Kaufmann) in eine „Orte“-Datei mit den Koordinaten der Punkte umgewandelt werden. Diese Datei besitzt die gleiche Struktur wie die Ausgabedatei des SPDM-Auswertalgorithmus, so dass auf sie die gleichen Analysealgorithmen angewandt werden können. Bei den Simulationen zu den Motorproteinen in *E. coli* Bakterien wurde der im vorherigen Kapitel beschriebene Clusteralgorithmus verwendet.

Die Anzahl der auf den Kreisen verteilten Punkte wurde als Produkt der angenommenen Anzahl an Molekülen mit der Detektionseffizienz programmiert. Aufgrund von EM-Daten wurde die Anzahl der Moleküle mit 35 für FliM (C-Ring) und 26 für FliF (MS-Ring) angenommen. Die Kreisdurchmesser wurden auf 40nm für die C-Ringstruktur (großer Kreis) bzw. auf 25nm für die MS-Ringstruktur (kleiner Kreis) gesetzt. Da das Loch der Ringstrukturen nur als  $\sim 7$ nm groß angenommen wird, wurde es bei den vorliegenden Simulationen vernachlässigt. In Abbildung 6.3.1 sind Beispiele der Kreissimulationen zu sehen. Die vom Clusteralgorithmus als Cluster gewertete Fläche ist grau markiert. Die Ergebnisse der mit Hilfe des Clusteralgorithmus bestimmten Durchmesser der simulierten Kreisflächen sind in den Histogrammen in Abbildung 6.3.2 dargestellt. Hierbei wurden jeweils 1000 große und kleine Kreise erzeugt. Um eine Detektionseffizienz zu simulieren, wurden nur 20% der angenommenen Anzahl an Molekülen pro Ringstruktur als Punkte auf den Kreisen verteilt. Um zusätzlich die Abhängigkeit von der Lokalisationsgenauigkeit zu untersuchen, wurde die Analyse mit unterschiedlichen Werten für diese durchgeführt. In den Histogrammen in Abbildung 6.3.2 sind die relativen Häufigkeiten der vom Cluster-Algorithmus gemessenen Kreisdurchmesser aufgetragen. Bei einer angenommenen Ungenauigkeit in der Positionsbestimmung von 20nm (Abb. 6.3.2 a) wird der mittlere Durchmesser des großen Kreises zu  $65,6 \pm 0,4$ nm und der des kleinen Kreises zu  $46,6 \pm 0,4$ nm bestimmt. Die Durchmesser beider Kreise werden somit durch den Fehler bei der Bestimmung der Position der Einzelsignale überschätzt. Geht man von einer schlechteren Lokalisationsgenauigkeit von 30nm aus (Abb. 6.3.2 b), welcher dem experimentellen Fehler in der Positionsbestimmung entspricht, so sind die Werte für die Kreisdurchmesser noch größer. Hierbei wird der mittlere Durchmesser des großen Kreises zu  $100,1 \pm 0,5$ nm und der des kleinen Kreises zu  $78,0 \pm 0,5$ nm bestimmt. Eine Ursache für die Abweichung zwischen simulierten und experimentellen Werten wird die bessere Statistik im Falle der Simulation sein. Ein weiterer Grund ist die Tatsache, dass die Detektionseffizienz im Experiment schlechter als 20% ist, was am Vergleich mit FACS-Daten deutlich wurde (Kapitel 6.2). Die Abhängigkeit der Ergebnisse von der Detektionseffizienz wurde untersucht, indem ihr Wert bei den Simulationen variiert wurde. Die Ungenauigkeit in der Positionsbestimmung wurde dabei konstant auf 30nm festgesetzt und es wurden je 200 Kreise vermessen. In Abbildung 6.3.3 sind die bestimmten Durchmesser der Kreise in Abhängigkeit von der simulierten Detektionseffizienz aufgetragen. Es wird deutlich, dass der vom Algorithmus bestimmte Durchmesser mit der Detektionseffizienz zunimmt. Dies ist plausibel, da mit zunehmender Detektionseffizienz mehr Punkte detektiert

werden, die im Mittel weiter auseinander liegen. Bei allen simulierten Effizienzen sind die beiden Kreise voneinander zu unterscheiden. Schwankungen in der Größenbestimmung sind auf die geringen absoluten Molekülanzahlen von 26 für den kleinen Kreis und 35 für den großen Kreis zurückzuführen.



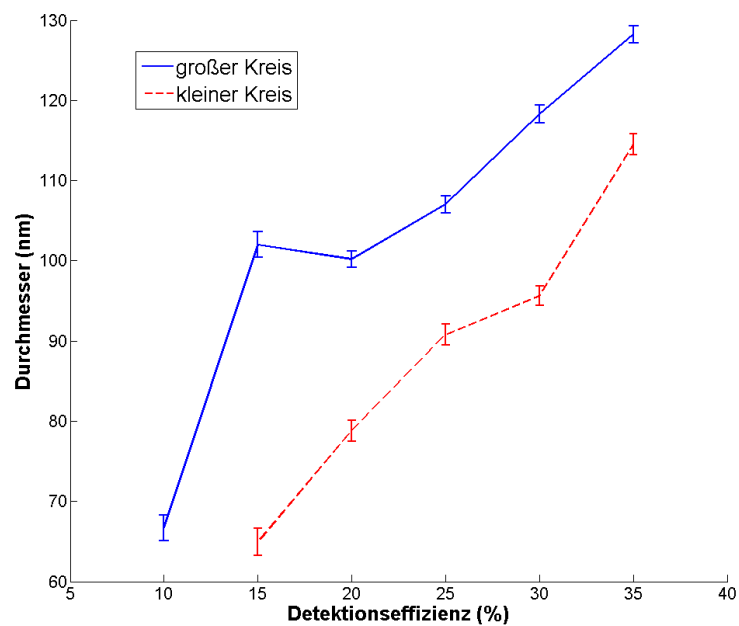
**Abbildung 6.3.1.:** Simulierte Verteilung von Punkten auf einer Kreisfläche mit einem Durchmesser von (a) 26nm (entspr. MS-Ring) und (b) 40nm (entspr. C-Ring). Die Punkte wurden mit einer simulierten Lokalisationsungenauigkeit von 30nm delokalisiert. Die graue Fläche wurde vom Clusteralgorithmus als Cluster gewertet.



**Abbildung 6.3.2.:** Histogramme der mit Hilfe des Clusteralgorithmus bestimmten Durchmesser der simulierten Kreisflächen (Durchmesser von 26nm bzw. 40nm). Jeweils 1000 Kreise mit einer simulierten Detektionseffizienz von 20% und einer simulierten Lokalisationsungenauigkeit von (a) 20nm und (b) 30nm. Es ergeben sich die mittleren Durchmesser von (a) großer Kreis:  $65,6 \pm 0,4$ nm; kleiner Kreis:  $46,6 \pm 0,4$ nm und bei (b) von großer Kreis:  $100,1 \pm 0,5$ nm; kleiner Kreis:  $78,0 \pm 0,5$ nm

**Tabelle 6.3.1.:** Vergleich der mit Hilfe des Clusteralgorithmus bestimmten Durchmesser der simulierten Kreise bei unterschiedlicher simulierter Detektionseffizienz (mit mit je 200 Durchläufen und einer Lokalisationsungenauigkeit von 30nm).

Detektionseff. (%)	10	15	20	25	30	35
∅ großer Kreis (nm)	66,7±1,6	102,0±1,6	100,2±1,0	107,0±1,1	118,3±1,1	128,2±1,1
∅ kleiner Kreis (nm)	-	64,9±1,7	78,8±1,3	90,8±1,3	95,6±1,2	114,5±1,3

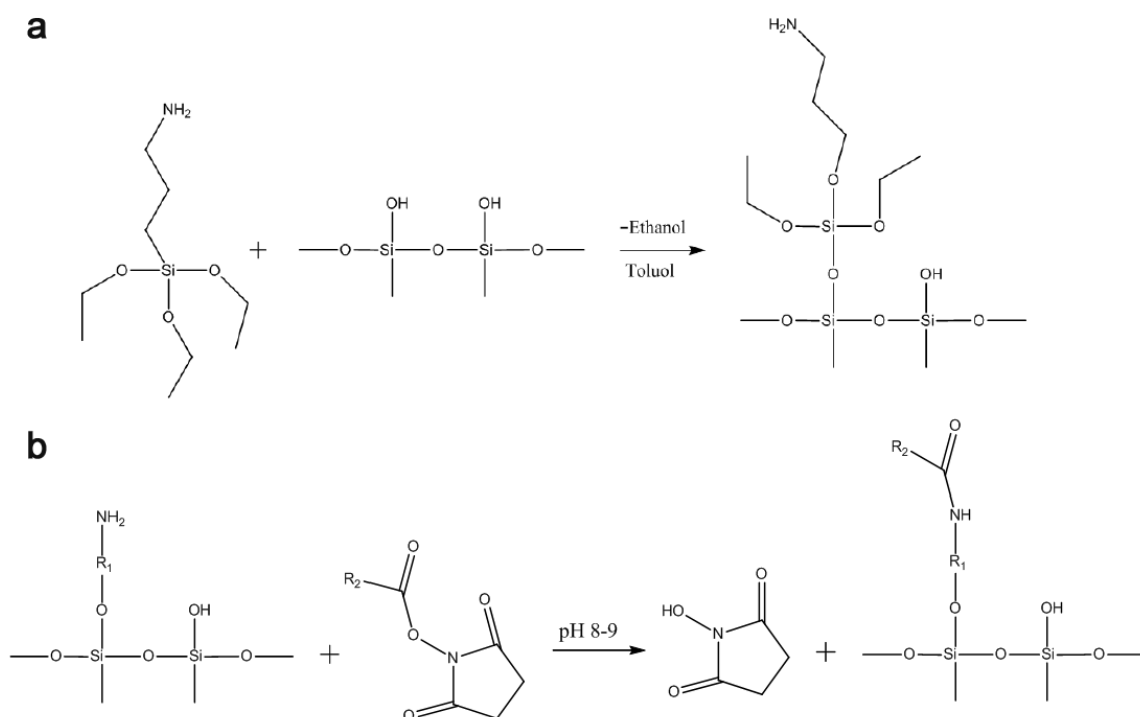


**Abbildung 6.3.3.:** Abhängigkeit des vom Algorithmus bestimmten Durchmessers der beiden Kreise von der simulierten Detektionseffizienz mit je 200 Durchläufen und einer simulierten Lokalisationsungenauigkeit von 30nm.

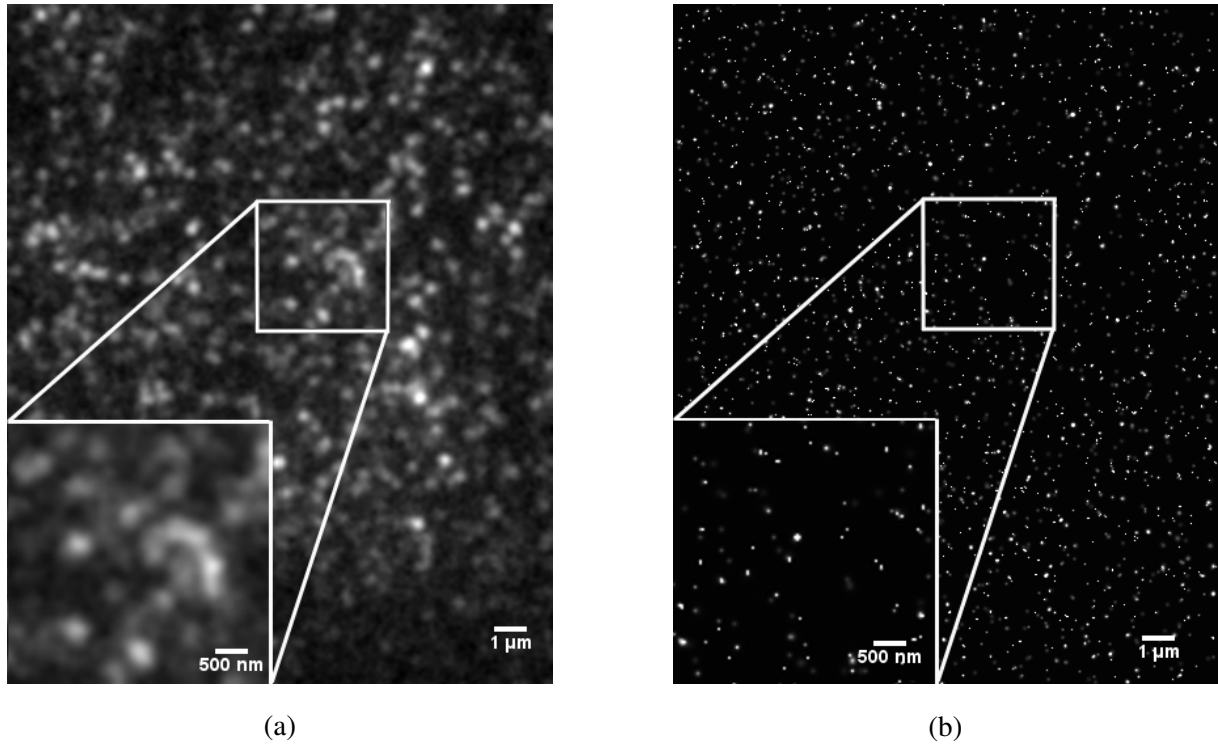
## 6.4. Alexa Fluor 647 Succinimidyl Ester an Deckglas gebunden

Um vergleichende Untersuchungen an Farbstoffmolekülen unabhängig von lokal variierender chemischer Umgebung innerhalb von Zellen durchführen zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 647 Succinimidyl Ester (Invitrogen) an die Deckglasoberfläche gebunden. Hierfür wurde 3-Amino-Propyltriethoxysilan an die Glasoberfläche gebunden. Die Fluoreszenzmoleküle können an die somit vorhandenen Aminogruppen binden. Abbildung 6.4.1 zeigt die chemischen Strukturformeln der entsprechenden Reaktionen. Die Farbstoffbindung sollte in einem leicht alkalischen Puffer stattfinden, um die Amino-Gruppe in einen nicht-protonierten Zustand zu bringen. Es ist zu beachten, dass die Bindungsstellen der Alexa-Moleküle in wässriger Lösung durch Hydrolysisierung unreaktiv werden. Diese Reaktion ist jedoch im Vergleich zur kovalenten Bindung an die Aminogruppen langsam.

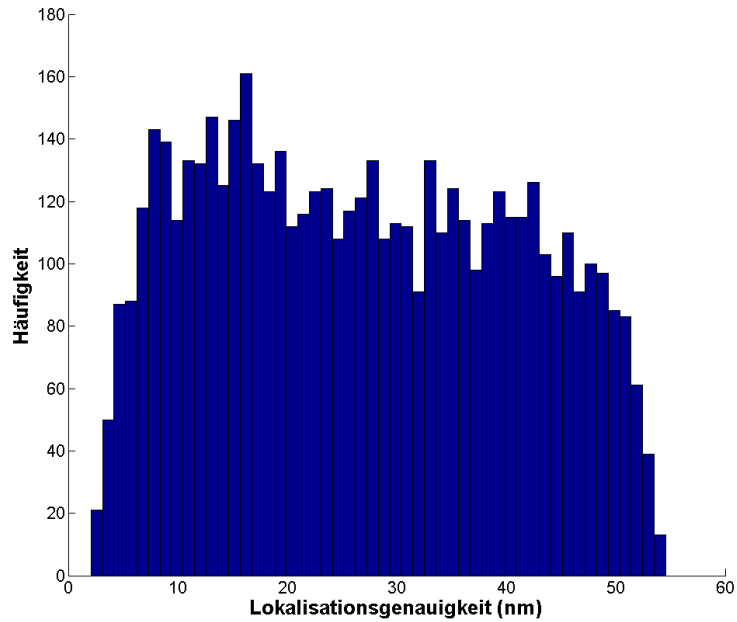
Abbildung 6.4.2 zeigt das mit einem Bandpass gaussgefilterte Weitfeldbild sowie die SPDM-Aufnahme von Alexa647-Molekülen, die am Deckglas gebunden sind. Für die Bindung der Farbstoffmoleküle wurde das Deckglas zehn Sekunden in eine Verdünnung mit Alexa647-Molekülen gelegt. Es wurden in vier Aufnahmen insgesamt 5422 Signale mit einer mittleren Lokalisationsgenauigkeit von  $27,0 \pm 0,2\text{nm}$  detektiert. Abbildung 6.4.4 zeigt die Histogramme der gemessenen Distanzverteilungen. Für alle Distanzen bis max. 500nm ergibt sich ein Mittelwert von  $250,0 \pm 1,0\text{nm}$ . Dass dieser Wert kleiner ist als bei der simulierten Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte zeigt, dass es Anhäufungen von Alexa-Molekülen gibt. Bei der Zufallsverteilung beträgt der Mittelwert über alle Distanzen bis 500nm  $332,2 \pm 0,6\text{nm}$ . Für die Distanzen zum benachbarten Molekül bis 100nm wurde ein Mittelwert von  $23,3 \pm 0,3\text{nm}$  gemessen. Auch dieser Wert ist bei der Zufallsverteilung mit  $63,3 \pm 0,5\text{nm}$  kleiner.



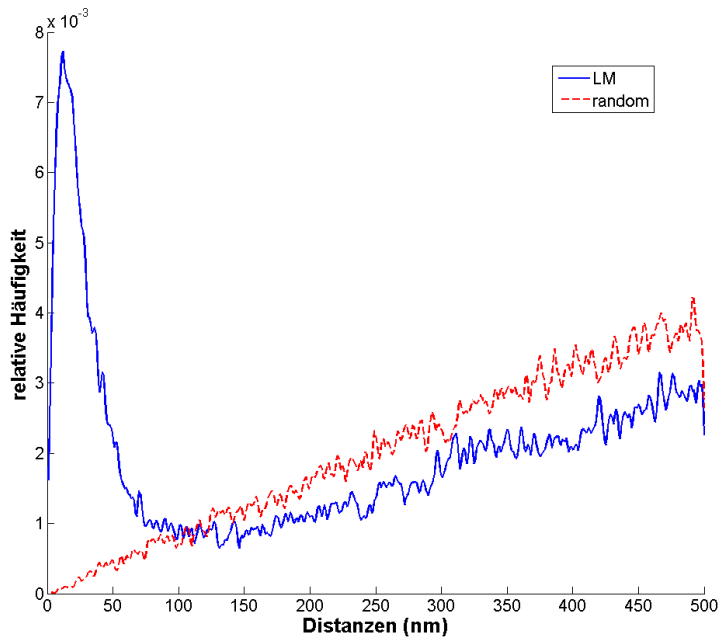
**Abbildung 6.4.1.:** (a) Bindung von 3-Amino-propyltriethoxysilan an Glas in Toluol-Umgebung. Es handelt sich um eine nukleophile Substitution. (b) Binden der Alexa 647-Farbstoffmoleküle an das mit 3-Amino-propyltriethoxysil an beschichtetes Deckglas (Gezeichnet mit ChemDraw Ultra, [Gra11]).



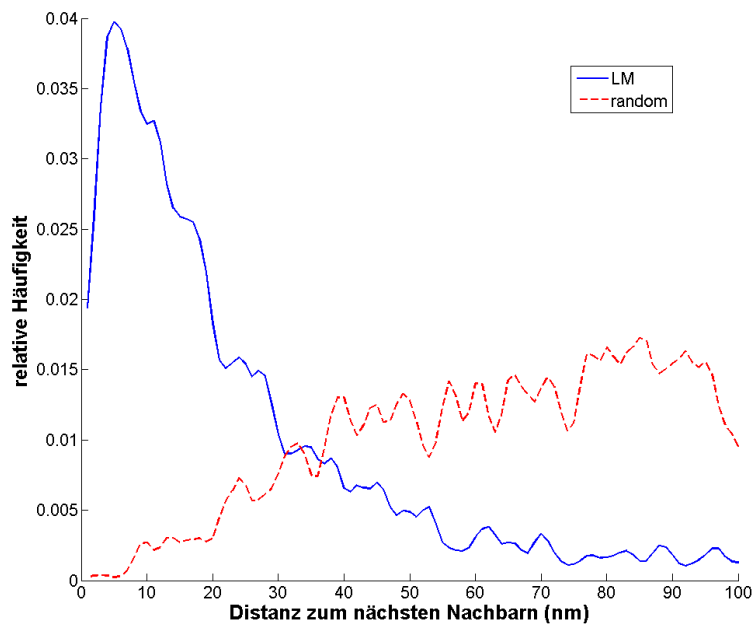
**Abbildung 6.4.2.:** Weitfeldbild mit Bandpass Gaussfilterung (a) und SPDM-Aufnahme (b) von ans Deckglas gebundenen Alexa647-Molekülen.



**Abbildung 6.4.3.:** Die mittlere Lokalisationsgenauigkeit der insgesamt 5422 detektierten Signale der ans Deckglas gebundenen Alexa647-Moleküle (gemittelt über vier Aufnahmen, 10s Reaktionszeit) beträgt  $27,0 \pm 0,2\text{nm}$ .



(a)

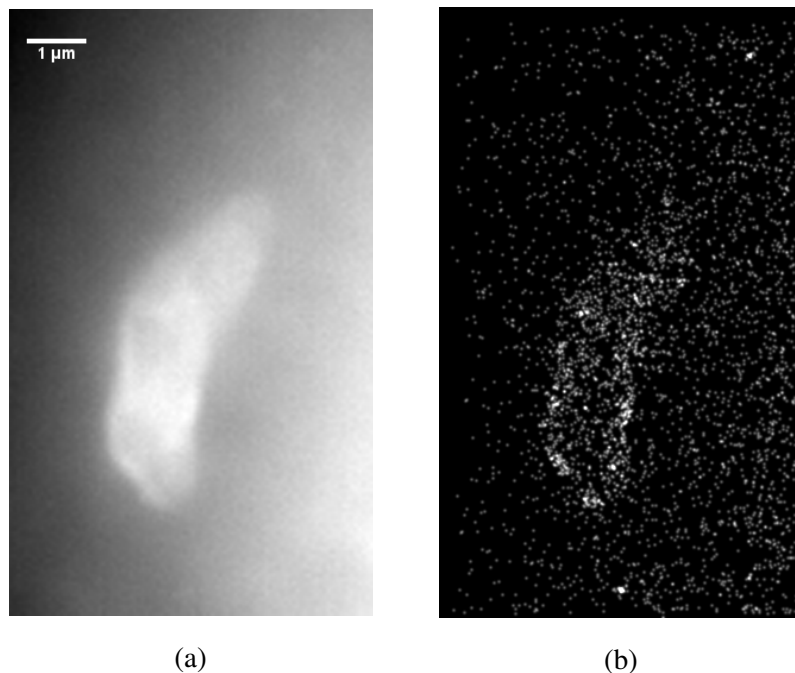


(b)

**Abbildung 6.4.4.:** Histogramme über die Distanzen zwischen den ans Deckglas gebundenen Alexa647-Molekülen im Vergleich zu einer Zufallsverteilung gleicher Ereignisdichte. Für alle Distanzen bis max. 500nm (a) ergibt sich ein Mittelwert von  $250,0 \pm 1,0\text{nm}$  und bei der Zufallsverteilung von  $332,2 \pm 0,6\text{nm}$ . Für die Distanzen zum benachbarten Molekül bis 100nm (b) ergibt sich ein Mittelwert von  $23,3 \pm 0,3\text{nm}$  und bei der Zufallsverteilung von  $63,3 \pm 0,5\text{nm}$ .

## 6.5. Membrananalysen an *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten

Die Messungen an extrazellulären *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. F. Frischknecht (Parasitologie, Universität Heidelberg<sup>4</sup>) durchgeführt. Abbildung 6.5.1 zeigt eine der ersten Aufnahmen. Hier wurde das Protein GAP50 des inneren Membrankomplexes (engl.: *Inner Membrane Complex, IMC*) mit Alexa488 markiert. Anhand dieser Aufnahme lässt sich keine eindeutige Abgrenzung und Vermessung des IMC vornehmen. Auf diesen ersten Messungen aufbauende weiterführende Untersuchungen sind in der von mir mitbetreuten Masterarbeit von Yiming Li [Li10] beschrieben, so dass an dieser Stelle nur eine Zusammenfassung der wesentlichen Aspekte der Arbeit vorgenommen wird.



**Abbildung 6.5.1.:** Aufnahme von *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten mit Alexa488-Markierung des IMC-Proteins GAP50. Mittelwertprojektion über die Zeit (a) und SPDM-Aufnahme (b).

Bei unseren Messungen wurde der innere Membrankomplex (IMC) und das Oberflächen Protein SAG1 (engl.: *Surface Antigen*) markiert. Die beiden Membranstrukturen konnten an den Lokalisationsmikroskopie-Aufnahmen nicht eindeutig voneinander getrennt werden, so dass ihr Abstand zueinander nicht direkt messbar war. Anhand von Bildsegmentierung und Kantenfilterung konnte eine Abschätzung des Abstandes zwischen IMC und der den Parasiten umhüllenden Plasmamembran erzielt werden. Auf die Vorgehensweise soll im Folgenden näher eingegangen werden.

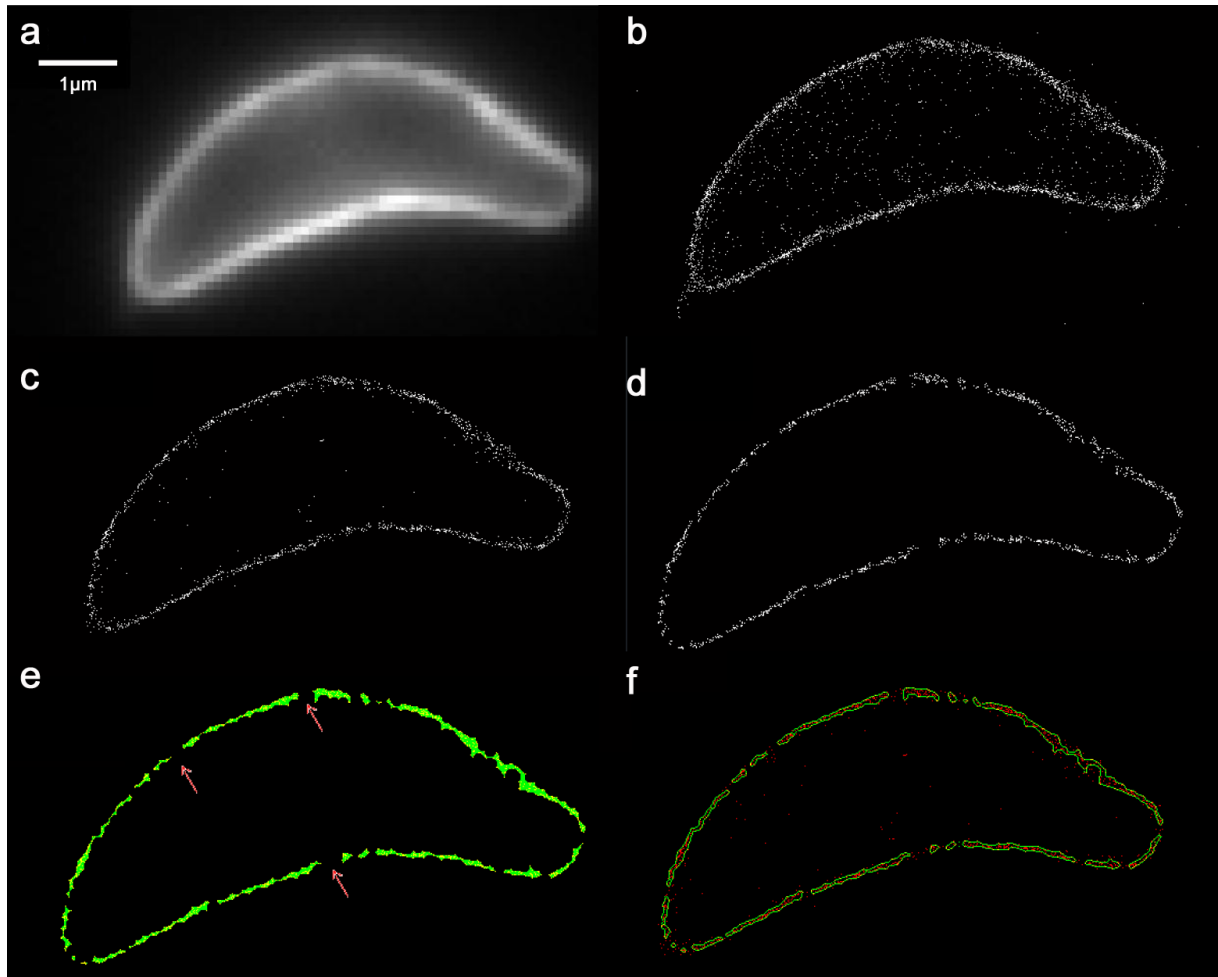
Da man aufgrund des Hintergrundrauschens in der Zelle Signale außerhalb der Membran detektiert, wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht, eine Segmentierung der Daten vorzunehmen. Zunächst wurde dies durch Erstellung einer Maske anhand des Weitfeldbildes mit Hilfe eines Schwellwertes für die Intensität getestet. Es erwies sich jedoch eine Segmentierung anhand der SPDM-Daten als sinnvoller, da hierbei eine präzisere Auswahl der Membranstruktur möglich ist. Die Ergebnisse der einzelnen

<sup>4</sup><http://www.medizinische-fakultaet-hd.uni-heidelberg.de/Malaria-3-Frischknecht.100117.0.html>

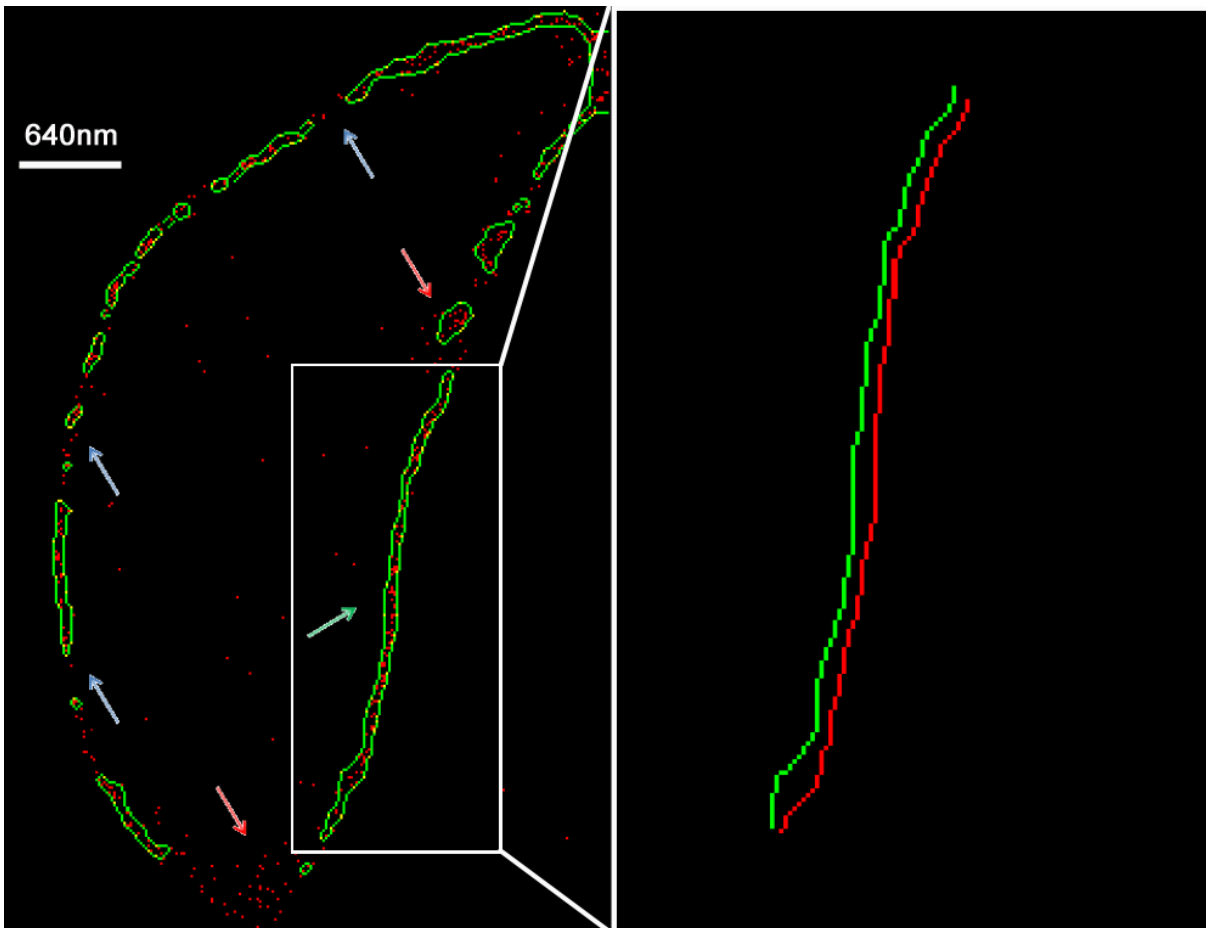
Schritte der Datensegmentierung sind anhand eines Beispiels in Abbildung 6.5.2 zu finden. Abbildung 6.5.2 (a) zeigt das Weitfeldbild, während in 6.5.2 (b) das unbearbeitete SPDM-Bild zu sehen ist. Es wurde zunächst eine Diskriminierung der Ereignisse über einen oberen Schwellwert der Lokalisationsgenauigkeit von 15nm vorgenommen. Im Ergebnis (Abb.6.5.2 (c)) ist eine deutliche Verringerung der Anzahl an Ereignissen im Zytoplasma zu erkennen. Eine bessere Isolation der Ereignisse innerhalb des IMC zeigt jedoch die Diskriminierung der Ereignisse über die Ereignisdichte. Abbildung 6.5.2 (d) zeigt ausschließlich die Ereignisse mit zwei oder mehr Nachbarn in einem Radius von drei Pixeln. An diesem Bild (6.5.2 (d)) wurde anschließend eine morphologische Schließung mit einer Kreisscheibe mit einem Radius von 5 Pixel als strukturierendes Element durchgeführt (Abb.6.5.2 (e)). Eine morphologische Schließung beinhaltet die aufeinanderfolgende Durchführung einer Dilatation und einer Erosion mit demselben strukturierenden Element. Bei der Dilatation wird jeder Bildpunkt der Originalstruktur auf die Form des strukturierenden Elementes ausgedehnt (dilatiert). Bei der anschließenden Erosion bleiben ausschließlich diejenigen Bildpunkte in der Menge enthalten, bei denen das Strukturelement vollständig in der Originalstruktur enthalten ist, wenn es auf ihnen positioniert wird. Auf das auf diese Weise erzeugte Bild wurde schließlich ein Kantenfilter („*Canny-Edge-Operator*“) angewendet. Das Ergebnis ist in Überlagerung mit dem ursprünglichen SPDM-Bild in 6.5.2 (f) zu sehen.

An den segmentierten Bilddaten und detektierten Membrankanten kann anschließend eine Distanzanalyse vorgenommen werden. Hierfür ist es erforderlich die beiden Kanten voneinander zu trennen. Dies wurde mit der von Yiming Li geschriebenen Matlab-Routine „*Measure*“ [Li10] (basierend auf dem von Daniel Paech geschriebenen Skript „*Object Drawer*“) durchgeführt. Mit dem Algorithmus „*ndist*“ konnte nun die Distanz zwischen den beiden Membrankanten gemessen werden. Das Ergebnis findet sich im Histogramm 6.5.4. Der Mittelwert der Distanz zwischen innerer und äußerer Membrankante wurde mit 60nm mit einer Standardabweichung von 16nm bestimmt.

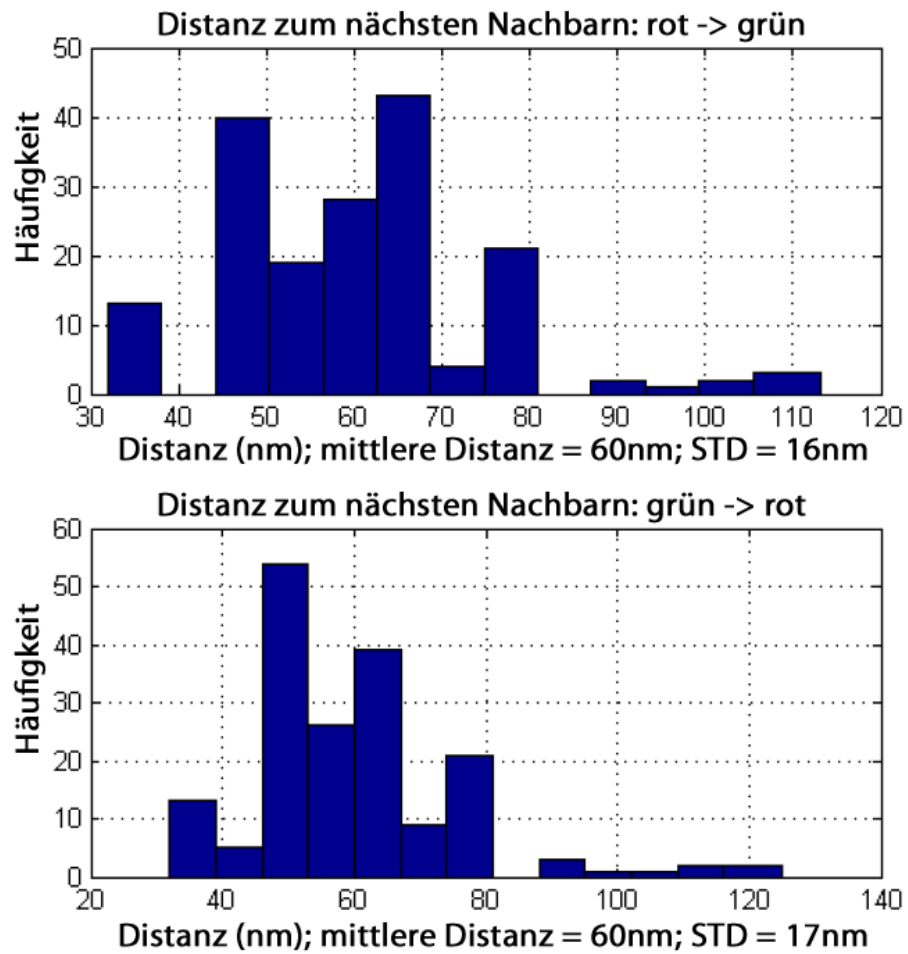




**Abbildung 6.5.2.:** Segmentierung anhand einer Beispielaufnahme einer Toxoplasma-Zelle (IMC1-Alexa488 und SAG1-Alexa488). (a) Weitfeld- und (b) SPDM-Bild , (c) SPDM-Bild mit Ereignissen mit einer Lokalisationsgenauigkeit von unter 15nm, (d) SPDM-Bild mit Ereignissen mit zwei oder mehr Nachbarn in einem Radius von drei Pixel, (e) Ergebnis der morphologischen Schließung von (d), (f) Ergebnis der Kantenerkennung von (e) mit SPDM-Bild.



**Abbildung 6.5.3.:** Links: Kantendetektion der Membran einer Toxoplasma-Zelle mit YFP-Markierung des inneren Membranproteins IMC1 und Alexa488-Markierung des Proteins SAG1 an der äußeren Membran. Rechts: Auswahl eines lückenlos detektierten Membranabschnittes und Trennung von innerer (grün) und äußerer (rot) Membrankante.



**Abbildung 6.5.4.:** Histogramm über die Distanzen zu den nächsten Nachbarn aus der jeweils anderen Membrankante. Es ergibt sich ein Mittelwert von  $60 \pm 16\text{nm}$  (STD: Standardabweichung).

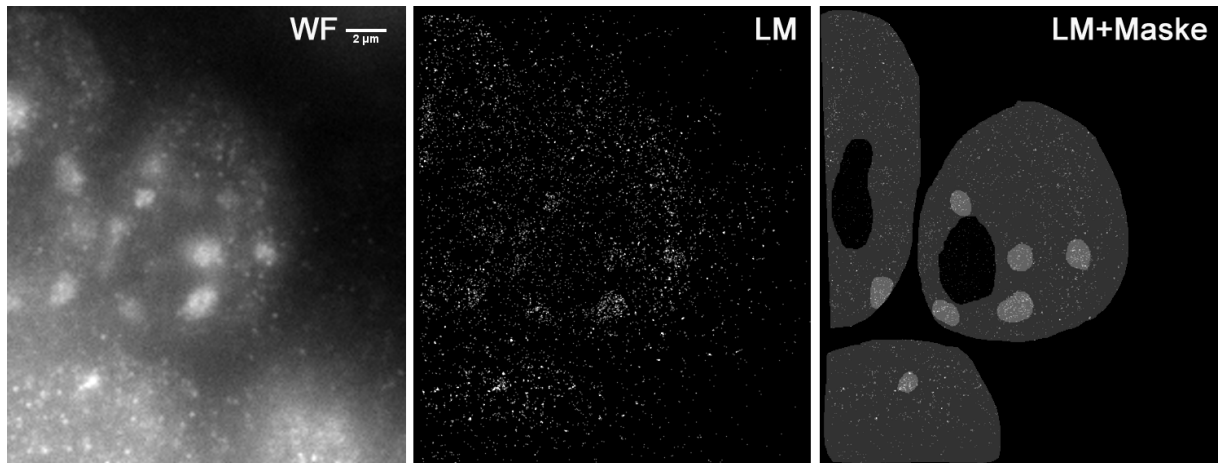
## 6.6. Analyse der Verteilung der Histon H3 Tri-methylierung an Lysin 9 in embryonalen Stammzellen der Maus

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Albrecht M. Müller (Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ), Universität Würzburg<sup>5</sup>) wurde mit Hilfe der Lokalisationsmikroskopie die Verteilung der heterochromatin-assoziierten Histon H3K9me3 Modifikation in embryonalen Stammzellen der Maus untersucht. Hierbei wurde eine Wildtyp- mit einer *knockout*(KO)-Zelllinie des *Polycomb*-Gens EED verglichen. Diese *knockout*-Zellen haben keinen stabilen *Polycomb repressive complex 2* (PRC2), was im Verlust globaler Histon H3 Lysin 27 Methylierung resultiert. Neben dem bereits beschriebenen Effekt auf die K27 Methylierung an Histon H3 ist auch die K9 Methylierung ein potentiell Ziel des PRC2. Aus diesem Grund wurden Unterschiede in der Verteilung der H3K9me3 Modifikation beim Vergleich der wildtypischen und der EED KO Stammzellen vermutet. Beide Histonmodifikationen, H3K9me3 und H3K27me3, sind mit inaktiven Genen bzw. mit Heterochromatin assoziiert. Bei der verwendeten Markierung handelt es sich um eine Immunfluoreszenzfärbung der Histon H3 Lysin 9 Trimethylierung (H3K9me3) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy2 (Invitrogen<sup>6</sup>). Wie aus den Epifluoreszenzaufnahmen zu entnehmen ist, liegt die H3 K9me3 Modifikation im Kern ungleichmäßig verteilt vor (Abb. 6.6.1 WF). Dabei entsprechen Bereiche intensiver Markierung durch den H3K9me3 spezifischen Antikörper konstitutivem Heterochromatin. Für diese „Cluster“ ist eine hohe Dichte, entsprechend geringeren Abständen zwischen den H3K9me3 Modifikationen zu erwarten. Die Proben wurden in 'Prolong Gold' eingedeckt und mit Ausgangsleistungen des Lasers von 100-150mW konnte der Farbstoff Cy2 in den reversibel gebleichten Zustand gebracht werden. Abbildung 6.6.1 zeigt eine Beispielaufnahme des Wildtyps. Zunächst wurde eine Weitfeldaufnahme (WF) mit konventionellem Beleuchtungsstrahlengang aufgenommen. Bereits hier sind deutliche Anhäufungen des Histon-Proteins H3K9 zu erkennen. Diese (Heterochromatin-)Cluster konnten auch mit der Lokalisationsmikroskopie (LM) detektiert werden. Um eine getrennte Distanz- und Dichteanalyse der Regionen unterschiedlicher Heterochromatin-Dichte vornehmen zu können, wurde mit dem Matlab-Skript „Object\_Drawer“ (von Daniel Paech) anhand des LM-Bildes eine Maske erstellt. Mit diesem Skript kann anhand eines Bildes eine Maske erstellt werden, in der den unterschiedlichen Regionen unterschiedliche Werte zugewiesen werden. Bei der hier vorgestellten Auswertung wurde die Maske am LM-Bild unter zu Hilfenahme des entsprechenden Weitfeldbildes erzeugt. Um systematische Fehler zu vermeiden, wurden ausschließlich Regionen als Cluster ausgewählt, die sowohl im Weitfeld- als auch im Lokalisationsbild zu erkennen sind. Die Maske des Beispielsbildes wurde in Abbildung 6.6.1 (rechts) mit dem Lokalisationsbild überlagert. Regionen, die als Cluster gewertet wurden, sind im Bild hellgrau dargestellt, während die restliche Region des Kerns dunkelgrau markiert ist. Für die Bereiche des restlichen Kerns wurden die Cluster und Bereiche mit deutlich niedriger Ereignisdichte (schwarz dargestellt) ausgespart. Zur Auswahl der entsprechenden Region wurde ihr Wert in der Maske auf eins gesetzt und die Maske mit dem LM-Bild multipliziert. Anhand des Ergebnisbildes wurde mit Hilfe des Matlab-Skripts „Bild2Orte“ [Lem09] die zugehörige Orte-Datei erzeugt, welche ausschließlich die Daten zu den gefundenen Ereignissen der ausgewählten Region enthält. Eine Beispielaufnahme der *knockout*-Zelllinie ist in Abbildung 6.6.2 zu sehen. Auch bei dieser Zelllinie sind deutliche Anhäufungen des Histonproteins H3K9 zu erkennen. Es wurden 12 Kerne der Wildtyp-Zelllinie untersucht, in welchen insgesamt 32 Cluster gezählt wurden. Die Zellen enthalten demnach im Mittel  $\sim 2,7$  Cluster. In 9 Kernen

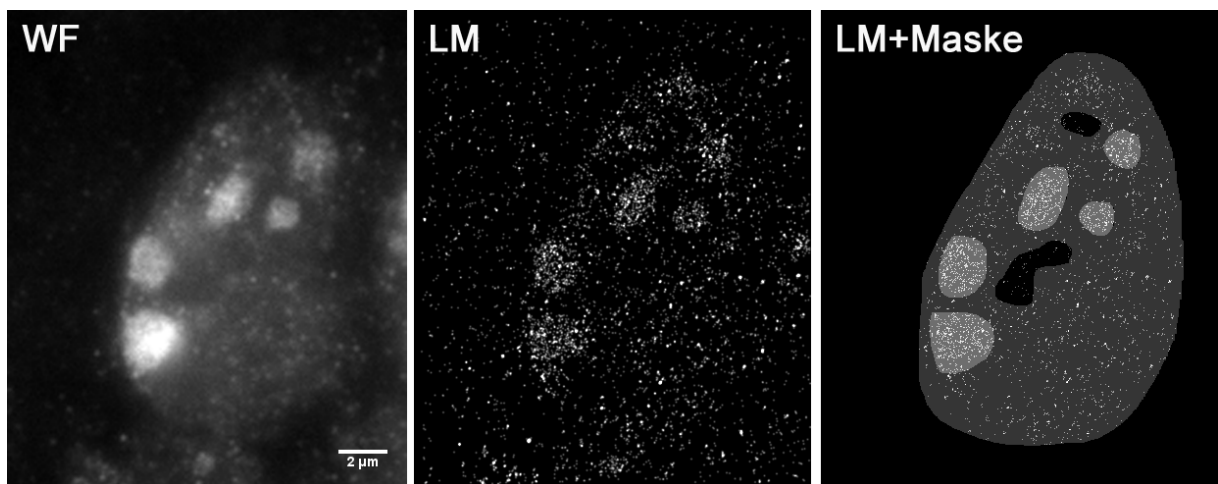
<sup>5</sup><http://www.strahlenkunde.uni-wuerzburg.de/ags/muellerneu.htm>

<sup>6</sup>Karlsruhe, <http://www.invitrogen.com>

der *knockout*-Linie wurden 35 Cluster gefunden, was einer mittleren Anzahl von  $\sim 3,9$  Cluster pro Kern entspricht. Eine Ursache für den Unterschied zwischen *knockout*- und Wildtyp-Zelllinie ist, dass wie bereits erwähnt ausschließlich Cluster in die Kalkulation mit einbezogen wurden, welche sowohl im Weitfeld- als auch im Lokalisationsbild detektiert wurden.



**Abbildung 6.6.1.:** Embryonale Mausstammzellen mit Cy2-Markierung des Histonproteins H3K9me3 der Wildtyp-Zelllinie. Links: Weitfeld-Aufnahme (WF), Mitte: Lokalisationsmikroskopie-Aufnahme (LM), rechts: Maske zur Auswahl der unterschiedlichen Regionen überlagert mit dem Lokalisationsbild. Regionen, die als Cluster gewertet wurden, sind hellgrau dargestellt, die restliche Region des Kerns dunkelgrau.

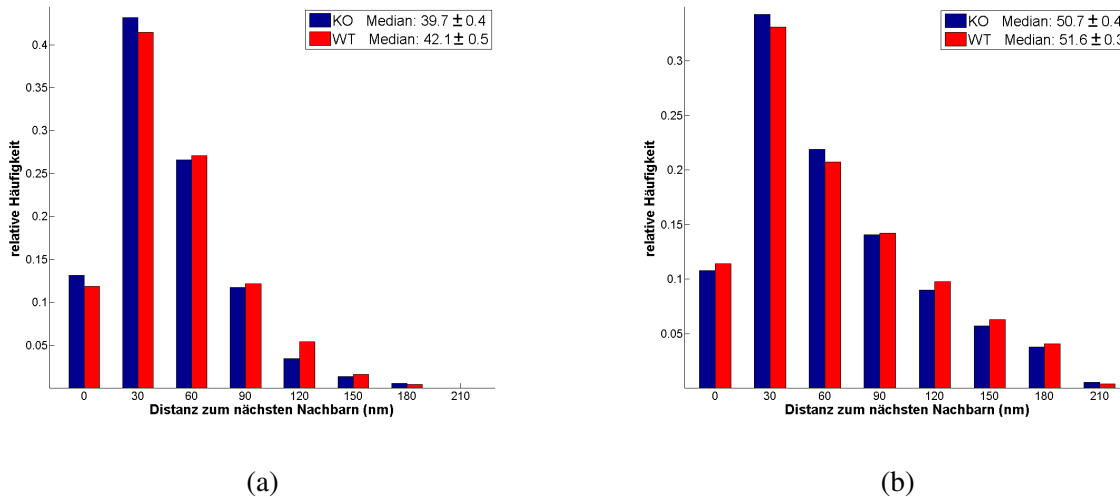


**Abbildung 6.6.2.:** Embryonale Mausstammzelle mit Cy2-Markierung des Histonproteins H3K9me3 der *knockout*-Zelllinie. Links: Weitfeld-Aufnahme (WF), Mitte: Lokalisationsmikroskopie-Aufnahme (LM), rechts: Maske zur Auswahl der unterschiedlichen Regionen überlagert mit dem Lokalisationsbild.

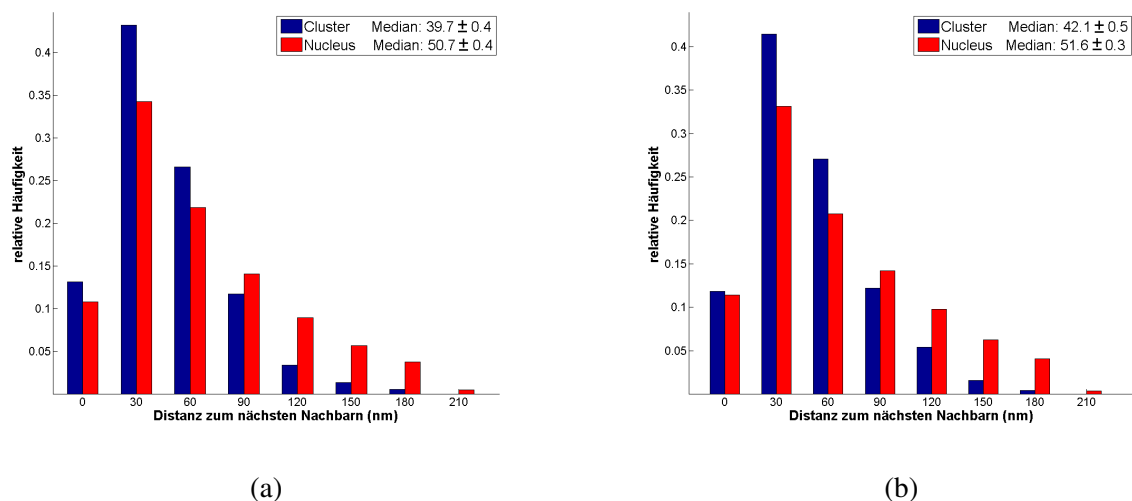
An den segmentierten Daten wurde eine Analyse der Distanzen zu den nächstgelegenen Histonproteinen durchgeführt. Für die Distanzen zu den nächstgelegenen Ereignissen innerhalb der Cluster wurde ein Median von  $39,7 \pm 0,4$  nm für die *knockout*-Zelllinie bestimmt. Dieser liegt nur geringfügig unterhalb des Medians der Distanzen zu den nächsten Nachbarn für die Wildtyp-Zelllinie, welcher bei  $42,1 \pm 0,5$  nm liegt. Als Fehler wurde hierbei die Standardabweichung geteilt durch die Quadratwurzel der Anzahl

bestimmter Distanzen angegeben. Der geringe Unterschied zwischen Wildtyp- und *knockout*-Zelllinie beim Median der Distanzen liegt somit außerhalb des dreifachen Fehlers. Betrachtet man die Distanzen zu den nächstgelegenen Ereignissen in der restlichen Region des Kerns, so sind diese erwartungsgemäß größer als innerhalb der Cluster. In dieser Region liegt der Median für die *knockout*-Zelllinie mit  $50,7 \pm 0,4\text{nm}$  ebenfalls nur geringfügig unterhalb des Medians der Wildtyp-Zelllinie, welcher zu  $51,6 \pm 0,3\text{nm}$  bestimmt wurde. In diesem Fall liegen die Werte somit noch gerade innerhalb des dreifachen Fehlers auseinander.

Neben den Distanzanalysen wurde auch eine Untersuchung der Dichteverteilungen vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.6.1 zusammengefasst. Es ergaben sich für die Wildtyp-Zelllinie Dichten von  $82,6\mu\text{m}^{-2}$  innerhalb der Cluster und im restlichen Kern von  $27,5\mu\text{m}^{-2}$ . Für die *knockout*-Zelllinie liegen die Dichten bei  $90,0\mu\text{m}^{-2}$  innerhalb der Cluster und im restlichen Kern bei  $28,3\mu\text{m}^{-2}$ . Vergleicht man die Ereignisdichten zwischen Wildtyp- und *knockout*-Zelllinie, so ist der Unterschied im restlichen Kern mit  $0,8\mu\text{m}^{-2}$  nur sehr gering. Betrachtet man jedoch die Dichten innerhalb der Cluster, so ist der Unterschied mit  $7,4\mu\text{m}^{-2}$  schon deutlicher.



**Abbildung 6.6.3.:** Histogramme über die Distanzen zu den nächsten Nachbarn des Histon-Proteins H3K9me3. Vergleich der Distanzen innerhalb der Cluster (a) bzw. im Rest des Kerns (b) zwischen Wildtyp- und *knockout*-Zelllinie.



**Abbildung 6.6.4.:** Histogramme über die Distanzen zu den nächsten Nachbarn des Histon-Proteins H3K9me3. Vergleich der Distanzen innerhalb der unterschiedlichen Regionen (Cluster und Rest des Kerns) für die *knockout*-Zelllinie (a) und die Wildtyp-Zelllinie (b).

**Tabelle 6.6.1.:** Ereignisdichten bei Cy2-markiertem H3K9me3 in embryonalen Stammzellen der Maus.

J1 WT		Dichte im Kern excl. Cluster		Dichte in Cluster
Messung Nr.	# Kerne	# Cluster	(1/μm <sup>2</sup> )	(1/μm <sup>2</sup> )
2	4	8	11,1	64,3
3	1	6	26,4	69,7
4	3	7	27,2	104,5
5	1	4	28,1	71,8
6	2	4	27,9	76,5
7	1	3	44,3	109,0
<b>J1 EED KO</b>		<b>12</b>	<b>32</b>	<b>82,6</b>
1	1	5	43,2	138,9
2	1	6	23,8	58,3
3	2	7	27,9	80,6
4	3	9	24,8	81,0
5	1	5	23,9	99,0
7	1	3	26,1	82,2
		<b>9</b>	<b>35</b>	<b>90,0</b>





## 7. Zusammenfassung und Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Anwendung fortschrittlicher Methoden der Lichtmikroskopie, deren Auflösung unterhalb der klassischen Beugungsgrenze liegt, auf fluoreszenzmarkierte Objekte in biologischen Präparaten untersucht. Dabei wurden drei physikalisch unterschiedliche Methoden angewandt: Erstens 4Pi-Mikroskopie mit fokussierter Beleuchtung, zweitens SMI-Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung und drittens Lokalisations-Mikroskopie mit homogener Beleuchtung. Dabei konnten Vor- und Nachteile der drei Methoden untersucht werden.

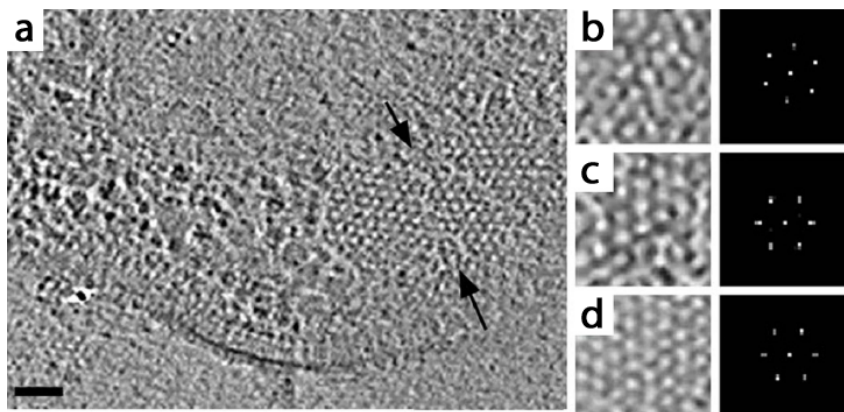
Die 4Pi-Messungen wurden an einem kommerziellen Gerät von Leica (TCS 4Pi) vorgenommen. Die bei jeder Messung nötige Justage des Geräts erwies sich als aufwendiger als bei den anderen Methoden. Dies ist mit einem erhöhten Bleichen der Fluoreszenzfarbstoffe verbunden. Spezifische technische Probleme des Leica TCS 4Pi-Mikroskops der Arbeitsgruppe von Prof. Cremer wurden analysiert und charakterisiert. Die auftretenden Vibrationen am unteren Objektiv konnten durch den Anbau eines Dämpfungsmoduls behoben werden. Die auf Glycerin korrigierten Objektive, die den Einsatz von Quarzdeckgläsern erfordern, wurden durch Öl-Objektive ersetzt. Für das Aufbringen der Reflexionsbeschichtung auf die 4Pi-Deckgläser wurde in Zusammenarbeit mit der mechanischen Werkstatt des Instituts eine Baugruppe entwickelt und angefertigt. Diese ermöglicht die Bespinnerung der Deckgläser im institutsinternen Reinraum. Mit beiden Objektivkonfigurationen wurden Aufnahmen gemacht. Durch die Aufnahme fluoreszenter Beads konnte gezeigt werden, dass Halbwertsbreiten von ca. 110nm mit 4Pi-Typ A und Einphotonen-Anregung mit Ölobjektiven erreichbar sind. An 4Pi-Aufnahmen von sechs Mikrometer großen Beads wurde verdeutlicht, dass ein axialer Phasenschub auftritt und dieser innerhalb eines Bildstapels variieren kann. Dies bedeutet, dass die im Leica TCS 4Pi-Mikroskop implementierte Phasenkompensation nicht ausreicht, um im gesamten Bildstapel eine axial konstante Phase zu erhalten. Der axiale Durchmesser eines 6µm großen Beads konnte anhand eines gefilterten aber nicht entfaltenen 4Pi-Bildes bis auf dreihundert Nanometer genau bestimmt werden. Obwohl dies im Hinblick auf die theoretische Auflösung des 4Pi-Mikroskops von ca. 110nm eine relativ schlechte Genauigkeit ist, liegt sie trotzdem unterhalb der axialen Auflösungsgrenze eines konfokalen Laserrastermikroskops. Es zeigt, dass axiale Distanzmessungen mit dem 4Pi-Mikroskop auch ohne Entfaltung möglich sind. Dies gilt allerdings nur sofern die Objekte, deren Abstand bestimmt werden soll, ein deutliches Hauptmaximum der 4Pi-PSF aufweisen und weiter als die halbe Wellenlänge des Anregungslichts auseinander liegen, so dass sich ihre Punktbildfunktionen nicht überlagern.

Bei der quantitativen Analyse von Kernporenkomplexen (NPCs) in MCF-7-Zellen mit 4Pi-Mikroskopie wurde eine mittlere Anzahl von NPCs pro Kern von  $1240 \pm 300$  ermittelt. Maul und Deaven ermittelten mit kombinierter Phasenkontrast- und Elektronenmikroskopie bei HeLa-Zellen eine Anzahl von 3 934 Poren pro Kern [MD77]. Dieser Unterschied in der Anzahl an Kernporen kann einerseits an dem unterschiedlichen Zellstamm liegen, andererseits an einer Überschätzung der Größe der einzelnen Kern-

porenkomplexe bei den 4Pi-Messungen. Die bei unseren Messungen ermittelte mittlere Fläche pro NPC entspricht einem Durchmesser von ca. 285nm unter der Annahme von Kreissymmetrie. Vergleicht man diesen Wert mit der mithilfe von optischer Nahfeldmikroskopie (engl.: *scanning near-field optical microscopy*, SNOM) ermittelten Halbwertsbreite von ca. 60nm [HSP<sup>+</sup>05] von p62-markierten NPCs, so spricht dies dafür, dass nicht einzelne Kernporen sondern Komplexe mehrerer Poren gemessen wurden. Eine Ursache hierfür kann sein, dass die laterale Auflösung des 4Pi-Mikroskops nicht wesentlich besser ist als diejenige eines konfokalen Laserraster-Mikroskops.

Die bei den 4Pi-Aufnahmen detektierten Einstülpungen der Kernmembran, wie in den Abbildungen 4.3.9 und 4.3.10 zu sehen, konnten bisher nur mittels Elektronenmikroskopie und strukturierter Beleuchtung abgebildet werden [SCH<sup>+</sup>08].

Mit der SMI-Mikroskopie wurden Cluster des Rezeptorproteins CheZ in *E. coli*-Bakterien untersucht. Die Messungen haben bestätigt, dass die Rezeptorproteine große Cluster bilden, die meist an den Zellpolen lokalisieren [MS93], [SB00a]. Hierbei wurde ein mittlerer Durchmesser der Rezeptorproteincluster von  $168 \pm 46\text{nm}$  unter der Annahme einer Kugelform bestimmt.

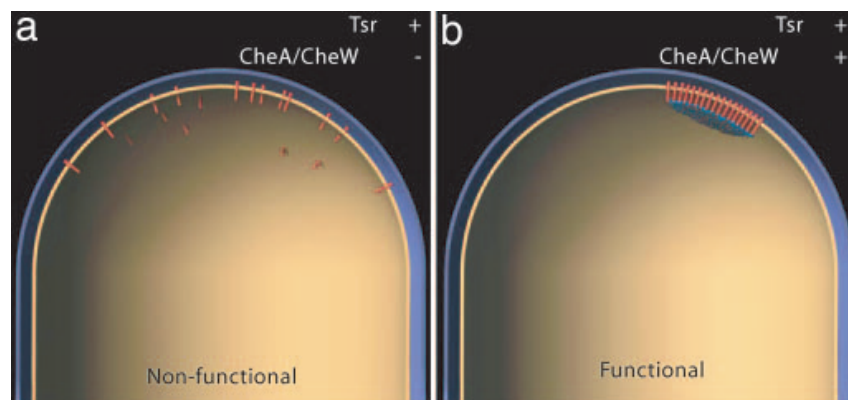


**Abbildung 7.0.1.:** In Elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in unterschiedlichen bakteriellen Spezies, einschließlich *E. coli*-Bakterien, eine 12nm hexagonale Struktur von Rezeptoren entdeckt: (a) *T. maritima*, (b) *R. sphaeroides*, (c) *E. coli*, (d) *V. cholerae* (Skalierungsbalken: 50nm) [BOT<sup>+</sup>09].

Bei Untersuchungen der Rezeptorcluster des Proteins CheZ mit der Lokalisations-Mikroskopie wurden Substrukturen der Cluster mit Halbwertsbreiten bis zu einem Minimalwert von ca. 85nm vermessen. Mittels Elektronenmikroskopie konnte in [ZKHS07] gezeigt werden, dass die Histidin-Kinase CheA und das Adapterprotein CheW für die Bildung funktioneller Rezeptorcluster entscheidend sind (Abb. 7.0.2). In Kapitel 6.1 zeigten Untersuchungen der Distanzverteilungen der Rezeptorproteine CheW und CheA deutliche Unterschiede im Vergleich zu Zufallsverteilungen. Zum Vergleich wurden LM-Messungen an *E. coli*-Bakterien zweier unterschiedlicher Negativkontrollen durchgeführt: Zum einen an einem Stamm mit YFP-Markierung des CheW-Proteins und *flhC-knockout*, bei welchem die CheW-Moleküle frei im Cytosol vorliegen, und zum anderen an Bakterien des Stamms RP437, bei dem YFP-Moleküle frei im Cytosol vorhanden sind. Die Ergebnisse der Negativkontrollen lagen deutlich näher an der Zufallsverteilung. Es wurde zunächst vermutet, dass die deutlichen Maxima bei diskreten Werten der Distanz zum nächsten Nachbarn Hinweise auf eine interne Substruktur geben. So wurden im Jahre 2009 bei Messungen mit Elektronenmikroskopie 12nm hexagonale Strukturen von Chemotaxisrezeptoren in unterschiedlichen bakteriellen Spezies, einschließlich *E. coli*-Bakterien, gemessen [BOT<sup>+</sup>09]. Da die

Maxima in den Distanzverteilungen der Rezeptoren bei den SPDM-Messungen jedoch auch bei der Zufallsverteilung auftreten, konnte die Vermutung, dass es sich hierbei um die hexagonale Struktur handelt, nicht bestätigt werden. Die Ursache hierfür kann neben einer zu geringen Moleküldichte auch an einer zu großen Ungenauigkeit in der Positionsbestimmung liegen. Zudem kommt es zu einer Verzerrung der realen dreidimensionalen Distanzen durch die Projektion entlang der optischen Achse und der Messung lateraler Distanzen.

Der Vergleich der mittleren Distanz zum benachbarten Molekül zwischen unfixierten und PFA-fixierten Proben zeigte, dass die Mittelwerte für das Protein CheW zwischen den beiden Präparationsmethoden nur ca. 2nm auseinander liegen. Nimmt man beide Präparationsmethoden zusammen, so ergab sich eine mittlere Distanz benachbarter CheW-Proteine von ca. 32nm. Für das Protein CheA ergab sich eine mittlere Distanz benachbarter Moleküle von ca. 30nm, wenn man die Werte von unfixierten und fixierten Proben zusammennimmt. Auch für dieses Protein fiel der Unterschied zwischen den beiden Präparationsmethoden mit ca. 3nm sehr gering aus. Das ist ein Hinweis darauf, dass der Einfluss der PFA-Fixierung auf die Struktur der *E. coli*-Bakterien im einstelligen Nanometerbereich liegt. Ist man nicht an dynamischen Prozessen interessiert, so ist man nicht auf Messungen lebender Organismen angewiesen. Umgekehrt lässt sich auch sagen, dass die Mobilität der Rezeptorproteine nicht so groß ist, dass sie das Ergebnis der Distanzmessungen stark verfälschen würde.

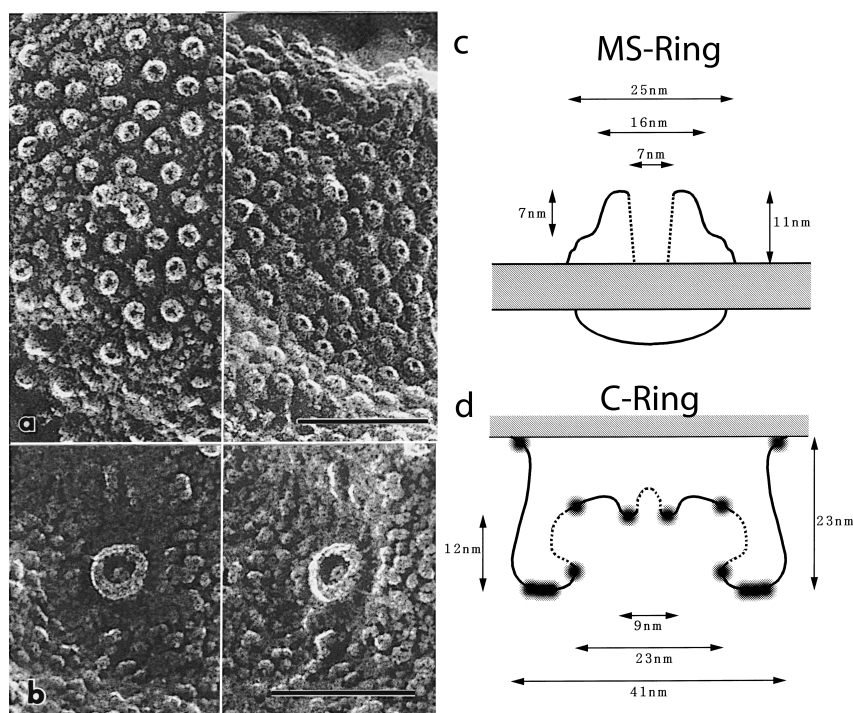


**Abbildung 7.0.2.:** Anwesenheit der Proteine CheA und CheW ist entscheidend bei der Bildung funktioneller Cluster von Chemorezeptoren in *E. coli*. (a) Abwesenheit von CheA und CheW führt zu einer zerstreuten Verteilung der Rezeptoren an den Polregionen des Bakteriums. (b) In Wildtyp-Bakterien bilden sich funktionelle Cluster der Chemorezeptoren [ZKHS07].

Bei den SPDM-Messungen an Proteinen des Motorkomplexes der *E. coli*-Bakterien wurden zwei unterschiedliche Ring-Strukturen vermessen. Nach elektronenmikroskopischen (EM) Untersuchungen liegen die Durchmesser der beiden Ringstrukturen um ca. 11-16nm auseinander [FSTD94], [LKK00], [KSO+96]. Abbildung 7.0.3 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der beiden Ringstrukturen sowie schematische Diagramme mit den Abschätzungen der Dimensionen [KSO+96]. Es sollte untersucht werden, ob die beiden Strukturen mithilfe von SPDM-Messungen voneinander zu unterscheiden sind. Auch bei diesen Proteinen wurden vergleichende Untersuchungen zwischen fixierten und unfixierten Präparaten vorgenommen. Die Unterschiede in der Größenbestimmung der Proteincluster sind kleiner als zwei Nanometer. Allerdings fallen auch die Unterschiede der mittleren Durchmesser zwischen den beiden Ringstrukturen kleiner als zwei Nanometer aus. Hieran sieht man, dass die Größe dieser Strukturen an der Auflösungsgrenze der Lokalisationsmikroskopie liegt. Dass die Größen der beiden

Ringstrukturen bei den SPDM-Messungen nicht zu unterscheiden waren, kann zwei Gründe haben. Einerseits kann es an einer zu hohen Ungenauigkeit in der Positionsbestimmung der Einzelmoleküle liegen, andererseits kann auch eine zu niedrige Detektionseffizienz eine Ursache sein.

Zur Abschätzung der Detektionseffizienz kann man die Ergebnisse erstens mit FACS-Daten und zweitens mit Ergebnissen aus der Elektronenmikroskopie vergleichen. Vergleiche mit FACS-Daten von der Arbeitsgruppe von Dr. Victor Sourjik zeigten eine Detektionseffizienz von maximal ca. 5%. Setzt man die ermittelten mittleren Anzahlen an Molekülen pro Cluster ins Verhältnis zur aufgrund von EM-Daten angenommenen Anzahl von Proteinen pro Motorkomplex (26 für den MS-Ring und 35 für den C-Ring), so kommt man auf eine Detektionseffizienz von ca. 13%. Bei SPDM-Messungen an Tabakmosaikviren, welche mit dem Fluorophor Atto 488 Succinimidylester (NHS) (Sigma-Aldrich, München) markiert waren, wurde ebenfalls eine Detektionseffizienz von ca. 13% ermittelt [Gun11].



**Abbildung 7.0.3.:** EM-Aufnahmen von (a) MS-Ring und (b) C-Ring des Motorproteinkomplexes in *E. coli*. Schematische Diagramme von (c) MS-Ring und (d) C-Ring mit Abschätzungen der Dimensionen [KSO<sup>+</sup>96].

Um die Einflüsse von Lokalisationsgenauigkeit und Detektionseffizienz auf das Messergebnis zu untersuchen, wurden SPDM-Messungen an Kreisen simuliert. Die Größe der Kreise sowie die Anzahl an Proteinen wurde an die aus EM-Messungen bekannten Größen der Ringstrukturen der Motorproteine angepasst. Dabei konnte die Lokalisationsgenauigkeit und die Detektionseffizienz variiert werden. Es zeigte sich, dass die beiden Kreise bei einer simulierten Detektionseffizienz von 20% sowohl mit 20nm als auch mit 30nm Ungenauigkeit in der Lokalisation der Moleküle im Mittelwert von 1000 gemessenen Kreisen voneinander unterschieden werden können. Bei einem an die Messungen angepassten Wert von 30nm Ungenauigkeit in der Positionsbestimmung können die Kreise bis zu einer Detektionseffizienz von minimal 15% voneinander unterschieden werden. Bei 10% Detektionseffizienz wird der kleine Kreis nicht mehr vom Cluster-Algorithmus erkannt, da in diesem Fall nur noch zwei Moleküle vom



---

kleinen Kreis detektiert werden. Vergleiche mit FACS-Daten der Motorproteine zeigten jedoch, dass die Detektionseffizienz bei den SPDM-Messungen unter zehn Prozent lag. Damit bestätigen die Simulationen, dass der Größenunterschied zwischen den beiden Ringstrukturen des Motorproteinkomplexes mit den bei den Messungen herrschenden Werten der Lokalisationsgenauigkeit und der Detektionseffizienz nicht aufzulösen ist. Sie zeigen allerdings auch, dass es bei einer besseren Lokalisationsgenauigkeit und Detektionseffizienz prinzipiell mit Lokalisationsmikroskopie möglich ist, die beiden Strukturen voneinander zu unterscheiden.

Bei den Membrananalysen an *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten mit SPDM zeigte sich, dass der innere Membrankomplex nicht eindeutig von der äußeren Membran getrennt abgebildet werden konnte. Dies könnte neben der für diese Fragestellung nicht ausreichend guten Lokalisationsgenauigkeit auch an der Krümmung der Membran liegen. Da die Lokalisationsmikroskopie ein Verfahren mit Weitfeldanregung und -detektion ist, ist die axiale Auflösung auf ca. 600nm beschränkt, was zu einer Projektion der Moleküle aus diesem Bereich führt. Geht man von einer sphärischen Krümmung der Membran mit einem Radius von  $2\mu\text{m}$  aus, was der mittleren Breite des Parasiten entspricht, führt dies durch die Projektion in Richtung der optischen Achse zu einer Verbreiterung der Verteilung der gemessenen lateralen Positionen von bis zu  $\sim 88\text{nm}$ . Mithilfe von Bildsegmentierung und Kantenfilterung konnte eine Abschätzung der Distanz zwischen den beiden Membranstrukturen erzielt werden. Es wurde eine mittlere Distanz zwischen den beiden Membrankanten von ca. 60nm gemessen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Sporozoiten haben ergeben, dass der Abstand zwischen dem inneren Membrankomplex und der äußeren Membran bei  $30 \pm 6\text{nm}$  liegt [KLB<sup>+</sup>10]. Bezieht man die Abstände der Fluorophore zum markierten Protein mit ein, so kommt man somit auf einen Abstand zwischen den Fluorophoren von  $\sim 30\text{-}70\text{nm}$  (Abb. 3.5.1). Damit ist der mit der Lokalisationsmikroskopie ermittelte Wert konsistent mit dem Ergebnis aus der Elektronenmikroskopie.

Für weiterführende Messungen wäre es sinnvoll, die Lokalisationsmikroskopie mit SMI-Mikroskopie zu verbinden, um eine erhöhte axiale Auflösung zu erhalten. Damit wäre der durch die Projektion in Richtung der optischen Achse entstehende systematische Fehler bei der Messung der lateralen Position der Moleküle auszuschließen.

In embryonalen Stammzellen wurde die Verteilung der heterochromatin-assoziierten H3K9me3 Histonmodifikation untersucht. Es wurden vergleichende Distanz- und Dichteanalysen zwischen einer Wildtyp- und einer *knockout*(KO)-Zelllinie des *Polycomb*-Gens EED durchgeführt. Die Zellen der KO-Zelllinie besitzen keinen stabilen *Polycomb repressive complex 2* (PRC2). Es wird vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen PRC2 und der Methylierung von H3K9 gibt. Es sollte untersucht werden, ob sich dieser Zusammenhang in einer unterschiedlichen Distanzverteilung von H3K9me3 Modifikationen bei Wildtyp- und KO-Zelllinie zeigt. Die Distanzanalysen wurden für Bereiche innerhalb des Kerns mit unterschiedlicher Ereignisdichte getrennt vorgenommen. Die Mediane der Distanzen zu den benachbarten Molekülen lagen im Vergleich von Wildtyp- und KO-Zelllinie in allen Bereichen nur um wenige Nanometer auseinander. Beim Vergleich der Ereignisdichten war der Unterschied zwischen Wildtyp- und KO-Zelllinie innerhalb der Cluster mit ca. sieben Ereignissen pro Quadratmikrometer am größten. Die erwarteten Unterschiede in den Distanzverteilungen zwischen Wildtyp- und KO-Zelllinie konnten anhand der SPDM-Messungen somit nicht bestätigt werden. Dies kann entweder bedeuten, dass der PRC2 keinen Einfluss auf die Methylierung von H3K9 hat, oder dass sich der Einfluss nicht in einer unterschiedlichen Distanzverteilung niederschlägt.



## 8. Ausblick

Bei allen mittels Lokalisationsmikroskopie erhaltenen Ergebnissen zeigt sich das Potential, welches in dieser Methode steckt. Es können zelluläre Nanostrukturen mit einer zweidimensionalen Auflösung bis in den Bereich von etwa 10nm untersucht werden. Dabei werden Moleküldichten von bis zu 300 000 Molekülen pro Zelle bzw. von ca. 50 detektierten Molekülen pro beugungsbegrenzter Fläche erreicht [GER<sup>+</sup>09]. Mithilfe der erhaltenen Positionsdaten der Einzelmoleküle lassen sich eine Vielzahl bislang ungeklärter Fragestellungen in den Lebenswissenschaften quantitativ analysieren. Je besser die laterale Position von Einzelmolekülen bestimmt werden kann, um so größer ist jedoch auch der prozentuale Fehler, der durch die axiale Projektion der dreidimensionalen Struktur bei Distanzmessungen gemacht wird. Das zukünftige Ziel wird es demnach sein, durch die Verbindung mit anderen hochauflösenden Mikroskopiemethoden eine dreidimensionale Strukturauflösung unterhalb der Beugungsgrenze zu ermöglichen. Es konnte bereits erfolgreich gezeigt werden, dass eine Verbindung mit SMI-Mikroskopie möglich ist [Lem09]. Da man bei SMI auf optische Isolation der Objekte angewiesen ist, werden sich auch Kombinationen mit anderen Formen der strukturierten Beleuchtung wie zum Beispiel der Dreistrahlinterferenz durchsetzen.

Ein weiterer Aspekt der zukünftigen Forschung im Bereich der optischen Nanoskopie wird die Erhöhung der Aufnahmegeschwindigkeit sein. Dies ist insbesondere deshalb erforderlich, da in der biologischen Wissenschaftsgesellschaft ein breites Interesse an der Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Organismen besteht. Eine Möglichkeit den Aufnahmeprozess zu beschleunigen, ist der Einsatz schnellerer Kameras. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Genauigkeit, mit der die Position der Fluorophore bestimmt werden kann, proportional zur Wurzel der von dem Fluorophor emittierten und von der Kamera detektierten Photonen ist. Inwieweit die Geschwindigkeit des Aufnahmeprozesses ohne Verlust an Lokalisationsgenauigkeit der Einzelmoleküle verbessert werden kann, hängt somit auch maßgeblich von der Fluoreszenzeigenschaft der Fluorophore ab. Forschungsbedarf besteht somit auch bei der Entwicklung neuer Fluoreszenzmarker mit verbesserten Fluoreszenzeigenschaften wie einer erhöhten Photonenemissionsrate. Man wird auch die bisher nur rudimentären Kenntnisse über die Einflüsse von der lokalen chemischen Umgebung auf das Fluoreszenzverhalten, insbesondere die Lebensdauer des reversiblen Bleichzustandes, vertiefen müssen. Ein weiteres Ziel bei der Untersuchung der zeitlichen Fluoreszenzcharakteristik von Fluorophoren kann es sein, unterschiedliche Fluorophore anstatt an ihrem chromatischen Spektrum anhand der Charakteristik ihrer zeitlichen Fluoreszenzemission voneinander zu unterscheiden.





# A. Anhang

## A.1. Protokoll der Präparation von *Escherichia coli*

### A.1.1. Ansetzen der Bakterienkultur

Zunächst wird die Übernachtskultur (ON-Kultur) angesetzt. Dazu werden 5ml TB-Medium und 5µl des benötigten Antibiotikums<sup>1</sup> mit einer an der Bunsenbrennerflamme desinfizierten Glaspipette in ein großes Reagenzglas gegeben. Danach wird eine Platte mit dem gewünschten Bakterienstamm aus dem –80°C Kühlschrank geholt und ein kleiner Teil mit einem an der Bunsenbrennerflamme gereinigten Streichholz ins Reagenzglas gekratzt. Abschließend werden die Bakterien durch kurzes Schwenken des Reagenzglases über der Flamme gelöst und über Nacht bei 30°C im laufenden Schüttelinkubator geschwenkt<sup>2</sup>. Nach ca. 12 Stunden werden mit einer über der Bunsenbrennerflamme desinfizierten Glaspipette in einen Erlenmeyerkolben nacheinander

- 100µl ON-Kultur,
- 10µl Pufferlösung: 10mM Kaliumphosphat [pH 7,0], 0, 1M Natriumchlorid, 100µM Ethylendiamintetraessigsäure, 10µM I-Methionin und 20mM Natrium I-Laktat,
- 10µl Ampicillin
- die gewünschte Menge in Wasser gelöstem Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid<sup>3</sup> (IPTG)

eingefüllt. Der Erlenmeyerkolben wird anschließend für etwa dreieinhalb Stunden bei 30°C und 275 Umdrehungen pro Minute im Schüttelinkubator geschwenkt. Sobald die Bakterienlösung die benötigte optische Dichte erreicht hat<sup>4</sup>, wird der Inhalt des Kolbens in ein Reagenzglas umgefüllt und sieben Minuten lang bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert<sup>5</sup>. Der Überstand wird anschließend abgossen und das Sediment in 10ml Puffer gelöst. Diese Lösung kann nun zur Objektpräparation, wie in den folgenden Abschnitten erklärt wird, unterschiedlich weiterverwendet werden. Ein weiterer Protokoll der *E. coli*-Präparation findet sich in der Doktorarbeit von P. Lemmer [Lem09].

### A.1.2. Objektpräparation auf Agarose

Vor dem Aufbringen der Bakterienlösung, die nach dem Protokoll des vorherigen Abschnitts hergestellt wurde, wird eine etwa 0,3mm dünne Agaroseplatte aus in der Mikrowelle verflüssigter Agarose gegossen

<sup>1</sup>Dadurch werden alle Bakterien, die das gewünschte Plasmid und somit die benötigte Resistenz nicht tragen, abgetötet.

<sup>2</sup>Auf diese Weise gewöhnen sich die Bakterien an das Medium.

<sup>3</sup>IPTG dient als künstlicher Induktor für das Lactose-Operon. Da auch ohne Induktor in den meisten Fällen eine niedrige Expression erfolgt, kann abhängig von der Fragestellung dieses Nullniveau für Einzelmolekülexperimente bereits ausreichend hoch sein.

<sup>4</sup>In den durchgeführten Experimenten betrug die optische Dichte bei 600nm  $OD_{600} = 0,45$ .

<sup>5</sup>Dabei ist unbedingt auf eine richtige Austarierung zu achten.

und mit einem Skalpell in kleine Rechtecke (etwa  $1\text{cm}^2$  groß) geschnitten. Diese Rechtecke werden auf einen mit Ethanol gereinigten Objektträger gelegt<sup>6</sup>. Im weiteren Verlauf werden  $5\mu\text{l}$  Lösung auf jedes Agaroserechteck pipettiert und es wird gewartet bis kein Flüssigkeitsfilm zu erkennen ist. Danach werden mit Ethanol gereinigte Deckgläser zunächst auf vier in den Ecken angeordneten Schmalzstützen auf die Agaroserechtecke gelegt. Abschließend werden die Deckgläser mit Hilfe von Zweikomponentenkleber an zwei gegenüberliegenden Kanten mit dem Objektträger verbunden<sup>7</sup>.

### A.1.3. Objektpräparation mit Poly-L-Lysin

$100\mu\text{l}$  Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich) auf ein mit Ethanol gereinigtes Deckglas pipettieren. Nach einer Trockenzeit von 5 Minuten Poly-L-Lysin abziehen, mindestens eine Stunde antrocknen lassen (bei zu geringer Bakteriendichte besser übernacht). Waschschrift mit doppelt destilliertem Wasser durchführen (ein Waschschrift bedeutet:  $3\times$  mit neuer Pipettenspitze  $100\mu\text{l}$  je  $10\times$  auf- und abpipettieren). Die Bakterienlösung kurz aufschütteln, um Ablagerungen wieder in Lösung zu bringen.  $100\mu\text{l}$  der Bakterienlösung auf die Poly-L-Lysin-Schicht geben und nach 5 Minuten Wartezeit wieder abziehen. Einen weiteren Waschschrift mit doppelt destilliertem Wasser durchführen. Einen kleinen Tropfen (ca.  $7\mu\text{l}$ ) des Einbettmediums (bei den *E. coli*-Präparaten wurde meist Fluoromount (Sigma-Aldrich) verwendet) auf den Objektträger geben und das Deckglas, um Blasenbildung zu vermeiden, vorsichtig darauf absenken. Das Deckglas bei langfristige zu verwendenden Proben mit Nagellack versiegeln, um ein Austrocknen zu verhindern.

### A.1.4. Fixierung mit Paraformaldehyd

#### Fixierung der Zellen auf dem Objektträger

Bei der Objektpräparation mit Poly-L-Lysin können die Zellen vor dem Eindecken alternativ noch mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden. Hierfür wird nach dem zweiten Waschschrift ca.  $500\mu\text{l}$  von 4% PFA auf das Deckglas gegeben. Nach einer Wartezeit von 10 Minuten wird es wieder abgezogen und ein Waschschrift mit PBS (engl.: phosphate buffered saline;  $130\text{mM}$  NaCl,  $10\text{mM}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) durchgeführt. Anschließend wird das Präparat wie im vorherigen Abschnitt beschrieben eingedeckt.

#### Fixierung der Zellen im Aliquot

$2\text{ml}$  der Bakterienlösung wird in einem Zentrifugenröhrchen mikrozentrifugiert (10Min. bei 4000 Umdrehungen/Minute). Der Überstand wird verworfen und die Zellen in  $750\mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Die Zellen werden durch Hinzufügen von  $250\mu\text{l}$  4% PFA fixiert (1% finale Konzentration). Die Lösung wird bei  $4^\circ\text{C}$  für 1 (bei Zellen mit dicker Zellwand) bis 24 Stunden (bei zerbrechlichen Zellen) inkubiert. Anschließend die Bakterienlösung erneut zentrifugieren (10Min. bei 4000 Umdrehungen/Minute), Überstand werfen und Bakterien in  $500\mu\text{l}$  PBS resuspendieren. Das Zentrifugieren und Resuspendieren in PBS einmal wiederholen und  $500\mu\text{l}$  absolutes Ethanol zugeben. In diesem Zustand können die Zellen für einige Monate bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden.

---

<sup>6</sup>Die Agarose stellt die feuchtigkeitsspendende und fixierende Unterlage für die Bakterien dar.

<sup>7</sup>Die Schmalzstützen ermöglichen es zwar die Bakterien mit Sauerstoff zu versorgen, führen wegen Instabilität jedoch zu einem Drift aus der Fokusebene heraus.

## A.2. Leica TCS 4Pi- Spezifikationen

Mikroskop Stand:

- Leica DM RXE

Laser und Schaltmodule:

- Ar 100 mW 457 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm
- DPSS 561 nm
- HeNe 2,5 mW 594 nm
- HeNe 10 mW 633 nm
- Ti: Sapphire 1.2 ps, 1 W, MaiTai 720–920 nm
- AOTF 4 oder 8 Kanäle im sichtbaren Bereich
- EOM, IR Bereich



# Literaturverzeichnis

- [Abb73] E. Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archive für Mikroskopische Anatomie*, 9:413–420, 1873.
- [AFHC01] B. Albrecht, A. V. Failla, R. Heintzmann, and C. Cremer. Spatially modulated illumination microscopy: online visualization of intensity distribution and prediction of nanometer precision of axial distance measurements by computer simulations. *Journal of Biomedical Optics*, 6:292, 2001.
- [Alb02] B. Albrecht. *Hochpräzisions-fluoreszenzmessungen mit räumlich modulierter Anregung*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Kirchhoff-Institut für Physik, 2002.
- [Amb08] R. Amberger. *Hochauflösende multispektrale Fluoreszenzmikroskopie mit lateralen stehenden Wellen*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Kirchhoff-Institut für Physik, 2008.
- [ANea09] C. Agop-Nersesian et al. Rab11a-controlled assembly of the inner membrane complex is required for completion of apicomplexan cytokinesis. *PLoS Pathogens*, 5(1):e1000270, 2009.
- [Bad07] D. Baddeley. *Precision Measurements with SMI and 4Pi Microscopy*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Kirchhoff-Institut für Physik, 2007.
- [BBB79] G. J. Brakenhoff, P. Blom, and P. Barends. Confocal scanning light microscopy with aperture immersion lenses. *Journal of Microscopy*, 117:219–232, 1979.
- [BCC06] D. Baddeley, C. Carl, and C. Cremer. 4pi microscopy deconvolution with a variable point-spread function. *Applied Optics*, 45/27:7056–64, 2006.
- [BCS10] D. Baddeley, M. B. Cannell, and C. Soeller. Visualization of localization microscopy data. *Microsc Microanal*, 16(1):64–72, 2010.
- [BDK<sup>+</sup>10] M. Bohn, P. Diesinger, R. Kaufmann, Y. Weiland, P. Müller, M. Gunkel, A. von Ketteler, P. Lemmer, M. Hausmann, D. W. Heermann, and C. Cremer. Localization microscopy reveals expression-dependent parameters of chromatin nanostructure. *Biophys J*, 99(5):1358–67, 2010.
- [Bea08] J. Baum et al. Host-cell invasion by malaria parasites: insights from plasmodium and toxoplasma. *Trends in parasitology*, 24(12):557–563, 2008.
- [BEH06] J. Bewersdorf, A. Egner, and S. Hell. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer Verl., 2006.
- [BFA95] P. S. Birchall, R. M. Fishpool, and D. G. Albertson. Expression patterns of predicted genes from the *C. elegans* genome sequence visualized by FISH in whole organisms. *Nature Genetics*, 11:314–320, 1995.

- [BFTL93] B. Bailey, D. L. Farkas, D. L. Taylor, and F. Lanni. Enhancement of axial resolution in fluorescence microscopy by standing-wave excitation. *Nature* 366, 6450:44–48, 1993.
- [BOT<sup>+</sup>09] A. Briegel, D. R. Ortega, E. I. Tocheva, K. Wuichet, Z. Li, S. Chen, A. Müller, C. V. Iancu, G. E. Murphy, M. J. Dobro, I. B. Zhulin, and G. J. Jensen. Universal architecture of bacterial chemoreceptor arrays. *PNAS*, 106:17181–86, 2009.
- [BPS<sup>+</sup>06] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–5, 2006.
- [BSEC] H. Bornfleth, K. Sätzler, C. Eils, and C. Cremer. High-precision distance measurements and volume-conserving segmentation of objects near and below the resolution limit in three-dimensional confocal fluorescence microscopy. *Journal of Mic.*, 189:118–136.
- [BVS<sup>+</sup>85] G. J. Brakenhoff, H. T. M. van d. Voort, E. A. van Spronsen, W. A. M Linnemans, and Nanninga. Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. *Nature*, 317:748–749, 1985.
- [Car85] P. ; Lenz R. ; Liljeborg A. ; Majlof L. ; Aslund N. Carlsson, K. ; Danielsson. Threedimensional microscopy using a confocal laser scanning microscope. *Opt. Lett.*, 10:53–55, 1985.
- [CC78] C. Cremer and T. Cremer. Considerations on a laser-scanning-microscope with high resolution and depth of field. *Microsc. Acta*, 81:31–44, 1978.
- [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, 2005.
- [CHBR] C. Christoph, M. 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.
- [CSW82] I. J. Cox, C. J. R. Sheppard, and Wilson. Super-resolution by confocal fluorescent microscopy. *Optik*, 60:391–396, 1982.
- [CSW07] C. Czeslik, H. Seemann, and R. Winter. Basiswissen physikalische chemie. 2007.
- [CTE<sup>+</sup>94] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263:802–5, 1994.
- [CVF96] B. P. Cormack, R. H. Valdivia, and S. Falkow. Facs-optimized mutants of the green fluorescent protein (gfp). *Gene*, 173:33–8, 1996.
- [CvKL<sup>+</sup>10] C. Cremer, A. von Kottler, P. Lemmer, R. Kaufmann, Y. Weiland, P. Mueller, M. Hausmann, M. Gunkel, T. Ruckelshausen, D. Baddeley, and R. 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] R. 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, 1997.
- [DSW90] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb. 2-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248:73–76, 1990.
- [EC00] P. Edelmann and C. Cremer. Improvement of confocal spectral precision distance microscopy (spdm). *Proc SPIE*, 3921:313–320, 2000.
- [EEK<sup>+</sup>00] A. Esa, P. Edelmann, G. Kreth, L. Trakhtenbrot, N. Amariglio, G. Rechavi, M. Hausmann, and C. Cremer. Three-dimensional spectral precision distance microscopy of chromatin nanostructures after triple-colour dna labelling: a study of the bcr region on chromosome 22 and the philadelphia chromosome. *J Microsc*, 199(Pt 2):96–105, 2000.
- [FBB<sup>+</sup>08] J. Fölling, M. L. Bossi, H. Bock, R. Medda, C. A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling, and S. W. Hell. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat. Methods*, 5(11):943–5, 2008.
- [FGJ96] Yang F., Moss L. G., and Phillips G. N. Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, 14(10):1246–51, 1996.
- [FM10] D. A. Fletcher and R. D. Mullins. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(28):485–492, 2010.
- [FSA<sup>+</sup>02] A.V. Failla, U. Spoeri, B. Albrecht, A. Kroll, and C. Cremer. Nanosizing of fluorescent objects by spatially modulated illumination microscopy. *Applied Optics*, 41:7275–7283, 2002.
- [FSTD94] N. R. Francis, G. E. Sosinsky, D. Thomas, and D. J. DeRosier. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.*, 235:1261–1270, 1994.
- [GER<sup>+</sup>09] M. Gunkel, F. Erdel, K. Rippe, P. Lemmer, R. Kaufmann, C. Hörmann, R. Amberger, and C. Cremer. Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. *Biotechnol J*, 4(6):927–38, 2009.
- [GGRD92] J. A. Gegner, D. F. Graham, A. F. Roth, and F. W. Dahlquist. Assembly of an mcp receptor, chew, and kinase chea complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Cell*, 70:975–982, 1992.
- [Gra11] A.-L. Grab. In situ nachweis von proteinadsorptionsprozessen mittels kombinierter schwingquarzmikrowägung und plasmonenresonanz in nanopartikelfilmen sowie detektion einzelner alexa-moleküle mit spdm, 2011.
- [Gu00] M. Gu. *Advanced Optical Imaging Theory*. Springer, 2000.
- [Gun11] M. Gunkel. *Lokalisationsmikroskopie mit mehreren Farben und ihre Anwendung in biologischen Präparaten*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Kirchhoff-Institut für Physik, 2011.
- [Gus99] M. G. L. Gustafsson. Extended resolution fluorescence microscopy. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(5):627–34, 1999.

- [Gus00] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.*, 198(2):82–7, 2000.
- [Gus05] M. G. L. Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(37):13081–6, 2005.
- [HC99] R. Heintzmann and C. Cremer. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. , jan . *Proc. SPIE*, 1999.
- [HCT95] R. Heim, A. B. Cubitt, and R. Y. Tsien. Improved green fluorescence. *Nature*, 373-4:663, 1995.
- [HFD<sup>+</sup>08] J. Hendrix, C. Flors, P. Dedecker, J. Hofkens, and Y. Engelborghs. Dark states in monomeric red fluorescent proteins studied by fluorescence correlation and single molecule spectroscopy. *Biophys J*, 94(10):4103–13, 2008.
- [HGM06] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J*, 91(11):4258–72, 2006.
- [HJC02] R. Heintzmann, T. M. Jovin, and C. Cremer. Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement. *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.*, 19(8):1599–609, 2002.
- [HL94] T. E. Holy and S. Leibler. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91:5682–5685, 1994.
- [HLCS94] S. Hell, S. Lindek, C. Cremer, and E. H. K. Stelzer. Measurement of 4pi-confocal point spread function proves 75nm axial resolution. *Appl. Phys. Lett.*, 64/11:1335–1337, 1994.
- [HPT94] R. Heim, D. C. Prasher, and R. Y. Tsien. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91(26):12501–4, 1994.
- [HRS<sup>+</sup>05] G. Hildenbrand, A. Rapp, U. Spöri, C. Wagner, C. Cremer, and M. Hausmann. Nano-sizing of specific gene domains in intact human cell nuclei by spatially modulated illumination light microscopy. *Biophysical Journal*, 88(6):4312–4318, 2005.
- [HS92a] S. Hell and E. H. K. Stelzer. Fundamental improvement of resolution with a 4pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Opt. Commun.*, 93:277–282, 1992.
- [HS92b] S. Hell and E. H. K. Stelzer. Properties of a 4pi confocal fluorescence microscope. *Journal of the Optical Society of America A*, 9:2159–2166, 1992.
- [HSHS95] S. W. Hell, M. Schrader, P. E. Haˆnninen, and E. Soini. Resolving fluorescence beads at 100–200 distance with a twophoton 4pi-microscope working in the near infrared. *Opt. Commun.*, 117:20–24, 1995.
- [HSLC94] S. W. Hell, E. H. K. Stelzer, S. Lindek, and C. Cremer. Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-b 4pi confocal microscopy. *Optics Letters*, 19:222–224, 1994.
- [HSP<sup>+</sup>05] C. Höppner, J. P. Siebrasse, R. Peters, U. Kubitschek, and A. Naber. High-resolution near-field optical imaging of single nuclear pore complexes under physiological conditions. *Biophysical Journal*, 88:3681–3688, 2005.



- [HT96] R. Heim and R. Y. Tsien. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.*, 6(2):178–82, 1996.
- [HvdLS<sup>+</sup>08] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, T. Tinnefeld, and S. Sauer. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 47(33):6172–6, 2008.
- [HvVR<sup>+</sup>02] C. L. L. Hendriks, L. J. van Vliet, B. Rieger, M. van Ginkel, and R. Ligteringen. *DIPimage User Manual*. PhD thesis, Pattern Recognition Group, Faculty of Applied Physics, Delft University of Technology, 2002.
- [JBHS95] A. W. Jones, J. Bland-Hawthorn, and P. L. Shopbell. Towards a general definition for spectroscopic resolution. *Astronomical Data Analysis Software and Systems IV*, 77:77, 1995.
- [Jäh05] B. Jähne. *Digitale Bildverarbeitung*. Springer, 2005.
- [KC02] T. A. Kost and J. P. Condreay. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol.*, 20(4):173–80, 2002.
- [KCJ05] T. A. Kost, P. J. Condreay, and D. L. Jarvis. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotech*, 23:567–575, 2005.
- [KGH<sup>+</sup>05] U. Kubitschek, D. Grunwald, A. Hoekstra, D. Rohleder, T. Kues, J. P. Siebrasse, and R. Peters. Nuclear transport of single molecules: dwell times at the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.*, 168/2:233–43, 2005.
- [KLB<sup>+</sup>10] M. Kudryashev, S. Lepper, W. Baumeister, M. Cyrklaff, and F. Frischknecht. Geometric constraints for detecting short actin filaments by cryogenic electron tomography. *PMC Biophys*, 3(6):1–14, 2010.
- [KLG<sup>+</sup>09a] R. Kaufmann, P. Lemmer, M. Gunkel, Y. Weiland, P. Müller, M. Hausmann, D. Baddeley, R. Amberger, and C. Cremer. SPDM – Single Molecule Superresolution of Cellular Nanostructures. *Proc. of SPIE*, 7185:1–19, 2009.
- [KLG<sup>+</sup>09b] R. Kaufmann, P. Lemmer, M. Gunkel, Y. Weiland, P. Müller, M. Hausmann, D. Baddeley, R. Amberger, and C. Cremer. Spdm: single molecule superresolution of cellular nanostructures. *Proc SPIE*, 2009.
- [KLvB<sup>+</sup>05] M. Kollmann, L. Løvdok, K. Bartholome, J. Timmer, and V. Sourjik. Design principles of a bacterial signalling network. *Nature*, 438:504–507, 2005.
- [KMH<sup>+</sup>11] R. Kaufmann, P. Müller, G. Hildenbrand, M. Hausmann, and C. Cremer. Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy. *Journal of Microscopy*, 242(1):46–54, 2011.
- [KSO<sup>+</sup>96] E. Katayama, T. Shiraishi, K. Oosawa, N. Baba, and S.-I. Aizawa. Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of salmonella typhimurium as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deep-etch replica images. *J. Mol. Biol.*, 255:458–475, 1996.
- [Lem09] P. Lemmer. *Lichtmikroskopische Untersuchungen konventionell markierter Präparate*

- weit unterhalb der Beugungsgrenze. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Kirchhoff-Institut für Physik, 2009.
- [LGW<sup>+</sup>09] P. Lemmer, M. Gunkel, Y. Weiland, P. Müller, D. Baddeley, R. Kaufmann, A. Urich, H. Eipel, R. Amberger, M. Hausmann, and C. Cremer. Using conventional fluorescent markers for far-field fluorescence localization nanoscopy allows resolution in the 10-nm range. *J. Microsc.*, 235(2):163–71, 2009.
- [Li10] Y. Li. Membrane reconstruction by spectral precision distance microscopy (spdm), 2010.
- [LKK00] R. Lux, N. Kar, and S. Khan. Overproduced salmonella typhimurium flagellar motor switch complexes. *J. Mol. Biol.*, 298:577–583, 2000.
- [LMEH07] M. Lang, T. Müller, J. Engelhart, and S. W. Hell. 4pi microscopy of type a with 1-photon excitation in biological fluorescence imaging. *Optics express*, 15/5:2459–67, 2007.
- [LSP03] J. Lippincott-Schwartz and G. H. Patterson. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 300:(5616):87, 2003.
- [LTW86] F. Lanni, D. L. Taylor, and A. S. Waggoner. Standing wave luminescence microscopy, 1986. US Patent 4,621,911.
- [LvKS07] L. Løvdok, M. Kollmann, and V. Sourjik. Co-expression of signaling proteins improves robustness of the bacterial chemotaxis pathway. *Journal of Biotechnology*, 129(2):173–180, 2007.
- [Mae07] K. Maecken. Vergleichende mikroskopiemethoden an fluoreszierenden kernporenkomplexen, 2007.
- [MBW<sup>+</sup>06] H. Mathé, D. Baddeley, C. Wotzlaw, J. Fandrey, C. Cremer, and U. Birk. Nanostructure of specific chromatin regions and nuclear complexes. *Histochemistry and Cell Biology*, 125(1):75–82, 2006.
- [MD77] G. G. Maul and L. Deaven. Quantitative determination of nuclear pore complexes in cycling cells with differing dna content. *J. Cell Biol.*, 73:748–760, 1977.
- [MFS<sup>+</sup>04] S. Martin, A. V. Failla, U. Spöri, C. Cremer, and A. Pombo. Measuring the Size of Biological Nanostructures with Spatially Modulated Illumination Microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, 15:2449, 2004.
- [Mic05] Leica Microsystems. Leica tcs 4pi: Discover the fluorescence nanoworld. *Confocal Application Letter*, 5:1–12, 2005.
- [Min] M. Minsky. Microscopy apparatus, u.s. patent nr. 3013467.
- [MS93] J. R. Maddock and L. Shapiro. Polar location of the chemoreceptor complex in the *Escherichia coli* cell. *Science*, 259:1717–23, 1993.
- [MZD<sup>+</sup>05] T. B. McAnaney, W. Zeng, C. F. E. Doe, N. Bhanji, S. Wakelin, Pearson. D. S., P. Abbyad, X. Shi, S. G. Boxer, and C. R. Bagshaw. Protonation, photobleaching, and photoactivation of yellow fluorescent protein (yfp 10c): a unifying mechanism. *Biochemistry*, 44(14):5510–24, 2005.
- [NH01] M. Nagorni and S. W. Hell. Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. i. comparative study of concepts. *J. Opt. Soc. Am. A*, 18(1), 2001.

- [NLH08] P. Naumanen, P. Lappalainen, and P. Hotulainen. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J. Microsc.*, 231:446–454, 2008.
- [OCK<sup>+</sup>96] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, and S. J. Remington. Crystal structure of the aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, 273:1392–1395, 1996.
- [Oea96] M. Ormö et al. Crystal structure of the aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, 273:1392–5, 1996.
- [ORW04] R. J. Ober, S. Ram, and E. S. Ward. Localization accuracy in single-molecule microscopy. *Biophys J*, 86(2):1185–200, 2004.
- [Paw95] J.E. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Kluwer Academic Publishers, 1995.
- [PEW<sup>+</sup>92] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, and M. J. Cormier. Primary structure of the aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2):229–33, 1992.
- [PGB<sup>+</sup>08] Lemmer P., M. Gunkel, D. Baddeley, R. Kaufmann, A. Urich, Y. Weiland, J. Reymann, Müller, M. P., Hausmann, and C. Cremer. Spdm: light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 93(1):1–12, 2008.
- [Ray96] L. Rayleigh. On the theory of optical images, with special reference to the microscope. *Philosophical Magazine*, 42:167–195, 1896.
- [RBDG<sup>+</sup>96] R. Rizzuto, M. Brini, F. De Giorgi, R. Rossi, R. Heim, R. Y. Tsien, and T. Pozzan. Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted gfp mutants in vivo. *Curr. Biol.*, 6(2):183–8, 1996.
- [RBZ06] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nat Methods*, 3(10):793–5, 2006.
- [RDB99] M. W. Rochlin, M. E. Dailey, and P. C. Bridgman. Polymerizing microtubules activate sitedirected f-actin assembly in nerve growth cones. *Mol. Biol. Cell*, 10:2309–2327, 1999.
- [Rey07] J. Reymann. *Entwicklung eines SMI Mikroskops zur Präzisions-Strukturanalyse in vitalen biologischen Systemen*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Kirchhoff-Institut für Physik, 2007.
- [SB00a] V. Sourjik and H. C. Berg. Localization of components of the chemotaxis machinery of escherichia coli using fluorescent protein fusions. *Mol Microbiol*, 37/4:740–51, 2000.
- [SB00b] V. Sourjik and H. C. Berg. Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99/1:123–7, 2000.
- [SB04] V. Sourjik and H. C. Berg. Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis. *Nature* 25, 428/6981:437–41, 2004.
- [SBW96] M. R. Speicher, S. G. Ballard, and D. C. Ward. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor fish. *Nature Genetics*, 12(4):368–375, 1996.
- [SC77] C. J. R. Sheppard and A. Choudhury. *Optica Acta*, 24:1051, 1977.
- [Sch99] U. Schneider. *Spatially modulated illumination microscopy*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Kirchhoff-Institut für Physik, 1999.

- [SCH<sup>+</sup>08] L. Schermelleh, P. M. Carlton, S. Haase, L. Shao, L. Winoto, P. Kner, B. Burke, M. C. Cardoso, D. A. Agard, M. G. L. Gustafsson, H. Leonhardt, and J. W. Sedat. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3d structured illumination microscopy. *Science*, 320:1332–6, 2008.
- [SFA99] D. Stoffler, B. Fahrenkrog, and U. Aebi. The nuclear pore complex: from architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:391–401, 1999.
- [SHvdV98] M. Schrader, S. W. Hell, and H. T. M. van der Voort. Three-dimensional superresolution with a 4pi-confocal microscope using image restoration. *Journal Of Applied Physics*, 84/8:4033–4042, 1998.
- [SKBH98] M. Schrader, G. Giese K. Bahlmann, and S. W. Hell. 4piconfocal imaging in fixed biological specimens. *Biophys. J.*, 75:1659–1668, 1998.
- [SLM<sup>+</sup>07] T. Staudt, M. Lang, R. Medda, J. Engelhardt, and S. Hell. 2,20-Thiodiethanol: A New Water Soluble Mounting Medium for High Resolution Optical Microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 70:1–9, 2007.
- [Spö04] U. Spöri. *Messungen mit dem SMI-Mikroskop*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Kirchhoff-Institut für Physik, 2004.
- [Spa16] C. M. Sparrow. On spectroscopic resolving power. *The Astrophysical Journal*, 44:76, 1916.
- [SPG00] A. San Paulo and R. Garcia. High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes. *Biophysical Journal*, 78(3):1599–1605, 2000.
- [SRT<sup>+</sup>08] S. Schulmeister, M. Ruttorf, S. Thiem, D. Kentner, D. Lebiecz, and V. Sourjik. Protein exchange dynamics at chemoreceptor clusters in escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17):6403, 2008.
- [Ste06] E. Steinwand. 4pi mikroskopie - anwendung und analyse bildverarbeitender methoden, 2006.
- [SVHS05] D. Sinnecker, P. Voigt, N. Hellwig, and M. Schaefer. Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins. *Biochemistry*, 44(18):7085–94, 2005.
- [SW78] C. J. R. Sheppard and T. Wilson. *Opt. Lett.*, 3:115, 1978.
- [SW07] V. Sourjik and N. S. Wingreen. Turning to the cold. *Nature Cell Biology*, 9(9):1029–31, 2007.
- [TLW02] R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J*, 82(5):2775–83, 2002.
- [TM01] D. Toomre and D. J. Mannstein. Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. *Trends Cell Biol.*, 11(7):298–303, 2001.
- [Tsi98] R. Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:509, 1998.
- [Uri08] A. Urich. Fluoreszenzmikroskopie mit strukturierter beleuchtung durch ein beugungsgitter, 2008.

- [vB09] A. von Bassewitz. Entwicklung eines in-vivo systems für die durchführung von in-vivo lokalisationsmessungen, 2009.
- [vdLKHS08] L. van de Linde, R. Kasper, M. Heilemann, and M. Sauer. Photoswitching microscopy with standard fluorophores. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 2008.
- [VV05] D. Veith and M. Veith. Ein regenbogen aus dem ozean - biologie fluoreszierender proteine. *Biol. Unserer Zeit*, 6(35):394–404, 2005.
- [VWS02] B. Valeur, J. Wiley, and I. Sons. Molecular fluorescence. 2002.
- [Wag04] C. Wagner. *Neue Methoden zur Größen-und Formbestimmung von fluoreszierenden Nanostrukturen unter Verwendung der SMI-Mikroskopie*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Kirchhoff-Institut für Physik, 2004.
- [WFP<sup>+</sup>01] T. C. Walther, M. Fornerod, H. Pickersgill, M. Goldberg, T. D. Allen, and I. W. Mattaj. The nucleoporin nup153 is required for nuclear pore basket formation, nuclear pore complex anchoring and import of a subset of nuclear proteins. *EMBO J.*, 20/20:5703–14, 2001.
- [WS84] T. Wilson and C. J. R. Sheppard. Theory and practice of scanning optical microscopy. *Academic, London*, 5:125, 1984.
- [ZKHS07] P. Zhang, C. M. Khursigara, L. M. Hartnell, and S. Subramaniam. Direct visualization of *Escherichia coli* chemotaxis receptor arrays using cryo-electron microscopy. *PNAS*, 104(10):3777–3781, 2007.



# Abbildungsverzeichnis

2.1.1. Simulierte laterale Punktbildfunktion (PSF) bei Weitfelddetektion . . . . .	4
2.1.2. Veranschaulichung des Rayleigh-Kriteriums . . . . .	5
2.2.1. Konfokale Optische Transferfunktion (OTF) . . . . .	7
2.3.1. Jablonski-Energiediagramm eines organischen Farbstoffmoleküls . . . . .	8
2.4.1. Konfokales Mikroskop mit epi-Beleuchtung und konfokales Laserraster-Mikroskop . . . . .	9
2.4.2. 4Pi-Mikroskop Typ B . . . . .	10
2.4.3. Leica TCS 4PI-Mikroskop . . . . .	11
2.4.4. PSF und OTF bei 2-Photonen-Anregung von 4Pi Typ A und C im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie . . . . .	13
2.4.5. Präparat der 4PI-Mikroskopie . . . . .	15
2.4.6. PSF und OTF des SMI-Mikroskops . . . . .	16
2.4.7. axiale Intensitätsverteilung einer SMI-Messung . . . . .	17
2.4.8. Zusammenhang zwischen dem Durchmesser und der Modulationstiefe . . . . .	17
2.4.9. Modell der Zustände und ihrer Übergänge eines fluoreszierenden Proteins . . . . .	19
2.4.10. Zusammenhang zwischen Anzahl detektierter Photonen und Lokalisationsgenauigkeit . . . . .	21
2.4.11. Der Prozess der Lokalisationsmikroskopie . . . . .	23
3.1.1. Sekundärstruktur des grün fluoreszierenden Quallenproteins (GFP) . . . . .	26
3.1.2. Anregungs- und Emissionsspektren fluoreszenter Proteine . . . . .	26
3.1.3. Kristallstruktur und schematische Diagramme eines Antikörpers . . . . .	28
3.2.1. Komponenten des Cytoskeletts am Beispiel eines Neurons . . . . .	30
3.2.2. An innere und äußere Kräfte angepasste Strukturen des Cytoskeletts . . . . .	30
3.3.1. Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes . . . . .	31
3.4.1. Der Signalweg der Chemotaxis in <i>Escherichia coli</i> . . . . .	33
3.4.2. Schemazeichnung und Elektronenmikroskop-Aufnahme des Motorproteinkomplexes von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	34
3.5.1. Schemazeichnung der Zellmorphologie von <i>Toxoplasma Gondii</i> Tachyzoites . . . . .	35
4.1.1. 4Pi-Bilder von 100nm grün fluoreszierenden Nanokugeln . . . . .	38
4.1.2. 4Pi-Bild eines 100nm grün fluoreszierenden Beads; aufgenommen mit Ölobjektiven . . . . .	39
4.1.3. 4Pi-Aufnahmen eines 6µm Beads . . . . .	40
4.2.1. CAD-Modell der Baugruppe zur Bespatterung der 4Pi-Deckgläser . . . . .	41
4.2.2. Modul zur zusätzlichen Dämpfung des unteren Objektivs . . . . .	42
4.2.3. Artefakte der Intensitätsmodulation aufgrund von Vibrationen des unteren Objektivs . . . . .	43
4.2.4. Intensitätsvergleich der beiden 4Pi-Objektive . . . . .	44
4.3.1. 4Pi-Aufnahme von F-Aktin . . . . .	45

4.3.2.Z-Projektionen eines 4Pi-Datenstapels einer MCF-7-Zelle mit Alexa 488-Färbung des Kernporenproteins p62 . . . . .	46
4.3.3.Histogramm über Größe (Fläche) der Kernporenkomplexe (p62) in erster MCF7-Zelle . . . . .	47
4.3.4.Histogramm über Größe (Fläche) der Kernporenkomplexe (p62) in zweiter MCF7-Zelle . . . . .	48
4.3.5.Histogramm über Größe (Fläche) der Kernporenkomplexe (p62) in dritter MCF7-Zelle . . . . .	48
4.3.6.Histogramm über Größe (Fläche) der Kernporenkomplexe (p62) aller drei MCF7-Zellen . . . . .	49
4.3.7.xz-Schnitt und Intensitätsprofil einer 4Pi-Aufnahme von einer MCF-7-Zelle mit Alexa488-Markierung des Kernporenproteins p62 . . . . .	50
4.3.8.Axiales Intensitätsprofil markierter Bereiche in Bild 4.3.7 . . . . .	50
4.3.9.3d-Rekonstruktion einer 4Pi-Aufnahme von einer MCF-7-Zelle mit Alexa488-Markierung des Kernporenproteins p62 . . . . .	51
4.3.10βd-Rekonstruktion des Mittelteils der MCF-7-Zelle . . . . .	51
5.1.1.Skizze des Vertico-SMI-Aufbaus . . . . .	54
5.2.1.SMI-Daten von YFP markiertem Rezeptorprotein CheZ . . . . .	55
6.1.1.Weitfeld- und SPDM-Bild von <i>E. coli</i> Bakterien mit YFP markiertem Rezeptorprotein CheZ . . . . .	58
6.1.2.Weitfeld- und SPDM-Bild sowie Intensitätsprofile von Cluster A aus Abb.6.1.1 . . . . .	58
6.1.3.Weitfeld- und SPDM-Bild sowie Intensitätsprofile von Cluster B aus Abb.6.1.1 . . . . .	59
6.1.4.[Weitfeld- und SPDM-Bild sowie Intensitätsprofile von Cluster C aus Abb.6.1.1 . . . . .	59
6.1.5.Weitfeld- und SPDM-Bild von unfixierten <i>E. coli</i> -Bakterien mit YFP markiertem Rezeptorprotein CheW . . . . .	60
6.1.6.Auswahl der einzelnen Zellen aus dem Gesamtbild (Abb. 6.1.5) und Bildausgabe des Clusteralgorithmus . . . . .	61
6.1.7.Weitfeld- und SPDM-Aufnahme einer PFA-fixierten <i>E. coli</i> -Zelle mit YFP-markiertem Rezeptorprotein CheW . . . . .	61
6.1.8.Histogramme der Lokalisationsgenauigkeiten der detektierten CheW-Proteine . . . . .	62
6.1.9.Distanzen der CheW-Proteine bei den unfixierten Proben im Vergleich zu einer Zufallsverteilung . . . . .	63
6.1.10Distanzen der CheW-Proteine bei den PFA-fixierten Proben im Vergleich zu einer Zufallsverteilung . . . . .	63
6.1.11Weitfeld- und SPDM-Aufnahme eines PFA-fixierten <i>E. coli</i> -Bakteriums mit YFP-Markierung des Rezeptorproteins CheA . . . . .	64
6.1.12Weitfeld- und SPDM-Aufnahme eines unfixierten <i>E. coli</i> -Bakteriums mit YFP-Markierung des Rezeptorproteins CheA . . . . .	65
6.1.13Weitfeld- und SPDM-Aufnahme eines weiteren unfixierten <i>E. coli</i> -Bakteriums mit YFP-Markierung des Rezeptorproteins CheA . . . . .	66
6.1.14Histogramme der Lokalisationsgenauigkeiten der detektierten CheA-Proteine . . . . .	66
6.1.15Distanzen der CheA-Proteine bei den unfixierten Proben im Vergleich zu einer Zufallsverteilung . . . . .	67
6.1.16Distanzen der CheA-Proteine bei den PFA-fixierten Proben im Vergleich zu einer Zufallsverteilung . . . . .	67
6.1.17Weitfeld- und SPDM-Aufnahme eines unfixierten <i>E. coli</i> -Bakteriums mit <i>flhC-knockout</i> und YFP-CheW . . . . .	68



6.1.1	Lokalisationsgenauigkeiten der detektierten CheW-Proteine in den <i>E. coli</i> -Bakterien mit flhC-KO . . . . .	69
6.1.1	Distanzen der Ereignisse bei der unfixierten Negativkontrolle (flhC-knockout) . . . . .	70
6.1.2	Distanzen der Ereignisse bei der PFA-fixierten Negativkontrolle (flhC-knockout) . . . . .	71
6.1.2	Weitfeld- und SPDM-Aufnahmen von <i>E. coli</i> -Bakterien vom Stamm RP437 . . . . .	71
6.1.2	Lokalisationsgenauigkeiten der YFP-Moleküle in <i>E. coli</i> -Bakterien vom Stamm RP437 . . . . .	72
6.1.2	Distanzen der Ereignisse bei der unfixierten Negativkontrolle mit freiem YFP (Stamm RP437) . . . . .	73
6.1.2	Distanzen der Ereignisse bei der PFA-fixierten Negativkontrolle mit freiem YFP (Stamm RP437) . . . . .	73
6.2.1	Anzahl der gefundenen Ereignisse pro Motorproteinkomplex . . . . .	75
6.2.2	Abhängigkeit des mittleren Durchmessers der als Cluster bestimmten Regionen vom Radius . . . . .	76
6.2.3	Weitfeld-, SPDM-Aufnahme und Positionskarte von <i>E. coli</i> -Zellen mit YFP-Markierung des Motorproteins FliF . . . . .	77
6.2.4	Histogramme der Durchmesser des C-Rings . . . . .	77
6.2.5	Histogramme der Durchmesser des MS-Rings . . . . .	77
6.2.6	Vergleich der Anzahl der detektierten Ereignisse pro Cluster zwischen C-Ring und MS-Ring . . . . .	78
6.2.7	Histogramm der Lokalisationsgenauigkeit (LG) von 859 Signalen in 8 <i>E. coli</i> -Bakterien (YFP-Markierung des C-Rings). Die mittlere LG liegt bei $31,0 \pm 0,4$ nm. . . . .	79
6.2.8	Lokalisationsgenauigkeit über den Distanzen zu den nächsten Nachbarn . . . . .	79
6.2.9	Vergleich der Durchmesser der Cluster zwischen C-Ring und MS-Ring mit Schwellwerten . . . . .	81
6.2.1	Farbliche Darstellung der Lokalisationsgenauigkeit der detektierten Einzelereignisse . . . . .	82
6.3.1	Simulierte Verteilung von Punkten auf einer Kreisfläche . . . . .	84
6.3.2	Durchmesser der simulierten Kreisflächen . . . . .	84
6.3.3	Abhängigkeit des Kreisdurchmessers von der simulierten Detektionseffizienz . . . . .	85
6.4.1	Chemische Strukturformeln der an beschichtetes Deckglas gebundenen Alexa 647-Farbstoffmoleküle . . . . .	86
6.4.2	Weitfeld- und SPDM-Aufnahme von ans Deckglas gebundenen Alexa647-Molekülen . . . . .	87
6.4.3	Lokalisationsgenauigkeit der ans Deckglas gebundenen Alexa647-Moleküle . . . . .	87
6.4.4	Distanzen zwischen den ans Deckglas gebundenen Alexa647-Molekülen . . . . .	88
6.5.1	Mittelwertprojektion über die Zeit und SPDM-Aufnahme von <i>Toxoplasma gondii</i> Tachyzoiten . . . . .	89
6.5.2	Segmentierung anhand einer Beispielaufnahme einer Toxoplasma-Zelle . . . . .	91
6.5.3	Kantendetektion der Membran einer Toxoplasma-Zelle . . . . .	92
6.5.4	Distanzen zu den nächsten Nachbarn aus der jeweils anderen Membrankante . . . . .	93
6.6.1	Weitfeld- und SPDM-Aufnahme embryonaler Mausstammzellen mit Cy2-Markierung des Histonproteins H3K9me3 der WT-Zelllinie . . . . .	95
6.6.2	Weitfeld- und SPDM-Aufnahme embryonaler Mausstammzellen mit Cy2-Markierung des Histonproteins H3K9me3 der KO-Zelllinie . . . . .	95
6.6.3	Vergleich der Distanzen innerhalb der Cluster bzw. im Rest des Kerns zwischen WT- und KO-Zelllinie . . . . .	96
6.6.4	Vergleich der Distanzen des Histon-Proteins innerhalb der unterschiedlichen Regionen . . . . .	97

7.0.1. Elektronenmikroskopischen Aufnahmen von hexagonaler Struktur von Rezeptoren in unterschiedlichen bakteriellen Spezies . . . . .	100
7.0.2. Einfluss der Proteine CheA und CheW auf die Bildung funktioneller Cluster von Chemorezeptoren in <i>E. coli</i> . . . . .	101
7.0.3. EM-Aufnahmen von MS-Ring und C-Ring in <i>E. coli</i> . . . . .	102

# Tabellenverzeichnis

2.4.1. Unterschiede zwischen den drei 4Pi-Varianten. . . . .	9
4.1.1. Vergleich der Höhen der Nebenmaxima in Prozent des Hauptmaximums von den 4Pi-Aufnahmen in Abb.4.1.1 . . . . .	39
4.3.1. Quantitative Analyse von Kernporenkomplexen (p62) mit 4Pi-Mikroskopie . . . . .	49
5.2.1. Quantitative Analyse der SMI-Daten von <i>E. coli</i> -Bakterien mit YFP markiertem Rezeptorprotein CheZ (30µM IPTG) . . . . .	55
5.2.2. Quantitative Analyse der SMI-Daten von <i>E. coli</i> -Bakterien mit YFP markiertem Rezeptorprotein CheZ (50µM IPTG) . . . . .	56
6.1.1. Anzahl detektierter CheW-Moleküle und ihre mittlere Lokalisationsgenauigkeit . . . . .	62
6.1.2. Mittlere Distanzen des Rezeptorproteins CheW bei unfixierten und PFA-fixierten Präparaten	62
6.1.3. Anzahl detektierter CheA-Moleküle und ihre mittlere Lokalisationsgenauigkeit . . . . .	65
6.1.4. Mittlere Distanzen des Rezeptorproteins CheA bei unfixierten und PFA-fixierten Präparaten	65
6.1.5. Anzahl detektierter Moleküle bei Negativkontrollen und ihre mittlere Lokalisationsgenauigkeit . . . . .	69
6.1.6. Mittlere Distanzen bei der Negativkontrolle (Stamm <i>flhC-knockout</i> ) bei unfixierten und PFA-fixierten Präparaten . . . . .	70
6.1.7. Mittlere Distanzen der YFP-Negativkontrolle bei unfixierten und PFA-fixierten Präparaten	72
6.2.1. Vergleich der mittleren Durchmesser von C-Ring und MS-Ring PFA-fixiert und unfixiert.	78
6.2.2. Anzahl an detektierten Ereignissen sowie Detektionseffizienz für C-Ring und MS-Ring .	80
6.3.1. Vergleich der mit Hilfe des Clusteralgorithmus bestimmten Durchmesser der simulierten Kreise . . . . .	85
6.6.1. Ereignisdichten bei Cy2-markiertem H3K9me3 in embryonalen Stammzellen der Maus.	97



# Danksagung

Ich möchte ganz herzlich folgenden Personen danken, die auf ihre Weise zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Prof. Dr. Dr. Christoph Cremer dafür, dass er mich als Doktorand angenommen hat und meine Arbeit betreut hat, sowie für die Leitung der Arbeitsgruppe.
- Prof. Dr. Michael Hausmann für die Begutachtung meiner Arbeit und die Ratschläge im Vorhinein.
- Prof. Dr. Iring Bender und Prof. Dr. Selim Jochim für ihre Bereitschaft mich zu prüfen.
- allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Angewandte Optik und Informationsverarbeitung für Vorarbeit, Einarbeitung, Anregungen, Ratschläge, wissenschaftliche Diskussionen und Unterstützung während der gesamten Zeit der Doktorarbeit sowie für Korrektur der Arbeit.
- Dr. Patrick Müller, Dr. Götz Pilarczyk und Dr. Jutta Schwarz-Finsterle für Ratschläge und Hilfsbereitschaft bei Fragen zu biologischen und chemischen Inhalten sowie für Korrektur der Arbeit.
- Dipl. Phys. Kathrin Maecken, Dipl. Phys. Sabrina Rossberger, Dipl. Phys. Anna Luise Grab und M.Sc. Yiming Li für Unterstützung bei Messungen und Auswertungen.
- Dr. Victor Sourjik und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe, dabei insbesondere Dr. Silke Neumann, Dr. Hui Li, Mohit Kumar und Dr. Sonja Schulmeister für Hilfe und Unterstützung bei der Präparation von *E. coli*-Bakterien.
- Prof. Dr. Albrecht M. Müller, Dr. Matthias Becker und Dr. Nadine Obier für die Präparate von embryonalen Mausstammzellen.
- PD. Dr. Andreas Naber für die Präparate von MCF7-Zellen.
- meinen Eltern Volker und Eva-Maria Ruckelshausen sowie meinen Schwestern Bettina und Maren Ruckelshausen für seelische und moralische Unterstützung und dafür, dass sie an mich glauben.
- meiner Freundin Cornelia Fleischhaker für Ablenkung und Ausgleich.



Erklärung:

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

Heidelberg, den .....