

# Lokalisationsmikroskopie für die Visualisierung zellulärer Strukturen

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES  
DER JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT  
WÜRZBURG

vorgelegt von

**Teresa Klein**

geboren in Würzburg

Würzburg, 2014

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer

Gutachter: Prof. Dr. Ricardo Benavente

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....



ICH BIN IMMER NOCH VERWIRRT,  
ABER AUF EINEM HÖHEREN NIVEAU.

Enrico Fermi



## Summary

The implementation of fluorescence microscopy enables specific labeling and studying of cellular structures with high contrast. Since light microscopy is limited in its resolution, structural information at the molecular level remains hidden. This barrier, known as diffraction limit, can be circumvented by modern imaging techniques. For this purpose localization microscopy employs photoswitchable fluorophores. The fluorescence of these fluorophores is spatially and temporally separated in order to localize single fluorophores with nanometer precision. From thousands of single-molecule localizations an artificial high-resolution image is reconstructed. Super-resolution microscopy is a valuable tool for live-cell observations in order to investigate sub-cellular structures and protein dynamics beyond the diffraction limit under physiological conditions. Both photoactivatable fluorescent proteins and photoswitchable organic fluorophores can be used as labels. Whereas labeling with fluorescent proteins is straightforward to implement, organic fluorophores, however, have the advantage of a more precise localization due to a higher photon yield. In living cells, labeling of structures with synthetic fluorophores is facilitated by so-called chemical tags. Those are polypeptide sequences that are genetically fused to the target protein and subsequently labeled with dye coupled substrates. In this work, on the basis of the model structure H2B—a histone protein—dyes are identified in combination with chemical tags, that can be successfully used for super-resolution imaging with *direct stochastic optical reconstruction microscopy* (*dSTORM*) in living cells. The dyes tetramethylrhodamine, 505 and Atto 655 proved to be particularly suitable, whereby the whole spectral range is represented. However, unspecific binding and dye aggregation can pose a problem for the efficient labeling of living cells. It is shown, that coating the glass surface with glycine successfully minimizes unspecific adsorption of fluorophores. Furthermore the impact of the excitation light on living cells is discussed. Methods are presented to keep photodamage at a minimum, e. g., by choosing a dye within the red excitation range.

The feasibility to label living cells with photoswitchable organic fluorophores represents a big asset for localization microscopy, which originally employed dye labeled antibodies. This alternative labeling technique is used in a collaboration to study the aggregation behavior of  $\beta$ -Amyloid peptides, which

---

cause Alzheimer's disease. By means of HeLa cells, different diffraction limited morphologies of aggregates are revealed. It is thereby shown, that intracellular peptides generate larger aggregates than the ones in the extracellular region.

In another collaboration the structural organization of two flotillin proteins in the membrane of bacteria is examined by means of the photoactivatable protein mEos2 and *photoactivated localization microscopy* (PALM). These proteins form two clusters with different diameters, which could be determined with nanometer precision. It was also asserted that both proteins exist in unequal numbers within the bacterium.

## Zusammenfassung

Die Einführung der Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, Strukturen in Zellen spezifisch und mit hohem Kontrast zu markieren und zu untersuchen. Da die Lichtmikroskopie jedoch in ihrer Auflösung begrenzt ist, bleiben Strukturinformationen auf molekularer Ebene verborgen. Diese als Beugungsgrenze bekannte Limitierung, kann mit modernen Verfahren umgangen werden. Die Lokalisationsmikroskopie nutzt hierfür photoschaltbare Fluorophore, deren Fluoreszenz räumlich und zeitlich separiert wird, um so einzelne Fluorophore mit Nanometer-Genauigkeit lokalisieren zu können. Aus tausenden Einzelmolekül-Lokalisationen wird ein künstliches, hochaufgelöstes Bild rekonstruiert. Die hochauflösende Mikroskopie ist gerade für die Lebendzell-Beobachtung ein wertvolles Werkzeug, um subzelluläre Strukturen und Proteindynamiken jenseits der Beugungsgrenze unter physiologischen Bedingungen untersuchen zu können. Als Marker können sowohl photoaktivierbare fluoreszierende Proteine als auch photoschaltbare organische Fluorophore eingesetzt werden. Während die Markierung mit fluoreszierenden Proteinen einfach zu verwirklichen ist, haben organische Farbstoffe hingegen den Vorteil, dass sie auf Grund der höheren Photonenausbeute eine präzisere Lokalisation erlauben. In lebenden Zellen wird die Markierung von Strukturen mit synthetischen Fluorophoren über sogenannte chemische Tags ermöglicht. Diese sind Polypeptidsequenzen, die genetisch an das Zielprotein fusioniert werden und anschließend mit Farbstoff-gekoppelten Substraten gefärbt werden. An der Modellstruktur des Histonproteins H2B werden in dieser Arbeit Farbstoffe in Kombination mit chemischen Tags identifiziert, die erfolgreich für die Hochauflösung mit *direct stochastic optical reconstruction microscopy* (*dSTORM*) in lebenden Zellen eingesetzt werden können. Für besonders geeignet erweisen sich die Farbstoffe Tetramethylrhodamin, 505 und Atto 655, womit der gesamte spektrale Bereich vertreten ist. Allerdings können unspezifische Bindung und Farbstoffaggregation ein Problem bei der effizienten Markierung in lebenden Zellen darstellen. Es wird gezeigt, dass die Beschichtung der Glasoberfläche mit Glycin die unspezifische Adsorption der Fluorophore erfolgreich minimieren kann. Weiterhin wird der Einfluss des Anregungslichtes auf die lebende Zelle diskutiert. Es werden Wege beschrieben, um die Photoschädigung möglichst gering zu halten, beispielsweise durch die Wahl eines Farbstoffs im roten Anregungsbereich.

---

Die Möglichkeit lebende Zellen mit photoschaltbaren organischen Fluorophoren spezifisch markieren zu können, stellt einen großen Gewinn für die Lokalisationsmikroskopie dar, bei der ursprünglich farbstoffgekoppelte Antikörper zum Einsatz kamen. Diese Markierungsmethode wird in dieser Arbeit eingesetzt, um das Aggregationsverhalten von Alzheimer verursachenden  $\beta$ -Amyloid Peptiden im Rahmen einer Kooperation zu untersuchen. Es werden anhand von HeLa Zellen verschiedene beugungsbegrenzte Morphologien der Aggregate aufgeklärt. Dabei wird gezeigt, dass intrazellulär vorhandene Peptide größere Aggregate formen als die im extrazellulären Bereich.

In einer zweiten Kollaboration wird mit Hilfe des photoaktivierbaren Proteins mEos2 und *photoactivated localization microscopy* (PALM) die strukturelle Organisation zweier Flotillinproteine in der Membran von Bakterien untersucht. Diese Proteine bilden zwei Cluster mit unterschiedlichen Durchmessern, die mit Nanometer-Genauigkeit bestimmt werden konnten. Es wurde außerdem festgestellt, dass beide Proteine in unterschiedlichen Anzahlen im Bakterium vorliegen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Summary</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Fluoreszenzmarker . . . . .	1
1.2 Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	2
1.3 Lokalisationsmikroskopie in lebenden Zellen . . . . .	6
1.4 Amyloid Peptide . . . . .	8
1.5 Lipid Rafts in Bakterien . . . . .	9
<b>2 Methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Herstellung von Vektoren . . . . .	11
2.2 Probenvorbereitung . . . . .	14
2.2.1 Markierung eukaryotischer Zellen . . . . .	14
2.2.2 <i>Bacillus subtilis</i> . . . . .	18
2.3 Hochauflösende Lokalisationsmikroskopie . . . . .	18
2.3.1 Mikroskopaufbau . . . . .	18
2.3.2 Schaltpuffer . . . . .	19
2.3.3 Bildrekonstruktion . . . . .	20
2.4 Photoschädigung . . . . .	20
<b>3 Liste der Publikationen</b>	<b>23</b>
<b>4 Weitere Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>25</b>
4.1 Lebendzell- <i>d</i> STORM mit organischen Fluorophoren . . . . .	25
4.1.1 Chemische Tags . . . . .	25
4.1.2 Zwei Farben Lebendzell- <i>d</i> STORM . . . . .	33
4.1.3 Photoschädigung . . . . .	35
4.2 Angewandte biologische Projekte . . . . .	36
4.2.1 $\beta$ -Amyloide in HeLa Zellen . . . . .	37
4.2.2 Lipid Rafts in Bakterien . . . . .	39

<b>5 Fazit und Ausblick</b>	<b>43</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>49</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>51</b>
<b>Danksagung</b>	<b>61</b>
<b>Publikationen</b>	<b>63</b>



# 1 Einleitung

Die Erfindung des Mikroskops hat die Biologie revolutioniert. Details, die dem bloßen Auge verborgen sind, konnten so zum ersten Mal sichtbar gemacht werden. HANS und ZACHARIAS JANSSEN nahmen dabei eine Vorreiterrolle ein, indem sie gegen Anfang des 17. Jahrhunderts das erste Mikroskop, allerdings mit noch eher geringer Vergrößerung bauten. ANTONI VAN LEEUWENHOEK konstruierte einige Jahrzehnte später seine eigenen Mikroskope mit selbst hergestellten Linsen und machte etliche biologische Entdeckungen. Beispielsweise untersuchte er Wasser und Speichel und fand darin erstmals Bakterien und Einzeller [Smit und Heniger, 1975]. Er war der erste, der die Zirkulation von Blutkörperchen in Kapillargefäßen beobachtete. Leeuwenhoeks Arbeit wurden von ROBERT HOOK bestätigt, der bereits 1665 die erste Arbeit über mikroskopische Studien, die *Micrographia* veröffentlicht hat [Hooke, 1665]. Die Qualität der mikroskopischen Aufnahmen hing zu der Zeit stark von der Linsenschleiftechnik ab, eine Fertigkeit, die van Leeuwenhoek exzellent beherrschte. ERNST ABBE fand später, 1873, heraus, dass die Fähigkeit Objekte aufzulösen, auch physikalisch begrenzt ist [Abbe, 1873], was von RAYLEIGH weiter diskutiert wurde [Rayleigh, 1896]. Demnach kann ein Lichtmikroskop nur Strukturen auflösen, die mindestens eine Größe von ungefähr der halben Wellenlänge des Lichts, also  $\sim 200$  nm, aufweisen. Dieses als Beugungsgrenze bekannte Phänomen stellte die Wissenschaft jeher vor die Herausforderung Wege zu finden, diese zu umgehen.

## 1.1 Fluoreszenzmarker

Wie genau zelluläre Strukturen untersucht werden konnten, wurde durch den geringen Kontrast der Zelle im Durchlicht limitiert. Die Entdeckung der Fluoreszenz durch STOKES im 19. Jahrhundert ebnete den Weg für die Fluoreszenzmikroskopie. Damit eröffneten sich völlig neue Möglichkeiten für die Bildgebung biologischer Proben. Fluoreszierende Stoffe konnten nun dazu verwendet werden, um Strukturen in Zellen und Geweben anzufärben und diese mit hohem Kontrast abzubilden. Seit der Herstellung des ersten synthetischen Farbstoffes,

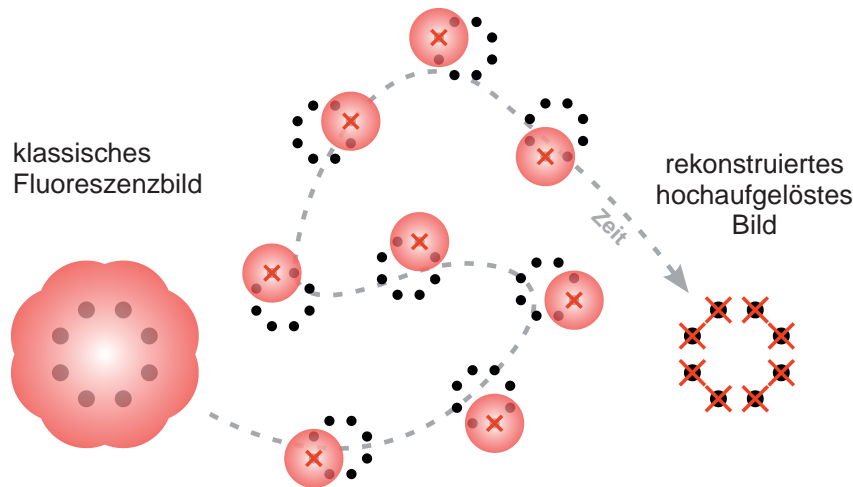
Fluorescein, durch Baeyer 1871 [Baeyer, 1871], ist die Anzahl der verfügbaren organischen Fluorophore stetig gestiegen. Heute sind Farbstoffe über die gesamte Breite des Spektrum erhältlich. Durch fluoreszenzmarkierte Antikörper können eine Vielzahl von Proteinen in der fixierten Zelle sichtbar gemacht und ihre Struktur und Anordnung zueinander studiert werden. Die Einführung der fluoreszierenden Proteine (FPs), wie GFP [Tsien, 1998], ermöglichte die spezifische Markierung auch in lebenden Zellen. Das Zielprotein wird auf genetischer Ebene mit dem FP modifiziert, so dass eine stöchiometrische Markierung vorhanden ist. Erstmals konnten Proteine unter physiologischen Bedingungen beobachtet und deren Dynamiken verfolgt werden [Lippincott-Schwartz und Patterson, 2003]. Organische Farbstoffe haben jedoch den Vorteil gegenüber FPs, dass sie Größenordnungen mehr an Photonen emittieren, dadurch ein verbessertes Signal-zu-Rausch Verhältnis haben, und photostabiler sind, also über einen längeren Zeitraum beobachtet werden können. Die Entwicklung von chemischen Tags vereint diese Vorteile eines synthetischen Fluorophors mit der genetisch kodierte, proteinspezifische Markierung durch FPs. Sie bestehen aus einer Polypeptidsequenz, die an das Zielprotein fusioniert wird und anschließend mit einem entsprechend modifizierten Farbstoff markiert wird. Damit sind organische Farbstoffe zu einem vielfach eingesetzten Werkzeug für die Lebendzell-Mikroskopie geworden [Miller und Cornish, 2005; Haugland et al., 2005; Giepmans et al., 2006]. Der erste chemische Tag, FLAsH, wurde bereits 1998 erfunden [Griffin et al., 1998]. Seit dem wurden verschiedene Tags entwickelt, darunter SNAP/CLIP-Tag [Keppler et al., 2003; Gautier et al., 2008], TMP-Tag [Miller et al., 2005] und HaloTag [Los et al., 2008].

## 1.2 Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie

Mit den klassischen Methoden der Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie können Strukturen nur bis zu einer Größe von  $\sim 200$  nm aufgelöst werden. Die Information auf molekulare Ebene, die durch stöchiometrische Markierungsmethoden vorhanden ist, bleibt auf Grund der Beugungsgrenze verborgen. Um diese Barriere zu umgehen und neue Einblicke in die zelluläre Architektur und dynamische Organisation zu erhalten, wurden verschiedene Ansätze entwickelt. Allen ist gemeinsam, dass sie Wege gefunden haben, die Emission der Fluorophore in einer zusätzlichen Dimension zu differenzieren, z. B. in der Zeit. Dies kann entweder durch deterministische Herangehensweisen, wie das Anwenden eines Lichtmusters, erfolgen oder stochastisch, wie das Verringern der Anzahl gleichzeitig fluoreszierender Farbstoffe. Zu den deterministischen Hoch-

aufLösungsmethoden gehört beispielsweise die *stimulated emission depletion* (STED) Mikroskopie [Hell und Wichmann, 1994; Klar et al., 2000; Dyba und Hell, 2002], die auf der konfokalen Mikroskopie beruht. Hierbei wird mit Hilfe eines sehr leistungsstarken donut-förmigen Strahls durch stimulierte Emission im peripheren Bereich des Fokus das Fluoreszieren der Farbstoffe verhindert und damit der Bereich, in dem spontane Emission unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons stattfinden kann, auf weit unterhalb der Beugungsgrenze eingengt. Bei der auf Weitfeld-Mikroskopie basierenden *structured illumination microscopy* (SIM) wird ein fein strukturiertes Anregungsmuster verwendet, um über den Moiré-Effekt in der Probe Strukturinformationen jenseits der Beugungsgrenze zu erhalten [Gustafsson, 2000, 2005; Heintzmann und Cremer, 1999].

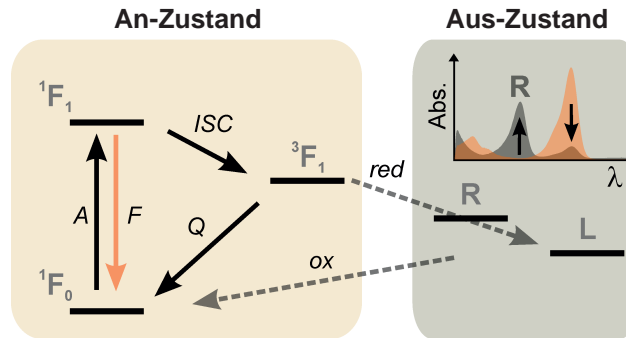
**Lokalisationsmikroskopie.** Stochastische Hochauflösungsmethoden sind auf die zeitliche Separierung der Fluoreszenz Emission einzelner Fluorophore angewiesen. Die Position jedes einzelnen Emitters wird präzise bestimmt, weswegen man auch von Lokalisationsmikroskopie spricht. Dies wird erreicht, indem photoschaltbare Fluorophore eingesetzt werden, d. h. sie besitzen einen nicht fluoreszenten Aus-Zustand und einen fluoreszierenden An-Zustand. In der *photoactivated localization microscopy* (PALM) [Betzig et al., 2006] und *fluorescence photoactivation localization microscopy* (FPALM) [Hess et al., 2006] werden photoaktivierbare oder photokonvertierbare fluoreszierende Proteine (PA-FPs) verwendet. Diese sind ursprünglich nicht fluoreszent, wie PAmCherry oder PA-GFP, oder sind blau-verschoben fluoreszent, z. B. mEos2, und werden mit Hilfe von UV Licht zur (rot-verschobenen) fluoreszenten Form konvertiert. Bei *stochastic optical reconstruction microscopy* (STORM) [Rust et al., 2006; Bates et al., 2007] und *direct STORM* [Heilemann et al., 2005, 2008; van de Linde et al., 2011b, 2013] kommen photoschaltbare organische Fluorophore zum Einsatz, welche zu Anfang in einen stabilen reversiblen Aus-Zustand überführt werden. Anschließend werden stochastisch einige Emitter aktiviert, deren Fluoreszenz detektiert und schließlich eine andere Subpopulation aktiviert. Dieser Zyklus von Aktivieren und Auslesen wird ein paar tausend Male wiederholt und eine entsprechende Anzahl von Bildern aufgenommen. Am Ende werden die Positionen der einzelnen Fluorophore mit nm-Genauigkeit bestimmt und ein hochaufgelöstes Bild rekonstruiert (Abbildung 1.1). Für die Lokalisationsmikroskopie ist es essentiell, dass die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung gering genug ist, so dass sich nur wenige Fluorophore gleichzeitig im An-Zustand befinden. Idealerweise ist der Abstand zwischen den einzelnen Emittlern größer als die Beugungsgrenze, denn nur so können sie einzeln genau lokalisiert werden.



**Abbildung 1.1:** Prinzip der Lokalisationsmikroskopie mit schaltbaren organischen Fluorophoren. Anfangs sind alle Farbstoffe, mit denen eine Struktur (schwarze Punkte) markiert ist, fluoreszent. Dies führt zu dem klassischen beugungsbegrenzten Fluoreszenzbild. Nachdem der Großteil der Fluorophore in einen stabilen Aus-Zustand überführt wurde, werden über die Zeit kleine Subpopulationen stochastisch aktiviert. Die einzelnen Emittoren werden so räumlich getrennt und können separat lokalisiert werden. Letztlich wird aus allen Lokalisationen ein hochaufgelöstes Bild rekonstruiert. Bearbeitet nach [van de Linde et al., 2013], mit Erlaubnis von Elsevier.

Dabei wird deren Punktspreizfunktion (PSF), d. h. ihr Emissionsmuster wie es durch die Optik abgebildet wird, mit einem Gauß-Modell angepasst und so deren Position bestimmt. Die Lokalisationsgenauigkeit hängt im Wesentlichen von der Helligkeit des Fluorophors ab, also wie viele Photonen ( $N$ ) detektiert wurden. Für vernachlässigbaren Hintergrund lässt sich der Fehler mit  $\sigma/\sqrt{N}$  annähern, wobei  $\sigma$  die Standardabweichung der PSF ist [Thompson et al., 2002; Mortensen et al., 2010]. Lokalisationsmikroskopie ist einfach zu realisieren, weswegen sie bereits für eine Reihe von biologischen Studien eingesetzt wurde [Flors et al., 2009; Owen et al., 2010; Endesfelder et al., 2010; Löschberger et al., 2012; Lando et al., 2012; Zessin et al., 2012; Rossy et al., 2013]. Benötigt werden ein Weitfeld-Mikroskop, Laser zur Anregung, empfindliche Kameras zur Detektion der Fluoreszenz und Software zur Auswertung, die zum Teil frei erhältlich ist [Wolter et al., 2010, 2012].

**Photoschalten.** Damit sich ausreichend wenige Farbstoffe im An-Zustand befinden, muss die Dauer des Aus-Zustandes wesentlich länger sein als die



**Abbildung 1.2:** Photoschalten organischer Fluorophore unter reduktiven Bedingungen. Unter Anregung wechselt der Farbstoff zwischen Singulett Grundzustand  $^1F_0$  und ersten angeregten Zustand  $^1F_1$  (A: Absorption, F: Fluoreszenz). Durch Interkombinationsübergänge (ISC) geht der Fluorophor in den Triplett  $^3F_1$  über. Hier kann dieser entweder gelöscht werden (Q) oder zum Radikal (R) reduziert werden (red). Manche Farbstoffe können erneut ein Elektron aufnehmen und die voll reduzierte Leukoform (L) bilden. Beide Formen können wieder durch Oxidation (ox) in den Grundzustand gebracht werden. Rechte oberer Ecke: Wenn ein Farbstoffradikal gebildet wird, erscheint bei den meisten Rhodamin-Derivaten eine zusätzliche Absorptionsbande bei  $\sim 400$  nm (Abs.: Absorption,  $\lambda$ : Wellenlänge). Bearbeitet nach [van de Linde et al., 2013], mit Erlaubnis von Elsevier.

des An-Zustandes [Heilemann et al., 2009; Vogelsang et al., 2010]. Für komplexe Strukturen mit einer hohen Markierungsdichte kann dies Aus-Zeiten über mehreren Sekunden bedeuten. Für PALM stellt dies ein eher geringes Problem dar, da zu Beginn alle Proteine nicht fluoreszent sind und die Aktivierungsrate durch das Anpassen der UV Einstrahlung sehr gut steuerbar ist. Außerdem wird jedes Protein im Idealfall nur einmal detektiert, da es während des Auslesens gebleicht wird. Bei *d*STORM jedoch werden die anfangs fluoreszenten Farbstoffe reversibel zwischen An- und Aus-Zustand geschaltet und mehrfach detektiert. Daher kommt den Schaltraten eine wichtige Rolle zu, um den Großteil der Emitter in den Dunkelzustand zu überführen [van de Linde und Sauer, 2014]. Das Schalten der Fluorophore wird durch das Zusammenspiel von thiolhaltigen Reduktionsmitteln, wie  $\beta$ -Mercaptoethylamin, im millimolaren Bereich und Oxidationsmitteln, z. B. Sauerstoff ermöglicht (Abbildung 1.2). Bei Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge wechselt ein Farbstoff wiederholt zwischen Singulett Grundzustand und ersten angeregten Zustand. Beim Übergang in den Grundzustand wird Fluoreszenz emittiert. Durch Interkombinationsübergänge geht der Fluorophor in den Triplett über und kann

durch Thiole zum Farbstoffradikal reduziert werden. Diese Form stellt bei vielen Rhodamin-Farbstoffen den stabilen Aus-Zustand dar. Einige Fluorophore, z. B. Oxazine, können ein weiteres Mal zur Leukoform reduziert werden. Diese Dunkelzustände können durch Oxidation mit beispielsweise Sauerstoff oder durch Bestrahlung der Radikale bei  $\sim 400$  nm erneut in den Grundzustand gebracht werden [van de Linde et al., 2011a]. Molekularer Sauerstoff kann außerdem den Triplett löschen und sofort den Singulett wiederherstellen und steht damit in direkter Konkurrenz zur Reduktion durch Thiole. Daher ist es z. B. bei Cyanin-Farbstoffen angebracht Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen, um den Aus-Zustand zu begünstigen. Bei beiden Reaktionen, Löschen durch Sauerstoff oder Reduktion durch Thiole, entsteht Singulett Sauerstoff bzw. Thiylradikale, beides hoch reaktive Spezies, die bei der Photoschädigung von Zellen eine Rolle spielen. Auf Grund des Schaltmechanismus können die Schaltraten angepasst werden, indem beispielsweise die Konzentration des Reduktionsmittels, des Sauerstoffs oder der pH Wert der Lösung verändert wird oder mit 400 nm zusätzlich aktiviert wird.

### 1.3 Lokalisationsmikroskopie in lebenden Zellen

Um biologische Strukturen und Prozesse in ihrer natürlichen Umgebung studieren zu können, sind Untersuchungen an der lebenden Zelle unerlässlich. Fluoreszierende Proteine bieten einen unkomplizierten Weg in lebenden Zellen Strukturen sichtbar zu machen. Daher wurden für die ersten Hochauflösungsversuche in lebenden Zellen photoaktivierbare fluoreszierende Proteine verwendet.

**PALM.** Bereits 2007 wurde mit Hilfe von PALM und PA-GFP mit einer lateralen Auflösung von 40 nm Dynamiken von Hemagglutinin Cluster untersucht, auf deren Basis der Diffusionskoeffizient ermittelt werden konnte [Hess et al., 2007]. Weiterhin wurden Studien zu Struktur des Aktin Proteins MreB [Biteen et al., 2008] und zur Dynamik von Adhäsionskomplexen [Shroff et al., 2008] mit PA-FPs durchgeführt. Da FPs stöchiometrische Markierung erlauben, eignen sie sich hervorragend, um Bewegung von Proteinen zu verfolgen. In Kombination mit PALM ist es daher möglich, die Trajektorien einzelner Proteine mit sogenanntem *single particle tracking PALM* (sptPALM) aufzunehmen und somit die Mobilität der Proteine auf Einzelmolekülebene vergleichend zu analysieren [Manley et al., 2008]. Jedoch ist zu bedenken, dass zur Aktivierung der PA-FPs 405 nm benötigt wird, was bei lebenden Zellen zu Photoschädigung führen kann. PALM ist außerdem auf das Untersuchen von relativ langsamen

Prozessen beschränkt, die im Minutenbereich ablaufen [Hess et al., 2007; Shroff et al., 2008]. Der Grund hierfür ist, dass PA-FPs eine vergleichsweise geringe Photonenausbeute zeigen, was sich in der erreichbaren Auflösung niederschlägt. Synthetische Fluorophore dagegen emittieren mehrere tausend Photonen und zeigen steuerbare Schaltraten, wodurch eine höhere räumliche und zeitliche Auflösung möglich wird. Daher stellen organische Farbstoffe eine passende Alternative zu PA-FPs für hochauflösende Untersuchungen in lebenden Zellen dar.

**dSTORM.** Da die Zelle von Natur aus ein Redoxsystem besitzt, ist es möglich viele Farbstoffe ohne Additive intrazellulär zu schalten [Wombacher et al., 2010; van de Linde et al., 2012]. Hauptverantwortlich ist das in der Zelle vorherrschende Reduktionsmittel Glutathion, was zwischen 1 und 11 mM vorliegt [Schafer und Buettner, 2001; Smith et al., 1996]. Das Redoxpotential variiert von Zelllinie zu Zelllinie aber auch innerhalb der Zellkompartimente, wobei Mitochondrien die höchste Konzentration an Glutathion aufweisen [Jones, 2010]. Die erste Demonstration von Hochauflösung mit organischen Fluorophoren in lebenden Zellen wurde mit Hilfe des TMP-Tags gezeigt. Das Histon Protein H2B wurde mit Atto 655 markiert, wobei mit *d*STORM eine laterale Auflösung von 20 nm und gleichzeitig Dynamiken mit 10 s zeitlicher Auflösung erzielt werden konnten. Ähnlich zu sptPALM können auch organische Farbstoffe dazu eingesetzt werden, um proteinspezifisches Diffusionsverhalten zu untersuchen, z. B. in der Doppelmembran der Mitochondrien [Appelhans et al., 2012] oder im Zellkern [Benke et al., 2012]. Ebenso besteht die Möglichkeit PALM und *d*STORM zu kombinieren und so Mehrfarben Anwendungen zu realisieren [Wilmes et al., 2012].

Für die Auflösung dynamischer Prozesse bei gleichzeitig hoher räumlicher Auflösung muss die Anzahl der Lokalisationen pro Zeiteinheit hoch genug sein. Gemäß dem Nyquist-Shannon Theorem muss die Markierungsdichte doppelt so hoch sein wie die gewünschte Auflösung, d.h. bei einer räumlichen Auflösung von 20 nm muss die Struktur alle 10 nm mit einem Fluorophor markiert sein [Shannon, 1949; Patterson et al., 2010]. Je komplexer eine Struktur ist, desto mehr Lokalisationen sind erforderlich, um diese aufzulösen, was bei gleicher Schaltrate entsprechend länger dauert als bei einer einfachen Struktur. Folglich stellt die Erhöhung der Schaltrate eine Möglichkeit dar, um die zeitliche Auflösung zu verbessern. In lebenden Zellen ist dies jedoch nur durch stärkere Anregung machbar, welche wiederum das Risiko für Photoschädigung mit sich bringt. Alternativ kann eine höhere zeitliche Auflösung auch durch eine höhere Einzelmoleküldichte erreicht werden. Wenn jedoch die Dichten 1 Fluorophor

$\mu\text{m}^{-2}$  Bild $^{-1}$  übersteigen, geht dies zu Lasten der präzisen Lokalisation bei den meisten Algorithmen [Wolter et al., 2011], was Artefakte im rekonstruierten Bild verursacht. Hierfür gibt es Ansätze zur Entwicklung alternativer Algorithmen zur Positionsbestimmung überlappender Punktspreizfunktionen [Holden et al., 2011; Zhu et al., 2012], welche bereits für die dynamische Lebendzell-Hochauflösung von Zellorganellen mit Membransonden eingesetzt wurden [Shim et al., 2012], allerdings mit geringerer Präzision.

**Zielsetzung.** Die hochauflösende Mikroskopie, insbesondere die Lokalisationsmikroskopie, gewinnt zunehmend an Bedeutung, um Informationen über Strukturen und zelluläre Prozesse auf nahezu molekularer Ebene zu erhalten. Erstmals ist dies auch für lebende Zellen möglich, was für bisherige Methoden vergleichbarer Auflösung, wie Elektronenmikroskopie, unerreichbar war. In dieser Arbeit sollen hierfür verschiedene Markierungsmethoden und Fluoreszenzsonden ermittelt werden. Sie sollen zum einem auf Kompatibilität mit der lebenden Zelle und zum andern in Hinblick auf ihre Eignung für die Lokalisationsmikroskopie untersucht werden, um damit die Voraussetzungen zu schaffen für den erfolgreichen Einsatz in der Lebendzell-Hochauflösung. Des Weiteren werden in zwei angewandten Projekten mit Hilfe der Lokalisationsmikroskopie biologische Fragestellungen bearbeitet. In einer internationalen Kooperation soll die Struktur der Alzheimer verursachenden Amyloid Peptide mit *d*STORM untersucht werden und in einer Zusammenarbeit vor Ort werden Mikrodomänen in der Membran von Bakterien, sogenannte Lipid Rafts, mittels PALM strukturell und quantitativ analysiert. Beide Vorhaben werden in den folgenden Abschnitten kurz eingeführt.

## 1.4 Amyloid Peptide

Alzheimer gehört zu einer der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen unserer Zeit. Verantwortlich für diese meist im Alter auftretenden Art von Krankheiten sind Ansammlungen von zum Teil falsch gefaltete Proteinen. Bei Alzheimer spielen dabei  $\beta$ -Amyloide ( $A\beta$ ), die sich als sogenannte Plaques im Gehirn ablagern, eine entscheidende Rolle [Masters et al., 1985]. Diese führen letztendlich zur Degeneration der Neuronen. Betroffene erfahren eine stetige Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten, die sich beispielsweise durch nachlassende Gedächtnisleistung und beeinträchtigt Sprachvermögen äußert [Förstl und Kurz, 1999; Frank, 1994]. Diese Peptide entstehen durch die Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) [Kang et al., 1987], ein



integrales Transmembranprotein, welches durch Sekretasen auf zwei Weisen gespaltet werden kann. Bei der Restriktion mit  $\alpha$ -Sekretase wird APP im Bereich des  $\beta$ -Amyloids geschnitten, wodurch es zu keiner Freisetzung des Amyloid Peptids kommt. Dagegen wird bei der Spaltung mit  $\beta$ - und anschließend  $\gamma$ -Sekretase das wesentlich kürzere  $\beta$ -Amyloid freigesetzt, welches eine Länge von 40 oder 42 Aminosäuren aufweist. Pathologisch relevant ist das zum geringeren Anteil auftretende A $\beta$  42, welches eine erhöhte Tendenz zur Aggregation zeigt im Vergleich zum 40 Aminosäuren langen Peptid, welches den Hauptteil ausmacht [Glabe, 2008]. Mit Hilfe von *d*STORM wurde im Rahmen einer Kooperation die Aggregatbildung der  $\beta$ -Amyloide im Modellsystem (HeLa Zellen) untersucht und ihre verschiedenen Morphologien studiert.

## 1.5 Lipid Rafts in Bakterien

Zellen müssen ihre hoch komplexen Prozesse effizient steuern und flexibel auf Umwelteinflüsse reagieren können. Dies wird gewährleistet, indem einzelne Funktionen in subzelluläre Strukturen aufgeteilt werden, um Abläufe effektiv organisieren zu können. Ein Konzept dieser Kompartimentierung stellen sogenannte Lipid Rafts dar, Mikrodomänen in der Membran von eukaryotischen Zellen [Simons und Ikonen, 1997]. Diese sind Bereiche in der Zellmembran, die eine bestimmte Zusammensetzung von Proteinen und Lipiden aufweisen, welche sich von ihrer Umgebung unterscheidet. Kennzeichnend hierfür sind Cholesterol, Sphingolipide und die strukturgebenden Flotillin Proteine. Lipid Rafts sind vermutlich an der Steuerung von Signalübertragungswegen, Protein Sortierung und Membrantransport beteiligt [Lingwood und Simons, 2010]. Dieses breite Spektrum an Aufgaben wird mit der Heterogenität der Mikrodomänen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung erklärt. Genauere Untersuchungen zur Organisation von Lipid Rafts gestalten sich jedoch schwierig, da eukaryotische Zellen nur schwer zu manipulieren sind [Mishra und Joshi, 2007]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch Bakterien spezielle Domänen in der Membran aufweisen, die denen der eukaryotischen Zelle ähneln [López und Kolter, 2010]. Sie beinhalten flotillinähnliche Proteine, die eine zentrale Rolle bezüglich der Integrität der Lipid Rafts einnehmen. Bakterien stellen ein einfach zu manipulierendes Modellsystem dar, an dem die Funktionalität der Flotilline studiert werden kann. In diesem Projekt wurde mit PALM die strukturelle Anordnung beider Flotilline in *Bacillus subtilis* untersucht und ihre Verteilung vergleichend quantifiziert.



## 2 Methoden

### 2.1 Herstellung von Vektoren

**PCR und pJet-Ligation.** Zur Konstruktion eines Fusionsproteins muss die genetische Sequenz des Proteins (Insert) in den gewünschten Zielvektor eingebracht werden. Hierzu wurde das Insert aus einem anderen Plasmid oder aus cDNA durch eine PCR vervielfältigt (Tabelle 2.1 und 2.2) und über ein 1% Agarose Gel (peqGOLD Universal-Agarose, peqlab) in SB-Puffer aufgereinigt (Tabelle 2.3). Die Primer wurden so designt, dass das PCR Produkt zum Zielvektor passende Schnittstellen aufwies. Die verwendete Polymerase Phusion (Finnzymes) generiert glatte (blunt) Enden, weswegen das PCR Produkt direkt in den Klonierungsvektor pJet1.2/blunt (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben ligiert werden konnte. Der Ligationsansatz wurde anschließend in kompetente *E. coli* XL1 Blue transformiert.

**Transformation.** Dazu wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen 10 min auf Eis aufgetaut und der Ligationsansatz vorsichtig ohne zu resuspendieren eingerührt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Anschließend wurden 900 µL vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und für den Aufbau der Antibiotikaresistenz (hier Ampicillin) 30 min bei 37 °C geschüttelt. Bei einer Kanamycin Resistenz wurde 60 min inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 800 g für ~1.5 min abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 800 µL verworfen und der verbleibende Ansatz resuspendiert. Die Bakterien wurden auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin: 100 µg/mL, Kanamycin: 50 µg/mL) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

**Kolonie PCR und Sequenzierung.** Am nächsten Tag wurde mit einer Kolonie PCR (Taq-Polymerase) bei ca. 20 Bakterienklonen die Orientierung des Inserts im Vektor überprüft (Tabelle 2.1 und 2.2). Von einem positiven Klon wurde eine Übernachtskultur (ÜK) in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikum angesetzt, aus der mit einem Plasmidpräparationskit (NucleoSpin Plasmid,

**Tabelle 2.1:** PCR Programm einer Phusion und Taq PCR. Die Annealingtemperatur wird 1-2 °C unterhalb der niedrigsten Schmelztemperatur der beiden Primer gewählt. Bei der Phusion PCR richtet sich die Temperatur der ersten 5 Zyklen nach dem zu Beginn komplementären Teil der Primer zum Template. Für die restlichen 25 Zyklen gilt der gesamte Primer mit angehängten Schnittstellen.

Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Polymerase
1	initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
5	Denaturierung	98 °C	10 s	Phusion
	Annealing	primerabhängig	20 s	
	Elongation	72 °C	~ 3000 nt/min	
25	Denaturierung	98 °C	10 s	
	Annealing	primerabhängig	20 s	
	Elongation	72 °C	~ 3000 nt/min	
1	Kühlen	4 °C	∞	
1	initiale Denaturierung	95 °C	180 s	
30	Denaturierung	95 °C	30 s	Taq
	Annealing	primerabhängig	20 s	
	Elongation	72 °C	~ 1000 nt/min	
1	Kühlen	4 °C	∞	

**Tabelle 2.2:** Reaktionsansatz für Kolonie (Taq) und Phusion PCR. Das Wasser wurde vorgelegt und die Polymerase wurde als letztes zugegeben. Das Zusammenführen der Reagenzien erfolgte bei der Phusion PCR auf Eis. Als Template DNA dienten bei der Kolonie PCR die Bakterienklone.

Reagenz	Phusion	Taq
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL	ad 25 µL
Puffer	10 µL (5x)	2.5 µL (10x)
fwd. Primer	2 µL	0.5 µL
rev. Primer	2 µL	0.5 µL
10 mM dNTPs	1 µL	0.5 µL
DMSO	1.5 µL	0.5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	-	0.75 µL
Template DNA	10 ng	-
Polymerase	0.5 µL	0.2 µL

**Tabelle 2.3:** SB-Puffer für die Herstellung von Agarose Gelen und Orange G DNA Laufpuffer. Es wurde eine 20x Stocklösung von SB-Puffer angesetzt, deren pH-Wert auf 8.0-8.5 eingestellt wurde. Der Laufpuffer wurde vor der Gelbeladung zur DNA Probe hinzugefügt.

20x SB-Puffer		6x Orange G Laufpuffer	
8 g	NaOH-Plätzchen	6 mL	Glycerol
50 g	Borsäure	2 mL	EDTA (0.2 M)
ad 1 L	ddH <sub>2</sub> O	1.5 mL	ddH <sub>2</sub> O
		500 µL	Orange G (4%)

Macherey-Nagel) der Vektor isoliert und zur Sequenzierung eingeschickt wurde (GATC Biotech).

**Restriktion und Ligation in den Zielvektor.** War die Sequenz fehlerfrei, wurde die Plasmid DNA mit den passenden Restriktionsenzymen (FastDigest Enzyme, Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verdaut und das Insert über ein Agarose Gel aufgereinigt. Der Zielvektor wurde ebenso geschnitten und aufgereinigt. Wenn mit nur einem Enzym verdaut wurde, wurde der Vektor-Restriktion Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Thermo Scientific) zugesetzt, um eine Selbstligation im nächsten Schritt zu verhindern. Das Insert wurde anschließend in den geschnittenen Zielvektor ligiert (T4 DNA Ligase, Thermo Scientific, gemäß Herstellerangaben).

Es folgte erneut eine Transformation in XL1 Blue, Kolonie PCR, ÜK, Plasmidpräparation und Sequenzierung des fertigen Vektors.

**Lagerung.** Von der ÜK des Bakterienklons mit dem fertigen Vektorkonstrukt wurden 600 µL in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µL Glycerol versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde der Glycerolstock sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die aufgereinigte DNA wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Verwendete Primer.** Für die Herstellung des Vektors pHaloTag-H2B wurde H2B aus pSNAPf-H2B amplifiziert und über ApaI-Schnittstellen N-terminal in den Vektor pHaloTag kloniert. Dabei wurden folgende Primer verwendet:

Bezeichnung	Sequenz
085-H2B-ApaI-fwd	GGGCCCATGCCAGAGCCAGCGAAG
086-H2B-ApaI-rev	GGGCCCTTAGCGCTGGTGTACTTGGTG
001-pJet-fwd-seq	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
002-pJet-rev-seq	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
066-Haloseq-rev-fuerBam	CAGGACTTCCACATAATGGGGGTC

## 2.2 Probenvorbereitung

In der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie ist die Probenvorbereitung von essentieller Bedeutung. Da die Methode einzelmolekülsensitiv ist, ist sie anfälliger gegenüber unspezifischen Hintergrundsignalen als konventionelle Mikroskopietechniken. Insbesondere gilt es Signale, die von der Trägeroberfläche stammen zu vermeiden.

### 2.2.1 Markierung eukaryotischer Zellen

Die Optimierung von Färbeprotokollen, v. a. die Anpassung der Farbstoffkonzentrationen und die Absättigung der Deckglasoberflächen, spielt bei der Zellmarkierung eine große Rolle.

**Zellkultur.** In dieser Arbeit wurden hauptsächlich U2-OS, COS-7 und HeLa Zellen verwendet. Die Linien wurden in Standard T-25 Kulturflaschen (Greiner Bio-One) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im jeweiligen Nährmedium gezogen (DMEM Ham's F-12 für U2-OS und COS-7 bzw. RPMI-1640 für HeLa, Sigma). Allen Medien wurden 10 % FCS (PAA Laboratories), 2 mM L-Glutamin (PAA) und 100 U/mL Penicillin (PAA) und 100 µg/mL Streptomycin (PAA) zugesetzt. Bei ca. 80 % Konfluenz wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA (PAA) subkultiviert.

Zur Probenpräparation wurden die Zellen in eine 8-Well Lab-Tek II Deckglas-Kammer (Nunc, Thermo Scientific) transferiert ( $1.5-1.8 \times 10^4$  Zellen/Well) und einen Tag bei Kulturbedingungen inkubiert.

**Zellsynchronisation.** Um Mitosen innerhalb einer Zellpopulation anzureichern, gibt es verschiedene Möglichkeiten, je nachdem zu welchem Zeitpunkt der Zellzyklus arretiert werden soll [Banfalvi, 2011]. Da hier einzelne Mitosestadien untersucht werden sollten, kam der Inhibitor RO-3306 (Calbiochem) zum Einsatz. Dieser hemmt die Cyclin-abhängige Kinase I (CDK1), welche für die Progression von der G2 Phase in die Mitose verantwortlich ist [Vassilev et al., 2006]. Damit werden die Zellen direkt vor dem Eintritt in die Mitose reversibel arretiert. U2-OS Zellen wurden mit 10 µM RO-3306 in Kompletmedium für 19 h inkubiert, drei Mal mit Kompletmedium gewaschen und anschließend nach 15 min, 30 min, 45 min, 60 min und 90 min fixiert und gefärbt.

**Färbung lebender Zellen.** Um die unspezifische Bindung von Farbstoffen an die Glasoberfläche zu reduzieren, wurde das Lab-Tek mit einer 2 M wässrigen Glycinlösung für 30-60 min bei RT inkubiert [Klein et al., 2011]. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen in das Lab-Tek umgesetzt.

Am folgenden Tag wurden die Zellen mit dem gewünschten Vektor nach Herstellerangaben transfiziert, z. B. mit FuGENE HD (Promega). Es wurden dabei pro Well 0.15 µg DNA mit FuGENE HD im Verhältnis 1:3.5 (U2-OS) bzw. 1:3 (COS-7, HeLa) eingesetzt. Die Vektoren wurden entweder von New England Biolabs (NEB) bezogen, z. B. pCLIPf-H2B, pSNAPf-ADRβ2, selber hergestellt (siehe 2.1) oder von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt (z. B. pH2B-eDHFR).

Nach 24 h Genexpression erfolgte die Färbung mit dem jeweiligen tag-spezifischen Substrat. Eine Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzmarker gibt Tabelle 2.4. Die Stammlösungen der Farbstoffsubstrate wurden in Komplettmedium auf die Endkonzentrationen von ~0.2-2.5 µM verdünnt. Die Zellen wurden 30-60 min mit der Färbelösung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit Komplettmedium gewaschen und erneut für 30 min in Medium ohne Phenolrot inkubiert. Vor der Messung wurde das Medium noch einmal gewechselt oder gegen Schaltpuffer ausgetauscht. Für genauere Informationen siehe Manuskripte 2, 3, 4 und 6 [van de Linde et al., 2011b; Klein et al., 2011, 2012; Holm et al., 2014].

**Fixieren von Zellen.** Für die Fixierung von Zellen wurden je nach Struktur, die gefärbt werden sollte, zwei verschiedene Protokolle angewendet.

Nachdem die Zellen ein bis zwei Tage bis zur gewünschten Dichte im Lab-Tek angewachsen sind, wurden sie für das Standard Protokoll einmal kurz mit 37 °C warmen PBS gewaschen und für 10 min mit warmen Formaldehyd (4 % in PBS) bei RT fixiert. Im Falle der synchronisierten Zellen wurde 40 % Formaldehyd direkt ins Medium zu den Zellen gegeben, so dass die Endkonzentration 4 % betrug. Anschließend wurde mit PBS gewaschen, 3 min mit 0.1 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert, erneut gewaschen und für 30 min in PBS mit 5 % BSA abgesättigt.

Für Cytoskelettfärbungen wurde nach [Small et al., 1999] vorgegangen. Die Zellen wurden mit 0.3 % Glutaraldehyd und 0.25 % Triton X-100 in Cytoskelettpuffer (CP: 10 mM MES pH 6.1, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM Glucose und 5 mM MgCl<sub>2</sub>) für 2 min behandelt und anschließend für 10 min in 2 % Glutaraldehyd in CP fixiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen und für 7 min in PBS mit 0.1 % NaBH<sub>4</sub> inkubiert um Hintergrundfluoreszenz zu vermindern [Xu et al., 2012]. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen 30 min

**Tabelle 2.4:** Verschiedene chemische Tags mit den zugehörigen Farbstoffsubstraten, die für die Markierung lebender Zellen eingesetzt wurden.

Tag	Substrat	Hersteller
SNAP	SNAP-Cell TMR-Star SNAP-Cell 505 SNAP-Surface Alexa Fluor 647	NEB
	Cy3B Alexa Fluor 532 Atto 520	Eigenherstellung <sup>1</sup>
	Alexa Fluor 488	Richard Wombacher <sup>2</sup>
	Atto 655 Atto 700	Virginia Cornish <sup>3</sup>
	Si-Rhodamin	Kai Johnsson <sup>4</sup>
	CLIP	CLIP-Cell TMR-Star CLIP-Cell 505
Atto 565		ATTO-TEC
TMP		Alexa Fluor 488 Atto 520
	Atto 655 Atto 700	Virginia Cornish <sup>3</sup>
	Halo	HaloTag TMR Ligand
Atto 655		ATTO-TEC

<sup>1</sup> Lisa Pließ, Technische Assistentin. Der Farbstoff wurde an das Substrat gekoppelt und mit HPLC aufgereinigt.

<sup>2</sup> Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Universität Heidelberg

<sup>3</sup> Fakultät für Chemie, Columbia Universität, New York

<sup>4</sup> Fakultät für chemische Wissenschaften, EPFL, Lausanne



**Tabelle 2.5:** Übersicht über die verwendeten Sonden zur spezifischen Fluoreszenzmarkierung fixierter Zellen.

Typ	Spezifität	Konzentration	Hersteller
prim. Antikörper	Monoklonaler Maus Anti- $\beta$ -Tubulin IgG	10-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Sigma, T8328
	Polyklonaler Kaninchen Anti-CEP152 IgG	0.04-0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Sigma, HPA039408
	Monoklonaler Maus Anti-Beta Amyloid IgG	2-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Covance, SIG39320
sek. Antikörper	Ziege Anti-Maus Alexa Fluor 647 F(ab') <sub>2</sub>	10-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	lifetechnologies, A21237
	Ziege Anti-Kaninchen Alexa Fluor 647 F(ab') <sub>2</sub>	1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	lifetechnologies, A21246
	Ziege Anti-Maus Alexa Fluor 532 IgG	10-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	lifetechnologies, A11002

mit 5 % BSA in PBS abgesättigt.

**Färbung fixierter Zellen.** Für Kernfärbungen wurden die mit pSNAPf-H2B oder pCLIPf-H2B transfizierten, permeabilisierten Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  SNAP-Surface Alexa Fluor 647 bzw. CLIP-Surface Alexa Fluor 647 in PBS mit 0.5 % BSA für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit PBS gewaschen. Andere Strukturen wurden durch indirekte Immunfluoreszenz markiert. Hierzu wurde der primäre Antikörper in PBS mit 5 % BSA auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt und 45-60 min bei RT zu den Zellen gegeben. Nach mehreren Waschstufen mit PBS (optional mit 0.1 % Tween 20 versetzt) wurden die Zellen mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper in 5 % BSA für 30 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Die Probe wurde nach erneutem Waschen mit PBS bis zum Vermessen bei 4 °C in  $\sim 0.2$  %  $\text{NaN}_3$  in PBS gelagert [van de Linde et al., 2011b, Manuskript 2]. Für die Immunfärbung der Alzheimer verursachenden  $\beta$ -Amyloid Peptide, wurden HeLa Zellen 1 h mit dem Peptid (0.5  $\mu\text{M}$ ) in serumfreien Medium bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Amyloid Peptide mit einer indirekten Immunfluoreszenz markiert. Das genaue Protokoll ist in Kaminski Schierle et al., 2011 (siehe Manuskript 1) beschrieben. Eine Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzsonden und deren Konzentrationen ist in Tabelle 2.5 gezeigt.

### 2.2.2 *Bacillus subtilis*

Um Lipid Rafts in Bakterien hochaufgelöst darzustellen, wurden zwei damit assoziierte Proteine (Flotilline), FloA und FloT, mit dem photoaktivierbaren Protein mEos2 gekoppelt. Es wurden jeweils Stämme von *Bacillus subtilis* hergestellt, die mit diesen Fusionsproteinen transformiert wurden (AG Lopez). Für die vergleichende Analyse der Cluster wurde von Christian Franke (eigener Lehrstuhl) eine Python Routine entwickelt. Für detaillierte Informationen siehe Manuskript 8 [Schneider et al., 2014].

**Kultivierung und Fixierung.** Es wurde eine ÜK der transformierten Stämme in LB-Medium angesetzt, entweder von einer Plattenkultur oder aus einem Glycerolstock. Am nächsten Tag wurde 1 mL der ÜK abzentrifugiert und das Pellet in 4 % FA aufgenommen und für 7 min fixiert. Anschließend wurde drei Mal mit PBS gewaschen. Die Bakteriensuspension wurde zum gewünschten Grad verdünnt und auf die vorbehandelten 8-Well Deckglas-Kammern (Sarstedt) gegeben.

**Deckglasbehandlung.** Die Deckglas-Kammer wurde 30 min mit reinsten Ethanol bei 37 °C im Schüttelinkubator gesäubert. Nach Waschen mit ddH<sub>2</sub>O wurde die Kammer mit 5 M Natronlauge ebenfalls für 30 min bei 37 °C behandelt. Es wurde erneut gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Anschließend wurden die einzelnen Wells mit 0.05 mg/mL Poly-D-Lysin (Sigma) für 30-60 min beschichtet um das Anheften der Bakterien an die Glasoberfläche zu gewährleisten.

## 2.3 Hochoflösende Lokalisationsmikroskopie

### 2.3.1 Mikroskopaufbau

Alle Aufnahmen erfolgten an schwingungsgedämpften Weitfeld-Aufbauten. Es wurde ein inverses Mikroskop (IX-71, Olympus) verwendet, das mit einem 60x Öl-Immersion-Objektiv (PlanApo, NA 1.45, bzw. Apo N, NA 1.49, Olympus) ausgestattet ist und somit für verschiedene Beleuchtungsarten, z. B. *highly inclined and laminated optical sheet* (HILO) [Tokunaga et al., 2008] oder *total internal reflection* (TIRF) Mikroskopie genutzt werden kann. Die verschiedenen Laserlinien (siehe Tabelle 2.6) zur Anregung der Fluorophore sind über

**Tabelle 2.6:** Verwendete Laser und ihre maximale Ausgangsleistung.

Wellenlänge	Bezeichnung	Ausgangsleistung	Hersteller
403 nm	iBeam smart 405-S	120 mW	TOPTICA Photonics
404 nm	Cube 405-100C	100 mW	Coherent
488 nm	Sapphire 488 LP	100 mW	Coherent
514 nm	Genesis MX 514-500 STM	500 mW	Coherent
532 nm	Nano250	100 mW	Linios
558 nm	Genesis MX 561-500 STM	500 mW	Coherent
568 nm	Sapphire 568 LP	100 mW	Coherent
641 nm	Cube 640-100C	100 mW	Coherent
640 nm	Genesis MX 514-500 STM	1000 mW	Coherent

optische Bauteile (Spiegel, Linsen, dichroitische Strahlteiler und Filter) in das Mikroskop eingekoppelt. Der Laserstrahl wird auf die hintere Fokalebene des Objektivs fokussiert, wodurch eine parallele Weitfeldbeleuchtung der Probe ermöglicht wird. Das Fluoreszenzlicht wird durch das selbe Objektiv gesammelt und über einen dichroitischen Strahlteiler und Bandpassfilter auf eine hochsensitive EMCCD Kamera abgebildet. Für detaillierte Informationen zum Aufbau vergleiche Heilemann et al. [2009]; Wombacher et al. [2010] und Manuskripte 1-3 [Kaminski Schierle et al., 2011; van de Linde et al., 2011b; Klein et al., 2011].

### 2.3.2 Schaltpuffer

Um das Photoschalten der Farbstoffe zu induzieren, wurden fixierte Zellen in thiol-haltigem Puffer bei einem pH-Wert zwischen 7.4 und 8.3 gemessen. Bei Cyanin-Farbstoffen, wie Alexa Fluor 647, wurde dem Puffer zusätzlich Sauerstoff entzogen. Dies erfolgte über ein enzymatisches System [Benesch und Benesch, 1953; Uppoor und Niebergall, 1996], welches Glucose unter Sauerstoffverbrauch oxidiert (Tabelle 2.7). Ein typischer Schaltpuffer enthielt dabei 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethylamin (MEA-HCl, Applichem), 5% (w/v) Glucose, 1–100 U/mL Glucose-Oxidase (Sigma) und 200 U/mL Katalase (Sigma). Für einen effizienten Sauerstoffentzug ist bereits 1 U/mL Glucose-Oxidase ausreichend, wie an anderer Stelle beschrieben [Schäfer et al., 2013]. Der pH wurde mit KOH (4.25 M) eingestellt.

**Tabelle 2.7:** Stammlösungen für den Schaltpuffer. Alle Lösungen wurden aliquotiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Glucoselösung wurde zuvor sterilfiltriert. MEA wurde teils auch frisch angesetzt und für eine Woche bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Enzymmischung		10 % (w/v) Glucose		1 M MEA	
125 $\mu\text{L}$	1 M KCl	5 g	Glucose	1.136 g	MEA-HCl
110 $\mu\text{L}$	1 M Tris-HCl pH 7.0	5 mL	Glycerol	ad 10 mL	ddH <sub>2</sub> O
10000 Units	Glucose-Oxidase	ad 50 mL	ddH <sub>2</sub> O		
200000 Units	Katalase				
20 $\mu\text{L}$	1 M TCEP				
2.5 mL	Glycerol				
ad 5 mL	ddH <sub>2</sub> O				

### 2.3.3 Bildrekonstruktion

Um ein hochaufgelöstes Bild zu rekonstruieren, wurde eine Serie von 8000 bis 40000 Einzelmolekülbilder aufgenommen (Bildrate 10 Hz-130 Hz), je nachdem welche Struktur aufgelöst werden soll, wie dicht diese markiert wurde und welche Art von Fluoreszenzmarker gewählt wurde. Anschließend wurde mit der Software *rapidSTORM* jedes einzelne Fluorophor in jedem Bild lokalisiert. Der genaue Algorithmus von *rapidSTORM* ist in [Wolter et al., 2010, 2012] beschrieben. Die Position der einzelnen Emitter in jedem Bild wird über die Anpassung deren PSF mit einer zweidimensionalen Gauß-Funktion mit nm Präzision bestimmt. Die so ermittelten Lokalisationen aus der gesamten Bilderserie werden in einem 2D-Histogramm mit einer Pixelgröße von typischerweise 10 nm übertragen und man erhält das hochaufgelöste Bild. Eine Farbkodierung gibt Aufschluss darauf, wie oft in einem Pixel ein Fluorophor lokalisiert wurde. Durch die Wahl einer Mindestanzahl an Photonen für ein Fluorophor und eines Asymmetriefilters für die PSF, kann die Lokalisationspräzision des rekonstruierten Bilds verbessert werden und Multi-Emitter-Ereignisse (gleichzeitige Emission mehrerer Moleküle innerhalb der Beugungsgrenze) reduziert werden. Außerdem können Fluorophore, die über mehrere Einzelbilder emittieren, mit dem *track emissions* Filter (Kalman-Filter) zu einer einzelnen Lokalisation zusammengefasst werden.

## 2.4 Photoschädigung

Um die Auswirkung der Laseranregung auf die lebende Zelle zu untersuchen, wurden eine U2-OS Zelllinie etabliert, die mit pCLIPf-H2B stabil transfiziert

wurde (U2-OS-SNAP-H2B). Für die Messungen zur Photoschädigung wurden die Zellen in 35 mm Schalen mit einem 500  $\mu\text{m}$  Gitter (ibidi) ein bis zwei Tage kultiviert. Anschließend wurden einzelne Zellen am Weitfeld-Aufbau mit unterschiedlichen Laserleistungen und Wellenlängen für jeweils 4 min bestrahlt. Mit Hilfe des Gitters konnten die bestrahlten Zellen wieder gefunden werden und in einer Biostation (Nikon) unter Kulturbedingungen 20-24 h im Phasenkontrast beobachtet werden. Dabei wurde verfolgt, ob die bestrahlten Zellen noch teilungsfähig waren, Apoptose einleiteten oder andere morphologische Auffälligkeiten zeigten. Die Herstellung der Zelllinie und die Messungen wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Sina Wäldchen sowohl mit ungefärbten als auch mit CLIP-Cell TMR-Star gefärbten Zellen durchgeführt.



### 3 Liste der Publikationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Manuskripte, die unter dem Abschnitt Publikationen zu finden sind, veröffentlicht bzw. eingereicht:

1. Kaminski Schierle, G. S., van de Linde, S., Erdelyi, M., Esbjörner, E. K., Klein, T., Rees, E., Bertoncini, C. W., Dobson, C. M., Sauer, M., und Kaminski, C. F. (2011). In situ measurements of the formation and morphology of intracellular beta-amyloid fibrils by super-resolution fluorescence imaging. *J Am Chem Soc*, 133(33):12902-5
2. van de Linde, S., Löschberger, A., Klein, T., Heidbreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., und Sauer, M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc*, 6(7):991-1009
3. Klein, T., Löschberger, A., Proppert, S., Wolter, S., van de Linde, S., und Sauer, M. (2011). Live-cell dstorm with snap-tag fusion proteins. *Nat Methods*, 8(1):7-9
4. Klein, T., van de Linde, S., und Sauer, M. (2012). Live-cell super-resolution imaging goes multicolor. *ChemBioChem*, 13(13):1861-3
5. van de Linde, S., Aufmkolk, S., Franke, C., Holm, T., Klein, T., Löschberger, A., Proppert, S., Wolter, S., und Sauer, M. (2013). Investigating cellular structures at the nanoscale with organic fluorophores. *Chem Biol*, 20(1):8-18
6. Holm, T., Klein, T., Löschberger, A., Klamp, T., Wiebusch, G., van de Linde, S., und Sauer, M. (2014). A blueprint for cost-efficient localization microscopy. *ChemPhysChem*, 15(4):651-654
7. Klein, T., Proppert, S., und Sauer, M. (2014). Eight years of single-molecule localization microscopy. *Histochem Cell Biol*, vor Druck online publiziert
8. Schneider, J., Klein, T., Mielich-Süss, B., Koch, G., Franke, C., Kuipers, O., Kovacs, A., Sauer, M., und Lopez, D. (2014). Spatio-temporal remodeling of bacterial membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci USA*, eingereicht





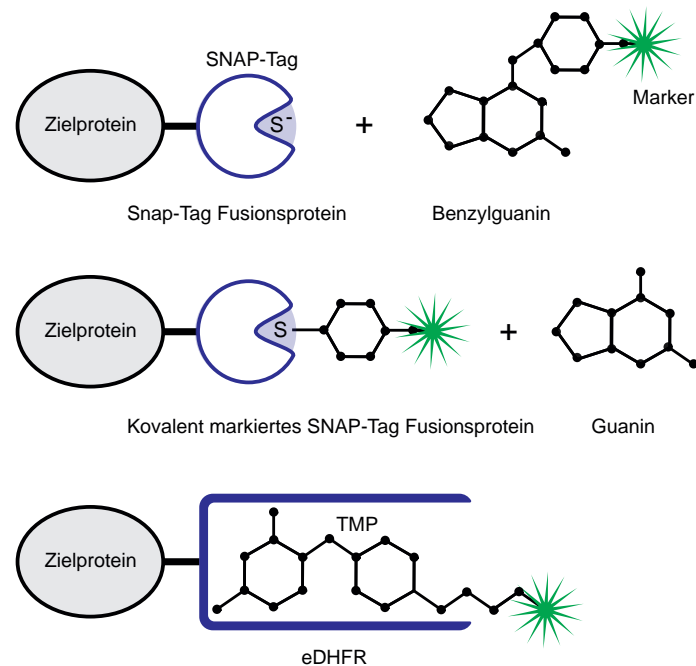
## 4 Weitere Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Lebendzell-*d*STORM mit organischen Fluorophoren

In den ersten Versuchen hochauflösende Mikroskopie auf lebende Zellen anzuwenden, kamen photoaktivierbare fluoreszierende Proteine (PA-FPs) zum Einsatz. Diese bringen den Vorteil, dass sie genetisch an ihr Zielprotein fusioniert werden und damit auf einfachem Weg spezifische, stöchiometrische Markierung erlauben, ohne dabei die Zelle nennenswert zu beeinflussen [Lippincott-Schwartz und Patterson, 2003]. PA-FPs wurden erfolgreich für die Lokalisationsmikroskopie in lebenden Zellen eingesetzt um Strukturen weit unterhalb der Beugungsgrenze zu untersuchen [Biteen et al., 2008; Hess et al., 2007; Shroff et al., 2008; Manley et al., 2008]. Jedoch besitzen FPs eine vergleichsweise niedrige Quantenausbeute (einige hundert Photonen) und sind von eher geringer Photostabilität, beides Faktoren, die für die erreichbare räumliche und zeitliche Auflösung von großer Bedeutung sind. Organische Farbstoffe dagegen können mehrere tausend Photonen emittieren und sind bei moderater Anregung über längere Zeit photostabil. Sie können mehrfach detektiert werden und zeigen anpassbare Schaltraten. Mit diesen photophysikalischen Eigenschaften sind organische Fluorophore bestens geeignet, um die räumlich-zeitliche Auflösung in lebenden Zellen zu verbessern. Allerdings gestaltet sich das spezifische Markieren in lebenden Zellen mit organischen Farbstoffen schwieriger als bei FPs.

#### 4.1.1 Chemische Tags

Mit Hilfe chemischer Tags ist es möglich, lebende Zellen mit organischen Fluorophoren zu markieren. Dabei wird das Zielprotein mit einer Polypeptidsequenz genetisch modifiziert, welche spezifisch mit einem fluoreszenzmarkierten Substrat reagiert. Es sind verschiedene, zum Großteil kommerziell erhältliche Tags verfügbar. Allen ist gemeinsam, dass die Markierung auf Grund einer Enzymreaktion zwischen dem Polypeptid Tag und dem Substrat erfolgt. Die Bindung kann kovalent sein, wie bei SNAP- [Keppler et al., 2003, 2004], CLIP-



**Abbildung 4.1:** Reaktionsmechanismus von chemischen Tags am Beispiel von SNAP- und TMP-Tag. Die Reaktion der  $O^6$ -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase mit farbstoffmarkierten  $O^6$ -Benzylguanin Derivaten führt zu dem kovalenten Transfer des Fluorophors auf ein reaktives Cystein im SNAP-Tag. Beim TMP-Tag ist die hohe Affinität der *E. coli* Dihydrofolatreduktase zu Trimethoprim, welches mit einem Fluorophor gekoppelt ist, für die nicht kovalente Markierung des Zielproteins verantwortlich.

[Gautier et al., 2008] und HaloTag [Los und Wood, 2007; Los et al., 2008], oder nicht kovalent, wie bei TMP-Tag [Miller et al., 2005] (Abbildung 4.1). Eine kovalente Form des TMP-Tags [Gallagher et al., 2009] war in dieser Arbeit nicht verfügbar. Die meisten chemischen Tags sind kleiner als FPs, beispielsweise besitzt SNAP-Tag eine Größe von 20 kDa im Gegensatz zu GFP mit 27 kDa [Sauer, 2013]. Dies stellt einen weiteren Vorteil von Tags für die hochauflösende Mikroskopie dar, bei der die Größe der Sonden durchaus ins Gewicht fällt, bedenkt man das im nm-Bereich liegende Auflösungsvermögen.

Damit chemische Tags für die Lokalisationsmikroskopie erfolgreich eingesetzt werden können, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen müssen die verwendeten Fluorophore (i) reversibel schaltbar sein unter physiologischen Bedingungen, (ii) der Farbstoff membranpermeabel sein, (iii) sein Zielprotein spezifisch markieren und (iv) möglichst wenig Hintergrund verursachen. Daher ist es erforderlich, Farbstoffe und Tags auf ihre Eignung für die

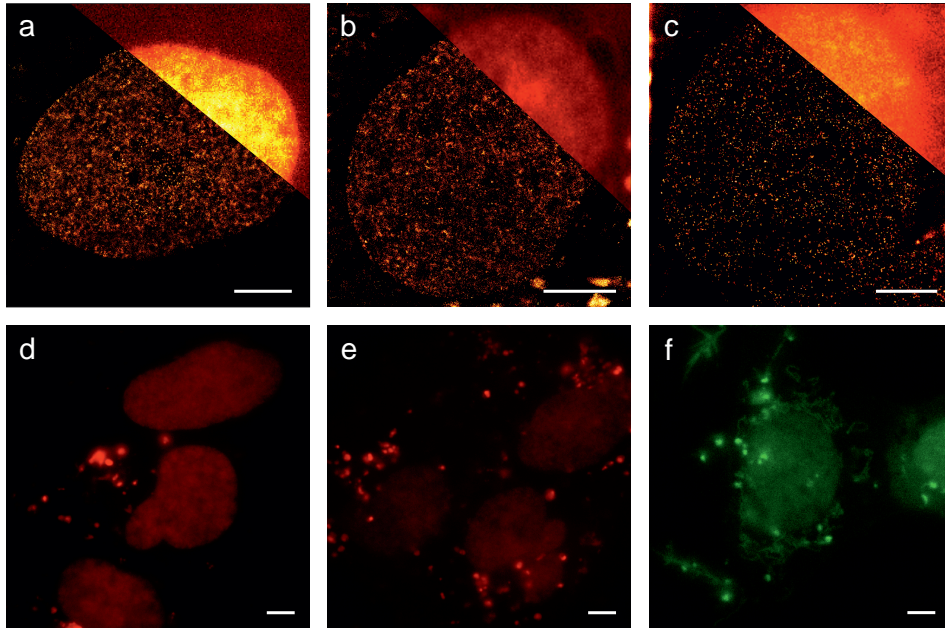
**Tabelle 4.1:** Ergebnisse der dSTORM Lebendzell-Experimente mit chemischen Tags. SNAP-, CLIP-, TMP- und HaloTag wurden mit den jeweils angegebenen Farbstoffen anhand von H2B Fusionsproteinen getestet. Für SNAP-Surface Alexa Fluor 647 wurde der Membranrezeptor pSNAPf-ADR $\beta$ 2 verwendet. Die Bewertung setzte sich aus Zellpermeabilität (außer bei SNAP-Surface Alexa Fluor 647), spezifische Markierung, Hintergrund und Blinkverhalten zusammen (+++ : sehr gut geeignet, ++ : gut geeignet, + : mäßig geeignet, - : ungeeignet für dSTORM in lebenden Zellen).

Tag	Substrat	Bewertung
SNAP	SNAP-Cell TMR-Star	+++
	SNAP-Cell 505	+++
	SNAP-Surface Alexa Fluor 647	+++
	Cy3B	-
	Alexa Fluor 488	-
	Alexa Fluor 532	-
	Atto 520	-
	Atto 655	++
Atto 700	+	
CLIP	CLIP-Cell TMR-Star	+++
	CLIP-Cell 505	+++
	Atto 565	-
TMP	Alexa Fluor 488	-
	Atto 520	-
	Atto 655	++
	Atto 700	+
Halo	HaloTag TMR Ligand	++
	Atto 655	++

Hochauflösung zu untersuchen, um sie dann optimal dafür nutzen zu können. Als Ergänzung zu den Ergebnissen aus Manuskript 3 und 4 [Klein et al., 2011, 2012] wurden weitere Experimente mit verschiedenen Farbstoffen und Tags durchgeführt und deren Einsatz als Lebendzell-Marker für dSTORM bewertet (Tabelle 4.1). Als Modellstruktur wurde auch hier das Histon Protein H2B verwendet, um den Zellkern in U2-OS, HeLa und COS-7 Zellen zu markieren (Abbildung 4.2 und 4.3). Die eingesetzten Farbstoffkonzentrationen variierten zwischen 0.2  $\mu$ M und 2.5  $\mu$ M. Dabei wurde eine Serie von 5000–10000 Einzelbildern aufgenommen mit einer Bildrate zwischen 30 Hz und 50 Hz. Die Leistung der den Farbstoffen entsprechend gewählten Anregungswellenlänge betrug  $\sim 1 \text{ kW cm}^{-2}$ .

**TMP-Tag.** Der TMP-Tag nutzt die hohe Affinität von Trimethoprim (TMP), einem Antibiotikum, zur *E. coli* Dihydrofolatreduktase. Diese wird genetisch an das Zielprotein fusioniert und durch die Zugabe von fluoreszenzgekoppelten TMP markiert [Miller et al., 2005]. Mit dem TMP-Tag wurde zum ersten Mal *d*STORM in lebenden Zellen demonstriert unter Verwendung des Farbstoffs Atto 655 [Wombacher et al., 2010]. Daher war dieser die erste Wahl und die Referenz um weitere Farbstoff-Tag Kombinationen zu untersuchen. Als Oxazin-Farbstoff wird Atto 655 sehr leicht durch die intrazellulär anwesenden Thiolverbindungen, wie Glutathion, zuerst zum Farbstoffradikal und anschließend zur nicht fluoreszenten Leukoform reduziert [Heilemann et al., 2009; van de Linde et al., 2011a]. Da dieser Aus-Zustand sehr langlebig ist, konnten nur vergleichsweise wenige Farbstoffe lokalisiert werden. Das hat zur Folge, dass die Struktur im rekonstruierten Bild löchrig, also nur gering markiert, erscheint. Dieser Umstand konnte verbessert werden, indem neben der Auslesewellenlänge bei 640 nm zusätzlich mit 405 nm ( $< 0.1 \text{ kW cm}^{-2}$ ) gepulst eingestrahlt wurde. Dadurch wurden die Farbstoffradikale angeregt und wieder in den Singulett Grundzustand gebracht, wodurch sie der Reduktionsreaktion zur Leukoform entzogen wurden. Die Farbstoffmoleküle konnten erneut Fluoreszenzzyklen durchlaufen und somit lokalisiert werden [van de Linde et al., 2011a]. Die Anzahl der Lokalisationen steigt und die hochaufgelöste Struktur wurde durchgängiger (Abbildung 4.2 a, d).

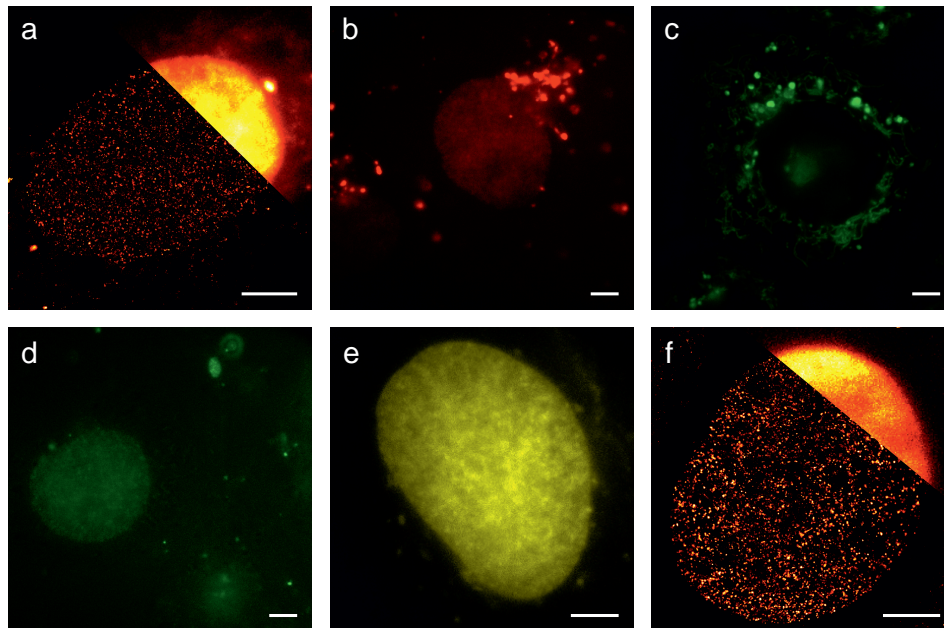
Eine weitere Herausforderung stellt die unspezifische Bindung und Aggregation der Fluorophor-Substrate innerhalb der Zelle dar. Bei Atto 655 fiel diese mäßig aus und es war möglich Zellkerne zu wählen, ohne störende unspezifische Farbstoff Akkumulationen. Atto 700 dagegen zeigte massive Aggregation im Zytoplasma der Zellen. Dieser kontinuierlich, sehr helle, fluoreszierende Hintergrund in Kombination mit schwacher Zielmarkierung, machen diesen TMP Liganden nur mäßig geeignet für die Lebendzell-Hochauflösung (Abbildung 4.2 b, e). Eine andere Art von Unspezifität stellte die Bindung an andere Zellorganellen, wie Mitochondrien, dar. Atto 520, ein Xanthen-Derivat ähnlich den Rhodamin-Farbstoffen, zeigte zwar spezifische Kernlokalisierung, aber zusätzlich mitochondriale Färbung (Abbildung 4.2 f). Photoschalten unter physiologischen Bedingungen war vorhanden, doch war die Spezifität der Markierung nicht gegeben. Eine der Hauptursachen von unspezifischer oder ineffizienter Markierung ist in der Struktur der Farbstoffe begründet [van de Linde et al., 2013, Manuskript 5]. Die positive Ladung von Atto 520 unterstützt die Membrangängigkeit des Substrates, jedoch trägt diese sehr wahrscheinlich auch zur Bindung an Mitochondrien bei, ein von einer Doppelmembran umschlossenes Organell. Im Fall von negativ geladenen Farbstoffen, wie Alexa Fluor 488, war



**Abbildung 4.2:** U2-OS Zellen, transient transfiziert mit pH2B-eDHFR. Lebende Zellen wurden gefärbt mit  $2\ \mu\text{M}$  TMP-Atto 655 (a, d), TMP-Atto 700 (b, e), TMP-Alexa Fluor 488 (c) und  $2.5\ \mu\text{M}$  TMP-Atto 520 (f). Abbildungen (a–c) zeigen rekonstruierte *d*STORM Bilder mit Ausschnitten der zugehörigen Weitfeld-Fluoreszenzbilder in den rechten oberen Ecken. Die untere Reihe zeigt klassische Weitfeld-Fluoreszenzbilder, welche die verschiedenen Grade der Aggregation und unspezifischen Bindung der Substrate verdeutlichen. Maßstabsbalken entsprechen  $5\ \mu\text{m}$ .

dagegen die Zellpermeabilität stark eingeschränkt, weswegen die Markierung des Nukleus nur sehr ineffizient erfolgte (Abbildung 4.2 c).

**SNAP- und CLIP-Tag.** SNAP- und CLIP-Tag sind kommerziell erhältliche Alternativen, um Proteine in lebenden Zellen zu markieren. Der Mechanismus beruht auf der Reaktion der  $\text{O}^6$ -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase mit farbstoffmodifizierten  $\text{O}^6$ -Benzylguanin (BG) Substraten (SNAP) bzw. in abgeänderter Form mit  $\text{O}^2$ -Benzylcytosin (BC) Derivaten (CLIP) [Keppler et al., 2003; Gautier et al., 2008]. Koppelte man Atto 655 an BG und färbte Zellen, die H2B-SNAP exprimierten, verhielt es sich ähnlich wie mit TMP-Atto 655. Das Substrat war zellpermeabel und markierte den Zellkern, jedoch war der unspezifische Hintergrund höher als bei TMP, d. h. Farbstoffaggregate im Zytoplasma um den Nukleus erschwerten die *d*STORM Aufnahme (Abbildung



**Abbildung 4.3:** Transient transfizierte U2-OS Zellen, die H2B-SNAP (a–e) bzw. H2B-HaloTag (f) exprimieren. Lebende Zellen wurden gefärbt mit 1  $\mu\text{M}$  (a) bzw. 2  $\mu\text{M}$  (b) BG-Atto 655, 1  $\mu\text{M}$  BG-Atto 520 (c), 1.2  $\mu\text{M}$  BG-Alexa Fluor 488 (d) und 1  $\mu\text{M}$  BG-Cy3B. H2B-HaloTag wurde mit 1  $\mu\text{M}$  Atto 655-HaloTag Ligand markiert (f). Abbildungen (a) und (f) zeigen *d*STORM Bilder mit Ausschnitten der zugehörigen Weitfeld-Fluoreszenzbilder in den rechten oberen Ecken. Abbildungen (b–e) zeigen Weitfeld-Fluoreszenzbilder mit unspezifischer Bindung des Farbstoffs (b, c) und schwache Markierung des Zielproteins (d). BG-Cy3B zeigte kein reversibles Schalten, aber spezifische Markierung (e). Maßstabsbalken entsprechen 5  $\mu\text{m}$ .

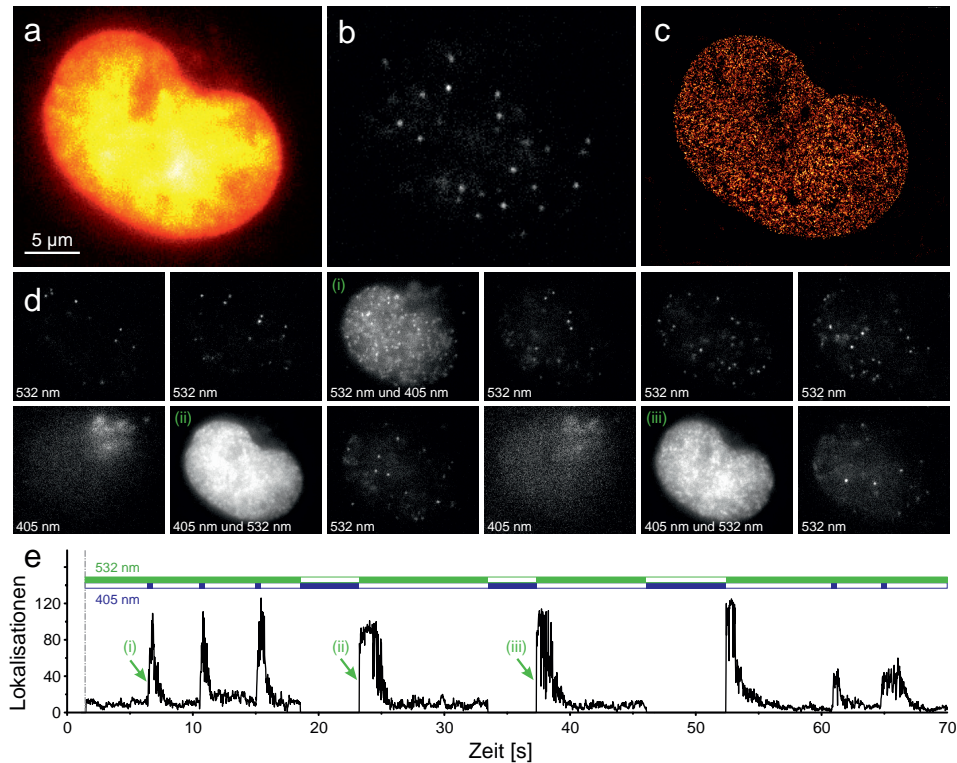
4.3 a, b). Gleiches galt für BG-Atto 700. Dies könnte in den unterschiedlichen Hydrophobizitäten von Benzylguanin und Trimethoprim begründet sein. Damit hat nicht nur die Art des verwendeten Fluorophors Einfluss auf die Effizienz eines chemischen Tags, sondern auch die Eigenschaften des Liganden mit dem er gekoppelt ist. Dies war auch bei Atto 520 zu beobachten. Während an TMP gekoppelt eine Färbung des Zellkerns festzustellen war, fand bei BG-Atto 520 keine Markierung des Zielproteins statt. Es waren lediglich die Mitochondrien unspezifisch gefärbt (Abbildung 4.3 c). Durch seine kationische hydrophobe Eigenschaft ist dieser Farbstoff einerseits sehr gut membranpermeabel, andererseits zeigt er dadurch eine hohe Affinität zu Mitochondrien, die ein hohes reduzierendes Potential besitzen. Das gleiche Bild zeigte sich bei einer CLIP-Tag Färbung mit BC-Atto 565, ein neutrales, aber ebenso hydrophobes

Molekül. Cy3B, ein Cyanin-Farbstoff, wies eine hoch spezifische Markierung der Zielstruktur auf und verursachte dabei nur minimalen Hintergrund (Abbildung 4.3 e). Es war allerdings kein reversibles Photoschalten der Farbstoffe zu beobachten. Für herkömmliche Fluoreszenzmikroskopie hingegen, kann das Substrat eingesetzt werden. Im Fall von Alexa Fluor 532 wurde weder der Kern noch andere Strukturen in der Zelle markiert. Das Substrat ist demnach nicht zellpermeabel, was sich durch die zwei negativ geladenen Sulfonsäuregruppen des Farbstoffes erklären lässt. Alexa Fluor 488 war auch als BG-Substrat nur minimal membrangängig und zeigte nur eine sehr schwache Kernfärbung (Abbildung 4.3 d). Auch dieser Farbstoff weist zwei Sulfonsäuregruppen auf, was die Permeabilität stark vermindert. Im Vergleich zu Alexa Fluor 532 ist dieses Molekül etwas kleiner, was möglicherweise die minimal höhere Membrangängigkeit erklärt. Entfernt man die Sulfonsäuregruppen, erhält man den als SNAP und CLIP Substrat kommerziell verfügbaren 505 Farbstoff. Dieser erwies sich als hervorragender Ligand, genauso wie SNAP/CLIP-Cell TMR-Star (siehe Manuskript 3 und 4).

Beide Rhodamin-Derivate zeigten bei beiden Tags sowohl spezifische Markierung, minimalen intrazellulären Hintergrund und reversibles Photoschalten unter physiologischen Bedingungen. Dabei konnten benachbarte H2B Domänen mit einem Abstand von  $< 100$  nm aufgelöst werden, was weit unterhalb der Beugungsgrenze liegt [Klein et al., 2011, Manuskript 3]. Bei Rhodaminen bilden Farbstoffradikale den stabilen Aus-Zustand [van de Linde et al., 2011a]. Dies konnte eindrucksvoll demonstriert werden, ähnlich wie bei TMP-Atto 655, indem SNAP-Cell TMR-Star bei 532 nm ausgelesen wurde und zusätzlich bei 405 nm die Radikale angeregt wurden (Abbildung 4.4). Diese wurden daraufhin sehr effektiv in den Singulett Zustand zurückgebracht, was in einem Anstieg der Einzelmoleküldichte resultierte. Die Direktanregung der Farbstoffradikale ermöglicht damit das genaue Einstellen der Dichte an Fluorophoren im dSTORM Experiment. Der Vorgang war hierbei wesentlich effizienter als bei Atto 655, der zusätzlich die Leukoform, die nicht angeregt wird, als Aus-Zustand besitzt. Daher ist die Anzahl der Lokalisationen im rekonstruierten Bild bei TMR und 505 höher als bei Atto 655 und die Struktur erscheint dichter markiert. Beide Farbstoffe konnten verlässlich in verschiedenen menschlichen und COS-7 Zellen eingesetzt werden. Dennoch sollte bei der Wahl des Substrates die Zelllinie berücksichtigt werden. Versuche in Mauseellen ergaben, dass SNAP-Cell TMR-Star den Zellkern effizient markiert, SNAP-Cell 505 dagegen keine Kernlokalisation aufwies, sondern nur bis in das Zytoplasma gelangte [Klein et al., 2011, Manuskript 3].

Unspezifische Farbstoffaggregate stellten bei TMR und 505 kein Problem dar,





**Abbildung 4.4:** Lebendzell-*d*STORM mit SNAP-Tag. (a) Weitfeld-Fluoreszenzbild der Histone H2B-SNAP einer COS-7 Zelle, gefärbt mit 1  $\mu$ M SNAP-Cell TMR-Star. Maßstabsbalken 5  $\mu$ m. (b) Einzelmolekül-Fluoreszenzbild des selben Kerns bei 532 nm Anregung mit  $\sim 1 \text{ kW cm}^{-2}$ , was Photoschalten induziert. (c) Rekonstruiertes *d*STORM Bild aus 10000 Einzelbildern, aufgenommen mit 50 Hz. (d) Zeitreihen *d*STORM Aufnahmen bei 532 nm mit und ohne zusätzlicher Bestrahlung bei 405 nm mit  $0.04 \text{ kW cm}^{-2}$ . Maßstabsbalken 5  $\mu$ m. (e) Anzahl der Lokalisationen aufgetragen gegen die Zeit. Durch Direktanregung der Farbstoffradikale bei 405 nm (violette Balken oberhalb des Graphen) steigt die Anzahl der Lokalisationen. Längere Bestrahlung mit ausschließlich 405 nm kann nahezu die gesamte fluoreszente Struktur wiederherstellen (siehe ii und iii in (d)). Die Signaldichten in i-iii sind zu hoch für eine angemessene *d*STORM Aufnahme und dienen nur zu Demonstrationszwecken. Mit Erlaubnis bearbeitet nach [Klein et al., 2011].

jedoch tendieren Rhodamine dazu, unspezifisch an Deckglasoberflächen zu adsorbieren. Eine Beschichtung mit 2 M Glycinlösung erwies sich als effektive Strategie, um den extrazellulären Hintergrund zu minimieren, während BSA oder Poly-Lysin nicht den gewünschten Effekt erzielten [Klein et al., 2011, Manuskript 3].

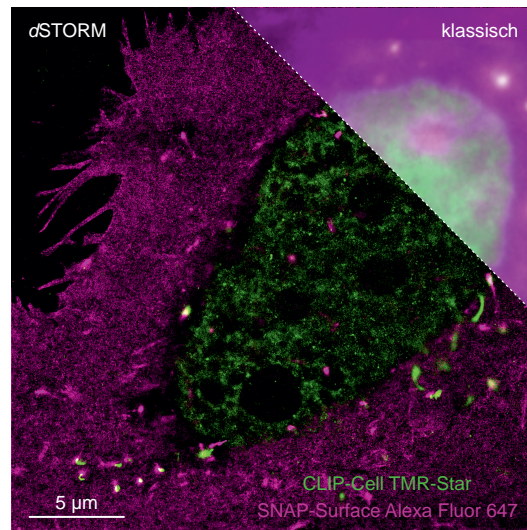


**HaloTag.** Der ebenfalls kommerzielle HaloTag basiert auf der Hydrolaseaktivität der Haloalkan Dehalogenase, die kovalent an den HaloTag Liganden bindet, ein Chloralkan, welches mit Fluorophoren oder anderen Molekülen, z. B. Biotin gekoppelt ist [Los et al., 2008]. Der erhältliche HaloTag TMR Ligand zeichnete sich durch spezifische, hintergrundarme Bindung aus und zeigte reversibles Schaltverhalten. Atto 655 gebunden an HaloTag Ligand zeigte gute Zellpermeabilität und spezifische Markierung des Zielproteins (Abbildung 4.3 f). Im Vergleich zu SNAP- oder TMP-Tag verursachte dieses Substrat hier am wenigsten zyttoplasmatischen Hintergrund und nur im geringen Maße Aggregation. Reaktivierung bei 405 nm war auch hier unabdingbar, um genügend Lokalisationen für ein hochaufgelöstes Bild zu erhalten.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Lokalisationsmikroskopie mit organischen Fluorophoren in lebenden Zellen möglich ist. Da die Zelle ihr eigenes reduzierendes Milieu, hauptsächlich bedingt durch die Anwesenheit von 1–10 mM Glutathion [Schafer und Buettner, 2001; Smith et al., 1996], bereitstellt, können organische Fluorophore unter physiologischen Bedingungen reversibel geschaltet werden [van de Linde et al., 2012]. Dies wurde nicht nur an High-End-Forschungsgeräten bewiesen, sondern auch mit einem, um 90 % günstigeren, Praktikumsaufbau verwirklicht, was die Verlässlichkeit dieser Methode demonstriert. Für detailliertere Informationen siehe Manuskript 6 [Holm et al., 2014]. Die Farbstoffe und Tags sollten dennoch sorgfältig gewählt werden unter Berücksichtigung der Zelllinie und des Zielproteins, damit sie erfolgreich für die Hochauflösung eingesetzt werden können.

#### 4.1.2 Zwei Farben Lebendzell-dSTORM

Auf Grund der Spezifität der Bindung zwischen Substrat und zugehörigen Polypeptid Tag, können chemische Tags orthogonal zueinander eingesetzt werden, wodurch Mehrfarben Anwendungen in lebenden Zellen möglich werden. Bisher wurde dafür eine Kombination aus einem organischen Fluorophor und PA-FPs eingesetzt [Wilmes et al., 2012] oder ein Tag in Verbindung mit direkt markierten Proteinen [Jones et al., 2011]. Zwei Farben dSTORM in lebenden Zellen mit zwei verschiedenen chemischen Tags ist ebenfalls möglich (Abbildung 4.5). CLIP-H2B wurde mit TMR markiert und als zweite Struktur die Membran gefärbt [Klein et al., 2012, Manuskript 4]. Hierzu wurde der adrenerge Rezeptor  $\beta$ -2 über SNAP-Tag mit Alexa Fluor 647 markiert. Auf Grund der negativen Ladung von Alexa Fluor 647, ist der Farbstoff membranimpermeabel, was die Färbung des außenständigen SNAP-Tags des Rezeptors begünstigte und zusätzlichen intrazellulären Hintergrund verhinderte. Da der Farbstoff



**Abbildung 4.5:** Zwei Farben Lebendzell-*d*STORM mit SNAP- und CLIP-Tag. U2-OS Zellen wurden transient transfiziert mit pSNAPf-ADR $\beta$ 2 (magenta) und pCLIPf-H2B (grün). Nach 24 h wurde mit 1  $\mu$ M SNAP-Surface Alexa Fluor 647 und 0.2  $\mu$ M CLIP-Cell TMR-Star für 45 min gefärbt. Um Photoschalten von Alexa Fluor 647 zu induzieren, wurde das Vollmedium durch Schaltpuffer ausgetauscht, der 100 mM reduziertes Glutathion, 5 % Glucose, 4 units/mL Glucose-Oxidase und 80 units/mL Katalase in DMEM ohne Phenolrot (pH 7.9) enthielt. Beide Kanäle wurden sequenziell mit einer Leistungsdichte von  $\sim 1 \text{ kW cm}^{-2}$  bei 641 nm und 50 Hz bzw. 532 nm und 33 Hz aufgenommen. Oben rechts ist das klassische Weitfeld-Fluoreszenzbild gezeigt. Mit Erlaubnis bearbeitet nach [Klein et al., 2012], © 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

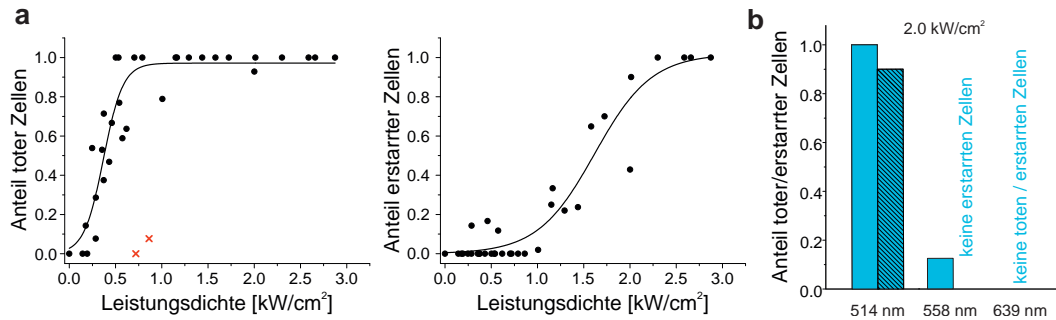
extrazellulär bindet, hat dieser keinen Zugang zum zellulären GSH. Um Photoschalten von Alexa Fluor 647 zu induzieren, muss folglich dem Medium ein Reduktionsmittel zugesetzt werden. Dies konnte durch Zugabe von MEA erreicht werden, was jedoch bereits bei wenigen Millimolar das Schalten von TMR im Zellkern negativ beeinflusste. Durch Hinzufügen von 100 mM Glutathion und leichter Reduktion des Sauerstoffgehalts konnte dagegen bei beiden Farbstoffen reversibles Schalten gewährleistet werden. Die Zellen wiesen nach zwei stündiger Inkubation unter diesen Bedingungen im Vergleich zu Zellen im Medium keine morphologischen Besonderheiten auf. Eine Trypanblaufärbung, um tote Zellen sichtbar zu machen, fiel ebenfalls negativ aus. Die Aufnahme der beiden spektral gut separierten Farbstoffe erfolgte sequenziell mit zwei Kameras. Zuerst wurde Alexa Fluor 647 ausgelesen, gefolgt von TMR, um Photozerstörung des roten Fluorophors durch das kürzerwellige Anregungslicht von TMR zu vermeiden. Chromatische Aberrationen wurden mit einer

nichtlinearen Transformationsmatrix korrigiert, die mit Hilfe von TetraSpecks (lifetechnologies) und dem Fiji Plugin bUnwarpJ [Arganda-Carreras et al., 2006] erstellt wurde.

### 4.1.3 Photoschädigung

Eine zentrale Frage, die sich jeder stellen sollte, der mit lebenden Zellen arbeitet, ist, inwiefern der natürliche Zustand der Zelle beeinflusst wird. Bei der Hochauflösung spielen v. a. die Laseranregung und die Produktion von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), die durch das Photoschalten der Farbstoffe verursacht werden, eine Rolle [van de Linde et al., 2011a, 2012]. Die Zelle besitzt Mechanismen, um sich gegen ROS zu schützen, indem sie von Antioxidantien, z. B. Glutathion, reduziert werden [Sies, 1999]. Ob diese Schutzmechanismen ausreichen und in welchem Ausmaß ROS produziert werden, ist bisher unbekannt, ebenso wie der Einfluss der Laserleistung auf die Zelle. Die Morphologie einer Zelle und das ungestörte Durchlaufen des Zellzyklus ist ein Maß für den Zustand einer Zelle [Khodjakov und Rieder, 2006]. Diese stellen leicht zugängliche Parameter dar, um die durch Lokalisationsmikroskopie verursachte Zellschädigung zu untersuchen.

Hierzu wurden U2-OS Zellen (stabil transfiziert mit pCLIPf-H2B) in Petrischalen mit einem Gitter kultiviert, welches erlaubt Zellen wiederzufinden. Die Zellen wurden mit verschiedenen Laserleistungen und unterschiedlichen Wellenlängen bestrahlt und 20-24 Stunden in einer Biostation beobachtet. Es konnten drei Entwicklungen verfolgt werden: (i) Die Zellen bewegten sich auf der Glasoberfläche und teilten sich, (ii) die Zellen lösten sich nach einer Weile ab und spreiteten sich nicht mehr aus, oder (iii) die Zellen verblieben starr auf dem Glas ohne ihre Form zu verändern. Im ersten Fall wurde von keiner größeren Schädigung ausgegangen. Der zweite Fall gleicht einem typischen Verlauf der Apoptose. Eine Trypanblaufärbung im dritten Fall ergab, dass die erstarrten Zellen tot waren. Mit steigender Laserleistung erhielt man weniger sich teilende lebende und dafür mehr tote Zellen (Abbildung 4.6 a). Das Verhältnis zwischen apoptotischen und erstarrten Zellen verschob sich mit höherer Leistung zu den Erstarrten hin. Schon bei moderaten Leistungen  $< 0.5 \text{ kW cm}^{-2}$  trat bei 514 nm Photoschädigung in Form von apoptotischen Zellen auf. Bereits bei  $\sim 1.6 \text{ kW cm}^{-2}$  waren 50 % der untersuchten Zellen nach Bestrahlung erstarrt. Variationen der Anregungswellenlänge zeigten eindeutig, dass längerwellige Anregung weniger schädigend wirkt als kurzwellige Bestrahlung. Während bei 514 nm alle Zellen tot und davon 90 % erstarrt waren, konnten bei 558 nm



**Abbildung 4.6:** Photoschädigung in Abhängigkeit der Anregungsleistung und Wellenlänge. (a) Ungefärbte U2-OS-CLIPf-H2B Zellen wurden mit verschiedenen Leistungsdichten bei 514 nm 4 min lang bestrahlt. Im Schnitt wurden 19 Zellen pro Datenpunkt ausgewertet. Links: Anteil toter Zellen an den gesamt bestrahlten Zellen pro Leistungsdichte. Rechts: Anteil erstarrter Zellen an den gesamt bestrahlten Zellen pro Leistungsdichte. Die Daten wurden mit einer Boltzmann Funktion angepasst. Rote gekennzeichnete Datenpunkte flossen nicht in den Fit mit ein. (b) U2-OS-CLIPf-H2B Zellen wurden mit verschiedenen Wellenlängen (514, 558 und 640 nm) bei gleicher Leistung ( $2 \text{ kW cm}^{-2}$ ) für 4 min bestrahlt. Ungemusterte Balken stellen den Anteil toter Zellen, gestreifte Balken den Anteil erstarrter Zellen an der Gesamtzellzahl dar. Bearbeitet nach [Wäldchen, 2013].

zwar tote, aber keine erstarrten Zellen bei gleicher Leistungsdichte festgestellt werden. Bei 640 nm überlebten alle Zellen die Bestrahlung.

Diese Messungen zeigen deutlich, welchen Einfluss die Anregung auf die Zellen hat. Um die Photoschädigung bei Lebendzell-Aufnahmen zu minimieren, sollte ein Farbstoff gewählt werden, der im roten Bereich angeregt werden kann. Ebenso sollte die Intensität so gering wie möglich gehalten werden. Dabei muss jedoch abgewogen werden zwischen der Qualität der Aufnahme, die unter anderem vom Schaltverhalten der Farbstoffe und damit auch von der Laserleistung abhängig ist, und dem Grad der Photoschädigung.

## 4.2 Angewandte biologische Projekte

Neben der Etablierung von *d*STORM in lebenden Zellen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Projekte zur Anwendung der Lokalisationsmikroskopie auf biologische Fragestellungen bearbeitet. Diese fanden im Rahmen von teils internationalen Kooperationen statt. Das  $\beta$ -Amyloid Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Clemens Kaminski (Lehrstuhl für Chemical Engineering and Biotechnology, Cambridge) durchgeführt. Die Untersuchung

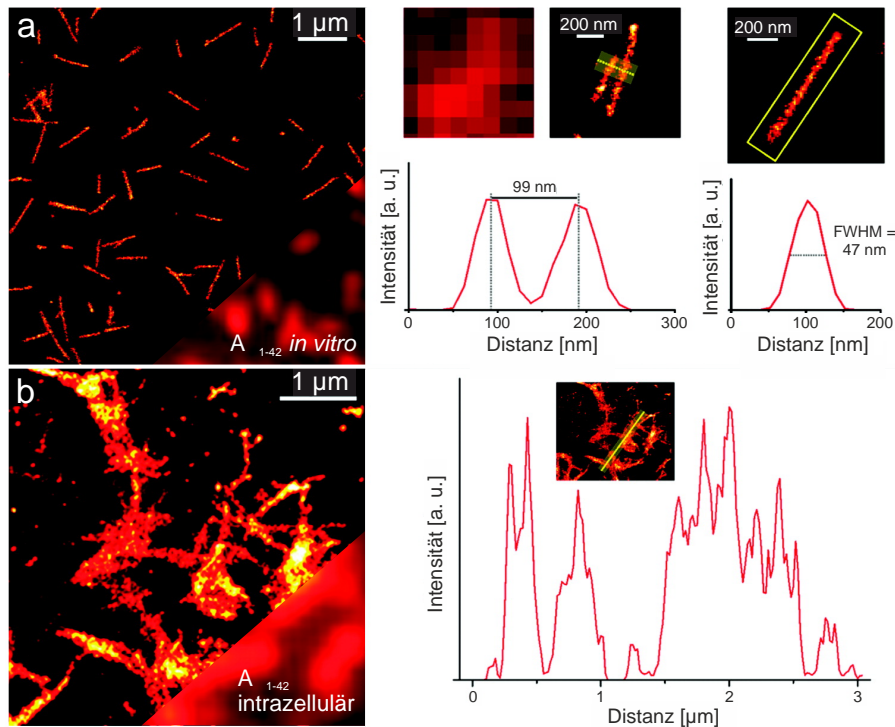
von Lipid Rafts in Bakterien fand in Kooperation mit Daniel Lopez (Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg) statt.

### 4.2.1 $\beta$ -Amyloide in HeLa Zellen

$\beta$ -Amyloide sind hauptverantwortlich für die Entstehung von Alzheimer. Charakteristisch ist dabei die Bildung von Ablagerungen (Plaques) im Gehirn bei Patienten [Haass und Selkoe, 2007]. Mit *d*STORM war es erstmals möglich, die genaue Struktur von intrazellulären Amyloid Aggregaten, die sich *in vivo* bilden, aufzuklären (siehe Manuskript 1, Kaminski Schierle et al., 2011). Es war zwar möglich mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie die Aufnahme von extrazellulär angebotenen  $\beta$ -Amyloid Peptiden ( $A\beta$ ) nachzuweisen, aber selbst mit strukturierter Beleuchtung (SIM) [Gustafsson, 2000, 2005], die eine Auflösungsverdopplung im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie erreicht, war es nicht möglich die unterschiedlichen Morphologien der  $A\beta$  Aggregate aufzuklären. *d*STORM konnte sowohl *in vitro* gebildete Aggregate auf der Deckglasoberfläche auflösen, als auch verschiedene Spezies von intrazellulären  $A\beta$  unterscheiden.  $A\beta_{1-42}$  formt kleine Oligomere und Fibrillen *in vitro*, die einen Durchmesser von 40-50 nm (Halbwertsbreite, FWHM) aufweisen. Berücksichtigt man die Größe der Antikörper ( $\sim 8-10$  nm, [Weber et al., 1978]), die zur Markierung verwendet wurden, ergibt sich ein tatsächlicher Durchmesser von  $\sim 20-30$  nm, was mit elektronenmikroskopischen Messungen übereinstimmt. Im Gegensatz dazu, konnten innerhalb der Zelle neben kleinen Oligomeren auch deutlich größere Aggregate beobachtet werden (Abbildung 4.7). Diese formten und vergrößerten sich während der einstündigen Inkubation mit  $A\beta_{1-42}$ . Die Aggregation innerhalb der Zelle wird dadurch begünstigt, dass die Aufnahme der Peptide durch Endocytose erfolgt. Folglich ist in den endocytotischen Vesikeln die  $A\beta_{1-42}$  Konzentration lokal erhöht, was Oligomerisationsprozesse und Aggregatbildung beschleunigt [Gorman et al., 2003; Lomakin et al., 1997]. Die intrazellulären Fibrillen zeigten unterschiedliche Längen zwischen 0.3 und 1.9  $\mu\text{m}$ . 90 % waren grade, während 10 % einen gebogenen Verlauf aufwiesen. Diese Charakteristik findet sich auch bei  $A\beta_{1-42}$  Fibrillen in Gehirnen von Alzheimer Patienten. Zellen, die mit  $A\beta_{1-40}$  inkubiert wurden, zeigten dagegen keine größeren Aggregate, sondern nur kleine monomere und oligomere Formen. Dies steht in Übereinstimmung mit der gängigen Annahme, dass  $A\beta_{1-40}$  weniger schädlich ist als  $A\beta_{1-42}$ , da dies auch in Gehirnen gesunder Personen nachzuweisen ist.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützten Thesen, dass auch intrazelluläre Aggregate zur pathogenen Wirkung von  $A\beta$  und zu extrazellulären Plaques

beitragen. Die Methode erwies sich außerdem als hervorragender Ansatz um das medizinisch relevante Aggregationsverhalten von Peptiden zu untersuchen. Sie kann leicht auf Proteine in anderen neurodegenerativen Krankheiten übertragen werden, z. B. Tau oder Huntingtin, und kann zu einem besseren Verständnis über die Vorgänge beitragen, die zur Ausprägung der Krankheiten führen.

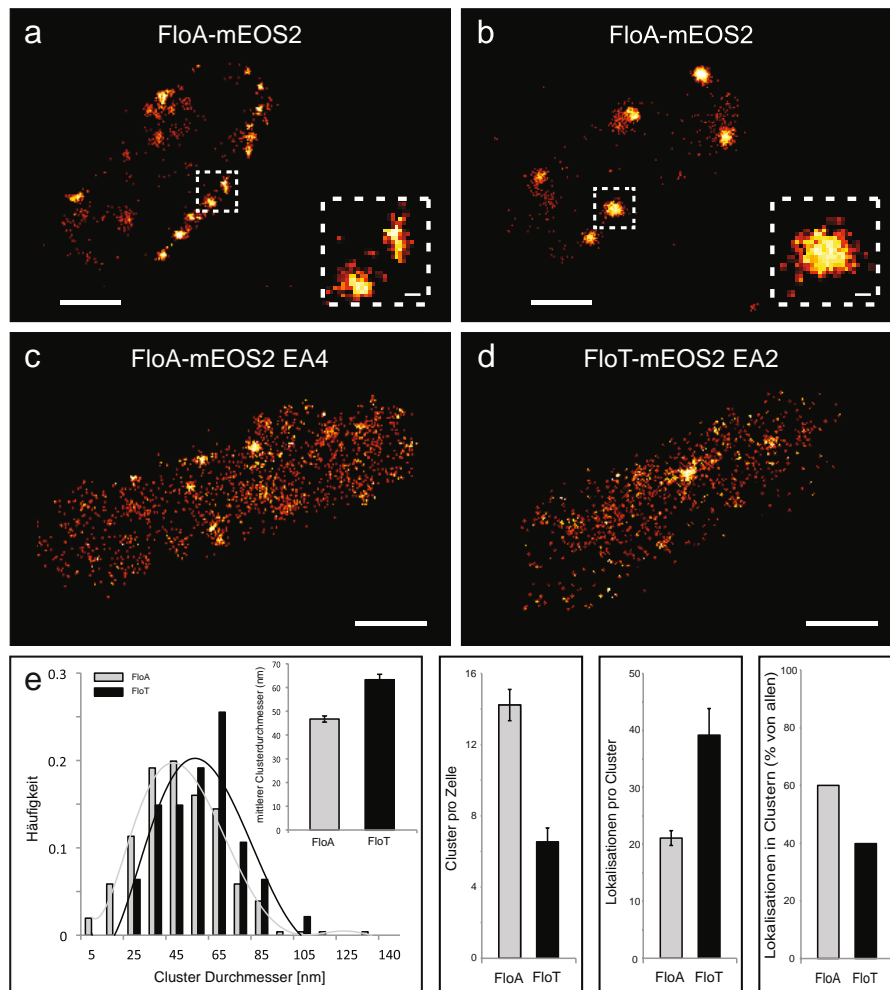


**Abbildung 4.7:** *d*STORM Aufnahmen von  $A\beta_{1-42}$  intra- und extrazellulär. Die Peptide wurde mit einer indirekten Immunfluoreszenz mit Alexa Fluor 647 markiert. (a) Links: hochaufgelöste  $\beta$ -Amyloid Fibrillen auf Deckglas, die sich *in vitro* gebildet haben. Die rechte untere Ecke zeigt die klassische Weitfeld-Fluoreszenz. Rechts: benachbarte Fibrillen können bis weit unterhalb der Beugungsgrenze aufgelöst werden (Abstand  $< 100$  nm). Der Durchmesser der Fibrillen beträgt zwischen 40 nm und 50 nm, welcher durch die FWHMs der Querschnittprofile bestimmt wurde. Die Antikörper tragen mit einer Größe von 8-10 nm erheblich zum gemessenen Durchmesser bei. (b) *d*STORM und Weitfeld-Fluoreszenzbild von einem Ausschnitt einer HeLa Zelle mit *in vivo* gebildeten  $\beta$ -Amyloid Aggregaten. Rechts: Intensitätsprofil entlang eines Querschnitts über hochaufgelöste intrazelluläre  $\beta$ -Amyloid Aggregate. Mit Erlaubnis bearbeitet nach [Kaminski Schierle et al., 2011], © 2011 American Chemical Society.

### 4.2.2 Lipid Rafts in Bakterien

Als Lipid Rafts werden bestimmte Bereiche in der Membran von eukaryotischen Zellen bezeichnet, die sich durch ihre Lipidzusammensetzung lokal von ihrer Umgebung unterscheiden [Simons und Ikonen, 1997]. Sie sind besonders reich an Sphingolipiden und Cholesterol. Die Existenz von Lipid Rafts wurde bereits 1988 zum ersten Mal postuliert [Simons und van Meer, 1988]. Diese Regionen dienen Proteinen als Plattform, um deren Interaktionen, z. B. in Prozessen der Signaltransduktion, effizient zu gestalten. Ist die Integrität dieser Mikrodomänen gestört, kommt es zu erheblichen Beeinträchtigungen der Signalübertragung [Lingwood und Simons, 2010]. An der Stabilität der Lipid Rafts sind neben Sphingolipiden und Cholesterol zwei Proteine, Flotillin 1 und 2 beteiligt. Es wird vermutet, dass diese eine Rolle in der Rekrutierung von Proteinen in die Rafts und in der Aktivierung von Signalwegen spielen [Langhorst et al., 2005; Stuermer, 2011].

Bisher ging man davon aus, dass Lipid Rafts nur in eukaryotischen Zellen existieren. 2010 fanden jedoch López und Kolter auch in prokaryotischen Membranen Mikrodomänen, die funktionell denen in Eukaryoten ähneln. Sie konnten zu Flotillin 1 homologe Proteine und andere an Signalprozessen beteiligte Proteine diesen Mikrodomänen zuordnen. Die bakteriellen Flotilline übernehmen dabei ähnliche Aufgaben, wie Flotilline in eukaryotischen Zellen. Bakterienmutanten ohne Flotilline zeigen daher auffällige Phänotypen [López und Kolter, 2010; Bach und Bramkamp, 2013]. *Bacillus subtilis* besitzt zwei Flotilline, FloA und FloT, die in Lipid Rafts lokalisieren. Ziel dieser Kooperation war es, die Funktionalität der beiden Flotilline zu untersuchen. Mit Hilfe von PALM und dem photoaktivierbaren Protein mEos2 wurde die Verteilung von FloA und FloT im Bakterium untersucht (Abbildung 4.8 a, b). Die beiden Proteine unterscheiden sich in ihrer räumlichen Anordnung. FloA ist in Cluster, die einen Durchmesser von ~45 nm aufweisen, organisiert (Abbildung 4.8 e). Im Mittel gibt es 14 dieser Cluster pro Bakterienzelle. Dagegen ist FloT nur in durchschnittlich 6 Domänen pro Zelle zu finden, jedoch mit einer Größe von ~60 nm. Vergleicht man die Anzahl der Lokalisationen vom mEos2, die pro Cluster detektiert wurden, enthalten die größeren Domänen von FloT auch mehr Lokalisationen (39) als die von FloA (21). Für die Gesamtanzahl in Clustern detektierter mEos2 ergibt sich damit nur ein geringer Unterschied zwischen den beiden Flotillinen. Jedoch sind diese Proteine nicht ausschließlich in Clustern organisiert. Berücksichtigt man die gesamten Lokalisationen einer Zelle, so kommen nur 40 % der FloT Proteine in Rafts vor, während FloA zu 60 % in solchen Domänen organisiert ist (Abbildung 4.8 e). Daraus lässt sich schließen, dass mehr FloT im Bakterium vorhanden ist als FloA.



**Abbildung 4.8:** PALM Aufnahmen und Analyse von FloA und FloT in *Bacillus subtilis*. Wildtypische FloA (a) und FloT (b) Proteine wurden mit mEos2 fusioniert und mittels PALM hochaufgelöst. In den rechten unteren Ecken sind Vergrößerungen der jeweils eingerahmten Bereiche dargestellt, um die unterschiedlichen Clustermorphologien der beiden Flotilline zu verdeutlichen. Felder (c) und (d) zeigen die Verteilung der mutierten Flotilline FloA (c) bzw. FloT (d) mit deletierten EA Wiederholungen. Die Diagramme in (e) stellen die Ergebnisse der Clusteranalyse dar. Details dazu sind im Text beschrieben. Maßstabsbalken in (a–d) entsprechen 500 nm bzw. in den umrahmten Bereichen 50 nm. Bearbeitet nach [Schneider et al., 2014].

Beide Flotilline weisen damit strukturelle Unterschiede auf, wodurch zwei distinkte Arten von Mikrodomänen unterschieden werden können. Zum einen existieren Domänen, die beide Flotilline enthalten, und zum andern gibt es



Rafts, die nur FloA besitzen. In molekularbiologischen Untersuchungen des Kooperationspartners wurden die Grundlagen dieser asymmetrischen Verteilung erforscht. Es stellte sich heraus, dass Flotilline Homooligomere bilden, wogegen Heterodimere nur zu einem geringen Teil vorkommen. Es ist von eukaryotischen Flotillinen bekannt, dass bestimmte Bereiche im Protein, Glutamat-Alanin (EA) Wiederholungen, für die Oligomerisierung verantwortlich sind. Es wurde von FloA und FloT eine EA-Mutante hergestellt, die mit PALM untersucht wurde (Abbildung 4.8 c, d). Die mutierten Flotilline wiesen weniger Cluster im Vergleich zum Wildtyp auf und waren eher einzeln zufällig auf der Membran verteilt. Dies bestätigt, dass Flotilline mit mutierten EA Wiederholungen, immer noch exprimiert werden, aber eine gestörte Oligomerisation zeigen. Die unterschiedliche Organisation der Flotilline in Cluster hängt damit von den Oligomerisationseigenschaften ab, die von bestimmten Bereichen im Protein vermittelt wird.

Die strukturellen Unterschiede der beiden Flotilline lassen vermuten, dass auch eine funktionelle Differenzierung zwischen FloA und FloT existiert. Biochemische und molekularbiologische Analysen des Kooperationspartners zeigten, dass die Flotilline in der Tat für unterschiedliche physiologische Prozesse und Aktivierung bestimmter Signalübertragungswege verantwortlich sind. FloA ist in allen Wachstumsphasen vorhanden und ist an Prozessen beteiligt, die den primären Metabolismus und Zellwand Regulation betreffen. FloT hingegen wird in der stationären Phase exprimiert und reguliert Mechanismen als Antwort auf Umweltbedingungen und Stress und ist in die Antibiotika Produktion involviert.

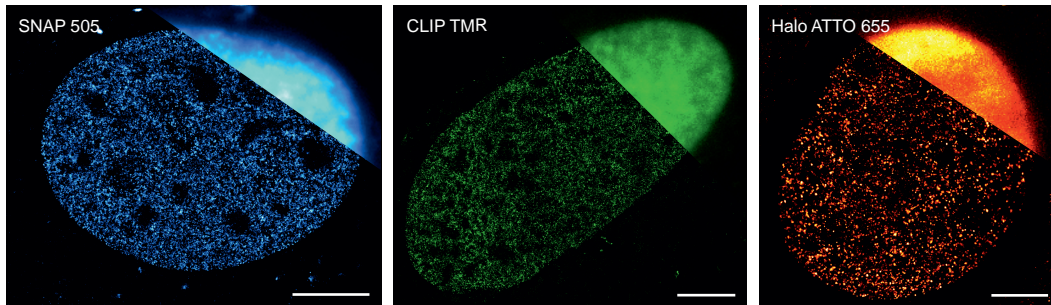
*Bacillus subtilis* ist in der Lage zwei distinkte Mikrodomänen zu organisieren, die sich in struktureller und funktioneller Zusammensetzung unterscheiden. Damit ist es dem Bakterium möglich diverse Regulationsprozesse zu kompartimentieren und effizient zu steuern, was bisher nur von höheren Organismen bekannt war [Lingwood et al., 2009; Lingwood und Simons, 2010]. Prokaryoten werden als einfachere Spezies angesehen, da ihre Signalwege im Vergleich zu Eukaryoten weit weniger komplex gebaut sind. Dennoch sind die Lipid Rafts in Bakterien vergleichbar zu jenen in Eukaryoten. Dies stellt ein bemerkenswert hochentwickeltes Niveau in der Organisation von Signalwegen und Steuerungsprozessen dar, was dem Bakterium erlaubt spezifisch auf verschiedene Umwelteinflüsse zu reagieren und komplexe Entwicklungsprozesse zu regulieren.



## 5 Fazit und Ausblick

**Chemische Tags.** Chemische Tags ermöglichen den Einsatz von organischen Fluorophoren in lebenden Zellen. Für die Lokalisationsmikroskopie haben Farbstoffe gegenüber photoaktivierbaren fluoreszierenden Proteinen den Vorteil, dass sie Größenordnungen mehr an Photonen emittieren und über einen längeren Zeitraum photostabiler sind [van de Linde et al., 2013; Klein et al., 2014, Manuskript 5 und 7]. Viele konventionelle Farbstoffe lassen sich unter physiologischen Bedingungen ohne Zugabe zusätzlicher Reduktionsmittel reversibel schalten. Dies wird ermöglicht durch das reduzierende System der Zelle, hauptsächlich bedingt durch Glutathion im millimolaren Bereich [Wombacher et al., 2010; Klein et al., 2011; van de Linde et al., 2011b]. SNAP-, CLIP-, TMP- und HaloTag eignen sich in Kombination ausgewählter Farbstoffe, um Strukturen in lebenden Zellen zu markieren. Rhodamin-Farbstoffe, wie Tetramethylrhodamin oder SNAP-Cell 505, zeigen gute Zellpermeabilität und eine effiziente Markierung des Zielproteins. Sie weisen reversibles Schaltverhalten auf, wobei die gebildeten Radikalanionen bei 405 nm angeregt werden können und somit die Fluorophordichte aktiv gesteuert werden kann [Klein et al., 2011, Manuskript 3]. Dies ist jedoch nicht unbedingt nötig, um ein hochaufgelöstes Bild rekonstruieren zu können. Bei Atto 655 dagegen, der zum Leukofarbstoff reduziert wird, ist die Reaktivierung bei 405 nm unabdingbar, damit eine ausreichende Markierungsdichte im Bild erreicht werden kann. Kontrollexperimente sind dennoch nötig, um die Kompatibilität eines Farbstoffliganden mit der Zelllinie oder auf unspezifischen Hintergrund zu überprüfen. Auf Grund ihrer Ladung tendieren beispielsweise einige Fluorophore dazu, an Zellorganellen, wie Mitochondrien, zu binden oder Aggregate zu bilden, was die Qualität der Aufnahmen beeinträchtigen kann. An Hand des Histons H2B wurden Farbstoffe über das gesamte Spektrum hinweg identifiziert, die für *d*STORM geeignet sind (Abbildung 5.1).

**Photoschädigung.** Zudem sollte der Einfluss der Lokalisationsmikroskopie auf die lebende Zelle bedacht werden. Schon bei moderaten Anregungsleistungen  $<0.5 \text{ kW cm}^{-2}$  wurde Apoptose in Folge der Bestrahlung beobachtet. Die Wellenlänge hat ebenso Anteil an der Photoschädigung. Im roten Anregungsbereich ist dieser bei Weitem geringer als im grünen oder blauen Spektrum. Daher

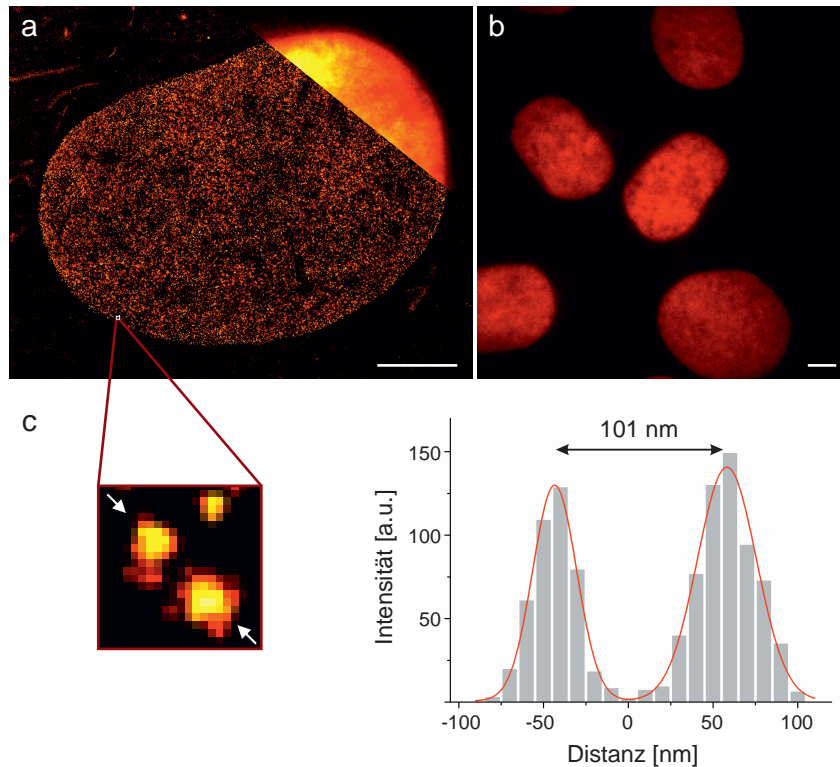


**Abbildung 5.1:** Lebendzell-*d*STORM mit chemischen Tags. Links: Transfizierte HeLa Zellen, die SNAP-H2B exprimierten, wurden mit  $1\ \mu\text{M}$  SNAP-Cell 505 gefärbt. Mitte: U2-OS Zellen wurden mit pCLIPf-H2B transfiziert und mit  $0.2\ \mu\text{M}$  CLIP-Cell TMR-Star gefärbt. Rechts: U2-OS Zellen wurden mit pHaloTag-H2B transfiziert und mit  $1\ \mu\text{M}$  HaloTag Ligand Atto 655 gefärbt. Alle Aufnahmen erfolgten mit einer Leistungsdichte von  $\sim 1\ \text{kW cm}^{-2}$  bei 488 nm (SNAP-Cell 505), 532 nm (TMR) bzw. 641 nm (Atto 655). Maßstabsbalken entsprechen  $5\ \mu\text{m}$ .

sollte vermehrt auf rote Farbstoffe zurückgegriffen werden. Kürzlich wurde ein neues Silizium-Rhodamin (SiR) entwickelt [Lukinavičius et al., 2013], welches die Eigenschaften eines Rhodamins mit dem Vorteil der langwelligen Anregung vereinigt. In Zusammenhang mit chemischen Tags konnte dieses erfolgreich für *d*STORM in lebenden Zellen eingesetzt werden und H2B Domänen mit einer FWHM von 30–40 nm aufgelöst werden (Abbildung 5.2). Das Substrat zeigt nahezu keine unspezifische Bindung. Das Si-R kann dabei ebenfalls mit 405 nm höchst reversibel über einen langen Zeitraum reaktiviert werden.

Die Rolle von ROS bei der Schädigung von Zellen ist immer noch unklar. Es ist bekannt, dass durch den Schaltvorgang der Farbstoffe ROS produziert werden, ob jedoch die Zelle in der Lage ist, diese durch ihre Schutzmechanismen unschädlich zu machen, ist weiterhin zu untersuchen. Dabei können Sensoren, wie das  $\text{H}_2\text{O}_2$ -sensitive Protein HyPer [Belousov et al., 2006], sich als nützliche Systeme erweisen, um intrazelluläre Superoxide zu messen.

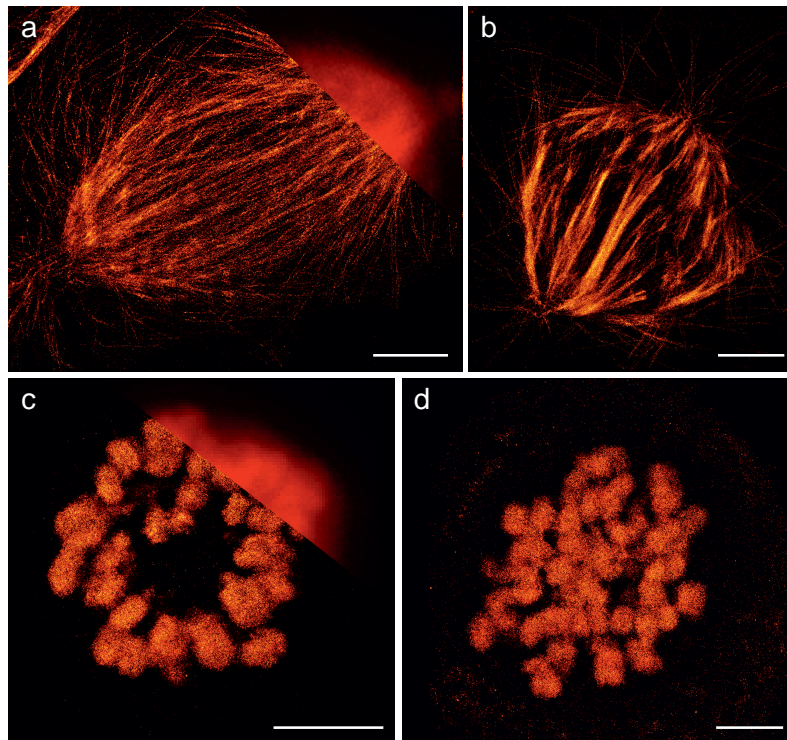
Das ungestörte Durchlaufen der Mitose ist ebenfalls ein Parameter um den Zustand der Zelle zu bewerten, da sie in dieser Phase besonders anfällig ist. Hierzu kann z. B. die korrekte Ausbildung des Spindelapparates im Zusammenspiel mit der DNA herangezogen werden. Die unterschiedlichen Stadien der Zellteilung könnten mit *d*STORM verfolgt werden, indem Tubulin oder DNA bzw. H2B fluoreszenzmarkiert werden. Wenn keine Arretierung oder andere morphologische Anomalien auftreten, wäre das ein Indiz, dass zum Zeitpunkt der Aufnahme keine unmittelbare Schädigung stattgefunden hat, also wirkliche eine lebende physiologische Zelle untersucht wurde. Erste Vorversuche mit fi-



**Abbildung 5.2:** Lebendzell-*d*STORM mit Silizium-Rhodamin. U2-OS Zellen wurden transient mit CLIP-H2B transfiziert und mit 0.1  $\mu\text{M}$  BC-SiR für 30 min gefärbt. (a) *d*STORM Aufnahme eines Nukleus mit  $\sim 1 \text{ kW cm}^{-2}$  bei 641 nm mit gleichzeitiger gepulster Reaktivierung bei 405 nm. Die rechte obere Ecke zeigt das klassische Weitfeld-Fluoreszenzbild. (b) Weitfeld-Aufnahme von SiR gefärbten Zellen. Der Farbstoff zeigt hochspezifische Markierung des Zielproteins und weist keine Aggregationen auf. (c) Intensitätsprofil von zwei benachbarten H2B Domänen, die im umrahmten Feld aus (a) vergrößert dargestellt sind. Die Anpassung mit einer Doppel-Gauß-Funktion ergibt einen Abstand von  $\sim 100 \text{ nm}$  und FWHMs von 30 nm bzw. 41 nm. Maßstabsbalken entsprechen 5  $\mu\text{m}$ .

xierten Zellen zeigten, dass die Teilungsspindel und kondensierte Chromosomen aufgelöst werden können, was die erste Voraussetzung ist, um die Strategie auf lebende Zellen übertragen zu können (Abbildung 5.3).

**$\beta$ -Amyloide.** In der Alzheimerforschung spielen  $\beta$ -Amyloid Peptide und deren Faltung und Aggregation eine zentrale Rolle. Sie sind die Ursache von Ablagerungen, die im Gehirn von Patienten zu finden sind [Masters et al., 1985]. Mit Hilfe von *d*STORM konnten mit einer Lokalisationsgenauigkeit



**Abbildung 5.3:** Mitose in mit RO-3306 synchronisierten und fixierten Zellen. *d*STORM Aufnahmen wurden in 100 mM MEA, 4 % Glucose, 8 units/mL Glucose-Oxidase und 160 units/mL Katalase bei pH 7.4 durchgeführt. Photoschalten der Farbstoffe wurde durch Anregung bei 640 nm mit einer Leistungsdichte von 5–13 kW cm<sup>-2</sup> erreicht. (a, b) COS-7 Zellen wurden mit primären Antikörper gegen  $\beta$ -Tubulin und Alexa Fluor 647 markierten sekundären anti-Maus Antikörper gefärbt. (a) zeigt den Spindelapparat einer Anaphase und (b) den einer Metaphase. Die rechte obere Ecke in (a) zeigt das klassische Weitfeld-Fluoreszenzbild. (c, d) zeigen mitotisches Chromatin, welches kondensiert vorliegt. (c) U2-OS Zellen, die stabil mit CLIP-H2B transfiziert sind, wurden nach der Fixierung mit 1  $\mu$ M BC-Alexa Fluor 647 gefärbt. Die rechte obere Ecke zeigt das klassische Weitfeld-Fluoreszenzbild. (d) Mit pSNAPf-H2B transient transfizierte U2-OS Zellen wurden nach Fixierung mit 1  $\mu$ M BG-Alexa Fluor 647 gefärbt. Maßstabsbalken entsprechen 5  $\mu$ m.

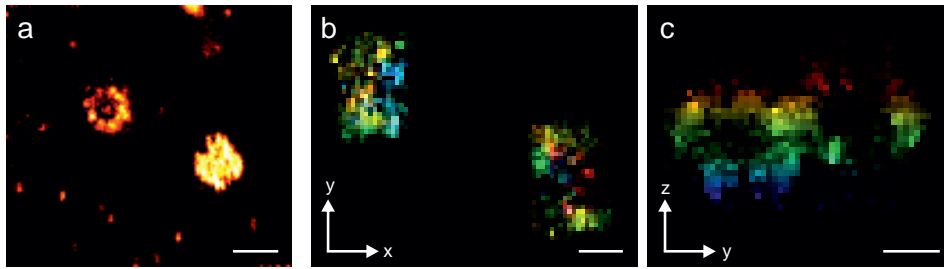
von < 20 nm unterschiedliche Morphologien der Aggregate differenziert werden [Kaminski Schierle et al., 2011, Manuskript 1]. Während *in vitro* gebildete Fibrillen einen Durchmesser von  $\sim$  50 nm aufwiesen, konnten intrazellulär weitaus größere Aggregate festgestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass im Innern der Zelle die Aggregation begünstigt wird, wahrscheinlich verursacht

---

durch die räumliche Begrenzung der Peptide auf Vesikel. Diese maturierten Aggregate zeigen Ähnlichkeiten zu den extrazellulären Plaques im Gehirn von Patienten, was ein Indiz dafür ist, dass intrazelluläre  $\beta$ -Amyloid Ansammlungen im Zusammenhang mit der Pathogenität von Alzheimer stehen [Paravastu et al., 2009]. *d*STORM hat sich als geeignete Methode erwiesen, dabei zu helfen molekulare Faltungsvorgänge aufzuklären und kann daher auch auf die Untersuchung weiterer Proteinfaltungskrankheiten angewandt werden. Kombiniert man solche Peptide nun mit chemischen Tags, könnten Aggregationsprozesse *in vivo* verfolgt und der intrazelluläre Transport besser verstanden werden, wodurch Therapieansätze effektiver gestaltet werden können.

**Lipid Rafts in Bakterien.** Eukaryotischen Lipid Rafts und ihrer Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen, wie Signalverarbeitung und Membrantransport, kommt immer mehr Aufmerksamkeit zu [Simons und Gerl, 2010]. Ihre funktionelle Vielfalt wird ihrer unterschiedlichen Lipid und Protein Zusammensetzung zugeschrieben. Die molekularen Mechanismen dieser Heterogenität sind jedoch immer noch unklar. *Bacillus subtilis* stellt ein einfach zugängliches Modellsystem dar, um Lipid Raft Differenzierung zu untersuchen. Das Bakterium weist zwei distinkte Familien von Signalplattformen auf, die spezielle zelluläre Prozesse regulieren [Schneider et al., 2014, Manuskript 8]. Diese Diversifizierung wird von der räumlich-zeitlichen Verteilung zweier Flotilline, FloA und FloT, bestimmt. Eine Art der zwei Mikrodomänen beinhaltet beide Flotilline, während die andere nur FloA besitzt. Zudem zeigen Rafts mit beiden Flotillinen einen größeren Durchmesser als die Domänen mit nur einem der beiden Proteine. FloA und FloT übernehmen unterschiedliche Aufgaben in der Zelle und werden auch zeitlich differentiell exprimiert. Diese Spezialisierung ermöglicht es dem Bakterium effizient auf Umweltbedingungen zu reagieren und Signalwege entsprechend anzupassen. Die komplexe Organisation der Lipid Rafts und der damit verbundenen Signalübertragung in Prokaryoten lassen annehmen, dass Bakterien weit komplexere Organismen sind, als bisher angenommen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lokalisationsmikroskopie auch in lebenden Zellen erfolgreich eingesetzt werden kann und eine wertvolle Methode zu Beantwortung biologische Fragestellungen darstellt. Damit ist die Grundlage geschaffen um komplexere Vorgänge in lebenden Zellen, wie den Transport und Interaktion von Proteinen oder die Dynamik zellulärer Strukturen zu untersuchen. Die Etablierung von 3D-Lokalisationsmikroskopie ist dabei von großer Bedeutung [Huang et al., 2008; Jones et al., 2011]. Dadurch erhält man zusätzlich die räumliche Information über Strukturen, welche in der zweidimensionalen Projektion oft verloren gehen. Bevor diese Methode



**Abbildung 5.4:** Centriolen in fixierten Zellen. Mit einer indirekten Immunfluoreszenz wurde das Protein CEP152 mit Alexa Fluor 647 angefärbt. Die Messungen wurden bei 640 nm mit einer Leistungsdichte von  $\sim 15 \text{ kW cm}^{-2}$  durchgeführt. (a) 2D-*d*STORM Aufnahme einer COS-7 Zelle, welche zwei zueinander senkrechte Centriolen zeigt. Die neunfach Symmetrie von CEP152 ist bei der  $90^\circ$  zur Bildebene stehenden Centriole sichtbar. (b, c) 3D-*d*STORM eines Centriolenpärchens in U2-OS Zellen. Der Farbcode (blau nach rot) entspricht einem Bereich von 0–400 nm. (b) zeigt die *x-y*- und (c) die *y-z*-Ansicht. Maßstabsbalken 500 nm (a), 200 nm (b, c). Bearbeitet nach [Klein et al., 2014].

biologisch relevant angewendet werden kann, muss zunächst ihre Verlässlichkeit und Leistung an Hand von Referenzstrukturen evaluiert werden. Centriolen, die den Ursprung für die Ausbildung der Spindelmikrotubuli bei der Mitose bilden, stellen dafür geeignete Strukturen dar [Bettencourt-Dias und Glover, 2007; Nigg und Raff, 2009]. Sie bestehen aus zwei zueinander senkrecht stehenden Hohlzylindern mit einem inneren Durchmesser von  $\sim 200 \text{ nm}$  und einer Länge von  $\sim 400 \text{ nm}$ . Je nachdem welches der Proteine, die ringförmig um den Zylinder angeordnet sind, erhält man unterschiedliche Durchmesser [Lawo et al., 2012]. In Abbildung 5.4 wurde CEP152, welches eine neunfach Symmetrie aufweist, durch eine indirekte Immunfluoreszenz markiert. In der *x-y*-Projektion ist die Hohlstruktur verborgen. Erst in der *y-z*-Ansicht ist die ringförmige Struktur zu sehen [Klein et al., 2014, Manuskript 7]. Diese ersten vielversprechenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich 3D-*d*STORM als nützliches Werkzeug für die hochauflösende Lebendzell-Mikroskopie erweisen wird.



## Abkürzungsverzeichnis

<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CP</b>	Cytoskelettpuffer
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	demineralisiertes Wasser
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>dSTORM</b>	direct stochastic optical reconstruction microscopy
<b>EMCCD</b>	Electron multiplying charge-coupled device
<b>EPI</b>	Weitfeld Beleuchtung
<b>FA</b>	Formaldehyd
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FP</b>	Fluoreszierendes Protein
<b>FWHM</b>	Halbwertsbreite einer Gauß-Verteilung
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>HILO</b>	Highly inclined and laminated optical sheet, steil einfallendes und dünnes Lichtblatt
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>MEA</b>	$\beta$ -Mercaptoethylamin
<b>nt</b>	Nucleotide
<b>PA-FP</b>	Photoaktivierbares fluoreszierendes Protein
<b>PALM</b>	Photoactivated Localization Microscopy
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PSF</b>	Punktspreizfunktion
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>STED</b>	Stimulated emission depletion

<b>STORM</b>	Stochastic optical reconstruction microscopy
<b>TIR</b>	Totale interne Reflexion
<b>TMR</b>	Tetramethylrhodamin
<b>ÜK</b>	Übernachtskultur

## Literaturverzeichnis

- Abbe, E. (1873). Theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Arch Mikrosk Anat*, 9(1):413–468.
- Appelhans, T., Richter, C. P., Wilkens, V., Hess, S. T., Piehler, J., und Busch, K. B. (2012). Nanoscale organization of mitochondrial microcompartments revealed by combining tracking and localization microscopy. *Nano Lett*, 12(2):610–6.
- Arganda-Carreras, I., Sorzano, C. O. S., Marabini, R., Carazo, J. M., de Solorzano, C. O., und Kybic, J. (2006). Consistent and elastic registration of histological sections using vector-spline regularization. In *Computer Vision Approaches to Medical Image Analysis*, volume 4241 of *Lecture Notes in Computer Science*, pages 85–95. Springer Berlin / Heidelberg.
- Bach, J. N. und Bramkamp, M. (2013). Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Mol Microbiol*, 88(6):1205–1217.
- Baeyer, A. (1871). Ueber eine neue klasse von farbstoffen. *Ber Dtsch Chem Ges*, 4:555–558.
- Banfalvi, G. (2011). Overview of cell synchronization. *Methods Mol Biol*, 761:1–23.
- Bates, M., Huang, B., Dempsey, G. T., und Zhuang, X. W. (2007). Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 317(5845):1749–1753.
- Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V., und Lukyanov, S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods*, 3(4):281–6.
- Benesch, R. E. und Benesch, R. (1953). Enzymatic removal of oxygen for polarography and related methods. *Science*, 118(3068):447–8.

- Benke, A., Olivier, N., Gunzenhäuser, J., und Manley, S. (2012). Multicolor single molecule tracking of stochastically active synthetic dyes. *Nano Lett*, 12(5):2619–24.
- Bettencourt-Dias, M. und Glover, D. M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(6):451–463.
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., und Hess, H. F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–5.
- Biteen, J. S., Thompson, M. A., Tselentis, N. K., Bowman, G. R., Shapiro, L., und Moerner, W. E. (2008). Super-resolution imaging in live caulobacter crescentus cells using photoswitchable eYFP. *Nat Methods*, 5(11):947–9.
- Dyba, M. und Hell, S. W. (2002). Focal spots of size  $\lambda/23$  open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution. *Phys Rev Lett*, 88(16):163901.
- Endesfelder, U., van de Linde, S., Wolter, S., Sauer, M., und Heilemann, M. (2010). Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy of myosin-actin motility. *ChemPhysChem*, 11(4):836–40.
- Flors, C., Ravarani, C. N., und Dryden, D. T. (2009). Super-resolution imaging of DNA labelled with intercalating dyes. *ChemPhysChem*, 10(13):2201–4.
- Förstl, H. und Kurz, A. (1999). Clinical features of alzheimer’s disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 249(6):288–290.
- Frank, E. M. (1994). Effect of alzheimer’s disease on communication function. *J S C Med Assoc*, 90(9):417–423.
- Gallagher, S. S., Sable, J. E., Sheetz, M. P., und Cornish, V. W. (2009). An in vivo covalent tmp-tag based on proximity-induced reactivity. *ACS Chem Biol*, 4(7):547–56.
- Gautier, A., Juillerat, A., Heinis, C., Corrêa, I. R., J., Kindermann, M., Beaufils, F., und Johnsson, K. (2008). An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol*, 15(2):128–36.

- Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H., und Tsien, R. Y. (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science*, 312(5771):217–24.
- Glabe, C. G. (2008). Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem*, 283(44):29639–29643.
- Gorman, P. M., Yip, C. M., Fraser, P. E., und Chakrabartty, A. (2003). Alternate aggregation pathways of the alzheimer beta-amyloid peptide: Abeta association kinetics at endosomal ph. *J Mol Biol*, 325(4):743–757.
- Griffin, B. A., Adams, S. R., und Tsien, R. Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science*, 281(5374):269–72.
- Gustafsson, M. G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc*, 198(Pt 2):82–7.
- Gustafsson, M. G. (2005). Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(37):13081–6.
- Haass, C. und Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the alzheimer’s amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(2):101–112.
- Haugland, R. P., Spence, M. T. Z., Johnson, I. D., und Basey, A. (2005). *The handbook : a guide to fluorescent probes and labeling technologies*. Molecular Probes, Eugene, OR, 10th edition.
- Heilemann, M., Margeat, E., Kasper, R., Sauer, M., und Tinnefeld, P. (2005). Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch. *J Am Chem Soc*, 127(11):3801–6.
- Heilemann, M., van de Linde, S., Mukherjee, A., und Sauer, M. (2009). Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(37):6903–8.
- Heilemann, M., van de Linde, S., Schüttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., und Sauer, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(33):6172–6.

- Heintzmann, R. und Cremer, C. (1999). Lateral modulated excitation microscopy: Improvement of resolution by using a diffraction grating. *Proc SPIE*, 3568:185–196.
- Hell, S. W. und Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett*, 19(11):780–2.
- Hess, S. T., Girirajan, T. P., und Mason, M. D. (2006). Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J*, 91(11):4258–72.
- Hess, S. T., Gould, T. J., Gudheti, M. V., Maas, S. A., Mills, K. D., und Zimmerberg, J. (2007). Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(44):17370–5.
- Holden, S. J., Uphoff, S., und Kapanidis, A. N. (2011). Daostorm: an algorithm for high- density super-resolution microscopy. *Nat Methods*, 8(4):279–80.
- Holm, T., Klein, T., Löschberger, A., Klamp, T., Wiebusch, G., van de Linde, S., und Sauer, M. (2014). A blueprint for cost-efficient localization microscopy. *ChemPhysChem*, 15(4):651–654.
- Hooke, R. (1665). *Micrographia: or some Physiological Descriptions of Minute Bodies made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries therupon*. Jo. Martyn und Ja. Allestry, Printers to the Royal Society, London.
- Huang, B., Wang, W. Q., Bates, M., und Zhuang, X. W. (2008). Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 319(5864):810–813.
- Jones, D. P. (2010). Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signalling. *J Intern Med*, 268(5):432–48.
- Jones, S. A., Shim, S. H., He, J., und Zhuang, X. (2011). Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nat Methods*, 8(6):499–505.
- Kaminski Schierle, G. S., van de Linde, S., Erdelyi, M., Esbjörner, E. K., Klein, T., Rees, E., Bertoncini, C. W., Dobson, C. M., Sauer, M., und Kaminski, C. F. (2011). In situ measurements of the formation and morphology of intracellular beta-amyloid fibrils by super-resolution fluorescence imaging. *J Am Chem Soc*, 133(33):12902–5.

- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., und Müller-Hill, B. (1987). The precursor of alzheimer's disease amyloid a4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106):733–736.
- Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H., und Johnsson, K. (2003). A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol*, 21(1):86–9.
- Keppler, A., Pick, H., Arrivoli, C., Vogel, H., und Johnsson, K. (2004). Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(27):9955–9.
- Khodjakov, A. und Rieder, C. L. (2006). Imaging the division process in living tissue culture cells. *Methods*, 38(1):2–16.
- Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A., und Hell, S. W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(15):8206–10.
- Klein, T., Löschberger, A., Proppert, S., Wolter, S., van de Linde, S., und Sauer, M. (2011). Live-cell dstorm with snap-tag fusion proteins. *Nat Methods*, 8(1):7–9.
- Klein, T., Proppert, S., und Sauer, M. (2014). Eight years of single-molecule localization microscopy. *Histochem Cell Biol*, published online.
- Klein, T., van de Linde, S., und Sauer, M. (2012). Live-cell super-resolution imaging goes multicolor. *ChemBioChem*, 13(13):1861–3.
- Lando, D., Endesfelder, U., Berger, H., Subramanian, L., Dunne, P., McColl, J., Klenerman, D., Carr, A., Sauer, M., Allshire, R., Heilemann, M., und Laue, E. (2012). Quantitative single-molecule microscopy reveals that cenp-a(cnp1) deposition occurs during g2 in fission yeast. *Open Biol*, 2(7):120078.
- Langhorst, M. F., Reuter, A., und Stuermer, C. A. O. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci*, 62(19-20):2228–2240.
- Lawo, S., Hasegan, M., Gupta, G. D., und Pelletier, L. (2012). Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nat Cell Biol*, 14(11):1148–1158.

- Lingwood, D., Kaiser, H.-J., Levental, I., und Simons, K. (2009). Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 5):955–960.
- Lingwood, D. und Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961):46–50.
- Lippincott-Schwartz, J. und Patterson, G. H. (2003). Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 300(5616):87–91.
- Lomakin, A., Teplow, D. B., Kirschner, D. A., und Benedek, G. B. (1997). Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid beta-protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(15):7942–7947.
- López, D. und Kolter, R. (2010). Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev*, 24(17):1893–1902.
- Los, G. V., Encell, L. P., McDougall, M. G., Hartzell, D. D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M. G., Learish, R., Ohana, R. F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klaubert, D. H., Bulleit, R. F., und Wood, K. V. (2008). Halotag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol*, 3(6):373–82.
- Los, G. V. und Wood, K. (2007). The halotag: a novel technology for cell imaging and protein analysis. *Methods Mol Biol*, 356:195–208.
- Löschberger, A., van de Linde, S., Dabauvalle, M. C., Rieger, B., Heilemann, M., Krohne, G., und Sauer, M. (2012). Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *J Cell Sci*, 125(Pt 3):570–575.
- Lukinavičius, G., Umezawa, K., Olivier, N., Honigsmann, A., Yang, G., Plass, T., Mueller, V., Reymond, L., Corrêa, I. R., J., Luo, Z. G., Schultz, C., Lemke, E. A., Heppenstall, P., Eggeling, C., Manley, S., und Johnsson, K. (2013). A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins. *Nature Chem*, 5(2):132–9.
- Manley, S., Gillette, J. M., Patterson, G. H., Shroff, H., Hess, H. F., Betzig, E., und Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat Methods*, 5(2):155–7.



- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., und Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in alzheimer disease and down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(12):4245–4249.
- Miller, L. W., Cai, Y., Sheetz, M. P., und Cornish, V. W. (2005). In vivo protein labeling with trimethoprim conjugates: a flexible chemical tag. *Nat Methods*, 2(4):255–7.
- Miller, L. W. und Cornish, V. W. (2005). Selective chemical labeling of proteins in living cells. *Curr Opin Chem Biol*, 9(1):56–61.
- Mishra, S. und Joshi, P. G. (2007). Lipid raft heterogeneity: an enigma. *J Neurochem*, 103 Suppl 1:135–142.
- Mortensen, K. I., Churchman, L. S., Spudich, J. A., und Flyvbjerg, H. (2010). Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy. *Nat Methods*, 7(5):377–81.
- Nigg, E. A. und Raff, J. W. (2009). Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*, 139(4):663–678.
- Owen, D. M., Rentero, C., Rossy, J., Magenau, A., Williamson, D., Rodriguez, M., und Gaus, K. (2010). PALm imaging and cluster analysis of protein heterogeneity at the cell surface. *J Biophotonics*, 3(3):446–54.
- Paravastu, A. K., Qahwash, I., Leapman, R. D., Meredith, S. C., und Tycko, R. (2009). Seeded growth of beta-amyloid fibrils from alzheimer’s brain-derived fibrils produces a distinct fibril structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(18):7443–7448.
- Patterson, G., Davidson, M., Manley, S., und Lippincott-Schwartz, J. (2010). Superresolution imaging using single-molecule localization. *Annu Rev Phys Chem*, 61:345–67.
- Rayleigh (1896). Xv. on the theory of optical images, with special reference to the microscope. *Philos Mag*, 42(255):167–195.
- Rossy, J., Owen, D. M., Williamson, D. J., Yang, Z., und Gaus, K. (2013). Conformational states of the kinase lck regulate clustering in early t cell signaling. *Nat Immunol*, 14(1):82–89.
- Rust, M. J., Bates, M., und Zhuang, X. W. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nature Methods*, 3(10):793–795.

- Sauer, M. (2013). Localization microscopy coming of age: from concepts to biological impact. *J Cell Sci*, 126(Pt 16):3505–3513.
- Schafer, F. Q. und Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 30(11):1191–212.
- Schäfer, P., van de Linde, S., Lehmann, J., Sauer, M., und Doose, S. (2013). Methylene blue- and thiol-based oxygen depletion for super-resolution imaging. *Anal Chem*, 85(6):3393–400.
- Schneider, J., Klein, T., Mielich-Süss, B., Koch, G., Franke, C., Kuipers, O., Kovacs, A., Sauer, M., und Lopez, D. (2014). Spatio-temporal remodeling of bacterial membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, submitted.
- Shannon, C. E. (1949). Communication in the presence of noise. *Proc IRE*, 37:10–21.
- Shim, S. H., Xia, C., Zhong, G., Babcock, H. P., Vaughan, J. C., Huang, B., Wang, X., Xu, C., Bi, G. Q., und Zhuang, X. (2012). Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(35):13978–83.
- Shroff, H., Galbraith, C. G., Galbraith, J. A., und Betzig, E. (2008). Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat Methods*, 5(5):417–23.
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 27(9-10):916–21.
- Simons, K. und Gerl, M. J. (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(10):688–699.
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633):569–572.
- Simons, K. und van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17):6197–6202.
- Small, J.-V., Rottner, K., Hahne, P., und Anderson, K. I. (1999). Visualising the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech*, 47(1):3–17.
- Smit, P. und Heniger, J. (1975). Antoni van leeuwenhoek (1632–1723) and the discovery of bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 41(1):217–228.

- Smith, C. V., Jones, D. P., Guenthner, T. M., Lash, L. H., und Lauterburg, B. H. (1996). Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol Appl Pharmacol*, 140(1):1–12.
- Stuermer, C. A. O. (2011). Reggie/flotillin and the targeted delivery of cargo. *J Neurochem*, 116(5):708–713.
- Thompson, R. E., Larson, D. R., und Webb, W. W. (2002). Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J*, 82(5):2775–83.
- Tokunaga, M., Imamoto, N., und Sakata-Sogawa, K. (2008). Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat Methods*, 5(2):159–61.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67:509–44.
- Uppoor, R. und Niebergall, P. J. (1996). beta-d(+) glucose-glucose oxidase-catalase for use as an antioxidant system. *Pharm Dev Technol*, 1(2):127–134.
- van de Linde, S., Aufmkolk, S., Franke, C., Holm, T., Klein, T., Löschberger, A., Proppert, S., Wolter, S., und Sauer, M. (2013). Investigating cellular structures at the nanoscale with organic fluorophores. *Chem Biol*, 20(1):8–18.
- van de Linde, S., Heilemann, M., und Sauer, M. (2012). Live-cell super-resolution imaging with synthetic fluorophores. *Annu Rev Phys Chem*, 63:519–40.
- van de Linde, S., Krstić, I., Prisner, T., Doose, S., Heilemann, M., und Sauer, M. (2011a). Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging. *Photochem Photobiol Sci*, 10(4):499–506.
- van de Linde, S., Löschberger, A., Klein, T., Heidebreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., und Sauer, M. (2011b). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc*, 6(7):991–1009.
- van de Linde, S. und Sauer, M. (2014). How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching. *Chem Soc Rev*, 43:1076–1087.
- Vassilev, L. T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D. C., und Chen, L. (2006). Selective small-molecule inhibitor reveals critical

- mitotic functions of human cdk1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(28):10660–10665.
- Vogelsang, J., Steinhauer, C., Forthmann, C., Stein, I. H., Person-Skegro, B., Cordes, T., und Tinnefeld, P. (2010). Make them blink: probes for super-resolution microscopy. *ChemPhysChem*, 11(12):2475–90.
- Weber, K., Rathke, P. C., und Osborn, M. (1978). Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(4):1820–4.
- Wilmes, S., Staufenbiel, M., Lisse, D., Richter, C. P., Beutel, O., Busch, K. B., Hess, S. T., und Piehler, J. (2012). Triple-color super-resolution imaging of live cells: resolving submicroscopic receptor organization in the plasma membrane. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51(20):4868–71.
- Wäldchen, S. (2013). Standards for live-cell localization microscopy. Masterarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Wolter, S., Endesfelder, U., van de Linde, S., Heilemann, M., und Sauer, M. (2011). Measuring localization performance of super-resolution algorithms on very active samples. *Opt Express*, 19(8):7020–33.
- Wolter, S., Löschberger, A., Holm, T., Aufmkolk, S., Dabauvalle, M. C., van de Linde, S., und Sauer, M. (2012). rapidstorm: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat Methods*, 9(11):1040–1.
- Wolter, S., Schüttpelz, M., Tscherepanow, M., van de Linde, S., Heilemann, M., und Sauer, M. (2010). Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images. *J Microsc*, 237(1):12–22.
- Wombacher, R., Heidbreder, M., van de Linde, S., Sheetz, M. P., Heilemann, M., Cornish, V. W., und Sauer, M. (2010). Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. *Nat Methods*, 7(9):717–9.
- Xu, K., Babcock, H. P., und Zhuang, X. (2012). Dual-objective storm reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. *Nat Methods*, 9(2):185–8.
- Zessin, P. J., Finan, K., und Heilemann, M. (2012). Super-resolution fluorescence imaging of chromosomal DNA. *J Struct Biol*, 177(2):344–8.
- Zhu, L., Zhang, W., Elnatan, D., und Huang, B. (2012). Faster storm using compressed sensing. *Nat Methods*, 9(7):721–3.

# Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich in den letzten Jahren während meiner Dissertation unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich bei Markus Sauer bedanken, der mir die Möglichkeit gab, in dieses hoch interessante Gebiet einzusteigen, als seine Arbeitsgruppe nach Würzburg kam. Danke für deine immerwährende Unterstützung, die vielen Anregungen und dafür, dass du dir immer Zeit genommen hast, wenn es an deine Tür klopfte.

Besonders möchte ich mich bei Sebastian van de Linde bedanken, der mich in die Welt der Hochauflösung eingeführt hat und mir alles über das „dSTORMen“ beigebracht hat. Du hattest immer ein offenes Ohr für Fragen und die passenden Antworten gleich mit dazu. Danke für die vielen, langen Gespräche über Wissenschaft, Musik, Geschichte und die Welt im Allgemeinen! Es war wirklich eine Freude mit dir zu arbeiten!

Vielen Dank an Ricardo Benavente, der bereitwillig das Zweitgutachten für diese Arbeit übernommen hat. Außerdem möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern bedanken, mit denen ich an überaus interessanten Themen arbeiten durfte: Daniel Lopez, Johannes Schneider und Gudrun Koch vom Zentrum für Infektionsforschung in Würzburg und Gabi und Clemens Kaminski von der Cambridge University. Danke für eure tolle Zusammenarbeit! In dem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei Christian Franke bedanken, der die Clusteranalysen erstellt hat.

Mein Dank gilt außerdem meiner ehemaligen Masterstudentin Sina Wäldchen für ihre großartige Arbeit am Photodamage Projekt. Auch bei meinen Bürokollegen Anna und Thonie möchte ich mich herzlich bedanken. Es war eine tolle Zeit, wir hatten viel Spaß und ihr standet mir bei Fragen immer hilfreich zur Seite. Danke, Anna, für die Starthilfe bei molekularbiologischen Dingen und für die „biologische Verstärkung“ in unserer Arbeitsgruppe.

Vielen Dank, Thorge, für deine Hilfe in physikalisch-technischen Fragen oder wenn das Setup mal wieder Aufmerksamkeit brauchte. Danke, Sven, für die tollen 3D-Messungen. Mein Dank geht an Lisa und Petra für die Zellkultur

## *Danksagung*

---

und Hilfen bei Experimenten, an Marcus, Albert und Willi für die vielen mechanischen Konstruktionen und Oli für den EDV-Support.

Bei dem gesamten Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik möchte ich mich bedanken für die Unterstützung und die tolle Atmosphäre während und auch außerhalb der Arbeitszeit. Nicht zu vergessen ist natürlich auch das Kickerspielen mit euch, was für einen guten Ausgleich für Zwischendurch gesorgt hat!

Ein großer Dank gilt meiner Familie, die mich immer unterstützt hat und meinen Freunden, besonders Lissi und Sonja. Wir hatten viel Spaß in den letzten Jahren! Danke für diese tolle Zeit!

Mein allergrößter Dank geht an Tommy, der mir eine unendliche Geduld in all den Jahren entgegengebracht hat, obwohl es nicht immer einfach war! Danke für alles!

# Publikationen

## Manuskript 1

Kaminski Schierle, G. S., van de Linde, S., Erdelyi, M., Esbjörner, E. K., Klein, T., Rees, E., Bertocini, C. W., Dobson, C. M., Sauer, M., und Kaminski, C. F. (2011). In situ measurements of the formation and morphology of intracellular beta-amyloid fibrils by super-resolution fluorescence imaging. *J Am Chem Soc*, 133(33):12902-5

## Manuskript 2

van de Linde, S., Löschberger, A., Klein, T., Heidebreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., und Sauer, M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc*, 6(7):991-1009



## **Manuskript 3**

Klein, T., Löschberger, A., Proppert, S., Wolter, S., van de Linde, S., und Sauer, M. (2011). Live-cell dstorm with snap-tag fusion proteins. *Nat Methods*, 8(1):7-9

## **Manuskript 4**

Klein, T., van de Linde, S., und Sauer, M. (2012). Live-cell super-resolution imaging goes multicolor. *ChemBioChem*, 13(13):1861-3

## **Manuskript 5**

van de Linde, S., Aufmkolk, S., Franke, C., Holm, T., Klein, T., Löschberger, A., Proppert, S., Wolter, S., und Sauer, M. (2013). Investigating cellular structures at the nanoscale with organic fluorophores. *Chem Biol*, 20(1):8-18

## **Manuskript 6**

Holm, T., Klein, T., Löschberger, A., Klamp, T., Wiebusch, G., van de Linde, S., und Sauer, M. (2014). A blueprint for cost-efficient localization microscopy. *ChemPhysChem*, 15(4):651-654

## Manuskript 7

Klein, T., Proppert, S., und Sauer, M. (2014). Eight years of single-molecule localization microscopy. *Histochem Cell Biol*, vor Druck online publiziert

## **Manuskript 8**

Schneider, J., Klein, T., Mielich-Süss, B., Koch, G., Franke, C., Kuipers, O., Kovacs, A., Sauer, M., und Lopez, D. (2014). Spatio-temporal remodeling of bacterial membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci USA*, eingereicht

## Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Ich versichere an Eides statt, dass mir die Möglichkeit zur Promotion und deren Betreuer nicht durch kommerzielle Stellen vermittelt wurde. Weiterhin erkläre ich, dass die Richtlinien der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden. Die Dissertation hat bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Es wurden neben dem Grad des Diplom-Biologen bisher keine weiteren akademischen Grade erworben.

Würzburg, Mai 2014

---

Teresa Klein