

**Untersuchung von Sphingolipiden und anderen
Membrankonjugaten mittels hochauflösender
Fluoreszenzmikroskopie**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Anne Burgert
geboren in Emmendingen

Würzburg, 2016

Eingereicht am: 29.11.2016

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Christian Wegener

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer

Gutachter: Prof. Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir

Tag des Promotionskolloquiums: 15.03.2017

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Methoden der Fluoreszenz-Lokalisationsmikroskopie (engl. single-molecule localization microscopy, SMLM) ermöglichen es Moleküle zu quantifizieren und deren Verteilung zu analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Membranmoleküle auf unterschiedlichen eukaryotischen Zellen, aber auch auf Prokaryoten mit *d*STORM (engl. *direct* stochastic optical reconstruction microscopy) oder PALM (engl.: photoactivated localization microscopy) aufgenommen und quantifiziert. Bevor jedoch diese hochauflösende fluoreszenzbasierte Technik für biologische Fragestellungen angewendet werden konnten, mussten zunächst potentielle Artefakt-auslösende Quellen identifiziert und Strategien gefunden werden, um diese zu eliminieren.

Eine mögliche Artefakt-Quelle ist eine zu niedrige Photonenzahl, die von Fluorophoren emittiert wird. Werden zu wenige Photonen detektiert, kann die Lokalisation eines Fluorophors weniger präzise bestimmt werden. Dies kann zu einer falschen Abbildung von Strukturen führen oder zu falschen Rückschlüssen über die Verteilung von Molekülen. Eine Möglichkeit die Anzahl der emittierten Photonen zu erhöhen, ist chemische Additive als Triplettlöcher einzusetzen. Sie bewirken, dass die Fluorophore wieder in den Grundzustand relaxieren und somit wieder angeregt werden können. Es wurden verschiedene Additive, die in der Literatur als Triplettlöcher beschrieben sind, getestet. Dazu wurden zunächst ihre Auswirkungen auf den Triplettzustand verschiedener Fluorophore (Alexa Fluor (Al) 488, 532 und 647 und Atto655) mit Hilfe von Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) untersucht. Cyclooctatetraen (COT) bewirkte dabei eine Abnahme der Triplettausbeute von Al488, Al532 und Al647 um ~ 40-60%, bei Atto655 veränderte sie sich nicht. Obwohl die Ergebnisse der FCS-Messungen darauf hindeuten, dass COT in einer erhöhten Anzahl an emittierten Photonen resultiert, konnte dies bei *d*STORM-Messungen nicht bestätigt werden. Hier hatte COT nur einen größeren positiven Effekt auf das Fluorophor Al647 (Zunahme um ~ 60%). Eine Erklärung für diese Widersprüchlichkeit zu den Ergebnissen aus den FCS-Messungen, könnte das Vorhandensein des Schaltpuffers bei *d*STORM-Messungen sein. Dieser bewirkt den Übergang der Fluorophore in den Aus-Zustand bzw. entzieht dem Puffer Sauerstoff.

Bei der Zugabe von 5 mM Kaliumiodid (KI) nahm die Triplettamplitude bei FCS-Messungen nur bei Al488 ab (um ~ 80%). Eine geringe Steigerung (um ~ 10%) der

Intensität von Al488 mit KI konnte bei *d*STORM-Messungen mit niedrigen Konzentrationen ($\sim 0,5$ mM) erzielt werden. Bei einer Konzentration von 5 mM sank die Intensität jedoch wieder um 40%.

Deuteriumoxid (D_2O) soll, anders als die Triplettlöcher, eine Verbesserung der Photonenausbeute dadurch bewirken, dass strahlungslose Relaxationsprozesse minimiert werden. Mit *d*STORM-Messungen konnte gezeigt werden, dass Atto655 und Al647 in D_2O zwar pro An-Zustand mehr Photonen emittieren als in Schaltpuffer ohne D_2O , da die Fluorophore hier jedoch schneller bleichen, letztendlich die gleiche Anzahl an Photonen detektiert werden.

Um die Anzahl an emittierten Photonen zu erhöhen, eignet sich also nur COT bei *d*STORM-Messungen mit Al647 und KI in sehr geringen Konzentrationen bei Al488. D_2O kann eingesetzt werden, wenn eine Probe schnell vermessen werden muss, wie zum Beispiel bei Lebendzellmessungen.

Nicht nur eine zu niedrige Photonenzahl, auch eine zu geringe Photoschaltrate kann Artefakte bei *d*STORM-Messungen erzeugen. Dies wurde anhand von verschiedenen biologischen Strukturen, die mit unterschiedlichen Anregungsintensitäten aufgenommen wurden, deutlich gemacht. Besonders die Aufnahmen von Plasmamembranen sind anfällig für die Generierung von Artefakten. Sie weisen viele inhomogene und lokal dichte Regionen auf. Wenn nun mehr als ein Emitter pro μm^2 gleichzeitig an ist, erzeugt das Auswertungsprogramm große artifizielle Cluster. Die hier durchgeführten Messungen machen deutlich, wie wichtig es ist, *d*STORM-Bilder immer auf mögliche Artefakte hin zu untersuchen, besonders wenn Moleküle quantifiziert werden sollen. Dafür müssen die unbearbeiteten Rohdaten sorgfältig gesichtet werden und notfalls die Messungen mit einer höheren Laserleistung wiederholt werden. Da *d*STORM mittlerweile immer mehr zur Quantifizierung eingesetzt wird und Clusteranalysen durchgeführt werden, wäre es sinnvoll bei Veröffentlichungen die Rohdaten von entscheidenden Aufnahmen der Öffentlichkeit zur Verfügung zu stellen.

Die Färbemethode ist ein weiterer Punkt, durch den Artefakte bei der Abbildung von Molekülen mittels SMLM entstehen können. Häufig werden Antikörper zum Markieren verwendet. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass möglichst kleine Antikörper oder Antikörperfragmente verwendet werden, besonders wenn Clusteranalysen durchgeführt werden sollen. Anderenfalls leidet die Auflösung darunter, bzw. erhöht sich die Gefahr der Kreuzvernetzung von Molekülen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit, wurden Plasmamembran-Ceramide untersucht. Ceramide gehören zu den Sphingolipiden und regulieren diverse zelluläre Prozesse. Verschiedene Stimuli bewirken eine Aktivierung von Sphingomyelinasen (SMasen), die Ceramide in der Plasmamembran synthetisieren. Steigt die Konzentration von Ceramiden in der Plasmamembran an, kondensieren diese zu Ceramid-reichen Plattformen (CRPs). Bisher ist noch wenig über die Verteilung der Ceramide und die Größe der CRPs bekannt. Sie wurden hier über IgG-Antikörper in der Plasmamembran von Jurkat-, U2OS-, HBME- und primären T-Zellen angefärbt und erstmals mit *d*STORM hochaufgelöst, um sie dann zu quantifizieren. Unabhängig von der Zelllinie befanden sich 50% aller Ceramidmoleküle in ~ 75 nm großen CRPs. Im Mittel bestanden die CRPs aus ~ 20 Ceramiden. Mit Hilfe einer Titrationsreihe konnte ausgeschlossen werden, dass diese Cluster nur durch die Antikörper-Färbung artifiziell erzeugt wurden. Bei Inkubation der Zellen mit *Bacillus cereus* Sphingomyelinase (bSMase) stieg die Gesamtkonzentration der Ceramide in der Plasmamembran an, ebenso wie die Ceramidanzahl innerhalb der CRPs, außerdem die Anzahl und Größe der CRPs. Dies könnte zu einer Veränderung der Löslichkeit von Membrankomponenten führen, was wiederum eine Akkumulation bestimmter Rezeptoren oder eine Kompartimentierung bestimmter Proteine erleichtern könnte. Die Anhäufung der Ceramide in den CRPs könnte ebenfalls die lokale Interaktion mit anderen Membranmolekülen erleichtern und dadurch möglicherweise die Reaktivität von Rezeptoren verändern.

Mittels Azid-modifizierten Ceramidanaloga und kupferfreier Click-Chemie wurden Plasmamembran-Ceramide auch in lebenden Jurkat-Zellen mit Hilfe konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM, engl. confocal laser scanning microscopy) und Strukturierter Beleuchtungsmikroskopie (SIM, engl. structured illumination microscopy) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Fettsäure-Kettenlänge und die Position des Azids bei den Ceramidanaloga eine entscheidende Rolle spielt, wie hoch das detektierte Signal in der Plasmamembran letztendlich ist. Die Versuche machen auch deutlich, dass die klickbaren Ceramidanaloga lebendzellkompatibel sind, sodass sie eine hervorragende Möglichkeit darstellen, zelluläre Reaktionen zu verfolgen.

Es wurden hier nicht nur Ceramide in eukaryotischen Zellen analysiert, sondern auch in Bakterien. *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) sind gramnegative Bakterien, die im Menschen eine Sepsis oder eine Meningitis auslösen können. Es wurde mittels

immunhistochemischen Färbungen mit dem anti-Ceramid IgG-Antikörper, aber auch mit den klickbaren Ceramidanaloga, ein Signal in der Membran erhalten, was mit *d*STORM hochaufgelöst wurde. In anderen Bakterien wurden ebenfalls schon Sphingolipide nachgewiesen. Studien zu Ceramiden in *N. meningitidis* wurden bisher jedoch noch nicht veröffentlicht. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals Ergebnisse erhalten werden, die darauf hinweisen, dass *N. meningitidis* ebenfalls Ceramide besitzen könnten.

In einem dritten Projekt wurde die Interaktion zwischen NK-Zellen und *Aspergillus fumigatus* untersucht. Der Schimmelpilz kann eine Invasive Aspergillose in immunsupprimierten Menschen auslösen, was zum Tod führen kann. Verschiedene Studien konnten schon zeigen, dass NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung des Pilzes spielen. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der NK-Zell-Marker CD56 entscheidend für die Pilzerkennung ist. Mit immunhistochemischen Färbungen und LSM-, aber auch *d*STORM-Messungen, konnte gezeigt werden, dass die normalerweise homogen verteilten CD56-Rezeptoren auf der Plasmamembran von NK-Zellen aktiv an die Interaktionsstelle zu *A. fumigatus* transportiert werden. Mit der Zeit akkumulieren hier immer mehr CD56-Proteine, während das Signal in der restlichen Membran immer weiter abnimmt. Es konnte erstmals CD56 als wichtiger Erkennungsrezeptor für *A. fumigatus* identifiziert werden.

In dem letzten bearbeiteten Projekt, wurde die Bindung von Anti-N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor Enzephalitis Autoantikörper an Neuronen untersucht. Bei einer Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis bilden die Patienten Autoantikörper gegen die NR1-Untereinheit ihrer eigenen postsynaptischen NMDA-Rezeptoren. Da die Krankheit oft sehr spät erkannt wird und die Behandlungsmöglichkeiten noch sehr eingeschränkt sind, führt sie noch oft zum Tod. Sie wurde erst vor wenigen Jahren beschrieben, sodass der genaue Mechanismus noch unbekannt ist. Im Rahmen dieser Arbeit, konnten erste Färbungen mit aufgereinigten Antikörper aus Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis Patienten an NMDA-Rezeptor-transfizierte HEK-Zellen und hippocampalen Maus-Neuronen durchgeführt und mit *d*STORM hochaufgelöst werden. Mit den Messungen der HEK-Zellen konnte bestätigt werden, dass die Autoantikörper an die NR1-Untereinheit der Rezeptoren binden. Es konnten erstmals auch die Bindung der

Antikörper an Neuronen hochaufgelöst werden. Dabei wurde sichtbar, dass die Antikörper zum einen dicht gepackt in den Synapsen vorliegen, aber auch dünner verteilt in den extrasynaptischen Regionen. Basierend auf der Ripley's H-Funktion konnten in den Synapsen große Cluster von ~ 90 nm Durchmesser und im Mittel ~ 500 Lokalisationen und extrasynaptisch kleinere Cluster mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ~ 70 nm und ~ 100 Lokalisationen ausgemacht werden. Diese ersten Ergebnisse legen den Grundstein für weitere Messungen, mit denen der Mechanismus der Krankheit untersucht werden kann.

Summary

With single molecule localization microscopy (SMLM) quantification of molecules and the analysis of their distribution becomes possible. In this work various plasma membrane molecules of different eukaryotic and prokaryotic cells were imaged with *d*STORM (*direct* stochastic optical reconstruction microscopy) or PALM (photoactivated localization microscopy) and quantified. To use these super-resolution fluorescence microscopy techniques and answer elaborate biological questions, potential sources of artifacts were identified and strategies to circumvent them developed.

A possible source of artifacts is an insufficient number of photons emitted by fluorophores. If less photons are detected, determining the localization of one fluorophore is less precise. This can cause a wrong reconstruction of structures or might lead to false conclusions about the distribution of molecules. One possibility to increase the number of photons is to use chemical additives which quench the triplet state of fluorophores. They ensure that the fluorophores relax into the ground state allowing them to become excited again. Different additives, described in literature as triplet quenchers, were tested. The effects of these additives on the triplet state of different fluorophores (Alexa Fluor (Al) 488, 532 und 647 und Atto655) were analyzed with fluorescence correlation spectroscopy (FCS). Cyclooctatetraene (COT) resulted in a decrease of triplet state yield of Al488, Al532 and Al647 by ~ 40-60%, yet the triplet state of Atto655 was unaffected. FCS measurements indicated that COT results in an increased number of emitted photons, but *d*STORM measurements could not confirm this finding. Here, COT only revealed a positive effect on the intensity of Al647 (increase by ~ 60%). An explanation for this inconsistency with the FCS results might be the presence of the switching buffer in *d*STORM measurements. The buffer is designed to cause a transition of the fluorophores to and stabilize the off-state by removing oxygen from the sample, counteracting the effect of COT.

On addition of 5 mM potassium iodide (KI) only Al488 fluorophores showed a decreased triplet state rate (~ 80%) in FCS measurements. This finding was confirmed by *d*STORM measurements with low concentrations (~ 0.5 mM) of KI which resulted in a slight intensity increase (~ 10%) of Al488. Higher KI concentration (5 mM) on the other hand showed a reversed effect, resulting in a drop in intensity by ~ 40%.

Deuterium oxide (D₂O) isn't a triplet quencher but should minimize non-radiative processes. *D*STORM measurements with Atto665 and Al647 revealed, that D₂O does

not affect the total number of emitted photons per fluorophore. Instead, D₂O increased the amount of emitted photons per time.

In a nutshell, these results show that *d*STORM measurements with A1647 can be improved using COT, and measurements with A1488 by using very low concentrations of KI. If needed, D₂O can speed up *d*STORM acquisition time considerably, e.g. for life cell measurements.

In addition to an insufficient number of collected photons, inappropriate photoswitching rates can induce artifacts in *d*STORM measurements as well. This was shown using various biological reference structures. Especially the imaging of plasma membranes is prone to generate artifacts. Plasma membranes exhibit a lot of intrinsically three-dimensional structures with high local emitter densities. In these regions of higher fluorophore densities the likelihood of two close fluorophores emitting at the same time is increased. This in turn can result in large artificial clusters due to misinterpretation by the reconstruction software. Taken together, the performed experiments show how important it is to prove *d*STORM images and minimize possibility image artifacts. Thus, raw data movies need to be examined carefully and, if necessary, measurements must be repeated with adapted imaging conditions. Since *d*STORM is increasingly used for quantification and cluster analysis it is recommended to publish raw data in the Supporting information of the manuscript.

Another source of artifacts when imaging molecules with SMLM is the staining procedure. Usually antibodies are used to label biological structures for *d*STORM. In the interest of resolution, small antibodies or just fragments of antibodies should be used, especially if cluster analysis is performed. Otherwise reduced resolution or an increase in cross-linking of molecules might occur.

In the second part of this study plasma membrane ceramides were investigated. Sphingolipid ceramides regulate various cellular processes. Different stimuli initiate activation of sphingomyelinases (SMase) which synthesize ceramides at the plasma membrane. A rise in ceramide concentration leads to a condensation of them in ceramide-rich platforms (CRPs). So far, only little is known about the distribution and the size of CRPs. Here, plasma membrane ceramides of Jurkat-, U2OS-, HBME- and primary T-cells were stained with an IgG-antibody, imaged using *d*STORM and their distribution quantitatively analyzed. Independent of the analyzed cell line, ~ 50% of all ceramides detected in the plasma membrane formed CRPs with a size of ~ 75 nm. On

average one CRP consisted of ~ 20 ceramide molecules. Using a titration series the possibility of artificial cluster generation due to antibody staining was ruled out. Treatment of cells with *Bacillus cereus* sphingomyelinase (bSMase) increased the overall ceramide concentration in the plasma membrane, the number of ceramides in the CRPs as well as the quantity and the size of CRPs. This might result in a higher solubility of membrane components in CRPs which in turn could facilitate accumulation or compartmentation of certain proteins. Accumulation of ceramides in the CRPs could also enable local interaction with other molecules and possibly change the reactivity of some receptors.

To investigate plasma membrane ceramides in living cells azido-modified ceramides and copper-free click chemistry were used for labeling. Imaging was performed using confocal laser-scanning microscopy (LSM) and structured illumination microscopy. It was shown that the length of fatty acid chains and the position of the azido group of ceramide analogues play a decisive role in the magnitude of the detected signal in the plasma membrane. These results demonstrate that azido-functionalized ceramides are live-cell compatible, making them an excellent tool to follow cellular reactions.

In this study, ceramides were not only analyzed in eukaryotic cells but in bacteria as well. *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) are gram-negative bacteria triggering sepsis or meningitis in humans. Using both immunolabeling with anti-ceramide IgG-antibodies and azido-modified ceramides, ceramides were detected for the first time in the membrane of *N. meningitidis* by dSTORM. Although sphingolipids were reported to exist in various bacterial membranes, studies about ceramides in *N. meningitidis* have not yet been published. The results obtained here suggest the presence of ceramides in *N. meningitidis*.

The third part of this thesis addresses the interaction between NK cells and *Aspergillus fumigatus*. The mold can cause invasive aspergillosis in immunocompromised patients which can lead to death. Various studies have already shown that NK cells play a crucial role in the clearance of the fungal infection. Still, the exact mechanism remains unknown. As part of this work the NK cell marker CD56 was identified as a decisive receptor in recognition of the mold. Using LSM and dSTORM measurements in combination with immunocytochemical staining an active transport of the usually homogenous distributed CD56 receptors to the interaction site of NK cells and fungus was detected. Over time CD56 proteins accumulate at these interaction sites while the signal in the rest of the membrane continuously decreases. For the first time this study

was able to identify CD56 as an important recognition receptor for *A. fumigatus*.

In the last project binding of anti-N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor encephalitis autoantibodies were investigated in neurons. Patients with this form of encephalitis generate autoantibodies against the NR1 subunit of their own postsynaptic NMDA receptors. Since NMDA receptor encephalitis is often diagnosed too late and treatment options are limited the disease often proves to be fatal. Anti-NMDA receptor encephalitis was described quite recently, explaining why the exact mechanism remains still unknown. For this study purified antibodies from anti-NMDA receptor encephalitis patients were used to stain NMDA receptor transfected HEK cells and hippocampal mouse neurons. These samples were subsequently imaged with *d*STORM and analyzed. Measurements on HEK cells confirmed that the autoantibodies bind to the NR1 subunit. Using *d*STORM, the binding sites of these antibodies at the neurons were imaged for the first time with super-resolution microscopy. The receptors are densely localized in synapses and more equally distributed at lower density in extrasynaptic regions. Based on Ripley's H function synaptic clusters with a diameter of ~ 90 nm and ~ 500 localizations were determined while the extrasynaptic smaller clusters have a median diameter of ~ 70 nm and ~ 100 localizations per cluster. These first results form the basis for further investigations on the mechanism of anti-NMDA receptor encephalitis.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	VI
1 Einleitung	1
1.1 Plasmamembran	1
1.2 Ceramide	2
1.3 Neisseria meningitidis	4
1.4 Aspergillus fumigatus	6
1.5 Anti-NMDAR-Encephalitis	7
2 Theoretische Grundlagen	11
2.1 Grundlagen der Fluoreszenz.....	11
2.1.1 Absorption und Emission von Licht.....	11
2.1.2 Fluoreszenzquantenausbeute und –lebensdauer	15
2.1.3 Triplettlöschung	16
2.2 Klassische Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie.....	17
2.2.1 Fluorophore und Strategien der Fluoreszenzmarkierung	17
2.2.2 Die Auflösungsgrenze in der Lichtmikroskopie	19
2.2.3 Methoden der Fluoreszenzmikroskopie	20
2.2.4 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	22
2.3 Fluoreszenzmikroskopie jenseits der Auflösungsgrenze	25
2.3.1 Methoden der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie	25
2.3.2 Prinzip der SMLM	27
2.3.3 Photoschaltmechanismus der Fluorophore für die SMLM	28
2.3.4 Quantifizierung von SMLM-Daten	31
3 Material und Methoden	35
3.1 Probenpräparation	35
3.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme	35

3.1.2 Transformation und transiente Transfektion.....	36
3.1.3 Antikörper-Markierung.....	37
3.1.4 Fixierung.....	37
3.1.5 Immunhistochemie.....	39
3.1.6 Aktin-Markierung mit Phalloidin	40
3.1.7 Gangliosid GM1-Markierung mit Choleratoxin	41
3.1.8 Sialinsäure und N-Acetylglukosamin-Markierung mit WGA	41
3.1.9 Click-Reaktionen	42
3.2 Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie.....	44
3.2.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.....	44
3.2.2 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	45
3.2.3 Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie	45
3.2.4 Hochauflösende Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie.....	45
3.2.5 Durchführung der SMLM-Messungen	46
3.2.6 Rekonstruktion von SMLM Daten	47
3.2.7 Analyse von SMLM Daten	47
4 Ergebnisse und Diskussion.....	49
4.1 Eliminierung von Artefakten in der SMLM	49
4.1.1 Artefakte durch zu niedrige Photonenanzahl.....	49
4.1.2 Artefakte durch zu niedrige Photoschaltraten.....	52
4.1.3 Artefakte durch die Probenpräparation.....	57
4.2 Quantifizierung von Plasmamembran-Ceramiden.....	63
4.2.1 Plasmamembran-Ceramide in Eukaryoten	63
4.2.2 Colokalisierung von Plasmamembran-Ceramiden mit anderen Molekülen ..	68
4.2.3 Untersuchung von Plasmamembran-Ceramiden mittels Click-Chemie	71
4.2.4 Ceramide in Prokaryoten	74
4.3 Identifizierung von Pathogen-Erkennungsrezeptoren auf NK-Zellen	80

4.4 Analyse der Autoantikörper von Anti-NMDAR Enzephalitis Patienten mittels <i>d</i> STORM.....	83
5 Fazit und Ausblick	87
5.1 Artefakte in der SMLM.....	87
5.2 Plasmamembran-Ceramide	89
5.3 CD56 ist ein Erkennungsrezeptor für <i>A. fumigatus</i>	93
5.4 Anti-NMDAR Enzephalitis Autoantikörper	94
Abkürzungsverzeichnis.....	96
Literaturverzeichnis.....	98
Eigene Publikationen	117
Danksagung.....	118
Eidesstattliche Erklärung.....	121

1 Einleitung

1.1 Plasmamembran

Die Plasmamembran dient der Abgrenzung des Zellinneren von der umgebenden Umwelt, mit jedoch der Möglichkeit des selektiven Austausches bestimmter Moleküle. Ihre Grundstruktur setzt sich aus einer Phospholipid-Doppelschicht zusammen, in der sich verschiedene integrale und periphere Proteine befinden [Purves et al., 2006]. Während lipophile Moleküle die 6-10 nm dicke Plasmamembran einfach passieren können, werden hydrophile Moleküle über Kanäle, Transporter oder Pumpen transportiert. Die Membranproteine erfüllen neben dieser Transportfunktion noch weitere Aufgaben, wie zum Beispiel Zelladhäsion, Zell-Zell-Kontakt oder Kontakt zu dem Zytoskelett. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Erkennungsreaktion des Immunsystems und ermöglichen als Rezeptoren Signaltransduktionen [Nicolson, 2015]. Die Plasmamembran enthält auch Kohlenhydrate, die an Proteine und Lipide kovalent gebunden sind und in den extrazellulären Raum hineinreichen. Die Proteine bzw. Lipide mit einer Kohlenstoffverbindung werden Glykoproteine bzw. Glykolipide genannt. Sie dienen als Erkennungssignal für andere Zellen oder Moleküle [Ohtsubo & Marth, 2006].

Das erste Plasmamembran-Modell wurde 1972 von Singer und Nicolson veröffentlicht [Singer & Nicolson, 1972]. Dieses sogenannte *Flüssig-Mosaik-Modell* besagt, dass sich in der flüssigen Lipiddoppelschicht die Proteine und Lipide frei bewegen und zufällig verteilt sind. Neuere Studien weisen jedoch eher auf eine Heterogenität in der Membranstruktur und eine eingeschränkte Protein- bzw. Lipiddiffusion hin. Nach dem *Picket-Fence-Modell* werden Proteine und Lipide in kleine Diffusionsräume eingesperrt. Diese Areale sind durch das Aktinskelett eingegrenzt (*fence*), wobei Transmembranproteine das Zytoskelett in der Membran verankern (*picket*) [Kusumi & Suzuki, 2005]. Es wird außerdem vermutet, dass sich Lipide, besonders Sphingolipide und Cholesterol, in dynamischen, kurzlebigen Mikrodomänen anordnen [Vereb et al., 2003]. Bestimmte Membranproteine sollen sich ebenfalls in diesen anreichern. Dadurch kommen die Proteine zusammen, die eine hohe Affinität zu diesen Lipiden haben, andere Proteine werden ausgeschlossen. Somit könnten Protein-Protein-Interaktionen reguliert werden, was entscheidend für die Signaltransduktionen ist [Brown, 2006]. Diese Domänen auf der Plasmamembran werden oft auch "lipid rafts" genannt [Simons & Ikonen, 1997]. Ihnen wird eine wichtige Rolle in verschiedensten biologischen

1 Einleitung

Prozessen, wie Signaltransduktion, Zelladhäsion, Zellmigration, synaptischer Transmission, Exo- und Endozytose und Apoptose nachgesagt. Ebenso sollen Bakterien, Viren und Toxine sie als Eintrittspforte nutzen [Munro, 2003; Brown, 2006].

Die Existenz, die Größe bzw. die Zusammensetzung der lipid rafts wird in der Literatur kontrovers diskutiert [Anderson & Jacobson, 2002; Edidin, 2001; Heerklotz, 2002]. Am häufigsten wurden lipid rafts mit Hilfe des Detergenz Triton bei niedrigen Temperaturen isoliert und ihre Lipid- und Protein-Zusammensetzung untersucht [Schroeder et al., 1998; London & Brown, 2000]. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass durch diese Methode lipid rafts künstlich erzeugt bzw. vergrößert werden [Munro, 2003]. Eine weitere Möglichkeit der Erforschung von lipid rafts stellen mikroskopische Techniken dar. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Auflösung hoch genug sein muss, um auch Domänen von wenigen Nanometern detektieren zu können. Methoden der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie liefern hierfür eine hervorragende Möglichkeit dies umzusetzen. Mittlerweile wurden schon viele Studien veröffentlicht, in denen verschiedenste Plasmamembranmoleküle auf unterschiedliche Weisen fluoreszenzmarkiert und hochaufgelöst wurden, um dann u.a. eine Aussage über deren Verteilung zu machen [Sengupta et al., 2011; Malkusch et al., 2013; Letschert et al., 2014; Fricke et al., 2014; Saka et al., 2014; Magenau et al., 2015].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Membranlipide, aber auch Membranproteine, mit unterschiedlichen Färbemethoden markiert und entweder mit konfokaler Mikroskopie detektiert oder mit *d*STORM (engl.: *direct* stochastic optical reconstruction microscopy) bzw. photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie (PALM) hochaufgelöst. Die daraus erhaltenen Ergebnisse wurden verwendet, um mehr über die Verteilung, Interaktionen oder Funktionen der Membranmoleküle herauszufinden.

1.2 Ceramide

Ceramide sind eine Untergruppe der Sphingolipide, die in eukaryotischen Zellen vorkommen, aber auch schon in Bakterien der Gattung *Sphingobacterium* nachgewiesen wurden [Yano et al., 1983]. Ceramide setzen sich aus einem Sphingosin und einer Fettsäure zusammen, die über eine Amidbindung kovalent verbunden sind. Ihre Kopfgruppe besteht nur aus einem Wasserstoffatom, sodass sie auch als einfachste Gruppe der Sphingolipide bezeichnet werden. Die Fettsäure der Ceramide kann unterschiedlich lang sein und aus 14 bis 32 Kohlenstoffatome bestehen [Deigner et al., 2007], wobei die meisten Ceramide Fettsäuren mit 16-24 C-Atomen aufweisen [Stancevic & Kolesnick, 2010]. Sie sind stark hydrophob und somit nicht in wässrigem

Medium löslich. Es gibt mehrere Wege der Ceramid-Biosynthese. Zum einen können sie im Endoplasmatischem Retikulum *de novo* synthetisiert werden. Der erste Schritt hierbei ist die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA durch die Serin-Palmitoyltransferase [Morad & Cabot, 2013]. Das Produkt daraus, nämlich 3-Ketosphingarin, wird dann durch die 3-Ketosphingarinreduktase zu Sphingarin reduziert. An dieses wird eine Fettsäure geknüpft, wodurch Dihydroceramid entsteht. Anschließend wird durch eine Dihydroceramid-Desaturase eine Doppelbindung eingeführt, sodass schlussendlich ein Ceramid gebildet wird. Die zweite Möglichkeit ist die Hydrolyse von Sphingomyelin (SM), das in der Plasmamembran zu Ceramid und Phosphocholin durch Sphingomyelinasen (SMasen) gespalten wird. Es sind mittlerweile fünf verschiedene SMasen identifiziert, die je nach pH-Optimum entweder zu den neutralen, alkalischen oder sauren SMasen eingeordnet werden. Neutrale SMasen befinden sich an der Innenseite der Plasmamembran und hydrolysieren dort SM. Alkalische SMasen wurden bisher nur an der Oberfläche von Mikrovillimembranen im Darmtrakt, im Darmlumen und der Galle nachgewiesen [Duan et al., 2003]. Die sauren SMasen sind in der Innenseite von Lysosomen lokalisiert und werden erst durch verschiedene Stimuli an die äußere Seite der Plasmamembran transportiert [Kornhuber et al., 2014].

Ceramide stellen jedoch auch den Ausgangspunkt für die Synthese komplexerer Sphingolipide dar, wie zum Beispiel Glykosphingolipide oder SM [Kolter et al., 2002]. Sie können auch durch Ceramidasen wieder zu Sphingosin gespalten werden, woraus dann zum Beispiel Sphingosin-1-Phosphat synthetisiert werden kann, das eine wichtige Rolle unter anderem in der Zellmigration und dem Überleben der Zellen spielt [Hannun & Obeid, 2008].

Ceramide sind wichtige Signalmoleküle, deren Beteiligung schon in einer Vielzahl von zellulären Prozessen nachgewiesen werden konnte, wie z.B. Differenzierung, Proliferation, Stoffwechselaktivität, aber auch Wachstumsstillstand, Apoptose und Entzündungen [Bieberich, 2011; Hannun & Obeid, 2002; Gulbins & Li, 2006; Simons & Ikonen, 1997; Babiychuk et al., 2008; Stancevic & Kolesnick, 2010; van Blitterswijk et al., 2003; Bollinger et al., 2005; Grassme et al., 2002; Beyersdorf & Muller, 2015; Apostolidis et al., 2016; Holopainen et al., 1998]. Des Weiteren können sie die Entwicklung und Vernetzung von Neuronen inhibieren, wodurch eine Depression entstehen kann [Kornhuber et al., 2014].

1 Einleitung

Es wurde mittlerweile eine Reihe von Stimuli gefunden, die zur Aktivierung der SMasen führen. Dazu zählen die Aktivierung von CD95 [Grassme et al., 2003a], CD40 [Grassme et al., 2002] oder FcγRII [Abdel Shakor et al., 2004], Infektionen mit verschiedenen Pathogenen [Grassme et al., 2003b], Chemotherapeutika oder anderer zellulärer Stress [Charruyer et al., 2005]. Steigt die Konzentration an Ceramiden in der Plasmamembran an, kondensieren diese zu Ceramid-reichen Plattformen (CRPs) [Stancevic & Kolesnick, 2010], die die Akkumulation diverser Rezeptoren und die Vesikelformation und -fusion erleichtern. Verschiedene Pathogene, wie *Neisseria gonorrhoeae* oder *Pseudomonas aeruginosa*, nutzen diese Plattformen auch für ihre Internalisierung in die Wirtszelle oder lösen eine Bildung dieser aus, um Apoptose zu induzieren [Esen et al., 2001; Grassmé et al., 1997; Hauck et al., 2000; Grassme et al., 2003b; Grassme et al., 2005; Avota et al., 2011; Simonis et al., 2014; Faulstich et al., 2015].

Durch die Komplexität des Metabolismus und die vielfältigen Funktionen von Ceramiden, ist noch vieles ungeklärt. Es ist zum Beispiel wenig über die molekulare Organisation der Ceramide in der Plasmamembran bekannt. Dies beruht hauptsächlich darauf, dass die meisten Studien mit Standard-Fluoreszenzmikroskopischen Techniken durchgeführt wurden. Mit diesen ist es nicht möglich Nanodomänen mit einer Größe unter 200 nm aufzulösen bzw. Aussagen über die Anzahl von einzelnen Molekülen zu treffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ceramide auf der Plasmamembran verschiedener Zellen erstmals mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie abgebildet, um sie dann zu quantifizieren und einer Clusteranalyse zu unterziehen. Es wurde außerdem der Frage nachgegangen, inwiefern sich die Anzahl der Ceramide bzw. deren Verteilung bei SMase-Inkubation verändert. Im Zuge dessen wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt, mit denen die Echtheit der Cluster überprüft werden sollte.

Des Weiteren wurden Zellen mit Azid-modifizierten Ceramidanaloga gefüttert und mittels Click-Chemie gefärbt. Dabei wurde die Einbaueffizienz von Ceramidanaloga mit unterschiedlich langen Fettsäuren bzw. Positionen des Azids analysiert.

1.3 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis (*N. meningitidis*) sind ~ 1 µm große gramnegative Diplokokken, die ausschließlich humanpathogen sind [Gabutti et al., 2015]. Sie besiedeln den Nasenrachenraum und können durch direkten Kontakt über Atemwegssekrete oder Tröpfchenaerosole übertragen werden. Befinden sich die Bakterien im Nasenrachenraum beeinträchtigen sie den Menschen nicht [Gabutti et al., 2015]. Unter

bestimmten Umständen können sie jedoch in die Blutbahn gelangen, wo sie sich schnell vermehren und eine lebensbedrohliche Sepsis auslösen können. Von dort können sie dann auch die Blut-Liquor-Schranke durchbrechen, sodass eine Meningitis entstehen kann, die zum Teil innerhalb weniger Stunden zum Tod führt [Coureuil et al., 2013]. In europäischen Ländern oder den USA treten pro Jahr nur ~ 0,5-5 Fälle pro 100 000 Menschen auf. In afrikanischen Ländern südlich der Sahara wurden in den letzten Jahren ~ 1000 Erkrankungen pro 100 000 Menschen und pro Jahr gezählt [Harrison et al., 2009]. Laut WHO sterben 5 – 10 % der Patienten. Welche bakteriellen Faktoren genau für die Vermehrung, das Überleben oder für die Adaption in die Blutbahn bzw. das Passieren der Blut-Liquor-Schranke der *N. meningitidis* entscheidend sind, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein Grund dafür ist, dass die Bakterien ausschließlich im Menschen vorkommen und sie somit nicht im Tiermodell erforscht werden können [Coureuil et al., 2013]. Die meisten Erkenntnisse wurden daher entweder an verstorbenen Patienten oder *in vitro* an zum Beispiel mikrovaskulären Endothelzellen von menschlichen Gehirnen (HBME-Zellen) erlangt [Pron et al., 1997; Unkmeir et al., 2002]. Dabei wurde unter anderem ein Membranprotein charakterisiert, welches für die Internalisierung in die humanen Zellen und das Überleben in der Blutbahn bzw. in der Hirnflüssigkeit entscheidend ist. Zum einen spielen Typ IV Pili bei der Adhäsion von *N. meningitidis* an Endothelzellen eine wichtige Rolle [Scheuerpflug et al., 1999]. Mit ihnen binden sie an CD147 auf den Zellen [Bernard et al., 2014]. Ein weiterer Rezeptor auf den Endothelzellen stellt der β 2-Adrenozeptor dar, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der das Passieren der Bakterien durch die Blut-Liquor-Schranke erleichtert [Coureuil et al., 2014]. Ebenso sind die Proteine Opa und Opc auf der äußeren Membran der Bakterien entscheidend für die Adhäsion und Invasion [Unkmeir et al., 2002]. *N. meningitidis*, die sich im Nasenrachenraum befinden, sind ungekapselt, während die meisten Bakterien, die sich im Blut oder Liquor befinden mit einer Polysaccharid-Kapsel umhüllt sind [Nassif, 1999]. Studien haben gezeigt, dass die Kapsel entscheidend ist, damit die Bakterien intrazellulär überleben und nicht vom Immunsystem des Wirts erkannt und phagozytiert werden [Nikulin et al., 2006]. Für die Internalisierung scheinen die Bakterien CRPs auf Endothelzellen zu nutzen [Simonis et al., 2014]. Sie induzieren dafür zunächst eine Aktivierung der sauren SMase, sodass Ceramide an der Kontaktstelle zu den Bakterien angereichert werden. Dies bewirkt wiederum eine Rekrutierung des Tyrosin-Kinase Rezeptor ErbB2 [Simonis et al., 2014], der wichtig für eine Reorganisation des Aktinskeletts ist, was schlussendlich

1 Einleitung

entscheidend für die Bakterienaufnahme ist [Hoffmann et al., 2001; Lambotin et al., 2005].

In Kooperation mit dem Lehrstuhl für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg, sollte die Verteilung der Ceramide auf der Plasmamembran von *N. meningitidis* infizierten HBME-Zellen hochaufgelöst werden. Im Zuge dessen wurden auf der Oberfläche der Bakterien ebenfalls Ceramide detektiert. Dies wurde mit Antikörperfärbungen und mittels Click-Chemie näher analysiert.

1.4 *Aspergillus fumigatus*

Unter den rund 200 Arten der Schimmelpilzgattung *Aspergillus*, ist *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) der wichtigste humanpathogene Pilz [Dagenais & Keller, 2009]. Er kann sich entweder sexuell oder asexuell vermehren [O'Gorman et al., 2009]. Bei der asexuellen Fortpflanzung sondert er 2-3,5 µm große Konidien in die Luft ab, von denen jeder Mensch täglich mehrere einatmet. Durch ihre geringe Größe, können sie bis in die Lungenalveolen vordringen [Ben-Ami et al., 2010]. Für Menschen mit intaktem Immunsystem ist es kein Problem die Sporen mit Zellen des angeborenen Immunsystems abzuwehren. Makrophagen sind dabei die ersten Immunzellen, die die Konidien phagozytieren. Aber auch Neutrophile und dendritische Zellen (DCs) werden an den Ort der Infektion rekrutiert, wo sie die Konidien zerstören. Konidien, die dieser Abwehr entgehen, können auskeimen. Im Gegensatz zu den Makrophagen, können Neutrophile und DCs diese so entstandenen Hyphen ebenfalls noch zerstören [Ben-Ami et al., 2010]. Aktivierte DCs aktivieren naive T-Zellen, sodass auch das adaptive Immunsystem eine wichtige Rolle bei einer *A. fumigatus* Infektion spielt [Morton et al., 2014].

Je nach Schwächung des Immunsystems, kann *A. fumigatus* verschiedene Krankheitsbilder bei Menschen auslösen. Bei Patienten mit beeinträchtigter Lungenfunktion, wie zum Beispiel Asthma, kann bei Kontakt mit *A. fumigatus* eine allergische bronchopulmonale Aspergillose entstehen, die u. a. Schmerzen im Brustkorb als Symptom mit sich zieht. Ein weiteres Krankheitsbild ist die nicht-invasive Aspergillose, die insbesondere Tuberkulose Patienten betrifft. Hier kolonisiert der Pilz zwar die Schleimhäute, infiltriert jedoch nicht das umliegende Gewebe. [Lamoth, 2016] Die schlimmste Form der Aspergillose ist die invasive Aspergillose (IA). Sie tritt bei hoch immungeschwächten Menschen auf, wie zum Beispiel Krebs- oder Transplantationspatienten. Da das Immunsystem hier die Konidien nicht bekämpfen kann, dringt der Pilz mit seinen Keimschläuchen in das Gewebe ein und kann in den

Blutstrom gelangen. Dies kann zu intravaskulären Thrombosen oder Nekrotisierung des umliegenden Gewebes führen. Die Sterblichkeitsrate dieser infizierten Patienten liegt je nach Infektionsort und Behandlung bei 40-90% [Dagenais & Keller, 2009].

Erst in den letzten Jahren wurde herausgefunden, dass auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von *A. fumigatus* spielt. Die Studie von Stuheler et al. bewies, dass die NK-Zellzahl stark mit dem Krankheitsverlauf der IA nach einer Stammzelltransplantation korreliert [Stuehler et al., 2015]. Eine verspätete NK-Zellrekonstitution und eine geringere NK-Zellzahl waren mit einem schlechteren Krankheitsverlauf assoziiert, wohingegen Patienten mit einer hohen NK-Zellzahl einen kontrollierten Krankheitsverlauf aufwiesen. NK-Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem. Ihre Aufgabe ist es infizierte oder entartete Zellen zu lysieren, aber auch das adaptive Immunsystem zu modulieren [Schuster et al., 2016]. Zwei Studien konnten zeigen, dass NK-Zellen durch Interaktion mit *A. fumigatus* aktiviert werden [Schmidt et al., 2011; Bouzani et al., 2011]. Schmidt et al. konnten nachweisen, dass aktivierte Zellen zytotoxische Granzyme und Perforine ausschütten und damit *A. fumigatus* Hyphen zerstören. Bouzarni et al. fanden dagegen heraus, dass durch direkten Kontakt mit *A. fumigatus*-Keimlinge NK-Zellen Interferon γ ausschütten und dies zu einer Schädigung des Pilzes führt. Wie genau die NK-Zellen den Pilz erkennen, wurde bisher noch nicht herausgefunden.

In einer Kooperation u.a. mit dem Lehrstuhl Innere Medizin II der Universität Würzburg wurde der Frage nachgegangen, welche Moleküle der NK-Zellen bei der Erkennung von *A. fumigatus* eine wichtige Rolle spielen. Es wurde konfokale Fluoreszenzmikroskopie, aber auch dSTORM genutzt, um die Proteine zu detektieren und ihre Verteilung zu analysieren.

1.5 Anti-NMDAR-Encephalitis

N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDARs) sind ionotrope Glutamatrezeptoren, die eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität spielen und somit unerlässlich für Lernprozesse oder das Gedächtnis sind [Hardingham & Bading, 2010]. Eine Unterfunktion der NMDARs wird in Verbindung mit neuropsychiatrischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Schizophrenie, gebracht [Coyle, 2006]. NMDARs sind Heterotetramere, die aus je zwei Kopien einer NR1- und einer NR2-Untereinheit zusammengesetzt sind [Karakas & Furukawa, 2014]. Die Rezeptoren bestehen aus einer aminoterminalen Domäne, die die Öffnung und Deaktivierung der Ionenkanäle kontrolliert, aus einer Liganden-bindenden Domäne, die mit Agonisten und

1 Einleitung

Antagonisten interagiert und somit verantwortlich für die Kanalöffnung ist, aus einer Transmembrandomäne, die den Ionenkanal bildet und außerdem aus einer intrazellulären carboxyterminalen Region, die mit Proteinen in der Postsynapse interagiert [Karakas & Furukawa, 2014]. Für die Aktivierung der Kanäle ist eine gleichzeitige Bindung von Glycin bzw. D-Serin an die NR1-Untereinheit und von L-Glutamat an die NR2-Untereinheit notwendig. Es gibt postsynaptische und extrasynaptische NMDARs, wobei die Funktion der extrasynaptischen Rezeptoren noch nicht vollständig geklärt ist. Störungen im Gleichgewicht zwischen synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren scheinen jedoch mit neuronalen Dysfunktionen, wie zum Beispiel Ischämie oder der Huntington-Krankheit verbunden zu sein [Hardingham & Bading, 2010].

2007 wurde von Dalmau et al. eine neuroimmunvermittelte Krankheit beschrieben, die als Anti-NMDAR Enzephalitis bezeichnet wurde [Dalmau et al., 2007]. Bei ihr bilden Patienten Autoantikörper gegen die N-terminale extrazelluläre Domäne der NR1-Untereinheit ihrer eigenen NMDARs [Gleichman et al., 2012]. Mittlerweile sind ~ 1000 Anti-NMDAR Enzephalitis Fälle beschrieben, sodass mehr über die Entstehung und den Ablauf der Krankheit bekannt ist, wobei auch noch viele offene Fragen vorhanden sind [Fischer et al., 2016]. Sie wurde schon in Menschen jeden Alters (8 Monate bis 84 Jahren) nachgewiesen [Peery et al., 2012]. Oft geht die Krankheit aus einer Infektion, einem Tumor oder einer Kombination aus beiden hervor. ~ 60% der Patienten haben einen Tumor, Frauen meist ein Eierstock-Teratom, Männer ein Hodenkeimzelltumor [Fischer et al., 2016]. Anti-NMDAR Enzephalitis kann meist in drei Krankheitsphasen unterteilt werden [Peery et al., 2012; Fischer et al., 2016]. Die erste Phase ist die sogenannte Vorphase mit einem unspezifischen Krankheitsbild, das Fieber, Diarrhoe, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Konzentrationsstörungen beinhalten kann. Auf Grund dieser Symptome wird sie oft fälschlicherweise als Influenza diagnostiziert. In der zweiten Phase zeigen die Patienten psychiatrische und neurologische Symptome, wie Gedächtnisverlust, Orientierungslosigkeit, Krampfanfälle und Psychosen. In dieser Phase werden manche Patienten zu einem Psychiater überwiesen, wo sie Psychopharmaka verschrieben bekommen. Die dritte Phase geht mit autonomen Dysfunktionen, wie Hyperventilation, abnormalen unwillkürlichen Bewegungen, Hypotonie und Herzrhythmusstörungen einher. Diagnostiziert werden kann die Krankheit, indem NMDAR-Autoantikörper im Serum, besser jedoch in der Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit nachgewiesen wird. Anti-NMDAR Enzephalitis wird dann u.a.

mit Immunsuppressiva, Plasmaaustausch und wenn vorhanden mit dem Entfernen des Tumors behandelt. Bei richtiger und frühzeitiger Behandlung genesen 75% der Patienten wieder vollständig. Wird sie nicht oder zu spät behandelt liegt die Sterberate bei 100%. Einen Rückfall erleben 20-25% der Patienten. [Peery et al., 2012]

Wie und warum die Autoantikörper gebildet werden, bleibt größtenteils noch ungewiss. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass bei Bindung der Autoantikörper an die NR1-Untereinheit, die Funktion des NMDAR-Kanals gestört ist [Gleichman et al., 2012]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Autoantikörper die Dichte der NMDA-Rezeptoren reversibel reduziert, hauptsächlich durch eine erhöhte Rezeptorinternalisierung [Moscato et al., 2014]. Mikasova et al. haben 2012 eine Studie veröffentlicht, in der sie herausgefunden haben, dass NMDAR-Autoantikörper die Interaktion zwischen Ephrin-B2 Rezeptoren (EphB2R) und NMDAR in der postsynaptischen Membran schwächen [Mikasova et al., 2012]. EphB2R gehören zu den Rezeptortyrosinkinasen, die durch Ephrin-B2 aktiviert werden. Sie modulieren die Langzeit-Potenzierung, wahrscheinlich durch die Interaktion mit NMDARs [Planaguma et al., 2016]. Wird die Interaktion zwischen EphB2R und NMDAR durch die Autoantikörper geschwächt, werden die NMDARs in den extrasynaptischen Bereich transloziert und dort internalisiert [Mikasova et al., 2012]. Planaguma et al. haben nun Mäuse mit Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit von Anti-NMDAR Enzephalitis Patienten infundiert, wodurch die Dichte der NMDARs abnahm und die Mäuse die typischen Anti-NMDAR Enzephalitis Symptome aufzeigten. Sie konnten gleichzeitig auch eine Abnahme der Dichte der EphB2Rs beobachten. Wurden nun diese Mäuse mit Ephrin-B2 behandelt, konnte die Abnahme der EphB2Rs und der NMDARs verhindert werden, genauso wie die pathogenen Effekte der Autoantikörper [Planaguma et al., 2016]. Die Erkenntnis, dass Ephrin-B2 die NMDARs stabilisiert und den Ausbruch der Anti-NMDAR Enzephalitis verhindern kann, könnte eine mögliche neue Behandlungsstrategie der Krankheit darstellen.

Trotz der mittlerweile umfangreichen Studien über Anti-NMDAR Enzephalitis bleiben noch viele Fragen offen. Zum Beispiel wie genau die Autoantikörper die Lokalisation der NMDA-Rezeptoren in der Postsynapse beeinflussen und sie die Veränderungen in der Rezeptorexpression und -internalisierung induzieren und dies zu einer Störung der synaptischen Plastizität führt. Eine Methode, mehr über die Lokalisation und Anzahl der NMDARs und die Veränderung der Rezeptoren bei Anti-NMDAR Enzephalitis herauszufinden, könnte die fluoreszenzbasierte Lokalisationsmikroskopie darstellen. Im

1 Einleitung

Rahmen dieser Arbeit wurden in einer Kooperation mit dem Hans-Berger Lehrstuhl für Neurologie der Universitätsklinik Jena erste Messungen mit Autoantikörpern aus Anti-NMDAR Enzephalitis-Patienten an HEK-Zellen und Neuronen mit Hilfe von *d*STORM durchgeführt.

2 Theoretische Grundlagen

Um biologische Strukturen, Molekülinteraktionen und -verteilungen zu untersuchen, haben sich die Fluoreszenzspektroskopie und –mikroskopie als wirksame Methoden erwiesen und etabliert. All diese Techniken haben gemeinsam, dass Fluorophore als hoch sensitive Marker der Zielstruktur verwendet werden (Kapitel 2.2.1). In diesem Kapitel werden zunächst die theoretischen Grundlagen der Fluoreszenz beschrieben (Kapitel 2.1) und einige spektroskopische und mikroskopische Verfahren vorgestellt, die sich die Fluoreszenz zu Nutze machen (Kapitel 2.2.3-2.3.1). Hierbei wird besonders auf die Einzelmolekül- Lokalisationsmikroskopie eingegangen (Kapitel 2.3.1-2.3.3) und wie die daraus gewonnenen Daten analysiert werden können (Kapitel 2.3.4).

2.1 Grundlagen der Fluoreszenz

2.1.1 Absorption und Emission von Licht

Moleküle nehmen, ebenso wie Atome, nur diskrete Energiezustände an. Im Gegensatz zu Atomen sind jedoch bei Molekülen nicht nur verschiedene Elektronenzustände vorhanden, es wird auch zwischen Rotations- und Schwingungszuständen unterschieden, die durch Rotation um einzelne Bindungen oder des gesamten Moleküls, bzw. Schwingung seiner Einzelatome entstehen. Die Energiedifferenzen der jeweiligen Zustände unterscheiden sich zwischen den drei Typen sehr stark. Höhere Rotationszustände können schon bei Raumtemperatur besetzt werden, da hierfür nur 10^{-3} eV benötigt werden. Um in einen angeregten Schwingungszustand zu gelangen, sind dagegen 0,1-0,4 eV nötig, sodass dies nur bei höheren Temperaturen stattfindet. Die elektronischen Zustände sind energetisch so weit auseinander (1-5 eV), dass auch bei hoher Temperatur kein höheres Niveau erreicht wird. Möglich ist dies nur, wenn das Molekül mit elektromagnetischer Strahlung angeregt wird. Die Energie dieser Photonen ergibt sich nach Max Planck aus der Gleichung:

$$E = h * \nu = h * \frac{c}{\lambda}, \quad (1)$$

wobei h für das Plancksche Wirkumsquantum, ν für die Frequenz, c für die Lichtgeschwindigkeit und λ für die Wellenlänge steht.

Wird diese Energie an Chromophore abgegeben, gelangen deren Valenzelektronen, die sich im Grundzustand mit einer stabilen Konfiguration befinden, im

2 Theoretische Grundlagen

Femtosekundenbereich in ein höheres, angeregtes Energieniveau. Für den Übergang eines Elektrons aus dem Grundzustand S_0 in den ersten angeregten Singulettzustand S_1 muss nach Bohr die Mindestenergie der Energiedifferenz

$$\Delta E = E_{S_1} - E_{S_0} \quad (2)$$

der beiden Energiezustände vorhanden sein. [Atkins & Paula, 2008]

Bei der Anregung von Molekülen mit Licht muss beachtet werden, dass die Energie nicht nur für die Anhebung der Elektronen in einen elektronisch höheren Zustand verwendet wird, sondern auch in ein höheres Vibrationsniveau. Dies verdeutlicht das Franck-Condon Prinzip [Franck, 1926; Condon, 1926], das in Abbildung 1 dargestellt ist. Es basiert darauf, dass Elektronen eine geringere Masse als Atomkerne besitzen. Dies hat zur Folge, dass in der Zeit, in der ein Elektron in einen elektronisch angeregten Zustand gelangt, sich die Kernposition nicht verändert. Die elektronischen Übergänge finden demnach vertikal statt, sodass sich das Molekül in einem anderen Schwingungsniveau befindet als vor der Anregung. Elektronen in den angeregten Singulettzuständen besitzen eine instabile Konfiguration, sodass die Chromophore ihre überschüssige Energie wieder abgeben, um in den stabilen Grundzustand zurückzukehren. Die Relaxation kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen, wie im Jablonski-Diagramm schematisch dargestellt ist (Abbildung 2). Dabei werden radiative und nicht-radiative Relaxationen unterschieden.

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, befindet sich ein angeregtes Elektron meist in einem höheren Vibrationszustand. Zunächst gelangen die Elektronen aus dem Singulettzustand S_n mit $n > 1$ in einen höheren Vibrationszustand von S_1 . Von dort gelangen sie über Abgabe von Energie durch Kollision mit anderen Molekülen, in den untersten Schwingungszustand des S_1 -Zustands. Diese vibronische Relaxation ist strahlungslos und findet in einem Bereich von $10^{-10} - 10^{-12}$ s statt. Aus diesem Zustand sind nun mehrere Wege der Relaxation möglich. Zum einen kann ein Elektron weiterhin seine Energie strahlungslos abgeben und in den elektronischen Grundzustand übergehen. Zum anderen kann eine radiative Relaxation, also eine Rückkehr der Elektronen in den Grundzustand durch Emission von Licht, die Lumineszenz genannt wird, stattfinden. Findet der Übergang dabei direkt aus dem untersten Vibrationszustand von S_1 in den Grundzustand S_0 statt, wird das dabei emittierte Licht Fluoreszenz genannt. Ein Elektron kann jedoch auch strahlungslos von S_1 in den ersten Triplettzustand T_1 übergehen. Ob ein Molekül in den Triplettzustand übergeht, ist meist

nicht vorhersagbar und hängt von dem verwendeten Fluorophor ab. Dieser als Intersystem Crossing bezeichnete Vorgang erfordert eine Spinumkehr und ist somit verboten. Von dort aus kann das Elektron entweder wieder strahlungslos oder aber unter Emission eines Phosphoreszenzphotons in den Singulett-Grundzustand relaxieren. Da letzteres abermals eine Spinumkehr des Elektrons im angeregten Orbital bedarf und somit ebenfalls einen verbotenen Vorgang darstellt, ist die Phosphoreszenz ein relativ unwahrscheinlicher Prozess. Dementsprechend ist auch die Aufenthaltsdauer des Elektrons im T_1 -Zustand länger. Die Lebenszeit kann hier bis zu 100 s betragen, während ein Elektron in einem angeregten Singulettzustand nur $10^{-7} - 10^{-9}$ s verweilt. Auf Grund der langen Lebenszeit der Moleküle im Triplettzustand, ist dieser oft in Photozerstörungsprozessen involviert [Liphardt et al., 1982] (Kapitel 2.1.3).

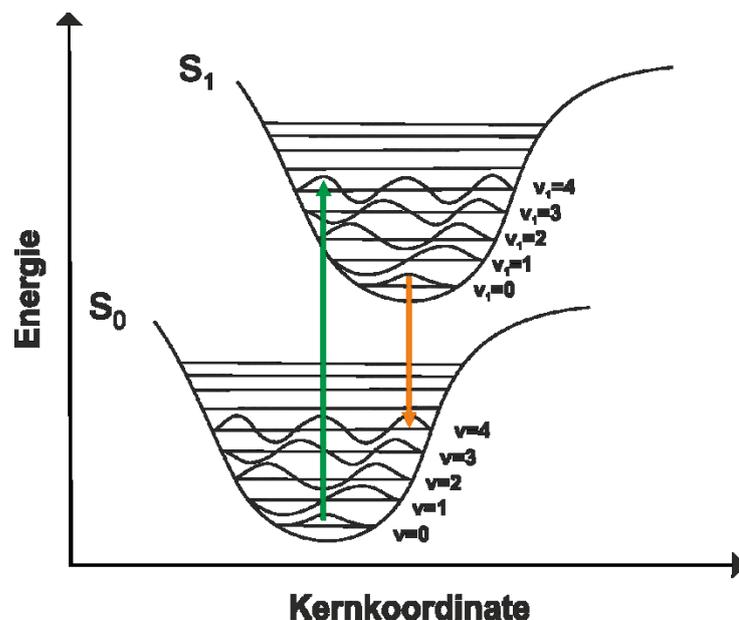


Abbildung 1: Franck-Condon-Prinzip. Die elektronischen Zustände (S) teilen sich weiter in verschiedene Vibrationszustände (v) auf. Bei einem elektronischen Übergang verändert sich die Lage des Kerns nicht, sodass sich das Molekül nach der Anregung in einem höheren Schwingungszustand befindet. Bevor das Elektron wieder in den Grundzustand S_0 zurückkehrt, relaxiert es in das unterste Schwingungsniveau des S_1 -Zustands, wodurch es anschließend in ein höheres Schwingungsniveau des Grundzustands gelangt.

2 Theoretische Grundlagen

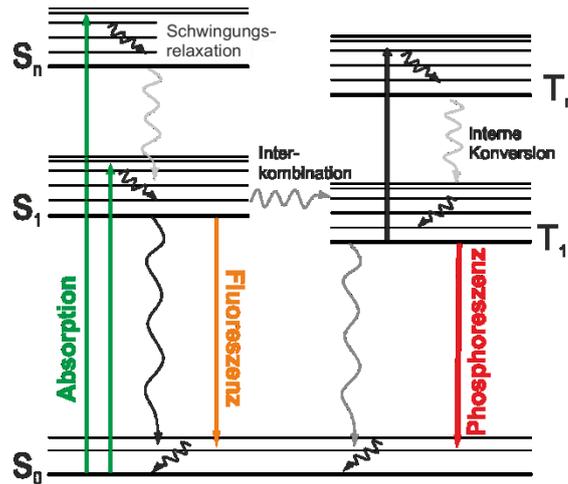


Abbildung 2: Ein Jablonski-Diagramm veranschaulicht auf einfache Weise die verschiedenen Möglichkeiten der Anregung eines Moleküls, sowie die verschiedenen Wege der Relaxation in den Grundzustand. S_0 steht für den Grundzustand, $S_{1/n}$ für die Singulettzustände und $T_{1/n}$ für die Triplettzustände.

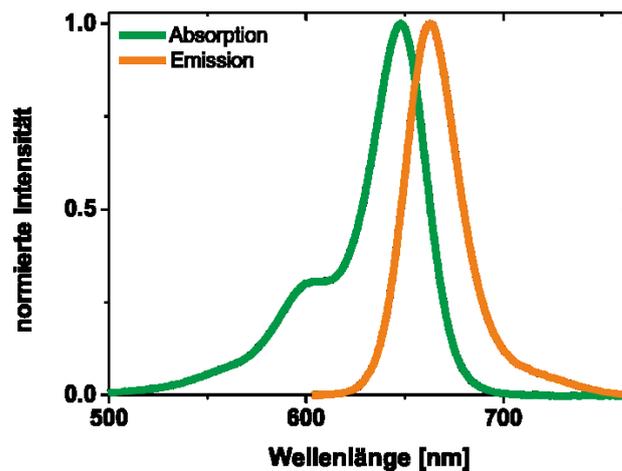


Abbildung 3: Absorptions- und Emissionsspektrum von Cy5 in PBS. Das Maximum des emittierten Fluoreszenzlichts ist im Vergleich zum Maximum des absorbierten Lichts um 15 nm zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Diese Verschiebung entsteht dadurch, dass ein Teil der absorbierten Energie auch durch nicht-radiative Prozesse abgegeben wird. Sie wird nach ihrem Entdecker Sir G.G. Stokes, Stokes Shift genannt.

Das Jablonski-Diagramm zeigt nicht nur die verschiedenen Wege der Anregung und Relaxation eines Moleküls auf, sondern auch, dass das ausgesendete Licht eines Fluorophors in den meisten Fällen langwelliger ist als die Anregungswellenlänge. Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass ein Teil der Energie – wie vorausgegangen beschrieben – über nicht-radiative Prozesse abgegeben wird. Dies führt dazu, dass das Emissionsspektrum eines Farbstoffes zum Absorptionsspektrum im Maximum rot-verschoben ist (Abbildung 3), was 1852 von Sir G.G. Stokes [Stokes,

1852] zuerst beobachtet wurden und nach ihm Stokes Shift benannt wurde. [Lakowicz, 2006; Sauer et al., 2011]

2.1.2 Fluoreszenzquantenausbeute und –lebensdauer

Verschiedene Fluorophore besitzen nicht nur unterschiedliche Absorptions- und Emissionswellenlänge, sie unterscheiden sich auch in ihrer Fluoreszenzquantenausbeute und -lebensdauer. Diese zwei Größen sind von besonderer Bedeutung bei der Auswahl eines Fluorophors für ihre Verwendung in der Fluoreszenzspektroskopie und –mikroskopie.

Dabei kann die **Fluoreszenzquantenausbeute** als Verhältnis von emittierten Photonen zu absorbierten Photonen beschrieben werden und ist somit ein Maß für die Fluoreszenzeffizienz eines Moleküls. Wird die Phosphoreszenz vernachlässigt, bedeutet dies: je mehr strahlungslose Vorgänge stattfinden, wie interne Konversion und Interkombination bzw. Lösprozesse, desto weniger Energie geben die Moleküle in Form von Fluoreszenzphotonen wieder ab. Die Quantenausbeute ergibt sich demnach aus der Gleichung:

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (3)$$

Dabei ist k_r die Rate der Fluoreszenzemission und k_{nr} die der nicht-radiativen Prozesse [Lakowicz, 2006]. Würden keine strahlungslosen Vorgänge stattfinden, würde demnach die Quantenausbeute 1 betragen. Bei einer rein nicht-radiativen Relaxation 0.

Das zweite wichtige Auswahlkriterium eines Fluorophores, die **Fluorophorlebensdauer** τ_f , gibt an, wie lang sich ein Molekül durchschnittlich im ersten angeregten Singulettzustand befindet, bevor es wieder durch Aussendung eines Fluoreszenzphotons in den Grundzustand zurückkehrt. Auch hier müssen wieder die strahlungslosen Möglichkeiten der Relaxation beachtet werden, die mit den radiativen Wegen konkurrieren. Demnach folgt die Gleichung:

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (4)$$

2 Theoretische Grundlagen

Das Abklingverhalten der Fluoreszenzintensität zeigt einen exponentiellen Abfall und gibt die Zeit wieder, in der sie 1/e ihrer ursprünglichen Intensität I_0 erlangt hat. Folgt die Fluoreszenzlebensdauer einem monoexponentiellen Verlauf, kann sie wie folgt dargestellt werden:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right) \quad (5)$$

$I(t)$ ist hierbei die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t . Gleichung 5 muss noch um weitere Exponentialterme erweitert werden, wenn die Probe aus unterschiedlichen Fluorophoren besteht, bzw. mehrere Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Molekülen vorhanden sind. [Sauer et al., 2011; Lakowicz, 2006]

2.1.3 Triplettlöschung

Der Triplettzustand spielt eine wichtige Rolle in der Photophysik. Ein Farbstoff besitzt nicht nur ein spezifisches S_0 - S_n Absorptionsspektrum, sondern auch ein T_1 - T_n Absorptionsspektrum [Labhart & Heinzelmann, 1973]. Dieses erstreckt sich über einen sehr großen Wellenlängenbereich und überlappt somit auch mit dem Fluoreszenzspektrum des Fluorophors [Liphardt et al., 1982]. Dadurch nimmt die Quantenausbeute des Fluorophors ab. Oft ist der Triplettzustand auch in Photozerstörungsprozesse involviert [Labhart & Heinzelmann, 1973]. Darunter werden photochemische Prozesse verstanden, die Moleküle in einen irreversiblen nicht-fluoreszierenden Zustand reduzieren. Da Moleküle in einem höher angeregten Zustand reaktiver sind als in ihrem Grundzustand, ist der Triplettzustand oft Ausgangspunkt für Photozerstörung. Moleküle, die photozerstört wurden, können nicht mehr angeregt werden und somit auch keine Photonen emittieren. Besonders für die Einzelmoleküldetektion ist es jedoch sehr entscheidend, dass möglichst viele Photonen von einem Molekül gesammelt werden, da dadurch eine höhere Präzision erzielt werden kann (Kapitel 2.3.2). Um eine hohe Quantenausbeute und Photostabilität zu gewährleisten, wurden verschiedene chemische Strategien zur Entvölkerung des Triplettzustands entwickelt, wodurch die Triplettlebenszeit stark verkürzt wird. Zwei häufig verwendete Triplettlöcher sind Cyclooctatetraen [Pappalardo, 1970] und molekularer Sauerstoff [Evans, 1957; Snavely & Schäfer, 1969]. Die meisten Additive, die als Triplettlöcher eingesetzt werden, weisen einen energetisch niedrigen Triplettzustand auf. Dadurch fungieren sie als Akzeptor in einem Triplet-Triplet

2.2 Klassische Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie

Energietransfermechanismus, sodass das Molekül wieder in den Grundzustand überführt wird. Da sich Akzeptor und Donor dabei sehr nahe sein müssen (< 1 nm), sind sehr hohe Konzentrationen (meist im mM-Bereich) an Triplettlöcher notwendig. Dies bringt gleich mehrere Probleme mit sich. Zum einen muss beachtet werden, dass die Additive selbst auch das Absorptions- bzw. Emissionslicht absorbieren und damit schwächen können [Liphardt et al., 1982]. Zum anderen sind einige Additive in so hohen Konzentrationen nicht lösbar oder wirken in diesen Konzentrationen toxisch bzw. verändern zum Beispiel Membraneigenschaften, wodurch sie nicht bei Lebendzellmessungen eingesetzt werden können [Alejo et al., 2013]. Um die hohen Konzentrationen zu umgehen, wurden auch Triplettlöcher direkt an die Fluorophore gekoppelt [Zheng et al., 2012; Zheng et al., 2016; Liphardt et al., 1982].

2.2 Klassische Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie

2.2.1 Fluorophore und Strategien der Fluoreszenzmarkierung

Um zelluläre Strukturen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen, müssen diese zunächst mit Fluorophoren markiert werden. **Fluorophore** sind Moleküle mit delokalisierten π -Elektronen, die als konjugierte Doppelbindungen oder aromatische Ringe vorliegen. Es wird zwischen intrinsischen und extrinsischen Fluorophoren unterschieden, wobei intrinsische Fluorophore natürlich vorkommende Biomoleküle sind, wie zum Beispiel aromatische Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin oder Phenylalanin) [Teale & Weber, 1957]. Auch die Coenzyme Nicotinamid Adenin Dinukleotid (NADH) und Flavin Adenin Dinukleotid (FAD) gehören je nach Oxidationszustand zu dieser Gruppe und emittieren bei 450 nm bzw. 515 nm [Chance et al., 1979; Warburg & Christian, 1932]. Intrinsische Fluorophore sind meistens die Quelle von störender Autofluoreszenz, können aber andererseits bei zum Beispiel Molekül-Aufreinigungen oder Konzentrationsbestimmungen sehr hilfreich sein. Extrinsische Fluorophore kommen dagegen nicht natürlich vor, sodass die zu untersuchenden Moleküle aktiv mit einem solchen Fluorophor markiert werden müssen. Es gibt mittlerweile eine große Anzahl von fluoreszierenden Proteinen und organischen Fluorophoren, die unterschiedliche Quantenausbeuten, Lebenszeiten oder Absorptions- bzw. Emissionswellenlängen besitzen. Dabei ist das Absorptionsmaximum von der Länge des konjugierten Elektronensystem abhängig; je länger dieses ist, desto mehr ist das Maximum zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Ein sehr spezifischer Weg um

2 Theoretische Grundlagen

Proteine mit Fluoreszenz zu markieren, sind **fluoreszierende Proteine** (FPs) (Kapitel 3.1.2). Dabei wird das zu untersuchende Zielprotein auf genetischer Ebene mit einem FP modifiziert, sodass dieses auch in lebenden Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und zum Beispiel auch deren Dynamiken verfolgt werden kann [Lippincott-Schwartz & Patterson, 2003]. Das wohl bekannteste FP ist das grün fluoreszierende Protein (GFP) [Bokman & Ward, 1981], das aus der Qualle *Aequorea Victoria* extrahiert wurde. Es gibt inzwischen eine ganze Reihe von photoaktivierbaren, -konvertierbaren und reversibel photoschaltbaren Fluorophoren, die je nach Anforderung verwendet werden können. Der Nachteil von fluoreszierenden Proteinen ist deren relativ niedrige Quantenausbeute und geringe Photostabilität. Da organische Fluorophore diese Nachteile nicht besitzen, wurden **chemische Tags** entwickelt, wie zum Beispiel SNAP- oder CLIP-Tags [Keppler et al., 2002; Gautier et al., 2008]. Hier werden die vorteilhaften photophysikalischen Eigenschaften der organischen Fluorophore und die Möglichkeit der spezifischen und stöchiometrischen Markierung von fluoreszierenden Proteinen verbunden.

Die wichtigsten organischen Fluorophore gehören zu den Cyaninen, Rhodaminen oder Oxazinen (Abbildung 4).

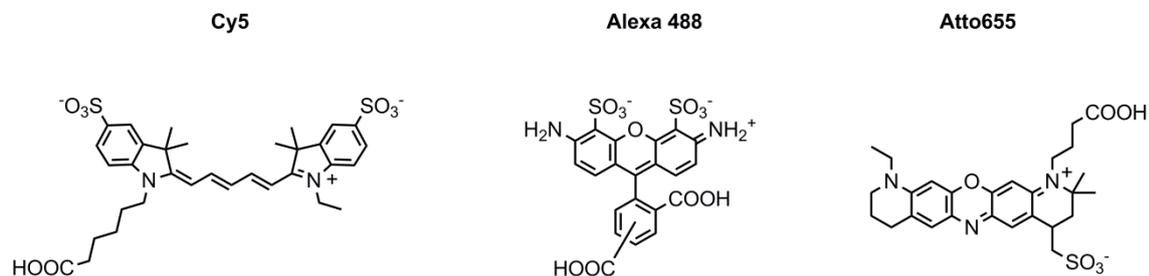


Abbildung 4: Molekulare Strukturen von Vertretern der Cyanine (Cy5), der Rhodamine (Alexa 488) und der Oxazine (Atto 655).

Organische Fluorophore werden nicht nur für chemische Tags verwendet, sondern können auch zum Beispiel über einen NHS-Ester an eine Amino-Gruppe eines **Antikörpers** gebunden werden (Kapitel 3.1.3). Bei der Antikörperfärbung wird zwischen direkter und indirekter Immunfluoreszenzmarkierung unterschieden. Bei der direkten Methode wird ein Fluorophor direkt an den Antikörper, der das Zielmolekül erkennt, gebunden. Bei der indirekten Methode werden zwei Antikörper verwendet. Zunächst inkubiert man die Zielstruktur mit einem Antikörper, der spezifisch an ein Zielepitop bindet. Erst danach gibt man einen Farbstoff-markierten Antikörper dazu, der den ersten Antikörper erkennt. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile. Bei der

indirekten Methode kann der Fluoreszenz-markierte Antikörper für viele verschiedene primäre Antikörper verwendet werden, wodurch Kosten gespart werden können. Außerdem können mehrere sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden, was zu einer Signalverstärkung führt. Probleme können jedoch durch Kreuzreaktionen auftreten, besonders wenn mehrere Moleküle in derselben Probe markiert werden sollen. Ein weiterer Nachteil, der insbesondere bei hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie eine Rolle spielt, ist die Größe der Antikörper. IgG-Antikörper haben eine Größe von ~ 10 nm [Weber et al., 1978], was somit zu einem maximalen Abstand von Zielmolekül und Farbstoff von ~ 20 nm führt und somit zu einer verminderten Auflösung. Diese Probleme können mit der direkten Antikörperfärbung umgangen werden. Auch können statt ganzen Antikörpern nur Fragmente von diesen verwendet werden. Eine Möglichkeit stellen **Nanobodies** dar. Sie werden zum Beispiel aus *Camelidae* gewonnen und bestehen aus nur zwei schweren Ketten, wodurch sie sehr klein sind (~ 2 nm) [Rothbauer et al., 2006]. Eine weitere Markierungsstrategie, die durch ihre Effizienz, Spezifität und Bioorthogonalität (= interferiert nicht mit biologischen Prozessen) [Sletten & Bertozzi, 2009] immer populärer wird, ist die sogenannte **“Click-Chemie“** (Kapitel 3.1.9). Hierbei wird Eins-zu-eins und direkt, also ohne einen großen Linker dazwischen, das Zielmolekül markiert. Sie wurde auf Grundlage der 1,3-dipolaren Cycloaddition [Huisgen, 1963] zur **“Kupfer-katalysierten Cycloaddition“** [Rostovtsev et al., 2002; Tornøe et al., 2002] und zur **“Kupfer-freien-Click-Chemie“** [Agard et al., 2004; Boyce & Bertozzi, 2011] weiterentwickelt und mittlerweile schon für eine Vielzahl von Versuchen, auch auf Einzelmolekülebene, angewendet [Zessin et al., 2012; Letschert et al., 2014; Löschberger et al., 2014b].

2.2.2 Die Auflösungsgrenze in der Lichtmikroskopie

Mit einem Mikroskop können kleine Strukturen vergrößert abgebildet werden, sodass Details erkennbar werden. Doch kein Mikroskop kann unendlich kleine Strukturen sichtbar machen, denn aufgrund der Beugung von Licht besitzt jedes mikroskopische Verfahren eine sogenannte Auflösungsgrenze. 1873 definierte Ernst Abbe die Auflösung eines Mikroskops als seine Fähigkeit zwei sehr eng liegende Linien eines Gitters abzubilden [Abbe, 1873]. Je dichter diese Linien liegen und noch unterschieden werden können, desto höher ist die Auflösung des Mikroskops. Abbe erkannte, dass die Auflösung d eines Mikroskops von der Wellenlänge des verwendeten Lichts λ , dem Öffnungswinkel des Objektivs α und dem Refraktionsindex n der Probe abhängt:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (6)$$

Die beiden letzten Größen können dabei auch als numerische Apertur des Objektivs zusammengefasst werden: $NA = n \sin \alpha$.

Da das Produkt aus $\sin \alpha$ und n nicht weit über 1 liegen kann, entspricht die Auflösung ungefähr der Hälfte der verwendeten Wellenlänge. Das bedeutet, dass Strukturen, die einen kleineren Abstand als ~ 200 nm haben, mit konventioneller Lichtmikroskopie nicht mehr als zwei Objekte erkannt werden, da die kleinste verwendbare Wellenlänge von sichtbarem Licht ~ 400 nm ist. 1896 wurde die Auflösung von John William Strutt, 3. Baron Rayleigh aus einem anderen Betrachtungswinkel beschrieben [Rayleigh, 1896]. Er ging von zwei selbstleuchtenden Punkten, wie zum Beispiel auch Fluorophoren, aus. Von beiden Punkten entsteht durch Beugung ein sogenanntes Beugungsbild, das 1835 von George Biddell Airy entdeckt wurde [Airy, 1835]. Dieses besteht aus einem zentralen Maximum, umgeben mit mehreren Ringen, die abnehmende Intensitäten aufweisen. Dieses Intensitätsmuster ist proportional zu einer Bessel Funktion erster Gattung und erster Ordnung. Rayleigh schlussfolgerte, dass ein leuchtender Punkt von seinem Nachbarn unterschieden werden kann, wenn sein erstes Intensitätsmaximum in das erste Intensitätsminimum des anderen fällt. Diese Bedingung wird Rayleigh-Kriterium genannt und berechnet mit:

$$d = \frac{1.22\lambda}{2NA} \quad (7)$$

wobei λ hier die Wellenlänge des emittierten Lichts des selbstleuchtenden Punktes ist.

2.2.3 Methoden der Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie kann grundsätzlich zwischen der Weitfeld- und der konfokalen Mikroskopie unterschieden werden. Bei der klassischen **Weitfeldmikroskopie** wird monochromatisches Licht, meist von einem Laser, zunächst mit Linsen aufgeweitet und auf die hintere Fokalebene des Objektivs fokussiert. Das Licht wird durch das Objektiv parallelisiert, was in einer breiten Ausleuchtung in allen Dimensionen der Probe resultiert. Diese Ausleuchtung wird **EPI**-Ausleuchtung genannt (Abbildung 5). Sie führt dazu, dass Fluorophore aus allen Ebenen angeregt und detektiert werden, sodass eine hohe Hintergrundfluoreszenz und ein schlechter Kontrast

entstehen. Durch Spiegel kann jedoch das Laserlicht auf verschiedene Positionen der hinteren Fokalebene des Objektivs gelenkt werden, was zu einer reduzierten Ausleuchtung der Ebenen, die hinter der Fokusebene in der Probe liegen, führen kann (Abbildung 5). Bei Totalreflektion (**TIR**) am Glas ist die Ausleuchtung in z-Richtung am geringsten. Sie beträgt ≤ 100 nm [Axelrod, 2001] und ist besonders geeignet bei zum Beispiel Messungen der Plasmamembran an der Deckglas-zugewandten Seite. Sollen Strukturen im Zytoplasma oder die Plasmamembran auf der Medium-zugewandten Seite einer Zelle abgebildet werden, muss in der sogenannten **HILO** (engl. highly inclined and laminated optical sheet) Ausleuchtung [Tokunaga et al., 2008] aufgenommen werden. Hierbei dringt ein schräges Lichtbündel in die Probe ein, wobei typischerweise eine Dicke von 5-10 μm erreicht wird. Auch diese Art von Ausleuchtung bewirkt ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zu Messungen im EPI-Modus.

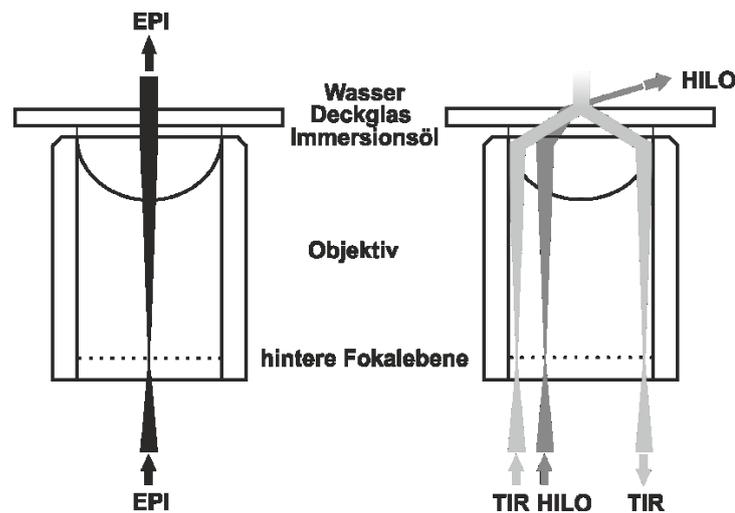


Abbildung 5: Verschiedene Möglichkeiten der Probenbeleuchtung bei einem Weitfeld-Mikroskop. Während die EPI-Ausleuchtung zu einer breiten Ausleuchtung der Probe in allen Dimensionen führt, wird die Ausleuchtung der Probe im HILO- und TIR-Modus stark reduziert. Ebenen außerhalb der Fokalebene werden hierbei weniger stark angeregt, sodass ein besseres Signal- Rausch-Verhältnis erhalten wird.

Der Nachteil bei der Weitfeldmikroskopie ist, dass immer auch Fluorophore unter oder über der Fokalebene angeregt werden, was zu einer Hintergrundfluoreszenz und zu einer niedrigen axialen Auflösung führt. Marvin Minsky lieferte 1957 eine Alternative zur Weitfeldmikroskopie, die dieses Problem umgeht: die **konfokale Mikroskopie** [Minsky, 1957]. Hier wird nur ein sehr kleines Probenvolumen mit einem stark fokussierten Laserstrahl bestrahlt. Die entscheidende Komponente in einem konfokalen Mikroskop ist die Lochblende. Sie gewährleistet, dass nur Signal aus der Fokalebene detektiert wird (Abbildung 6). Signal aus anderen Ebenen kann die Lochblende nicht

2 Theoretische Grundlagen

passieren und wird nicht detektiert. Soll ein komplettes Bild der Probe erstellt werden, kann ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop (CLSM) verwendet werden. Dabei wird die gesamte Probe in x- und y-Richtung mit einem fokussierten Laserstrahl abgerastert, wobei immer nur die Photonen der Fluorophore im Fokus eingesammelt werden. Werden dabei noch mehrere z-Ebenen aufgenommen, kann neben einem 2D auch ein 3D-Bild rekonstruiert werden. Die konfokale Mikroskopie findet mittlerweile eine breite Anwendung und wird unter anderem auch für Untersuchungen von Kinetiken verwendet. Hierbei sind vor allem die Techniken Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP) [Axelrod et al., 1976], alternierende Laseranregung (ALEX) [Kapanidis et al., 2005] oder die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) [Magde et al., 1972] zu erwähnen. Letztere wird im folgenden Kapitel (Kapitel 2.2.4) genauer beschrieben.

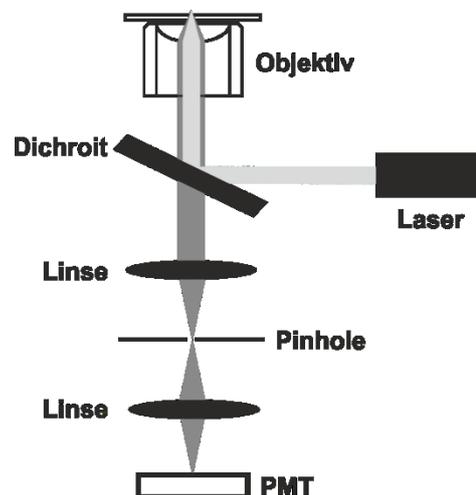


Abbildung 6: Beispielhafter Aufbau und Strahlengang eines konfokalen Mikroskops. Ein sehr kleines Probenvolumen wird mit einem stark fokussierten Laserstrahl angeregt. Das Fluoreszenzlicht kann den Dichroit passieren und wird auf ein Pinhole fokussiert. Dabei geht nur Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene durch das Pinhole, sodass nur dieses auf den Detektor trifft. Licht aus anderen Ebenen wird abgefangen und nicht detektiert.

2.2.4 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ist eine Methode, mit der man über Analyse von zeitabhängigen Fluoreszenzfluktuationen Informationen über molekulare Dynamiken erhält (Krichevsky & Bonnet, 2002). Eingeführt wurde die Methode erstmals 1972 von Magde et al. anhand von Messungen mit Ethidiumbromid und doppelsträngiger DNA, um den Diffusionskoeffizienten und die Bindungskonstante zu bestimmen [Magde et al., 1972]. Darauf folgend wurde die Methode in vielen Publikationen verwendet, um von verschiedensten Molekülen die Konzentration,

Diffusion oder kinetische Konstanten zu bestimmen. Verbessert wurde die Technik, indem Detektoren mit Einzelmolekül-Sensitivität, geeigneten Fluorophoren mit hoher Quantenausbeute zum Markieren und stabile Laser zur Anregung genutzt wurden. Zwanzig Jahre später wurde die FCS-Technik mit der konfokalen Detektion verbunden [Rigler et al., 1993]. Dadurch wurde das Detektionsvolumen auf wenige Femtoliter verringert und eine erhöhte Sensitivität, eine Abschwächung des Hintergrunds und damit auch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erzielt. Dies wiederum ermöglicht es, dass nun mit Hilfe der FCS auch Konformationsänderungen und Interaktion- bzw. Translokationsprozesse von biologischen (intrazellulären) Molekülen oder photophysikalische Prozesse von Fluorophoren untersucht werden kann. [Schwille & Haustein, 2004]

Fluoreszenzfluktuationen können durch verschiedene Ereignisse hervorgerufen werden. Dazu zählen Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer, Konformationsänderungen von Molekülen, Übergang der Elektronen in den Triplettzustand oder Diffusion von fluoreszierenden oder Fluoreszenz-markierten Molekülen in bzw. aus dem Detektionsvolumen [Gell et al., 2006]. Die so erhaltenen fluktuierenden Fluoreszenzintensitäten werden zunächst mit sich selbst zu verschiedenen Zeiten verglichen, wobei die Verzögerung zwischen den einzelnen Zeitpunkten variiert wird. Diese sogenannte Autokorrelationsfunktion wird aus der Gleichung

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) * \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (8)$$

berechnet. Dabei steht $\langle F(t) \rangle$ für die Mittelung des Fluoreszenzsignals über die Zeit, während $\delta F(t)$ und $\delta F(t + \tau)$ die Abweichung des Signals zum Zeitpunkt t und $t + \tau$ vom Mittelwert beschreibt. [Hess et al., 2002] Wird für die auf der x-Achse aufgetragenen Korrelationszeit eine logarithmische Skala gewählt, wird eine sigmoidal verlaufende Autokorrelationskurve erhalten. Diese kann gefittet werden, um die benötigte Diffusionszeit τ_d der Moleküle durch das Detektionsvolumen, die Zeit τ_i , die sich die Moleküle im Triplettzustand befinden, aber auch alle anderen molekularen Dynamiken, wie z.B. Konformationskinetiken, zu erhalten (Abbildung 7). Folgende Fitfunktion kann hierzu verwendet werden:

2 Theoretische Grundlagen

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \div \left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right) \times \left(1 + K \times \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_k}\right) + T \times \exp\left(\frac{-\tau}{\tau_t}\right)\right) \quad (9)$$

Dabei ist N die Teilchenanzahl, T der Anteil der Moleküle im Tripletzustand, K die Gleichgewichtskonstante der Reaktion und τ_k die Konformationszeit.

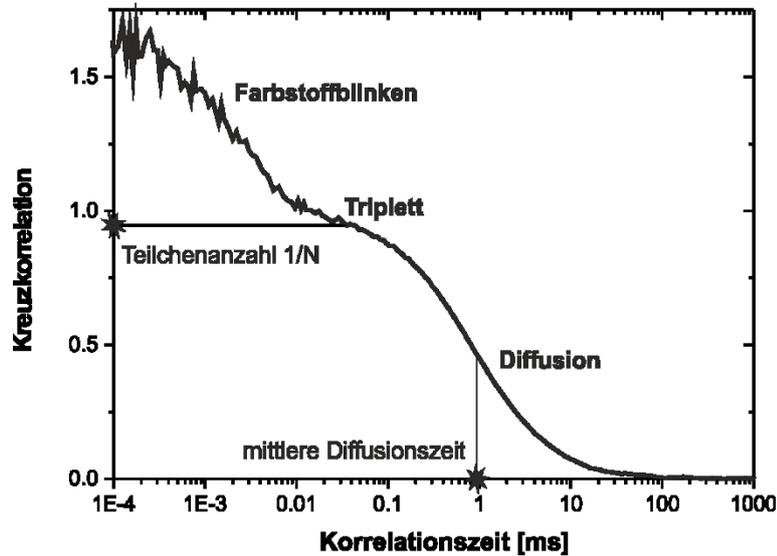


Abbildung 7: Typische Kreuzkorrelationsfunktion einer FCS-Messung. Aus der Funktion können Diffusion, Triplet und Farbstoffblinken bestimmt werden.

Die Diffusionszeit ist abhängig von dem Radius des Beobachtungsvolumens und der Diffusionskonstante D :

$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_D} \quad (10)$$

Gleichzeitig ergibt sich nach der Stokes-Einstein Gleichung die Diffusionskonstante aus:

$$D = \frac{k_B \times T}{6\pi \times \eta \times R_h}, \quad (11)$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, η die Viskosität des Lösungsmittels und R_h den hydrodynamischen Radius angibt.

2.3 Fluoreszenzmikroskopie jenseits der Auflösungsgrenze

Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, besitzt die Fluoreszenzmikroskopie eine Auflösungsgrenze, sodass Strukturen, die weniger als ~ 200 nm voneinander entfernt liegen, nicht getrennt abgebildet werden können. Viele biologische Strukturen liegen jedoch deutlich näher beieinander und sind nur wenige nm klein, sodass eine Untersuchung mit der klassischen Fluoreszenzmikroskopie nicht möglich ist. Mit Mikroskopen, die keine Fluoreszenz nutzen, wie zum Beispiel Elektronenmikroskope oder Rasterkraftmikroskope, können sehr einfach Oberflächen mit einer Auflösung von wenigen Nanometer abgebildet werden. Diese Methoden sind jedoch nicht kompatibel mit intrazellulären Lebendmessungen. Das Interesse Mikroskopie-Methoden zu entwickeln, welche Fluoreszenz nutzen und die Auflösungsgrenze umgehen, ist dementsprechend sehr groß und es sind mittlerweile eine Reihe von Methoden vorhanden, die dies ermöglichen. All diese hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie-Methoden haben entweder eine **deterministische** oder eine **stochastische** Herangehensweise.

2.3.1 Methoden der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie

Zu den **deterministischen Methoden** zählt zum Beispiel die **strukturierte Beleuchtungsmikroskopie** (engl. structured illumination microscopy, **SIM**) [Gustafsson, 2000]. Sie basiert auf einem Weitfeldmikroskop, wobei ein Gitter mit einem feinen sinusförmigen Streifenmuster in den Anregungsstrahlengang positioniert ist und somit in die Fokusebene der zu untersuchenden Probe projiziert wird. Die Probe wird dann mehrere Male bestrahlt und aufgenommen, wobei das Gitter rotiert und lateral verschoben wird. Durch Überlagerung des strukturierten Lichts mit dem Gitter, das von der unbekanntem Verteilung der Fluorophore in der Probe generiert wird, entsteht ein tieffrequentes Moiré Muster. Aus diesem können nun die hohen Frequenzen (feine Strukturen) der Probe mathematisch berechnet werden. Wird diese Methode mit einem axial regulierbaren Beleuchtungsmuster kombiniert, kann neben einer Verbesserung der lateralen auch eine Verbesserung der axiale Auflösung um den Faktor 2 erzielt werden [Gustafsson et al., 2008]. Mittlerweile wurde die lineare SIM zur nicht-linearen Beleuchtungstechnik erweitert. Dazu zählt zum Beispiel die Saturierung des angeregten Zustands der Fluorophore [Heintzmann, 2003; Gustafsson, 2005] oder die Verwendung von reversibel photoschaltbaren fluoreszierenden Proteinen [Rego et al., 2012]. Theoretisch kann damit eine unlimitierte Auflösung erreicht werden, in der Praxis wurde bisher schon eine Auflösung von 40 nm erzielt [Rego et al., 2012].

2 Theoretische Grundlagen

Eine weitere deterministische Methode, die sich das nicht-lineare Antwortverhalten von Fluorophoren zunutze macht, ist **STED** (engl. **stimulated emission depletion**). Sie wurde 1994 von Stefan Hell publiziert [Hell & Wichmann, 1994], der dafür 2014 den Nobelpreis überreicht bekam. STED beruht auf einem konfokalen Mikroskopie-Aufbau. Es wird neben dem Anregungslaser noch ein zweiter Laser verwendet, der rotverschoben zu dem Ersten ist. Er bewirkt, dass die Fluorophore durch stimulierte Emission in den Grundzustand zurückkehren, ohne dabei Photonen des Fluorophorspezifischen Emissionsspektrums auszusenden. Der zweite Laser hat im Gegensatz zu dem normalen Anregungslaser eine Donut-förmige Ausleuchtung, sodass bei Überlagerung der beiden die Fluorophore im Zentrum nicht von diesem bestrahlt werden. Durch Verwendung von Wellenlängen-spezifischen optischen Filtern, kann nun das Signal der stimulierten Emission blockiert werden, sodass nur Photonen aus dem Zentrum detektiert werden. Je höher die Intensität des "Ausschaltelasers" ist, desto kleiner ist der zentrale Bereich, in dem Fluoreszenzphotonen von spontaner Emission detektiert werden. Die Auflösung ist damit theoretisch nur von der Intensität des "Ausschaltelasers" begrenzt. Bei STED-Messungen von biologischen Proben konnten bisher laterale Auflösungen im Bereich von 20 nm bis 100 nm erzielt werden [Neupane et al., 2014].

Bei den **stochastischen Hochauflösungsmethoden** werden Emitter zeitlich getrennt voneinander aktiviert. Damit kann die Position einzelner Fluorophore sehr präzise bestimmt werden, sodass diese Methoden auch als Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie-Methoden (engl. single-molecule localization microscopy, SMLM) bezeichnet werden. Die Grundsteine für die Einzelmolekülmikroskopie wurden unabhängig voneinander von W.E. Moerner und E. Betzig gelegt, die beide 2014 den Nobelpreis in Chemie überreicht bekamen. 1989 gelang es W.E. Moerner und Kollegen zum ersten Mal einen einzelnen Fluorophor zu beobachten [Moerner & Kador, 1989]. 1997 untersuchten W.E. Moerner und Kollegen [Dickson et al., 1997] dann die Fluoreszenz von einzelnen mutierten GFP-Molekülen. Dabei beobachteten sie ein "Blinken" der Moleküle. Bei Anregung der Proteine mit 488 nm Laserlicht zeigten diese wiederholt Zyklen von Fluoreszenzemission auf, zwischen denen ein langlebiger Dunkel-Zustand lag. Aus diesem nicht-fluoreszenten Zustand konnten sie die Fluorophore mit 405 nm Anregung zurückholen und somit zeigen, dass mutiertes GFP reversibel photoschaltbar ist. E. Betzig veröffentlichte 1995 die Idee, dass die Position einzelner Fluorophore mit isolierbaren optischen Eigenschaften sehr präzise durch

Anpassen ihrer emittierten Photonen mit einer Gauß-Funktion bestimmt werden kann [Betzig, 1995]. Durch Überlagerung der Positionen der einzelnen Moleküle kann dann ein hochaufgelöstes Bild erhalten werden. Zehn Jahre später konnte seine Idee dann praktisch umgesetzt werden, indem die **“(Fluoreszenz) photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie“ ((F)PALM)** entwickelt wurde, für die photoaktivierbare/-konvertierbare Proteine verwendet wurden [Betzig et al., 2006; Hess et al., 2006]. Die folgenden Jahre wurden eine ganze Reihe von weiteren SMLM-Methoden entwickelt, wie zum Beispiel **dSTORM** (engl. **direct stochastic optical reconstruction microscopy**), bei der photoschaltbare organische Fluorophore eingesetzt werden [Heilemann et al., 2008].

2.3.2 Prinzip der SMLM

Das Prinzip der SMLM-Methoden beruht darauf, dass die Moleküle der Zielstruktur zunächst mit photoaktivierbaren oder reversibel photoschaltbaren Fluorophoren angefärbt werden. Diese Fluorophore besitzen einen stabilen nicht-fluoreszierenden (Aus-) und einen kurzen fluoreszierenden (An-) Zustand. Die meisten Fluorophore werden in den Aus-Zustand gebracht, sodass nur eine geringe Anzahl an Molekülen fluoresziert. Diese Fluoreszenz wird detektiert und andere Fluorophore werden stochastisch in den An-Zustand überführt, deren Photonen wiederum aufgenommen werden. Dies wird viele Male wiederholt, sodass am Ende tausende einzelne beugungsbegrenzte Bilder erhalten werden. Wichtig ist hierbei, dass nur sehr wenige Fluorophore gleichzeitig fluoreszieren. Idealerweise ist nur ein Fluorophor pro beugungsbegrenzte Fläche im An-Zustand. Die Emissionsverteilungen der einzelnen Fluorophore (siehe Kapitel 2.2.2), die von der Kamera aufgenommen werden (=Punktspreizfunktion, PSF), werden dann mit einer zweidimensionalen Gauß-Funktion angepasst. Das Maximum der Gauß-Funktion lässt sich mit nm-Genauigkeit bestimmen und spiegelt die Position der einzelnen Fluorophore wider. Die Präzision der Lokalisation I hängt dabei hauptsächlich von der Anzahl der detektierten Photonen (N) eines Fluorophors ab [Thompson et al., 2002]:

$$I \approx \frac{\sigma^2}{N} \quad (12)$$

wobei σ die Standardabweichung der Gaußfunktion darstellt. Neben einer geringen Anzahl von Fluorophoren, die sich gleichzeitig im An-Zustand befinden und einer hoher Anzahl an detektierten Photonen, ist ein weiterer Parameter bei SMLM-Methoden

2 Theoretische Grundlagen

entscheidend. Beschrieben kann dieser mit dem Shannon-Nyquist-Theorem [Shannon, 1949]. Es besagt, dass der Abstand zwischen Fluorophoren, mit denen die Zielstruktur markiert wird, mindestens zweimal so klein wie die gewünschte Auflösung sein muss. Das bedeutet zum Beispiel, dass bei einer Auflösung von 20 nm eine Struktur mindestens alle 10 nm mit einem Fluorophor markiert sein muss. Hierbei muss beachtet werden, dass Fluorophore sich nur so nahe kommen können, wie ihr eigener Durchmesser ist. Das heißt, wird die Zielstruktur mit sehr großen fluoreszierenden Molekülen markiert, leidet darunter die Auflösung. Die Markierungsstrategie (siehe Kapitel 2.2.1) sollte deshalb sorgfältig gewählt werden. Werden alle genannten Parameter beachtet und die berechneten Positionen aller detektierten Fluorophore überlagert, kann ein hochaufgelöstes Bild erzeugt werden.

SMLM-Messungen werden mit einem konventionellen Weitfeldmikroskop durchgeführt, wobei die Probe meist im TIR oder HILO-Modus bestrahlt wird. Die Fluoreszenz der Markermoleküle wird entweder mit einer EMCCD- (engl.: electron multiplying charged coupled device) oder einer sCMOC- (engl.: scientific complementary metal-oxide-semiconductor) Kamera detektiert. Die aufgenommenen Rohdatenbilder können zum Beispiel mit der Lokalisierungssoftware *rapidSTORM* [Wolter et al., 2010; Wolter et al., 2012] weiter verarbeitet und ausgewertet werden.

2.3.3 Photoschaltmechanismus der Fluorophore für die SMLM

Wie schon in Kapitel 2.3.2. erwähnt, ist die Auswahl der Fluorophore in der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie entscheidend für das Erreichen einer hohen Auflösung. Da in dieser Arbeit PALM und hauptsächlich *dSTORM* verwendet wurden, wird in diesem Kapitel nochmal genauer auf die Fluorophore und deren Schaltmechanismus bei diesen zwei Methoden eingegangen. Wichtigstes Kriterium, ob ein Fluorophor in der SMLM eingesetzt werden kann, ist seine Fähigkeit photoschaltbar zu sein. Dies ist nicht bei allen Fluorophoren gegeben. Viele sind so synthetisiert, dass sie besonders photostabil sind und eine hohe Quantenausbeute besitzen. Blinken bzw. ein langlebiger Dunkel-Zustand wäre bei den klassischen Fluoreszenzmethoden störend. Wie in Kapitel 2.3.1. schon kurz aufgeführt, sind die Mechanismen bei PALM und *dSTORM* unterschiedlich. Bei (F)PALM wird das Zielmolekül mit einem **Protein** genetisch markiert, das **photaktivierbar oder -konvertierbar** ist. Photoaktivierbare Fluorophore liegen zunächst in einer nicht-fluoreszierenden Form vor. Erst die Bestrahlung mit UV-Licht überführt das Protein durch eine Decarboxylierung der Aminosäure Glu222 irreversibel in eine fluoreszierende Form [Shcherbakova &

2.3 Fluoreszenzmikroskopie jenseits der Auflösungsgrenze

Verkhusha, 2014]. Diese kann mit einem zweiten Laser mit entsprechender Wellenlänge angeregt und ihre Fluoreszenz detektiert werden. Zwei bekannte Vertreter der photoaktivierbaren Proteine sind das grün fluoreszierende PA-GFP und das rot fluoreszierende PAmCherry [Patterson & Lippincott-Schwartz, 2002; Shcherbakova & Verkhusha, 2014]. Photokonvertierbare Proteine sind von Grund auf fluoreszierend. Durch UV-Bestrahlung wird jedoch ihr Polypeptid-Rückgrat irreversibel gespalten, was eine Verschiebung ihres Absorptions- und Emissionsspektrum zu längeren Wellenlängen zur Folge hat [Wiedenmann et al., 2004; Nienhaus et al., 2005]. Durch das Einsetzen geeigneter Laser und Filter kann dann nur die rotverschobene Emission detektiert werden. Eines der meist verwendeten photokonvertierbaren Fluorophore ist das EosFP-Derivat mEos2, das mit UV-Licht von einer grün fluoreszierenden Form in eine rot fluoreszierende Form konvertiert wird. Zusammengefasst funktionieren SMLM-Methoden, die auf photoaktivierbaren oder -konvertierbaren Fluorophoren beruhen also wie folgt: Zunächst sind die Fluorophore in einem Dunkel-Zustand bzw. einem Zustand, der nicht detektiert wird. Durch Bestrahlung der Probe mit sehr geringen UV-Laser-Intensitäten werden stochastisch wenige Fluorophore in die fluoreszierende Form überführt, die dann mit geeigneten Laserwellenlängen angeregt und detektiert werden, bevor sie irreversibel photogeleicht werden.

Bei *d*STORM werden **photoschaltbare organische Farbstoffe** eingesetzt. Im Gegensatz zu den verwendeten Fluorophoren bei PALM-Messungen, sind die organischen Fluorophore reversibel schaltbar, können also mehrfach im An-Zustand sein. Besonders bei dicht markierten Strukturen ist es somit besonders wichtig, dass sich die meisten Fluorophore im Dunkel-Zustand befinden (siehe Kapitel 2.3.2), was bedeutet, dass der nicht-fluoreszierende Zustand deutlich länger als der fluoreszierende Zustand sein muss [Heilemann et al., 2009]. Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, gelangen Fluorophore durch Anregung mit passendem Laserlicht vom Grundzustand in den Singulettzustand. Bei Relaxation in den Grundzustand emittieren sie Photonen. Sie können aber auch vom Singulettzustand in den Triplettzustand wechseln. Von dort können sie wieder durch Elektronentransfer mit Triplett-Sauerstoff in den Grundzustand zurückkehren oder aber durch Reduktion in einen Radikalzustand. Manche Fluorophore können dann ein weiteres Mal ein Elektron aufnehmen und die voll-reduzierte Leukoform annehmen (Abbildung 8).

2 Theoretische Grundlagen

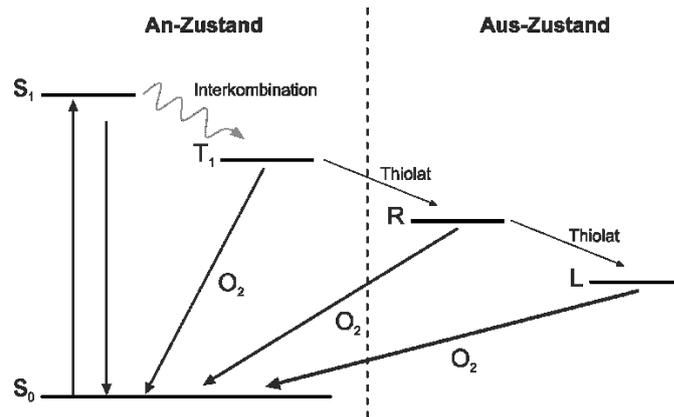


Abbildung 8: Schaltmechanismus von organischen Fluorophoren, der bei *d*STORM-Messungen stattfindet. Fluorophore gelangen durch Anregung mit Licht passender Wellenlänge vom Grundzustand (S_0) in den Singulettzustand (S_1). Von dort relaxieren sie unter Aussendung von Photonen wieder in den S_0 -Zustand oder gehen in den Triplettzustand (T_1) über. Durch Energietransfer mit Triplett-Sauerstoff werden sie wieder in den S_0 -Zustand gebracht oder gehen durch Reduktion mit einem Thiolat in den Radikalzustand (R) über bzw. nehmen durch weitere Reduktion die voll-reduzierte Leukoform (L) an. Aus diesen beiden Aus-Zuständen können sie wieder durch Sauerstoff oxidiert werden.

Die reduzierten Zustände stellen einen stabilen Aus-Zustand dar. Die Reduktion der Fluorophore zum Farbstoffradikal erfolgt durch Thiole. Bei *d*STORM-Messungen an fixierten Proben wird oft β -Mercaptoethylamin (MEA) im millimolaren Bereich verwendet. MEA ist eigentlich kein so starkes Reduktionsmittel, durch Erhöhung des pH-Werts ($\sim 7-9$) liegt es jedoch hauptsächlich als Thiolat vor, was die reduzierende Spezies ist. In lebenden Zellen liegt ein natürlich vorkommendes Reduktionsmittel vor: das Glutathion. *d*STORM konnte somit auch schon erfolgreich in lebenden Zellen angewandt werden [Klein et al., 2011]. Aus den Aus-Zuständen können die Fluorophore wieder durch Oxidation mit Sauerstoff oder durch Bestrahlen der Radikale mit Licht niedriger Wellenlänge (UV-blau) in den Grundzustand gebracht werden [Heilemann et al., 2005]. Wird also der Sauerstoff aus der Probe entfernt, verbleiben die Fluorophore länger im Triplett- und in den Radikalzuständen. Sauerstoff kann zum Beispiel durch Zugabe von Glukoseoxidase, Katalase und Glukose als Substrat enzymatisch entfernt werden [van de Linde & Sauer, 2014]. Schäfer et al. konnte jedoch auch zeigen, dass MEA schon alleine Sauerstoff aus Lösungen ausreichend entfernt [Schäfer et al., 2013]. Der erste Farbstoff, der als photoschaltbar identifiziert wurde, war Cy5 [Heilemann et al., 2005]. Er und Alexa Fluor 647 eignen sich durch ihre hohen Quantenausbeuten und effizienten Photoschalteneigenschaften am besten für *d*STORM-Messungen. Aber auch andere organische Farbstoffe können verwendet werden, wie zum Beispiel Alexa Fluor 532 und Alexa Fluor 488. Dabei muss für jeden Farbstoff die optimale MEA-Konzentration, Laserleistung und der optimale pH-Wert herausgefunden werden [van de Linde et al., 2011].

2.3.4 Quantifizierung von SMLM-Daten

SMLM Techniken erzeugen nicht nur hochaufgelöste Bilder. Da die räumlichen Koordinaten jeder detektierten Fluorophor-Lokalisation in einer Lokalisationsliste gespeichert werden, können die Daten auch lokalisationsgenau quantifiziert werden. Es können unter anderem Aussagen über die Verteilung Fluoreszenz-markierter Moleküle gemacht werden, wie zum Beispiel ob sie homogen verteilt sind oder geclustert vorliegen [Malkusch et al., 2013; Williamson et al., 2011; Letschert et al., 2014]. Es sind mittlerweile viele verschiedene Strategien und Algorithmen vorhanden, um Cluster zu identifizieren. In diesem Kapitel wird jedoch nur auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Herangehensweise näher eingegangen.

Eine besonders häufig verwendete Methode der **Clusteranalyse** ist die **Ripley-Funktion**, die 1977 von B.D. Ripley veröffentlicht wurden [Ripley, 1977]. Die Ripley-Funktion vergleicht die Verteilung der Lokalisationen in einem vorgegebenen Radius um jede einzelne Lokalisation mit der Verteilung einer zufälligen Anordnung. Weicht die Verteilung der Lokalisationen von einer zufälligen Verteilung ab, clustert das zu untersuchende Molekül. Die Ripley's K-Funktion lässt sich berechnen aus:

$$K(r) = \frac{1}{n^2} \sum_i \sum_j \frac{N_r(d_{ij})}{\lambda} \quad (13)$$

Dabei ist r der Beobachtungsradius, n die Anzahl aller analysierten Lokalisationen, d_{ij} der Abstand zwischen zwei Lokalisationen i und j , N_r die Anzahl der Lokalisationen um die Lokalisation i innerhalb des Abstands zu j . λ ist ein Gewichtungsfaktor, der die durchschnittliche Dichte in der ganzen beobachteten Fläche korrigiert. Um die Daten vereinfacht darzustellen, kann $K(r)$ linearisiert werden:

$$L(r) = \sqrt{\frac{K(r)}{\pi}} \quad (14)$$

Wird die Ripley's L-Funktion nun noch normalisiert, erhält man die Ripley's H-Funktion:

$$H(r) = L(r) - r \quad (15)$$

2 Theoretische Grundlagen

Bei einer homogenen Verteilung der Lokalisationen ist $H(r)$ demnach 0. Liegen die Lokalisationen jedoch in Clustern vor, kann die ungefähre durchschnittliche Größe der Cluster aus dem Maximum der Ripley's H-Funktion gewonnen werden (Abbildung 9). Das Maximum liegt typischerweise zwischen dem Radius und dem Durchmesser der Cluster [Kiskowski et al., 2009]. Besonders sinnvoll ist die Clusterbestimmung mit der Ripley Funktion, wenn untersucht werden soll, ob sich Clustergrößen verändern, da keine Aussage über die exakte Größe der Cluster getroffen werden kann.

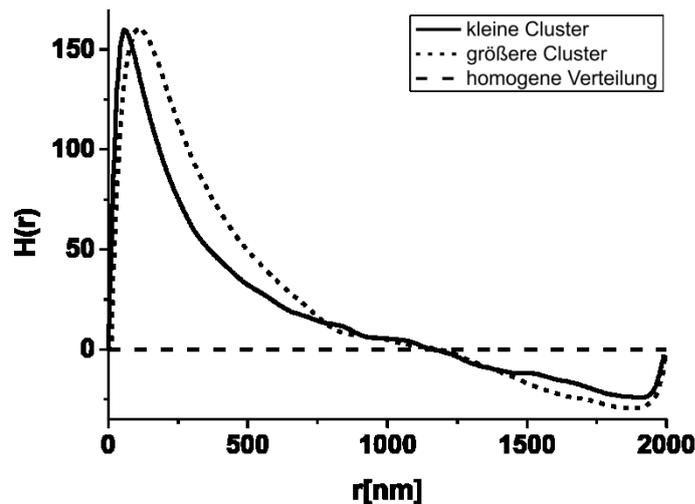


Abbildung 9: Typische Ripley's H-Funktionen. Sind die Lokalisationen homogen verteilt, ist $H(r) = 0$. Liegen die Lokalisationen in Clustern vor, kann die Größe der Cluster aus dem Maximum der Funktion herausgelesen werden. Mit zunehmender Clustergröße verschiebt sich der Peak zu größeren r -Werten. Das Maximum liegt typischerweise zwischen dem Radius und Durchmesser der Cluster.

Sollen Proben quantifiziert werden, ist es besonders wichtig, eine sinnvolle Markierungsstrategie zu wählen. Ideal sind ein geringer Abstand zwischen dem zu untersuchenden Molekül und Fluorophor (Kapitel 2.2.1) und einer Eins-zu-eins Markierung mit einer guten Photoschaltrate der Fluorophore (Kapitel 2.3.2 und 2.3.3). Ist die Photoschaltrate durch zum Beispiel einer zu geringen Laserleistung zu klein, überlappen die PSFs benachbarter Emitter. Folglich zeigen Proben mit einer eigentlich homogenen Verteilung artifizielle Cluster auf [Burgert et al., 2015] (Kapitel 4.1.2). Künstlich erzeugte Cluster können außerdem auch bei einer Markierung mit Antikörper entstehen, wenn diese sich vernetzen (Kapitel 4.1.3).

Mit der Ripley-basierten Clusteranalyse kann also überprüft werden, ob Lokalisationen in Cluster vorliegen und wie groß diese Cluster ungefähr sind. Sie liefert jedoch keine Informationen über die Anzahl der Lokalisationen innerhalb der Cluster. Dafür muss eine sogenannte **morphologische Clusteranalyse** (MCA) durchgeführt werden, die auf einer vorangegangenen Ripley-Clusteranalyse basieren kann (Kapitel 3.2.7).

Das **Zählen von Molekülen** in Cluster oder außerhalb dieser bekommt in der Biologie und Medizin einen immer größeren Stellenwert. Die SMLM kann hierzu viele interessante Ergebnisse liefern [Ehmann et al., 2014; Löscherberger et al., 2014a; Renz et al., 2012]. Der Vorteil bei der Quantifizierung von PALM-Daten im Vergleich zu *d*STORM-Daten ist die Eins-zu-eins Markierung, die durch genetische Modifizierung sichergestellt wird (Kapitel 2.2.1 und 2.3.3). Ein Problem bei der Quantifizierung von PALM-Daten ist jedoch, dass auch fluoreszierende Proteine blinken können, wodurch ein Protein mehrmals gezählt wird. Mittlerweile wurden Korrekturmöglichkeiten veröffentlicht um diese Mehrfachzählungen größtenteils heraus zu rechnen. Hierbei werden auch Lokalisationen, die zeitlich weiter voneinander detektiert werden, gruppiert, wobei die räumliche Gruppierung auf einer genau bestimmten Lokalisationspräzision basiert [Annibale et al., 2011; Lee et al., 2012; Puchner et al., 2013]. Es kann jedoch bei der Quantifizierung von PALM-Messungen nicht nur zu einer Überschätzung, sondern auch zu einer Unterschätzung der Anzahl an Molekülen kommen. Durch zum Beispiel Fehlfaltung oder verfrühte Photobleichung der fluoreszierenden Proteine werden nicht alle Proteine detektiert und somit weniger Moleküle gezählt [Durisic et al., 2014; Puchner et al., 2013].

Auch bei der Quantifizierung von *d*STORM-Daten müssen mehrere Punkte bedacht werden. Meist werden nicht alle Zielmolekül markiert, wodurch nicht alle vorhandenen Moleküle gezählt werden. Ein Molekül kann auch mit mehreren Fluorophoren markiert sein, wodurch es mehrfach gezählt wird. Genau wie bei den PALM-Messungen, führt auch bei *d*STORM-Messungen das Photoblinken zu mehrmaligem Detektieren eines Fluorophors. Um aus der Anzahl der Lokalisationen auf die Anzahl der Moleküle zurückzuschließen, gibt es verschiedene Herangehensweisen. Letschert et al. bestimmten die Anzahl der Lokalisationen von einem Fluorophor, indem sie bei einer sehr dünn markierten Probe die Lokalisationen mit unterschiedlichen Radien über die gesamte Aufnahmezeit gruppierten [Letschert et al., 2014]. Die Anzahl der Lokalisationen wurde über den Gruppierungsradius aufgetragen, sodass aus der Saturierung der Kurve die Anzahl der Lokalisationen, die von einem Fluorophor stammten, bestimmt werden konnte. Mit dieser Strategie konnten sie berechnen, dass die Plasmamembran einer Zelle ungefähr 10 Millionen Glykane enthält. Ehmann et al. hingegen konnten über Titrationsreihen eines primären Antikörper und zweier sekundärer Antikörper berechnen, wieviel sekundäre Antikörper an einem primären Antikörper binden und wieviel Lokalisationen von einem Fluorophor-markierten

2 Theoretische Grundlagen

sekundären Antikörper detektiert werden [Ehmann et al., 2014]. Daraus bestimmten sie letztendlich die Anzahl der Bruchpilot-Moleküle in der Zytomatrix der aktiven Zone von Synapsen. Nair et al. hingegen konnten zeigen, dass AMPA-Rezeptoren oft in Nanodomänen in neuronalen Synapsen des Hippocampus von Ratten vorliegen und schätzten die Anzahl Rezeptoren, indem sie die Intensitäten von einzelnen AMPA-Molekülen mit den Intensitäten der Nanodomänen verglichen [Nair et al., 2013]. Auch wenn man mit SMLM-Daten noch nicht die exakte Anzahl von Molekülen bestimmen kann, so kann mit ihrer Hilfe zumindest die Größenordnung ermittelt werden.

Werden zwei verschiedene Moleküle in einer Probe mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert, kann mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Messungen überprüft werden, ob diese räumlich sehr nahe beieinander liegen und somit colokalisieren. Eine **Colokalisation** zweier verschiedener Moleküle deutet darauf hin, dass diese interagieren und stellt somit eine sehr wichtige Fragestellung dar. Es gibt mittlerweile mehrere Herangehensweisen, die Colokalisation zu überprüfen. In der klassischen, nicht hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie, wird meist einfach den beiden Molekülen eine andere Farbe zugewiesen und die beiden Bilder übereinander gelegt. Überlappen die Farben, entsteht eine Mischfarbe der beiden. Die Colokalisation von SMLM-Daten kann entweder pixelgenau durchgeführt werden, zum Beispiel über die Bestimmung des Pearson's Korrelationskoeffizienten [Pearson, 1896] oder des Manders' Colokalisationskoeffizienten [Manders et al., 1993]. Die zweite Möglichkeit der Colokalisationsbestimmung wird lokalisationsgenau durchgeführt. Sie wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewendet. Bei der sogenannten Koordinaten-basierten Colokalisation (Abk. CBC) [Malkusch et al., 2012] werden von jeder Lokalisation eines Fluorophors die Verteilungen der benachbarten Lokalisationen von beiden Fluorophoren über die Ripley-Funktion bestimmt, sodass zwei Ripley-Funktionen pro Lokalisation erhalten werden. Diese beiden Funktionen werden korreliert und ein CBC-Wert berechnet. Je näher dieser Wert an 1 liegt, desto ähnlicher sind sich die Verteilungen beider Fluorophore, bzw. desto höher ist ihr Maß an Colokalisation. Ist der Wert 0, korrelieren die beiden Moleküle nicht und die Wahrscheinlichkeit der Colokalisation ist sehr gering. Ein negativer CBC-Wert deutet auf eine Anti-Colokalisation hin, was bedeutet, dass dort wo das erste Molekül ist, das zweite auf keinen Fall lokalisiert ist.

3 Material und Methoden

3.1 Probenpräparation

3.1.1 Zelllinien und Bakterienstämme

Es wurden verschiedene Zelllinien verwendet. Humane Osteosarkoma- (U2OS)-Zellen wurden in DMEM Ham's F12 (Sigma) mit 10% FCS (PAA Laboratories), 100 U/ml Penicillin (PAA Laboratories) und 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Sie wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% wachsen gelassen, dann mit PBS gewaschen und für 5 min mit Akkutase inkubiert, um sie zu passagieren. Die Jurkat-T-Zellen E6-1 wurden in RPMI1640 (Sigma) mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 2 mM Natrium-Pyruvat, 2 mM nicht-essentielle Aminosäuren und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin bis zu einer Dichte von $\sim 1 \times 10^6$ Zellen/ml wachsen gelassen, bevor sie gesplittet wurden.

Mikrovaskuläre Endothelzellen eines menschlichen Gehirns (HBME-Zellen) wurden im Lehrstuhl für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg in Gelatinebeschichtete Kulturflaschen kultiviert. Als Nährmedium wurde RPMI1640 (Life Technologies) mit 10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 10% Nu Serum IV, 1% "Minimal Essential Medium" mit nicht-essentiellen Aminosäuren, 5 U/ml Heparin und 30 mg/ml Wachstumszusätzen für Endothelzellen verwendet.

Humane primäre T-Zellen wurden im Lehrstuhl Innere Medizin II der Universität Würzburg aufgereinigt oder im Lehrstuhl Virologie der Universität Würzburg aufgereinigt und gefärbt. Dazu wurden zunächst mononukleäre Zellen aus peripherem Blut von gesunden Spendern mittels Ficoll Dichtegradient-Zentrifugation (Biochrom) isoliert. Danach wurden die T-Zellen über negative Selektion (Pan T cell isolation kit, Miltenyi Biotec) von anderen Zellen getrennt und mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI1640 (Life Technologies) mit 0,5% BSA (Sigma) und 120 µg/ml Gentamicin (Refobacin; Merck) resuspendiert. Die Reinheit der T-Zellen wurde mittels CD3-Antikörper Färbung und FACS-Messungen bestimmt. 98% der Zellen waren CD3 positive T-Zellen.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden im Lehrstuhl Innere Medizin II der Universität Würzburg aufgereinigt. Dafür wurden zunächst humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) über eine Ficoll Dichtegradient-Zentrifugation (Biochrom) aus Blut von gesunden Spendern isoliert. Die NK-Zellen wurden mit Hilfe eines MACS NK negativ Selektionskit (Miltenyi Biotec) von den PBMCs getrennt und

3 Material und Methoden

dann in RPMI1640 (Invitrogen) mit 10% FBS (Sigma) und 120 µg/ml Gentamicin (Merck) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Stimulation der Zellen fand mit 1000 U/ml rekombinanten menschlichen Interleukin-2 (Novartis) über Nacht statt.

Primäre hippocampale Neuronen wurden vom Hans-Berger Lehrstuhl für Neurologie der Universitätsklinik Jena zur Verfügung gestellt. Sie wurden aus C57BL/6 E18 Mausembryonen präpariert. Dazu wurden zunächst die Schädel und die Hirnhäute mit einer feinen Pinzette von den Embryonengehirnen entfernt. Die Hippocampi wurden von den Gehirnen separiert, mit 0,25% Trypsinlösung für 5 min bei 37 °C behandelt und dann pulverisiert. Die Neuronen wurden auf Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen in Plattiermedium (MEM, 0,5% Glukose, 10% Pferdeserum, 0,5% Penicillin/Streptavidin) mit einer Dichte von 20 000 Zellen/cm² ausgesät. Nach 1 h wurde das Plattiermedium mit Wachstumsmedium (Neurobasal, 2% B27, 1% Glutamin, 0,5% Penicillin/Streptavidin) ausgetauscht und die Neuronen 10 bis 15 Tage kultiviert. Ein ausführliches Protokoll zur Präparation der Neuronen ist in Werner et al. aufgeführt [Werner et al., 2016]. Es wurden außerdem noch NR1, NR2A und NR2B transfizierte menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) zur Verfügung gestellt.

Die Bakterienstämme wurden im Lehrstuhl für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg kultiviert. Es wurden die *Neisseria meningitidis* Serogruppen B Stämme MC58 (E.R. Moxon), MC58 *siaD* (ungekapselte Mutante) [Unkmeir et al., 2002], H44/76, H44/76 *lpx* (Inaktivierung zweier Gene, die in der Lipid A Acyloxyacylierung involviert sind) (Prof. van der Ley, National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven) und der Serogruppe C Stamm 8013/12 (kein Gen für Opc und inaktiviertes Opa-Gen) verwendet. Zusätzlich wurde ein *Neisseria gonorrhoeae* Stamm (N927) von der Mikrobiologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Transformation und transiente Transfektion

Um GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Anker auf der Plasmamembran zu untersuchen, wurden Zellen mit Fusionsproteinen, mit denen SMLM-Messungen möglich sind, transfiziert. Das Plasmid mit der GPI Sequenz (315 µg/ml) wurde im Lehrstuhl Biophysik der TU Wien hergestellt. Der pcDNA3 Vektor bestand aus einer ER-Lokalisierungssequenz und einer mEOS3.2-Sequenz, die an einer Sequenz für 25 Aminosäuren des GPI-Ankers des humanen Folatrezeptors fusioniert war. Zunächst musste eine **Transformation** durchgeführt werden, für die der kompetente *E. coli* XL1 Blue Bakterienstamm verwendet wurde. Es wurden 20 µl Bakterien zu 1 µl GPI-

Plasmid gegeben, ohne zu resuspendieren. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden sie auf Ampicillin haltigen TY-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine Kolonie gepickt und diese in 5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin (100 mg/ml) bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Danach wurden die Bakterien für 10 min und bei 5000 rpm runterzentrifugiert und eine Plasmidisolierung (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche) durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die Proben zur Sequenzierung (GATC) geschickt.

Für die transiente **Transfektion** wurden $1,4 \times 10^4$ U2OS-Zellen pro Kammer in ein LabTek II (Nunc, Thermo Fischer Scientific) gegeben. Diese wurden über Nacht im Brutschrank anwachsen gelassen. Transfiziert wurden die Zellen mit FuGENE[®]HD (Promega) mit einem Verhältnis von 1,5:1 (FuGENE[®]HD:DNA) für 24 h. Es wurde sich dabei an die Anleitung, die von Promega zur Verfügung gestellt wird, gehalten.

3.1.3 Antikörper-Markierung

Um Neuronen mit Farbstoff-markierten Patientenantikörpern zu färben, ohne einen weiteren sekundären Antikörper zu verwenden, wurden diese mit Cy5 direkt markiert. Zu den Patientenantikörpern wurde ein 3-facher Überschuss an Cy5-NHS, 25 µl NaHCO₃ (0,15 M) und 40 µl doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) dazugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Um den Farbstoff-markierten Antikörper von freiem Farbstoff zu trennen, wurden Gelsäulen (NAP[™]-5 Columns, GE Healthcare) verwendet. Die Säulen wurden zunächst 3 Mal mit PBS gewaschen, bevor die Probe auf diese pipettiert wurde. Sobald die Probe eingezogen war, wurden ~ 420 µl PBS dazu pipettiert und ein weiteres Mal (1 ml) als zwei Phasen in der Säule zu erkennen waren. Die erste Bande, die den markierten Antikörper darstellte, wurde aufgefangen und die Konzentration bzw. die durchschnittliche Anzahl der Farbstoffe an einem Antikörper (Labelgrad = DOL) mit dem Absorptionsspektrometer bestimmt. Die DOL betrug ~ 1,3.

3.1.4 Fixierung

Die Fixierung ist ein kritischer Schritt in der Probenvorbereitung. Sie muss sorgfältig für jedes neue Zielmolekül ausgewählt werden. Die bekanntesten Fixative in der Fluoreszenzfärbung sind Formaldehyd (FA) und Glutaraldehyd (GA). Sie vernetzen Proteine indem sie u.a. zwischen den basischen Aminosäuren Hydroxymethylen-Brücken ausbilden. FA ist kleiner als GA wodurch es schneller in die Zelle gelangt. GA ist deutlich größer, wodurch es effektiver die Moleküle vernetzt. GA sollte deshalb bei

3 Material und Methoden

Membranfärbungen verwendet werden [Tanaka et al., 2010]. Sind die Proteine jedoch mit mEOS angefärbt darf kein GA verwendet werden, da dieses das Fluorophor zerstört [Lippincott-Schwartz & Patterson, 2009]. Auch die Temperatur spielt eine wichtige Rolle bei der Fixierung. Soll zum Beispiel das Zytoskelett angefärbt werden, ist es wichtig die Fixierung bei 37 °C durchzuführen, anderenfalls depolymerisiert es [Whelan & Bell, 2015]. Bei Membranen hingegen ist es besser bei RT zu fixieren, um Molekülbewegungen zu verlangsamen.

Für die Vorfixierung wurden die Zellen zunächst in eine LabTek II Kammer überführt. Dabei wurden bei den verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Konzentrationen und Inkubationszeiten verwendet. U2OS- und HBME-Zellen wurden mit einer Konzentration von 1×10^4 bzw. $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Kammer verwendet und 2 Tage anwachsen gelassen. Für die Fixierung von Jurkat- und primären T-Zellen wurden $1-1,5 \times 10^5$ Zellen in eine Kammer pipettiert und 30 bzw. 15 Minuten inkubiert. Die LabTeks wurden für HBME-Zellen mit 0,2% Gelatine (1 Stunde, 37 °C), für Jurkat-Zellen mit Poly-D-Lysin (2 Stunden, RT) und für T Zellen mit 10 µg/ml Ziege anti-Maus IgG Antikörper (1 Stunde, 37 °C) vorinkubiert. Die NK-Zellen wurden entweder allein oder zusammen mit *Aspergillus fumigatus* (Multiplizität der Infektion (MOI) 0,5) auf Poly-D-Lysin beschichtete LabTeks für 3, 6, 9 oder 12 h kultiviert (Lehrstuhl Innere Medizin II, Würzburg). Die Bakterien wurden mit einer Konzentration von 10^8 Bakterien pro Kammer in Poly-L-Lysin beschichtete LabTeks gegeben (Lehrstuhl für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg). Dazu wurden zunächst 3 M Kaliumhydroxid (KOH) für 30 min in die LabTeks gegeben. Diese wurden dann erst mit sterilem deionisierten Wasser, dann mit PBS und ein weiteres Mal mit Wasser gewaschen. Die Kammern wurden daraufhin für 10 min mit 0,05% Poly-L-Lysin behandelt und danach die Bakterien für 15-20 min anwachsen gelassen. Ungebundene Bakterien wurden entfernt und die Probe mit PBS gewaschen.

Sollte das Zytoskelett gefärbt werden, wurden die Zellen mit 3% FA + 0,1% GA in PBS für 10 Minuten bei 37 °C vorfixiert. Da GA Schiff'sche Basen bildet, die fluoreszieren können, wurde die Probe danach für 7 Minuten mit 0,1% Natriumborohydrid (NaBH_4) in PBS inkubiert. Bei allen anderen Färbungen fand die Vorfixierung nur mit 4% FA für mindestens 20 Minuten statt. Die Nachfixierung wurde immer mit 4% FA + 0,1% GA in PBS durchgeführt. Die mit mEOS transfizierten Zellen wurden nur mit 4% FA für 40 min fixiert. Die Proben wurden nach den Fixierungen immer 3 Mal mit PBS gewaschen.

3.1.5 Immunhistochemie

Für die Mikrotubuli-Färbungen wurden die mit FA und GA fixierten U2OS-Zellen zunächst mit 3% BSA und 0,5% Triton X-100 in PBS für 10 min geblockt bzw. permeabilisiert. Danach wurden die Zellen mit 24 µg/ml Maus-anti-β-Tubulin (Sigma)

Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper für die immunhistochemische Markierung verschiedener Moleküle.

Antigen	Wirt	Antikörper- klasse/ Modifikation	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
β-Tubulin	Maus	IgG	1,5 µg/ml	Thermo Fisher
β-Tubulin	Kaninchen	IgG/ A1532	20 µg/ml	Invitrogen
C16 Ceramide	Kaninchen	IgG	5 µg/ml	Prof. E. Bieberich, USA
C18 Ceramide	Kaninchen	IgG	5 µg/ml	Prof. E. Bieberich, USA
C16-24 Ceramide	Kaninchen	IgG	5 µg/ml	Prof. E. Bieberich, USA
Ceramide	Maus	IgM	16,6 µg/ml	Enzo Life Science
Cy5	Maus	IgG	4 µg/ml	Sigma-Aldrich
OMP	Kaninchen	IgG	~ 5 µg/ml	Lehrstuhl für Hygiene und Mikrobiologie, Würzburg
Homer1	Kaninchen	IgG	2,5 µg/ml	Synaptic Systems
Bassoon	Kaninchen bzw. Maus	IgG	2,5 µg/ml	Synaptic Systems
NR1	Mensch	IgG	Patienten- abhängig	Patientenmaterial, Hans-Berger Lehrstuhl für Neurologie, Jena
NR1	Maus	IgG	2,4 µg/ml	Merck Millipore
CD56	Maus	IgG, A1647	2 µg/ml	Biologend

in BSA/Triton-Blockpuffer für 1,5 Stunden inkubiert. Nach sechs Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit 10 µg/ml Farbstoff-markierten sekundären Ziege anti-Maus

3 Material und Methoden

Antikörper in Blockpuffer für 1 Stunde gefärbt. Bevor die Zellen mit FA + GA nachfixiert wurden, wurden sie abermals sechs Mal mit PBS gewaschen.

Bei allen anderen Immunhistochemie-Färbungen wurden die FA-fixierten Proben zunächst mit 10% BSA in PBS für eine Stunde geblockt. Befanden sich die Zielmoleküle in der Zelle, wurden diese davor noch mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 10 Minuten permeabilisiert. Danach wurden die Proben mit dem primären Antikörper für 1-2 Stunden inkubiert, sechs Mal mit PBS gewaschen, mit dem sekundären Antikörper in BSA für 1 Stunde inkubiert und ein weiteres Mal sechs Mal mit PBS gewaschen. Die Nachfixierung fand mit FA + GA statt.

Bei Lebendfärbungen, wurden U2OS-Zellen zunächst 10 min auf Raumtemperatur runtergekühlt. Das LabTek mit den Zellen wurde dann 5 min auf Eis gestellt, bevor mit der Färbung gestartet wurde. Das Zellmedium wurde gegen Zellmedium ohne FCS ausgetauscht, bevor die Zellen mit zunächst dem primären Antikörper in Zellmedium ohne FCS für 30 min inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit HBSS wurden sie dann mit einem Farbstoff-markierten Antikörper für 30 min gefärbt.

Alle primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Farbstoff-markierte Antikörper gegen die in Tabelle 2 aufgelisteten primären Antikörper. Alle Antikörper wurden von Life Technologies bezogen und mit einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die Abkürzung Al steht für Alexa Fluor.

Wirt/Antigen	Antikörperklasse	Fluorophor
Ziege/Kaninchen	IgG, F(ab') ₂	Al647
Ziege/Maus	IgG, F(ab') ₂	Al647
Ziege/Maus	IgG (H+L)	Al532
Ziege/Maus	IgM	Al647
Ziege/Mensch	IgG (H+L)	Al647

3.1.6 Aktin-Markierung mit Phalloidin

Phalloidin ist ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes und bindet spezifisch an F-Aktin [Steinmetz et al., 1998]. Markiert mit einem Fluorophor kann es für Fluoreszenzfärbungen des Zytoskeletts verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode für die Untersuchung verschiedener Triplettlöcher angewandt. Für die Färbung wurde ein Protokoll verwendet, das von Small et al. entwickelt wurde [Small et al., 1999]. Es wurde zunächst ein Zytoskelett-Puffer (CB) hergestellt. Dafür

wurde als Erstes 800 ml ddH₂O in einen Kolben vorgelegt. Dazu wurden 10 mM MES, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM Glukose und 5mM MgCl₂ gegeben und die Lösung mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 6,1 eingestellt. Danach wurde mit ddH₂O auf 1 Liter aufgefüllt und der Puffer steril filtriert. Um U2OS-Zellen zu fixieren und permeabilisieren wurde dann aus dem CB zwei Lösungen angesetzt. Zum einen 0,3% GA+0,25% Triton X-100 in CB (= CB1) und 2% GA in CB (=CB2), die beide auf 37 °C vorgewärmt wurden. Die Zellen wurden mit CB1 für 1-2 Minuten und direkt danach für 10 Minuten mit CB2 bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Schiff'schen Basen des GAs 7 Minuten mit 0,1% NaBH₄ in PBS reduziert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit den Farbstoff-markierten (Alexa Fluor 647/532, Atto655) Phalloidin Lösungen gefärbt. Vor dem Messen wurden die Proben 3 Mal mit PBS gewaschen. Eine Postfixierung ist bei dieser Färbung nicht notwendig.

3.1.7 Gangliosid GM1-Markierung mit Cholera toxin

Cholera toxin wird oft verwendet um "lipid rafts" anzufärben. Die Untereinheit B des Toxins bindet dabei an das Ganglioside GM1. In dieser Arbeit wurden Jurkat-Zellen mit Alexa Fluor 488 markiertem Cholera toxin markiert, um mit Ceramiden auf der Plasmamembran zu colokalisieren. Es wurden zuerst die Ceramide mit einem IgG-Antikörper und einem Alexa Fluor 647-markierten sekundären Antikörper gefärbt. Danach wurden die Zellen 6 Mal gewaschen und dann für 1 Stunde mit 10% Kaninchenserum abgeblockt. Um GM1 zu markieren, wurden die Proben danach 10 Minuten bei 4 °C mit 3,3 µg/ml Cholera toxin B (CTxB, Life Technologies) inkubiert. Nachdem drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen wurde, wurde CTxB mit einem Kaninchen anti-CTxB IgG-Antikörper (1:300) für 15 Minuten bei 4 °C stabilisiert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und mit FA + GA nachfixiert.

3.1.8 Sialinsäure und N-Acetylglukosamin-Markierung mit WGA

Um die Sialinsäuren und N-Acetylglukosamin Reste der Plasmamembran anzufärben, wurden fixierte U2OS-Zellen 10 Minuten mit 5 µg/ml Alexa Fluor 647-konjugiertem Weizenkeimlektin (engl.: wheat germ agglutinin, WGA, Invitrogen) in PBS bei RT inkubiert. Die Zellen wurden drei Mal mit PBS gewaschen, bevor sie direkt im Anschluss gemessen wurden.

3.1.9 Click-Reaktionen

Die sehr effiziente und spezifische Click-Chemie (Kapitel 2.2.1) wurde für die Markierung von Glykanen oder Ceramiden auf der Plasmamembran von U2OS-, Jurkat-Zellen und Bakterien verwendet. Die Färbung der Zucker wurde mit der kupferkatalysierten Click-Chemie durchgeführt. Dafür wurden U2OS-Zellen mit einer Konzentration von 1×10^4 Zellen pro Kammer direkt in unbehandelte LabTeks gegeben und dort 2 Tage mit $25 \mu\text{M}$ Azid modifizierter Galaktose (Ac_4GalNAz ; Life Technologies) inkubiert. In dieser Zeit bauen die Zellen diese metabolisch in die Zielmoleküle der Plasmamembran ein [Letschert et al., 2014]. Für die Färbung wurde zunächst eine Färbelösung hergestellt. Hierzu wurden $50 \mu\text{M}$ Kupfersulfat (CuSO_4), $250 \mu\text{M}$ Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA) und $2,5 \text{ mM}$ Natriumascorbat (Asc) für 5 min in einem Eppendorfgefäß inkubiert. In dieser Zeit wurde Cu(II) durch Asc. zu Cu(I) reduziert und die Radikale von THPTA abgefangen. Danach wurden $20 \mu\text{M}$ Al647-Alkin und PBS dazu pipettiert. Die Proben wurden einmal mit PBS gewaschen und in jede Kammer dann $120 \mu\text{l}$ Färbelösung dazu gegeben und diese 5 min inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit GA und FA nachfixiert.

Für die Markierung der Ceramide wurde die kupferfreie Click-Chemie verwendet. Nach 1,5 h Inkubation im LabTek, wurden die Jurkat-Zellen mit $25 \mu\text{M}$ Azid modifizierten Ceramidanaloga (Tabelle 3) für 30 Minuten gefüttert. Die Zellen wurden dann ~ 5 min bei RT abkühlen gelassen. In der Zwischenzeit wurde $25 \mu\text{M}$ Azidibenzoyklooctyne-Cy5 (DBCO-Cy5; Sigma-Aldrich) in PBS angesetzt. Die Zellen wurden mit PBS 1 Mal gewaschen, bevor pro LabTek Kammer $120 \mu\text{l}$ Farbstofflösung pipettiert wurde. Nach 7-15 min wurde diese wieder abgenommen und die Zellen 4 Mal mit PBS gewaschen. Die noch lebenden Zellen wurden dann unmittelbar im Anschluss am LSM aufgenommen.

Die Bakterien wurden im Lehrstuhl für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg mit unterschiedlichen Konzentrationen an Azid modifizierten Ceramiden und DBCO-Cy5 gefärbt.

3.1 Probenpräparation

Tabelle 3: Struktur und Bezeichnung der Azido-Ceramide und Azido-Fettsäuren. Sie wurden alle von Tim Walter aus der Organischen Chemie der Universität Würzburg synthetisiert und deren Struktur von ihm gezeichnet.

Chemische Struktur	Bezeichnung
	CerC6 ω
	CerC6 α
	CerC16 ω
	CerC16 α
	faC6 ω
	faC6 α
	faC16 Ω
	faC16 α

3.2 Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie

3.2.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Um die Auswirkungen von Cyclooctatetrae (COT), Kaliumiodid (KI) und Deuteriumoxid (D₂O) auf den Tripletzustand verschiedener Fluorophore zu untersuchen, wurden Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)-Messungen durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene FCS-Aufbauten dafür verwendet. Für die Fluorophore Al647 und Atto (At)655 wurde ein inverses Mikroskop von Zeiss (Axiovert 100 TV) genutzt. Die Farbstoffe in den Proben wurden mit einem 637 nm Dioden-Laser (Coherent) angeregt, dessen maximale Leistung von 50 mW mit einem Graufilterrad reduziert werden konnte. Der Laserstrahl wurde mit einem dichroitischen Spiegel (645DLRP, Omega Optics) in ein Ölimmersionsobjektiv (63x/1,4, Plan Apochromat, Zeiss) gelenkt, das mit einer Temperaturkontrolle ausgestattet war, sodass Temperaturschwankungen ausgeglichen werden konnten. Das Fluoreszenzlicht wurde mit einem Bandpassfilter (700DF75, Omega Optics) gefiltert, bevor es von einem 50:50 Strahlenteiler auf zwei Multimodefasern gelenkt wurde. Diese optischen Fasern mit einem Durchmesser von 100 µm, übernahmen dabei die Funktion eines Pinholes, sodass alle Photonen, die nicht aus dem Fokus stammten, herausgefiltert wurden. Das Fluoreszenzlicht wurde dann von zwei Avalanche-Photodioden (SPCM-AQR-15-FC, Perkin Elmer), die eine Totzeit von 50 ns besaßen, detektiert. Von dort wurden die Signale an einen Korrelator (5000/60XO Multiple Tau-Digital Real Correlator, ALV) übertragen, der sie in Echtzeit über Kreuzkorrelation verarbeitete, womit eine zeitliche Auflösung von 6,23 ns erreicht wurde. Der zweite Aufbau war sehr ähnlich aufgebaut, wobei dieser mit einem 488 nm (Coherent) und einem 532 nm (QIOPTIQ) Laser ausgestattet war, sodass die Fluorophore Al488 und Al532 gemessen werden konnten. Die Kreuzkorrelation wurde hier mit einem Softwarekorrelator (SymPhoTime, PicoQuant) berechnet.

Die Messungen wurden in PBS mit 0,005% Tween und verschiedenen Konzentrationen an COT, KI und D₂O bei 20 °C durchgeführt. Die verwendeten Fluorophore mit ihren Modifikationen sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die erhaltenen Kreuzkorrelationsgraphen wurden in Origin8.6 mit der Gleichung 9 gefittet und die Tripletamplitude und Tripletzeit bestimmt.

3.2 Fluoreszenzspektroskopie und -mikroskopie

Tabelle 4: Fluorophore mit ihren Modifikation, die mittels FCS gemessen wurden. Alle AI-Fluorophore wurden von Thermo Fisher bezogen, während Atto655 von der Firma Atto-Tec hergestellt wurde.

Fluorophor	Modifikation
Al488	anti- β -Tubulin IgG
Al532	Phalloidin
Al532	anti- β -Tubulin IgG
Al647	Phalloidin
Al647	anti- β -Tubulin IgG
Atto655	Phalloidin

3.2.2 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Konfokale Aufnahmen wurden an einem Laser-Scanning-Mikroskop LSM700 von Zeiss generiert. Dieses war mit einem 63x/1,40 Ölimmersionsobjektiv ausgestattet. Je nach verwendetem Fluorophor wurde mit einem blauen Festkörperlaser (488 nm, 10 mW) oder einem roten Festkörperlaser (639 nm, 5 mW) angeregt. Das Pinhole wurde immer auf 1 AU (engl.: Airy Unit) gesetzt. Sollte die Intensität bei verschiedenen Proben verglichen werden, wurden identische Einstellungen gewählt. Zur Detektion der Fluoreszenz standen zwei hoch-sensitive PMT (engl.: Photomultiplier) Detektoren zur Verfügung.

3.2.3 Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie

Um die mit Ceramidanaloga gefütterten und mit DBCO-Cy5 geklickten Jurkat-Zellen hochaufzulösen, wurden sie mit einem Mikroskop mit strukturierter Beleuchtung (engl. structured illumination microscope, SIM) (ELYRA S.1, Zeiss) gemessen. Die Messungen wurden mit einem invertierten Axio Observer Z1 Stativ durchgeführt, das mit einem Plan-Apochromat Ölimmersionsobjektiv (63x/1,40) ausgestattet war. Die Fluorophore wurden mit einem 642 nm Festkörperlaser angeregt und mit einer PCO.edge 5.5 sCMOS Kamera detektiert. Z-Stapel wurden mit 3 Rotationen und 5 Phasen für jede z-Ebene generiert, wobei diese 100 nm auseinander lagen. Die SIM-Bilder wurden mit der Zen 2012 SP1 Software berechnet und mit Fiji bearbeitet.

3.2.4 Hochauflösende Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie

Die SMLM-Aufnahmen wurden entweder an einem 2D oder an einem 3D schwingungsgedämpften Weitfeld-Aufbau generiert. Für 2D-Messungen wurden ein invertiertes Weitfeldmikroskop (IX-71, Olympus), das mit einem Ölimmersionsobjektiv

3 Material und Methoden

(63x/1,45, Olympus) ausgestattet war, verwendet. Um während den Aufnahmen Drift zu minimieren, wurde eine Nosepiece Stage (IX2-NPS, Olympus) genutzt. Für *d*STORM-Messungen wurde je nach Fluorophor entweder mit einem 641 nm Laser (Cube 640-100C, Coherent), einem 488 nm Laser (Sapphire 488-100, Coherent) oder einem 532 nm Laser (Nano 250-532-100, Linos) angeregt. Für PALM-Messungen wurde ein 568 nm Laser (Sapphire 568, Coherent) zum Anregen der Fluorophore verwendet und zusätzlich ein UV Laser (405 nm, Cube 405-100C, Coherent) um die Fluorophore zu photokonvertieren. Das Licht jedes Lasers wurde zunächst mit einem passenden schmalen Bandpassfilter aufgereinigt (Bright Line HC 642/10, Semrock und Z568/10, 532/10, 488/10, Chroma) bevor es mit Hilfe mehrere Spiegel in einen gemeinsamen Strahlengang gelenkt wurde. Durch manuell auswechselbare Linsen wurde es erst aufgeweitet, bevor es dann über eine weitere Linse in die hintere Fokalebene des Objektivs fokussiert wurde. Um das Emissionslicht von dem Anregungslicht zu trennen, wurde ein passender Strahlenteiler vor dem Objektiv verwendet (HC560/659, BrightLine 410/504/582/669, HC BS 680 imaging, Semrock). Bevor das Emissionslicht mit einer EMCCD Kamera (iXon, Andor) detektiert wurde, wurde es noch mit Bandpass- (HC697/75, HC630/92, HC582/75, HC Quadband 440/521/607/700, Semrock) und/oder Langpassfilter (LP647, LP575, LP488, Semrock) gefiltert.

Für 3D *d*STORM-Messungen [Proppert et al., 2014] wurde ein Zeiss Axio Observer Z1 Stativ verwendet, das mit einem Wasserimmersionsobjektiv (LD C-Apochromat 63x/1,15 W Corr M27, Zeiss) ausgestattet war. Die Al647-Fluorophore wurden mit einem 150 mW 640 nm Laser (iBeam Smart 640-S, Toptica) angeregt, der mit einem Bandpassfilter (MaxDiode LD01-640/8, Semrock) spektral aufgereinigt wurde. Vor dem Objektiv wurde ein Strahlenteiler (BrightLine Di01-R405/466/532/635-25x36, Semrock) und ein Bandpassfilter (ZET405/488/532/642m, Chroma) platziert. Um Astigmatismus der PSF einzuführen, wurde eine 250 nm achromatische Zylinderlinse (Thorlabs) in den Emissionsstrahlengang gestellt. Um das Emissionslicht weiter aufzureinigen, wurde es mit einem weiteren Bandpassfilter (ET700/75m, Chroma) gefiltert, bevor es mit einer EMCCD Kamera (iXon Ultra DU897U-CSO; Andor) detektiert wurde.

3.2.5 Durchführung der SMLM-Messungen

Für das Photoschalten der Fluorophore bei *d*STORM-Messungen (Kapitel 2.3.3) wurde ein Puffer aus β -Mercaptoethylamin (MEA; Sigma-Aldrich) in PBS angesetzt, der immer kurz vor der Messung frisch hergestellt wurde. Wurde bei einer Messung nur der

Farbstoff Al647 oder Cy5 verwendet, wurden 100 mM MEA gelöst und mit 5 M KOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Bei Messungen mit Al532 wurde ein Schaltpuffer mit 100 mM MEA und einem pH-Wert von 7,6 verwendet, mit Al488 80 mM MEA und einem pH-Wert von 8 und mit Atto655 (At655) 20 mM MEA, pH 7,4. Wurde die Probe nur mit Al647 oder Cy5 angefärbt, wurde manchmal noch zusätzlich zu dem MEA 2% Glukose, 4 U/ml Glukoseoxidase und 80 U/ml Katalase hinzugegeben, um Sauerstoff enzymatisch aus der Lösung zu entfernen.

Für jede 2D *d*STORM-Messung wurden 15 000 Bilder mit einer Bildrate von 50 Hz aufgenommen und für jede 3D-Messung mindestens 30 000 Bilder mit einer Rate von 54 Hz. Bei PALM-Messungen wurde die Bildrate auf 10 Hz eingestellt.

Bei Zwei-Farben-Messungen wurden vor den Messungen TetraSpecks (Invitrogen) mit den verwendeten Laserlinien aufgenommen, um die beiden Detektionskanäle übereinander zu legen.

3.2.6 Rekonstruktion von SMLM Daten

Um die mit SMLM aufgenommenen Bilder zu rekonstruieren, wurde die Software *rapidSTORM* 3.3.1 [Wolter et al., 2012] verwendet. Mit der Software können die Positionen aller detektierten Lokalisationen durch Anpassung ihrer Intensitätsverteilung mit einer 2D-Gaußfunktion ermittelt werden. Bei 3D-Aufnahmen wird die z-Koordinate mit der zusätzlichen Information der Stärke und Richtung des durch eine Zylinderlinse induzierten Astigmatismus der PSF berechnet. Um Hintergrundsignal raus zu filtern, kann eine Mindestanzahl von Photonen pro Lokalisation angegeben werden. Die Positionen der verbleibenden Lokalisationen werden dann in Pixel mit einer Größe von 10 nm gebinnt, sodass ein hochaufgelöstes Bild erzeugt wird. Gleichzeitig generiert *rapidSTORM* eine Lokalisierungsdatei, in der die Positionen, Intensitäten und Bildnummern aufgelistet sind.

Um die Anzahl der Lokalisationen pro Fluorophor zu bestimmen, wurde das “track emissions“ Modul (Kalman-Filter) in *rapidSTORM* verwendet.

3.2.7 Analyse von SMLM Daten

Die Lokalisierungsdateien wurden verwendet, um die Daten weiter zu analysieren. Um zum Beispiel die Intensitätsverteilungen zu untersuchen, wurden die aufgelisteten Intensitäten in der Lokalisierungsdatei, mit der Software Origin (Version 8.6) graphisch dargestellt und die mittleren Intensitäten berechnet. Colokalisierungsanalysen, Clusteranalysen und die Ermittlungen der Lokalisationen pro Fläche wurden mit der

3 Material und Methoden

Software LAMA [Malkusch & Heilemann, 2016] durchgeführt. Eine genaue Anleitung für diese Software steht unter <http://user.uni-frankfurt.de/~malkusch/lama.html> zur Verfügung. Um Verteilungen von Molekülen zu untersuchen, wurden zunächst mehrere $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ große Bildausschnitte (engl. region of interest, ROI) eines hochaufgelösten Bildes mit Fiji ausgewählt und mit LAMA deren Ripley's H-Funktionen (Gleichung 15) bestimmt. Das Maximum der Ripley's H-Funktion (r_{Max}) liegt zwischen dem Radius und dem Durchmesser der Cluster, sodass zunächst nur eine Aussage über das grundsätzliche Vorhandensein von Clustern und deren ungefähre Größe getroffen werden kann (Kapitel 2.3.4). Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse aus der Ripley-basierten Clusteranalyse genutzt, um mit einer morphologischen Clusteranalyse (MCA) detaillierte Ergebnisse über die Cluster zu erhalten. Es wurden, wenn nicht anders angegeben, nur die Cluster ausgewertet, deren Radius zwischen r_{Max} und $r_{\text{Max}}/2$ lag. Mit LAMA wurden zunächst alle Lokalisationen in Pixel mit einer Größe von 10 nm gebinnt und so ein zwei-dimensionales Histogramm generiert. Ein Schwellenwert wurde angegeben, um aus diesem ein binäres Bild zu generieren, von dem wiederum eine Maske erstellt wurde. Basierend auf dieser Maske, konnte dann die ungefähre Größe, Anzahl und Form der Cluster berechnet werden. Um die Anzahl der Lokalisationen pro Cluster zu bestimmen, wurde die Maske über das ursprüngliche Histogramm gelegt. Um die Colokalisation des Signals von der Färbung mit CTxB-A1488 und den A1647 markierten Ceramid Antikörper zu untersuchen, wurde die Funktion CBC (engl. coordinate based colocalization) (Kapitel 2.3.4) in LAMA verwendet. Chromatische Aberrationen wurden mit einer nichtlinearen Transformationsmatrix, die aus den Messungen der TetraSpecks erstellt wurde, korrigiert.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Eliminierung von Artefakten in der SMLM

Die Lokalisationsmikroskopie wird durch ihre Fähigkeit kleinste Strukturen mit Nanometer-Genauigkeit und –Auflösung abzubilden, immer populärer. Da die Mikroskop-Aufbauten für die Messungen relativ einfach sind (Holm, 2014), ausführliche Protokolle für die Durchführung veröffentlicht sind (Linde, 2011, Dempsey 2011) und Rekonstruktionsprogramme für die Aufnahmen frei verfügbar sind, findet sie eine breite Anwendung in verschiedensten Forschungsgebieten. Dies birgt auch Gefahren. Werden die Messungen nicht richtig durchgeführt, können Artefakte entstehen, aus denen dann falsche Schlüsse gezogen werden können. Im ersten Teil der Dissertation wurden Fehlerquellen bei *d*STORM-Messungen genauer beleuchtet. Da die Lokalisationspräzision direkt mit der Anzahl der emittierten Photonen zusammenhängt, wurden zunächst verschiedene chemische Additive auf ihre Fähigkeit diese zu erhöhen, untersucht. Es wurde außerdem die Auswirkung einer zu niedrigen Photoschalttrate der Fluorophore auf die Verteilungen der Lokalisationen überprüft und Strategien entwickelt, Artefakte zu erkennen. Da im zweiten Teil der Dissertation hauptsächlich Plasmamembran-Ceramide mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen und *d*STORM-Messungen untersucht werden sollte, wurde auch auf mögliche Artefakte bei diesen eingegangen.

4.1.1 Artefakte durch zu niedrige Photonenzahl

Bei *d*STORM-Messungen sind zwei verschiedene photochemische Prozesse notwendig. Zum einen sollen viele Fluorophore über den Tripletzustand in den Aus-Zustand reduziert werden, was über Thiolate erreicht wird. Zum anderen sollen jedoch die Fluorophore, die sich gerade im An-Zustand befinden, möglichst schnell wieder aus dem Tripletzustand in den Grundzustand relaxieren, damit möglichst viele Photonen detektiert werden können. Denn wie in Kapitel 2.3.2 aufgeführt, hängt die Präzision der Moleküllokalisierung von der Photonenzahl ab. Je mehr Photonen ein Fluorophor emittiert, desto genauer kann seine Position bestimmt werden und desto genauer wird die markierte Struktur abgebildet. Ziel dieses Projekts war es verschiedene chemische Additive hinsichtlich ihrer Fähigkeit die Photonenzahl von Fluorophoren, die bei *d*STORM-Messungen eingesetzt werden können, zu untersuchen. Es sind mittlerweile eine Reihe von Additiven auf ihre Eignung als Tripletlöcher überprüft worden, jedoch nur in Ensemblemessungen [Evans, 1957; Snavely & Schäfer, 1969; Pappalardo, 1970;

4 Ergebnisse und Diskussion

Liphardt et al., 1982; Zheng et al., 2012; Zheng et al., 2016;]. Es wurde zunächst mit Fluoreszenzkorrelationsmessungen (FCS) die Veränderungen des Triplettzustands von Al488, Al532, Al647 und At655 bei Zugabe von Cyclooctatetraen (COT), Kaliumiodid (KI) und Deuteriumoxid (D₂O) untersucht. Danach wurden Zellen mit diesen Fluorophoren markiert, unterschiedliche Konzentrationen an den drei genannten Additiven hinzugegeben und mit *d*STORM abgebildet. Aus den erhaltenen Lokalisationsdateien wurde die Anzahl der Photonen bestimmt.

Die Ergebnisse aus den FCS-Messungen zeigen, dass die Additive unterschiedliche Auswirkungen auf die verschiedenen Fluorophore haben (Abbildung 10). Während 2 mM COT eine Abnahme der Triplettamplitude von Al488, Al532 und Al647 um 40-60% bewirkte, hatte COT keinen Effekt auf die Triplettamplitude von At655. 5 mM KI hingegen resultierte in einer Abnahme der Triplettamplitude um ~ 80% bei Al488 und in einer Zunahme dieser bei Al532, Al647 und At655 (um den Faktor 3,5, 1,8 und 52). Die Triplettamplitude veränderte sich nicht, wenn die Farbstoffe statt in PBS in D₂O gemessen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein. COT wird als allgemeiner Triplettquencher eingesetzt. Es reagiert mit Fluorophoren im Triplettzustand über Triplett-Triplett Energietransfer, sodass diese wieder in den Grundzustand relaxieren [Zheng et al., 2016]. Dadurch sollte die Photonenausbeute der Fluorophore erhöht werden. KI fördert den Triplettübergang bei Fluorophoren, die im grünen und roten Bereich absorbieren, durch den Schweratomeffekt [Korobov & Chibisov, 1983; Turro et al., 2009]. Chmyrov et al. konnten 2010 zeigen, dass hingegen bei Fluorophoren, die im blauen Bereich Licht absorbieren, KI in mikromolaren Konzentrationen photooxidierte Fluorophore wieder reduziert [Chmyrov et al., 2010]. In millimolaren Konzentrationen bewirkt es eine Reduktion von nicht-oxidierten Fluorophoren. Dies bedeutet, dass die Photonenausbeute bei Fluorophoren im grünen und roten Bereich mit KI abnehmen sollte, im blauen Bereich hingegen zunehmen sollte. D₂O greift nicht am Triplettzustand an, sondern bewirkt eine Verbesserung der Photonenausbeute dadurch, dass strahlungslose Relaxationsprozesse minimiert werden [Suppan, 1994]. Es ist demnach nicht verwunderlich, dass keine Veränderungen in der Triplettamplitude festzustellen waren.

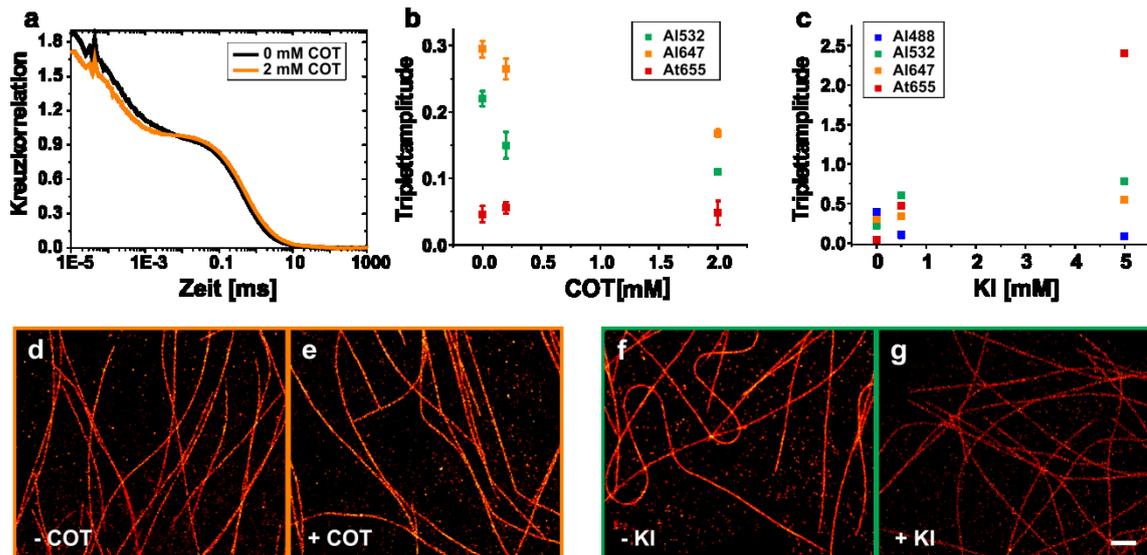


Abbildung 10: Auswirkung von COT und KI auf den Tripletzustand. (a) Beispielhafte Kreuzkorrelationsfunktionen von Al647 mit und ohne COT. (b) Die Tripletamplitude von Al488, Al532 und Al647 nimmt mit steigender COT-Konzentration ab, während sie bei At655 gleich bleibt. (c) Die Tripletamplitude von Al488 nimmt mit höherer KI-Konzentration ab, die von Al532, Al647 und At655 zu. (d, e) Das Signal von Al647 gefärbten Mikrotubuli steigt bei Zugabe von COT bei *d*STORM-Messungen an. (f, g) Das Signal von Al532 gefärbten Mikrotubuli ist hingegen deutlich geringer mit KI als ohne. Maßbalken: 1 μm (d-g).

Die FCS-Messungen wurden ohne Zugabe von Thiolat oder Sauerstoff-entfernende-Enzyme durchgeführt. Bei *d*STORM-Messungen sind diese jedoch notwendig, damit sich genügend Fluorophore im Aus-Zustand befinden. Die Bedingungen sind somit unterschiedlich und eine mit der FCS gemessene Abnahme der Tripletamplitude resultiert nicht zwangsläufig in einer Zunahme der Photonenzahl bei *d*STORM-Messungen. Dies ist auch bei den Messungen mit COT der Fall (Tabelle 5). Während die Photonenzahl bei Al647 mit 2 mM zunahm (um $\sim 60\%$), was der Abnahme der Tripletamplitude bei den FCS-Messungen entspricht, war keine Veränderung bei Al532 erkennbar. Was genau der Grund für diese Widersprüchlichkeit ist, konnte hier nicht geklärt werden. Bei At655 blieb die Intensität weitestgehend konstant, was mit den FCS-Messungen übereinstimmt.

Die Ergebnisse der *d*STORM-Messungen mit KI stimmen mit den FCS-Ergebnissen überein. Die Photonenzahl nahm bei Al532 und Al647 durch Zugabe von 5 mM KI ab (um 30-40%). Was dadurch erklärbar ist, dass KI den Übergang von grün/rot absorbierenden Fluorophoren in den Tripletzustand fördert und somit diese Fluorophore keine Photonen emittieren können. Bei Al488 nahm die Intensität zunächst sehr leicht zu (um $\sim 10\%$), bei höheren KI-Konzentrationen (> 1 mM) jedoch wieder ab (bei 5 mM um $\sim 40\%$). Vorstellbar ist, dass bei niedrigen KI-Konzentrationen die Reduktion der photooxidierten Fluorophore gefördert wird, sodass Fluorophore

4 Ergebnisse und Diskussion

zunächst mehr Photonen aussenden können. Da jedoch bei höheren KI-Konzentrationen nicht-photooxidierte Fluorophore reduziert werden und bei *d*STORM-Messungen wenig Sauerstoff vorhanden ist, um sie daraus wieder zu oxidieren, nimmt die Intensität ab.

Tabelle 5: Auswirkung verschiedener Triplettlöcher und D₂O auf die Anzahl der detektierten Photonen pro Fluorophor bei *d*STORM-Messungen. k.A. = keine Angaben vorhanden, = = keine Auswirkungen, - = 1,1-1,4 fache Abnahme der Photonenzahl, -- = 1,5-1,9 fache Abnahme, + = 1,1-1,4 fache Zunahme der Photonenzahl, ++ = 1,5-1,9 fache Zunahme.

Farbstoff	COT	KI	D ₂ O
Al488	k. A.	=	k. A.
Al532	=	--	k. A.
Al647	++	--	=
At655	=	k. A.	=

Beim Vergleich der Photonenzahlen, gemessen in MEA/PBS und MEA/D₂O wurde festgestellt, dass sich die Anzahl der Photonen pro Fluorophor und Einzelbild mit D₂O erhöht, da weniger oft ein angeregtes Farbstoffmolekül seine Energie auf ein schweres Wasserstoffmolekül überträgt. Allerdings bleichen die Fluorophore schneller in D₂O, sodass letztendlich die gleiche Anzahl an Photonen detektiert wird. Klehs et al. veröffentlichten während der Durchführung dieses Projekts genau diese Beobachtungen [Klehs et al., 2014].

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass nur COT und nur bei Al647 einen signifikanten positiven Effekt auf die Photonenzahl bei *d*STORM-Messungen hat. KI in niedrigen Konzentrationen resultiert bei Al488 in einer geringen Signalsteigerung. Bei allen anderen Additiven und Fluorophoren nimmt die Photonenzahl ab oder verändert sich kaum. Mit D₂O kann bei Al647 und At655 schneller die gleiche Anzahl von Photonen detektiert werden, wodurch es bei Messungen, die schnell durchgeführt werden müssen, wie zum Beispiel Lebendzellmessungen, verwendet werden kann.

4.1.2 Artefakte durch zu niedrige Photoschaltraten

Selbst wenn Fluorophore verwendet werden, mit denen theoretisch eine hohe Photonenausbeute erhalten werden kann, müssen weitere Faktoren beachtet werden, um ein hochaufgelöstes Bild mit SMLM-Techniken zu generieren. Wie van de Linde et al. 2010 gezeigt haben, leidet die strukturelle Auflösung, wenn mehr als ein Fluorophor in

einer zwei-dimensionalen auflösungsbegrenzten Fläche gleichzeitig emittieren und die PSFs dieser sich überlappen [van de Linde et al., 2010]. Zwei eng liegende Filamente, wie zum Beispiel Mikrotubuli, können dann nicht mehr als diese aufgelöst werden, da das Auswerteprogramm falsche Lokalisationen zwischen den eigentlichen Positionen der Fluorophore erzeugt. Grundsätzlich sollte nicht mehr als ein Emitter pro μm^2 an sein, um ein Artefakt-freies rekonstruiertes Bild zu erhalten [Wolter et al., 2011]. Es gibt verschiedene Gründe, die dazu führen, dass zu viele Fluorophore gleichzeitig an sind. Bei PALM-Messungen zum Beispiel kann die Photoaktivierungsleistung zu hoch gewählt sein. Bei *d*STORM-Messungen muss hingegen darauf geachtet werden, dass der Schaltpuffer die richtige Konzentration an Reduktionsmittel und einen geeigneten pH-Wert enthält. Sind zu viele Fluorophore gleichzeitig an, kann zum Beispiel der pH-Wert hinaufgesetzt werden. Wenn bei sehr dicht markierten Strukturen, die zum Beispiel mit Antikörpern angefärbt wurden, dies nicht zum gewünschten Ergebnis führt, kann auch eine geringere Konzentration an Fluorophor-markierten Antikörpern verwendet werden. Wobei dabei das Nyquist-Shannon Kriterium nicht vergessen werden darf; denn ist die Struktur zu dünn markiert, kann sie ebenfalls strukturell nicht aufgelöst werden. Ein weiterer Punkt, der zu nicht ausreichenden Photoschaltraten führt, ist eine zu niedrige Anregungsleistung.

In diesem Projekt, das in Zusammenarbeit mit Sebastian Letschert vom Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik der Universität Würzburg bearbeitet wurde, wurde zum einen die Auswirkungen von zu niedrigen Photoschaltraten auf Mikrotubuli und Mitochondrien untersucht. Da sich die vorliegende Arbeit jedoch mit der Untersuchung von Membranmolekülen beschäftigt, wurden hauptsächlich die Konsequenzen auf diese überprüft [Burgert et al., 2015]. Es wurden membranassoziierte Glykane über die kupferfreie Click-Chemie fluoreszenzmarkiert und Sialinsäure und N-Acetylglukosamin über Al647-markiertes WGA angefärbt. Die dadurch erreichte hohe Fluorophordichte in der basalen und apikalen Plasmamembran wurde anschließend mit verschiedenen Anregungsleistungen visualisiert. Dabei wurde bei allen angefärbten Strukturen, die mit niedrigen Laserleistungen ($< 1 \text{ kW/cm}^2$) gemessen wurden, große Cluster mit sehr hohem Signal sichtbar (Abbildung 11). Diese wurden umso größer je niedriger die Anregungsleistung gewählt wurde.

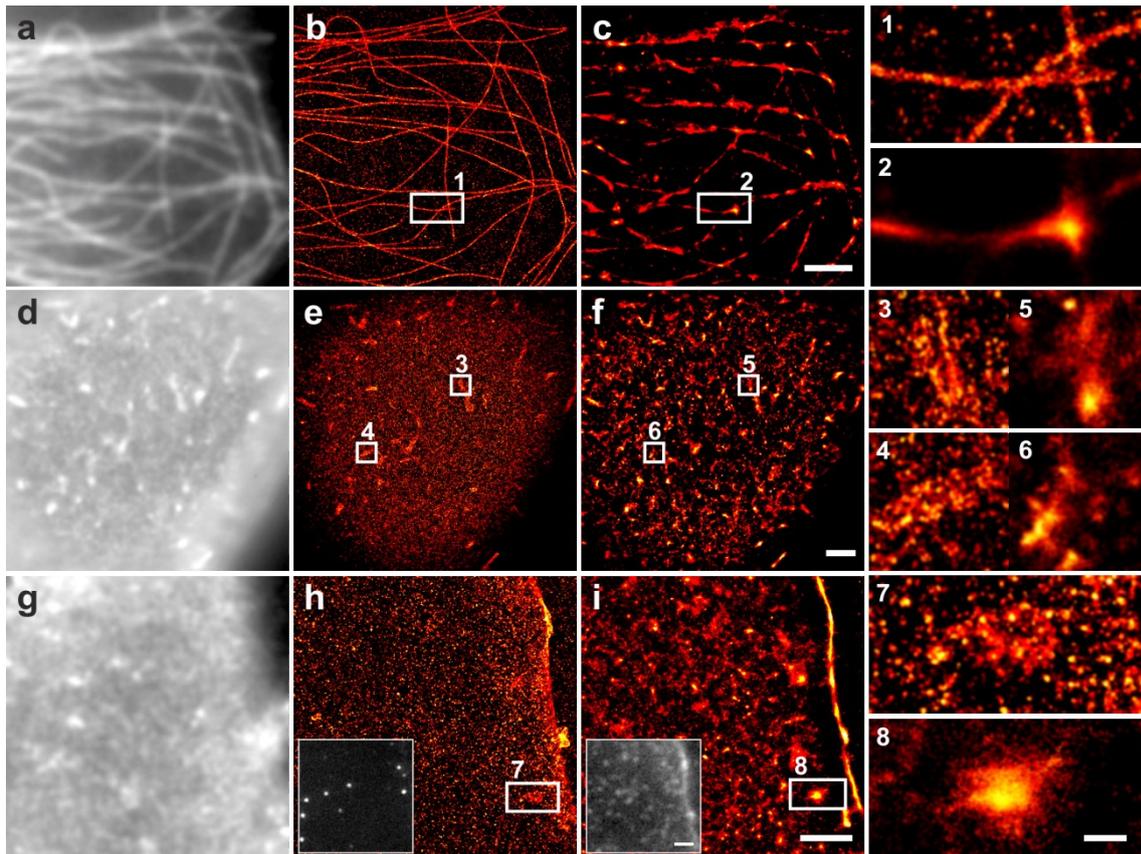


Abbildung 11: Zu niedrige Laserleistungen bei *d*STORM-Messungen, können bei dicht gefärbten Proben zu artifiziellen Clustern führen. (a) zeigt eine Weitefeld-Fluoreszenzaufnahme von Al647 gefärbten Mikrotubuli und (d) und (g) Weitefeld-Fluoreszenzaufnahmen der apikalen bzw. basalen Plasmamembran von WGA-Al647 gefärbten U2OS-Zellen. (b), (e) und (h) sind die dazugehörigen *d*STORM-Aufnahmen, gemessen bei einer Anregungsintensität von $\sim 7 \text{ kW cm}^{-2}$. Hier ist eine durchgängige Färbung und homogene Verteilung der Fluorophore erkennbar. Überkreuzende Mikrotubuli (1) und dicht markierte Mikrovilli (3, 4) bzw. Vesikel-ähnliche Strukturen (7) sind klar zu erkennen. (c), (f) und (i) zeigen die gleichen Zellen, gemessen bei einer Anregungsintensität von $\leq 0.5 \text{ kW cm}^{-2}$. Hier können überkreuzende oder dicht liegende Mikrotubuli (2) bzw. dicht markierte Strukturen (5, 6, 8) durch eine zu niedrige Photoschaltrate der Fluorophore nicht richtig aufgelöst werden und erscheinen als artifizielle Cluster. Die **Insets** in (h) und (i) zeigen Einzelbilder aus den entsprechenden Rohfilmen. Maßbalken: $2 \mu\text{m}$ (a-i und **Insets**) und 300 nm (1-8). Abbildung aus [Burgert et al., 2015] mit Erlaubnis von Springer, leicht modifiziert, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015.

Um diese hellen Cluster waren schwarze Flächen, es wurden demnach dort keine Lokalisationen angezeigt. *rapid*STORM, das Programm, mit dem die Bilder rekonstruiert wurden, fittet die PSF eines Emitters mit einer Gaußfunktion an (Kapitel 3.2.6). Wenn nun jedoch mehrere Fluorophore gleichzeitig in einer beugungsbegrenzten Fläche an sind, wird das Signal von diesen aufsummiert und als eine sehr helle Lokalisation dargestellt. Um diese helle Lokalisation ist dann lokal ein sehr schlechtes Signal-zu-Hintergrund Verhältnis. Da *rapid*STORM die Unterscheidung von wahren Lokalisationen zu Hintergrundsignal über das Verhältnis vom Gaußmaximum zum -minimum, also lokalem Hintergrund, festmacht, werden einzelne Emitter als Hintergrund erkannt und somit verworfen. Dadurch entstehen große, sehr helle Cluster,

um die herum keine Lokalisationen angezeigt werden. Dieser Effekt wird umso mehr verstärkt, je höher die Mindestanzahl an Photonen pro Lokalisation (= Intensitäts-Threshold) in *rapidSTORM* gewählt wird (Abbildung 12). Der Grund hierfür ist, dass bei Erhöhung des Intensitäts-Thresholds immer mehr einzelne Lokalisationen rausgefiltert und letztendlich nur noch die hohen aufsummierten Signale der Fluorophore, die gleichzeitig an sind, dargestellt werden.

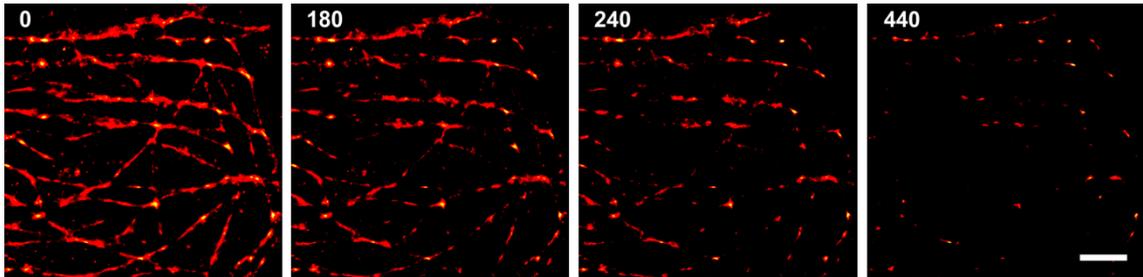


Abbildung 12: Mit höher gewähltem Intensitäts-Threshold in *rapidSTORM* nehmen die Flächen ohne Lokalisationen zu. Mikrotubuli in U2OS-Zellen wurden über indirekte Immunhistochemie mit Al647 angefärbt und mit einer Anregungsleistung von $\sim 0,1 \text{ kW cm}^{-2}$ gemessen. Die *dSTORM*-Aufnahmen wurden mit *rapidSTORM* rekonstruiert, wobei der Intensitäts-Threshold variiert wurde (0-440 Photonen). Maßbalken: $2 \mu\text{m}$. Abbildung aus [Burgert et al., 2015] mit Erlaubnis von Springer, modifiziert, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015.

Während bei den bekannten Strukturen von Mikrotubuli und Mitochondrien klar zu erkennen ist, dass diese nicht richtig abgebildet wurden, ist bei den Aufnahmen der Plasmamembranen nicht auf den ersten Blick zu erkennen, dass die abgebildeten Cluster keine wirklichen Cluster sind. Erst bei einem Vergleich mit den Bildern, die mit hohen Laserleistungen ($\sim 7 \text{ kW cm}^{-2}$) generiert wurden, waren diese artifiziellen Cluster als zum Beispiel Mikrovilli, Vesikel oder überlagerte Membranen zu erkennen (Abbildung 11). Die Moleküle waren hingegen homogen in der Plasmamembran verteilt, was durch eine Ripley's H-Funktion-basierte Clusteranalyse gezeigt werden konnte (Abbildung 13). Sie wurde bei WGA-Al647 gefärbten und mit unterschiedlichen Anregungsleistungen aufgenommenen U2OS-Zellen durchgeführt. Dabei wurde immer der gleiche Bereich auf der apikalen und basalen Plasmamembran einer Zelle mit $\sim 0,1 \text{ kW cm}^{-2}$, $\sim 0,3 \text{ kW cm}^{-2}$ und $\sim 7 \text{ kW cm}^{-2}$ aufgenommen und die Ripley's H-Funktionen miteinander verglichen. Das Maximum der Ripley's H-Funktion bei $\sim 7 \text{ kW cm}^{-2}$ betrug dabei $\sim 30 \text{ nm}$, was der wiederholten Lokalisierung einzelner Fluorophore entspricht. Der Peak der Ripley's H-Funktionen, die aus den Messungen mit niedrigeren Anregungsleistungen erhalten wurden, waren zu größerem r verschoben und breiter, was erkennen lässt, dass die Clustergröße auf größeren Längenskalen variiert.

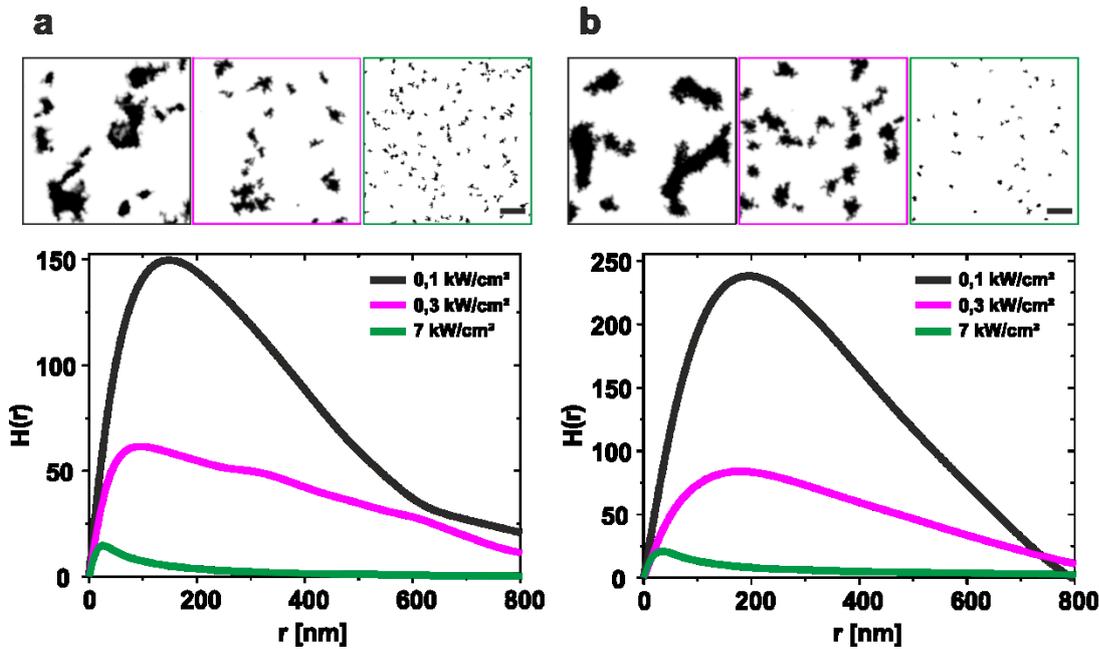


Abbildung 13: Plasmamembran-Cluster werden mit niedrigeren Anregungsleistung größer. U2OS-Zellen wurden mit WGA-A1647 gefärbt. (a) und (b) zeigen binäre *d*STORM Bilder der apikalen (a) und basalen (b) Plasmamembran. Die jeweils gleiche Stelle wurde mit $\sim 0,1 \text{ kW cm}^{-2}$ (schwarze), $\sim 0,3 \text{ kW cm}^{-2}$ (magenta) und $\sim 7 \text{ kW cm}^{-2}$ (grün) aufgenommen. Bei einer Anregungsleistung von $\sim 7 \text{ kW cm}^{-2}$ weisen die Ripley's H-Funktionen ein Maximum von $\sim 30 \text{ nm}$ auf, was der wiederholten Lokalisierung einzelner Fluorophore entspricht. Bei niedrigeren Laserleistungen werden die Peaks der Ripley's H-Funktionen breiter und das Maximum befindet sich bei größeren r -Werten. Maßbalken: 300 nm. Abbildung aus [Burgert et al., 2015] mit Erlaubnis von Springer, leicht modifiziert, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015.

Die Messungen zeigen, dass Aufnahmen von Plasmamembranen besonders anfällig für artifizielle Cluster sind, da hier viele inhomogene und lokal dichte Regionen vorkommen, wie zum Beispiel Membranein- und -ausstülpungen oder Vesikel, die vollgepackt mit Fluorophoren und dicht bei der Membran lokalisiert sind. Es ist somit besonders wichtig, die Photoschaltraten bei diesen *d*STORM-Messungen zu überprüfen. Dies kann zum Beispiel über die sorgfältige Sichtung der unbearbeiteten Filme erfolgen. Sie liefern direkte Informationen über Emitterdichten, Photoschaltraten oder zum Beispiel Drift. Aber auch 3D (*d*)STORM-Messungen [Huang et al., 2008] bzw. 3D hochauflösende Lokalisationstechniken mit verbesserter axiale Auflösung durch die Analyse der Emission über dem kritischen Winkel (engl.: supercritical angle fluorescence) [Deschamps et al., 2014; Bourg et al., 2015], können helfen wirklich vorhandene Cluster von anderen 3D Strukturen zu unterscheiden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, am Deckglas-anhaftende Zellen zu beschallen, wodurch nur noch die basale Membran vorhanden bleibt [Avery et al., 2000]. Dadurch kann sichergestellt werden, dass keine angefärbten Strukturen die im Cytosol vorliegen, fälschlicherweise als Plasmamembrancluster aufgenommen werden.

Ferner zeigen die Ergebnisse, dass die Photoschaltrate durch Erhöhung der Laserleistung verbessert werden kann. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass zum einen die Kameras nicht unendlich schnell sind und zum anderen bei höherer Anregungsleistung die Fluorophore stärker gebleicht werden. Die Laserleistung darf also auch nicht zu hoch gewählt werden. Ob die Fluorophore bleichen, kann ebenfalls in den Rohfilmen überprüft werden. Ist es nicht möglich, die Photoschaltrate ausreichend zu erhöhen, kann auch auf die Auswertesoftware DAOSTORM [Holden et al., 2011] ausgewichen werden. Sie fittet nacheinander mehrere PSFs, zunächst an die hellsten Fluoreszenzpunkte und dann schrittweise an die restlichen Signale. Dies wird mehrmals wiederholt, sodass letztendlich auch sich überlappende PSFs angefittet werden können. Mit dieser Methode können auch Aufnahmen mit einer Emitterdichte von bis zu 10 Molekülen pro μm^2 Artefakte-frei ausgewertet werden. Eine weitere Methode, mit der es möglich ist, dicht markierte Proben aufzulösen, stellt SOFI (engl.: super-resolution optical fluctuation imaging) dar [Dertinger et al., 2009]. SOFI macht sich sämtliche stochastische Emissionsfluktuationen zu Nutze und berechnet durch Autokorrelation ein hochaufgelöstes Bild. SOFI und DAOSTORM erzielen allerdings bei zu hoher Emitterdichte auch eine niedrigere Lokalisationsgenauigkeit.

4.1.3 Artefakte durch die Probenpräparation

Nicht nur die falsche Anwendung der SMLM kann in artifiziellen Clustern resultieren, theoretisch könnte auch schon die Probenpräparation zu einem verfälschten Ergebnis führen. Neben der Fixierung (Kapitel 3.1.4) ist die Färbemethode (Kapitel 2.2.1) ein wichtiger Schritt dabei. Das Anfärben über die Click-Chemie ist eine Methode, die sehr effizient ist und da sich der Farbstoff direkt an dem Zielmolekül befindet, kann sie zu einer verbesserten Auflösung führen. Doch nicht für jedes zu untersuchende Molekül kann die Click-Chemie eingesetzt werden. Zum einen da nicht für jedes Molekül eine klickbare Verbindung vorhanden ist, zum anderen vertragen die Zellen nicht alle modifizierten Moleküle. Die am häufigsten eingesetzte Markierungsstrategie ist die Antikörperfärbung. Es sind mittlerweile eine Vielzahl von Antikörpern gegen die verschiedensten Moleküle vorhanden. Auch bei den folgenden biologischen Projekten kamen hauptsächlich Antikörper zur Verwendung. Manche davon waren dabei direkt mit einem oder mehreren Fluorophoren verbunden, bei anderen musste ein zweiter Farbstoff-markierter Antikörper verwendet werden. Das Problem von Antikörpern ist deren vergleichsweise große Größe und dass sie theoretisch bei nicht richtig fixierten Proben Moleküle oder primäre Antikörper quervernetzen können und somit artifizielle

4 Ergebnisse und Diskussion

Cluster bilden. Um das zu überprüfen, wurden U2OS-Zellen zunächst mit Azid-modifizierter Galaktose (GalNaz) gefüttert, über die Click-Chemie mit Al647 angefärbt und mit Formaldehyd fixiert. Letschert et al. veröffentlichten Ergebnisse, die zeigen, dass Glykane homogen in der Plasmamembran verteilt sind [Letschert et al., 2014].

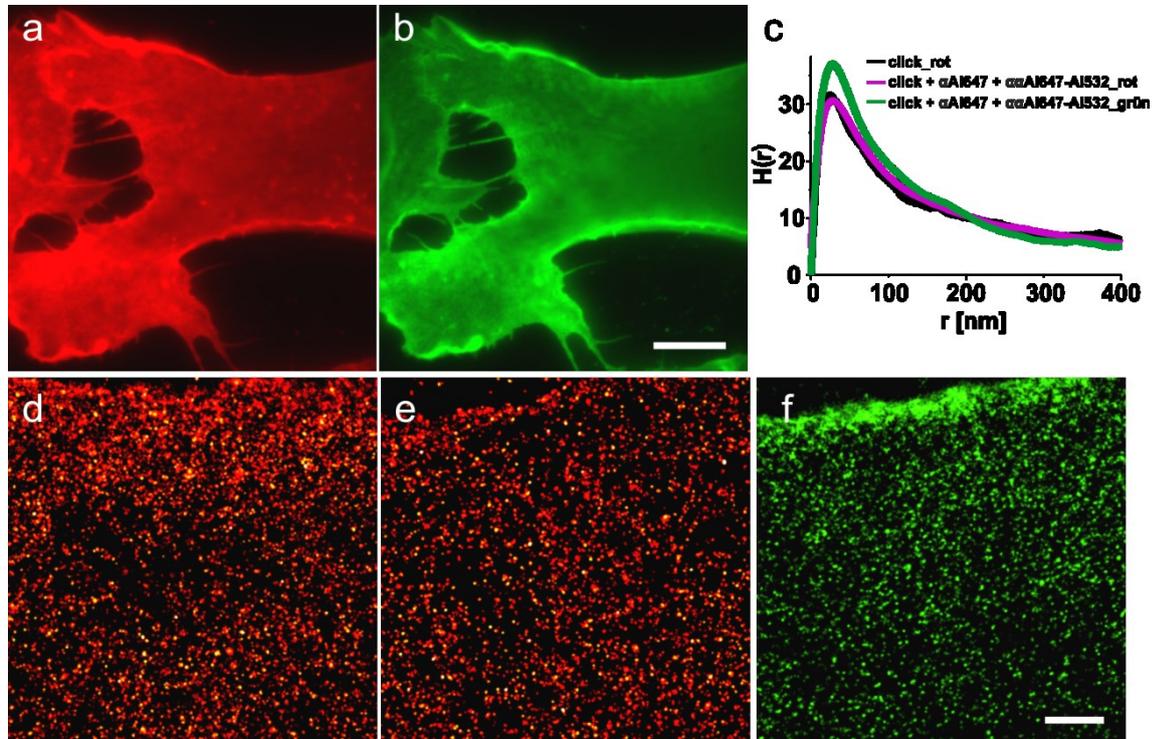


Abbildung 14: Antikörper erzeugen nicht generell Cluster auf der Plasmamembran. U2OS-Zellen wurden mit 25 μM GalNaz inkubiert und nach 2 Tagen über die kupferkatalysierte Click-Chemie mit Al647 angefärbt (click) (d). Ein Teil der Zellen wurde direkt mit *d*STORM gemessen, die anderen wurden noch mit einem Antikörper gegen Al647 (click+ α Al647) und einem Al532 markierten Antikörper, der an den ersten bindet, gefärbt (click+ α Al647+ α Al647-AI532) (a, b, e, f). Bei diesen wurde das Signal von Al647 (rot) und das Signal von Al532 (grün) mit *d*STORM hochaufgelöst (e bzw. f) oder eine Weitfeld-Fluoreszenzaufnahme erzeugt (a bzw. b). Die Lokalisationen aus den *d*STORM-Messungen wurden mit der Ripley-basierten Clusteranalyse untersucht. Alle Ripley's H-Funktionen haben ein Maximum bei $r \sim 28$ nm, was der wiederholten Lokalisierung einzelner Fluorophore entspricht. Maßbalken: 10 μm (a,b) und 8 μm (d-f).

Dies zeigen auch die hier erhaltenen *d*STORM-Aufnahmen und die Clusteranalyse (Abbildung 14d bzw. Abbildung 14c). Es waren keine Cluster auf der Plasmamembran zu erkennen und das Maximum der Ripley's H-Funktion lag bei $r \sim 28$ nm, was der wiederholten Lokalisierung einzelner Fluorophore entspricht. Danach wurden die geklickten und mit Formaldehyd fixierten Zellen mit einem Al647-bindenden IgG-Antikörper inkubiert. Bei einem Teil der Zellen wurden anschließend noch die primären Antikörper mit einem zweiten Al532-markierten IgG-Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden zur Nachfixierung abschließend mit Formaldehyd und Glutaraldehyd behandelt. Bei unvollständiger Fixierung der Moleküle oder Quervernetzung der Antikörper hätten

nun Cluster auf der Plasmamembran erkennbar sein sollen. Es waren jedoch keinerlei Cluster auf den *d*STORM-Aufnahmen der Antikörper behandelten Zellen sichtbar, egal ob das Signal von A1647 (Click-Chemie) oder das von A1532 (sekundärer Antikörper) detektiert wurde (Abbildung 14e und Abbildung 14f). Auch von diesen Aufnahmen wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Die Ripley's H-Funktionen zeigten den gleichen Verlauf wie die der Zellen ohne Antikörper, sodass eine artifizielle Cluster-Bildung der Moleküle durch die Antikörperinkubation ausgeschlossen werden kann.

Die Ergebnisse zeigen, dass Antikörper nicht generell Cluster generieren. Es ist dadurch jedoch nicht sichergestellt, dass sämtlich Antikörper keine artifiziellen Cluster bilden. Auch werden verschiedene Plasmamembran-assoziierte Moleküle unterschiedlich gut fixiert [Tanaka et al., 2010]. Besonders schwierig gestaltet sich hierbei die effiziente Fixierung von Lipiden, wodurch die Gefahr der Bildung von artifiziellen Clustern hoch ist. Bei einem der nachfolgenden biologischen Projekte sollten Ceramide, eine Untergruppe der Sphingolipide, mit Antikörper angefärbt und quantifiziert werden. Es sind zwei IgM-Antikörper, die an Ceramide binden, kommerziell erhältlich [Cowart et al., 2002]. Es wurden fixierte HBME-Zellen mit einem der beiden Antikörper und einem A1647-markierten sekundären IgM-Antikörper angefärbt und mit *d*STORM aufgenommen. Das Problem von IgM-Antikörper ist, dass sie mit ~ 1000 kDA sehr groß sind, wodurch die Auflösung bei *d*STORM-Messungen verringert wird. Außerdem war das Signal bei den Aufnahmen sehr gering und die Photoschaltrate schlecht (Abbildung 15). Die kommerziell erhältlichen IgM-Antikörper sind daher nicht geeignet um die Verteilung der Ceramide auf der Plasmamembran zu untersuchen.

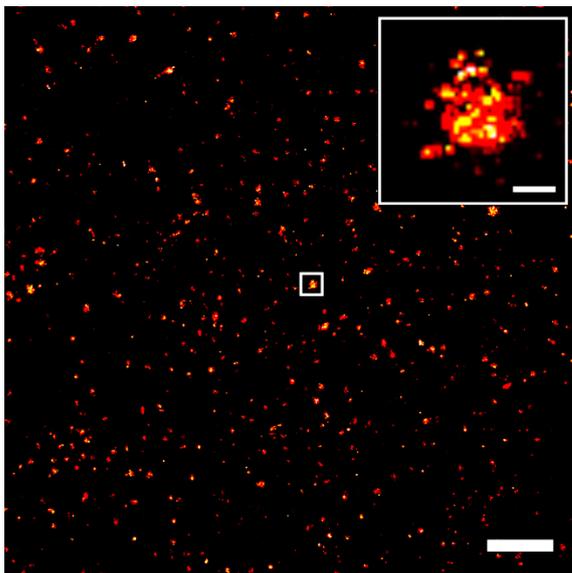


Abbildung 15: IgM-Antikörper sind durch ihre Größe nicht geeignet, um die Verteilung von Ceramiden auf der Plasmamembran zu untersuchen. HBME-Zellen wurden fixiert und mit einem Ceramid-bindenden IgM-Antikörper und einem sekundären A1647 markierten IgM-Antikörper gefärbt. Die Fluorophore zeigen eine schlechte Photoschaltrate und eine geringe Anzahl von Photonen in *d*STORM-Messungen auf. Die Lokalisationen sind in großen Clustern (≥ 100 nm) lokalisiert. Maßbalken: 2 μ m und 100 nm (Vergrößerung).

4 Ergebnisse und Diskussion

Bieberich und Kollegen gelang es 2007 IgG-Antikörper, die spezifisch Ceramide mit unterschiedlichen Kettenlängen erkennen, zu synthetisieren [Krishnamurthy et al., 2007]. IgG-Antikörper sind im Vergleich zu IgM-Antikörper mit ~ 150 kDA deutlich kleiner und somit besser geeignet, um mit Hilfe von *d*STORM-Messungen die Verteilung von Ceramiden auf der Plasmamembran zu untersuchen. Es wurden zunächst fixierte HBME-Zellen mit einer anti-Ceramid-Antikörper-Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ inkubiert und mit einem Al647-markierten IgG-Antikörper gefärbt. Bei *d*STORM-Messungen zeigten die Fluorophore eine ausreichende Photoschaltrate und eine Photonenzahl von 1400 pro Schaltzyklus. Auf den rekonstruierten *d*STORM-Aufnahmen waren kleine Cluster auf der Plasmamembran sichtbar (Abbildung 16b). Diese wurden mit der Ripley's H-Funktion-basierten Clusteranalyse quantifiziert. Das Maximum der Ripley's H-Funktion lag dabei bei ~ 70 nm (Abbildung 17b). Eine darauf folgende morphologische Clusteranalyse ergab einen Median-Durchmesser von 72 ± 8 nm (\pm MAD) und 22851 ± 1160 Lokalisationen pro μm^2 in den Clustern (Abbildung 17c und Abbildung 17d).

Um zu überprüfen ob die Fixierungsreagenzien die Plasmamembran zerstören und sie dadurch die Ceramidverteilung verändern, wurden auch Lebendfärbungen durchgeführt. Dafür wurden U2OS-Zellen auf Eis lebend mit dem anti-Ceramid IgG-Antikörper und einem zweiten Farbstoff-markierten Antikörper gefärbt. Dadurch, dass die Zellen auf Eis präpariert wurden, wurden Endo- und Exozytoseprozesse unterdrückt [Rode et al., 1997]. Die Zellen wurden dann entweder direkt lebend mit dem LSM aufgenommen oder zunächst mit 4% FA oder 0,3% GA nachfixiert. Zwar kann keine genaue Aussage über die Größe der Ceramid-reichen Plattformen (CRPs) mit dem LSM getroffen werden, jedoch über die ungefähre Verteilung. Es ist deutlich zu erkennen, dass keine Unterschiede zwischen der Ceramid-Verteilung auf der Plasmamembran von lebenden, nur nachfixierten und vor- und nachfixierten Zellen vorhanden sind (Abbildung 16a). Da der benötigte Schaltpuffer für *d*STORM-Messungen nicht Lebendzell-kompatibel ist, wurden die Ceramide nur auf GA nachfixierten Zellen auch hochaufgelöst. Diese Aufnahmen zeigen keine Unterschiede in der Größe der CRPs zwischen nur nachfixierten und vor- und nachfixierten Zellen (Abbildung 16b). Die hier durchgeführten Versuche beweisen, dass die Fixierung die Ceramidverteilung nicht verändert. Dies deckt sich auch mit den Versuchen von Frisz et al. [Frisz et al., 2013]. Sie verwendeten Ceramid-BODIPY und verglichen deren Verteilung bei lebenden und

nachfixierten Zellen mittels Elektronenmikroskopie. Hierbei konnten sie auch keine Unterschiede feststellen.

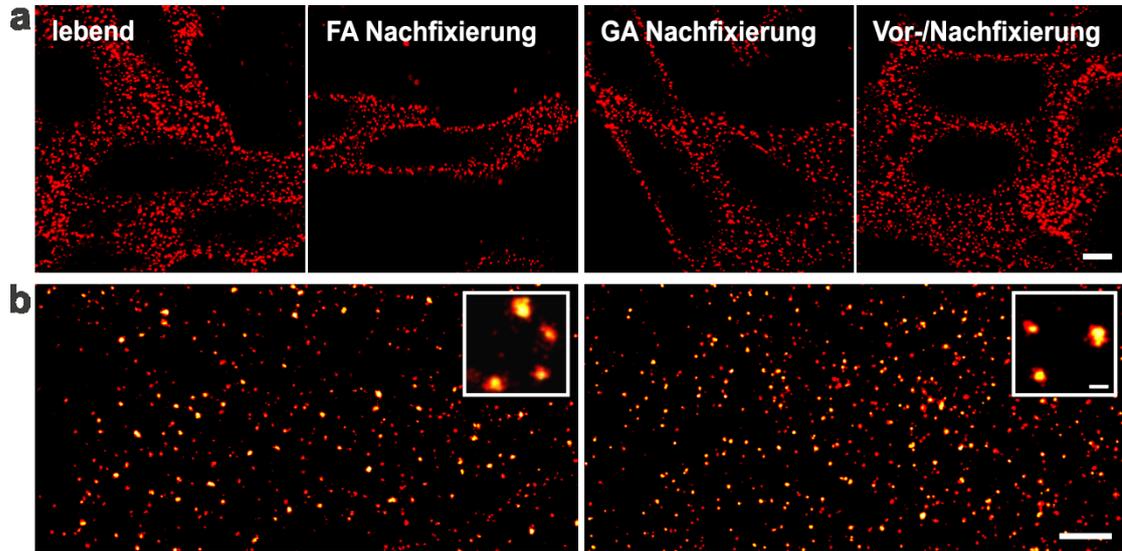


Abbildung 16: Die Fixierung verändert die Ceramidverteilung nicht. Lebende U2OS-Zellen wurden auf Eis mit dem IgG-Antikörper gegen C16/24 Ceramide und einem Al647-markierten sekundären Antikörper gefärbt. (a) Vier verschiedene Fixierungsansätze wurden mit dem LSM aufgenommen: keine Fixierung, FA oder GA Nachfixierung nach Lebendfärbung und Vor- und Nachfixierung. (b) *d*STORM-Aufnahmen der lebend gefärbten + GA nachfixierten Zellen und der vor- und nachfixierten Zellen. Es sind keine Veränderungen der Größe und Verteilung der CRPs durch die Fixierung zu erkennen. Maßbalken: 10 μm (a), 1 μm (b) und 100 nm (Inset).

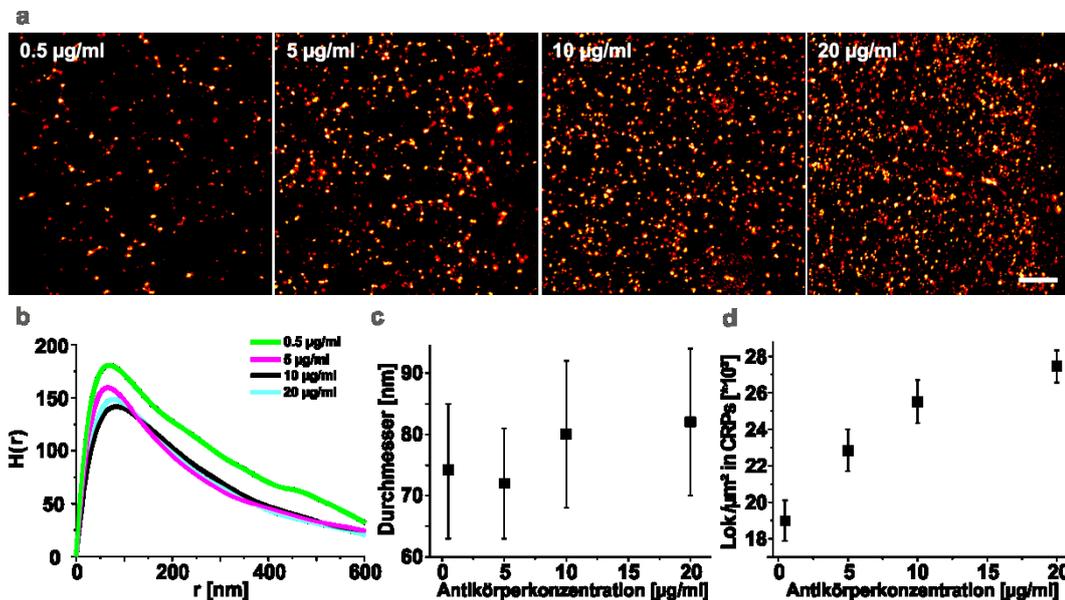


Abbildung 17: Ceramide sind in ~ 75 nm großen Plattformen auf der Plasmamembran verteilt. Fixierte HBME-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an anti-Ceramid Antikörper (20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ und 0,5 $\mu\text{g/ml}$) und einer festen sekundären Antikörperkonzentration (10 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt. (a) Bei allen Antikörperkonzentrationen sind CRPs auf den *d*STORM-Aufnahmen der Plasmamembran zu erkennen. (b) Alle Ripley's H-Funktionen zeigen ein Clustermaximum bei $r \sim 70$ nm. (c) Die Quantifizierung der CRP-Durchmesser ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen. (d) Die Anzahl der Lokalisationen pro μm^2 innerhalb der CRPs nimmt hingegen mit steigender Antikörperkonzentration zu. Maßbalken: 1 μm .

4 Ergebnisse und Diskussion

Um nun noch auszuschließen, dass die Cluster nicht nur durch mehrfache Lokalisierung der blinkenden Fluorophore entstehen, wurde eine Titrationsreihe der anti-Ceramid-Antikörper durchgeführt (Abbildung 17). Dabei sollte bei einer eigentlich homogenen Verteilung der Moleküle die relative Fläche, die die "Cluster" einnehmen mit steigender Antikörperkonzentration stetig zunehmen, während die Anzahl der Lokalisationen innerhalb der "Cluster" konstant bleibt. Im Gegensatz dazu sollte bei wirklich vorhandenen Molekülclustern die relative Fläche gleich bleiben, während die Anzahl der Lokalisationen mit steigender Antikörperkonzentration zunimmt [Baumgart et al., 2016]. Die Ergebnisse, die mit der Titrationsreihe des anti-Ceramid IgG-Antikörpers erhalten wurden, zeigen, dass die hier aufgenommenen Cluster wirklich vorhandene Cluster sind. Während der Durchmesser der Cluster mit steigender Antikörperkonzentration gleich bleibt, nimmt die Anzahl der Lokalisationen in diesen CRPs zu.

4.2 Quantifizierung von Plasmamembran-Ceramiden

4.2.1 Plasmamembran-Ceramide in Eukaryoten

Ceramide sind wichtige Signalmoleküle, die in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie z.B. Differenzierung, Proliferation, Stoffwechselaktivität, aber auch Wachstumsstillstand, Apoptose und Entzündungen, beteiligt sind [Hannun & Obeid, 2002; Gulbins & Li, 2006; Simons & Ikonen, 1997; Babiychuk et al., 2008; Stancevic & Kolesnick, 2010; van Blitterswijk et al., 2003; Bollinger et al., 2005; Grassme et al., 2002; Beyersdorf & Muller, 2015; Apostolidis et al., 2016; Holopainen et al., 1998]. Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Internalisierung von Pathogenen [Grassmé et al., 1997; Hauck et al., 2000; Grassme et al., 2003b; Grassme et al., 2005; Avota et al., 2011; Simonis et al., 2014; Faulstich et al., 2015]. Ceramide werden zum einen *de novo* im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Zum anderen katalysieren Sphingomyelinasen (SMasen) in der Plasmamembran die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramiden [Hannun & Obeid, 2002; Gulbins & Li, 2006]. Es wurde mittlerweile eine Reihe von Stimuli gefunden, die zur Aktivierung der SMasen führen. Dazu zählen die Aktivierung von CD95 [Grassme et al., 2003a], CD40 [Grassme et al., 2002] oder FcγRII [Abdel Shakor et al., 2004], Infektionen mit verschiedenen Pathogenen [Grassme et al., 2003b], Chemotherapeutika oder anderer zellulärer Stress [Charruyer et al., 2005]. Steigt die Konzentration an Ceramiden in der Plasmamembran an, kondensieren diese zu Ceramid-reichen Plattformen (CRPs) [Stancevic & Kolesnick, 2010], die die Akkumulation diverser Rezeptoren und die Vesikelformation und -fusion erleichtern. Obwohl Ceramide eine solch wichtige Rolle bei verschiedensten zellulären Prozessen spielen und auch bei Krankheiten beteiligt sind, ist deren molekulare Organisation in der Plasmamembran noch nicht endgültig entschlüsselt. Zwar wurden eine Reihe von Ergebnissen von mikroskopischen Aufnahmen von Fluoreszenz-markierten Ceramiden veröffentlicht, diese wurden jedoch mit Fluorophoren wie NBD oder BODIPY durchgeführt, die zu verfälschten Ergebnissen führen können [Kuerschner et al., 2005; Mukherjee et al., 2004; Shaw et al., 2006]. Außerdem wurden für die Aufnahmen Standard-Fluoreszenzmikroskop-Techniken verwendet, die nicht die benötigte Auflösung erreichen, um Nanodomänen mit einer Größe < 200 nm abzubilden, geschweige denn Aussagen über die Anzahl der Moleküle in diesen zu treffen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Aus diesem Grund wurden verschiedene, fixierte Zelllinien mit einem anti-Ceramid Antikörper, der C16:0 bis C24:1 Ceramide erkennt (C16/24-Antikörper) [Krishnamurthy et al., 2007] und einem Al647-markierten sekundären Antikörper gefärbt und deren Plasmamembran mit *d*STORM visualisiert (Abbildung 18). Die *d*STORM-Aufnahmen der U2OS-, Jurkat-, HBME- und primären T-Zellen zeigen eine klare nicht zufällige Verteilung der Ceramide in der basalen und apikalen Plasmamembran aller Zelllinien.

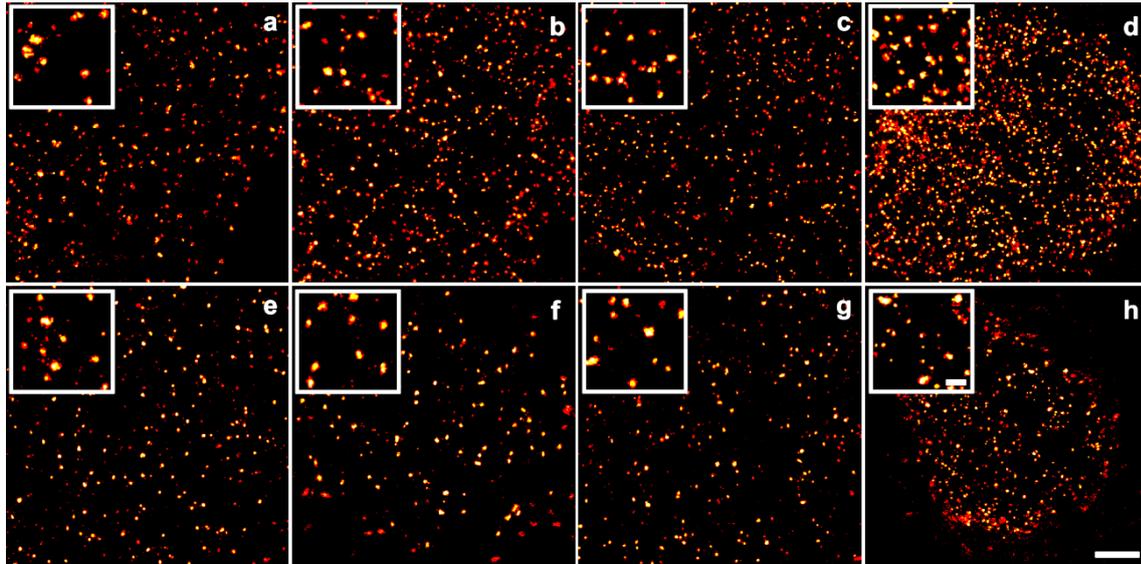


Abbildung 18: Ceramide sind in CRPs in der Plasmamembran organisiert. U2OS- (a, e), Jurkat- (b, f), HBME- (c, g) und primäre T- (d, h) Zellen wurden fixiert und mit IgG-Antikörper gegen C16/24 Ceramide und einem Al647-markierten sekundären Antikörper gefärbt. *d*STORM-Aufnahmen der basalen (a-d) und apikalen (e-h) Plasmamembran zeigen eine nicht-zufällige Verteilung der Ceramide bei allen Zelllinien. Die **Insets** sind Vergrößerungen aus den jeweiligen Aufnahmen. Maßbalken: 1 μm (a-h) und 200 nm (**Insets**).

Bevor die Lipide quantifiziert wurden, wurden die *d*STORM-Aufnahmen auf Artefakte untersucht (Kapitel 4.1). Da die PSFs einzelner Fluorophore nicht in den *d*STORM-Aufnahmen überlappten, konnten artifizielle Cluster ausgeschlossen werden. Eine folgende Ripley's H-Funktion-basierte Clusteranalyse zeigte eine inhomogene Verteilung der Ceramide, wobei das Clustermaximum von allen Zelllinien und der basalen, sowie apikalen Plasmamembran bei ~ 70 nm lag (Abbildung 19).

4.2 Quantifizierung von Plasmamembran-Ceramiden

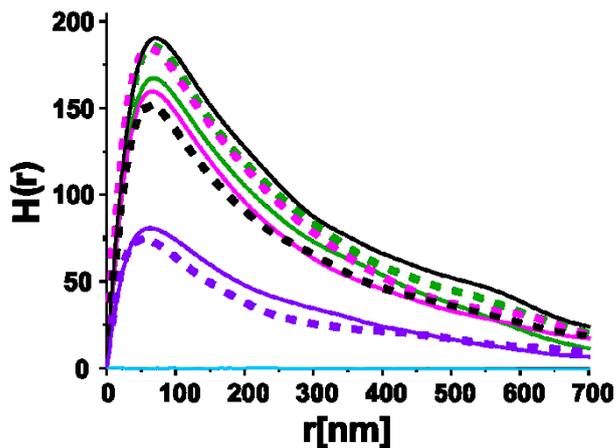


Abbildung 19: Die Ceramide sind nicht zufällig in der Plasmamembran verteilt. Jurkat- (schwarz), U2OS- (magenta), HBME- (grün) und T- (lila) Zellen wurden mit Antikörper gegen C16/24 Ceramide gefärbt und mit *d*STORM visualisiert. Die Verteilung der Lokalisationen wurde mit einer Ripley's H-Funktion analysiert und mit einer simulierten zufälligen Verteilung (Monte Carlo Methode) verglichen (blau). Die Daten aller Zelllinien und der basalen (durchgezogene Linie) sowie der apikalen (gestrichelte Linie) zeigen eine nicht zufällige Verteilung der Lokalisationen mit einem Clustermaximum bei $r \sim 70$ nm.

Eine darauf basierende morphologische Clusteranalyse (Kapitel 3.2.7) ergab einen Median-Durchmesser der CRPs von mindestens 72 ± 8 nm (\pm MAD) und höchstens 78 ± 11 (\pm MAD) nm in den basalen und apikalen Plasmamembranen aller Zelllinien (Tabelle 6). Die Lokalisationspräzision betrug dabei $11,4 \pm 0,2$ nm (Abbildung 20a).

Tabelle 6: Quantifizierung der Plasmamembran-Ceramide. Die Daten wurden aus *d*STORM-Messungen der basalen und apikalen Plasmamembran verschiedener Zelllinien, die mit anti-C16/24 Antikörper gefärbt wurden, abgeleitet. Die Durchmesser [nm] und die Lokalisationen (Lok.) pro CRP sind Ergebnisse aus einer morphologischen Clusteranalyse, die auf den Ergebnissen der Ripley's H-Funktion basieren. Die Anzahl der Ceramide (Cer) wurden berechnet, indem die Anzahl der Lokalisationen durch den Faktor 5.4 geteilt wurden. Die Durchmesser, Lok./CRP und Cer/CRP sind als Median \pm MAD angegeben und die CRPs/ μm^2 , Lok./ μm^2 und Cer/ μm^2 als Mittelwert \pm s.e.m.

Zelllinie	Durchmesser	Lok./CRP	Cer/CRP	CRPs/ μm^2	Lok./ μm^2	Cer/ μm^2
U2OS, basal	72 ± 8	92 ± 28	17 ± 5	2.5 ± 0.2	433 ± 39	80 ± 7
U2OS, apikal	74 ± 9	121 ± 42	22 ± 8	2.2 ± 0.2	472 ± 40	87 ± 7
Jurkat, basal	76 ± 10	97 ± 33	18 ± 6	3.5 ± 0.5	1048 ± 88	194 ± 16
Jurkat, apikal	78 ± 11	112 ± 43	21 ± 8	3.7 ± 0.5	749 ± 106	139 ± 20
HBME, basal	72 ± 8	85 ± 26	16 ± 5	1.7 ± 0.2	259 ± 21	48 ± 4
HBME, apikal	74 ± 9	93 ± 29	17 ± 5	1.9 ± 0.2	334 ± 35	62 ± 6
T-Zellen, basal	76 ± 7	93 ± 28	17 ± 5	3.9 ± 0.7	1699 ± 164	315 ± 30
T-Zellen, apikal	74 ± 8	89 ± 26	16 ± 5	2.3 ± 0.5	1022 ± 80	189 ± 15

4 Ergebnisse und Diskussion

Je nach Zelllinie und Plasmamembran-Seite konnten 1,7 – 3,9 CRPs pro μm^2 ausgemacht werden. Neben der Größe der CRPs konnte auch die Anzahl der Lokalisationen in den CRPs bestimmt werden. Sie betrug je nach Zelllinie zwischen 85 und 121 Lokalisationen pro CRP. Indem einzelne, gut separierte Komplexe aus primäre/Al647-markierte Antikörper neben den Zellen aufgenommen und deren Lokalisationen mit unterschiedlichen Radien zusammengefasst wurden (Kapitel 3.2.6), konnte ein Umrechnungsfaktor von Lokalisationen in Ceramid-Moleküle von 5.4 bestimmt werden (Abbildung 20b). Es befinden sich demnach 16-22 C16/24-Ceramide in einem CRP. Diese Anzahl von Ceramid-Molekülen pro CRP ist sehr wahrscheinlich etwas geringer als die, die wirklich vorhanden ist. Ein IgG-Antikörper hat eine Größe von ~ 10 nm, dadurch sind sterische Abschirmungseffekte um die Ceramide vorstellbar.

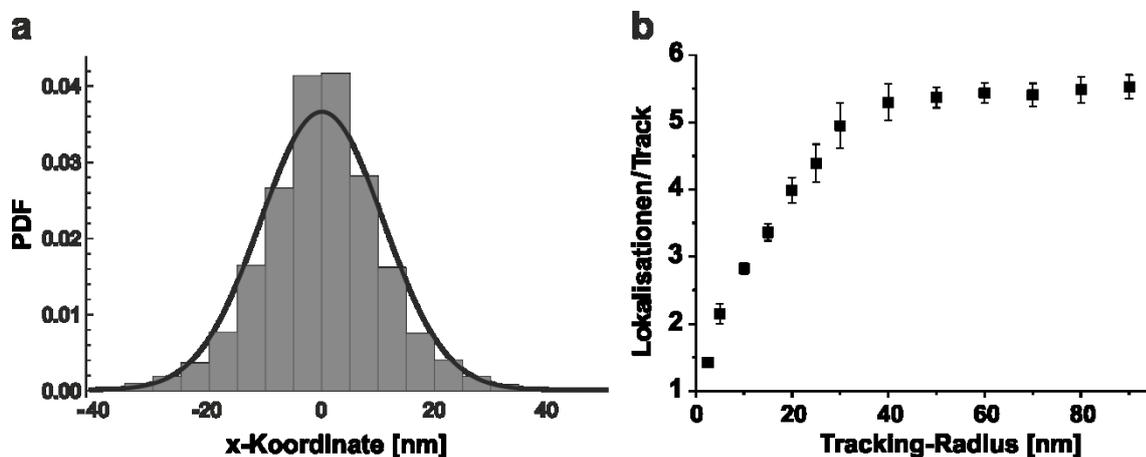


Abbildung 20: (a) Ermittlung der Lokalisationspräzision. Räumlich gut separierte fluoreszierende “Punkte“ neben den Zellen, die mit anti-C16/24 Antikörper gefärbt wurden, wurden mit *d*STORM visualisiert. Die Koordinaten der Lokalisationen, die zu einem isolierten fluoreszierenden “Punktes“ gehörten, wurden an ihrem Massenmittelpunkt ausgerichtet. Die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (engl. Probability density functions; PDF) wurde generiert und daraus eine Lokalisationspräzision von $11,4 \pm 0,2$ nm (\pm s.e.m., 4 unabhängige Messungen) bestimmt. (b) Ermittlung der Anzahl von Lokalisationen pro Ceramid-Antikörper. Al647-markierte Antikörper, die an anti-C16/24 Antikörper gebunden haben, wurden mit *d*STORM im TIR-Modus auf der Glasoberfläche gemessen. Gut separierte fluoreszierende “Punkte“ wurden über unterschiedliche Radien (Tracking-Radius) zusammengefasst und die Anzahl der Lokalisationen pro Track über den Tracking-Radius aufgetragen. Die Funktion saturiert bei einem Wert von $5,4 \pm 0,2$ Lokalisationen pro Track (Median \pm MAD, 4 unabhängige Messungen).

Da jedoch ein CRP eine Fläche von $4,42 \times 10^{-15}$ m² (Durchmesser ~ 75 nm) einnimmt, könnte theoretisch ein CRP 56 IgG-Antikörper beinhalten, unter der Voraussetzung, dass ein Antikörper eine Fläche von $7,85 \times 10^{-17}$ m² benötigt. Da jedoch die Abschätzung der Anzahl der C16/24-Ceramide selbst bei saturierten Antikörperkonzentrationen (~ 24 Ceramid-Moleküle pro CRP, Abbildung 17) deutlich

4.2 Quantifizierung von Plasmamembran-Ceramiden

unter diesem Wert liegt, kann davon ausgegangen werden, dass sterische Hinderungen und Abschirmung der Ceramide durch die Antikörper keine große Rolle spielt.

Wie oben beschrieben, können Ceramide durch die Aktivierung von SMase synthetisiert werden. Es wurden deshalb HBME-Zellen vor der Färbung mit exogener *Bacillus cereus* SMase (bSMase) inkubiert und die Veränderung auf die Ceramidverteilung in der Plasmamembran untersucht. Durchflusszytometrie-Messungen, die von den Kooperationspartnern aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Mikrobiologie durchgeführt wurden, zeigen, dass die Zellen die höchste Ceramidkonzentration bei einer Inkubation von 150 mU bSMase und einer 40-minütigen Inkubation aufzeigen. Diese Konzentration und Inkubationszeit wurde dann verwendet, um die Zellen mit dSTORM zu visualisieren (Abbildung 21 a/b). Die Auswertung der dSTORM-Daten ergab, dass die Anzahl der Ceramide von 259 ± 21 (\pm s.e.m.) auf 967 ± 55 (\pm s.e.m.) Lokalisationen pro μm^2 anstieg (Abbildung 21d). Gleichzeitig stieg die Anzahl der CRPs pro μm^2 von 1.8 ± 0.3 auf 3.6 ± 0.7 pro μm^2 . Außerdem wurden mehr CRPs mit größerem Durchmesser (Abbildung 21e) und höhere Dichte an Ceramiden (Abbildung 21f) bei bSMase inkubierten Zellen gemessen.

Eine Folge der Erhöhung der Ceramidkonzentration und Anzahl der CRPs nach bSMase-Inkubation, könnte zu einer Veränderung der Löslichkeit von Membrankomponenten führen, was wiederum eine Akkumulation bestimmter Rezeptoren oder eine Kompartimentierung bestimmter Proteine erleichtern könnte. Die Anhäufung der Ceramide in den CRPs könnte ebenfalls die lokale Interaktion mit anderen Membranmolekülen erleichtern und dadurch möglicherweise die Reaktivität von Rezeptoren verändern.

Mit den hier durchgeführten dSTORM-Messungen konnte erstmals eine Aussage darüber getroffen werden, wieviel Ceramide sich in einem CRP ungefähr befinden und wie sich diese bei SMase-Inkubation verändern. Da der Durchmesser der CRPs ~ 75 nm beträgt und sich somit weit unter der Auflösungsgrenze befindet, ist es nicht möglich sie mit konventionellen Fluoreszenzmikroskopen aufzulösen.

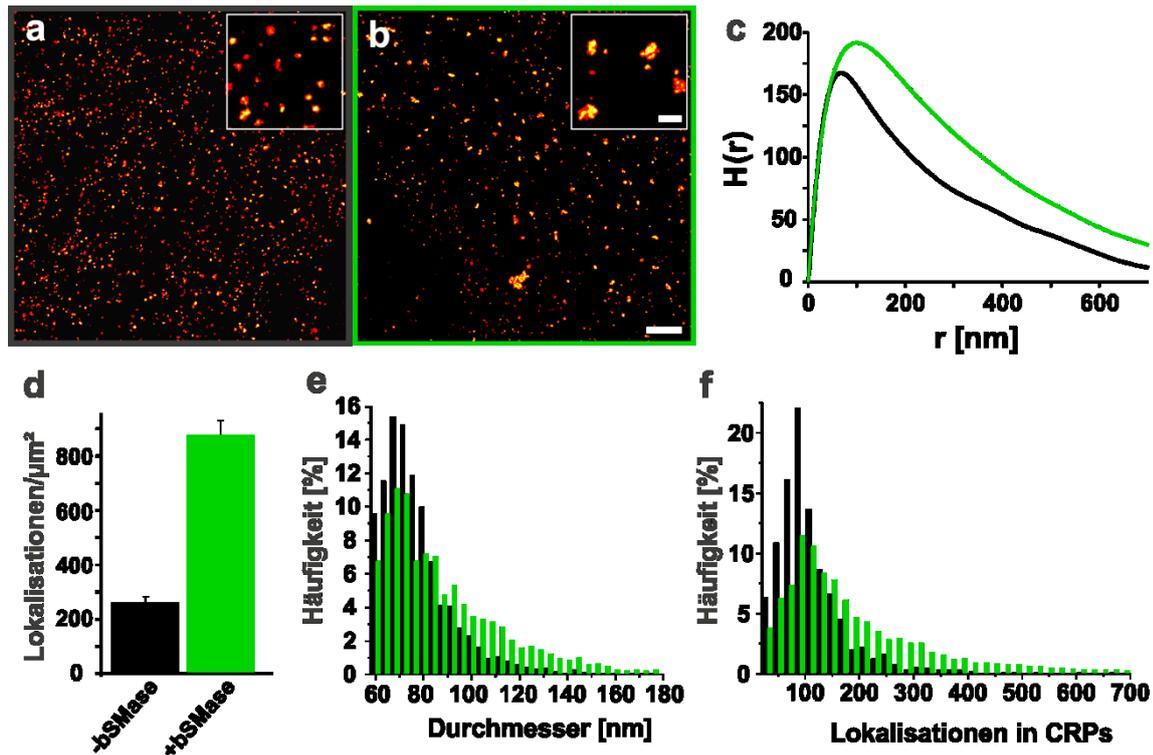


Abbildung 21: Die Behandlung von HBME-Zellen mit bSMase resultiert in einem Anstieg der Ceramidkonzentration und in einer Vergrößerung der CRPs. C16/24 Ceramide auf der Plasmamembran von unbehandelten (a) und bSMase (150 μM , 40 min) behandelten (b) HBME-Zellen wurden über indirekte Immunhistochemie mit einem IgG-Antikörper und Al647 angefärbt. dSTORM-Aufnahmen der bSMase behandelten Zellen machen größere CRPs auf der Plasmamembran, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, sichtbar. Die **Insets** in (a) und (b) sind vergrößerte Regionen der entsprechenden dSTORM-Aufnahmen. Die Ripley's H-Funktion (c) weisen auf eine nicht-zufällige Verteilung der Ceramide hin. Das Maximum der Funktion von unbehandelten Zellen (schwarz) liegt bei $r = 69 \pm 1$ nm (Mittelwert \pm s.e.m. von 44 Regionen ($2 \times 2 \mu\text{m}$) von 11 Zellen), das von behandelten Zellen (grün) bei 105 ± 5 nm (113 Regionen von 18 Zellen). (d) Die unbehandelten Zellen haben weniger Lokalisation pro μm^2 (259 ± 21) als die mit bSMase behandelten Zellen (867 ± 55), werden alle Lokalisationen inner- und außerhalb von CRPs berücksichtigt. Es sind außerdem mehr größere CRPs (e) und mehr CRPs mit größerer Anzahl an Lokalisationen (f) bei den bSMase behandelten Zellen vorhanden. Es wurden 3543 CRPs von unbehandelten und 9379 CRPs von behandelten Zellen analysiert. Maßbalken: $1 \mu\text{m}$ (a,b) und 200 nm (Insets).

4.2.2 Colokalisierung von Plasmamembran-Ceramiden mit anderen Molekülen

Über die Affinität von Proteinen oder anderen Sphingolipiden zu den CRPs, sind bisher nur sehr wenige Studien veröffentlicht worden [Grassme et al., 2001; Grassme et al., 2002; Chiantia et al., 2008; Simonis et al., 2014]. Chiantia et al. fanden kürzlich mittels Messungen mit Rasterkraftmikroskopie, LSM und Scanning-FCS heraus, dass Cholera-Toxin B (CTxB) mit CRPs in synthetischen Membranen colokalisiert [Chiantia et al., 2008]. CTxB wird oft als "lipid raft"-Marker verwendet [Nichols, 2003; Avota et al., 2004]. Es bindet an GM1-Ganglioside, die aus einem extrazellulären Oligosaccharid und einem Ceramid, das das Lipid in der Membran verankert, besteht. Die Existenz

4.2 Quantifizierung von Plasmamembran-Ceramiden

bzw. die Zusammensetzung von sogenannten "lipid rafts" wird in der Literatur kontrovers diskutiert [Anderson & Jacobson, 2002; Edidin, 2001; Heerklotz, 2002]. Dabei werden lipid rafts oft als Bereiche in der Plasmamembran definiert, die sich durch ihre Lipidzusammensetzung lokal von ihrer Umgebung unterscheiden [Simons & Ikonen, 1997]. Meistens basiert der Nachweis von lipid rafts auf der Behandlung der Zellen mit Detergenzien [Kenworthy et al., 2000]. Die Ergebnisse aus diesen Studien weisen auch darauf hin, dass sie besonders reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind. Andererseits konnte auch schon nachgewiesen, dass in Ceramid-Plattformen kein Cholesterol vorhanden ist [Cremesti et al., 2002; Castro et al., 2009].

Um zu überprüfen, ob die CRPs mit GM1 auch in Plasmamembranen von Zellen colokalisieren, wurden Jurkat-Zellen mit CTxB-A1488 und dem anti-C18-Ceramid IgG-Antikörper mit zusätzlich einem sekundären A1647-markierten Antikörper, angefärbt. Die Zellen wurden mit *d*STORM aufgenommen und die Daten auf Cluster und Colokalisierung der Lokalisationen beider Fluorophore mit Hilfe der Auswertesoftware LAMA (Kapitel 3.2.7) überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch GM1 in ~ 70 nm großen Cluster vorliegen (Abbildung 22). Außerdem colokalisieren viele Lokalisation von CTxB mit denen von den Ceramiden und umgekehrt (Abbildung 22). Es gibt jedoch auch viele Lokalisationen, die nicht colokalisieren, eine Antikorrelation konnte jedoch nicht festgestellt werden. Bei der Quantifizierung wurde auch festgestellt, dass die CRPs bei gleichzeitiger Färbung mit CTxB größer werden, als wenn sie nur alleine angefärbt werden. CTxB ist ein Homo-Pentamer, das bis zu 5 GM1 Moleküle gleichzeitig binden kann [Zhang et al., 1995]. Durch seine Größe, seine vielen Bindungsstellen und dadurch dass bei der CtxB-Färbung ein zusätzlicher CTxB-vernetzender Antikörper verwendet wird, könnte es sein, dass auch die Ceramide vernetzt werden und die CRPs künstlich vergrößert werden. CTxB ist somit kein geeigneter Marker, besonders wenn quantifiziert werden soll.

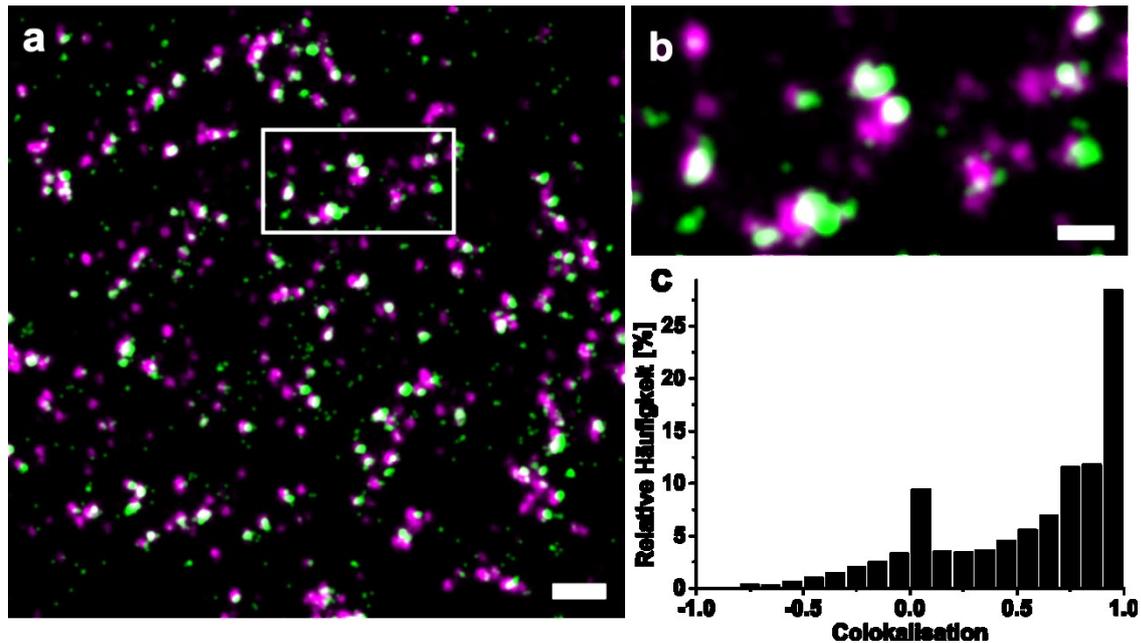


Abbildung 22: Die meisten Ceramide und GM1-Ganglioside auf der Plasmamembran colokalalisieren. GM1-Ganglioside auf der Plasmamembran von fixierten Jurkat-Zellen wurden über A1488-markiertes Cholera-toxin B angefärbt. In einem zweiten Schritt wurden C18 Ceramide über indirekte Immunhistochemie über einen IgG-Antikörper und A1647 markiert. Abbildung (a) zeigt beispielhaft eine dSTORM-Aufnahme. GM1-Ganglioside sind in grün, C18 Ceramide in magenta dargestellt, weiß zeigt die Stellen an, wo grün und magenta überlappen. (b) ist eine Vergrößerung der umrandeten Region in (a). (c) zeigt die CBC-Werte der in (a) dargestellten Zelle. Die meisten Lokalisationen der GM1-Ganglioside colokalalisieren mit den Lokalisationen der Ceramide. Maßbalken: 500 nm (a) und 200 nm (b).

Verschieden Studien mit konventionellen oder Elektronenmikroskopen zeigten, dass auch Glykosylphosphatidylinositol (GPI) - verankerte Proteine in Domänen mit Cholesterol und Sphingolipiden clustern [Anderson, 1998; Raghupathy et al., 2015]. Chiantia et al. untersuchen ob diese auch in den CRPs vorkommen [Chiantia et al., 2008]. Sie konnten eine Clusterung einer GPI-verankerten alkalischen Phosphatase in den CRPs von synthetischen Membranen nachweisen. Vor kurzem veröffentlichte Ergebnisse aus hochaufgelösten Fluoreszenzmikroskop-Messungen deuten im Gegensatz darauf hin, dass GPI-verankerte Proteine homogen in der Plasmamembran verteilt sind und nicht clustern [Baumgart et al., 2016]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden U2OS-Zellen transient mit GPI-mEOS3.2 transfiziert, fixiert und mittels PALM hochaufgelöst. Es wurde zunächst die Verteilung der Lokalisationen mit einer Ripley's H-basierten Clusteranalyse untersucht. Im Vergleich zu der Analyse der Ceramide, war das Maximum der Funktion deutlich weiter zu kleinerem r (~ 42 nm) verschoben (Abbildung 23c). Die morphologische Clusteranalyse zeigte, dass die Cluster einen Durchmesser von ~ 46 nm haben und sich durchschnittlich ~ 28 Lokalisationen in einem Cluster befinden. Nur 3% der Lokalisationen liegen jedoch in diesen Clustern vor, die meisten sind homogen in der Membran verteilt (Abbildung 23a,

b). Diese Beobachtung deckt sich also mit den Ergebnissen von Baumgart et al. und zeigt, dass die Verteilung der GPI-verankerten Proteine sich deutlich von der Verteilung der Ceramide unterscheidet.

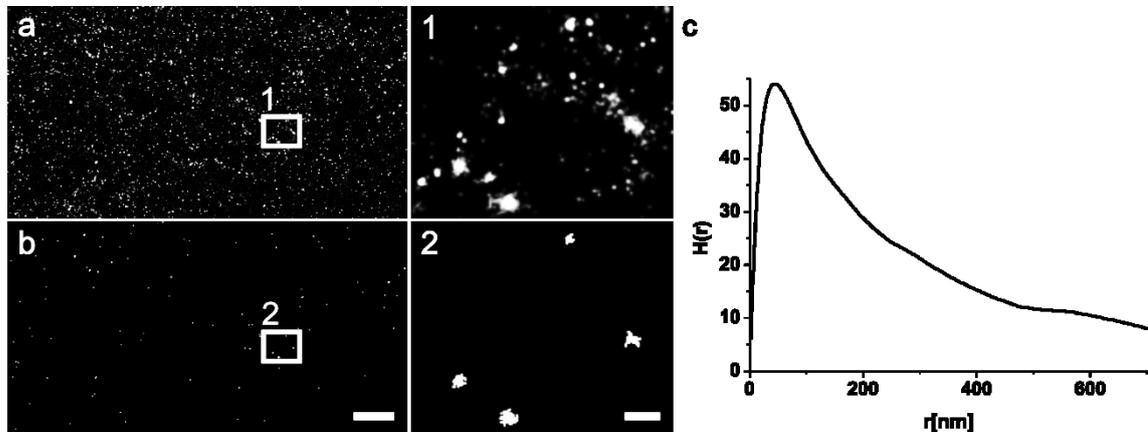


Abbildung 23: GPI ist größtenteils homogen in der Plasmamembran verteilt. U2OS-Zellen wurden transient mit GPI-mEOS3.2 transfiziert, fixiert und mittels PALM hochaufgelöst. In (a) sind alle Lokalisationen dargestellt, während in (b) nur die in Cluster lokalisierten Lokalisationen des gleichen Bildausschnittes abgebildet sind. (1) und (2) sind Vergrößerungen der eingerahmten Regionen. (c) zeigt die gemittelte Ripley's H-Funktion aus 9 gemessenen Zellen. Ihr Maximum ist bei $r = 42$ nm. Maßbalken: $2 \mu\text{m}$ (a, b) und 200 nm (1, 2).

4.2.3 Untersuchung von Plasmamembran-Ceramiden mittels Click-Chemie

Eine weitere Möglichkeit Moleküle anzufärben, stellt die Click-Chemie dar. Da mit dieser Methode eins-zu-eins und direkt, also ohne einen großen Linker dazwischen, die Zielmoleküle gefärbt werden, ist sie besonders für die Quantifizierung mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie interessant. Ziel war es, Zellen mit Azid-modifizierten Ceramiden zu inkubieren, sie auf der Plasmamembran über kupferfreie Click-Chemie anzufärben und mit *d*STORM aufzunehmen. Die geklickten Ceramide sollten dann quantifiziert werden und mit den Ergebnissen aus den Antikörper-Färbungen verglichen werden.

Es wurden zunächst Azid-modifizierte Ceramide (Azo-Ceramide) mit unterschiedlichen Kettenlängen vom Lehrstuhl Organische Chemie der Universität Würzburg synthetisiert (Kapitel 3.1.9). Dann wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Azo-Ceramiden und unterschiedlichen Zeiten inkubiert. Zum einen konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Azo-Ceramiden keinen substanziellen Anstieg des Zellsterbens verursacht. Zum anderen konnte mit Durchflusszytometrie-Messungen (Lehrstuhl Virologie, Universität Würzburg) gezeigt werden, dass mit einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ an Azo-Ceramiden und einer Inkubationszeit von ~ 25 min optimale Einbauergebnisse erzielt werden [Collenburg et al., 2016]. Die Färbung der

4 Ergebnisse und Diskussion

eingebauten Ceramide wurde mit 25 μM DBCO-Cy5 oder DIBO 488 durchgeführt. Da möglichst nur die Ceramide auf der Plasmamembran der lebenden Zellen markiert werden sollten, wurde die Färbezeit möglichst kurz gehalten. Es wurde letztendlich nur 5-7 min gefärbt, wobei die Färbelösung dabei maximal auf Raumtemperatur temperiert war. Bei längeren Färbezeiten oder hohen Temperaturen während der Färbung, waren deutlich mehr Fluorophore in den Zellen sichtbar, was durch eine erhöhte Endozytose erklärbar ist.

Es wurde dann versucht mit den optimierten Bedingungen die Plasmamembran von Jurkat- und U2OS-Zellen mit *d*STORM aufzunehmen. Dies war jedoch nicht möglich, da der Hintergrund auf dem Deckglas zu hoch war. Versuche, den Hintergrund durch zum Beispiel unterschiedliche Beschichtungen der Deckgläser bzw. Säuberung dieser zu reduzieren, führten zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Ein weiteres Problem stellte die Fixierung dar. Je länger fixiert wurde, desto mehr Fluorophore befanden sich in der Zelle und desto schwieriger wurde es, Signal auf der Plasmamembran von intrazellulärem Signal zu unterscheiden.

Aus diesem Grund wurden dann die Messungen an einem SIM-Aufbau bzw. am LSM durchgeführt. Hier konnte zwar keine Aussage über die Anzahl der Moleküle oder genaue Verteilung der Ceramide getroffen werden, die Messungen konnten jedoch lebend durchgeführt werden. Mit dem LSM wurde zunächst die Einbaueffizienz der Azo-Ceramide mit unterschiedlichen Kettenlängen überprüft. Es standen dabei C6-Azo-Ceramide (CerC6) und C16-Azo-Ceramide (CerC16) zur Verfügung, beide mit entweder dem Azid am Kopf (α) oder am Ende der Fettsäure (ω) (Kapitel 3.1.9). Mit den CerC6-Analoga wurde dabei ein deutlich stärkeres Signal in der Plasmamembran von Jurkat-Zellen erhalten als mit CerC16 (Abbildung 24). Unterschiede zwischen CerC6 α und CerC6 ω gab es dabei kaum. Die CerC16-Analoga haben sich insofern unterschieden, dass mit CerC16 ω ein schwaches Signal in der Plasmamembran detektiert wurde, wohingegen bei CerC16 α kein spezifisches Signal detektiert werden konnte. Um zu überprüfen, ob die Zellen CerC16 nicht einbauen, oder es zwar eingebaut, aber das Azid nicht mehr zugänglich für den Farbstoff ist, wurde CerC16 α erst geklickt und dann zu den Zellen gegeben. Die Plasmamembran war hier nun deutlich angefärbt und die Intensität vergleichbar mit der aus den CerC6-Messungen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Azid von eingebauten CerC16 α nicht mehr für den Farbstoff zugänglich ist.

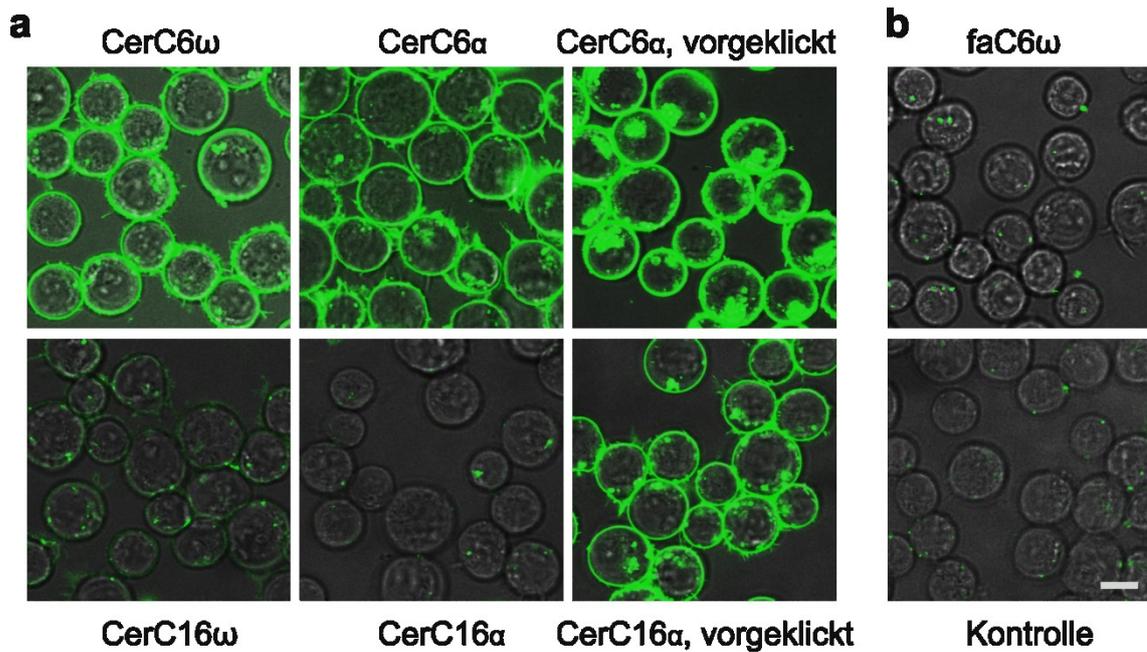


Abbildung 24: Jurkat-Zellen bauen Azid-modifizierte Ceramide in die Plasmamembran ein. Jurkat-Zellen wurden 30 min mit Azo-Ceramiden, die unterschiedliche Kettenlängen und unterschiedliche Positionen der Azid-Modifikation aufweisen, gefüttert. Danach wurden sie lebend über kupferfreie Click-Chemie mit DBCO-Cy5 für 7 min angefärbt und sofort mit dem LSM aufgenommen. Details sind im Text beschrieben. Maßbalken: 10 μm .

Allerdings muss bedacht werden, dass sich die Löslichkeit von CerC16 α verändert, wenn ein Fluorophor daran gebunden hat. Es kann also noch nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob CerC16 α von den Zellen eingebaut wird.

Um auszuschließen, dass die Zellen die zugefütterten Azo-Ceramide spalten und nur die Fettsäure mit dem Azid einbauen, wurden Jurkat-Zellen auch mit Azid-modifizierten Fettsäuren (fa) inkubiert und gefärbt. Es wurden alle Kettenlängen und Positionen des Azids überprüft, wobei bei keinem der Analoga ein Signal in der Plasmamembran detektiert werden konnte. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Zellen die Azo-Ceramide nicht spalten, sondern komplett einbauen.

Um den Einbau der Azo-Ceramide in die Zellen mit einer höheren Auflösung zu visualisieren, wurden auch SIM-Aufnahmen durchgeführt. Dafür wurden Jurkat-Zellen mit CerC6 ω inkubiert und mit DBCO-Cy5 gefärbt. Bei den SIM-Messungen wurde immer ein z-Stapel aufgenommen, sodass mehrere Einzelbilder aus verschiedenen z-Positionen erhalten wurden (Abbildung 25). Durch die höhere Auflösung und die 3D-Information, wurden einzelne Vesikel sichtbar. Diese befanden sich besonders in der Nähe der Plasmamembran und könnten endozytierte Ceramid-angereicherte Domänen aus der Plasmamembran darstellen.

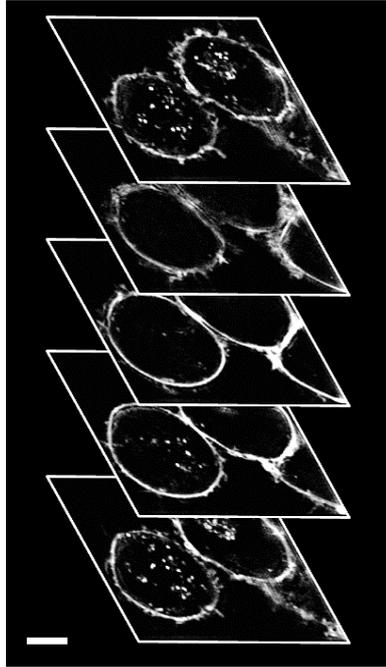


Abbildung 25: Einzelbilder aus einem SIM-z-Stapel von Jurkat-Zellen. Die Zellen wurden mit 25 μM CerC6 ω inkubiert und nach 30 min mit 25 μM DBCO-Cy5 für 10 min gefärbt. Die lebenden Zellen wurden dann mit dem SIM gemessen. Die Einzelbilder sind $\sim 2 \mu\text{m}$ in z-Richtung entfernt von einander. Maßbalken: 5 μm . Abbildung aus [Collenburg et al., 2016].

Messungen von den Kooperationspartnern aus dem Lehrstuhl für Virologie der Universität Würzburg, konnten außerdem zeigen, dass die Azo-Ceramide auch für Untersuchungen an primären T-Zellen einsetzbar sind [Collenburg et al., 2016]. Sie konnten nachweisen, dass sie nicht toxisch auf die Zellen wirken und nicht mit der frühen T-Zell-Aktivierung interferieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Azo-Ceramide zwar nicht für *d*STORM-Messungen von Zellen eingesetzt werden können, sie aber eine gute Möglichkeit darstellen, um sie mit SIM oder LSM aufzunehmen. Dabei wirken sie nicht toxisch auf die Zellen, sodass auch Prozesse über einen längeren Zeitraum verfolgt werden könnten. Ein weiterer Vorteil ist, dass sie nicht mit natürlichen Prozessen in der Zelle interferieren. Die unterschiedlichen Einbau- bzw. Markierungseffizienz bei Azo-Ceramiden mit unterschiedlichen Kettenlängen bzw. Azid-Positionen muss noch näher untersucht werden, was zum Beispiel mittels Massenspektrometrie oder Anisotropie erfolgen kann.

4.2.4 Ceramide in Prokaryoten

In Kapitel 4.2.1 konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von HBME-Zellen mit extern zugefügter bSMase in einer erhöhten Ceramidsynthese resultiert. 2014 konnten Simonis et al. nachweisen, dass auch *N. meningitidis* zu einer Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (ASM) in HBME-Zellen führt, gefolgt von einer erhöhten Ceramidkonzentration in der Plasmamembran [Simonis et al., 2014]. Dies sollte nun in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Hygiene und Mikrobiologie der Universität

4.2 Quantifizierung von Plasmamembran-Ceramiden

Würzburg mit *d*STORM hochaufgelöst und genauer quantifiziert werden. Es wurden HBME-Zellen dafür für 4 h mit dem *N. meningitidis* -Stamm MC58 infiziert, fixiert und mit dem IgG-Antikörper gegen C16/24-Ceramide gefärbt. Die danach durchgeführten Fluoreszenzaufnahmen zeigten dabei überraschenderweise nicht nur eine Färbung der Plasmamembran der Zellen, es wurde auch ein deutliches Signal von den Bakterien detektiert. Da somit nicht zwischen dem Signal von der Plasmamembran und von den Bakterien unterschieden werden kann, konnte das ursprüngliche Ziel, die Untersuchung der Verteilung der Ceramide an der Kontaktstelle, nicht weiter verfolgt werden. Da bisher jedoch davon ausgegangen wurde, dass *N. meningitidis* keine Ceramide enthalten, sollte die Bindung der anti-Ceramid Antikörper näher analysiert werden.

2010 wurden zwei Studien veröffentlicht, in denen Mikrodomänen in Prokaryoten gefunden wurden, die den lipid rafts in Eukaryoten funktionell und strukturell ähneln. Lopez und Kolter konnten zu Flotilin 1 homologe Proteine in *Bacillus subtilis* nachweisen [Lopez & Kolter, 2010]. Dabei konnten sie mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie zeigen, dass diese in ~ 60 nm großen Cluster vorliegen. J. L. Benach und Kollegen beschäftigten sich ausführlich mit dem Aufbau der Membran von *Borrelia burgdorferi*, wobei sie Cholesterol-haltige Mikrodomänen [LaRocca et al., 2010] und Oberflächen-Lipoproteine, die mit diesen assoziiert sind, fanden [Toledo et al., 2014]. Sie konnten außerdem zeigen, dass zum einen die Bakterien Cholesterol aus der Plasmamembran von eukaryotischen Zellen extrahieren können, aber auch selbst Lipide zu den eukaryotischen Zellen transferieren [Crowley et al., 2013]. Cholesterol wurde auch schon in vielen anderen Bakterien gefunden, wie zum Beispiel in *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma phagocytophilum* [Lin & Rikihisa, 2003], *Heliobacter sp.* [Haque et al., 1995], *Mycoplasma gallinarum* [Smith, 1971] oder *Brachyspira sp.* [Thaddeus, 2001]. Es wurden außerdem auch schon in einigen Bakterien Ceramide und andere Sphingolipide nachgewiesen [Minamino et al., 2003]. Sie wurden alle zu der Gattung *Sphingobacterium* zusammengefasst [Yano et al., 1983]. Die Ceramide wurden jedoch noch nie hochaufgelöst oder ihre Verteilung untersucht. Ob in *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* Sphingolipide vorhanden sind, wurde bisher noch nicht geprüft bzw. Ergebnisse darüber veröffentlicht.

Es wurden zunächst verschiedene *N. meningitidis* Stämme mit dem C16/24 IgG-Antikörper und einem A1647-markierten sekundären Antikörper gefärbt. Dabei wurden die *N. meningitidis* Serogruppen B Stämme MC58, die ungekapselte Mutante MC58 *siaD*, H44,76 und eine H44,76 Mutante, bei der zwei Gene für die Lipid A

4 Ergebnisse und Diskussion

Acyloxyacylierung inaktiviert sind (*lpx*), verwendet. Zusätzlich wurde der *N. gonnorrhoeae* Stamm N927 angefärbt. Die Bakterienstämme wurden dabei nicht permeabilisiert, sodass bei *d*STORM-Messungen nur die Bindung der Antikörper an die Membran detektiert wurde.

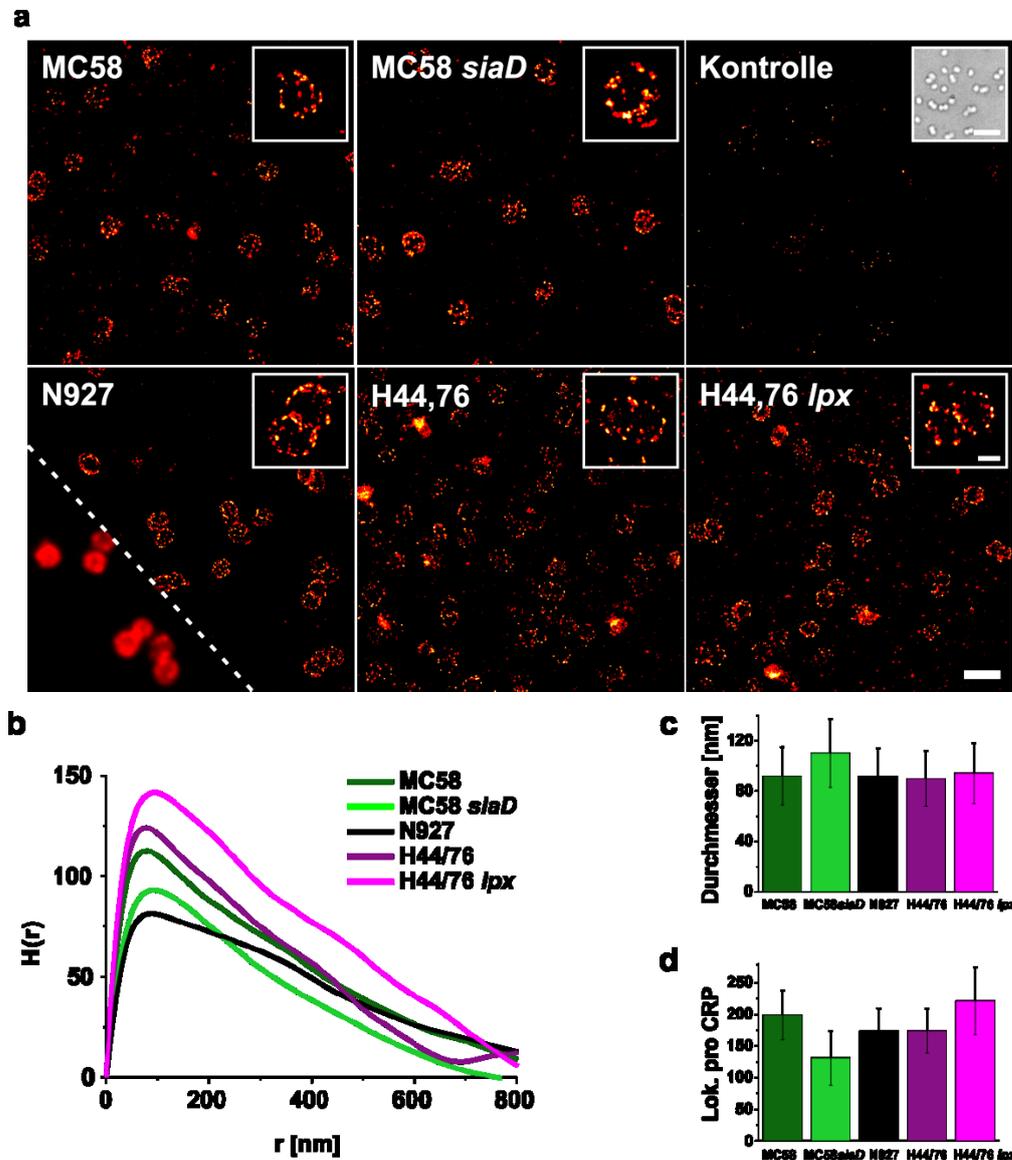


Abbildung 26: Die Membran von *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* werden durch anti-C16/24 IgG-Antikörper angefärbt. Verschiedene *N. meningitidis* Stämme und der *N. gonorrhoeae* Stamm N927 wurden fixiert und über indirekte Immunhistochemie mit dem anti-C16/24 IgG-Antikörper und Al647 angefärbt. Als Kontrolle wurde eine Färbung mit nur dem sekundären Antikörper durchgeführt. Abbildung (a) zeigt beispielhaft je eine *d*STORM Aufnahme aller Bakterienstämme und eine Vergrößerung aus diesen. Es ist eine deutliche Membranfärbung zu erkennen, wobei das Signal nicht homogen, sondern in großen Clustern verteilt ist. Um diese näher zu untersuchen, wurde die Ripley's H-Funktion verwendet (b). Diese weisen alle ein Maximum bei $r \sim 100$ nm auf. Anhand einer morphologischen Clusteranalyse wurde ein durchschnittlicher Durchmesser von ~ 90 nm (c) und 125-225 Lokalisationen pro Cluster (d) bei allen Bakterienstämmen bestimmt. Das **Inset** in der *d*STORM Abbildung der Kontrolle zeigt die dazugehörige Durchlichtaufnahme. In der unteren Ecke der *d*STORM Aufnahme von N927 ist ein Weitfeld-Fluoreszenzbild gezeigt. Maßbalken: 2 μ m, 5 μ m (Durchlichtbild) und 500 nm (Vergrößerungen).

4.2 Quantifizierung von Plasmamembran-Ceramiden

Bei allen Bakterienstämmen konnte eine Färbung der Membran ausgemacht werden. Hochaufgelöst wurde sichtbar, dass das Signal nicht homogen in der Membran verteilt war, sondern in großen, separierten Clustern (Abbildung 26a). Eine durchgeführte Clusteranalyse zeigte keinen Unterschied bei dem Durchmesser (~90 nm) und der Anzahl der Lokalisationen pro Cluster (125-225) zwischen den verschiedenen Stämmen (Abbildung 26b-d). Bei der Mutante H44,76 *lpx* fehlen die Lipopolysaccharide (LPS). Sie wurde untersucht, um zu überprüfen, ob die Antikörper wirklich an Ceramide binden, oder fälschlicherweise an das strukturähnliche LPS. Dadurch, dass jedoch auch die Mutante das gleiche Antikörpermuster aufzeigte, kann dies ausgeschlossen werden. Des Weiteren bindet der Antikörper auch nicht an die Kapsel, da keinen Unterschied zwischen bekapseltem und unbekapseltem Bakterienstamm zu erkennen ist.

Der *N. meningitidis* Stamm MC58 wurden auch mit den Azo- Ceramiden gefüttert und mit DBCO-Cy5 gefärbt. Zunächst durchgeführte LSM-Aufnahmen, zeigten ein deutliches Signal bei den gefütterten Bakterien, während bei den ungefütterten, aber gefärbten Bakterien (Kontrolle) kein spezifisches Signal detektiert wurde (Abbildung 27a, b). Diese Ergebnisse und Ergebnisse von Durchflusszytometrie-Messungen, die von den Kooperationspartnern durchgeführt wurden, weisen auf einen Einbau der Ceramide hin (Abbildung 27c). Die geklickten Bakterien konnten auch mit *d*STORM aufgenommen werden, da anders als bei den eukaryotischen Zellen, nicht auf dem Glas gemessen werden musste und das Signal in den Bakterien höher war. Auf den Aufnahmen wurde eine homogene Verteilung in der Membran sichtbar, wobei das Signal nicht nur in der äußeren Membran detektiert wurde, sondern auch weiter im intrazellulären Bereich der Bakterien (Abbildung 27d).

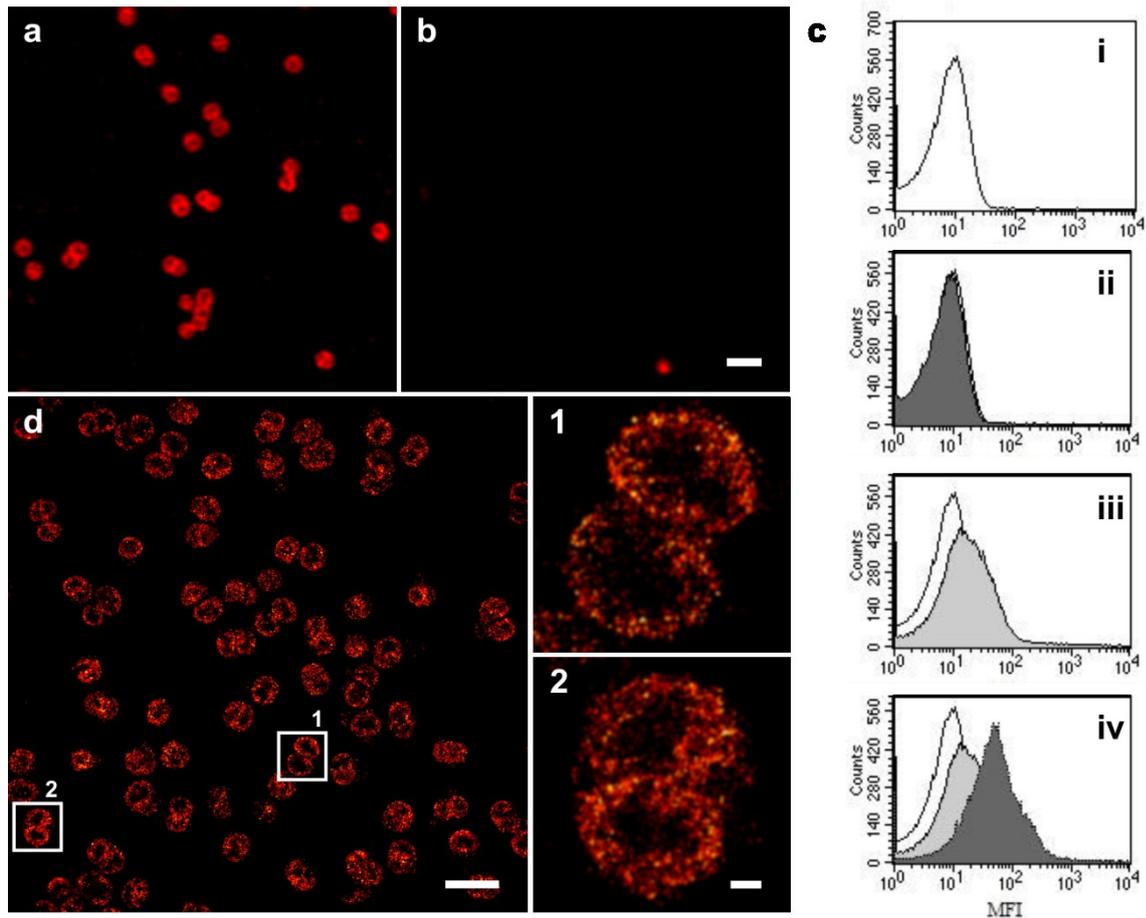


Abbildung 27: MC58 Bakterien bauen Azid-modifizierte Ceramide in ihre Membran ein. MC58 Bakterien wurden mit 25 μM (a, b) oder 50 μM (c) CerC16 ω gefüttert und mit DBCO-Cy5 gefärbt. (a) LSM-Aufnahmen zeigen ein deutliches Signal in der Membran. (b) Bei ungefütterten, aber gefärbten Bakterien, kann kein Signal detektiert werden. (c) Auch Durchflusszytometrie-Messungen zeigen, dass MC58 die Azid-modifizierten Ceramide einbaut. (ci) zeigt das Histogramm der unbehandelten Bakterien, (cii) das der mit CerC16 ω inkubierten, (ciii) das der mit DBCO-Cy5 gefärbten und (civ) das der mit CerC16 ω behandelten und DBCO-Cy5 gefärbten Bakterien. (d) Mit *d*STORM-Messungen ist erkennbar, dass das Signal homogen in der Membran verteilt ist. (1) und (2) sind Vergrößerungen der umrahmten Regionen in (d). Maßbalken: 2 μm (a, b, d) und 200 nm (1, 2).

Die Verteilung der Azo-Ceramide stimmt demnach nicht mit der Verteilung der Ceramide aus den Immunhistochemie-Färbungen überein. Um zu überprüfen, ob die geclusterte Verteilung der Ceramide bei der Antikörper-Färbung ein Artefakt ist und eine Clusterung bei allen Antikörper-Färbungen von Membranmolekülen in den Bakterien entsteht, wenn sie mit *d*STORM gemessen werden, wurden *N. meningitidis* Stämme mit einem anti-OMP (OMP = outer membrane proteins) Antikörper und einem Al647-markierten sekundären Antikörper angefärbt und visualisiert. Da der Antikörper an alle äußere Membranproteine bindet, wurde eine homogene Verteilung des Signals erwartet. Die konnte auch mit *d*STORM-Messungen klar gezeigt werden (Abbildung 28). Antikörper-Färbungen der Bakterienmembran resultieren demnach nicht generell in

Cluster. Dies deutet darauf hin, dass die Bakterien die zugeführten Ceramide anders in die Membran einbauen, als die anscheinend schon vorhandenen Ceramide.

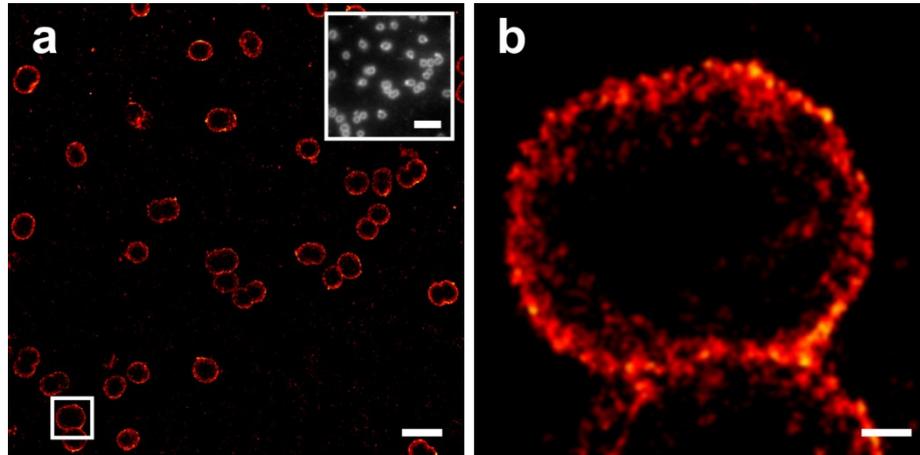


Abbildung 28: Die äußeren Membranproteine sind homogen verteilt. Der *N. meningitidis* Stamm MC58 wurde fixiert und mit einem anti-OMP IgG-Antikörper und einem sekundären Al647-markierten Antikörper gefärbt. Die *d*STORM-Aufnahmen zeigen eine starke, homogen verteilte Markierung der Membran. Das **Inset** zeigt die dazugehörige Weitfeld-Fluoreszenzaufnahme. **(b)** ist eine Vergrößerungen der umrahmten Region in **(a)**. Maßbalken: 5 μm (**Inset**), 2 μm (**a**) und 200 nm (**b**).

Mit den hier durchgeführten *d*STORM- und Durchflusszytometrie-Messungen wurde zum ersten Mal ein Hinweis auf das mögliche Vorhandensein von Ceramiden in der Plasmamembran von *N. meningitidis* und dem *N. gonorrhoeae* Stamm N927 erhalten. Da, wie eingangs beschrieben, auch schon in anderen Bakterien Ceramide nachgewiesen werden konnten, ist dies keine abwegige Vorstellung. Mit den verschiedenen Kontrollmessungen konnte eine artifizielle Bindung der anti-Ceramid Antikörper ausgeschlossen werden. In folgenden Messungen muss nun analysiert werden, warum die Bakterien die Azo-Ceramide anders verteilt einbauen, als die schon vorhandenen Ceramide. Außerdem kann mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden überprüft werden, ob die Ceramide in den Bakterien zum Beispiel bei der Adhäsion oder Invasion in eukaryotische Zellen eine Funktion übernehmen.

4.3 Identifizierung von Pathogen-Erkennungsrezeptoren auf NK-Zellen

Nicht nur Bakterien sind potentielle Krankheitserreger, gegen die sich unsere Zellen wehren müssen. Wir atmen täglich mehrere Hundert Pilzsporen ein. Darunter sind auch Schimmelpilze, wie zum Beispiel *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*). Bei gesunden Menschen verhindert das Immunsystem eine Ausbreitung im Körper, sodass wir keine Auswirkungen spüren. Bei immunsupprimierten Menschen, bei denen zum Beispiel gerade eine Stammzelltransplantation durchgeführt wurde oder die an Leukämie leiden, kann sich jedoch der Schimmelpilz im gesamten Körper ausbreiten. Man spricht dann von einer invasiven Aspergillose (IA) [Segal, 2009]. Immunsupprimierte Patienten mit einer IA haben eine sehr schlechte Überlebensprognose [Singh & Paterson, 2005]. 2015 wurde eine Studie veröffentlicht, in der herausgefunden wurde, dass Stammzelltransplantations-Patienten mit einer massiven IA weniger natürlichen Killer-(NK-) Zellen besitzen, als die Patienten mit einer gut kontrollierten IA [Stuehler et al., 2015]. NK-Zellen zählen zu den Lymphozyten und sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie lysieren nicht nur infizierte oder entartete Zellen, sondern spielen auch bei der Modulation der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle [Schuster et al., 2016]. Zwei Studien konnten zeigen, dass NK-Zellen durch Interaktion mit *A. fumigatus* aktiviert werden [Schmidt et al., 2011; Bouzani et al., 2011]. Schmidt et al. konnten nachweisen, dass aktivierte Zellen zytotoxische Granzyme und Perforine ausschütten und damit *A. fumigatus*-Hyphen zerstörten. Bouzarni et al. fanden dagegen heraus, dass durch direkten Kontakt mit *A. fumigatus*-Keimlinge NK-Zellen Interferon γ ausschütten und dies zu einer Schädigung des Pilzes führt. Wie genau jedoch die NK-Zellen den Pilz erkennen war bisher noch nicht geklärt.

Mit Durchflusszytometrie-Messungen, die von den Kooperationspartnern aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin II der Universität Würzburg durchgeführt wurden, wurden zunächst verschiedene NK-Zell-aktivierende Rezeptoren und *A. fumigatus*-Muster-Erkennungs-Rezeptoren (engl.: pattern recognition receptors, PRRs) bei *A. fumigatus*-Kontakt untersucht. Dabei wurde die Expression der NK-Zell-aktivierenden Rezeptoren NKp44, 2B4, NTB-A und DNAM1 und der PRRs TLR-2, TLR-4, Dectin-1 und NKp30 analysiert. Es wurde jedoch bei keinem dieser Proteine eine Veränderung festgestellt [Ziegler et al., 2016]. Interessanterweise konnte aber eine Reduktion der CD56-Fluoreszenz verglichen mit NK Zellen, die nicht mit dem Pilz in Kontakt kamen, beobachtet werden. NK-Zellen lassen sich von anderen Immunzellen durch die Präsenz

4.3 Identifizierung von Pathogen-Erkennungsrezeptoren auf NK-Zellen

des Glykoproteins CD56 und die Abwesenheit von CD3 unterscheiden. NK-Zellen werden in CD56^{bright} und CD56^{dim} Zellen unterteilt. CD56^{dim} Zellen sind zytotoxischer, während CD56^{bright} Zellen mehr Zytokine produzieren, wodurch sie andere Immunzellen aktivieren [Cooper et al., 2001]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde herausgefunden, dass sich CD56 auch an der Kontaktstelle zu Stomazellen anhäuft und somit die sich früh entwickelnde Immunzellsynapse charakterisiert. Dort ist das Protein an der NK-Zell-Bewegung und -Entwicklung beteiligt [Mace et al., 2016].

Um zu analysieren woher die Abnahme der CD56-Fluoreszenz resultiert, wurden weitere Versuche durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen kein CD56 in den Überstand abgeben und die CD56 Reduktion nicht durch Apoptose induziert wird. Außerdem konnte ausgeschlossen werden, dass die Rezeptoren internalisiert werden und deshalb weniger CD56 detektiert wird. Western Blot-Analysen zeigten, dass die CD56-Proteine nach *A. fumigatus*-Inkubation noch intakt vorliegen. Mittels quantitativer real-time PCR konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Genexpression von CD56 durch den Pilz nicht beeinflusst wird. Nachdem all diese möglichen Ursachen der CD56-Fluoreszenz-Reduktion ausgeschlossen werden konnten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die CD56-Moleküle bei Kontakt mit dem Pilz an diesen binden, dadurch maskiert werden und nicht mehr mit Durchflusszytometrie-Messungen detektiert werden können. Möglich wäre auch, dass bei der Ernte der NK-Zellen Membranstrukturen an der klebrigen Pilzwand haften bleiben, was auch eine Reduktion der CD56-Fluoreszenz hervorrufen könnte. Um diese möglichen Erklärungen zu überprüfen, wurden fluoreszenzmikroskopische Messungen mit einem konfokalen LSM und 2D- bzw. 3D-dSTORM-Messungen durchgeführt. Hier wurde sichtbar, dass sich die Verteilung der CD56-Moleküle bei Pilzkontakt verändert. Während CD56 in NK-Zellen ohne Pilzkontakt homogen in der Plasmamembran vorliegt, verlagert es sich bei Pilzkontakt an die Kontaktstelle NK-Zelle zu Pilz (Abbildung 29). Je länger die NK-Zellen mit *A. fumigatus* inkubiert wurden, desto mehr Signal wurde an der Kontaktstelle detektiert und desto weniger im Rest der Membran. Daraus wurde geschlossen, dass CD56 aktiv an die Kontaktstelle transportiert wird. Mit Durchflusszytometrie-Messungen der Kooperationspartner konnte außerdem gezeigt werden, dass die CD56 Relokalisation Aktin-abhängig ist, während ein Transport an Mikrotubuli ausgeschlossen werden konnte.

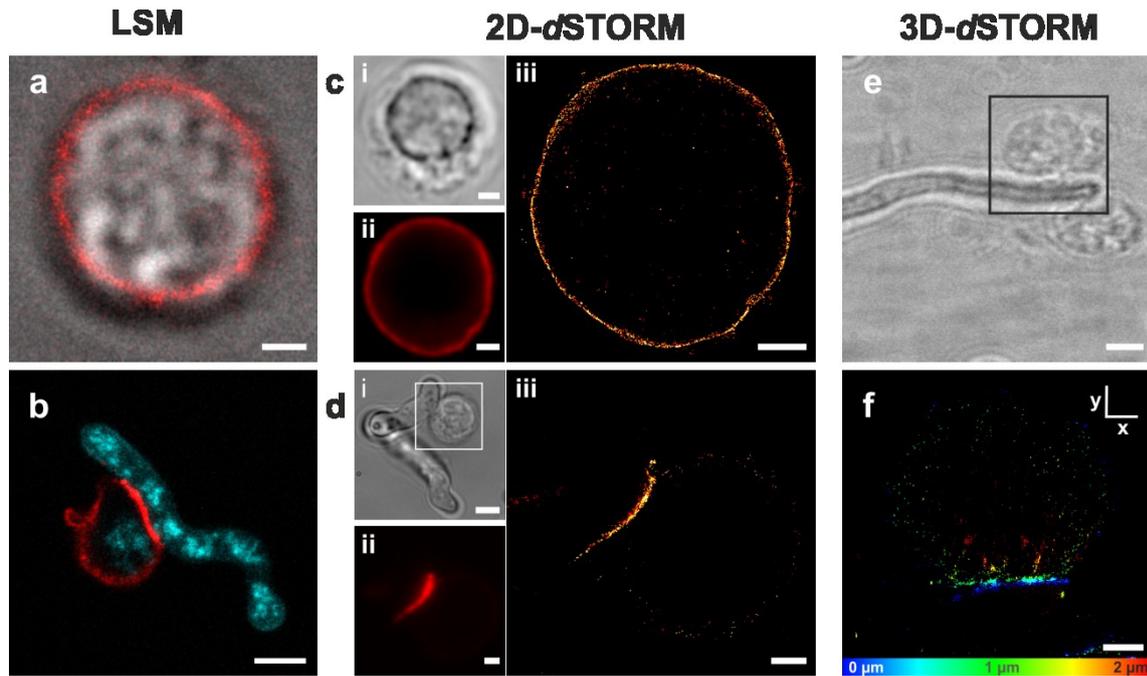


Abbildung 29: CD56 wird an die Kontaktstelle NK-Zelle - *A. fumigatus* reorganisiert. NK-Zellen wurden entweder alleine (**a**, **c**) oder zusammen mit *A. fumigatus*-Keimlinge (**b**, **d-f**) für 3 h inkubiert. Danach wurden sie fixiert und mit einem Al647-markierten anti-CD56 IgG-Antikörper gefärbt. (**a**) und (**b**) zeigen LSM-Bilder, wobei in Rot CD56-Signal dargestellt ist und in Cyan die Autofluoreszenz. Ohne Vorhandensein des Pilzes ist das CD56-Signal homogen in der Plasmamembran der Zellen verteilt (**a**). Binden die Zellen an den Pilz, häuft sich das CD56-Signal an der Kontaktstelle an (**b**). Dies ist auch gut in 2D- (**ciii**, **diii**) und 3D-dSTORM (**f**) -Aufnahmen erkennbar. (**ci**), (**di**) und (**e**) zeigen Durchlichtaufnahmen, (**cii**) und (**dii**) sind Weitfeld-Fluoreszenzaufnahmen. (**f**) ist die Vergrößerung der umrahmten Region in (**e**). Die z-Ebene in (**f**) ist farbcodiert. Maßbalken: 1,5 µm (**c**, **dii**, **diii**), 2 µm (**b**, **f**), 3 µm (**a**, **e**), 4 µm (**di**) und 5 µm (**b**).

Mit diesen Ergebnissen konnte erstmals gezeigt werden, dass CD56 eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von *A. fumigatus* durch NK-Zellen spielt. CD56 akkumuliert bei Pilzkontakt an der Kontaktstelle, wo es aktiv hin transportiert wird.

4.4 Analyse der Autoantikörper von Anti-NMDAR Enzephalitis

Patienten mittels dSTORM

Anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR) Enzephalitis ist eine immunvermittelte Erkrankung, die zum ersten mal 2007 beschrieben wurde [Dalmau et al., 2007]. Patienten bilden dabei Autoantikörper gegen die extrazelluläre Domäne ihrer eigenen NMDA-Rezeptoren. NMDA-Rezeptoren sind Heterotetramere, die aus je zwei Kopien einer NR1- und einer NR2-Untereinheit zusammengesetzt sind [Karakas & Furukawa, 2014] und auf der postsynaptischen Seite von Neuronen vorkommen. NMDA-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität. Erste Studien konnten zeigen, dass die meisten pathogenen Patientenantikörper an die N-terminale Domäne der NR1-Untereinheit bindet und dabei die Funktion des Kanals behindern [Gleichman et al., 2012]. Die meisten Anti-NMDAR Enzephalitis Patienten zeigen ein mehrstufiges Krankheitsbild mit psychiatrischen und neurologischen Störungen [Peery et al., 2012; Fischer et al., 2016]. Es gibt Hinweise, dass die Autoantikörper die Dichte der NMDA-Rezeptoren reduzieren, hauptsächlich durch eine erhöhte Rezeptorinternalisierung [Moscato et al., 2014]. Wie jedoch genau die Autoantikörper die Lokalisation der NMDA-Rezeptoren in der Postsynapse beeinflussen und die Veränderungen in der Rezeptorexpression und -internalisierung induzieren und dies zu einer Störung der synaptischen Plastizität führt, ist noch nicht geklärt.

In einer Kooperation mit dem Hans-Berger Lehrstuhl für Neurologie der Universitätsklinik Jena sollen diese Fragen mit Hilfe von Patch-Clamp und hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie geklärt werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden dafür erste dSTORM-Messungen durchgeführt. Die Kooperationspartner reinigten zunächst IgG-Antikörper von mehreren anti-NMDAR Enzephalitis Patienten auf. Die Antikörper wurden dann für Fluoreszenzmessungen mit Cy5 direkt markiert und aufgereinigt. Um zunächst zu überprüfen, ob die Patientenantikörper (Pat.-IgG) an NR1 oder NR2 binden, wurden HEK-Zellen mit entweder der NR1- oder NR2-Untereinheit transfiziert und mit den Pat.-IgGs-Cy5 gefärbt. dSTORM-Aufnahmen zeigen deutlich, dass die Antikörper hauptsächlich an die NR1-Untereinheit binden, wo sie homogen verteilt sind (Abbildung 30). Des Weiteren wurden die mit NR1 transfizierten Zellen mit IgG-Antikörper aus gesunden Menschen (Ktr.-IgG) gefärbt. Hier ist die Bindung der Antikörper ebenfalls deutlich geringer (Abbildung 30c). Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein [Gleichman et al., 2012] und bestätigt die Spezifität der aufgereinigten Antikörper.

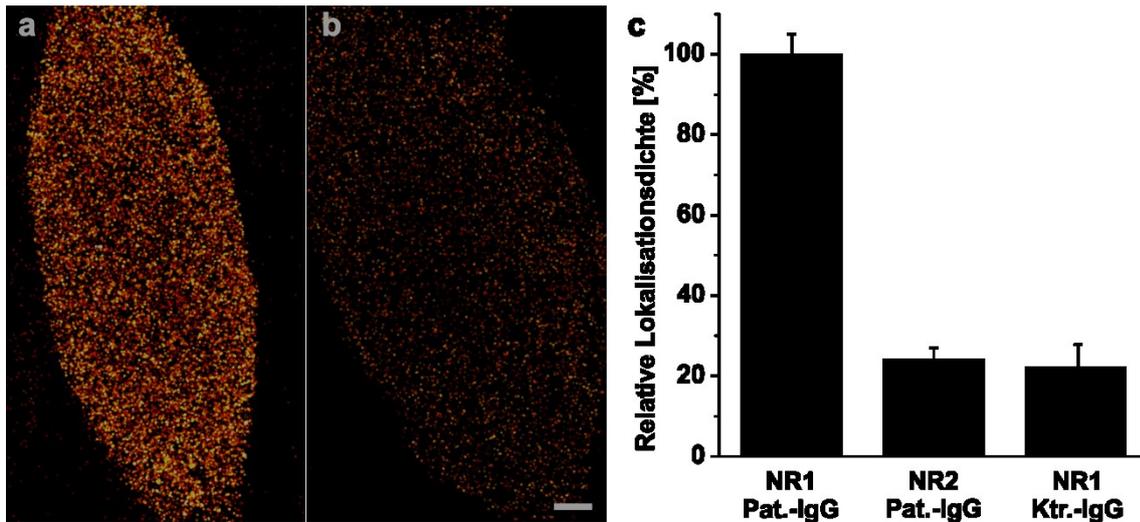


Abbildung 30: Antikörper aus anti-NMDAR Encephalitis Patienten binden an die Untereinheit NR1 des NMDA-Rezeptors. HEK-Zellen wurden entweder mit der NMDAR-Untereinheit NR1 oder NR2 transfiziert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Cy5-markierten Antikörpern aus anti-NMDAR-Encephalitis Patienten (Pat.-IgG) gefärbt. Als Kontrolle wurden die NR1 transfizierten Zellen zusätzlich noch mit Antikörper aus gesunden Patienten (Ktr.-IgG) inkubiert. *d*STORM-Aufnahmen zeigen eine deutliche Färbung mit dem Patienten-Antikörper bei den NR1 transfizierten Zellen (a), wohingegen die NR2 transfizierten Zellen (b) kaum angefärbt sind. (c) Die Lokalisationsdichte bei NR1 transfizierten und mit Pat.-IgG gefärbten Zellen ist ~ 5 fach höher als die bei den NR2 transfizierten Zellen und NR1 transfizierten aber mit Ktr.-IgG angefärbten Zellen. Maßbalken: 2 μ m.

Als nächstes wurden die Pat.-IgGs auf fixierten hippocampalen Maus-Neuronen getestet. Hier ist auf den 2D- und 3D-*d*STORM-Aufnahmen zu erkennen, dass die Antikörper zum einen dicht gepackt in den Synapsen vorliegen, zum anderen aber auch dünner verteilt in den extrasynaptischen Regionen (Abbildung 31a, b). In den Synapsen konnten Cluster mit einem Median-Durchmesser von 94 nm (Abbildung 31c) ausgemacht werden, wohingegen extrasynaptisch die Antikörper in kleineren Clustern mit einem Durchmesser von 67 nm akkumulieren. Die größeren synaptischen Cluster enthielten durchschnittlich $\sim 500 \pm 60$ Lokalisationen (\pm s.e.m., $n=106$), während bei den kleineren extrasynaptischen nur $\sim 100 \pm 5$ Lokalisationen ($n=1381$) gezählt werden konnten. Die Färbungen wurden auch mit einem kommerziellen NR1-bindenden Antikörper verglichen, wobei ein ähnliches Muster erkennbar war (Abbildung 31d, e, f).

4.4 Analyse der Autoantikörper von Anti-NMDAR Enzephalitis Patienten mittels dSTORM

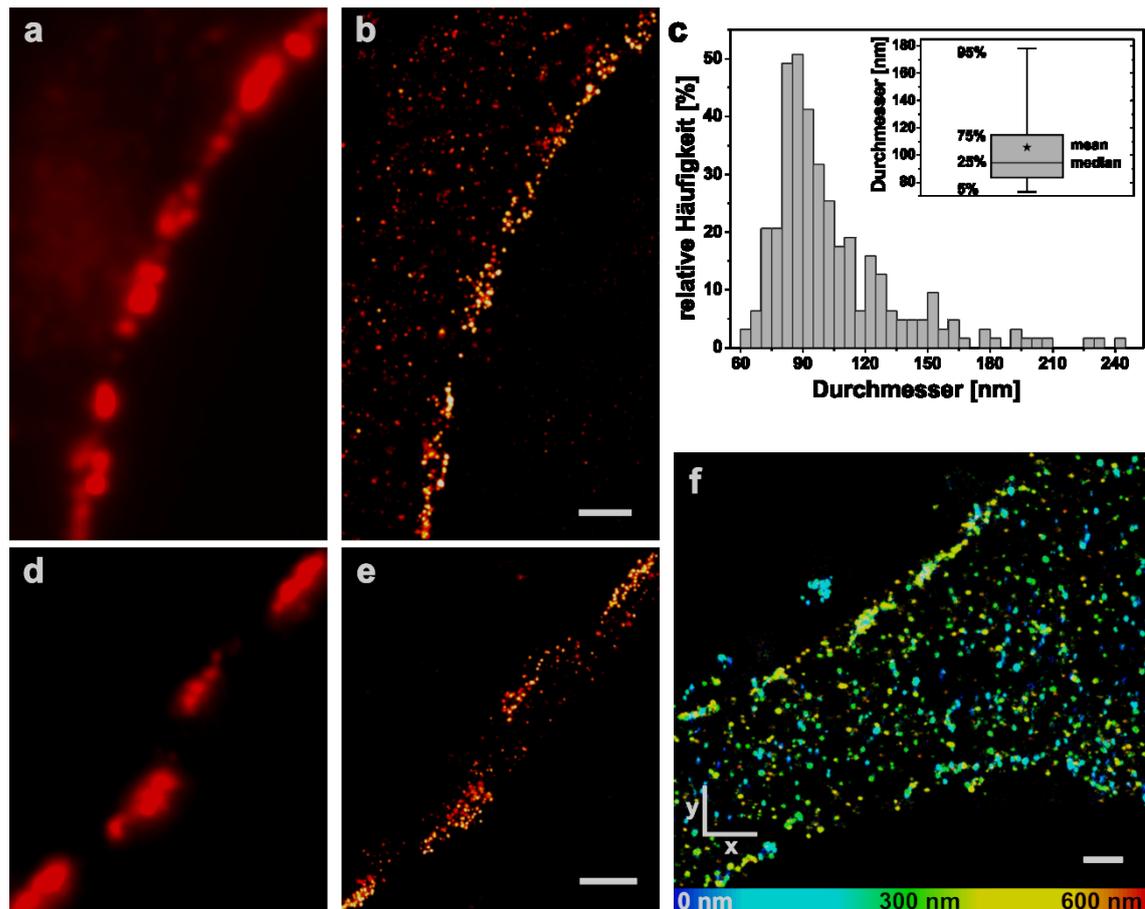


Abbildung 31: NR1 liegt in den Synapsen von hippocampalen Maus-Neuronen in Clustern vor. Hippocampale Maus-Neuronen wurden fixiert und entweder mit menschlichen anti-NMDAR Enzephalitis Antikörper (a,b) oder einem kommerziellen NR1-Antikörper (d, e, f) angefärbt und mit dSTORM aufgenommen. Beide Antikörper zeigen ähnliche Verteilung: sie liegen dicht gepackt in den Synapsen vor und sind in den extrasynaptischen Regionen homogen verteilt. Die Cluster in den Synapsen haben einen Median-Durchmesser von 94 nm (c), wohingegen die extrasynaptischen Cluster kleiner sind (Median: 67 nm). (b) und (e) zeigen die dSTORM-Aufnahmen, (a) und (d) die dazugehörigen Weitfeld-Fluoreszenzaufnahmen und (f) eine 3D dSTORM Aufnahme. Maßbalken: 2 μ m (a, b), 1 μ m (d, e) und 4 μ m (f).

Um in folgenden Messungen die genaue Lokalisation der Pat.-IgGs in den Synapsen zu identifizieren, wurden Marker für Prä- und Postsynapsen und mit diversen Färbeprotokollen getestet [Dani et al., 2010; Andreska et al., 2014]. Dazu wurden Neuronen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörper gegen das präsynaptische Protein Bassoon und das postsynaptische Protein Homer1 gefärbt. Mit dSTORM-Messungen wurde sichtbar, dass die Proteine in länglichen Clustern vorliegen. Homer1 und Bassoon Cluster lagen dabei meistens gegenüber voneinander, meist getrennt von einer nicht gefärbten Region, die den synaptischen Spalt kennzeichnete (Abbildung 32). Die Form und Größe des synaptischen Spalts war dabei von der Orientierung der Synapse während der Messung abhängig. Mit den Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass mit dSTORM, aufgrund der erhöhten Auflösung, zwischen Prä- und Postsynapse

4 Ergebnisse und Diskussion

unterschieden werden kann. Außerdem eignen sich die Antikörper gegen Homer1 und Bassoon hervorragend, um die Lokalisation anderer Proteine zu untersuchen.

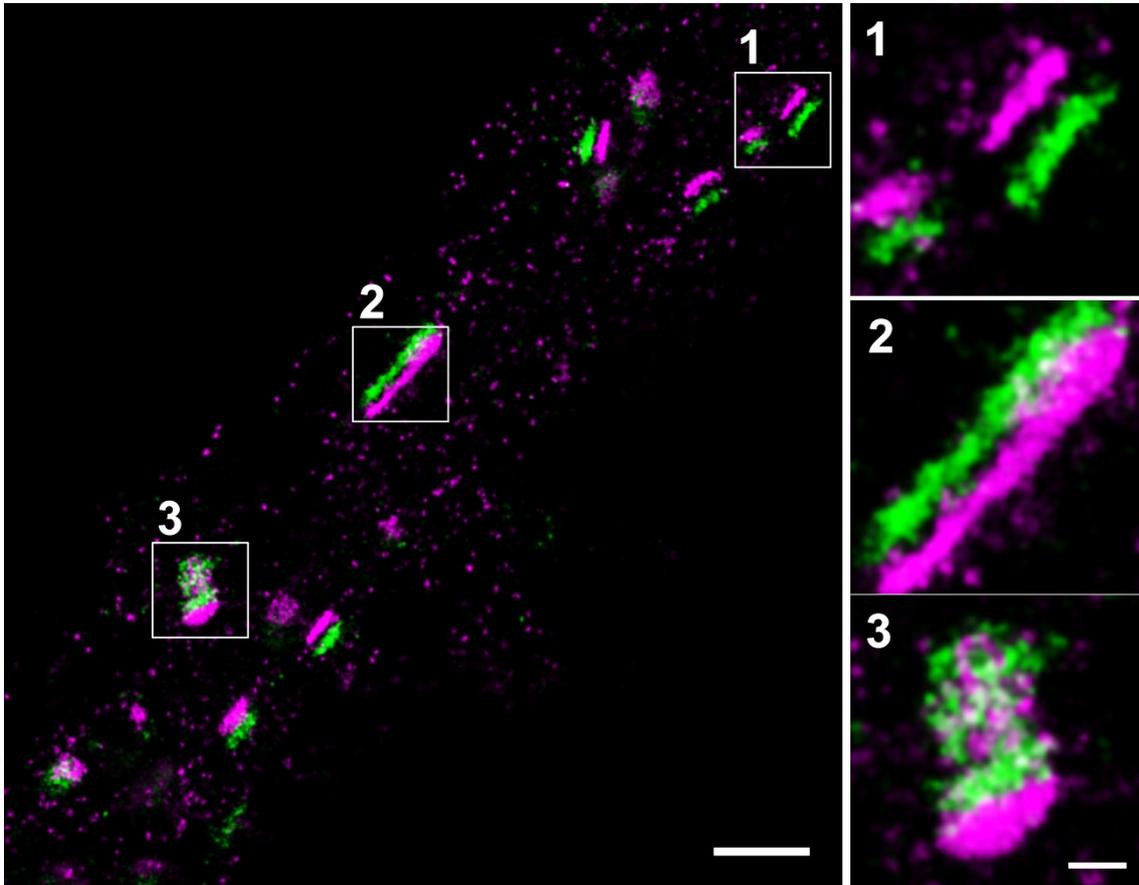


Abbildung 32: Mit *d*STORM-Messungen kann zwischen Prä- und Postsynapse unterschieden werden. Hippocampale Maus-Neuronen wurden fixiert, permeabilisiert und über indirekte Immunhistochemie mit einem anti-Bassoon Antikörper und A1532 (grün) bzw. einem anti-Homer1 Antikörper und A1647 (magenta) angefärbt. Bei den *d*STORM-Aufnahmen kann zwischen dem präsynaptisch liegenden Bassoon-Protein und dem postsynaptischen Homer1-Protein unterschieden werden. Die Größe des dazwischenliegenden synaptischen Spalts hängt von der Orientierung der Synapse während der Messung ab. (1-3) sind Vergrößerungen der umrandeten Regionen. Maßbalken: 1 μm und 200 nm (Vergrößerungen).

5 Fazit und Ausblick

5.1 Artefakte in der SMLM

Methoden der Lokalisationsmikroskopie, wie PALM und *d*STORM, ermöglichen es Moleküle zu quantifizieren und deren Verteilung zu analysieren. Gerade weil diese Methoden Ergebnisse auf Einzelmolekülebene liefern, ist es von besonderer Bedeutung potentielle Artefakt-generierende Quellen zu identifizieren und zu eliminieren.

Je mehr Photonen pro Fluorophor detektiert werden können, desto genauer kann deren Position lokalisiert werden und desto genauer wird die Struktur abgebildet. Eine Strategie, die Photonenzahl zu erhöhen, ist den Triplettzustand zu löschen. In der Literatur sind verschiedene chemische Additive als Triplettlöscher beschrieben [Evans, 1957; Snavely & Schäfer, 1969; Pappalardo, 1970; Liphardt et al., 1982; Zheng et al., 2012; Zheng et al., 2016;]. Dies wurde jedoch bisher nur auf Ensembleebene überprüft. Die Auswirkungen bei PALM- oder *d*STORM-Messungen auf die Photonenausbeute wurde hingegen noch nicht analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe von FCS-Messungen zunächst gezeigt werden, dass bei Zugabe von COT der Triplettzustand von Fluorophoren, die im blauen, grünen oder roten Bereich absorbieren, abnimmt. Bei *d*STORM-Messungen hatte COT jedoch nur bei Al647 einen größeren positiven Effekt. Bei den anderen Fluorophoren blieb die Anzahl der gemessenen Photonen gleich oder nahm nur minimal zu. Eine Erklärung für diese Widersprüchlichkeit zu den Ergebnissen aus den FCS-Messungen, könnte das Vorhandensein des Schaltpuffers in *d*STORM-Messungen sein. Dieser bewirkt ein Übergang der Fluorophore in den Aus-Zustand bzw. entzieht dem Puffer Sauerstoff. Das bedeutet, dass es nur sinnvoll ist, COT bei Messungen mit Al647 in einer niedrigen mM-Konzentration einzusetzen. Al647 ist jedoch schon der Farbstoff, der am geeignetsten für *d*STORM-Messungen ist. Er besitzt schon eine hohe Quantenausbeute und lässt sich am besten schalten. Für Zweifarben-Messungen wäre es aus diesem Grund gut, einen Triplettlöscher zu finden, der bei Fluorophoren, die im blauen oder grünen Bereich absorbieren, die Photonenzahl erhöht. KI wurde als Triplettlöscher beschrieben, der bei blauen Fluorophoren eine Erhöhung der Photonenausbeute bewirkt [Chmyrov et al., 2010]. Mit FCS-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von KI tatsächlich in einer leichten Verringerung des Triplettzustands von Al488 resultiert. Im Gegensatz dazu nahm er bei steigender KI-Konzentration bei Al532, Al647 und At655 zu. Bei *d*STORM-Messungen nahm die Intensität von Al488 zunächst

5 Fazit und Ausblick

sehr leicht zu, bei höheren KI-Konzentrationen jedoch wieder ab. Vorstellbar ist, dass die Fluorophore zunächst mehr Photonen aussenden können, da bei niedrigen KI-Konzentrationen die Reduktion der photooxidierten Fluorophore gefördert wird. Da jedoch bei höheren KI-Konzentrationen nicht-photooxidierte Fluorophore reduziert werden und bei *d*STORM-Messungen wenig Sauerstoff vorhanden ist, um sie daraus wieder zu oxidieren, nimmt die Intensität ab. Die Photonenzahl bei A1532 und A1647 nimmt hingegen deutlich ab. Somit sollte auch KI nicht für Ein- oder Zweifarben-*d*STORM-Messungen eingesetzt werden.

D₂O greift nicht am Triplettzustand an, sondern bewirkt eine Verbesserung der Photonenausbeute dadurch, dass strahlungslose Relaxationsprozesse minimiert werden [Suppan, 1994]. In *d*STORM-Messungen mit A1647 und At655 bewirkte D₂O nicht, dass insgesamt mehr Photonen detektiert wurden, sondern nur in kürzerer Zeit die gleiche Anzahl von Photonen ausgesendet wurden. Das bedeutet, dass D₂O eingesetzt werden kann, wenn eine Probe schnell vermessen werden muss, wie zum Beispiel bei Lebendzellmessungen.

Nicht nur eine zu niedrige Photonenzahl, auch eine zu geringe Photoschaltrate kann Artefakte in *d*STORM-Messungen erzeugen. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere bei Aufnahmen der Plasmamembran besondere Vorsicht geboten ist, um markierte Moleküle der Wahrheit entsprechend abzubilden [Burgert et al., 2015]. Plasmamembranen weisen viele inhomogene und lokal dichte Regionen auf, wie zum Beispiel Membraneinstülpungen oder Vesikel, die sich dicht bei der Membran befinden. Sind mehr als ein Emitter pro μm^2 gleichzeitig an, kann *rapid**d*STORM die einzelnen Fluorophore nicht mehr richtig fitten, wodurch große Cluster erzeugt werden. Wenn nun eine Quantifizierung der Moleküle durchgeführt bzw. die Verteilung der Moleküle analysiert werden soll, werden falsche Ergebnisse erhalten. Die hier durchgeführten Messungen machen deutlich, wie wichtig eine ausreichende Photoschaltrate ist. Die Rohdaten sollten immer sorgfältig gesichtet und notfalls die Messungen mit einer höheren Laserleistung wiederholt werden. Da *d*STORM immer mehr zur Quantifizierung und Clusteranalyse eingesetzt wird, wäre es sinnvoll, bei Veröffentlichungen die Rohdaten von entscheidenden Aufnahmen der Öffentlichkeit zur Verfügung zu stellen.

Um artifizielle Cluster zu verhindern, muss auch die Färbemethode sorgfältig gewählt und überprüft werden. Der Marker sollte dabei möglichst klein sein und nahe bei dem zu markierenden Zielmolekül liegen. Besonders bewährt hat sich hier die Click-Chemie

[Letschert et al., 2014; Löschberger et al., 2014b]. Am häufigsten werden jedoch immer noch Antikörper zum Anfärben verwendet. Hier sollte jedoch darauf geachtet werden, dass keine IgM-Antikörper verwendet werden, da diese besonders groß sind und Moleküle vernetzen können, wodurch artifizielle Cluster entstehen können. Aber auch wenn die kleineren IgG-Antikörper verwendet werden, muss überprüft werden, ob gemessene Cluster echte Cluster sind. Baumgart et al. veröffentlichten kürzlich eine einfache Methode dies zu kontrollieren [Baumgart et al., 2016]. Diese wurde auch verwendet, um Ceramid-Cluster auf der Plasmamembran auf ihre Echtheit zu überprüfen. Dafür wurde eine Titrationsreihe von C16/24-Ceramid bindenden Antikörper hergestellt, Zellen gefärbt und mit *d*STORM visualisiert. Da der Durchmesser der Cluster sich bei unterschiedlichen Antikörper-Konzentrationen nicht veränderte, sondern nur die Anzahl der Lokalisationen zunahm, konnte bewiesen werden, dass Ceramide wirklich in Clustern auf der Plasmamembran verteilt sind.

5.2 Plasmamembran-Ceramide

Ceramide spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen und bei Krankheiten [Hannun & Obeid, 2002; Gulbins & Li, 2006; Simons & Ikonen, 1997; Babiychuk et al., 2008; Stancevic & Kolesnick, 2010; van Blitterswijk et al., 2003; Bollinger et al., 2005; Grassme et al., 2002; Beyersdorf & Muller, 2015; Apostolidis et al., 2016; Holopainen et al., 1998]. Sie konnten hier erstmals hochaufgelöst werden und somit mehr über ihre Verteilung rausgefunden werden. Neben dem Durchmesser der CRPs (~ 75 nm) konnte auch eine ungefähre Anzahl der Moleküle in diesen bestimmt werden. Es befanden sich je nach Zelllinie 16-22 C16/24-Ceramide in einem CRP. Bei Inkubation von HBME-Zellen mit bSMase wurden mehr größere CRPs und mehr CRPs mit einer höheren Anzahl von Molekülen gemessen. Eine Folge der Erhöhung der Ceramidkonzentration und Anzahl der CRPs nach bSMase-Inkubation könnte eine Veränderung der Löslichkeit von Membrankomponenten sein, was wiederum eine Akkumulation bestimmter Rezeptoren oder eine Kompartimentierung bestimmter Proteine erleichtern könnte. Die Anhäufung der Ceramide in den CRPs könnte ebenfalls die lokale Interaktion mit anderen Membranmolekülen erleichtern und dadurch möglicherweise die Reaktivität von Rezeptoren verändern. Dies könnte in weiteren Messungen überprüft werden, indem andere Rezeptoren markiert werden. Mit den Messungen konnte gezeigt werden, dass *d*STORM eine Methode darstellt, mit der einzelne Moleküle gezählt werden können und Aussagen darüber getroffen werden können, wie diese Moleküle angeordnet sind. Dies ist wichtig um zelluläre Prozesse

5 Fazit und Ausblick

besser verstehen zu können, um dann zum Beispiel Ansätze zu entwickeln Krankheiten zu bekämpfen.

Die Erhöhung der Plasmamembran-Ceramide wurde wie oben beschreiben künstlich durch extern zugefügter bSMase erzeugt. Hier wäre es interessant gewesen zu überprüfen wie sich die Ceramidverteilung bei einer Infizierung mit Pathogenen verändert. Dies war jedoch nicht möglich, da die anti-Ceramid IgG-Antikörper auch an die verwendeten *Neisseria meningitidis* Bakterien binden. Um den natürlichen Bedingungen einer *N. meningitidis*-Infektion näher zu kommen, sollen hier in einem weiteren Schritt verschiedene entscheidende Proteine, z.B. Proteine des Typ IV Pilus (Kapitel 1.3) des Bakteriums isoliert werden, zu den eukaryotischen Zellen gegeben und die Ceramide angefärbt werden. Auch könnte *d*STORM genutzt werden, um die Adhäsion von *N. meningitidis* an Endothelzellen näher zu untersuchen. Da mit der Technik eine Auflösung von ~ 20 nm erreicht werden kann, ist es möglich einzelne Pili aufzulösen und somit mehr über die Interaktion zwischen Bakterien und eukaryotischen Zellen zu erfahren. Mit einer Antikörper-Färbung der äußeren Membranproteine, konnte in einem ersten Versuch schon gezeigt werden, dass die Pili mit *d*STORM klar zu erkennen sind (Abbildung 33).

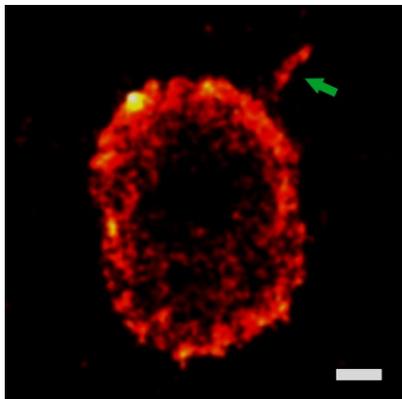


Abbildung 33: Mit *d*STORM können Pili visualisiert werden. Der *N. meningitidis* -Stamm MC58 wurde fixiert und mit einem anti-OMP IgG-Antikörper und einem sekundären Al647-markierten Antikörper gefärbt. Der grüne Pfeil deutet auf einen gut erkennbaren Pili. Maßbalken: 200 nm.

Um die Zusammensetzung der CRPs bzw. die Affinität anderer Moleküle zu diesen Plattformen näher zu analysieren, wurden Cofärbungen durchgeführt. Chiantia et al. veröffentlichten Rasterkraftmikroskopie-, LSM- und Scanning-FCS-Messungen, mit denen sie eine Clusterung von GM1-Gangliosiden und einer GPI-verankerten alkalischen Phosphatase in CRPs auf synthetischen Membranen nachweisen konnten [Chiantia et al., 2008]. In der vorliegenden Arbeit sollte dies in der Plasmamembran von Zellen nachgeprüft werden. Die Colokalisationsanalyse von CtxB, das GM1-Ganglioside anfärbt, und anti-Ceramid Antikörpern weist zwar auf eine Colokalisation

hin, andererseits konnte auch festgestellt werden, dass CtxB Moleküle vernetzt und die CRPs künstlich vergrößert. CtxB eignet sich deshalb nicht für Untersuchungen auf Einzelmolekülebene. Die Färbung des GPI-Ankers des humanen Folatrezeptors mittels Transfektion zeigte bei PALM-Messungen eine größtenteils homogene Verteilung auf. Dies stimmt mit den kürzlich veröffentlichten Ergebnissen von Baumgart et al. überein [Baumgart et al., 2016], widerlegt jedoch die Studie von Chiantia et al. [Chiantia et al., 2008] und auch andere Studien [Anderson, 1998; Raghupathy et al., 2015]. Mit den hier durchgeführten Versuchen konnte zwar kein definitives Vorhandensein anderer Moleküle in den CRPs nachgewiesen werden, sie zeigen jedoch ein weiteres Mal wie wichtig die richtige Färbemethode ist. Dass CtxB die CRPs künstlich vergrößert, könnte mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie nicht festgestellt werden. Erst mit Methoden, die eine höhere Auflösung besitzen, ist dies möglich. Obwohl CtxB häufig in der Literatur auch als lipid raft Marker verwendet wird, sollte darauf verzichtet werden. Die Ergebnisse machen außerdem deutlich, dass *d*STORM in Kombination mit lokalisationsgenauen Clusteranalysen eine hervorragende Technik darstellt, um die Verteilung verschiedener Plasmamembranmoleküle zu analysieren.

Eine Frage, der bei diesem Projekt noch nachgegangen werden könnte, ist die Verteilung der intrazellulären Ceramide. Zum Beispiel könnte untersucht werden, wie Ceramide an die Plasmamembran transportiert werden. Ein erster Versuch dazu wurde in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Virologie der Universität Würzburg durchgeführt. Primäre T-Zellen wurden permeabilisiert und Mikrotubuli und Ceramide mit unterschiedlichen Fluorophoren gefärbt. Die Zellen wurden dann mit *d*STORM aufgenommen (Abbildung 34). Es wurde deutlich, dass die Ceramide nicht nur in der Plasmamembran lokalisiert sind, sondern auch viele mit den Mikrotubuli colokalisieren. Hierzu müssen jedoch noch weitere Messungen durchgeführt werden, um den Transport entlang der Mikrotubuli zu bestätigen.

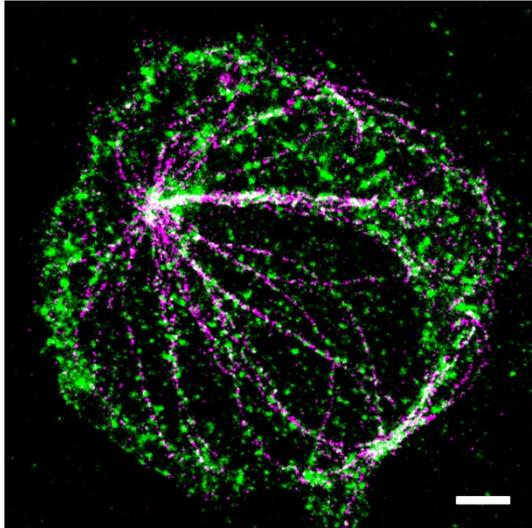


Abbildung 34: Ceramide werden entlang Mikrotubuli transportiert. Primäre T-Zellen wurde fixiert und vorsichtig permeabilisiert. Die Mikrotubuli (magenta) wurden dann über direkte Immunhistochemie mit A1647 und die intrazellulären Ceramide (grün) über indirekte Immunhistochemie mit einem IgG-Antikörper und A1532 angefärbt und mit *d*STORM hochaufgelöst. Maßbalken: 1 μm .

Statt Antikörpern klickbare Ceramidanaloga einzusetzen um Plasmamembran-Ceramide hoch aufzulösen, war nicht möglich, da der Hintergrund auf dem Deckglas zu hoch war. Mit LSM- und SIM-Messungen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Fettsäure-Kettenlänge und die Position des Azids bei den Ceramidanaloga eine entscheidende Rolle spielt, wie hoch das detektierte Signal in der Plasmamembran letztendlich ist. Die Experimente mit den vorgeklickten Molekülen deuten darauf hin, dass das Azid bei langkettigen Ceramidanaloga nicht mehr so gut für den Farbstoff zugänglich ist. Da jedoch die vorgeklickten Ceramidanaloga auch löslicher sein könnten, als die Analoga, die noch keinen Farbstoff tragen, müssen hier weiter Versuche durchgeführt werden. Hier könnten Massenspektrometrie-Messungen weitere Ergebnisse liefern. Die aufgeführten Ergebnisse zeigen jedoch schon, dass die klickbaren Ceramidanaloga eine hervorragende Möglichkeit darstellen, um in lebenden Zellen Ceramide mit Hilfe LSM oder SIM zu untersuchen [Collenburg et al., 2016].

Überraschenderweise kann die Spezies *N. meningitidis* Ceramidanaloga in ihre Zellmembran einbauen. Auch wurde eine Färbung dieser erhalten, wenn die Bakterien mit dem anti-Ceramid IgG-Antikörper inkubiert wurden. Der Unterschied zwischen den beiden Färbemethoden war jedoch, dass das Signal bei der Click-Chemie eher homogen in der Membran verteilt war, während bei der Antikörperfärbung große Domänen (~ 90 nm) sichtbar wurden. Mit Kontrollmessungen konnte zum einen ausgeschlossen werden, dass Antikörperfärbungen bei *N. meningitidis* generell in Cluster resultieren, zum anderen dass der Antikörper fälschlicherweise an das strukturell-ähnliche LPS bindet. Daraus kann geschlossen werden, dass die Bakterien die zugeführten Ceramidanaloga anders einbauen, als die schon vorhandenen Ceramide verteilt sind.

5.3 CD56 ist ein Erkennungsrezeptor für *A. fumigatus*

Um weiter zu überprüfen, ob *N. meningitidis* tatsächlich Ceramide besitzen, könnten die Bakterien in Minimalmedium kultiviert werden. Da in diesem Medium keine Sphingolipide vorhanden sind, könnte somit ausgeschlossen werden, dass die Bakterien die Ceramide aus dem Medium aufnehmen und in ihre Membran einbauen und dadurch eine Färbung mit den Antikörpern entsteht. Da auch schon bei *Bacillus burgdorferi* nachgewiesen werden konnte, dass Bakterien Lipide aus Endothelzellen extrahieren und einbauen können [Crowley et al., 2013], wäre dies ein vorstellbarer Prozess. Auch der Befund, dass Bakterien Ceramide aus dem Medium aufnehmen können und in ihre Membran einbauen wäre ein sehr wichtiges Ergebnis und in weiteren Versuchen sollte geklärt werden, welcher biologische Vorteil der Einbau von Ceramiden für Bakterien mit sich bringt. Generell muss nun mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden herausgefunden werden, welche Funktion die Ceramide in den Bakterien erfüllen.

5.3 CD56 ist ein Erkennungsrezeptor für *A. fumigatus*

Unter den rund 200 Arten der Schimmelpilzgattung *Aspergillus*, ist *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) der wichtigste humanpathogene Pilz. Für gesunde Menschen stellen seine Sporen keine große Gefahr dar, bei Menschen mit einem supprimierten Immunsystem kann er jedoch eine invasive Aspergillose auslösen, die oft zum Tod führt [Dagenais & Keller, 2009]. Aus diesem Grund ist es von besonderer Bedeutung genau zu verstehen, wie das Immunsystem bei gesunden Menschen die Ausbreitung des Pilzes verhindert, um mögliche Behandlungsstrategien von Aspergillose-Patienten entwickeln zu können. Da in den letzten Jahren herausgefunden wurde, dass natürliche Killerzellen (NK-Zellen) dabei eine wichtige Rolle spielen [Schmidt et al., 2011; Bouzani et al., 2011; Stuehler et al., 2015], wurde in der Kooperation mit u.a. dem Lehrstuhl für Innere Medizin II der Universität Würzburg die Interaktion zwischen NK-Zellen und *A. fumigatus* näher untersucht. Dabei konnte das Zellmembranprotein CD56 auf den NK-Zellen erstmals als wichtiger Erkennungsrezeptor von *A. fumigatus* identifiziert werden. Es konnte mit LSM- und dSTORM-Messungen gezeigt werden, dass CD56 bei NK-Zellen normalerweise homogen in der Plasmamembran verteilt ist. Bei Inkubation mit *A. fumigatus* akkumuliert das Protein mit der Zeit immer stärker an die Kontaktstelle zu dem Pilz. Dieses Ergebnis ist ein wichtiger Schritt um besser die Abwehr des Immunsystems bei einer *A. fumigatus* Infektion zu verstehen. Die nächsten Schritte werden nun sein, rauszufinden wie die NK-Zellen den Pilz nach der Erkennung schädigen. Schmidt et al. konnten mit molekularbiologischen Methoden zeigen, dass

aktivierte NK-Zellen zytotoxische Granzyme und Perforine ausschütten, die die Pilze schädigen sollen [Schmidt et al., 2011; Bouzani et al., 2011]. Mehr Informationen, besonders darüber ob NK-Zellen Perforin und Granzyme gezielt an der Kontaktstelle ausschütten, könnten mit mikroskopischen Messungen erhalten werden. Um mehr über die Interaktion der NK-Zellen mit *A. fumigatus* zu erfahren, könnten Versuche mit lebenden NK-Zellen, die mit dem Pilz inkubiert werden, durchgeführt werden. Die Zellen könnten dabei mit einer Plasmamembranfärbung markiert werden und die Interaktion über die Zeit entweder mit einem LSM oder SIM beobachtet werden.

5.4 Anti-NMDAR Enzephalitis Autoantikörper

Anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Enzephalitis ist eine immunvermittelte Erkrankung, die durch ihre vielfältigen und unklaren Symptomen oft zu spät erkannt wird und dadurch zum Tod führen kann [Peery et al., 2012]. Die Patienten bilden Autoantikörper gegen die NR1-Untereinheit ihrer eigenen NMDA-Rezeptoren, was dann in einer Internalisierung dieser resultiert [Moscato et al., 2014]. Da die Krankheit erst 2007 erstmals beschrieben wurde [Dalmau et al., 2007], sind noch viele Fragen in der Entstehung und somit auch in der Behandlung offen. Um mehr über die Bindung der Autoantikörper an Neuronen und die Auswirkungen auf die Anzahl der NMDA-Rezeptoren zu erfahren, wurden immunhistochemische Färbungen an hippocampalen Maus-Neuronen und *d*STORM-Messungen dieser etabliert. Dabei wurden Autoantikörper von mehreren Anti-NMDAR Enzephalitis Patienten verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Bindung dieser aufgereinigten Antikörper an NMDA-Rezeptoren überprüft. Dabei konnte durch *d*STORM-Messungen an NR1 bzw. NR2 transfizierte HEK-Zellen eindeutig nachgewiesen werden, dass der Autoantikörper an die NR1-Untereinheit bindet. Dies stimmt mit veröffentlichten Studien überein [Gleichman et al., 2012]. Die Verteilung der Autoantikörper an Neuronen wurde dann mit 2D- und 3D-*d*STORM-Messungen untersucht. Hier konnten zum ersten Mal hochaufgelöste Aufnahmen der Antikörper erzeugt werden und deren Verteilung mit einer ~ 20 nm hohen Auflösung bestimmt werden. Dabei wurde sichtbar, dass die Antikörper zum einen dicht gepackt in den Synapsen vorliegen, aber auch dünner verteilt in den extrasynaptischen Regionen. Basierend auf der Ripley's H-Funktion konnten in den Synapsen große Cluster von ~ 90 nm Durchmesser und extrasynaptisch kleinere Cluster mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ~ 70 nm ausgemacht werden. Die *d*STORM-Daten konnten auch genutzt werden um die ungefähre Anzahl der Lokalisationen von den Antikörpern zu bestimmen. Während in den größeren

Cluster durchschnittlich ~ 500 Lokalisationen gezählt wurden, waren in den kleineren durchschnittlich nur ~ 100 Lokalisationen vorhanden. Die Ergebnisse zeigen, dass *d*STORM eine hervorragende Methode ist, um die Bindung der Autoantikörper zu quantifizieren. Die etablierten Protokolle und ersten *d*STORM-Messungen können nun genutzt werden um weiterführende Versuche durchzuführen. Die Autoantikörper sollen nun mit einer Doppelfärbung von prä- und postsynaptischen Markern hochaufgelöst werden, um die Position der Antikörper besser lokalisieren zu können. Hierfür wurden schon Antikörper gegen das präsynaptische Protein Bassoon und das postsynaptische Protein Homer1 getestet und *d*STORM-Bilder aufgenommen. Das größere Ziel in diesem Projekt ist es Mäusen humane Anti-NMDAR Enzephalitis Antikörper zu injizieren und die Veränderung der NMDA-Rezeptoren mit *d*STORM in Kombination mit Patch-Clamp-Messungen zu analysieren und zu quantifizieren.

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AI	Alexa Fluor
ALEX	alternierende Laseranregung
ASM	saure Sphingomyelinase
Azo-Ceramide	Azid-modifizierte Ceramide
BSA	Bovines Serumalbumin
CB	Zytoskelett-Puffer
CBC	Koordinaten-basierte Colokalisation
CD	engl.: clusters of differentiation
CerC6	C6-Azo-Ceramide
CerC6	C16-Azo-Ceramide
CLSM	konfokale Laser-Raster-Mikroskopie
CMOS	engl.: complementary metal oxide semiconductor chip
CTxB	Choleratoxin B
CRP	Ceramid-reiche Plattform
COT	Cyclooctatetraen
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dSTORM	engl.: <i>direct</i> Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
DOL	Labelgrad
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMCCD	engl.: electron multiplying charge-coupled device
EphB2R	Ephrin-B2 Rezeptor
EPI	Weitfeld Beleuchtung
FA	Formaldehyd
fa	Fettsäure
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FCS	Fetales Kälberserum
FRAP	Fluoreszenzerholung nach Photobleichen
GA	Glutaraldehyd
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HBMEC	mikrovaskuläre Endothelzellen eines menschlichen Gehirns

HBSS	Lösung mit Hank's Salzen
HEK-Zellen	menschliche embryonale Nierenzellen
HILO	engl.: highly inclined and laminated optical sheet
IA	invasive Aspergillose
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Ktr.-IgG	IgG-Antikörper aus gesunden Menschen
LPS	Lipopolysaccharide
MAD	Median der absoluten Abweichung
MCA	morphologische Clusteranalyse
MEA	β-Mercaptoethylamin
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
PALM	engl.: photoactivated localization microscopy
Pat.-IgG	Patienten IgG-Antikörper
PBMC	humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMT	Photomultiplier
PSF	Punktspreizfunktion
ROI	engl.: region of interest
RT	Raumtemperatur
s.e.m.	Standardfehler des Mittelwerts
SIM	engl.: structured illumination microscopy
SM	Sphingomyelin
SMasen	Sphingomyelinasen
SMLM	engl.: single molecule localization microscopy
SOFI	engl.: super-resolution optical fluctuation imaging
STED	engl.: stimulated emission depletion
TIR	Totale interne Reflexion
U2OS-Zellen	humane Osteosarkoma Zellen
WGA	Weizenkeimlektin

Literaturverzeichnis

- Abbe, E.** (1873): Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv f. mikrosk. Anatomie*, 9(1):413–418.
- Abdel Shakor, A.B.;** Kwiatkowska, K.; Sobota, A. (2004): Cell surface ceramide generation precedes and controls FcγRII clustering and phosphorylation in rafts. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35):36778–36787.
- Agard, N.J.;** Prescher, J.A.; Bertozzi, C.R. (2004): A strain-promoted [3 + 2] azide–alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(46):15046–15047.
- Airy, G.B.** (1835): On the diffraction of an object-glass with circular aperture. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*, (5):283–291.
- Alejo, J.L.;** Blanchard, S.C.; Andersen, O.S. (2013): Small-molecule photostabilizing agents are modifiers of lipid bilayer properties. *Biophysical Journal*, 104(11):2410–2418.
- Anderson, R.;** Jacobson, K. (2002): A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*, 296(5574):1821–1825.
- Anderson, R.G.** (1998): The caveolae membrane system. *Annual review of biochemistry*, 67:199–225.
- Andreska, T.;** Aufmkolk, S.; Sauer, M.; Blum, R. (2014): High abundance of BDNF within glutamatergic presynapses of cultured hippocampal neurons. *Front. Cell. Neurosci.*, 8(1):107.
- Annibale, P.;** Vanni, S.; Scarselli, M.; Rothlisberger, U.; Radenovic, A. (2011): Quantitative photo activated localization microscopy: unraveling the effects of photoblinking. *PLoS ONE*, 6(7):e22678.
- Apostolidis, S.A.;** Rodriguez-Rodriguez, N.; Suarez-Fueyo, A.; Dioufa, N.; Ozcan, E.; Crispin, J.C.; Tsokos, M.G.; Tsokos, G.C. (2016): Phosphatase PP2A is requisite for the function of regulatory T cells. *Nature immunology*, 17(5):556–564.
- Atkins, P.W.;** Paula, J. de (2008): Kurzlehrbuch Physikalische Chemie. 4. Auflage. *Wiley-VCH*.
- Avery, J.;** Ellis, D.J.; Lang, T.; Holroyd, P.; Riedel, D.; Henderson, R.M.; Edwardson, J.M.; Jahn, R. (2000): A Cell-Free System for Regulated Exocytosis in Pc12 Cells. *J Cell Biol*, 148(2):317–324.

- Avota, E.;** Gulbins, E.; Schneider-Schaulies, S. (2011): DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. *PLoS pathogens*, 7(2):e1001290.
- Avota, E.;** Müller, N.; Klett, M.; Schneider-Schaulies, S. (2004): Measles virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts. *Journal of Virology*, 78(17):9552–9559.
- Axelrod, D.** (2001): Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology. *Traffic*, 2(11):764–774.
- Axelrod, D.;** Koppel, D.E.; Schlessinger, J.; Elson, E.; Webb, W.W. (1976): Mobility measurements by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysics Journal*, 16(9):1055–1069.
- Babiychuk, E.B.;** Monastyrskaya, K.; Draeger, A. (2008): Fluorescent annexin A1 reveals dynamics of ceramide platforms in living cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(10):1757–1775.
- Baumgart, F.;** Arnold, A.M.; Leskovar, K.; Staszek, K.; Folser, M.; Weghuber, J.; Stockinger, H.; Schutz, G.J. (2016): Varying label density allows artifact-free analysis of membrane-protein nanoclusters. *Nature methods*,
- Ben-Ami, R.;** Lewis, R.E.; Kontoyiannis, D.P. (2010): Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. *British journal of haematology*, 150(4):406–417.
- Bernard, S.C.;** Simpson, N.; Join-Lambert, O.; Federici, C.; Laran-Chich, M.-P.; Maissa, N.; Bouzinba-Segard, H.; Morand, P.C.; Chretien, F.; Taouji, S.; Chevet, E.; Janel, S.; Lafont, F.; Coureuil, M.; Segura, A.; Niedergang, F.; Marullo, S.; Couraud, P.-O.; Nassif, X.; Bourdoulous, S. (2014): Pathogenic *Neisseria meningitidis* utilizes CD147 for vascular colonization. *Nature medicine*, 20(7):725–731.
- Betzig, E.** (1995): Proposed method for molecular optical imaging. *Opt. Lett.*, 20(3):237.
- Betzig, E.;** Patterson, G.H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O.W.; Olenych, S.; Bonifacino, J.S.; Davidson, M.W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H.F. (2006): Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):6172–6176.
- Beyersdorf, N.;** Muller, N. (2015): Sphingomyelin breakdown in T cells: role in activation, effector functions and immunoregulation. *Biological Chemistry*, 396(6-7):749–758.

- Bieberich, E.** (2011): Ceramide in stem cell differentiation and embryo development: novel functions of a topological cell-signaling lipid and the concept of ceramide compartments. *Journal of lipids*, 2011:610306.
- Bokman, S.H.;** Ward, W.W. (1981): Renaturation of Aequorea Green-Fluorescent Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 101(4):1372–1380.
- Bollinger, C.R.;** Teichgräber, V.; Gulbins, E. (2005): Ceramide-enriched membrane domains. *Biochimica et biophysica acta*, 1746(3):284–294.
- Bourg, N.;** Mayet, C.; Dupuis, G.; Barroca, T.; Bon, P.; Lécart, S.; Fort, E.; Lévêque-Fort, S. (2015): Direct optical nanoscopy with axially localized detection. *Nature Photon*, 9(9):587–593.
- Bouzani, M.;** Ok, M.; McCormick, A.; Ebel, F.; Kurzai, O.; Morton, C.O.; Einsele, H.; Loeffler, J. (2011): Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN-gamma release. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(3):1369–1376.
- Boyce, M.;** Bertozzi, C.R. (2011): Bringing chemistry to life. *Nat Meth*, 8(8):638–642.
- Brown, D.A.** (2006): Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology*, 21(6):430–439.
- Burgert, A.;** Letschert, S.; Doose, S.; Sauer, M. (2015): Artifacts in single-molecule localization microscopy. *Histochem Cell Biol*, 144(2):123–131.
- Castro, B.M.;** Silva, L.C.; Fedorov, A.; de Almeida, Rodrigo F M; Prieto, M. (2009): Cholesterol-rich fluid membranes solubilize ceramide domains: implications for the structure and dynamics of mammalian intracellular and plasma membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(34):22978–22987.
- Chance, B.;** Schoener, B.; Oshino, R.; Itshak, F.; Nakasa, Y. (1979): Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(11):4764–4771.
- Charruyer, A.;** Grazide, S.; Bezombes, C.; Muller, S.; Laurent, G.; Jaffrezou, J.-P. (2005): UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(19):19196–19204.
- Chiantia, S.;** Ries, J.; Chwastek, G.; Carrer, D.; Li, Z.; Bittman, R.; Schwille, P. (2008): Role of ceramide in membrane protein organization investigated by combined AFM and FCS. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(5):1356–1364.

- Chmyrov, A.;** Sandén, T.; Widengren, J. (2010): Iodide as a fluorescence quencher and promoter—mechanisms and possible implications. *J. Phys. Chem. B*, 114(34):11282–11291.
- Collenburg, L.;** Walter, T.; Burgert, A.; Muller, N.; Seibel, J.; Japtok, L.; Kleuser, B.; Sauer, M.; Schneider-Schaulies, S. (2016): A Functionalized Sphingolipid Analogue for Studying Redistribution during Activation in Living T Cells. *The Journal of Immunology*, 196(9):3951–3962.
- Condon, E.** (1926): A theory of intensity distribution in band systems. *Physical Review*, 28(6):1182–1201.
- Cooper, M.A.;** Fehniger, T.A.; Caligiuri, M.A. (2001): The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 22(11):633–640.
- Coureuil, M.;** Bourdoulous, S.; Marullo, S.; Nassif, X. (2014): Invasive meningococcal disease: a disease of the endothelial cells. *Trends in Molecular Medicine*, 20(10):571–578.
- Coureuil, M.;** Join-Lambert, O.; Lecuyer, H.; Bourdoulous, S.; Marullo, S.; Nassif, X. (2013): Pathogenesis of meningococemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(6)
- Cowart, L.A.;** Szulc, Z.; Bielawska, A.; Hannun, Y.A. (2002): Structural determinants of sphingolipid recognition by commercially available anti-ceramide antibodies. *The Journal of Lipid Research*, 43(12):2042–2048.
- Coyle, J.T.** (2006): Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cellular and molecular neurobiology*, 26(4-6):365–384.
- Cremesti, A.E.;** Goni, F.M.; Kolesnick, R. (2002): Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts. Do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Letters*, 531(1):47–53.
- Crowley, J.T.;** Toledo, A.M.; LaRocca, T.J.; Coleman, J.L.; London, E.; Benach, J.L. (2013): Lipid exchange between *Borrelia burgdorferi* and host cells. *PLoS pathogens*, 9(1):e1003109.
- Dagenais, T.R.T.;** Keller, N.P. (2009): Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(3):447–465.
- Dalmau, J.;** Tüzün, E.; Wu, H.M.J.R.J.E.; Voloschin, A.; Baehring, J.; Shimazaki, H.; Koide, R.; King, D.; Mason, W.; Sansing, L.H.; Dichter, M.A.; Rosenfeld, M.R.; Lynch, D.R. (2007): Paraneoplastic anti-N-methyl_D_aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol.*, 61(1):25–36.

- Dani, A.;** Huang, B.; Bergan, J.; Dulac, C.; Zhuang, X. (2010): Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron*, 68(5):843–856.
- Deigner, H.P.;** Gulbins, E.; Claus, R.A. (2007): Sphingolipid metabolism in systemic inflammation. *Yearbook of intensive care and emergency medicine*, 2007:249–266.
- Dertinger, T.;** Colyer, R.; Iyer, G.; Weiss, S.; Enderlein, J. (2009): Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI). *PNAS*, 106(52):22287–22292.
- Deschamps, J.;** Mund, M.; Ries, J. (2014): 3D superresolution microscopy by supercritical angle detection. *Optics Express*, 22(23):29081–29091.
- Dickson, R.M.;** Cubitt, A.B.; Tsien, R.Y.; Moerner, W.E. (1997): On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 388(6640):355–358.
- Duan, R.-D.;** Cheng, Y.; Hansen, G.; Hertervig, E.; Liu, J.-J.; Syk, I.; Sjostrom, H.; Nilsson, A. (2003): Purification, localization, and expression of human intestinal alkaline sphingomyelinase. *Journal of lipid research*, 44(6):1241–1250.
- Durisic, N.;** Laparra-Cuervo, L.; Sandoval-Alvarez, A.; Borbely, J.S.; Lakadamyali, M. (2014): Single-molecule evaluation of fluorescent protein photoactivation efficiency using an in vivo nanotemplate. *Nature methods*, 11(2):156–162.
- Eddidin, M.** (2001): Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends in Cell Biology*, 11(12):492–496.
- Ehmann, N.;** van de Linde, S.; Alon, A.; Ljaschenko, D.; Keung, X.Z.; Holm, T.; Rings, A.; DiAntonio, A.; Hallermann, S.; Ashery, U.; Heckmann, M.; Sauer, M.; Kittel, R.J. (2014): Quantitative super-resolution imaging of Bruchpilot distinguishes active zone states. *Nat Comms*, 5
- Esen, M.;** Schreiner, B.; Jendrossek, V.; Lang, F.; Fassbender, K.; Grassmé, H.; Gulbins, E. (2001): Mechanisms of Staphylococcus aureus induced apoptosis of human endothelial cells. *APOPTOSIS*, 6(6):431–439.
- Evans, D.F.** (1957): Perturbation of singlet-triplet transitions of aromatic molecules by oxygen under pressure. *Journal of the Chemical Society*:1351–1357.
- Faulstich, M.;** Hagen, F.; Avota, E.; Kozjak-Pavlovic, V.; Winkler, A.-C.; Xian, Y.; Schneider-Schaulies, S.; Rudel, T. (2015): Neutral sphingomyelinase 2 is a key factor for PorB-dependent invasion of Neisseria gonorrhoeae. *Cellular microbiology*, 17(2):241–253.

- Fischer, C.E.;** Golas, A.C.; Schweizer, T.A.; Munoz, D.G.; Ismail, Z.; Qian, W.; Tang-Wai, D.F.; Rotstein, D.L.; Day, G.S. (2016): Anti N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: a game-changer? *Expert review of neurotherapeutics*, 16(7):849–859.
- Franck, J.** (1926): Elementary process of photochemical reactions. *Trans. Faraday Soc.*, 21:536–542.
- Fricke, F.;** Malkusch, S.; Wangorsch, G.; Greiner, J.F.; Kaltschmidt, B.; Kaltschmidt, C.; Widera, D.; Dandekar, T.; Heilemann, M. (2014): Quantitative single-molecule localization microscopy combined with rule-based modeling reveals ligand-induced TNF-R1 reorganization toward higher-order oligomers. *Histochem Cell Biol*, 142(1):91–101.
- Frisz, J.F.;** Lou, K.; Klitzing, H.A.; Hanafin, W.P.; Lizunov, V.; Wilson, R.L.; Carpenter, K.J.; Kim, R.; Hutcheon, I.D.; Zimmerberg, J.; Weber, P.K.; Kraft, M.L. (2013): Direct chemical evidence for sphingolipid domains in the plasma membranes of fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8):E613-E622.
- Gabutti, G.;** Stefanati, A.; Kuhdari, P. (2015): Epidemiology of Neisseria meningitidis infections: case distribution by age and relevance of carriage. *JPMH*, 56(3):116–120.
- Gautier, A.;** Juillerat, A.; Heinis, C.; Corrêa, I.R.; Kindermann, M.; Beaufils, F.; Johnsson, K. (2008): An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chemistry & Biology*, 15(2):128–136.
- Gell, C.;** Brockwell, D.; Smith, A. (2006): Handbook of single molecule fluorescence spectroscopy. Auflage. *Oxford University Press*.
- Gleichman, A.J.;** Spruce, L.A.; Dalmau, J.; Seeholzer, S.H.; Lynch, D.R. (2012): Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. *Journal of Neuroscience*, 32(32):11082–11094.
- Grassme, H.;** Cremesti, A.; Kolesnick, R.; Gulbins, E. (2003a): Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene*, 22(35):5457–5470.
- Grassme, H.;** Jekle, A.; Riehle, A.; Schwarz, H.; Berger, J.; Sandhoff, K.; Kolesnick, R.; Gulbins, E. (2001): CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(23):20589–20596.
- Grassme, H.;** Jendrossek, V.; Bock, J.; Riehle, A.; Gulbins, E. (2002): Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *The Journal of Immunology*, 168(1):298–307.

- Grassme, H.;** Jendrossek, V.; Riehle, A.; Kurthy, G. von; Berger, J.; Schwarz, H.; Weller, M.; Kolesnick, R.; Gulbins, E. (2003b): Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nature medicine*, 9(3):322–330.
- Grassme, H.;** Riehle, A.; Wilker, B.; Gulbins, E. (2005): Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(28):26256–26262.
- Grassmé, H.;** Gulbins, E.; Brenner, B.; Ferlinz, K.; Sandhoff, K.; Harzer, K.; Lang, F.; Meyer, T.F. (1997): Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell*, 91(5):605–615.
- Gulbins, E.;** Li, P.L. (2006): Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 290(1):R11-R26.
- Gustafsson, M.** (2000): Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, 198(2):82–87.
- Gustafsson, M.G.;** Shao, L.; Carlton, P.M.; Wang, C.J.R.; Golubovskaya, I.N.; Cande, W.Z.; Agard, D.A.; Sedat, J.W. (2008): Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophysical Journal*, 94(12):4957–4970.
- Gustafsson, M.G.L.** (2005): Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *PNAS*, 102(37):13081–13086.
- Hannun, Y.A.;** Obeid, L.M. (2002): The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29):25847–25850.
- Hannun, Y.A.;** Obeid, L.M. (2008): Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2):139–150.
- Haque, M.;** Hirai, Y.; Yokota, K.; Oguma, K. (1995): Steryl glycosides: a characteristic feature of the heliobacter spp.? *Journal of Bacteriology*, 177(18):5334–5337.
- Hardingham, G.E.;** Bading, H. (2010): Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 11(10):682–696.
- Harrison, L.H.;** Trotter, C.L.; Ramsay, M.E. (2009): Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*, 27 Suppl 2:B51-63.

- Hauck, C.R.;** Grassmé, H.; Bock, J.; Jendrossek, V.; Ferlinz, K.; Meyer, T.F.; Gulbins, E. (2000): Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Letters*, 478(3):260–266.
- Heerklotz, H.** (2002): Triton Promotes Domain Formation in Lipid Raft Mixtures. *Biophysical Journal*, 83(5):2693–2701.
- Heilemann, M.;** Margeat, E.; Kasper, R.; Sauer, M.; Tinnefeld, P. (2005): Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch. *Journal of the American Chemical Society*, 127(11):3801–3806.
- Heilemann, M.;** van de Linde, S.; Mukherjee, A.; Sauer, M. (2009): Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48(37):6903–6908.
- Heilemann, M.;** van de Linde, S.; Schüttpelz, M.; Kasper, R.; Seefeldt, B.; Mukherjee, A.; Tinnefeld, P.; Sauer, M. (2008): Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47(33):6172–6176.
- Heintzmann, R.** (2003): Saturated patterned excitation microscopy with two-dimensional excitation patterns. *Micron*, 34(6-7):283–291.
- Hell, S.;** Wichmann, J. (1994): Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 19(11):780–782.
- Hess, S.T.;** Girirajan, T.P.; Mason, M.D. (2006): Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal*, 91(11):4258–4272.
- Hess, S.T.;** Huang, S.; Heikal, A.A.; Webb, W.W. (2002): Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review. *Biochemistry*, 41(3):697–705.
- Hoffmann, I.;** Eugene, E.; Nassif, X.; Couraud, P.O.; Bourdoulous, S. (2001): Activation of ErbB2 receptor tyrosine kinase supports invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *The Journal of Cell Biology*, 155(1):133–143.
- Holden, S.J.;** Uphoff, S.; Kapanidis, A.N. (2011): DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy. *Nature methods*, 8(4):279–280.
- Holopainen, J.M.;** Subramanian, M.; Kinnunen, P.K. (1998): Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. *Biochemistry*, 37(50):17562–17570.

- Huang, B.;** Wang, W.; Bates, M.; Zhuang, X. (2008): Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5864):810–813.
- Huisgen, R.** (1963): 1.3-Dipolare Cycloadditionen Rückschau und Ausblick. *Angew. Chem.*, 75(13):604–637.
- Kapanidis, A.N.;** Laurence, T.A.; Lee, N.K.; Margeat, E.; Kong, X.; Weiss, S. (2005): Alternating-laser excitation of single molecules. *Acc. Chem. Res.*, 38(7):523–533.
- Karakas, E.;** Furukawa, H. (2014): Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science*, 344(6187):992–997.
- Kenworthy, A.K.;** Petranova, N.; Edidin, M. (2000): High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Molecular Biology of the Cell*, 11:1645–1655.
- Keppler, A.;** Gendreizig, S.; Gronemeyer, T.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K. (2002): A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol*, 21(1):86–89.
- Kiskowski, M.A.;** Hancock, J.F.; Kenworthy, A.K. (2009): On the use of Ripley's K-function and its derivatives to analyze domain size. *Biophysical Journal*, 97(4):1095–1103.
- Klehs, K.;** Spahn, C.; Endesfelder, U.; Lee, S.F.; Fürstenberg, A.; Heilemann, M. (2014): Increasing the brightness of cyanine fluorophores for single-molecule and superresolution imaging. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 15(4):637–641.
- Klein, T.;** Loschberger, A.; Proppert, S.; Wolter, S.; van de Linde, S.; Sauer, M. (2011): Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins. *Nature methods*, 8(1):7–9.
- Kolter, T.;** Proia, R.L.; Sandhoff, K. (2002): Combinatorial ganglioside biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29):25859–25862.
- Kornhuber, J.;** Müller, C.P.; Becker, K.A.; Reichel, M.; Gulbins, E. (2014): The ceramide system as a novel antidepressant target. *Trends in pharmacological sciences*, 35(6):293–304.
- Korobov, V.E.;** Chibisov, A.K. (1983): Primary photoprocesses in colorant molecules. *Russian Chemical Reviews*, 52(1):43–71.
- Krishnamurthy, K.;** Dasgupta, S.; Bieberich, E. (2007): Development and characterization of a novel anti-ceramide antibody. *The Journal of Lipid Research*, 48(4):968–975.

- Kuerschner, L.;** Ejsing, C.S.; Ekroos, K.; Shevchenko, A.; Anderson, K.I.; Thiele, C. (2005): Polyene-lipids: a new tool to image lipids. *Nature methods*, 2(1):39–45.
- Kusumi, A.;** Suzuki, K. (2005): Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1746(3):234–251.
- Labhart, H.;** Heinzelmann, W. (1973): Triplet-triplet absorption spectra of organic molecules. *Organic Molecular Photophysics*, 1:297–355.
- Lakowicz, J.R.** (2006): Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3. Auflage. *Springer*.
- Lambotin, M.;** Hoffmann, I.; Laran-Chich, M.-P.; Nassif, X.; Couraud, P.O.; Bourdoulous, S. (2005): Invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis* requires cortactin recruitment by a phosphoinositide-3-kinase/Rac1 signalling pathway triggered by the lipo-oligosaccharide. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 16):3805–3816.
- Lamoth, F.** (2016): *Aspergillus fumigatus*-related species in clinical practice. *Frontiers in microbiology*, 7(154):683.
- LaRocca, T.J.;** Crowley, J.T.; Cusack, B.J.; Pathak, P.; Benach, J.; London, E.; Garcia-Monco, J.C.; Benach, J.L. (2010): Cholesterol lipids of *Borrelia burgdorferi* form lipid rafts and are required for the bactericidal activity of a complement-independent antibody. *Cell host & microbe*, 8(4):331–342.
- Lee, S.-H.;** Shin, J.Y.; Lee, A.; Bustamante, C. (2012): Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(43):17436–17441.
- Letschert, S.;** Göhler, A.; Franke, C.; Bertleff-Zieschang, N.; Memmel, E.; Doose, S.; Seibel, J.; Sauer, M. (2014): Super-resolution imaging of plasma membrane glycans. *Angew. Chem.*, 53(41):10921–10924.
- Lin, M.;** Rikihisa, Y. (2003): *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for Lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infection and Immunity*, 71(9):5324–5331.
- Liphardt, B.;** Liphardt, B.; Lüttke, W. (1982): Laserfarbstoffe mit intramolekularer Triplettlöschung. *Chemische Berichte*, 115:2997–3010.
- Lippincott-Schwartz, J.;** Patterson, G.H. (2003): Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 300(5616):87–91.

- Lippincott-Schwartz, J.;** Patterson, G.H. (2009): Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging. *Trends in Cell Biology*, 19(11):555–565.
- London, E.;** Brown, D.A. (2000): Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *BBA*, 1508(1-2):182–195.
- Lopez, D.;** Kolter, R. (2010): Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes & development*, 24(17):1893–1902.
- Löschberger, A.;** Franke, C.; Krohne, G.; van de Linde, S.; Sauer, M. (2014a): Correlative super-resolution fluorescence and electron microscopy of the nuclear pore complex with molecular resolution. *Journal of Cell Science*, 127(20):4351–4355.
- Löschberger, A.;** Niehörster, T.; Sauer, M. (2014b): Click chemistry for the conservation of cellular structures and fluorescent proteins. *ClickOx. Biotechnology Journal*, 9(5):693–697.
- Mace, E.M.;** Gunesch, J.T.; Dixon, A.; Orange, J.S. (2016): Human NK cell development requires CD56-mediated motility and formation of the developmental synapse. *Nature communications*, 7:12171.
- Magde, D.;** Elson, E.; Webb, W.W. (1972): Thermodynamic fluctuations in a reacting system-measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29(11):705–708.
- Magenau, A.;** Owen, D.M.; Yamamoto, Y.; Tran, J.; Kwiatek, J.M.; Parton, R.G.; Gaus, K. (2015): Discreet and distinct clustering of five model membrane proteins revealed by single molecule localization microscopy. *Molecular Membrane Biology*, 32(1):11–18.
- Malkusch, S.;** Endesfelder, U.; Mondry, J.; Gelléri, M.; Verveer, P.J.; Heilemann, M. (2012): Coordinate-based colocalization analysis of single-molecule localization microscopy data. *Histochem Cell Biol*, 137(1):1–10.
- Malkusch, S.;** Heilemann, M. (2016): Extracting quantitative information from single-molecule super-resolution imaging data with LAMA – LocAlization Microscopy Analyzer. *Sci. Rep.*, 6:34486.
- Malkusch, S.;** Muranyi, W.; Müller, B.; Kräusslich, H.-G.; Heilemann, M. (2013): Single-molecule coordinate-based analysis of the morphology of HIV-1 assembly sites with near-molecular spatial resolution. *Histochem Cell Biol*, 139(1):173–179.

- Manders, E.M.M.;** Verbeek, F.J.; Aten, J.A. (1993): Measurements of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*, 169(3):375–382.
- Mikasova, L.;** Rossi, P. de; Bouchet, D.; Georges, F.; Rogemond, V.; Didelot, A.; Meissirel, C.; Honnorat, J.; Groc, L. (2012): Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain*, 135(5):1606–1621.
- Minamino, M.;** Sakaguchi, I.; Naka, T.; Ikeda, N.; Kato, Y.; Tomiyasu, I.; Yano, I.; Kobayashi, K. (2003): Bacterial ceramides and sphingophospholipids induce apoptosis of human leukaemic cells. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 8):2071–2081.
- Minsky, M.** (1957): Microscopy apparatus, US Patent 3,013,467.
- Moerner, W.E.;** Kador, L. (1989): Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Physical Review Letters*, 62(21):2535–2538.
- Morad, S.A.F.;** Cabot, M.C. (2013): Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature reviews. Cancer*, 13(1):51–65.
- Morton, C.O.;** Fliesser, M.; Dittrich, M.; Mueller, T.; Bauer, R.; Kneitz, S.; Hope, W.; Rogers, T.R.; Einsele, H.; Loeffler, J. (2014): Gene expression profiles of human dendritic cells interacting with *Aspergillus fumigatus* in a bilayer model of the alveolar epithelium/endothelium interface. *PLoS ONE*, 9(5):e98279.
- Moscato, E.H.;** Peng, X.; Jain, A.; Parsons, T.D.; Dalmau, J.; Balice-Gordon, R.J. (2014): Acute mechanisms underlying antibody effects in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Ann Neurol.*, 76(1):108–119.
- Mukherjee, S.;** Raghuraman, H.; Dasgupta, S.; Chattopadhyay, A. (2004): Organization and dynamics of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids. A fluorescence approach. *Chemistry and Physics of Lipids*, 127(1):91–101.
- Munro, S.** (2003): Lipid rafts: elusive or illusive. *Cell*, 115(4):377–388.
- Nair, D.;** Hosy, E.; Petersen, J.D.; Constals, A.; Giannone, G.; Choquet, D.; Sibarita, J.-B. (2013): Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors Inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. *Journal of Neuroscience*, 33(32):13204–13224.
- Nassif, X.** (1999): Interaction mechanisms of encapsulated meningococci with eucaryotic cells: what does this tell us about the crossing of the blood–brain barrier by *Neisseria meningitidis*? *Curr Opin Microbiol*, 2(1):71–77.

- Neupane, B.;** Liger, F.S.; Wang, G. (2014): Review of recent developments in stimulated emission depletion microscopy: applications on cell imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 19(8):080901-1-080901-9.
- Nichols, B.J.** (2003): GM1-containing lipid rafts are depleted within clathrin-coated pits. *Current Biology*, 13(8):686–690.
- Nicolson, G.L.** (2015): Cell membrane fluid-mosaic structure and cancer metastasis. *Cancer research*, 75(7):1169–1176.
- Nienhaus, K.;** Nienhaus, G.U.; Wiedenmann, J.; Nar, H. (2005): Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26):9156–9159.
- Nikulin, J.;** Panzner, U.; Frosch, M.; Schubert-Unkmeir, A. (2006): Intracellular survival and replication of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 296(8):553–558.
- O’Gorman, C.M.;** Fuller, H.T.; Dyer, P.S. (2009): Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457(7228):471–474.
- Ohtsubo, K.;** Marth, J.D. (2006): Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126(5):855–867.
- Pappalardo, R.** (1970): Long pulse laser emission from rhodamine 6 G using cyclooctatetraene. *Appl. Phys. Lett.*, 16(7):267.
- Patterson, G.H.;** Lippincott-Schwartz, J. (2002): A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5588):1873–1877.
- Pearson, K.** (1896): Mathematical contributions to the theory of evolution. On a form of superous correlation which may arise when indices are used in the measurement of organs. *Proc. R. Soc. Lond.*, 60(1):489–498.
- Peery, H.E.;** Day, G.S.; Dunn, S.; Fritzler, M.J.; Pruss, H.; Souza, C. de; Doja, A.; Mossman, K.; Resch, L.; Xia, C.; Sakic, B.; Belbeck, L.; Foster, W.G. (2012): Anti-NMDA receptor encephalitis. The disorder, the diagnosis and the immunobiology. *Autoimmunity reviews*, 11(12):863–872.
- Planaguma, J.;** Haselmann, H.; Mannara, F.; Petit-Pedrol, M.; Grunewald, B.; Aguilar, E.; Ropke, L.; Martin-Garcia, E.; Titulaer, M.J.; Jercog, P.; Graus, F.; Maldonado, R.; Geis, C.; Dalmau, J. (2016): Ephrin-B2 prevents N-methyl-D-aspartate receptor antibody effects on memory and neuroplasticity. *Annals of neurology*,

- Pron, B.;** Taha, M.-K.; Rambaud, C.; Fournet, J.-C.; Pattey, N.; Monnet, J.-P.; Musilek, M.; Beretti, J.-L.; Nassif, X. (1997): Interaction of *Neisseria meningitidis* with the Components of the Blood-Brain Barrier Correlates with an Increased Expression of PilC. *The Journal of infectious diseases*, 176(5):1285–1292.
- Proppert, S.;** Wolter, S.; Holm, T.; Klein, T.; van de Linde, S.; Sauer, M. (2014): Cubic B-spline calibration for 3D super-resolution measurements using astigmatic imaging. *Opt. Express*, 22(9):10304.
- Puchner, E.M.;** Walter, J.M.; Kasper, R.; Huang, B.; Lim, W.A. (2013): Counting molecules in single organelles with superresolution microscopy allows tracking of the endosome maturation trajectory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40):16015–16020.
- Purves, W.K.;** Sadava, D.; Orians, G.H.; Heller, H.C. (2006): *Biologie*. 7. Auflage. *Spektrum*.
- Raghupathy, R.;** Anilkumar, A.A.; Polley, A.; Singh, P.P.; Yadav, M.; Johnson, C.; Suryawanshi, S.; Saikam, V.; Sawant, S.D.; Panda, A.; Guo, Z.; Vishwakarma, R.A.; Rao, M.; Mayor, S. (2015): Transbilayer lipid interactions mediate nanoclustering of lipid-anchored proteins. *Cell*, 161(3):581–594.
- Rayleigh, J.W.S.** (1896): On the theory of optical images, with special reference to the microscope. *Philosophical Magazine Series 5*, 42(255):167–195.
- Rego, E.H.;** Shao, L.; Macklin, J.J.; Winoto, L.; Johansson, G.A.; Kamps-Hughes, N.; Davidson, M.W.; Gustafsson, M.G.L. (2012): Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(3):E135-E143.
- Renz, M.;** Daniels, B.R.; Vamosi, G.; Arias, I.M.; Lippincott-Schwartz, J. (2012): Plasticity of the asialoglycoprotein receptor deciphered by ensemble FRET imaging and single-molecule counting PALM imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44):E2989-97.
- Rigler, R.;** Mets, Ü.; Widengren, J.; Kask, P. (1993): Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background. Analysis of translational diffusion. *Eur Biophys J*, 22(3):169–175.
- Ripley, B.D.** (1977): Modelling spatial patterns. *Journal of the Royal Statistical Society*, 39(2):172–212.

- Rode, M.;** Berg, T.; Gjøen, T. (1997): Effect of Temperature on Endocytosis and Intracellular Transport in the Cell Line SHK-1 Derived from Salmon Head Kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117(4):531–537.
- Rostovtsev, V.V.;** Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. (2002): A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem.*, 114(14):2708–2711.
- Rothbauer, U.;** Zolghadr, K.; Tillib, S.; Nowak, D.; Schermelleh, L.; Gahl, A.; Backmann, N.; Conrath, K.; Muyldermans, S.; Cardoso, M.C.; Leonhardt, H. (2006): Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Meth*, 3(11):887–889.
- Saka, S.K.;** Honigmann, A.; Eggeling, C.; Hell, S.W.; Lang, T.; Rizzoli, S.O. (2014): Multi-protein assemblies underlie the mesoscale organization of the plasma membrane. *Nat Comms*, 5:4509.
- Sauer, M.;** Hofkens, J.; Enderlein, J. (2011): Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging. From single molecules to ensembles. 1. Auflage. *Wiley-VCH*.
- Schäfer, P.;** van de Linde, S.; Lehmann, J.; Sauer, M.; Doose, S. (2013): Methylene blue- and thiol-based oxygen depletion for super-resolution imaging. *Analytical chemistry*, 85(6):3393–3400.
- Scheuerpflug, I.;** Rudel, T.; Ryll, R.; Pandit, J.; Meyer, T.F. (1999): Roles of PilC and PilE proteins in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells. *Infection and Immunity*, 67(2):834–843.
- Schmidt, S.;** Tramsen, L.; Hanisch, M.; Latge, J.-P.; Huenecke, S.; Koehl, U.; Lehrnbecher, T. (2011): Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia. *The Journal of infectious diseases*, 203(3):430–435.
- Schroeder, R.J.;** Ahmed, S.N.; Zhu, Y.; London, E.; Brown, D.A. (1998): Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2):1150–1157.
- Schuster, I.S.;** Coudert, J.D.; Andoniou, C.E.; Degli-Esposti, M.A. (2016): "Natural regulators": NK Cells as modulators of T cell immunity. *Frontiers in immunology*, 7:235.

- Schwille, P.;** Haustein, E. (2004): Fluorescence Correlation Spectroscopy: An introduction to its concepts and applications. *Online Biophysics Textbook*:1–33.
- Segal, B.H.** (2009): Aspergillosis. *The New England Journal of Medicine*, 360(18):1870–1884.
- Sengupta, P.;** Jovanovic-Talisman, T.; Skoko, D.; Renz, M.; Veatch, S.L.; Lippincott-Schwartz, J. (2011): Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis. *Nat Meth*, 8(11):969–975.
- Shannon, C.E.** (1949): Communication in the presence of noise. *Proc Inst Radio Eng*, 37(1):10–21.
- Shaw, J.E.;** Epanand, R.F.; Epanand, R.M.; Li, Z.; Bittman, R.; Yip, C.M. (2006): Correlated fluorescence-atomic force microscopy of membrane domains: structure of fluorescence probes determines lipid localization. *Biophysical Journal*, 90(6):2170–2178.
- Shcherbakova, D.M.;** Verkhusha, V.V. (2014): Chromophore chemistry of fluorescent proteins controlled by light. *Current opinion in chemical biology*, 20:60–68.
- Simonis, A.;** Hebling, S.; Gulbins, E.; Schneider-Schaulies, S.; Schubert-Unkmeir, A.; Tang, C. (2014): Differential activation of acid sphingomyelinase and ceramide release determines invasiveness of *Neisseria meningitidis* into brain endothelial cells. *PLoS Pathog*, 10(6):e1004160.
- Simons, K.;** Ikonen, E. (1997): Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633):569–572.
- Singer, S.J.;** Nicolson, G.L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023):720–731.
- Singh, N.;** Paterson, D.L. (2005): Aspergillus infections in transplant recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1):44–69.
- Sletten, E.M.;** Bertozzi, C.R. (2009): Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48(38):6974–6998.
- Small, J.V.;** Rottner, K.; Hahne, P.; Anderson, K.I. (1999): Visualising the actin cytoskeleton. *Microscopy Research and Technique*, 47(1):3–17.
- Smith, P.F.** (1971): Biosynthesis of cholesteryl glucoside by *Mycoplasmata gallinarum*. *Journal of Bacteriology*, 108(3):986–991.
- Snively, B.B.;** Schäfer, F.P. (1969): Feasibility of CW Operation of Dye-Lasers. *Physics Letters*, 28A(11):728–729.

- Stancevic, B.;** Kolesnick, R. (2010): Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. *FEBS Letters*, 584(9):1728–1740.
- Steinmetz, M.O.;** Stoffler, D.; Müller, S.A.; Jahn, W.; Wolpensinger, B.; Goldie, K.N.; Engel, A.; Faulstich, H.; Aebi, U. (1998): Evaluating atomic models of F-actin with an undecagold-tagged phalloidin derivative. *J. Mol. Biol.*, 276(1):1–6.
- Stokes, G.G.** (1852): On the change of refrangibility of light. *Royal Society of London Philosophical Transactions Series I*, (142):463–562.
- Stuehler, C.;** Kuenzli, E.; Jaeger, V.K.; Baettig, V.; Ferracin, F.; Rajacic, Z.; Kaiser, D.; Bernardini, C.; Forrer, P.; Weisser, M.; Elzi, L.; Battegay, M.; Halter, J.; Passweg, J.; Khanna, N. (2015): Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and association with occurrence and outcome of invasive Aspergillosis. *The Journal of infectious diseases*, 212(6):959–967.
- Suppan, P.** (1994): Chemistry and light. 1. Auflage. *Royal Society of Chemistry*.
- Tanaka, K.A.K.;** Suzuki, K.G.N.; Shirai, Y.M.; Shibutani, S.T.; Miyahara, M.S.H.; Tsuboi, H.; Yahara, M.; Yoshimura, A.; Mayor, S.; Fujiwara, T.K.; Kusumi, A. (2010): Membrane molecules mobile even after chemical fixation. *Nat Meth*, 7(11):865–866.
- Teale, F.;** Weber, G. (1957): Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochemical Journal*, 65(3):476–482.
- Thaddeus, M.** (2001): The search for Brachyspira outer membrane proteins that interact with the host. *Internat. Math. Res. Notices*, 2001(22):1169.
- Thompson, R.E.;** Larson, D.R.; Webb, W.W. (2002): Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical Journal*, 82(5):2775–2783.
- Tokunaga, M.;** Imamoto, N.; Sakata-Sogawa, K. (2008): Addendum. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat Meth*, 5(5):455.
- Toledo, A.;** Crowley, J.T.; Coleman, J.L.; LaRocca, T.J.; Chiantia, S.; London, E.; Benach, J.L. (2014): Selective association of outer surface lipoproteins with the lipid rafts of *Borrelia burgdorferi*. *mBio*, 5(2):e00899-14.
- Tornøe, C.W.;** Christensen, C.; Meldal, M. (2002): Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.*, 67(9):3057–3064.
- Turro, N.J.;** Ramamurthy, V.; Scaiano, J.C. (2009): Principles of molecular photochemistry. An introduction. Auflage. *University Science Books*.

- Unkmeir, A.;** Latsch, K.; Dietrich, G.; Wintermeyer, E.; Schinke, B.; Schwender, S.; Kim, K.S.; Eigenthaler, M.; Frosch, M. (2002): Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Molecular Microbiology*, 46(4):933–946.
- van Blitterswijk, W.J.;** van der Luit, A.H.; Veldman, R.J.; Verheij, M.; Borst, J. (2003): Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *The Biochemical journal*, 369(2):199–211.
- van de Linde, S.;** Löscherger, A.; Klein, T.; Heidebreder, M.; Wolter, S.; Heilemann, M.; Sauer, M. (2011): Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc*, 6(7):991–1009.
- van de Linde, S.;** Sauer, M. (2014): How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching. *Chem. Soc. Rev.*, 43(4):1076–1087.
- van de Linde, S.;** Wolter, S.; Heilemann, M.; Sauer, M. (2010): The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging. *Journal of Biotechnology*, 149(4):260–266.
- Vereb, G.;** Szöllösi, J.; Matko, J.; Nagy, P.; Farakas, T.; Vigh, L.; Matyus, L.; Waldmann, T.A.; Damjanovich, S. (2003): Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. *PNAS*, 100(14):8053–8058.
- Warburg, O.;** Christian, W. (1932): A new oxidation enzyme and its absorption spectrum. *Biochem. Z.*, 254:438.
- Weber, K.;** Rathke, P.C.; Osborn, M. (1978): Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75(4):1820–1824.
- Werner, C.;** Pauli, M.; Doose, S.; Weishaupt, A.; Haselmann, H.; Grunewald, B.; Sauer, M.; Heckmann, M.; Toyka, K.V.; Asan, E.; Sommer, C.; Geis, C. (2016): Human autoantibodies to amphiphysin induce defective presynaptic vesicle dynamics and composition. *Brain*, 139(Pt 2):365–379.
- Whelan, D.R.;** Bell, T.D.M. (2015): Image artifacts in single molecule localization microscopy: why optimization of sample preparation protocols matters. *Sci. Rep.*, 5:7924.
- Wiedenmann, J.;** Ivanchenko, S.; Oswald, F.; Schmitt, F.; Röcker, C.; Salih, A.; Spindler, K.-D.; Nienhaus, G.U. (2004): EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *PNAS*, 101(45):15905–15910.

- Williamson, D.J.;** Owen, D.M.; Rossy, J.; Magenau, A.; Wehrmann, M.; Gooding, J.J.; Gaus, K. (2011): Pre-existing clusters of the adaptor Lat do not participate in early T cell signaling events. *Nat Immunol*, 12(7):655–662.
- Wolter, S.;** Endesfelder, U.; van de Linde, S.; Heilemann, M.; Sauer, M. (2011): Measuring localization performance of super-resolution algorithms on very active samples. *Optics Express*, 19(8):7020–7033.
- Wolter, S.;** Löschberger, A.; Holm, T.; Aufmkolk, S.; Dabauvalle, M.-C.; van de Linde, S.; Sauer, M. (2012): rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat Meth*, 9(11):1040–1041.
- Wolter, S.;** Schüttpelz, M.; Tscherepanow, M.; van de Linde, S.; Heilemann, M.; Sauer, M. (2010): Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images. *Journal of Microscopy*, 237(1):12–22.
- Yano, I.;** Imaizumi, S.; Tomiyasu, I.; Yabuuchi, E. (1983): Separation and analysis of free ceramides containing 2-hydroxy fatty acids in *Sphingobacterium* species. *FEMS Microbiology Letters*, 20(3):449–453.
- Zessin, P.J.;** Finan, K.; Heilemann, M. (2012): Super-resolution fluorescence imaging of chromosomal DNA. *Journal of Structural Biology*, 177(2):344–348.
- Zhang, R.-G.;** Scott, D.L.; Westbrook, M.L.; Nance, S.; Spangler, B.D.; Shipley, G.G.; Westbrook, E.M. (1995): The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *J. Mol. Biol.*, 251(4):563–573.
- Zheng, Q.;** Jockusch, S.; Rodríguez-Calero, G.G.; Zhou, Z.; Zhao, H.; Altman, R.B.; Abruña, H.D.; Blanchard, S.C. (2016): Intra-molecular triplet energy transfer is a general approach to improve organic fluorophore photostability. *Photochemical & photobiological sciences*, 15(2):196–203.
- Zheng, Q.;** Jockusch, S.; Zhou, Z.; Altman, R.B.; Warren, J.D.; Turro, N.J.; Blanchard, S.C. (2012): On the mechanisms of cyanine fluorophore photostabilization. *J. Phys. Chem. Lett.*, 3(16):2200–2203.
- Ziegler, S.;** Weiß, E.; Schmitt, A.-L.; Schlegel, J.; Burgert, A.; Terpitz, U.; Sauer, M.; Moretta, L.; Sivori, S.; Kurzai, O.; Einsele, H.; Loeffler, J. (2016): Human natural killer cells interact with *Aspergillus fumigatus* hyphae through the receptor CD56. *eingereicht bei The Journal of Allergy and Clinical Immunology.*

Eigene Publikationen

Burgert, Anne; Letschert, Sebastian; Doose, Sören; Sauer, Markus (2015): Artifacts in single molecule localization microscopy. *Histochemistry and Cell Biology*. 144(2):123-131. <http://link.springer.com/article/10.1007/s00418-015-1340-4>.

Collenburg, Lena; Walter, Tim; **Burgert, Anne;** Müller, Nora; Jürgen, Seibel; Lukasz, Japtok; Kleuser, Burkhard; Sauer, Markus; Schneider-Schaulies, Sybille (2015): A functionalized sphingolipid analogue for studying redistribution during activation in living T cells. *The Journal of Immunology*. 196(9):3951-62. <http://www.jimmunol.org/content/196/9/3951.full?sid=594798b4-66d2-4e15-ba63-ec75e411e66f>.

Burgert, Anne; Becam, Jerome, Bieberich, Erhard; Schubert-Unkmeir, Alexandra; Sauer, Markus: Characterization of plasma membrane ceramides by super-resolution microscopy. Eingereicht bei *PNAS*.

Ziegler, Sabrina; Weiß, Esther; Schmitt, Anna-Lena; Schlegel, Jan; **Burgert, Anne;** Terpitz, Ulrich; Sauer, Markus; Moretta, Lorenzo; Sivori Simona; Kurzai, Oliver; Einsele, Hermann, Löffler, Jürgen: Human natural killer cells interact with *Aspergillus fumigatus* hyphae through the receptor CD56. Eingereicht bei *Scientific Reports*.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Markus Sauer dafür bedanken, dass er mich in seinen Lehrstuhl aufgenommen hat. Danke für deine Unterstützung und dass du dazu beiträgst, dass man gerne zur Arbeit geht.

Ich danke auch Alexandra Schubert-Unkmeir dafür, dass sie sich bereit erklärt hat Zweitgutachterin für diese Arbeit zu sein. Danke auch für die tolle Zusammenarbeit im Ceramid-Projekt – ich habe sehr gerne mit euch kooperiert!

Während meiner Doktorarbeit durfte ich mit einer Reihe von Menschen aus anderen Lehrstühlen kooperieren: Danke an alle aus dem Hans-Berger Lehrstuhl für Neurologie der Universitätsklinik Jena besonders dafür, dass ihr mich in Jena so nett empfangen und mir Einblicke in eure Arbeit gegeben habt. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Sören Doose bedanken, der mir dieses Projekt gegeben und mich dabei unterstützt hat! Mein Dank gilt auch allen Kooperationspartnern von dem “Aspergillus-Projekt“, besonders aus dem Lehrstuhl Innere Medizin II der Universität Würzburg. Natürlich möchte ich mich auch bei allen Beteiligten des Azo-Ceramid-Projektes bedanken, u.a. den Beteiligten aus der Virologie und der Organischen Chemie der Universität Würzburg – ich konnte durch euch vieles Lernen! Ganz besonders möchte ich mich bei Esther, Jérôme und Tim bedanken: Danke für viele interessante Diskussionen, für das Erklären eurer Arbeit, für die vielen Proben, die ihr vorbereitet und mir gebracht habt, aber auch dafür, dass der Spaß nicht zu kurz kam!

Ein ganz großer Dank geht an Sebastian Letschert für die Zusammenarbeit beim Artefakt-Projekt. Danke aber auch für die vielen Gespräche über Wissenschaft, aber auch über andere große und kleine Themen dieser Welt ☺. Danke an Jan und Uli für die Einführung in die Welt der Pilze – es war eine Freude mit euch zusammen zu arbeiten. Ich danke auch Sven und Felix, die mir bei den 3D-*d*STORM-Aufnahmen geholfen haben. Mein Dank geht auch an Lisa und Petra für die Zellkultur und an Albert, Marcus, Willi und Oli für ihre Hilfe bei mechanischen, elektronischen oder EDV-Problemen.

Vielen Dank auch an meine Bürokollegen, Andrea, Sebastian, Fabi, Saskia und Lena für eure Aufmunterungen, eure Hilfe und für viele lustige Stunden!

Patrick, Sebastian, Andrea, Jule, Franzi, Esther und Lena möchte ich auch für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit danken.

Natürlich möchte ich mich auch bei all meinen anderen Kollegen des Lehrstuhls für die Unterstützung und tolle Atmosphäre bedanken.

Dankeschön auch an meine Freiburger Freunde für eure Ermutigungen und euer immer offenes Ohr!

Liebe Familie, was für ein Glück euch zu haben! Danke, für eure immer lieben Worte und für eure Unterstützung!

An dich, lieber Patrick, geht der größte Dank! Danke, dass ich in dir jemanden hatte, mit dem ich über meine Projekte und das weitere Vorgehen sprechen konnte. Danke aber auch, dass du mich immer wieder aufgebaut hast, dich mit mir gefreut hast, dich mit mir aufgeregt – und mich wieder beruhigt hast 😊!

Eidesstattliche Erklärung

Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Untersuchung von Sphingolipiden und anderen Membrankonjugaten mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den _____

Unterschrift