
Mikroskopie, Bildverarbeitung und Automatisierung der Analyse von Vesikeln in *C. elegans* und anderen biologischen Strukturen

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

Vorgelegt von

Kristin Verena Kaldorf (geb. Schuch)

aus

Bad Mergentheim

Würzburg, 2018



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: _____

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. Christian Stigloher

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

1 Erklärung / Affidavit

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Mikroskopie, Bildverarbeitung und Automatisierung der Analyse von Vesikeln in *C. elegans* und anderen biologischen Strukturen“, 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.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „Microscopy, Image Analysis and Atomization of Analysis of Vesicles in *C. elegans* and further biological Structures” is the result of my own work.

I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, den _____

Kristin Kaldorf

2 Inhaltsverzeichnis

1	Erklärung / Affidavit	II
	Eidesstattliche Erklärung	II
	Affidavit	II
2	Inhaltsverzeichnis.....	III
3	Zusammenfassung	1
4	Summary	3
5	Einleitung	4
5.1	Septine als Cytoskelett-Komponenten	7
5.2	Der Modellorganismus <i>C. elegans</i>	10
5.2.1	Der alternative Lebenszyklus über das Dauerlarven-Stadium.....	12
5.2.2	Signaltransduktion im Nervensystem	13
5.2.3	Septine in <i>C. elegans</i>	15
5.3	Untersuchungen in Blutplättchen	16
5.3.1	Septine in Thrombozyten	17
5.3.2	Storage Pool Disease	18
5.3.3	Hermansky-Pudlak Syndrom	19
5.3.4	Unc-13	19

5.3.5	Nbeal	19
5.4	Ziel der Arbeit	20
5.4.1	Teil 1	20
5.4.2	Teil 2	21
5.4.3	Teil 3	21
6	Material und Methoden.....	23
6.1	Elektronenmikroskopische Methoden	23
6.1.1	Tiere.....	23
6.1.2	Aufreinigung von Dauerlarven	23
6.1.3	Hochdruckgefrierung, Gefriersubstitution und Einbettung.....	24
6.1.4	Ultradünnschnitte und Vorbereitung für das TEM	25
6.1.5	Elektronenmikroskopie und Elektronen Tomographie	27
6.2	Verwendete Software zur Bildanalyse	27
6.2.1	Fiji	27
6.2.2	Ilastik	31
6.2.3	Statistische Analyse	31
6.3	Entwickelte Software.....	32

6.3.1	Voraussetzungen für die Anwendung der erstellten Makros (3D ART VeSElecT und Klassifikations-Makro)	32
6.3.2	3D ART VeSElecT und Klassifikationsmakro	32
6.4	„Machine-Learning“-Algorithmen zur Klassifikation	33
6.4.1	Support Vektor Maschine	33
6.4.2	Random Forest	33
6.4.3	K-Nächste-Nachbarn-Klassifikator.....	34
6.4.4	Implementierung der maschinellen Lernalgorithmen	35
6.4.5	Evaluation der maschinellen Lernalgorithmen	36
7	Resultate	38
7.1	Resultate I: Fiji-Makro 3D ART VeSElecT	38
7.1.1	Algorithmus von 3D ART VeSElecT: Automatische Registrierung und Charakterisierung.....	38
7.1.2	Vergleich manueller und automatischer Annotation am Beispiel von 4dpf und 8dpf embryonalen <i>Danio rerio</i> neuromuskulären Endplatten (NME).....	43
7.1.3	Anwendungsbeispiel: Vergleich von wildtypischen <i>C. elegans</i> mit Septin-Mutante.	50
7.1.4	Weitere Fehlerratenanalyse: „Precision“ und „Recall“	53
7.1.5	Vergleich zu Ilastik als Methode auf Basis von maschinellem Lernen.....	57

7.2	Resultate II: Maschinelle Lernalgorithmen zur automatisierten Klassifizierung.....	61
7.2.1	Anpassungen des Algorithmus von 3D ART VeSElecT	61
7.2.2	Erstellung der Trainingsdaten	64
7.2.3	Charakterisierung aufgrund von Bildeigenschaften.....	70
7.2.4	Vergleich maschineller Lernalgorithmen zur Klassifizierung von Vesikeln	73
7.2.5	Implementierung der SVM in das Fiji Makro	75
7.2.6	Algorithmus des Klassifikationsmakros.....	76
7.2.7	Anwendung des Klassifikationsmakros auf Tomogrammen von NME zweier C. elegans Entwicklungsstadien	78
7.2.8	Fehlerraten und Cross-Validierung	83
7.3	Resultate III: Anwendung von 3D ART VeSElecT bei Thrombozyten.....	86
8	Diskussion	90
8.1	Diskussion I: Fiji-Macro 3D ART VeSElecT.....	90
8.2	Diskussion II: Maschinelle Lernalgorithmen zur automatisierten Klassifizierung.....	93
8.3	Diskussion III: Anwendung von 3D ART VeSElecT bei Thrombozyten.....	98
8.4	Zusammenfassende Diskussion	101
9	Fazit	104
10	Abkürzungsverzeichnis.....	105

11	Abbildungsverzeichnis.....	107
12	Literaturverzeichnis.....	109
13	Lebenslauf	120
14	Publikationen.....	123
15	Danksagung	124

3 Zusammenfassung

Thema dieser Thesis ist die Analyse sekretorischer Vesikelpools auf Ultrastrukturebene in unterschiedlichen biologischen Systemen. Der erste und zweite Teil dieser Arbeit fokussiert sich auf die Analyse synaptischer Vesikelpools in neuromuskulären Endplatten (NME) im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*. Dazu wurde Hochdruckgefrierung und Gefriersubstitution angewandt, um eine unverzügliche Immobilisation der Nematoden und somit eine Fixierung im nahezu nativen Zustand zu gewährleisten. Anschließend wurden dreidimensionale Aufnahmen der NME mittels Elektronentomographie erstellt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden junge adulte, wildtypische *C. elegans* Hermaphroditen mit Septin-Mutanten verglichen. Um eine umfassende Analyse mit hoher Stichprobenzahl zu ermöglichen und eine automatisierte Lösung für ähnliche Untersuchungen von Vesikelpools bereit zu stellen wurde eine Software namens 3D ART VeSElecT zur automatisierten Vesikelpoolanalyse entwickelt. Die Software besteht aus zwei Makros für ImageJ, eines für die Registrierung der Vesikel und eines zur Charakterisierung. Diese Trennung in zwei separate Schritte ermöglicht einen manuellen Verbesserungsschritt zum Entfernen falsch positiver Vesikel. Durch einen Vergleich mit manuell ausgewerteten Daten neuromuskulärer Endplatten von larvalen Stadien des Modellorganismus Zebrafisch (*Danio rerio*) konnte erfolgreich die Funktionalität der Software bewiesen werden. Die Analyse der neuromuskulären Endplatten in *C. elegans* ergab kleinere synaptische Vesikel und dichtere Vesikelpools in den Septin-Mutanten verglichen mit Wildtypen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neuromuskulärer Endplatten junger adulter *C. elegans* Hermaphroditen mit Dauerlarven verglichen. Das Dauerlarvenstadium ist ein spezielles Stadium, welches durch widrige Umweltbedingungen induziert wird und in dem *C. elegans*

über mehrere Monate ohne Nahrungsaufnahme überleben kann. Da hier der Vergleich der Abundanz zweier Vesikelarten, der „clear-core“-Vesikel (CCV) und der „dense-core“-Vesikel (DCV), im Fokus stand wurde eine Erweiterung von 3D ART VeSElect entwickelt, die einen „Machine-Learning“-Algorithmus zur automatisierten Klassifikation der Vesikel integriert. Durch die Analyse konnten kleinere Vesikel, eine erhöhte Anzahl von „dense-core“-Vesikeln, sowie eine veränderte Lokalisation der DCV in Dauerlarven festgestellt werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde untersucht ob die für synaptische Vesikelpools konzipierte Software auch zur Analyse sekretorischer Vesikel in Thrombozyten geeignet ist. Dazu wurden zweidimensionale und dreidimensionale Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop erstellt und verglichen. Die Untersuchung ergab, dass hierfür eine neue Methodik entwickelt werden muss, die zwar auf den vorherigen Arbeiten prinzipiell aufbauen kann, aber den besonderen Herausforderungen der Bilderkennung sekretorischer Vesikel aus Thrombozyten gerecht werden muss.

4 Summary

Subject of this thesis was the analysis of the ultrastructure of vesicle pools in various biological systems. The first and second part of this thesis is focused on the analysis of synaptic vesicle pools in neuromuscular junctions in the model organism *Caenorhabditis elegans*. In order to get access of synaptic vesicle pools in their near-to native state high-pressure freezing and freeze substitution was performed. Subsequently three-dimensional imaging of neuromuscular junctions using electron tomography was performed. In the first part young adult wild-type *C. elegans* hermaphrodites and septin mutants were compared. To enable extensive analysis and to provide an automated solution for comparable studies, a software called 3D ART VeSElecT for automated vesicle pool analysis, was developed. The software is designed as two macros for ImageJ, one for registration of vesicles and one for characterization. This separation allows for a manual revision step in between to erase false positive particles. Through comparison with manually evaluated data of neuromuscular junctions of larval stages of the model organism zebrafish (*Danio rerio*), functionality of the software was successfully proved. As a result, analysis of *C. elegans* neuromuscular junctions revealed smaller synaptic vesicles and more densely packed vesicle pools in septin mutants compared to wild-types.

In the second part of this thesis NMJs of young adult *C. elegans* hermaphrodites were compared with dauer larvae. The dauer larva is a special state that is induced by adverse environmental conditions and enables *C. elegans* to survive several months without any food uptake. Aiming for an automated analysis of the ratio of two vesicle types, clear core vesicles (CCVs) and dense core vesicles (DCVs), an extension for 3D ART VeSElecT was developed,

integrating a machine-learning classifier. As a result, smaller vesicles and an increased amount of dense core vesicles in dauer larvae were found.

In the third part of this thesis the developed software, designed for the analysis of synaptic vesicle pools, was checked for its suitability to recognize secretory vesicles in thrombocytes. Therefore, two-dimensional and three-dimensional transmission electron microscopic images were prepared and compared. The investigation has shown that a new methodology has to be developed which, although able to build on the previous work in principle, must meet the special challenges of image recognition of secretory vesicles from platelets.

5 Einleitung

Neue mikroskopische Techniken, wie Rasterelektronenmikroskopie mit fokussiertem Ionenstrahl (in Englisch „focussed ion beam scanning electron microscopy“) oder Elektronen-Tomographie, ermöglichen eine detaillierte dreidimensionale (3D) Darstellung biologischer Präparate in nahezu isotropischer Auflösung im Nanometerbereich [1–5]. Diese Techniken erzeugen jedoch extrem große Datensätze, welche die Analyse und Interpretation der neugewonnenen Information extrem erschweren. Bisher spielt die manuelle Annotation und Interpretation dieser Datensätze eine entscheidende Rolle. Aufgaben der Mustererkennung, die für den Menschen sehr einfach sind, stellen sich oft als äußerst komplexes Problem für Computer heraus [6]. Dies führt in der Praxis dazu, dass der langwierige Schritt der Bildanalyse immer noch manuell von Experten durchgeführt werden muss, was teuer und zeitintensiv ist. Lernfähige Algorithmen, auch bekannt unter dem Begriff künstliche oder artifizielle Intelligenz (KI), ihre Fähigkeiten und Einsatzgebiete, stehen schon seit längerem im Zentrum der

medialen Aufmerksamkeit [6]. Sogenannte „Deep-Learning“-Algorithmen, ein Teilbereich der KI wird häufig verwendet um Muster zu erkennen (in Englisch „pattern recognition“) und somit komplexe Sachverhalte wie Gesichtserkennung [7–11] und Sprachverständnis [12,13] zu meistern, Fähigkeiten die bislang ausschließlich komplexen biologischen Nervensystemen vorbehalten waren [11,14]. KI wird durch sogenannte künstliche neuronale Netzwerke ermöglicht, die an die Funktionsweise des Gehirns angelehnt sind [15]. Gut trainierte Netzwerke können dabei eine geringere Fehlerrate als ein menschlicher Experte erzielen und stehen somit in der Diskussion im Gesundheitswesen zukünftig Ärzte bei ihrer Arbeit, besonders bei der Auswertung medizinischer Bilder, zu unterstützen [15–18]. Jedoch muss bedacht werden, dass sich auch komplexe Nervensysteme neue Fähigkeit nur durch einen Lernprozess durch intensives Training aneignen können. Durch die ständige Verarbeitung neuer Eindrücke und Erfahrungen erfahren Nervensysteme neue Anpassung auf zellulärer (neuronale Verschaltungen)[19] und molekularer Ebene [20]. Vergleichbar dazu benötigen auch intelligente Algorithmen einen umfassenden Trainingsprozess, meist unter Verwendung der Hälfte der Gesamtheit der gesammelten Daten, was oft tausenden Trainingsbeispielen entspricht, um letztlich valide Vorhersagen machen zu können [21,22]. Jedoch genau hier liegt das Problem, denn die Generierung dieser Mengen an biologischen Daten, um eine adäquates Training zu gewährleisten, ist oft schlichtweg nicht möglich oder der Aufwand des intensiven Trainings der KI übersteigt bei weitem den Nutzen. Ein weiteres Argument gegen die Nutzung von KI ist, dass genauso wie es uns nicht möglich ist Einblick in die Denkvorgänge eines Menschen zu erhalten auch die Algorithmen aus nicht-einsehbaren Ebenen aufgebaut sind und somit die Generierung der Ergebnisse in der Regel nicht vollständig nachvollziehbar ist [23]. Das kann besonders bei wissenschaftlichen Fragestellungen von entscheidendem

Nachteil sein. Durch dieses Dilemma fallen schließlich komplexe Aufgaben der Mustererkennung meist immer noch menschlichen Experten zu.

Doch zwischen einer komplett manuellen Analyse und einer Analyse mittels neuronaler Netzwerke gibt es viele weitere Möglichkeiten, die die Bildanalyse beschleunigen und vereinfachen können. Die Entwicklung solcher Hilfsmittel ist Gegenstand dieser Arbeit.

Um automatisierte Analysemethoden zu entwickeln wurden bereits bestehende Algorithmen zur Bildanalyse und -filterung verwendet. Hierzu wurde Fiji [24], eine Distribution von ImageJ [25] benutzt, welches eine große Auswahl an Möglichkeiten bietet, da es von Beginn an viele Plugins enthält. Diese wurden zu unserem Zweck zu einem Workflow verknüpft und mit maschinellen Lernalgorithmen kombiniert, so dass relevante Strukturen automatisiert erkannt, segmentiert, quantifiziert und sogar klassifiziert werden konnten. Der große Vorteil ist, dass durch diesen methodischen Ansatz keine Daten für Trainingszwecke verloren gehen, jedoch eine sehr gute Performance mit sehr geringen Fehlerraten erreicht wird. Zusätzlich ist der gesamte Prozess der Datenanalyse einsehbar und nachvollziehbar.

Erst durch den Schritt der Datenanalyse, also der Segmentierung der Strukturen und Auswertung der Bilder, werden die neu gewonnenen Informationen aus 3D-Bilddatensätzen systematisch quantifizierbar, wodurch dann neue wissenschaftliche Erkenntnisse gewonnen werden können. Diese Arbeit fokussiert sich zum größten Teil auf die Analyse der Morphologie von Synapsen und die genauere Analyse zellulärer Strukturen.

Einer der wichtigsten Bestandteile von eukaryontischen Zellen ist das Zytoskelett. Es spielt eine entscheidende Rolle für die Stabilität der Zelle, den Transport von Zellkomponenten wie auch die Bewegung und Interaktion von Zellkomponenten, wie z.B. bei der Fusion von Vesikeln. Bereits gut erforschte Zytoskelettproteine sind Mikrotubuli, Aktin- und

Intermediärfilamente [26]. Neben diesen gibt es jedoch noch eine weitere, weniger gut untersuchte Klasse von Filamenten, die Septine [27].

5.1 Septine als Cytoskelett-Komponenten

Septine kommen in allen eukaryotischen Organismen außer Pflanzen vor [27–30] wo sie äußerst wichtige Funktionen einnehmen. Im menschlichen Körper zeigen sich Fehlfunktionen der Proteine als schwere gesundheitliche Störungen. Bekannt Erkrankungen sind z.B. Krebs [31], Unfruchtbarkeit [31] und Blutgerinnungsstörungen [32] aber auch neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer [33], Parkinson [34] und Huntington [35]. Bis heute sind zwar viele funktionale Aufgaben der Septine bekannt, jedoch ist Vieles über die genaue Funktionsweise der Proteine und ihrer Interaktionen auf molekularer Ebene bislang noch unklar [32].

Septine sind evolutionär hochkonservierte GTP-bindende Cytoskelett-Proteine, welche zur Superklasse der Ras-ähnlichen GTPasen der phosphat-bindenden „schlingenförmigen“ (P-loop) NTPasen gehören [36]. Alle bekannten Septine (30-65 kDa) teilen eine strukturell gleiche Domänenorganisation: eine zentrale, hochkonservierte GTP-bindende Region, einen variablen Amino-Terminus und einen Carboxy-Terminus, dem häufig eine superspiralisierte („coiled-coil“) Struktur vorhergesagt wird, welche höchst wahrscheinlich essentiell für Protein-Protein Interaktionen ist. Des Weiteren enthalten sie eine membranbindende Region als auch eine Septin-spezifische Domäne [37] (siehe Abbildung 1)[32].

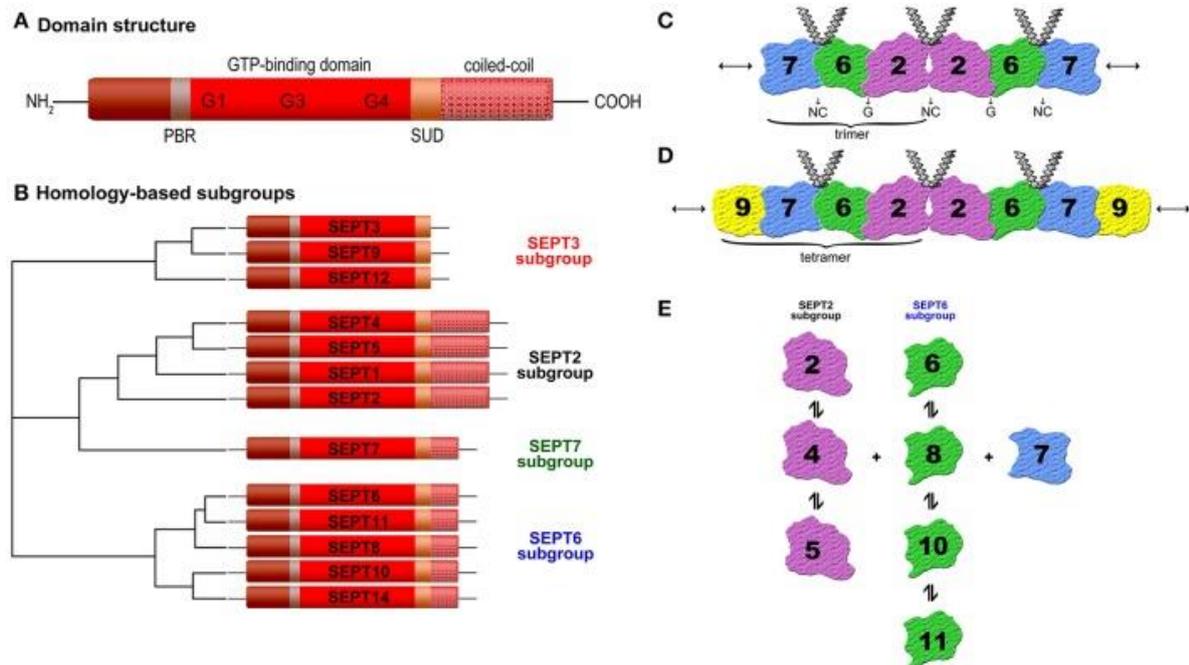


Abbildung 1: Schema der Septin-Domänenstruktur und Komplexbildung. (A) schematische Septin Domänenstruktur. Septine zeichnen sich durch eine konservative GTP-bindende Domäne, eine phosphoinositid-bindende polybasische Region (PBR), eine Septin-spezifisch Domäne („septin unique domain“, SUD), und die meisten von ihnen auch eine Coiled-Coil-Domäne. (B) Homologie-basierte Untergruppen. Die 13 humanen Septine (SEPT1 bis SEPT12 und SEPT14) sind in vier Untergruppen (SEPT3, SEPT2, SEPT7 und SEPT6) klassifiziert, basierend auf ihrer Sequenzhomologie und Coiled-Coil-Domänen [38,39]. (C) Struktur des SEPT2-6-7-Komplex. Zwei Kopien jedes Septins sind symmetrisch (SEPT7-6-2-2-6-7) arrangiert und bilden ein Hexamer durch abwechselnde N- und C-Termini und G-Schnittstellen (GTP-bindende Domäne) [40]. (D) Struktur des SEPT2-6-7-9-Komplex [41,42]. (E) Bindungs-Präferenzen der individuellen Septine zu anderen Septinen [41]. (Abbildungsquelle [32])

Septine können sich zu multimeren Komplexen zusammenlagern. Diese Komplexe können, je nach Organismus, aus zwei oder mehr Untereinheiten bestehen und setzen sich aus variablen

Septin-Versionen zusammen [43–45]. Die Septinkomplexe sind in der Lage höher geordnete Strukturen wie Filamente, Bündel, Ringe oder Netze zu bilden [46]. Dabei verknüpfen sie sich mit anderen Proteinen, die eine Art Grundgerüst vorgeben. Bekannt sind Interaktionen mit anderen zytoskelettalen Komponenten wie Mikrotubuli und Aktin [47–49]. Beispielsweise sind Septine wichtig für die Stabilisierung von Mikrotubuli und spielen daher eine zentrale Rolle für den axonalen als auch vesikulärer Transport[50], der Exocytose [47,51,52], und der neuronalen Entwicklung [47]. Des Weiteren sind Septinproteine wichtig für die Zellteilung und Kompartimentalisierung, wo sie zusammen mit Aktin, Myosin II (Motorproteine) und Anillin, zur Verlinkung der Komponenten, einen kontraktilen Ring bilden [53].

Menschen besitzen 13 unterschiedliche Septin-Gene[54], *SEPT1-12* und *SEPT14*, welche nach der Homologie ihrer Domänenstruktur in vier Untergruppen eingeteilt werden (*SEPT2*, *SEPT3*, *SEPT6* und *SEPT7*) [32]. Dies ist relevant für die Ausbildung höher geordneter Strukturen, wo Septine der gleichen Gruppenzugehörigkeit untereinander ausgetauscht werden können [41,55].

Die Septine sind von besonderem Interesse, da *SEPT3* und *SEPT5* im Gehirn von Mäusen und dort hauptsächlich in den prä-synaptischen Endigungen der Neuronen exprimiert sind [56–58]. *SEPT5* hat außerdem eine wichtige Funktion bei der Exozytose an der zentralen Synapse. In Yang et al wird eine mögliche Funktion von *SEPT5* als physikalische Barriere beim Andocken der synaptischen Vesikel an die Zellmembran direkt vor der Fusion vermutet [59]. Dies macht Septine zu interessanten Kandidaten für den Aufbau der filamentösen Strukturen innerhalb des Vesikelpools.

Septine treten in der Regel in einer hohen Vielfalt auf [39,60]. Durch die diversen Kombinationsmöglichkeiten der Septin-Isoformen gepaart mit der vielfältigen

Funktionsweise, besonders in Kombination mit anderen Proteinen, ist die genaue Funktion der Septine schwer zu ermitteln. Der gut untersuchte Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* bildet hinsichtlich der Septine den Vorteil, dass er in seinem Genom nur zwei Septingene, *unc-59* und *unc-61*, kodiert. Aus diesem Grund eignet sich *C. elegans* ganz besonders, um die Funktionsweise der Septine zu erforschen (siehe Kapitel Septine in *C. elegans*).

5.2 Der Modellorganismus *C. elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) gehört zum Stamm der Nematoden (Fadenwürmer) und ist ein gut etablierter Modellorganismus [61,62]. Er ist weitgehend transparent, und wird als adultes Tier bis zu ca. 1mm lang und besitzt einen Durchmesser von ca. 65 µm [63]. Sein natürlicher Lebensraum ist das Lückensystem im Boden, wo er sich von Mikroben, vor allem von Bakterien ernährt [64]. Besondere wissenschaftliche Aufmerksamkeit erlangte *C. elegans* in den 1960er Jahren wo er durch den späteren Nobelpreisgewinner Sydney Brenner als Modellorganismus etabliert und schließlich weltbekannt wurde. Heute ist *C. elegans* ein äußerst gut erforschter Modellorganismus und findet Verwendung in vielen Forschungsbereichen der Biowissenschaften. *C. elegans* zeichnet sich als Modellorganismus durch viele praktische Aspekte aus, wie seiner einfachen Haltung, Zellkonsistenz (Eutelie) mit 959 somatischen Zellkernen im adulten Hermaphroditen, einem schnellen Lebenszyklus (3 Tage bei 25°C, vom Ei zum eilegenden Adultus) und seinem kleinen Nervensystem [61,65]. Das Nervensystem setzt sich aus einem großen somatischen Nervensystem (282 Neuronen), welches aus einem dorsalen und einem ventralen Nervenstrang besteht, und einem kleinen, ringförmigen, pharyngealen Nervensystem (20 Neuronen) zusammen [66,67]. *C. elegans'* kleines Nervensystem ermöglicht die Untersuchung des Konnektoms in seiner Gesamtheit

[65,68,69]. Die meiste Forschung konzentriert sich auf Embryonalstadien und adulte Hermaphroditen. Neben diesem prävalenten adulten Stadium gibt es auch einen geringen Anteil an männlichen adulten Würmern (< 0,2%). Bei Standardbedingungen im Labor dauert die embryonale Phase bis zum Schlüpfen des L1 Stadiums etwa 9h (Abbildung 2).

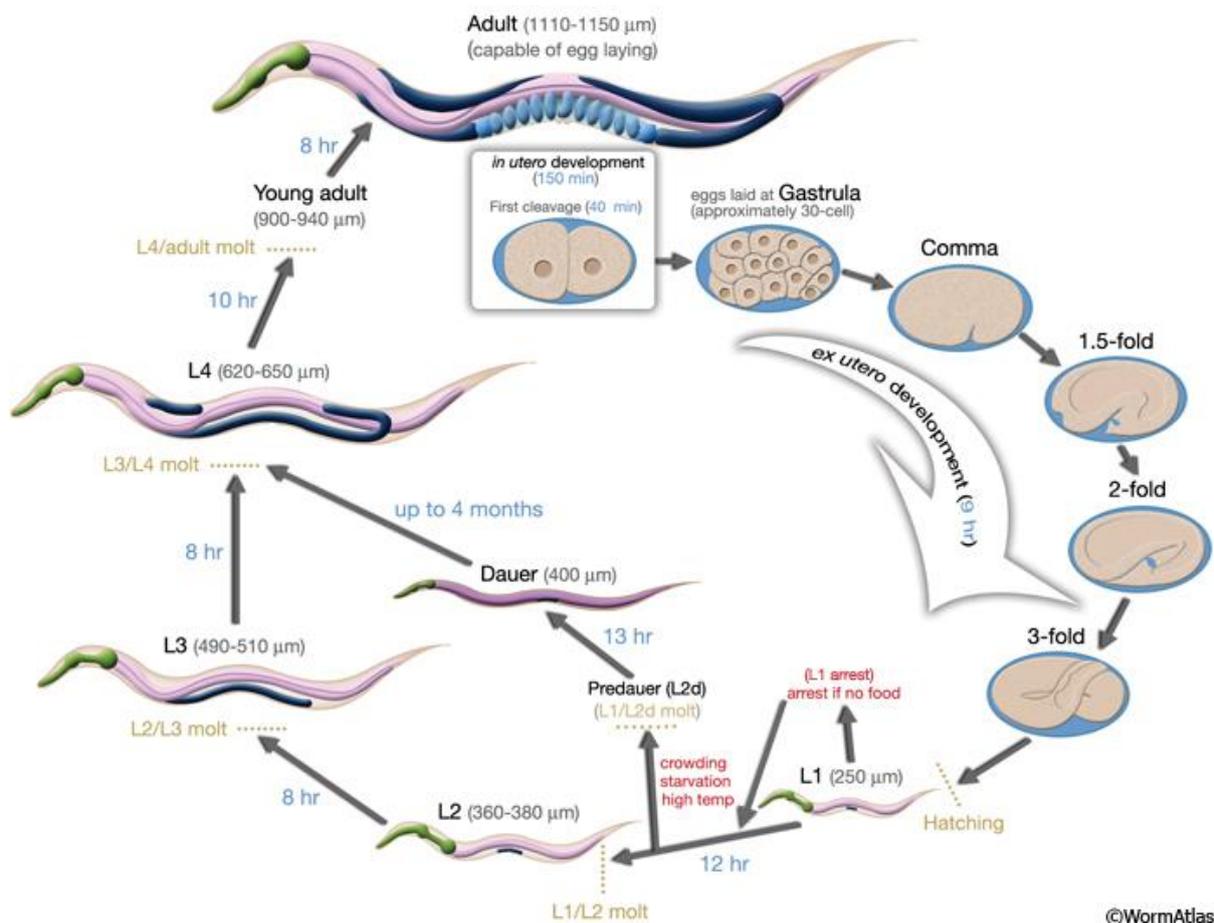


Abbildung 2: Lebenszyklus von *C. elegans* bei 22°C. 0 min ist der Zeitpunkt der Fertilisation. Die blauen Zahlen entlang der Pfeile zeigen die Länge der Dauer jedes Entwicklungsstadiums. Die erste Zellteilung erfolgt ca. 40 min. nach der Fertilisation. Die Eier werden etwa 150 min. nach der Befruchtung, während der Gastrulation abgelegt. Die Länge der Nematoden in jedem Stadium ist direkt neben dem Stadium in Mikrometern (μm) angegeben. (Abbildungsquelle: [64])

Bei guten Umweltbedingungen entwickelt sich *C. elegans* über das L2, L3 und L4 Stadium hinweg in etwa drei Tagen zum adulten Tier. Schlechte Umweltbedingungen (z.B. niedrigere Temperatur) verlangsamen den Zyklus oder können, z.B. bei Nahrungsmangel, Hitze oder Überpopulation, zur Entwicklung eines alternativen Larvenstadiums, der Dauerlarve, führen.

5.2.1 Der alternative Lebenszyklus über das Dauerlarven-Stadium

Dauerlarven sind äußerst gut an widrige Umweltbedingungen adaptiert. Ihr Mund ist verschlossen, sodass keine Nahrungsaufnahme möglich ist [70]. Die Larven überstehen mehrere Monate ohne Nahrung [71]. Obwohl die Aktivität des Metabolismus herabgesetzt ist [71], sind Dauerlarven dazu fähig sich schnell fortzubewegen, besonders um negativen Umweltstimuli zu entkommen und neue Habitate zu besiedeln. Eine verdickte Kutikula schützt sie vor Austrocknung oder Toxinen, sodass die Dauerlarven in der Lage sind eine Behandlung mit stark tensidischer Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)-Lösung zu überstehen. Dies wird sich zu nutze gemacht, um Dauerlarven von anderen Stadien zu isolieren. Sobald eine Verbesserung der Umweltbedingungen eintritt entwickeln sich *C. elegans* Dauerlarven in das präadulte L4 Larvenstadium und treten somit wieder in den reproduktiven Lebenszyklus ein [70,72].

Durch Zellablationsstudien konnte eine kleine Gruppe sensorischer Neurone, ASI, ASJ und ADF identifiziert werden, die entscheidend bei der Aktivierung oder dem Austritt aus dem Dauerstadium sind. Aus diesem Grund steuern sensorische Prozesse die Entscheidung der Dauerlarvenentwicklung [73,74]. Genetische Analyse von *C. elegans* Mutanten, die entweder nicht fähig sind das Dauerlarvenstadium unter widrigen Umweltbedingungen zu aktivieren oder die konstitutiv ein Dauerstadium entwickeln, unabhängig von den Umweltbedingungen,

offenbaren multiple Signalwege, welche sensorischen Informationen unterliegen um die Entscheidung der Entwicklung zu beeinflussen [73,75]. Das Zusammenspiel zwischen diesen multiplen Signalwegen, die Kontrollmechanismen und die transkriptionelle Regulation, welchem die verschiedenen Entwicklungsstrategien unterliegen, müssen noch aufgeklärt werden[76].

5.2.2 Signaltransduktion im Nervensystem

Das Nervensystem besteht aus einer Vielzahl von Nervenzellen und ist dazu konzipiert Signale des Körpers zu empfangen, weiterzuleiten und zu verarbeiten, was als Signaltransduktion bezeichnet wird. Synapsen sind Schnittstellen zwischen einer synaptischen Endigung einer Nervenzelle und einer postsynaptischen Zelle. Es gibt elektrische und chemische Synapsen über die Signale zur nächstgelegenen Zelle weitergeleitet werden. Die chemische Signalweiterleitung funktioniert über die Ausschüttung von Botenstoffen, den Neurotransmittern, in den synaptischen Spalt, der sich zwischen den beiden Zellen befindet [77]. Von dort aus binden die Neurotransmitter an Rezeptoren der postsynaptischen Zelle um Signale weiterzuleiten. Neurotransmitter werden in kleinen Bläschen, den synaptischen Vesikeln, gespeichert. Auch wenn sich Funktion und Struktur von Nervensystemen zwischen unterschiedlichen Spezies enorm unterscheiden, ist die prinzipielle Funktionsweise die Gleiche, wodurch grundlegende neuronale Funktionen an Modellorganismen, wie *C. elegans*, untersucht werden können [26].

Elektronenmikroskopische Untersuchungen und Rekonstruktion vom *C. elegans* Nervensystem, in Kombination mit Hochdruckgefrierung und Gefriersubstitution als Fixierungsmethode, zeigen zwei Arten von Vesikeln, CCVs und DCVs [2,78]. CCVs sind charakterisiert durch ihren namensgebenden klaren inneren Kern in

elektronenmikroskopischen Aufnahmen. CCVs enthalten typischer Weise Neurotransmitter, wie Acetylcholin oder γ -Aminobuttersäure (GABA), in *C. elegans* NMEs. NMEs sind Synapsen, die die Muskeln innervieren. Der in den CCVs enthaltene Neurotransmitter ist entscheidend für die funktionale Signalweiterleitung der Synapse, Acetylcholin ist ein erregender (exzitatorischer) Neurotransmitter[79] wohingegen GABA hemmend (inhibitorisch) wirkt [80,81]. Meist beinhalten Synapsen eine große Fraktion der abundanten CCVs und eine kleinere Fraktion DCVs [2,78].

Im Gegensatz zu der äußerst charakteristischen Rolle der CCVs [82], ist über die Bedeutung der DCVs deutlich weniger bekannt. DCVs sind durch ihren namensgebenden dunklen, elektronendichten Kern gekennzeichnet. Sie beinhalten in der Regel Neuropeptide, kleine Proteinmoleküle, mit etwa 3 – 100 Aminosäuren [83–86], oder andere zelluläre Komponenten, wie Proteine der aktiven Zone [87]. Für *C. elegans* wurden durchschnittlich größere Durchmesser für DCVs im Vergleich zu CCVs beschrieben [2]. Synaptische Vesikelgrößen können in verschiedenen Organismen oder Entwicklungsstadien variieren [88,89]. CCVs sind im Bereich um die aktive Zone herum stark angereichert, wohingegen DCVs typischerweise am Rand dieses CCVs-„Pools“ in größerer Entfernung zur AZ lokalisiert sind, wie es für *C. elegans* NMEs beschrieben wurde [2].

DCV Exozytose wird als langsame synaptische oder nicht-synaptische Kommunikation in Neuronen bezeichnet [83]. Sie findet unabhängig von der aktiven Zone und vermehrt bei starker neuronaler Aktivität statt [83,86,90]. In *C. elegans* spielen Neuropeptide bei vielfältigen Verhaltensweisen, wie der Bildung der Dauerlarve, Lokomotion oder der Eiablage aber auch in mechanischen und chemischen Wahrnehmung eine wichtige Rolle. Dies ist abhängig vom Expressionsmuster der Peptide. [86]

Neben der bekannten, wichtigen Rolle der Neuropeptide in der Dauerentwicklung ist bisher nicht systematisch untersucht worden, ob sich das Dauerstadium bezüglich der DCV-Verteilung in NME unterscheidet, was in dieser Arbeit genauer betrachtet wurde.

5.2.3 Septine in *C. elegans*

Der Modellorganismus *C. elegans* bietet gegenüber anderen Organismen einen entscheidenden Vorteil. *C. elegans* besitzt nur zwei Septingene, *unc-59* und *unc-61*. Das Vorkommen von nur zwei unterschiedlichen Septinen erleichtert die Erforschung ihrer grundlegenden Funktionsweise, was besonders durch den Vergleich zu anderen Organismen, wie dem Modellorganismen *Saccharomyces cerevisiae* (7 unterschiedlichen Septine) oder dem Menschen (13 verschiedenen Septine) [32,39,60] deutlich wird.

UNC-59 und UNC-61 sind nach den Phänotypen ihrer Funktionsverlustmutanten benannt, die eine unkoordinierte Fortbewegungsweise zeigen [61]. Septine spielen nachweislich eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung (Zytokinese), wo sie bei ihrer Lokalisation gegenseitig auf die Präsenz des anderen Proteins angewiesen sind [91]. Das unkoordinierte Verhalten der Funktionsverlustmutanten wurde ursprünglich einer fehlerhaften Zytokinese in der embryonalen Entwicklung zugeschrieben, was inzwischen widerlegt ist, da gezeigt werden konnte, dass unkoordinierte Bewegungsmuster auch ohne Fehler in der zytokinetischen Entwicklung vorkommen können [92]. *Unc-59* und *unc-61* Mutanten zeigen eine normale embryonale Entwicklung, erst in späteren Entwicklungsstadien wurden morphologische Fehlentwicklungen der Vulva, des männlichen Schwanz, der Gonaden und sensorischen Neuronen beobachtet [91]. Von Finger et al. wurden axonale Migrationsdefekte als Grund für die unkoordinierte Bewegungsmuster beschrieben [92].

Die Septine UNC-59 und UNC-61 lagern sich zu unpolaren, symmetrischen Heterotetrameren, in der Form UNC-59 | UNC-61 | UNC-61 | UNC-59 zusammen [44].

5.3 Untersuchungen in Blutplättchen

Sekretorische Vesikel üben nicht nur in Synapsen eine entscheidende funktionale Rolle aus, sondern kommen auch in anderen biologischen Systemen vor, wie zum Beispiel den Blutplättchen.

Plättchen sind essentiell für die Hämostase (Blutstillung), weshalb Thrombozytopenie (Plättchenanzahl $<150 \times 10^9 /l$), ein Mangel an Thrombozyten, ein schwerwiegendes klinisches Problem darstellt. Thrombozytopenie spielt bei einer Vielzahl von Erkrankungen, Chemotherapie, Komplikationen während der Schwangerschaft und Geburt, als auch bei operativen Eingriffen eine Rolle. Des Weiteren kann die eigentlich lebensrettende Ausbildung von Thromben zur Blutstillung, beispielsweise bei Verletzungen, ebenso zu pathologischen Auswirkungen führen, die wiederum Krankheiten wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall hervorrufen können [93].

Zirkulierende Blutplättchen sind Zellen, die darauf spezialisiert sind Blutungen zu stoppen und Blutgefäßverletzungen zu minimieren. Plättchen zirkulieren in ihrer inaktiven Form bis zur Stimulation, die eine Aktivierung herbeiführt, welche zum Entlassen ihres granularen Inhalts führt. Durch diese Aktivierung und dadurch induzierte Sekretion von Vesikeln vergrößern Thrombozyten ihre Oberfläche um eine physische Barriere auszubilden, welche den Blutverlust verhindert. Blutplättchen werden von großen Vorläuferzellen im Knochenmark,

den Megakaryozyten abgeschnürt, welche lange Verzweigungen ausbilden. Diese Vorläuferzellen der Plättchen werden in sinusoide Blutplättchen umgewandelt [94].

Die Plättchen beinhalten sekretorische Granula, die entscheidend für die Plättchenfunktion sind. Von den drei Typen sekretorischer Granula in Plättchen, den α -Granula, den δ -Granula und den Lysosomen, kommen die α -Granula am häufigsten vor. Es gibt schätzungsweise 50-80 α -Granula pro Plättchen mit einer Größe von etwa 200-500 nm [95]. Diese nehmen \sim 10% des Plättchenvolumens ein, etwa zehnmal mehr als die δ -Granula. Die zusätzliche Membran des offenen kanikulären Systems und der α -Granula ermöglicht es den Plättchen bei Stimulation oder Ausbreitung ihre Oberfläche 2-4-fach zu vergrößern [96].

Dysfunktionen in der Sekretion der Vesikel sind somit mit Blutungserkrankungen assoziiert. Es kann viele verschiedene Auslöser für eine fehlerhafte Ausschüttung der Vesikel geben. In dieser Arbeit wurden Aufnahmen von murinen WT, UNC13 und Nbeal Thrombozyten als auch von Patienten, mit potentieller „storage-pool-disease“ (SPD) oder „Hermansky-Putlak“-Syndrom hergestellt. Auch die in dieser Thesis thematisierten Septine spielen eine wichtige Rolle bei der Sekretion der Granula.

5.3.1 Septine in Thrombozyten

In Blutplättchen werden mehrere Septine (SEPT2, 4, 5, 7, 8, 9, und 11) exprimiert, welche eine bedeutende Rolle in der Regulierung der Plättchen Funktion einnehmen [41,97–100]. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass SEPT4 und 8 die α -Granula umgeben, wie es auch bereits für SEPT5 bekannt ist [101]. Daher liegt nahe, dass diese Septin-Isoformen Komponenten eines gemeinsamen Komplexes in Thrombozyten sind und daher eine wichtige regulatorische Rolle in der Plättchenbiologie spielen. Aktivierung der Plättchen durch Agonisten resultiert in der Translokation von SEPT4 und 8 an die Oberfläche der

Thrombozyten. Dies lässt eine mögliche funktionale Rolle der Proteine im granularen Transport und der Sekretion vermuten [32,101–103]. Interessanterweise zeigen Mäuse mit Bernard-Soulier-Syndrom, verursacht durch genetische Deletion des Plättchenglykoproteins Ib β (GB1BB), erhöhte SEPT5 Konzentration in der Megakaryozytenlinie. Überexpression von SEPT5 wird mit weniger und größeren α -Granula in Plättchen assoziiert, was auf eine unterstützende Funktion von SEPT5 bei der α -Granulagröße in Wildtypen (WT) hinweist [104]. [32]

5.3.2 Storage Pool Disease

Storage Pool Disease (SPD)-Plättchen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie weniger oder keine Granula beinhalten im Vergleich zu nicht betroffenen Thrombozyten. SPD kann sich durch eine verringerte Zahl an α -Granula und/oder der δ -Granula bemerkbar machen.

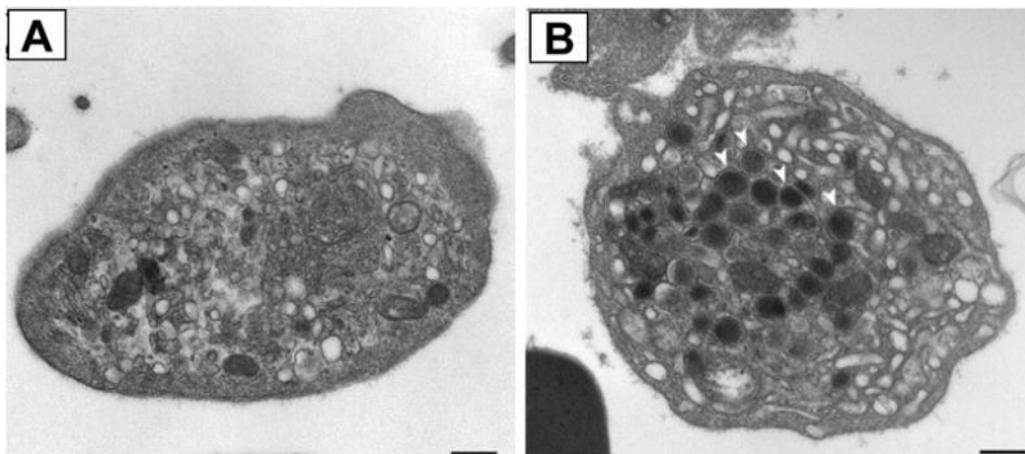


Abbildung 3: Ultradünnschnitt von transmissionselektronenmikroskopischen Bildern von Plättchen. (A) Aufnahme eines Blutplättchens aus einem Fetus mit einer Mutation in VPS33B und (B) Plättchen eines gesunden Fetus. Abundant auftretende α -Granula sind in der Kontrolle mit weißen Pfeilspitzen markiert und fehlen in VSP33B Mutanten. Skalierungsbalken = 500 nm. (Abbildungsquelle: [96])

Patienten mit SPD neigen zu einer längeren Blutungsdauer und vermehrtem Auftreten von Blutungen. [96,105]

5.3.3 Hermansky-Pudlak Syndrom

Hermansky–Pudlak Syndrom (HPS) ist eine heterogene Gruppe von autosomal rezessiven Erkrankungen, die durch okulokutanen Albinismus, Neigung zu Blutungen und lysosomalen Dysfunktionen charakterisiert ist. HPS ist besonders in Puerto Rico verbreitet [106]. Bei HPS wurden krankhafte Veränderungen der δ -Granula diagnostiziert, welche eine entscheidende Rolle bei der Plättchenaggregation spielen [105,107].

5.3.4 Unc-13

Bevor sekretorische Vesikel ausgeschüttet werden können, müssen sie zunächst in einem Reifungsschritt fusionskompetent gemacht werden. Bei diesem Schritt, der Vorbereitung der Vesikelfusion, spielt Unc-13 eine entscheidende Rolle. Mäuse mit mutiertem Munc-13 (murine Form von Unc-13) zeigen eine normal ausgeprägte Ultrastruktur der Synapsen, jedoch arretiert der synaptische Vesikelzyklus beim Reifungsschritt, weshalb weder eine spontane noch eine induzierte Vesikelentlassung in betroffenen Synapsen nachgewiesen werden kann [108–110]. Das Fehlen von Munc13-4 bewirkt außerdem granulare Sekretionsdefekte in einer Vielzahl blutbildender Zellen, wie zum Beispiel den Blutplättchen [111].

5.3.5 Nbeal

Das Gray-Platelet-Syndrom (GPS) ist eine autosomal rezessive Bluterkrankheit mit vergrößerten Plättchen, die keine α -Granula enthalten. GPS Plättchen sind sehr groß und erscheinen Grau, wenn sie mit dem Lichtmikroskop betrachtet werden [112–114]. Die Diagnose wird durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt, wodurch das Fehlen der α -Granula in den Plättchen [115] als auch in Megakaryozyten [116] nachgewiesen werden kann. Es wurde herausgefunden, dass Mutationen von *NBEAL2* (neurobeachin-like 2) GPS

auslösen. Megakaryozyten und Plättchen exprimieren eine einzigartige Kombination von *NBEAL2* Transkripten. [117]

5.4 Ziel der Arbeit

5.4.1 Teil 1

Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Ultrastruktur von Vesikeln mittels Hochdruckgefrierung und Elektronentomographie und die Entwicklung von automatisierten Verfahren zur schnelleren und reproduzierbaren Erkennung und Quantifizierung von Vesikeln.

Der erste Teil dieser Arbeit fokussiert sich auf den Vergleich von *C. elegans* Septin-Funktionsverlust-Mutanten, *unc-59(e261)*, zu wildtypischen (N2) Nematoden. Dieser systematische Vergleich ist von besonderem Interesse, da (i) der unkoordinierte Bewegungs-Phänotyp der Septin-Mutanten noch immer nicht gänzlich geklärt ist, (ii) Veränderungen innerhalb der Synapse jedoch ein Grund für das unkoordinierte Bewegungsmuster darstellen könnten [92] und (iii) da Septine in präsynaptischen Endigungen eine wichtige Funktionen einnehmen [56–59].

Ziel war es herauszufinden, ob es signifikante morphologische Unterschiede zwischen *C. elegans unc-59(e261)*-Mutanten und Wildtypen auf Ultrastrukturebene gibt, um weitere Hinweise auf die Funktion der Septine zu erhalten. Um diese umfassende Analyse zu ermöglichen und eine automatisierte Lösung zur Erkennung und Quantifizierung von Vesikeln in elektronenmikroskopischen Tomogrammen zu gewährleisten wurde außerdem eine Software entwickelt, mit der die Analysen dieser Arbeit, aber auch für vergleichbare

Aufgabenstellungen in der Zukunft schneller und mit reproduzierbaren Ergebnisse ermöglicht werden.

5.4.2 Teil 2

Der zweite Teil dieser Arbeit baut auf den ersten Teil auf, fokussiert sich jedoch auf die automatisierte Klassifizierung verschiedener Vesikeltypen. Die in Teil 1 erstellte Software sollte so erweitert werden, dass eine automatisierte Differenzierung zwischen unterschiedlichen Vesikeltypen ermöglicht wird. Dies sollte verwendet werden um quantitative und morphologische Unterschiede verschiedener Klassen (DCVs und CCVs) von Vesikeln am Beispiel vom Vergleich von NME junger adulter Hermaphroditen mit Dauerlarven zu untersuchen.

Ziel war es mit der neu entwickelten Methode weitere Einblicke in die Besonderheiten der Morphologie von Synapsen der Dauerlarven zu erhalten und diese systematisch mit den gut erforschten jungen adulten Hermaphroditen zu vergleichen. Dies sollte zum einen dazu dienen, die Besonderheiten dieses alternativen Lebensstadiums besser zu verstehen. Zum anderen soll der neu entwickelte Algorithmus aber in Zukunft auch dazu dienen andersgeartete morphologische Fragestellungen zu Vesikelpopulationen systematisch, effektiv, quantitativ und verlässlich zu beantworten.

5.4.3 Teil 3

In Teil drei der Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die entwickelte Software aus Teil 1 und 2 für die automatisierte Erkennung und Quantifizierung von sekretorischen Vesikeln (Granula) in Blutplättchen verwendet werden kann. Außerdem sollte überprüft werden, ob die elektronenmikroskopische Tomographie einen entscheidenden Vorteil bei der Quantifizierung der Granula bietet. Zu diesem Zweck wurden 2D und 3D Aufnahmen am

Transmissionselektronenmikroskop (TEM) von Kontroll-Plättchen und verschiedener Erkrankungen erstellt um einen Eindruck über das Bildmaterial zu erhalten und abschätzen zu können ob unsere Methode zur Erkennung der Vesikel verwendet werden kann.

6 Material und Methoden

6.1 Elektronenmikroskopische Methoden

6.1.1 Tiere

C. elegans WT (Bristol N2) und *unc-59(e261)* Septin-Mutanten wurden mittels Standardmethoden kultiviert und verwendet [61]. Diese *C. elegans* Linien sind beim CGC (Caenorhabditis Genetics Center) erhältlich.

Für den ersten Teil der Arbeit (Resultate I: Fiji-Makro 3D ART VeSElect) wurden ausschließlich junge adulte Hermaphroditen verwendet. Für den zweiten Teil der Arbeit (Resultate II: Maschinelle Lernalgorithmen zur automatisierten) wurden junge adulte Hermaphroditen (Bristol N2) und Dauerlarven (Bristol N2) verwendet.

6.1.2 Aufreinigung von Dauerlarven

Um Dauerlarven effektiv von anderen Entwicklungsstadien des *C. elegans* Lebenszyklus zu trennen wurde eine Behandlung mit Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)-Puffer [72] verwendet. Von allen *C. elegans* Larven- und Adultstadien sind ausschließlich Dauerlarven dazu fähig eine SDS-Behandlung zu überleben, da sie einen verschlossenen Pharynx und eine verdickte, schützende Kutikula besitzen. Zunächst wurden die Nematoden mit M9 Medium [118] von den Agar-Platten gespült. Die Nematoden-Lösung wurde in ein 50 ml Tube transferiert und für 5 min mit 2000g bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 50 ml 1% SDS Lösung gelöst und für 15 min auf einem Schüttler inkubiert. Das SDS wurde entfernt, indem mit 2000g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, und der Überstand bis auf 5 ml entfernt wurde. Das Behältnis wurde dann mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die Prozedur 2-3 Mal wiederholt, bis alle Larven und Adultstadien außer den Dauerstadien abgetötet waren. Um die Dauerlarven von totem Material zu separieren wurde die Lösung in

eine Vertiefung auf eine Agarplatte pipettiert. Nach Eintrocknen der Lösung sind die überlebenden Dauerlarven dazu fähig aus der Vertiefung zu kriechen. Nach 1-3 Stunden wurden alle weggewanderten (lebenden) Nematoden mit M9 Medium abgewaschen. Die Aufreinigung der Dauerlarven, Hochdruckgefrierung (HPF), Gefriersubstitution (GS) der Dauerlarven wurde von Johannes Kattan während seiner Masterarbeit in der Zentralen Abteilung für Mikroskopie unter der Leitung von Christian Stigloher hergestellt. Ultradünnschnitte und Elektronentomographie wurde von mir durchgeführt.

6.1.3 Hochdruckgefrierung, Gefriersubstitution und Einbettung

Hochdruckgefrierung (HPF) und Gefriersubstitution (GS) für morphologische Analysen wurden durchgeführt, wie es bereits für *C. elegans* etabliert und beschrieben ist [2,119,120]. Für die HPF wurde der Hochdruckgefrierer HPM100 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) benutzt. Es wurden bis zu 10 junge adulte Hermaphroditen in eine Gefrierkammer transferiert (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland; Probenhalter vom Typ A, 100 µm, verschlossen mit einem Probenhalter des Typs B, 0 µm) und mit Gefrierschutzlösung aus OP50 *E. coli* Bakterien in M9-Minimum-Medium [118] mit 20 % BSA bedeckt. Proben wurden bei > 20.000 K/s und > 2100 bar hochdruckgefroren, was wesentlich für eine optimale Vitrifikation der Proben war. Hochdruckgefrorene Pellets wurden stets in flüssigem Stickstoff gehalten und so in die EM AFS2 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) zur Gefriersubstitution transferiert. Die Gefriersubstitution wurde durchgeführt, wie bereits beschrieben [2,120], mit Ausnahme von der Benutzung von Epoxidhartz (Epon 812; Serva, Heidelberg, Deutschland) als Infiltrations- und Einbettmedium. Dazu wurden die Probenkapseln geöffnet und für 96 h bei 90°C in einer Lösung aus 0,1% Tanninsäure (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) und 0,5% Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland), welches in wasserfreiem Aceton (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelöst war,

inkubiert. Im Anschluss wurde je viermal bei -90°C für 1 h in wasserfreiem Aceton gewaschen. Daraufhin erfolgte die Fixierung bei ebenfalls -90°C für 28 h mit 2% OsO₄, welches in wasserfreiem Aceton gelöst war. Anschließend wurden die Proben über 14h kontinuierlich in einem linearen Temperaturanstieg auf -20°C erwärmt und daraufhin noch einmal für 16 h bei -20°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Temperatur innerhalb von 4h in einem linearen Anstieg auf 4°C erhöht. Daraufhin folgten Waschschriffe von 4 x je 30 min in wasserfreiem Aceton, woraufhin die Proben innerhalb 1 h linear auf 20°C erwärmt wurden. Im Anschluss darauf erfolgte eine Infiltration in Epon über eine kontinuierlich ansteigende Epon-Acetonreihe:

30% Epon, 4h

70% Epon, 5h

90% Epon, über Nacht bei 4°C

100% Epon, 8h (mit 3-maligem Wechsel der Lösung mit frischem Epon)

Die Proben wurden als Flacheinbettungen zwischen zwei ACLAR Folien oder anderen Plastikfolien mit vergleichbaren Eigenschaften eingebettet und für 72h bei 60°C polymerisiert.

Die GS und Einbettung wurde von mir für N2 und *unc-59(e261) C. elegans* Proben vorgenommen.

6.1.4 Ultradünnschnitte und Vorbereitung für das TEM

Reagenzien für 50 ml Reynolds Bleicitrat-Lösung [121]:

1,33g	Pb(NO ₃) ₂ (Merck)
1,76g	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (Sigma Aldrich)
8 ml	1M NaOH (Applichem)
42 ml	abgekochtes ddH ₂ O

Eponblöcke wurden mit dem Ultramikrotom UC7 (Leica, Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und einem Histo-Diamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz) in 250 nm dicke Schnitte für Elektronentomographie geschnitten. Die Schnitte wurden auf Pioloform-beschichtete Einloch-Netzchen aus Kupfer (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) transferiert. Anschließend wurden die Netzchen gefärbt und kontrastiert. Dazu wurden diese für 15 min in Tröpfchen von 2.5 % (w/v) Uranylacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland) in Ethanol und 10 min in Reynolds Bleicitrat-Lösung [121] gelegt. Anschließend wurden alle Netzchen mit einer schätzungsweise 5 nm dicken Kohlenstoffschicht beschichtet um Aufladungen der Probe zu vermeiden. Dazu wurde das Beschichtungsgerät MED 010 (Balzers Union AG, Balzers, Liechtenstein) verwendet. Für Doppeltiltserien wurden außerdem Goldmarker aufgebracht um eine genaue Überlagerung der Bildserie zu gewährleisten. Dafür wurden die Kupfernetzchen für 15 min in unverdünnte 12 nm ProtA-Au-beads (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert, gefolgt von einem kurzen Waschschrift in destilliertem Wasser. Die Proben wurden auf eine gute morphologische Gewebeerhaltung und auf mögliche Eiskristallbildung kontrolliert. Eiskristallbildung in Geweben zeigt sich als erstes in Zellkernen. In einem solchen Fall wurde die Probe von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Fertig präparierte Proben konnten schließlich am TEM untersucht werden, wo Doppeltislerien von mind. + 65 bis – 65 Grad erstellt wurden.

6.1.5 Elektronenmikroskopie und Elektronen Tomographie

Für Elektronen-Tomographie (EM-Tomographie) wurde ein JEM-2100 (JEOL, München, Deutschland) TEM, ausgestattet mit einer TemCam F416 4k x 4k (Tietz, „Video and Imaging Processing Systems“, Gauting, Deutschland), benutzt. Für die automatische Analyse waren Doppeltilts, aufgrund ihrer besseren Auflösung und Detailgehalt, notwendig. Um Doppeltilts zu erhalten wurden zwei Tiltserien von mind. +65° bis -65° und max. +70° bis -70° in 1° Grad Schritten von derselben NME aus zwei Richtungen aufgenommen. Die zweite Aufnahmeserie wurde nach Rotation des Grids um 90° aufgenommen. Für die automatisierte Durchführung der Aufnahmeserien wurde SerialEM [122] verwendet. Beide Tiltserien wurden aligniert, kombiniert und rekonstruiert mittels „Back-Projection“ Algorithmus der eTomo Software [123].

6.2 Verwendete Software zur Bildanalyse

6.2.1 Fiji

Fiji [24] ist eine Distribution der populären und quelloffenen Software ImageJ [124], welche durch Wayne Rasband am „National Institute of Health“ (Bethesda, Maryland, USA) [25,124] entwickelt wurde. ImageJ wurde speziell für die Analyse von biologischem Bildmaterial konzipiert. Es ist leicht auf beliebigen Plattformen zu installieren und bietet eine einfache Benutzeroberfläche. ImageJ ist sowohl für Anwender als auch für Softwareentwickler konzipiert, da ImageJ die Möglichkeit bietet, Funktionen in Form von Plugins oder Makros hinzuzufügen. Fiji verwendet moderne Softwareentwicklung um leistungsfähige Softwarebibliotheken mit einem breiten Spektrum von Skriptsprachen zu kombinieren, wodurch eine schnelle Entwicklung algorithmischer Prototypen zur Bildprozessierung ermöglicht wird. Fiji erleichtert die Umwandlung neuer Algorithmen in ImageJ Plugins, welche

mit anderen Endbenutzern über ein integriertes Updatesystem geteilt werden können. Über die Jahre wurde so ein beeindruckendes Sortiment von ImageJ Plugins entwickelt, die die meisten Felder der biologischen Bildanalyse berühren[24,25,124].

In dieser Arbeit wurden die Plugins „3D Image Suite“ [125] und „3D Viewer“ [126] verwendet.

6.2.1.1 3D „Image Suite“-Plugin

Da die meiste Software zur Bildanalyse nur für zweidimensionale Bilder geeignet ist, wurde das ImageJ Plugin „Tools for Analysis of Nuclear Genome Organization“ (TANGO, [125]) entwickelt, welches Biologen erlaubt einen vollständigen Analyseprozess, bestehend aus Bildprozessierung, quantitativer Analyse und statistische Auswertung, auf 3D Fluoreszenz Bildern durchzuführen. TANGO wurde ursprünglich entwickelt um Nuclei zu analysieren und in dieser Arbeit genutzt um dreidimensionalen Analyseschritte im Workflow durchzuführen, die 3D Vesikel zu verwalten und zu filtern [88,125]. Folgende Funktionen wurden verwendet:

3D „Fill Holes“

Durch Unregelmäßigkeiten in der Intensität eines Vesikels konnte es beim Anlegen eines Schwellwerts dazu kommen, dass kleine Löcher entstanden. Diese konnten später bei der Anwendung des 3D Watershed-Algorithmus dazu führen, dass Vesikel fälschlicherweise gespalten wurden. Um diese Löcher zu füllen wurde die Funktion „3D Fill Holes“ verwendet.

3D „Distance Map“

Die „3D Distance Map“ wurde verwendet um ausgehend von einem Binärbild (Schwarz-Weiß) die Distanz eines Vesikels (Schwarz) zum Hintergrund (Weiß) bildlich darzustellen. Dazu wurde ein neues Bild erzeugt, indem alle Rand-Voxel eines Vesikels ,also mit geringer Distanz zum Hintergrund, dunkel dargestellt werden, wo hingegen Voxel, die mittig in einem Vesikel lokalisiert waren (also mit großem Abstand zum Hintergrund), in der Distanzkarte hell

dargestellt wurden. Dadurch entstand für jeden, vorher im binären Bild schwarz dargestellten Vesikel ein Gradient aus Grauwerten, der zur Mitte hin immer heller wurde. Die entstandene „3D Distance Map“ war dazu da eine maximale Intensität im 3D Mittelpunkt eines jeden 3D Vesikels zu erzeugen, welche dann als Ausgangspunkte (englisch, „seed point“) für den daraufhin angewandten Watershed-Algorithmus diente.

3D „Watershed“

Der 3D „Watershed“-Algorithmus (zu Deutsch Wasserscheidentransformation) ist der entscheidende Schritt um aus zweidimensionaler Information durch Segmentierung dreidimensionale Vesikel zu erschaffen. Jeder segmentierte Vesikel bekam einen anderen Farbwert (16-bit) zugewiesen, um jeden Vesikel darüber unterscheiden zu können. Neben der Segmentierung hat der 3D „Watershed“ eine weitere entscheidende Funktion. Durch das Füllen der Vesikel, ausgehen ihrer Intensitätsmaxima kam es bei dem Aufeinandertreffen der virtuellen Wasserflächen zu einer Grenzbildung und somit zu einer Trennung von Vesikeln, die vorher verbunden waren. Dies war besonders im Falle der Vesikel entscheidend, die oft über filamentartige Strukturen verbunden sind oder sehr dicht beieinanderliegen. Durch Anwendung des 3D „Watershed“-Algorithmus konnten verbundene Vesikel voneinander getrennt werden.

3D „ROI-Manager“

Der 3D „ROI-Manager“ bietet eine Reihe nützlicher Funktionen um dreidimensionale Vesikeln zu verwalten. In dieser Arbeit wurden folgende Optionen verwendet: Segmentierung, quantitative Messung, Intensitätsmessung, Distanzmessung, Co-Lokalisation und Oberflächenkontaktmessung. Quantitative Messungen wurden mit der „Measure“-Funktion durchgeführt, Intensitätsmessungen dagegen mit der „Quantif“-Funktion. Außerdem

ermöglicht der 3D „ROI-Manager“ die Auflistung aller erkannten Vesikel. Jeder Vesikel kann in dieser Liste anhand seines Farbwertes und der Objektnummer ausgewählt werden. Falsch-positive Vesikel konnten so ausgewählt und mit der „Erase“-Funktion manuell gelöscht werden. Die „Live-Roi“-Funktion war dabei hilfreich um in der Liste ausgewählten Vesikel im Bild zu markieren und dadurch die Auswahl zu überprüfen.

3D „ROI-Manager“-Optionen

Die 3D „ROI-Manager“-Optionen dienen dazu bereits vor der Anwendung des 3D „ROI-Managers“ festzulegen welche Charakteristika unter der Option „Measurement“ ausgelesen werden sollen. Es konnte zwischen geometrischen Messungen, Intensitäts-Messungen einer Distanz- und Kollokalisations-Analyse gewählt werden. Geometrischen Messungen wurden in dieser Arbeit verwendet um Volumen (in nm³), Feret (die größte ermittelte Distanz zwischen zwei Kontur-Voxeln), Centroid (Massemittelpunkt) und die Distanz zur Oberfläche zu ermitteln. Die Option „Statistics“ bei den Intensitäts-Messungen diente dazu den durchschnittlichen, maximalen und minimalen Grauwert eines Vesikels und dessen Standardabweichung (SD) zu ermitteln. Die Distanz- und Kollokalisations-Analyse, mit der Option „centre-centre“, wurde zum Bestimmen der nächsten Nachbarvesikel verwendet.

6.2.1.2 3D „Viewer“-Plugin

Die 3D „Viewer“-Bibliothek diente zur Visualisierung dreidimensionaler Daten, sie beinhaltet Funktionen zur Extraktion von Oberflächen, zur Darstellung von Volumen und zur interaktiver Bearbeitung von Volumen. Die Bibliothek ermöglicht die einfache Darstellung und Interaktion von Bildvolumen in einer dreidimensionalen Umgebung. Das Plugin wurde beispielsweise verwendet um den Vesikelpool in 3D von allen Seiten zu betrachten, was durch Drehung per Mauszeiger möglich war [126].

6.2.2 Ilastik

Ilastik steht für “interactive learning and segmentation toolkit” [127]. Ilastik ist eine machine-learning software, die eine interaktive Segmentierung, Klassifizierung und Analyse von Bilddaten gewährleistet. Ilastik lernt von vom Benutzer per Maus gezeichneten Markierungen auf den Bilddaten. Basierend auf diesen Labels erschließt Ilastik eine Problem-spezifische Segmentierung. Ein „random forest classifier“ wird für den Lernschritt benutzt, wo die Nachbarschaft jedes Pixels durch ein Reihe generischer (nicht linearer) Eigenschaften charakterisiert wird [127].

Ilastik wurde in dieser Arbeit verwendet um die Performance der Software mit dem entwickelte 3D ART VeSElecT-Makro zu vergleichen.

6.2.3 Statistische Analyse

Für die Ermittlung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U Test in R [128] oder dem „scipy.stats“ Paket [129] in Python benutzt. Ein p-Wert $> 0,05$ = nicht signifikant (n.s.), $< 0,05$ = schwach signifikant (*), $< 0,01$ = signifikant (**), $< 0,001$ = hoch signifikant (***)

6.3 Entwickelte Software

6.3.1 Voraussetzungen für die Anwendung der erstellten Makros (3D

ART VeSElecT und Klassifikations-Makro)

Fiji Version: 1.51g

Zusätzliches Plugin: 3D ImageJ Suite [125]

Die Analyse wurde an einem Computer mit folgenden Charakteristika durchgeführt:

Prozessor: Intel® Core™ i5-3570 CPU | Xeon E5-1630v4 mit Nvidia NVS510 2GB Grafikkarte

Arbeitsspeicher: 16 GB | 32 GB

Systemtyp: 64 bit Betriebssystem

Beide Makros "3DART_VeSElecT_RegistVesicle" als auch "3DART_VeSElecT_MeasureVesicle" funktionieren mit der Fiji Version 1.51g.

6.3.2 3D ART VeSElecT und Klassifikationsmakro

3D ART VeSElecT steht für "3D automated reconstruction tool for vesicle structures of electron tomograms" und wurde zur automatisierten Erkennung von synaptischen Vesikeln in elektronenmikroskopischen Tomogrammen entwickelt. Die 3D ART VeSElecT-Makros für Registrierung, Charakterisierung (Resultate I: Fiji-Makro 3D ART VeSElecT) und Klassifizierung (Resultate II: Maschinelle Lernalgorithmen zur automatisierten Klassifizierung Resultate II: Maschinelle Lernalgorithmen zur automatisierten) synaptischer Vesikel wurden in IJMakro-Skriptsprache geschrieben. ImageJ selbst ist ein auf Java basierende Software. Die entwickelten Makros stehen auf der Homepage des Lehrstuhls für Bioinformatik zum Download zur Verfügung: <https://www.biozentrum.uni->

wuerzburg.de/bioinfo/computing/3DART-VeSElecT. Die genaue Funktionsweise der Makros ist detailliert in „Resultate I: Fiji-Makro 3D ART VeSElecT“ erklärt.

6.4 „Machine-Learning“-Algorithmen zur Klassifikation

Um den besten Algorithmus zur Klassifizierung der Vesikel zu finden wurden eine Support Vektor Maschine (SVM), ein Entscheidungsbaum-Klassifikator („Random Forest“ (RF) mit $k = 10$, $k = 1500$, k entspricht der Anzahl der Bäume) und ein k -Nächste-Nachbarn-Klassifikator (KNN) gegeneinander verglichen. Ausgangspunkt war der Vergleich der Performance bei der Klassifizierung von CCVs und DCVs anhand von vier Eigenschaften (r , gv , $GVSD$ und $distAZ$)

6.4.1 Support Vektor Maschine

Eine lineare Support Vektor Maschine (SVM) trennt zwei Klassen mittels eine Hyperebene auf. Daher fungierte die SVM als binärer Klassifikator, der ein lineares Klassifikationsproblem löste. Ein einer-gegen-alle („one-versus-all“) Ansatz und Problemkern-Reduktion können prinzipiell verwendet werden um die Klassifikation auf nichtlineare Probleme und mehr als zwei Klassen zu erweitern, was hier jedoch nicht benötigt wurde. Mit dem Ziel die Fehlerrate zu minimieren, diente eine Vektoroptimierung dazu den Abstand zwischen der Hyperebene und den nächsten Datenpunkten beider Klassen zu maximieren. Diese gleichnamigen „support-vectors“ (unterstützende Vektoren) liegen auf der positiven und negativen Hyperebene und befinden sich stets im gleichen Abstand zur separierenden Hyperebene [130].

6.4.2 Random Forest

„Random Forest“ (RF) ist ein sehr bekannter Klassifikator mit guter Performance, Skalierbarkeit und Anwenderfreundlichkeit. RF kann als eine Ansammlung von Entscheidungsbäumen betrachtet werden. Die Idee hinter diesem Algorithmus ist, dass die

Kombination schwacher Lernalgorithmen zu einem robusteren Modell, einem starken Lernalgorithmus, führen. Dies führt zu einem besseren Generalisierungsfehler und ist weniger anfällig für eine Überanpassung (in Englisch „Overfitting“). Der RF-Algorithmus kann in vier Schritte eingeteilt werden. Zuerst wurde ein zufälliges Bootstrap-Beispiel der Größe n erstellt, indem zufällig n Stichproben vom Trainingsdatensatz mit Ersetzungen ausgewählt wurden. Anhand dieses Bootstrap-Beispiels wurde eine festgelegte Anzahl von m Entscheidungsbäumen erstellt. Jeder dieser Bäume bestand aus einer festgelegten Anzahl an Eigenschaften. Dabei stellt jede Verzweigung eines Baumes eine logische UND-Verknüpfung aus Eigenschaften dar, die die Klassen repräsentierten. Jedes Blatt eines Baumes stellte eine Klasse dar. Zur Bestimmung der Klassenzuordnung wurden die Vorhersagen aller Bäume gesammelt und schließlich durch Mehrheitswahl zugeteilt.

RF-Modelle bieten einige Vorteile, zum Beispiel ist die Wahl der Hyperparameter nicht von entscheidender Bedeutung. Viel wichtiger ist die Wahl der Anzahl der Bäume. Typischerweise ist die Performance des Klassifizieralgorithmus besser je höher die Anzahl der Bäume, jedoch auf Kosten der Rechendauer [130].

6.4.3 K-Nächste-Nachbarn-Klassifikator

Der „K-Nearest Neighbor“, zu Deutsch K-nächste-Nachbarn-Algorithmus (KNN), gehört zu den langsam lernenden Algorithmen, da er keine unterscheidende Funktion erlernt, sondern sich stattdessen den Trainingsdatensatz einprägt. KNN basiert auf dem Prinzip, dass Instanzen (Beispiele in einem Trainingsset) innerhalb eines Datensatzes generell in enger Nachbarschaft zu anderen Instanzen mit ähnlichen Eigenschaften liegen.

Der KNN Algorithmus ist prinzipiell sehr unkompliziert, zunächst wurde eine Anzahl k und eine metrische Distanz gewählt. Danach wurden die k nächsten Nachbarn der zu klassifizierenden Instanz gesucht. Das Label wurden dann durch Mehrheitswahl vergeben.

KNN Algorithmen haben sich in vielen Fällen als sehr mächtiger Algorithmus bewiesen, ihnen werden jedoch auch einige Vorbehalte entgegengebracht. Der größte Vorteil von KNN ist, dass es sich umgehend anpasst, sobald neue Trainingsdaten gewählt werden. Jedoch gibt es folgende Nachteile des KNN Algorithmus: I) er benötigt viel Speicherkapazität, da der Rechenaufwand für die Klassifizierung neuer Instanzen linear mit der Anzahl der Beispiele im Trainingsdatensatz ansteigt, II) er ist sensitiv auf die Wahl der Ähnlichkeitsfunktion („similarity-function“), die benutzt wird um die Instanzen zu vergleichen und III) ihm fehlt ein prinzipieller Weg um k auszuwählen, außer durch Cross-Validierung oder ähnlich rechenaufwändige Techniken [130,131].

6.4.4 Implementierung der maschinellen Lernalgorithmen

Im Rahmen eines von mir betreuten Masterpraktikums wurde von Maria Theiss ein Skript in Python 3 erstellt, das CSV-Dateien einliest, welche das Trainingsdatenset enthalten, und die Klassifizierungs-Algorithmen von der „scikit-learn“-Bibliothek angewandt [132]. Dazu wurden die manuellen Labels in einen Array mit Eigenschaften umgewandelt: Vesikel, die mit „D“ (DCV) markiert waren wurden zu „-1“ umgewandelt. Vesikel, die als „E“ gekennzeichnet waren wurden entfernt und alle anderen Markierungen, also „C“ (CCV) und „N“ (nicht determinierbar), wurden zu „1“ umgeschrieben. „N“ Vesikel wurden CCVs zugeordnet, da sie mit ihnen mehr Ähnlichkeiten aufwiesen als mit DCVs (siehe Abbildung 15).

6.4.5 Evaluation der maschinellen Lernalgorithmen

Die Klassifikatoren wurden von Maria Theiss während eines von mir mitbetreuten Praktikums durch Cross-Validierung evaluiert. Dazu wurde ein Training so oft durchgeführt wie die Anzahl der vorhandenen Datensätze. Bei jedem Trainingsdurchlauf diente ein anderer Datensatz zur Validierung, alle restlichen Datensätze wurden zum Training benutzt. Für jede dieser Kombinationen wurden die Eigenschaften der Trainingsdaten standardisiert, indem der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) verwendet, und an den Klassifizierer übergeben wurden. Eine Evaluierungsfunktion determinierte die Akkuratessse aller Vesikel und zusätzlich „Precision“ (Genauigkeit), „Recall“ (Trefferquote) und den F-score der DCVs (siehe Formeln (1) – (3)).

Formeln:

$$Precision_{DCV} = \frac{RP_{DCV}}{RP_{DCV} + FP_{DCV}} \quad (\text{Formel 1}) *$$

$$Recall_{DCV} = \frac{RP_{DCV}}{RP_{DCV} + FN_{DCV}} \quad (\text{Formel 2}) *$$

$$F_{DCV} = 2 * \frac{Precision_{DCV} * Recall_{DCV}}{Precision_{DCV} + Recall_{DCV}} \quad (\text{Formel 3}) *$$

*RP: richtig Positive; FP: falsch Positive; FN: falsch Negative

Resultate der Evaluierung wurden als pandas.DataFrame [133] und als CSV Datei wiedergegeben.

r	gv	distAZ	GVSD	Manual_label	Label-array
12.685	134.98	461.932	4.266	D	-1
6.631	150.42	190.144	7.5	C	1
9.354	144.51	405.247	7.633	E	Deleted
7.911	134.485	473.051	4.539	N	1
...

Abbildung 4: Format der Input CSV-Datei. Die ersten vier Spalten sind die vier Eigenschaften, die fünfte Spalte beinhaltet die manuellen Labels. Das Python-Skript ersetzt die manuellen Labels mit numerische Bezeichnern: „D“ (DCV) -> „-1“, „E“ (error) wird gelöscht, „C“ und „N“ -> „1“ (CCV). (Abbildung zeigt die noch unveröffentlichten Daten aus dem von mir betreuten Masterpraktikum von Maria Theiss; Abbildung wurde von Maria Theiss erstellt)

7 Resultate

7.1 Resultate I: Fiji-Makro 3D ART VeSElecT

7.1.1 Algorithmus von 3D ART VeSElecT: Automatische Registrierung und Charakterisierung

Um zukünftig eine manuelle Segmentierung von Vesikelpools in elektronenmikroskopischen Tomogrammen zu ersetzen sollte eine automatisierte Lösung für diesen Zweck entwickelt werden. Dazu wurden zwei Makros für FIJI [24] von Katja Schulze (Technische Universität, Wildau) begonnen und schließlich von unter direkter programmiertechnischer Betreuung von Prof. Philip Kollmannsberger (Juniorprofessor am Center for Computational and Theoretical Biology, Universität Würzburg) fertiggestellt und weiterentwickelt.

Zur automatischen Registrierung und Charakterisierung synaptischer Vesikel wurden zwei Makros für FIJI [24] implementiert. FIJI ist eine Distribution von ImageJ [25,124], welche bereits eine große Zahl an Makros zur biologischen Bildanalyse enthält. Das erste Makro ermöglicht die Segmentierung von Vesikeln und setzt sich folgendermaßen zusammen: Präprozessierung, Vordergrund-Separierung, Entfernung störender Komponenten und schließlich die Segmentierung einzelner Vesikel (Abbildung 5: (I) registration macro).

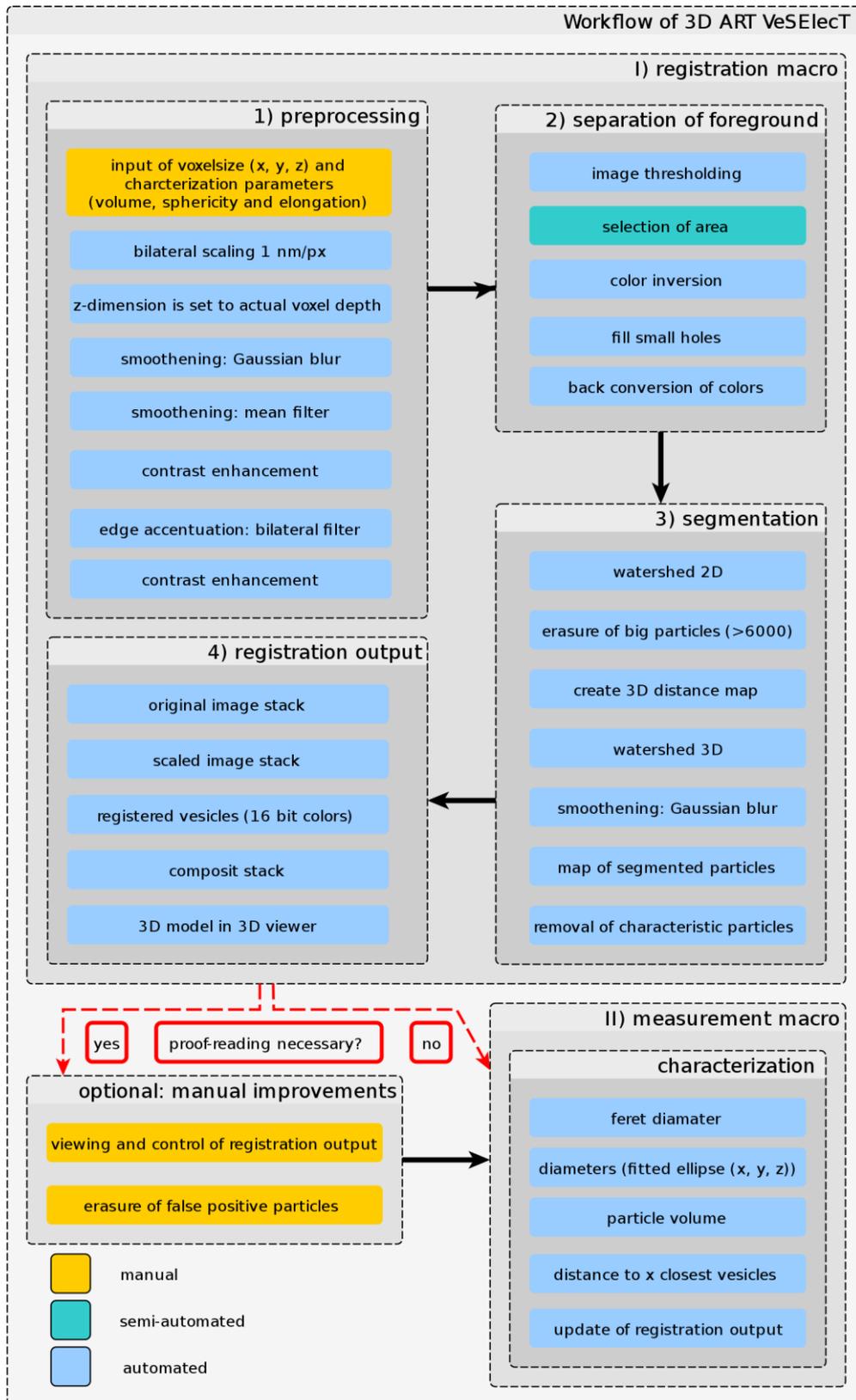


Abbildung 5: Workflow der automatisierten Vesikel-Annotation mit 3D ART VeSElecT. Der Arbeitsablauf besteht aus drei Schritten: 1) automatische Registrierung (I) „registration macro“, 2) optionale manuellen Verbesserung und 3) Charakterisierung (II)

„measurement macro“). Im ersten Schritt wird das Makro zur automatischen Registrierung angewandt, welches das Tomogramm anhand der eingegebenen Benutzerinformationen skaliert und vielfältige Filter im Präprozessierungsschritt anwendet. Anschließend findet eine Separation des Vordergrundes statt, indem der Benutzer semi-automatisch die zu analysierende Region auswählt. Daraufhin wird der „Watershed“-Algorithmus zur Vesikel Segmentierung und Registrierung angewandt. Der zweite Schritt besteht aus einem optionalen manuellen Verbesserungsschritt. Schließlich wird das vollautomatische „measurement“-Makro benutzt um die Charakteristika der Vesikel zu extrahieren. Alle manuellen Schritte sind in Gelb gekennzeichnet, semi-automatische in Türkis und vollautomatische in Blau (Abbildung aus Kaltdorf et al, 2017[88]).

7.1.1.1 Präprozessierung

Um eine reproduzierbare Routine für unterschiedliche Bildauflösungen zu garantieren und die reale Vesikelgröße bei abweichender Auflösung feststellen zu können, wurde jeder Bildstapel mittels bilateraler Skalierung in x und y Richtung auf 1 nm/px skaliert. Für die z-Dimension wurden keine Änderungen in der Skalierung vorgenommen, sondern die Distanz zwischen den einzelnen Bildern des Stacks auf die reelle Voxelgröße gesetzt, um die ursprünglichen räumlichen Dimensionen zu behalten ohne zusätzliche interpolierte Bilder zu erschaffen. Die Pixel/nm Größe des Datensatzes wurde über Benutzereingabe eingelesen. Es erfolgte eine Kontrasterhöhung via Histogrammspreizung über den gesamten Helligkeitsbereich, bei dem zugelassen wurde, dass 0.4 % der Pixel gesättigt werden. Danach wurde ein „Mean“-Filter (Radius = 3.45 px) angewandt um das Bildrauschen zu verringern, zusätzlich wurde ein Bilateralfilter („spatial“ = 3, „range“ = 100) zur Rauschreduzierung und Kantenerhaltung angewandt.

7.1.1.2 Vordergrund Separierung

Die Separierung des Vorder- und Hintergrundes wurde für jedes Bild einzeln mittels Schwellwertbildung basierend auf der mittleren Helligkeit durchgeführt. Um den Einfluss störender Komponenten im Bild zu reduzieren wurde eine semi-automatische Zellselektion

integriert. Dafür musste die Zellwand manuell mindestens im ersten und letzten Bild des Bildstapels nachgezeichnet werden. Basierend auf diesen Selektionen, der „regions of interest“ (ROI), wird für alle übrigen Bilder des Stacks die Auswahl interpoliert und so Teile des Bilds außerhalb der selektierten Regionen von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Da das Innere der Vesikel oft ähnliche Intensitätswerte wie der Hintergrund hat, kam es gelegentlich zur Ausbildung von Löchern im Binärbild (Maske). Diese wurden in einem zusätzlichen Bearbeitungsschritt gefüllt: Wegen der eng beieinanderliegenden Komponenten wurde eine Limitierung der Lochgröße eingebaut um zu verhindern, dass Teile des Hintergrundes gefüllt werden, was eine inkorrekte Separation zur Folge hätte. Deshalb wurde der Bildstapel mit der Funktion „Dilate“ erweitert um kleine Fehler auszubessern, die die folgenden Bildbearbeitungsschritte negativ beeinflusst hätten. Anschließend wurden die Farbwerte des Stacks invertiert um alle Löcher im Größenbereich 0-575 px zu registrieren und auszufüllen. Daraufhin wurde der Bildstapel wieder zurück invertiert was in einem korrekt separierten Hintergrund und Vordergrund resultierte.

7.1.1.3 Entfernung von störenden Komponenten und Segmentierung einzelner Vesikel

Da eine Zelle viele Komponenten enthält, die in hoher Dichte vorkommen, waren fast alle Teile der Zelle im Schwellwertbild miteinander verbunden. Um die runden Vesikel zu extrahieren wurde eine Segmentierung in zwei Schritten mittels „Watershed“-Algorithmus durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine 2D Segmentierung, und im Anschluss darauf eine 3D Segmentierung durchgeführt, wozu die Methoden der 3D ImageJ Suite [134] verwendet wurden. Dieser zweigeteilte Prozess half den Berechnungsaufwand und die Speichernutzung erheblich zu verringern. Außerdem ermöglichte es eine präzisere Eliminierung störender

Bestandteile. Diese erfolgte zwischen den beiden Segmentierungsschritten mit der Erosions-Methode der Bilder des Bildstapels und der Entfernung von Vesikeln mit einer Größe über 6000 px.

Für die 3D Segmentierung wurde eine 3D Abstandskarte erstellt und mit einem Gaussfilter von 3,45 geglättet um Artefakte an den Kanten der Vesikel zu verhindern. Basierend auf der erstellten Abstandskarte wurde die 3D Segmentierung ausgeführt (Schwellwert = 2 und Radius des Ausgangswerts = 2,3 px). Dadurch wurde eine Karte aller erkannten Vesikel erstellt. Jedes Vesikel wurde in unterschiedlicher Farbe dargestellt. Schließlich wurden alle Vesikel mit dem 3D „RoiManager“-Plugin registriert und Vesikel welche nicht den vorher definierten Charakteristika (Volume, Spherizität, Ellipsen Anpassung; Schwellwerte der Charakteristika differieren je Organismus: siehe Material und Methoden) entsprachen wurden automatisch entfernt.

7.1.1.4 Output der Registrierung

Als Endergebnis wurden die folgenden Bildstapel erstellt:

- „Stack“: original Bildstapel (Tomogramm)
- „StackDuplicateScale“: skaliertes Tomogramm
- „StackSegmented“: registrierte Vesikel in zufällig zugeteilten 16-bit Farben
- „Composit“: Überlagerung des „StackDulicateScale“ mit dem „StackSegmented“
- „StackSegmentedCopie“: eine 8bit Version des „StackSegmented“, der zur Betrachtung im 3D Viewer Plugin [126] verwendet werden konnte.

Alle Vesikel wurden im 3D „Manager“-Plugin registriert und konnten so einzeln innerhalb der Bildstapel ausgewählt werden. Der Name des ROIs korreliert zur Farbe des Vesikels in der 16-bit Farbkarte („StackSegmented“).

Die Separierung der Erkennung und Charakterisierung der Vesikel in zwei getrennte Makros ermöglicht einen fakultativen, manuellen Verbesserungsschritt, der dem Benutzer die Möglichkeit bietet falsch positiv erkannte Vesikel zu löschen.

7.1.1.5 Charakterisierung

Anschließend an die Registrierung und Segmentierung der Vesikel, werden im zweiten Makro unterschiedliche Charakteristika für jeden registrierten Vesikel, basierend auf der „Measure 3D“ Funktion des RoiManagers, determiniert: Feret, Diameter in x,y und z-Richtung (geordnet nach der Größe und nicht nach der Orientierung), Volumen jedes Vesikels und die Distanz zu den n (wurde zu Beginn des Makros festgesetzt) nächsten Vesikeln. Alle Messungen wurden in nm ausgegeben. Zusätzlich wurden alle Bilder erneuert um manuell gelöschte Vesikel in allen Bildstapeln zu entfernen.

7.1.2 Vergleich manueller und automatischer Annotation am Beispiel von 4dpf und 8dpf embryonalen *Danio rerio* neuromuskulären Endplatten (NME)

Um 3D ART VeSElecT auf seine Funktionalität zu testen und eine Quantifizierung für seine Leistungsfähigkeit zu erhalten, wurden vom Makro generierte Ergebnisse mit manuell ausgewerteten Daten verglichen. Hierzu wurden Tomogramme von NME von Zebrafisch (*Danio rerio*) Embryonen (4dpf und 8dpf) verwendet. In einer früheren Publikation von Frederik Helmprobst [89] wurden bereits systematische Unterschiede zwischen den unterschiedlichen embryonalen Stadien detektiert. Die Zebrafischproben-Präparation und Erstellung der Elektronenmikroskopischen Aufnahmen, als auch die manuelle Analyse wurden von Frederik Helmprobst durchgeführt und sind in Helmprobst et al publiziert [89].

Das Makro wurde von mir verwendet um die Daten ein weiteres Mal, diesmal mittels 3D ART VeSElecT, auszuwerten und so manuelle und automatische Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Dies diente dazu zu überprüfen ob die Unterschiede der synaptischen Vesikel in Embryonen verschiedener Stadien mit unserer Methode nachgewiesen werden können.

Abbildung 6A zeigt das Tomogramm einer 4dpf embryonalen Zebrafisch NME. Die NME wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden rekonstruiert. Im ersten Durchlauf manuell, mittels dem IMOD Softwarepaket [135] (Abbildung 6B und B') und im zweiten Ansatz mit dem entwickelten 3D ART VeSElecT Makro für Fiji [24] inklusive manuellem Verbesserungsschritt (Abbildung 6C und C'). Der visuelle Vergleich zeigt, dass Vesikel sehr akkurat und effizient durch das Makro erkannt werden. Die Verteilung und Position der annotierten Vesikel der automatischen Rekonstruktion sind vergleichbar mit der manuellen Annotation der Synapse. Auch bei näherer Betrachtung zeigt sich, dass individuelle Vesikel in beiden Rekonstruktionen nahezu identisch werden können.

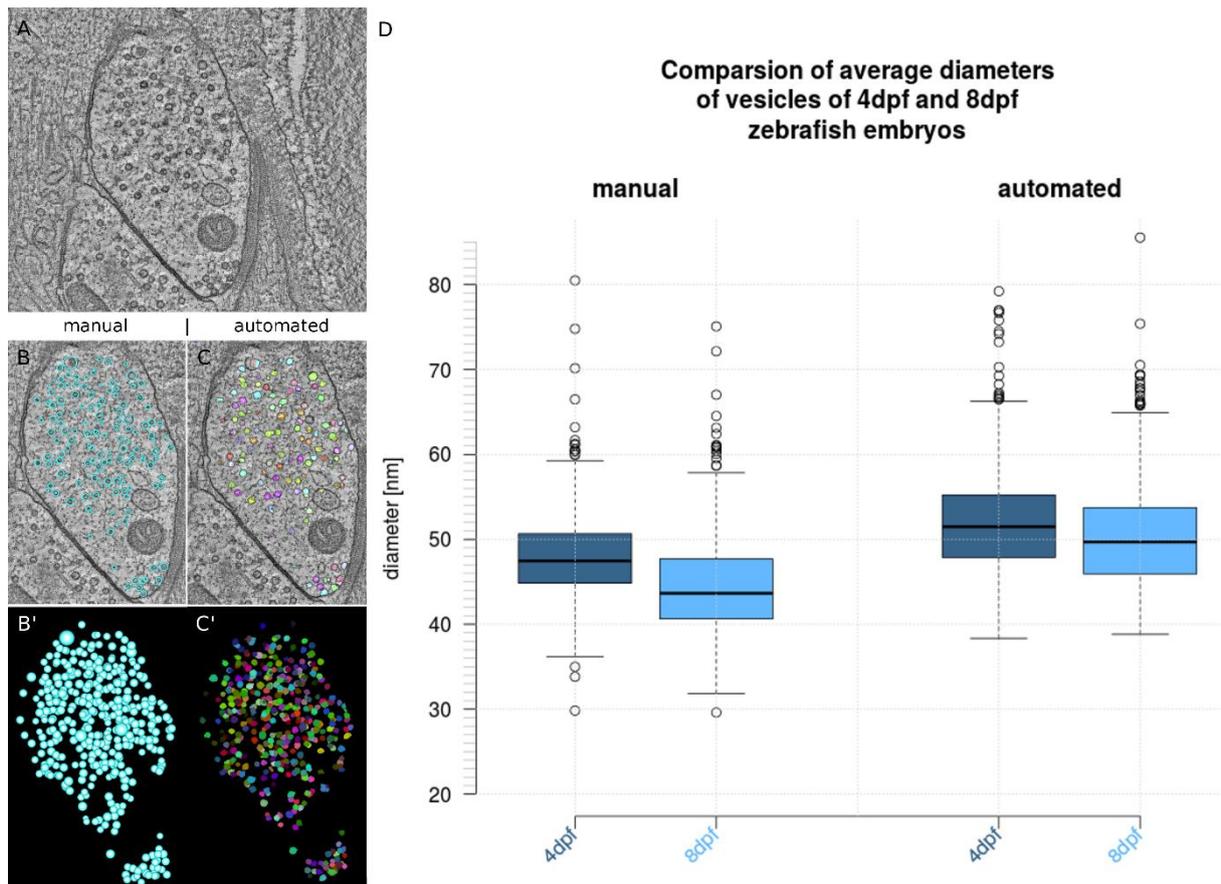
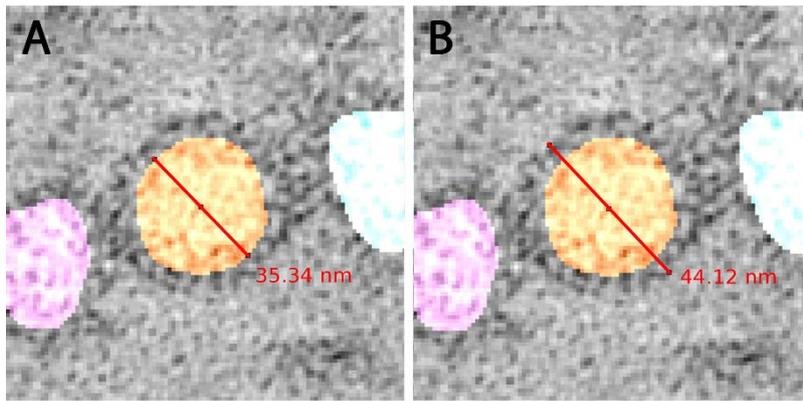


Abbildung 6: Analyse von NME von Zebrafisch-Embryonen mit 3D ART VeSElect im Vergleich zur manuellen Analyse mit IMOD. In Abbildung A) ist das originale Tomogramm einer 4dpf Zebrafisch NME zu sehen. In B) sieht man die Überlagerung des Tomogramms aus A) überlagert mit der manuellen Rekonstruktion, B') zeigt die 3D Rekonstruktion der manuellen Annotation (Vesikel sind in hellblau dargestellt). Diese steht zum Vergleich zur semi-automatischen Vesikel Rekonstruktion. In C) ist die Überlagerung des original Tomogramms mit der Vesikel-Rekonstruktion mit 3D ART VeSElect zu sehen, C') zeigt den Vesikelpool der 3D Rekonstruktion der semi-automatischen Rekonstruktion (Vesikel sind in beliebigen Farben dargestellt). Die in D) dargestellten Boxplots zeigen die Ergebnisse aus dem Vergleich von 4dpf und 8dpf Zebrafisch-Embryonen der Analyse mittels manueller Rekonstruktion (links) und semi-automatischer Rekonstruktion (rechts). Die Box des Boxplots zeigt die mittleren 50% der Daten. Die Linie in der Box repräsentiert den Median aller Daten. Die Antennen enden am niedrigsten Wert innerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands (IQA) des unteren Quartils und am höchsten Wert innerhalb des 1,5-fachen IQA des oberen Quartils. Daten die nicht innerhalb der Antennen liegen werden als punktförmige Ausreißer dargestellt (manuelle Analysen wurden von Frederik Helmprobst, automatisierte Analysen von mir durchgeführt; Abbildung aus Kaltdorf et al, 2017[88]).

Manuelle Messungen und automatische Messungen sind prinzipiell zwei unterschiedliche methodische Ansätze um durchschnittliche Vesikeldiameter zu messen. Bei der manuellen Messung wie in Helmprobst et al. [89] wurde die Software IMOD benutzt um jeden Vesikel mit einer Kugel darzustellen. Die Größe der Kugel wurde so angepasst, dass die Vesikelmembran darin enthalten war, wie in Abbildung 6 B zu sehen. Radius und Diameter konnten anhand der Kugelgröße extrahiert werden. Der durchschnittliche Vesikeldiameter der manuellen Messung beträgt $47,86 \pm 4,98$ nm für 4dpf und $44,45 \pm 5,49$ nm für 8dpf Embryonen, was einen Unterschied von 3,41 nm ergibt (Abbildung 6D). Im Gegensatz zur manuellen Rekonstruktion erkennt das Makro automatisch das Innere des Vesikels ohne die Vesikelmembran (Abbildung 6 C und A). Um das Ergebnis der semi-automatischen Rekonstruktion zu visualisieren, wurde ein durchschnittlicher Diameter aus Diameter 1, 2 und 3 errechnet um die Vesikelgröße zu erhalten. Diameter aus manueller und automatischer Rekonstruktion unterscheiden sich systematisch. Automatisch generierte Vesikeldurchmesser sind stets kleiner als die Ergebnisse aus der manuellen Messung, was dadurch erklärt werden kann, dass bei der manuellen Messung die Vesikelmembran miteinbezogen wird, während bei der automatischen Messung nur das Vesikelinnere segmentiert wird. Um die Unterschiede der Durchmesser der manuellen und automatischen Analyse genauer zu determinieren wurde die Differenz zwischen dem inneren (was dem vom Makro gemessenen Diameter entspricht) und äußeren Vesikeldiameter (bis zum äußeren Rand der Vesikelmembran) systematisch an 80 Stichproben aus verschiedenen *C. elegans* Tomogrammen ausgemessen, wie in Abbildung 7A und B gezeigt.



C Difference between inner diameter (automated segmentation) and outer diameter (manual segmentation)

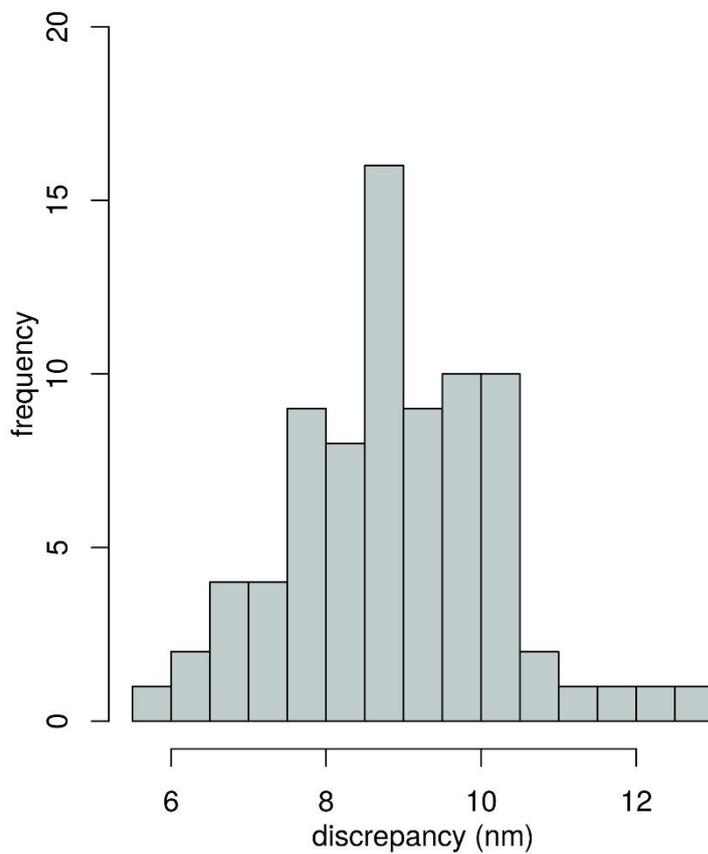


Abbildung 7: Messergebnisse des inneren und äußeren synaptischen Vesikel Durchmessers. Um die Differenz zwischen dem inneren und äußeren Vesikeldurchmesser der manuellen und automatischen Messung zu erhalten wurde das Mess-Werkzeug in Fiji verwendet. In A) ist der innere Vesikeldurchmesser gezeigt, wie er durch die Annotation mit 3D ART VeSElecT automatisch segmentiert wird. In B) ist der äußere Durchmesser dargestellt, wie er in der manuellen Rekonstruktion verwendet wird. In C) sind die

Resultate der Unterschiede zwischen innerem und äußerem Durchmesser als Histogramm aufgetragen, Anzahl der Messungen = 80 (Abbildung aus Kaldorf et al, 2017[88]).

Abbildung 7C zeigt alle gemessenen Unterschiede in einem Histogramm. Die Ergebnisse zeigen eine durchschnittliche Diskrepanz von $8,9 \pm 1,36$ nm was ziemlich genau dem erwarteten Wert von 8 nm entspricht, der Dicke der Doppellipidschicht. Um die Differenzen zwischen äußerem und innerem Vesikeldurchmesser zu kompensieren und so eine Vergleichbarkeit zwischen manuellen und automatischen Messungen herzustellen wurde die ausgemessene Differenz von 8,9 nm auf die Vesikeldurchmesser der automatischen Analyse dazu addiert. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden in Abbildung 6D aufgetragen. Automatisch annotierte Vesikel zeigen dann einen Mittelwert von $51,79 \pm 5,78$ nm für 4 dpf und einen Mittelwert von $50,33 \pm 5,88$ nm für 8 dpf Zebrafisch Embryonen, was einen Unterschied von 1,46 nm ergibt.

Tabelle 1 vergleicht die benötigte Zeit für manuelle und semi-automatische Rekonstruktion von Vesikelpools. Die benötigte Zeit für die manuelle Analyse wurde aus unserer Erfahrung in der manuellen Analyse heraus abgeschätzt. Wie in Tabelle 1 ersichtlich, ist die automatische Vesikelregistrierung mit anschließendem manuellen Verbesserungsschritt viel weniger zeitaufwändig als eine komplett manuelle Annotation. Die manuelle Annotation mittels IMOD benötigt durchschnittlich 4 bis 8 Stunden, je nach Vesikelanzahl im Vesikelpool und abhängig von der Erfahrung und Routine der ausführenden Person. Dagegen benötigt die automatische Vesikelsegmentierung ca. 7 bis 40 min abhängig davon wie lange für die nachträgliche manuelle Verbesserung dauerte, was je nach Tomogramm 0-30 min in Anspruch nahm, anhängig von der Anzahl an falsch positiven Vesikeln.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der benötigten Zeit für manuelle Rekonstruktion und semi-automatischer Rekonstruktion

	IMOD	3D ART VeSElect
Annotation	~ 4-8 h (manuell)	< 7 min (automatisch)
Verbesserung / „Proof-Reading“	Nicht notwendig	~ 0 – 30 min (manuell)
Auslesen der Ergebnisse	Innerhalb von Sekunden (automatisch)	Innerhalb von Sekunden (automatisch)

Tabelle 1 vergleicht die benötigte Zeit für manuelle Segmentierung mittels IMOD (links) im Vergleich zur automatischen Segmentierung mit 3D ART VeSElect (rechts) plus der benötigten Zeit für den manuellen Verbesserungsschritt. Die benötigte Zeit wurde jeweils für jedes einzelne der 10 Tomogramme aufgetragen und den einzelnen Arbeitsschritten zufolge in Kategorien eingeteilt: Annotation, Verbesserung („Proof-Reading“) und Auslesen der Ergebnisse. Um ein typisches Beispiel zu nennen: für eine Synapse mit einer Größe von 0,153 μm^3 , 389 richtig positiven Vesikeln und 8 falsch positiven Vesikeln wird eine Laufzeit von 6:15 min für die automatische Erkennung der Vesikel benötigt, 10 min für das „Proof-Reading“ und ca. 20 sek. für das Makro zur automatischen Ausmessung der Vesikel.

Die folgende Tabelle 2 zeigt die Fehlerrate der automatischen Analyse jedes Zebrafisch Tomogramms nach manueller Verbesserung, also Entfernung falsch positiver Vesikel. Die Fehlerrate wurde definiert als falsch Negative (FN) / Gesamtanzahl der Vesikel in Prozent. Zusätzlich wurde die Fehlerrate als „Precision“ (Genauigkeit) und „Recall“ (Trefferquote) ermittelt und in Abbildung 9 dargestellt.

Tabelle 2: Fehlerrate falsch negativer Vesikel pro Gesamtanzahl der Vesikel für jedes Tomogramm.

	Tomo 1	Tomo 2	Tomo 3	Tomo 4	Tomo 5	Tomo 6	Tomo 7	Tomo 8	Tomo 9	Tomo 10
Fehlerrate* (%)	3,6	1,8	1,0	1,8	2,6	3,3	14,7	12,9	1,2	2,5

*Die Fehlerrate ist definiert als FN / Gesamtzahl der Vesikel in der Synapse.

Tabelle 2 zeigt eine sehr geringe Fehlerrate von 1% bis 3,6% (Durchschnitt ist 2,2%) für acht von zehn Tomogrammen. Nur zwei Tomogramme zeigen eine etwas höhere Fehlerrate von 12,9% und 14,7%. Alle zehn Tomogramme zusammengenommen ergeben eine durchschnittliche Fehlerrate von 4,8%.

7.1.3 Anwendungsbeispiel: Vergleich von wildtypischen *C. elegans* mit Septin-Mutante

Nachdem anhand des Zebrafischbeispiels gezeigt wurde, dass das Makro in der Lage ist Vesikelunterschiede zu detektieren, wurde 3D ART VeSElect als nächstes bei einer ungelösten biologischen Fragestellung angewandt. Dafür wurden die gut beschriebenen Vesikelpools von der NME wildtypischer (N2) *C. elegans* auf ihre Unterschiede im Vergleich zu Funktionsverlust-Mutanten eines potentiellen synaptischen Vesikelpool-Regulators – den Septinen verglichen.

Wegen des bislang nicht gänzlich geklärten unkoordinierten Bewegungsablaufs in *C. elegans unc-59*-Mutanten gab es Grund zur Annahme, dass durch eine Mutation im Septingen, die zum Funktionsverlust des Proteins führt, die Ultrastruktur der NME beeinträchtigt ist. Um zu untersuchen ob eine genauere Analyse des Sachverhalts sinnvoll wäre und um zu beweisen, dass die entwickelten Makros auch auf Tomogrammen anderer Organismen funktionieren, benutzten wir 3D ART VeSElect um eine schnelle Analyse der *unc-59(e261)* NME auf

offensichtliche Unterschiede im Vergleich zum N2 WT zu untersuchen. Ergebnisse aus dieser Analyse sind in Abbildung 8 dargestellt.

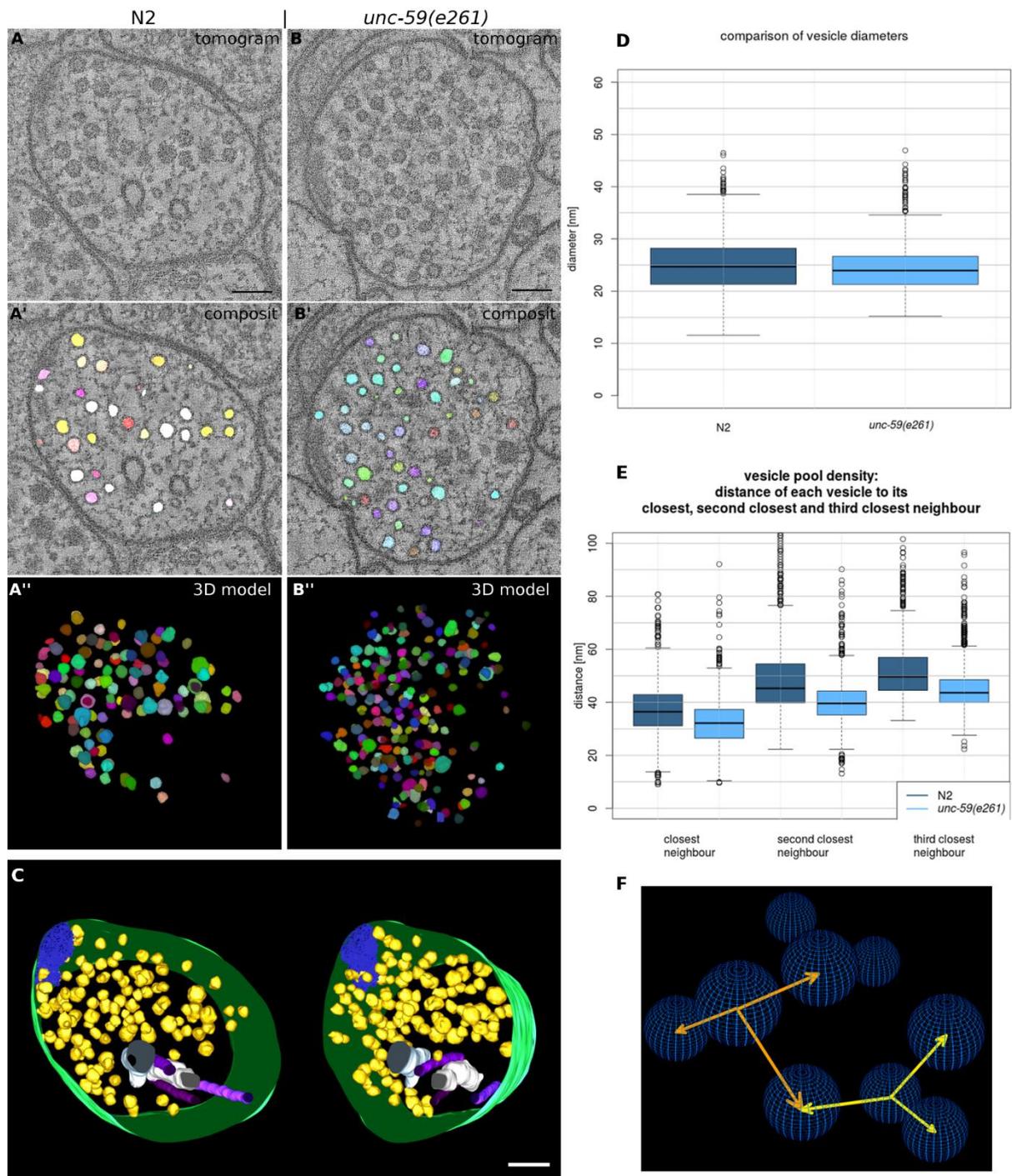


Abbildung 8: Vergleich von N2 und *unc-59(e261)* *C. elegans* Tomogrammen mittels 3D ART VeSElecT. Diese Abbildung zeigt die einzelnen Schritte der Vesikelannotation mit 3D ART VeSElecT auf N2 (A-A'') und *unc-59(e261)* (B-B'') *C. elegans* Tomogrammen. In (A, B) ist das ursprüngliche Tomogramm gezeigt, (A', B') zeigt den „Composit“-Bildstapel, eine

Überlagerung aus dem ursprünglichen Tomogramm mit der Annotation des Vesikelpools (Vesikel sind in zufälligen Farben dargestellt). Das dreidimensionale Modell der semi-automatischen Annotation (automatische Registrierung plus manuelle Korrektur) des Vesikelpools ist in (A'', B'') gezeigt. In (C) wurde die semi-automatische Annotation des Vesikelpools in IMOD übertragen und die Rekonstruktion manuell um weitere Strukturen der NME vervollständigt (Abbildung aus Kaltdorf et al, 2017[88]).

Abbildung 8 zeigt visuelle Ergebnisse der Vesikelrekonstruktion (Abbildung 8A-A'' und B-B'') als auch Resultate aus den Messungen der Vesikelgröße und Vesikelpooldichte (Abbildung 8D und E). Abbildung 8A und 4B zeigen die original Tomogramme von N2 und *unc-59(e261)* *C. elegans* NMEs. Auf automatisiertem Wege findet und markiert das Makro Vesikel basierend auf den Tomographiedaten. Abbildung 8A' und B' zeigen „Composit“-Bildstapel, also Überlagerungen aus dem ursprünglichen Tomogramm mit der Vesikelannotation. Die Annotation der Vesikel kann als dreidimensionale Rekonstruktion visualisiert werden, wie in Abbildung 8A'' und B'' zu sehen. Nach automatischer Registrierung und manueller Verbesserung, das heißt dem Löschen falsch positiver Vesikel, wurde ein zweites Makro angewandt um relevante quantitative Daten zu extrahieren, z.B. Vesikeldiameter, Vesikelvolumen und Distanz zwischen den Vesikeln. Um die synaptischen Vesikelpools von *unc-59(e261)* und N2 *C. elegans* auf ihre Unterschiede hin zu untersuchen, wurden die durchschnittlichen Vesikeldiameter und durchschnittliche Distanz zu den 3 nächsten Nachbarvesikeln miteinander verglichen (Abbildung 8D und E). Abbildung 8D zeigt den Vergleich der synaptischen Vesikelgröße von N2 und *unc-59(e261)* NME. Für den Vergleich wurde der durchschnittliche Diameter aus Diameter 1, 2 und 3, welche vom Makro ausgegeben werden, errechnet. Die Boxplots in Abbildung 8D zeigen kleine aber hochsignifikante (p-Wert < 0.001, Mann-Whitney-U Test) Unterschiede in der durchschnittlichen synaptischen Vesikelgröße von 0,7 nm zwischen N2 und *unc-59(e261)*.

Boxplots in Abbildung 8E zeigen die synaptische Vesikelpooldichte. Diese wurde errechnet, indem die Distanz von einem Vesikelmittelpunkt zu den Mittelpunkten der drei nächsten Nachbarvesikel gemessen wurde, wie schematisch in Abbildung 8F demonstriert. Als Ergebnis zeigen *unc-59(e261)* NME für jedes Messergebnis (nächster, zweitnächster und drittnächster Vesikel) eine hochsignifikant 4 nm (p-Wert < 0,001, Mann-Whitney-U-Test) kürzere Distanz zwischen SVs als N2 NME.

Nach der Anwendung von 3D ART VeSElect zur automatischen Rekonstruktion des Vesikelpools, besteht die Möglichkeit die visuellen Ergebnisse zu transformieren und in IMOD zu transferieren. Dort können fehlende Vesikel oder andere zelluläre Strukturen ergänzt werden (Abbildung 8C).

7.1.4 Weitere Fehlerratenanalyse: „Precision“ und „Recall“

Um die unterschiedliche Qualität der Tomogramme und die stark davon abhängige Fehlerrate besser zu verstehen zeigen und diskutieren wir einzelne Vesikel von Tomogrammen mit verschiedenen Ergebnissen für „Precision“ (Genauigkeit) und „Recall“ (Trefferquote) (Abbildung 9).

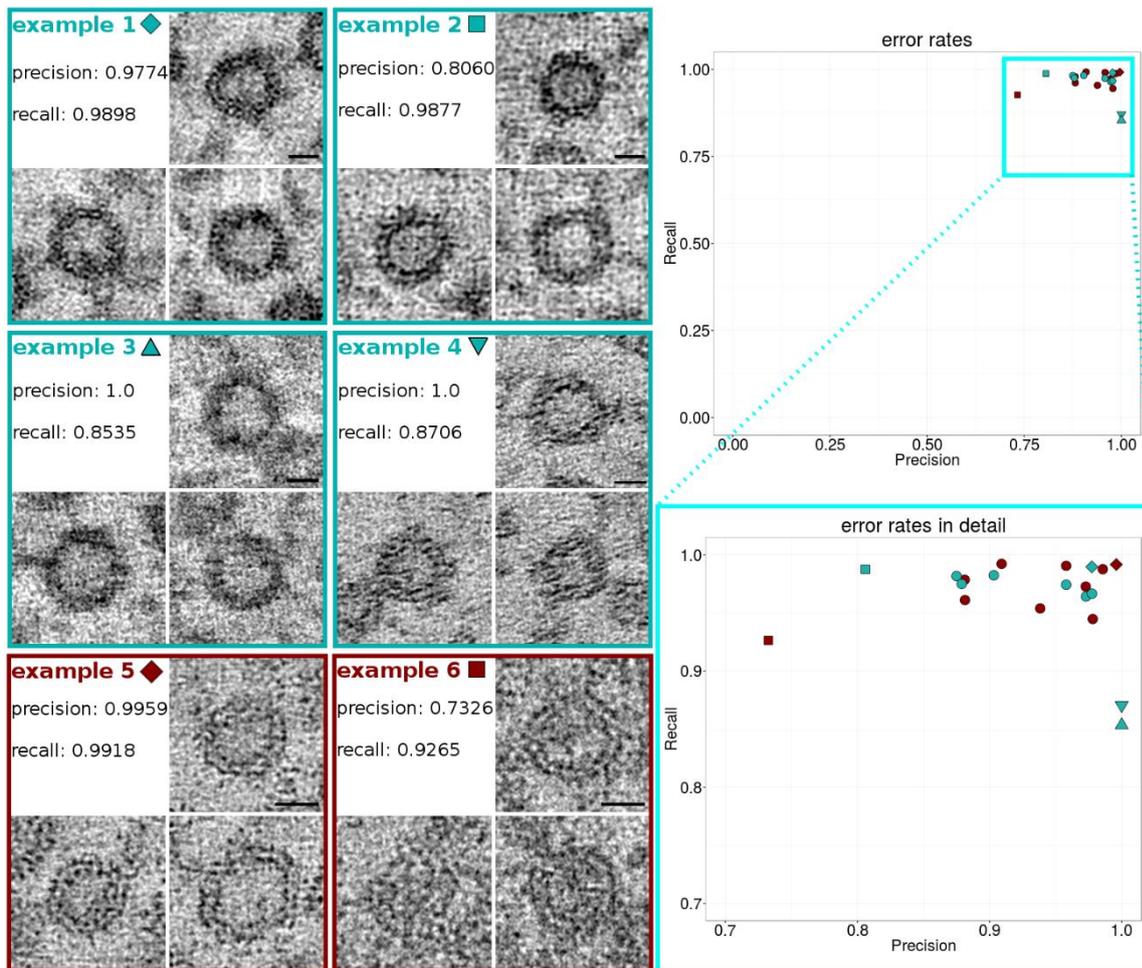


Abbildung 9: Fehlerraten bei der automatischen Vesikelerkennung mit 3D ART VeSElecT. Im rechten oberen Eck ist ein Punktdiagramm zu sehen, welches die Fehlerraten von Zebrafisch (Türkis) und *C. elegans* (Dunkelrot) zeigt. Jeder Punkt repräsentiert „Precision“ und „Recall“ eines Tomogramms (Vergrößerter, detaillierter Plot ist auf der unteren rechten Seite zu sehen). Tomogramme, die auf der linken Seite der Abbildung als Beispiele repräsentiert sind, wurden in den Diagrammen als spezielle Zeichen (z.B. Dreieck oder Quadrat) anstatt von Punkten dargestellt. Beispiel 1 auf der linken Seite der Abbildung zeigt eine hohe Qualität des Tomogramms mit guten Ergebnissen für „Recall“ (geringe Anzahl an FN) und „Precision“ (geringe Anzahl an FP). Im Vergleich dazu ein Tomogramm mit schlechterem Ergebnis für „Precision“ (Beispiel 2) und zwei Tomogramme (Beispiel 3 und 4) mit höherer Rate von FN Vesikel, also geringerer „Recall“. Außerdem zeigen die Beispiele 5 und 6 Vesikel eines Tomogramms mit den besten Resultaten (Beispiel 5) im Vergleich zu einem Tomogramm mit schlechter „Precision“-Rate (Beispiel 6). Skalierungsbalken = 20 nm. (Abbildung aus Kaltdorf et al, 2017[88])

Auf der rechten Seite von Abbildung 9 sind die Ergebnisse als „Precision“ (Genauigkeit) und „Recall“ (Trefferquote) dargestellt, jeder Punkt repräsentiert die Ergebnisse beider Werte für ein Tomogramm. Alle Punkte clustern in der rechten oberen Ecke (nahe von $x=1$ und $y=1$) des Punktdiagramms. Dies zeigt, dass die Fehlerraten des Makros sehr gering sind, 3D ART VeSElecT also gute, verlässliche Ergebnisse mit nur sehr wenigen Fehlern generiert. Die Fehlerraten für *C. elegans* liegen im gleichen Bereich wie die von Zebrafischen. Auf der linken Seite von Abbildung 9 wurden Ausreißer zu Tomogrammen mit den besten Ergebnissen für „Precision“ und „Recall“ verglichen. „Precision“ und „Recall“ sind ein Maß für die Fehlerrate. „Precision“ ist ein Indikator für die Zahl von falsch Positiven (FP) in Relation zu richtig Positiven (RP) (siehe Formel 1) und wird auch als Genauigkeit bezeichnet. Wo hingegen „Recall“ die Zahl der FN in Relation zu den RP darstellt (siehe Formel 2). Eine Rate von „Precision“ und „Recall“ von je 1 würde eine Fehlerfreiheit von 100% bedeuten. Oft haben Beispiele entweder ein sehr gutes Ergebnis für „Precision“ oder für „Recall“, somit gilt es die Parameter des Makros so zu setzen, dass ein ausgewogenes Gleichgewicht der beiden Fehlerraten für alle Tomogramme entsteht. Beispiel 1 hat sehr gute Ergebnisse sowohl für „Precision“ als auch für „Recall“ („Precision“ = 0,9774; „Recall“ = 0,9898). Die Ausschnitte der Vesikel aus diesem Tomogramm (Abbildung 9, Beispiel 1) zeigen die sehr gute Qualität des Datensatzes. Die Textur des Tomogramms ist sehr gleichmäßig und die Doppellipidmembranen der Vesikel ist deutlich zu erkennen. Beispiel 2 hat ebenfalls sehr gute Ergebnisse für „Recall“ (0,9877) dafür jedoch schwächere Ergebnisse für „Precision“ (0,8060). Beim Vergleich der Bildausschnitte fällt auf, dass die Textur von Beispiel 1 ebenmäßiger und feiner ist als bei Beispiel 2. Dies scheint der Grund für die unterschiedliche Erkennung FP Vesikel zu sein. Beispiel 3 und 4 haben beide sehr gute Ergebnisse für „Precision“ („Precision“ = 1, keine FP), jedoch haben sie dafür schlechtere Ergebnisse für „Recall“ (Beispiel 3: Recall = 0,8535 und Beispiel 4: Recall = 0,8706). In Beispiel

3 ist eine deutlich schlechtere Qualität des Tomogramms erkennbar, verglichen zu Beispiel 1. Details wie die Doppellipidmembran der Vesikel können nicht erkannt werden. Die Vesikelmembranen sehen verschwommen aus. Wegen der weniger deutlichen Kanten im Tomogramm wurden manche Vesikel hier nicht erkannt. Beispiel 4 hat ein geringfügig besseres Ergebnis für „Recall“ als Beispiel 3. Auf den ersten Blick sehen die Vesikel in Beispiel 4 definierter aus als in Beispiel 3. Wenn man Beispiel 4 jedoch zu Beispiel 1 und 2 vergleicht werden deutliche Unterschiede in der Textur der Datensätze offensichtlich. Wo sie Textur in Beispiel 1 und 2 kleinen runden Punkten ähnelt, sieht die Textur in Beispiel 4 eher wie kleine Streifen aus, die in die gleiche Richtung orientiert sind. Die Qualität des Tomogramms ist von vielen Faktoren abhängig. Zuerst einmal können kleine Unterschiede in der Probe und technische Anomalien, so wie Vibrationen während der Aufnahme der Tilt-Serie die Qualität der resultierende Tomogramme beeinflussen. Zweitens, ideale Einstellung der Belichtungszeit und des Fokus sind ausschlaggebend. Drittens, Mängel beim Prozessieren des Tomogramms, wie z.B. nicht exaktes Überlagern der einfach getilteten Tomogramme zu einem sog. „Doppeltilt“ aufgrund ungleicher Verteilung von Goldantikörpern, sind entscheidend für die Qualität des finalen Tomogramms und sind somit möglicherweise Erklärungen für die Beobachtungen.

Beispiel 5 zeigt Vesikel des *C. elegans* Tomogramms mit den besten Ergebnissen für „Precision“ und „Recall“ („Precision“ = 0,9959; „Recall“ = 0,9918). Obwohl der Kontrast viel geringer als in den Beispielen 1 und 2 ist, kann die Doppellipidmembran sehr gut erkannt werden. Im Vergleich dazu zeigt Beispiel 6 Vesikel eines *C. elegans* Tomogramms mit geringer „Precision“ (viele FN Vesikel). Der Vesikel im oberen rechten Eck im Beispiel 6 wurde vom Makro gut erkannt, wo hingegen beide Vesikel darunter nicht erkannt wurden. Diese beiden Vesikel sind aufgrund ihres geringen Kontrasts des Vesikelinneren zur Membran selbst für das

menschliche Auge nur schwer vom Hintergrund zu unterscheiden. In diesem Fall wurde entschieden die Tomogramme mit geringerer Qualität mit in die Analyse einzubinden, da neben der ermittelten Fehlerrate die Vesikelerkennung noch immer innerhalb des Toleranzbereichs lag. Tomogramme haben stets eine Varianz der Qualität aufgrund der vielen Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen können, einerseits während der Aufnahme der Tiltserie und andererseits während der Prozessierung des Tomogramms. Daher muss der Benutzer selbst entscheiden welches Tomogramm noch im Toleranzbereich liegt und welches von der Analyse ausgeschlossen wird, dazu sind „Precision“ und „Recall“ hilfreiche Indikatoren.

7.1.5 Vergleich zu Ilastik als Methode auf Basis von maschinellem Lernen

Um die Performance unserer Methode im Vergleich zu anderer Software besser beurteilen zu können wurde ein „Random Forest“-Klassifikator (siehe Material und Methoden, Random Forest), ein Klassifizierungsverfahren, welches Entscheidungsbäume benutzt, in Ilastik trainiert. Dazu wurden Eigenschaften ausgewählt, die auf runde, kugelartige Strukturen abzielten (Gaussian Smoothing, Laplacian of Gaussian, Difference of Gaussian, und Hessian of Gaussian Eigenvalues). Es wurden große sigma-Werte benutzt ($\sigma = 3.5 \dots 10.0 \text{ px}$). Trainingsdaten wurden manuell in 3D in einem Subvolumen von 686 x 674 x 111 px manuell gelabelt.

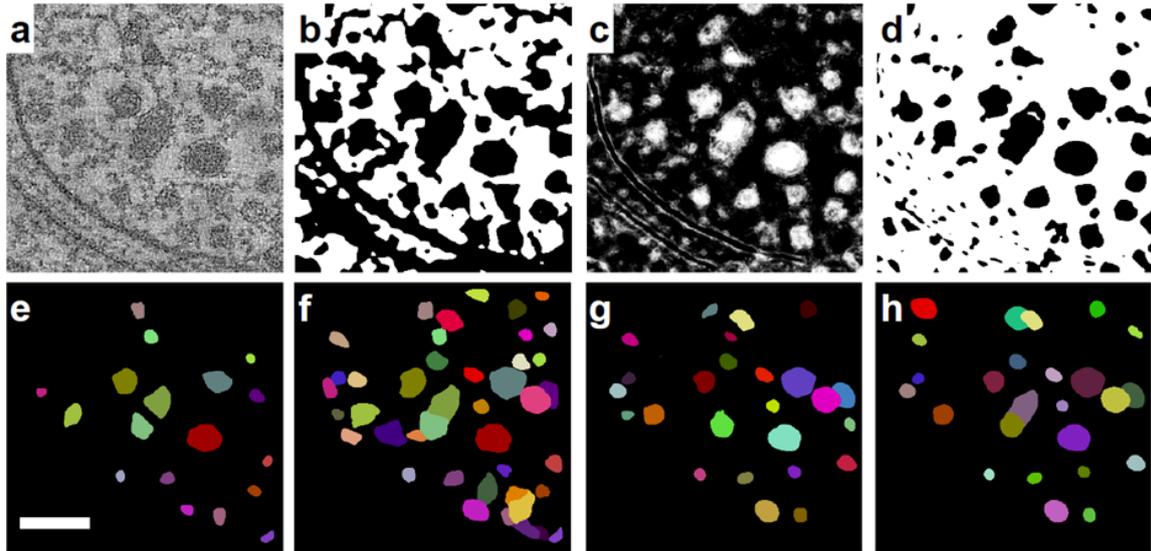


Abbildung 10: Vergleich von 3D ART VeSElecT mit Ilastik. (A) Schnitt durch ein original Tomogramm bei $z = 55$, (B) gleicher Schnitt nach der Präprozessierung und Schwellwertbildung durch unsere Methode, (C) Vesikel Membran Vorhersagekarte produziert von Ilastik, (D) Vorhersagekarte nach Anwendung von Otsu's Algorithmus für die Schwellwertbildung. (E) Segmentierte Vesikel bei $z = 55$, und (F) „max-intensity“ Projektion des gesamten Volumens nach Segmentierung mit unserer Methode, (G) „max-intensity“ Projektion des segmentierten Volumens mittels Ilastik-generierter Vorhersagekarte als Input, und (H) „max-intensity“ Projektion des segmentierten Volumens nach Anwendung des 3D „Watershed“-Algorithmus auf Basis der Vorhersagekarte. Skalierungsbalken = 100 nm (Abbildung erstellt von Philip Kollmannsberger; Abbildungsquelle: Kaldorf et al, 2017[88]).

Die Maske, die durch Thresholding der Ilastik-generierten Wahrscheinlichkeitskarte (Abbildung 10d) erstellt wurde, zeigt eine höhere Spezifität für Vesikel als die Maske, die in unserer Methode produziert wird (b). Nach der Segmentierung und morphologischen Filterung auf beiden Masken wurden mit Hilfe unserer Methode mehr Vesikel gefunden (f, 43 Vesikel) als in der Ilastik-generierten Maske (g, 26 Vesikel) oder einer direkten 3D „Watershed“-Segmentierung auf der Maske (h, 26 Vesikel). Vesikel, die durch diese drei unterschiedlichen Methoden erkannt wurden sahen alle in Größe und Form identisch aus. Die Tatsache, dass insgesamt weniger Vesikel mit der Wahrscheinlichkeitskarte von Ilastik und dass

unterschiedliche Vesikel aber insgesamt die gleiche Gesamtzahl abhängig von der Vorgehensweise gefunden werden (g, h) zeigt, dass die lernbasierte Methode unserer zielgerichteten Methode nicht überlegen ist. Da FP Vesikel leichter zu korrigieren sind als FN, ist eine weniger spezifische Klassifizierung zu bevorzugen (und kann möglicherweise durch Anpassung der unterschiedlichen Parameter und Trainingsdaten erreicht werden). Während die Zeit, die für ein dürftiges Labeln der Trainingsdaten benötigt, zu vernachlässigen ist, übertrifft die Laufzeit des Klassifikators auf dem kleinen 3D Testdatensatz die des Makros um mindestens das Fünffache (getestet auf einem Intel i7-2640 CPU @2.80GHz mit 8GB RAM).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass der lernbasierte Ansatz eine vergleichbare Leistung zeigt, wenn es als Ersatz für die Präprozessierung und Filterungsschritte in unserem Workflow benutzt wird, kann jedoch weder die Segmentierung noch den Part der morphologischen Filterung ersetzen. Die Wahrscheinlichkeitskarten benötigen immer noch morphologische Filterung, wie sie in unserem Segmentierungs-Workflow gemacht wird. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass nicht-vesikuläre Strukturen einen identischen Kontrast und Textur in den Tomogrammen haben. Training eines zusätzlichen Objekt-Klassifikators wäre notwendig für eine völlig lern-basierte Analyse-Pipeline. Im Falle der Vesikel konnten jedoch zuvor klare morphologische Kriterien definiert werden, was jedoch nicht der effizienteste Ansatz ist.

Dies ist möglicherweise anders in Szenarien, wo weniger genau definierte Eigenschaften segmentiert werden müssen. Neueste Verbesserungen in lernbasierten Methoden, wie z.B. „convolutional networks“, also faltende Netzwerke, übertreffen in der Regel zielgerichtete Methoden bezogen auf „Precision“ und „Recall“, jedoch auf Kosten hohen Bedarfs an Berechnungszeit und Trainingsdaten. Es wurde kein Vergleich zu „Deep-Learning“-Ansätzen

gemacht, da das Ziel unserer Arbeit war eine integrierte, benutzerfreundliche und frei erhältliche Lösung für die Segmentierung und Quantifizierung von Vesikeln inklusive eines manuellen Überprüfungsschritts zu entwickeln. Dies ermöglicht Wissenschaftlern ohne Detailwissen in Bildverarbeitung synaptische Vesikelpools in elektronenmikroskopischen 3D Daten zu analysieren.

Tabelle 3 Vergleich von 3D ART VeSElect zu Ilastik

	Fiji / 3D ART VeSElect	Ilastik
Notwendige Benutzereingabe	3 Parameter*	Kennzeichnung der Trainingsdaten
Output	Segmentierung auf Pixelebene und Ergebnistabelle	Wahrscheinlichkeitskarte
Laufzeit	5 min	35 min (plus Kennzeichnung der Daten)

*die 3 Parameter sind: min. Volumen, min. Spherizität und max. Elongation

7.2 Resultate II: Maschinelle Lernalgorithmen zur automatisierten Klassifizierung

Das in Teil 1 entwickelte 3D ART VeSElecT ermöglicht zukünftig eine automatisierte Segmentierung und Quantifizierung von Vesikeln in elektronenmikroskopischen Tomogrammen. Jedoch ist es nicht in der Lage Vesikel funktional nach ihren Attributen zu klassifizieren. Da Synapsen jedoch zwei Arten von Vesikeln, CCV und DCV, enthalten ist eine Charakterisierung unumgänglich um quantitative Unterschiede verschiedener Vesikeltypen analysieren zu können. Daher wurde in einem von mir und Prof. Philip Kollmannsberger betreuten Praktikum von Maria Theiss ein Klassifikationsmakro entwickelt, welches einen maschinellen Lernalgorithmus implementiert, und direkt nach dem 3D ART VeSElecT-Workflow angewandt wird. Dieses wurde benutzt um die Vesikeleigenschaften in zweierlei Entwicklungsstadien von *C. elegans*, Dauerlarven und jungen adulte Hermaphroditen, in elektronenmikroskopischen Tomogrammen umfassend zu untersuchen. Dazu wurden zu aller erst einige kleinere Änderungen am 3D ART VeSElecT-Makro vorgenommen, die nachfolgend im Detail beschrieben sind.

7.2.1 Anpassungen des Algorithmus von 3D ART VeSElecT

Im Zuge eines von mir betreuten Master-Praktikums von Maria Theiss wurde 3D ART VeSElecT erweitert um diverse Bildeigenschaften der detektierten Vesikel zu ermitteln um sie für eine automatisierte Klassifikation zu verwenden. Der Workflow mit den vorgenommenen Änderungen ist in Abbildung 11 dargestellt und hat sich nicht konzeptionell im Vergleich zu Abbildung 5 verändert. Alle Änderungen im Vergleich zum zuvor publizierten Workflow [88] wurden durch eine schwarze Umrandung hervorgehoben.

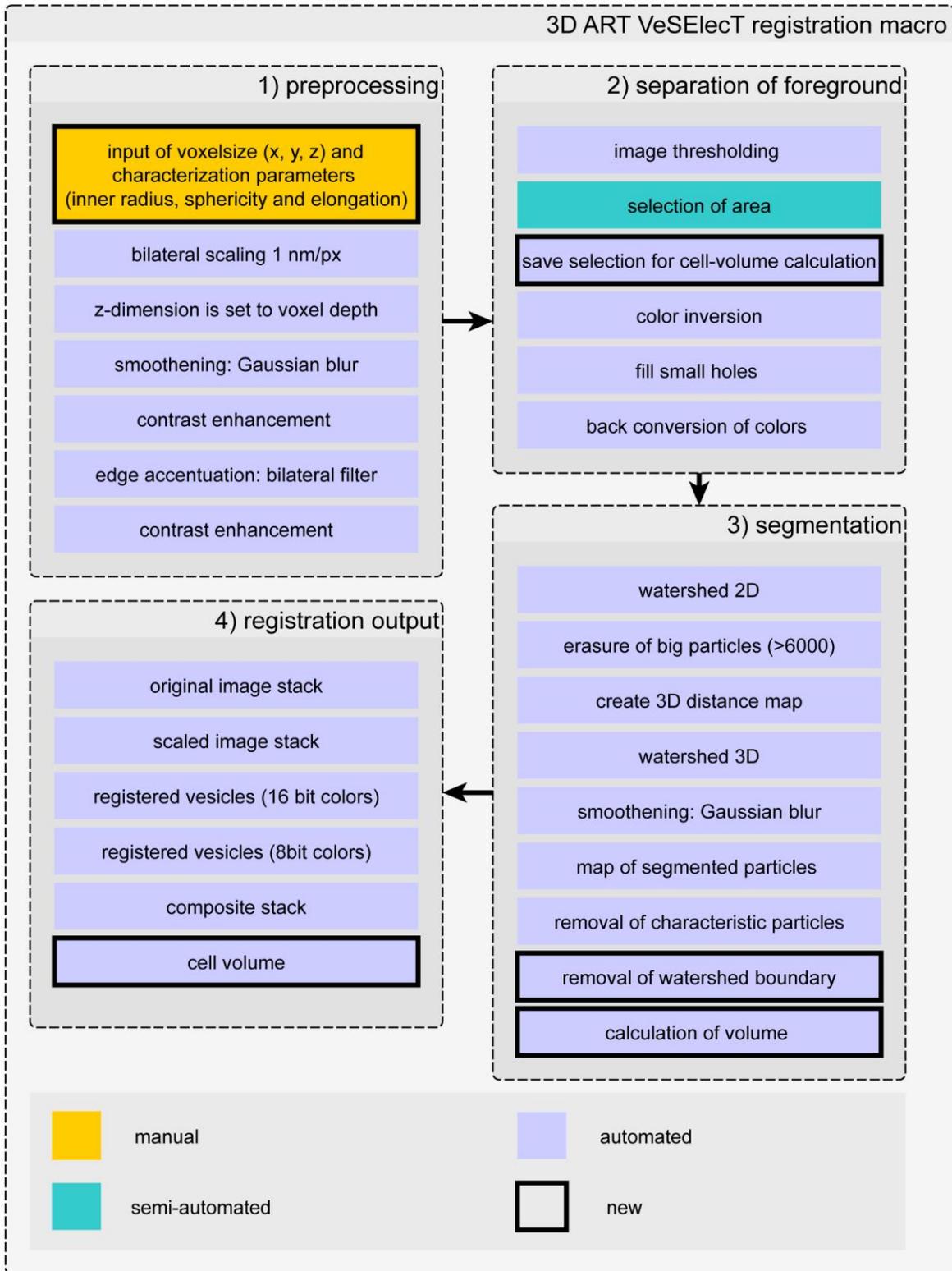


Abbildung 11: Verbesserungen des ursprünglichen 3D ART VeSElect-Workflows. Die Abbildung zeigt den bereits publizierten Workflow des 3D ART VeSElect Makros [88]. Alle Veränderungen wurden schwarz umrandet. In der gelben Box wurde nur eine kleine

Veränderung vorgenommen, anstatt des Volumens wird nun der innere Radius für die Größendeterminierung verwendet (eigene Daten, noch unveröffentlicht).

Eine Veränderung die im Zuge des Praktikums von Maria Theiss vorgenommen wurde ist das Auslesen des mittleren Radius anstatt des Volumens im Präprozessierungsschritt, da dieser, oder der Diameter (Radius x 2), typischerweise verwendet wird um Vesikelgrößen anzugeben. Außerdem wurde von mir die automatische Berechnung des Zellvolumens anhand der bereits inkludierten semi-automatischen Flächenauswahl implementiert. Die semi-automatische Flächenselektion entspricht dem Zellvolumen, wenn die Auswahl entlang der Zellmembran vorgenommen wird, wie es im 3D ART VeSElect Tutorial auf unserer Homepage (<https://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/bioinfo/computing/3DART-VeSElect>) beschrieben ist. Die semi-automatische Flächenauswahl wurde im Schritt 2, der Separierung des Vordergrunds („separation of foreground“) und im dritten Schritt, der Segmentierung („segmentation“), berechnet. Um das Zellvolumen zu bestimmen wurden zunächst die semi-automatischen Benutzerauswahlen im RoiManager interpoliert. Die zwei Variablen „volume“ und „volumeNM“ wurden initiiert. Eine „for“-Schleife wurde benutzt um jede einzelnen Ebene des Stacks durchzugehen ($s = 1$ (beginnend bei Ebene 1); $s \leq \text{slices}$ (solange wie s kleiner oder gleich der Anzahl der Ebenen ist); $s++$ (nach jedem Durchlauf der Schleife wird s um 1 erhöht)). Anschließend wurde Ebene s des Tomogramms ausgewählt und im RoiManager die dazu gehörende Flächenauswahl ausgewählt. Die Messfunktion „Measure“ des RoiManagers wurde angewandt und alle Ergebnisse in einem Resultate-Fenster ausgegeben, welches ausgewählt wurde um die Flächengröße dieser Ebene auszulesen. Jede ausgelesene Fläche dieser Ebene wurde auf einen Vektor namens „volume“ aufsummiert. Nachdem alle Ebenen durchlaufen und aufsummiert waren wurde das Resultate-Fenster noch einmal ausgewählt

und geschlossen, das ausgerechnete Zellvolumen wurde in nm^3 und μm^3 umgerechnet und im vierten Schritt, dem Output als Log-Datei ausgegeben.

7.2.2 Erstellung der Trainingsdaten

Um eine Methode zur automatischen Klassifizierung zu entwickeln musste zunächst ein soenannter „goldener Standard“ festgelegt werden. Dazu wurde jeweils von mir und Maria Theiss eine manuelle Zuteilung der Vesikel unabhängig voneinander durchgeführt. Anschließend wurden beide Zuteilungen miteinander verglichen. Bei Uneinstimmigkeit wurde ein gemeinsamer Konsens gefunden oder ein dritter Experte (Christian Stigloher, Zentrale Abteilung für Mikroskopie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) zu Rate gezogen. Bei genauerer Untersuchung der Vesikel in den Tomogrammen fiel auf, dass manche der Vesikel nur sehr schwer oder überhaupt nicht zu einer der beiden bekannten Klassen, CCV oder DCV zugeordnet werden konnten. Aus diesem Grund wurde zunächst eine dritte hypothetische Klasse der „nicht-definierbaren“ (ND)-Vesikel definiert. Abbildung 12 zeigt eine repräsentative Auswahl an CCVs, DCVs und ND Vesikeln von 8 Beispiel-Tomogrammen (4 von Dauerlarven und 4 von jungen adulten Hermaphroditen).

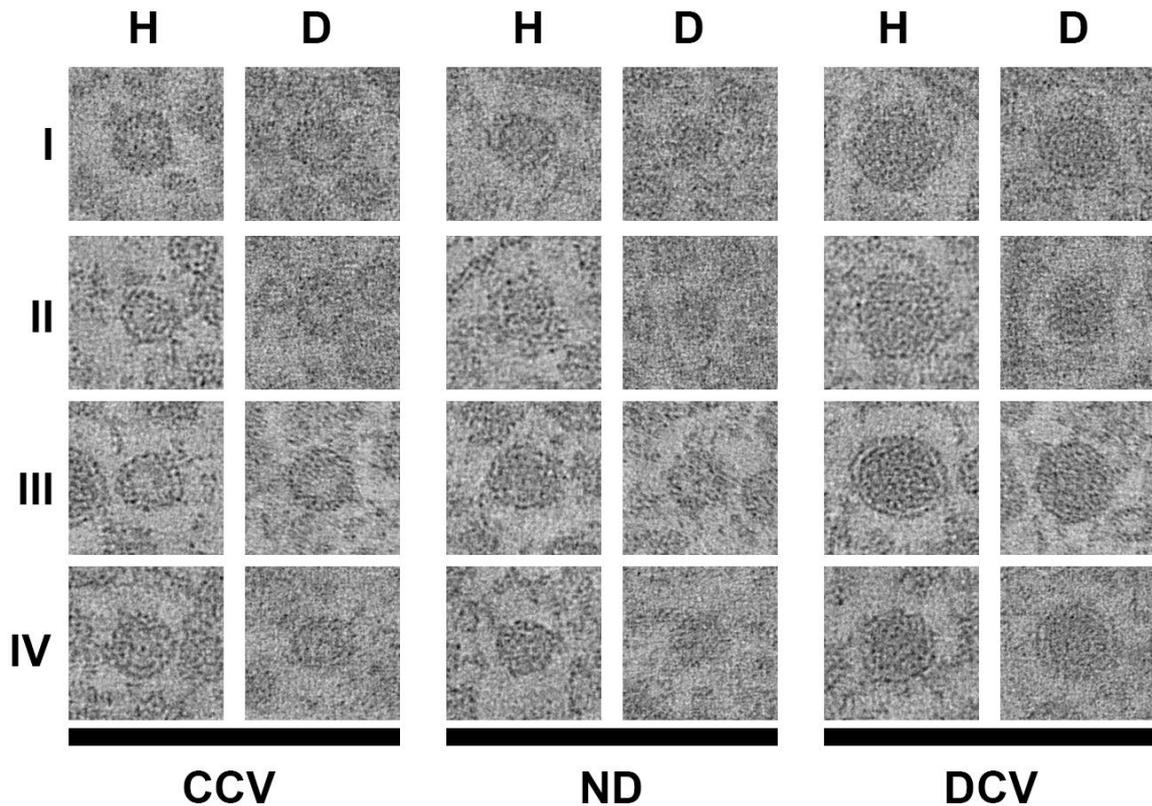


Abbildung 12: Beispiele für repräsentative CCVs, NDs und DCVs von jungen adulten Hermaphroditen (H) und Dauerlarven (D). Bilder des gleichen Entwicklungsstadiums und mit der gleichen Nummer (I – IV) stammen vom selben Tomogramm (z.B. CCV DI, ND DI und DCV DI stammen alle vom exakt selben Datensatz). Die Kantenlänge der einzelnen Kacheln beträgt 100 nm. (eigene Daten, noch unveröffentlicht)

ND Vesikel entsprechen Vesikeln, die durch einen einzelnen Experten nur schwer zuordenbar waren. Durch wiederholte Überprüfung durch mehrere Experten konnten die meisten dieser Vesikel einer der beiden Klassen (CCV oder DCV) zugeordnet werden. Immer noch nicht zuordenbare Vesikel (< 1%) wurden als NA, also in Englisch „not assignable“ oder auf Deutsch „nicht zuordenbare“ Vesikel bezeichnet, wie in Tabelle 4 und Tabelle 5 ersichtlich, und vom Training der SVM ausgeschlossen.

Insgesamt wurden 1072 segmentierte Vesikel von 7 Tomogrammen junger adulter Hermaphroditen und 1108 segmentierte Vesikel von 8 Dauerlarven-Tomogrammen für die

Analyse verwendet. Alle bis auf zwei der verwendeten Tomogramme wurden von mir hergestellt (*C. elegans* Kultivierung, HPF, GS, Einbettung, Herstellung der Ultradünnschnitte und Elektronentomographie). Um ein umfassendes Training und Validierung der Daten zu gewährleisten wurden zwei weitere Tomogramme von N2 *C. elegans*, erstellt von Sebastian Markert (Zentrale Abteilung für Mikroskopie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg), mit in die Analyse einbezogen. Die Ergebnisse aus allen Tomogrammen zusammen genommen zeigten nur einen geringfügigen Unterschied in der DCV-Anzahl von Dauerlarven (13%) und jungen adulten Hermaphroditen (10%) (siehe Tabelle 4, gelbe Markierung).

Tabelle 4: Vesikelanzahl und prozentuale Anteile der Vesikelklassen (CCV, DCV, NA).

Entwicklungsstadium	Tomogramme (n)	Anzahl der Vesikel	CCV	DCV	NA	total
Junge adulte Hermaphroditen	7	Summe	949	109	14	1072
		Verhältnis	89%	10%	1%	
	5	Summe ⁽¹⁾	837	85	11	933
		Verhältnis ⁽¹⁾	90%	9%	1%	
Dauerlarven	8	Summe	948	148	12	1108
		Verhältnis	86%	13%	1%	
	5	Summe ⁽¹⁾	669	130	3	802
		Verhältnis ⁽¹⁾	83%	16%	0%	

⁽¹⁾ Analyse mit einem selektierten Satz an Datensätzen, ausschließlich von cholinergen NMEs mit deutlich erkennbaren "dense projections" und mit > 100 Vesikeln.

Wurden die Datensätze jedoch genauer nach ihren biologischen Eigenschaften selektiert (nur cholinerge Synapsen mit deutlich erkennbaren „dense projections“ und einer Mindestanzahl von 100 Vesikeln) konnten dagegen größere Unterschiede in der relativen Anzahl der DCVs in

Dauerlarven ausgemacht werden (16 %) im Vergleich zu jungen adulten Hermaphroditen (9 %).

Da jedoch bekannt ist, dass DCVs vermehrt am Rand der AZ auftreten [2] wurde zusätzlich die Zellgrößenveränderung vom ersten Bild zum letzten Bild der Synapse in einem Tomogramm in zwei Richtungen (x und y) gemessen. Diese Messungen sollten Aufschluss darüber geben wie zentral der Schnitt durch die Synapse tatsächlich ist, obwohl in jedem der analysierten Tomogramme deutlich „dense projections“ zu erkennen waren. Für einen sehr mittig angesetzten Schnitt wurde keine oder nur eine geringe Größenveränderung erwartet. Dagegen wurde bei einem dezentralen Schnitt eine große Größenänderung der Zelle erwartet, da bekannt ist, dass sich die synaptischen Boutons gegen Ende hin verjüngen. Die Resultate der Differenzen in x- und y-Richtung wurden berechnet und der Betrag aufaddiert. Die Ergebnisse dieser Messung im Verhältnis zum relativen DCV-Gehalt wurden in Abbildung 13 als Streudiagramm dargestellt und die Messergebnisse in Tabelle 5 aufgelistet.

relation of cell size change to DCV ratio

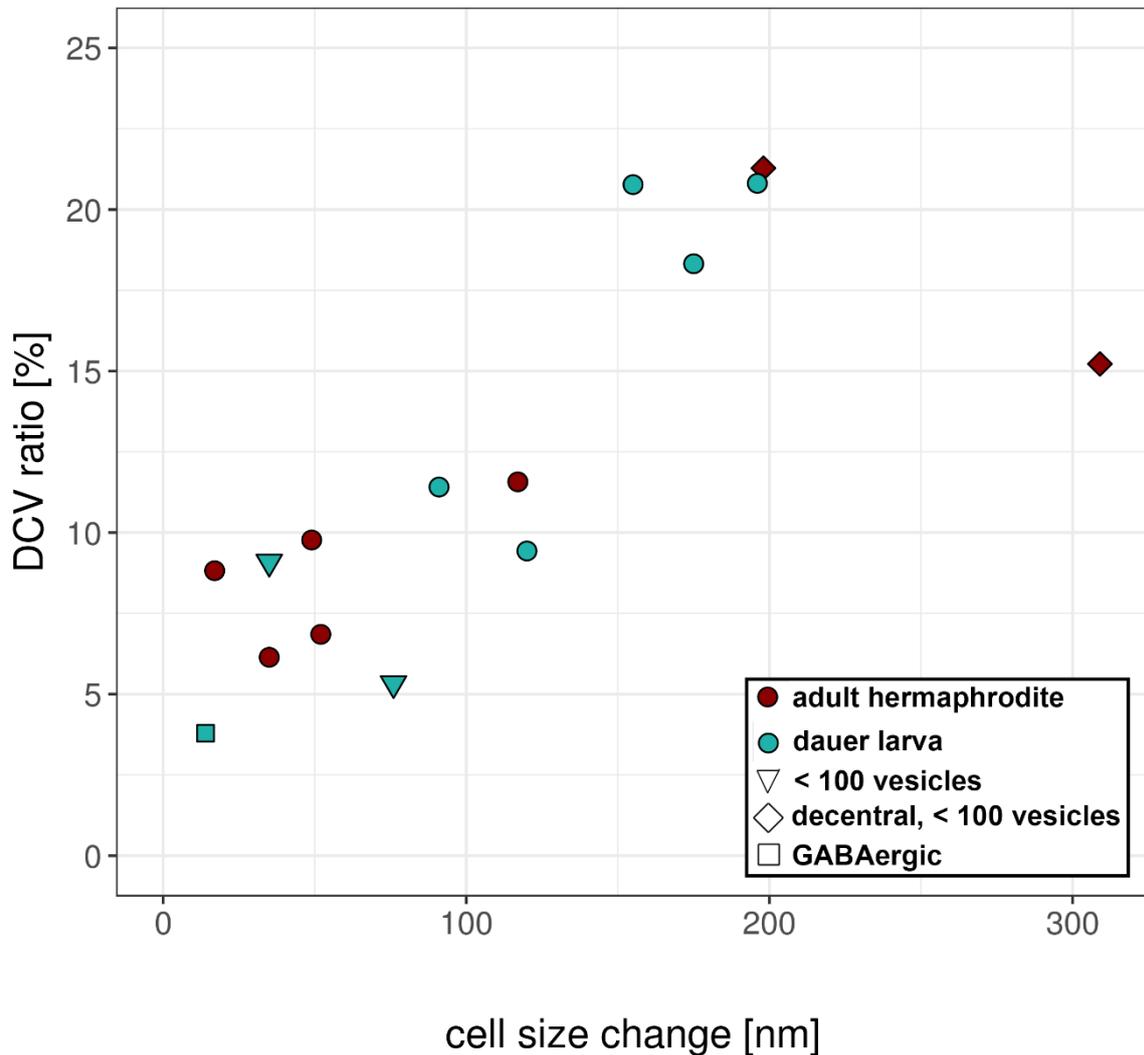


Abbildung 13: Verhältnis von relativem DCV-Gehalt zur Zellgrößenveränderung in jedem analysierten Tomogramm. Ergebnisse aus Tomogrammen junger adulter Hermaphroditen sind in Dunkelrot, Dauerlarven in Blau-Grün dargestellt. Alle Ergebnisse der selektierten Datensätze (nur cholinerge Synapsen, mit deutlichen DP und > 100 Vesikeln) sind als Kreise gezeigt, während NME mit abweichenden Charakteristika andere Symbole zugeordnet wurden (siehe Legende). (eigene Daten, noch unveröffentlicht).

Die aufgetragenen Ergebnisse aus der Gegenüberstellung von DCV-Gehalt zu Zellgrößenveränderung zeigen eine Abhängigkeit (siehe Abbildung 13). Mit ansteigender Zellgrößenveränderung, die die Zentralität des Schnittes innerhalb des synaptischen Boutons widerspiegelt, nimmt auch der DCV-Gehalt zu. Beispielsweise zeigen 3 Tomogramme von

Dauerlarven, einen sehr hohen DCV-Gehalt von 18-21 %, weisen jedoch ebenfalls eine hohe Zellgrößenänderung auf. Dies zeigt, dass selbst wenn offensichtlich „dense projection“ in den Tomogrammen zu sehen sind, Tomogramme dezentrale Regionen mit enthalten können, in denen eine höhere DCV-Abundanz zu erwarten ist.

Die genauen Ergebnisse aus der Zellgrößenmessung und die Verhältnisse der Vesikelklassen sind für jedes Tomogramm im Detail in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verhältnis von CCVs, NA und DCVs jedes Tomogramms und die gemessenen Zellgrößendurchmesser in x- und y-Richtung. (eigene Daten, noch unveröffentlicht).

Hermaphrodit	%CCV	%NA	%DCV	x1	x2	y1	y2	x difference	y difference	SUM difference
H_1_Tomo	84,78%	0,00%	15,22%	412	594	478	605	182	127	309
H_2_Tomo	89,34%	1,84%	8,82%	632	634	603	588	2	15	17
H_3_Tomo	93,15%	0,00%	6,85%	411	361	597	599	50	2	52
H_4_Tomo	88,06%	0,37%	11,57%	759	694	657	605	65	52	117
H_5_Tomo	87,22%	3,01%	9,77%	494	465	459	439	29	20	49
H_6_Tomo	92,98%	0,88%	6,14%	509	506	596	564	3	32	35
H_7_Tomo	72,34%	6,38%	21,28%	557	383	483	507	174	24	198
mean	86,84%	1,78%	11,38%							
sd	7,07%	2,30%	5,32%							
mean selected	90,15%	1,22%	8,63%							
sd selected	2,77%	1,21%	2,20%							
Dauer (8 tomograms)										
D_1_Tomo	90,67%	4,00%	5,33%	482	462	380	324	20	56	76
D_2_Tomo	79,23%	0,00%	20,77%	422	336	437	368	86	69	155
D_3_Tomo	88,59%	0,00%	11,41%	350	397	453	497	47	44	91
D_4_Tomo	90,57%	0,00%	9,43%	334	402	446	498	68	52	120
D_5_Tomo	79,19%	0,00%	20,81%	510	419	638	533	91	105	196
D_6_Tomo	80,10%	1,57%	18,32%	530	622	463	546	92	83	175
D_7_Tomo	87,88%	3,03%	9,09%	352	335	406	388	17	18	35
D_8_Tomo	93,94%	2,27%	3,79%	532	519	552	551	13	1	14
mean	86,27%	1,36%	12,37%							
sd	5,88%	1,61%	6,77%							
mean selected	83,54%	0,31%	16,15%							
sd selected	5,57%	0,70%	5,37%							
										dorsal nerve cord
										< 100 vesicles
										decentral & < 100 vesicles
										GABAergic

Tabelle 5 zeigt einen Überblick der finalen Ergebnisse jedes Tomogramms. Alle ausgewählten Tomogramme (> 100 Vesikeln, cholinerge Synapse, zentraler Schnitt) sind gelb markiert. Alle anderen Tomogramme sind nach ihrem Ausscheidungskriterium farblich in Hellgrau (< 100 Vesikel), Dunkelgrau (dezentraler Schnitt mit < 100 Vesikeln) oder Blau (GABAerge Synapse) hinterlegt. In Rot geschriebene Tomogrammbezeichnungen stehen für NME des dorsalen Nervenstrangs, alle anderen Tomogramme entstammen dem ventralen Nervenstrang.

7.2.3 Charakterisierung aufgrund von Bildeigenschaften

Um einen quantitativen Vergleich der Vesikel auszuführen und Klärung über die ND Vesikel zu erhalten wurden einige Bildeigenschaften extrahiert, die zur Klassifizierung der Vesikel beitragen sollen. Da DCVs größer und dunkler sind als auch meist in einer größeren Entfernung zur AZ lokalisieren als CCVs, wurden Radius (r), der mittlere Grauwert (gv) und Distanz zur AZ ($distAZ$) als primäre Charakteristika ausgewählt (Abbildung 14).

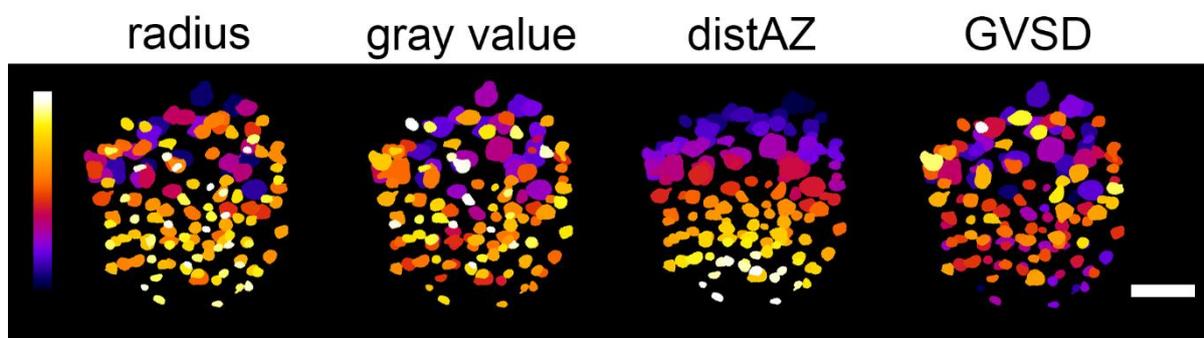


Abbildung 14: Visualisierung von Vesikeln in einem Dauerlarventomogramm mit farbkodierten Vesikel Eigenschaften: innerer r , gv , $distAZ$ und $GVSD$. „Clear core“-ähnliche Charakteristika sind gelblich, „dense-core“-ähnliche sind blauverschoben dargestellt (Abbildung wurde von Maria Theiss erstellt und zeigt eigene, noch unveröffentlichte Daten; Makro für graduelle Einfärbung wurde gemeinsam von mir und Maria im Zuge eines von mir betreuten Masterpraktikums entwickelt).

Zusätzlich wurde auch die Grauwert-Standardabweichung ($GVSD$) miteinbezogen, da sie ein Maß für den Kontrast zwischen der Membran und dem Inneren des Vesikels darstellt, welches unabhängig von der durchschnittlichen Helligkeit des Vesikels ist.

Anhand der Eigenschaften der Vesikel wurden weitere statistische Analysen gemacht um herauszufinden ob es zwei oder doch drei Vesikelklassen gibt. Dazu wurden zunächst alle Vesikeleigenschaften zu einem integralen Maß für die DCV-Ähnlichkeit zusammengefügt, dem „Dense-Core-Factor“ (DCF). Da alle beschriebenen Eigenschaften nicht gleich wichtig für die

Klassifizierung sind, wurde zunächst anhand einer einfachen linearen Gleichung eine grobe Gewichtung anhand folgender Formel festgelegt:

$$DCF = distAZ_{norm} * 0.25 + r_{norm} * 0.25 + gv_{norm} * 0.5 \quad (\text{Formel 4})$$

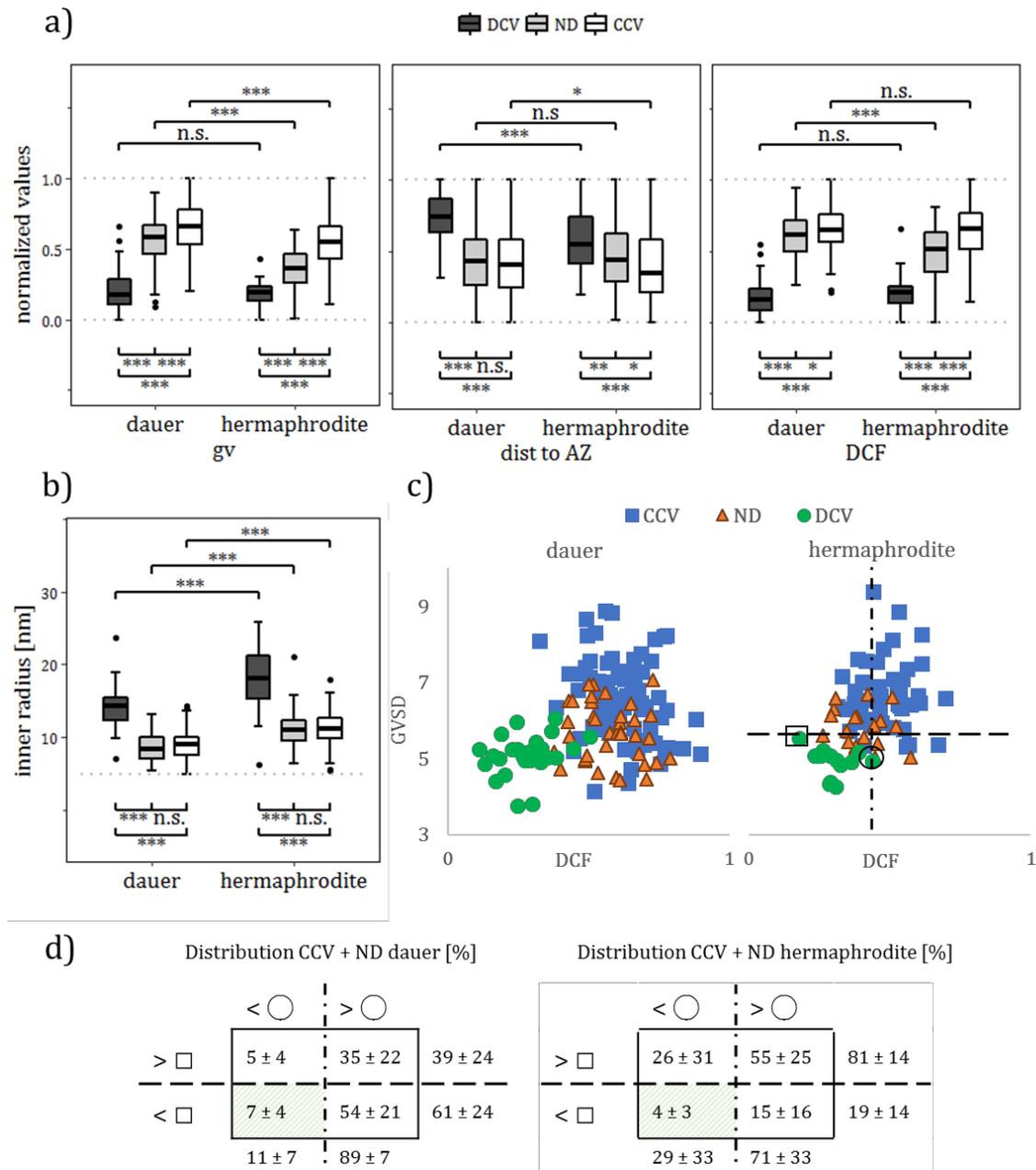


Abbildung 15: Statistische Analyse von CCV und DCV Eigenschaften. a + b) Boxplots des inneren r, normalisierte gv, distAZ und dem „Dense-Core-Factor“ (DCF) von Dauerlarven und junger adulter Hermaphroditen. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U Test

bestimmt: p-Werte > 0,05 = nicht signifikant (n.s.), < 0,05 = schwach signifikant (*), < 0,01 = signifikant (), < 0,001 = hoch signifikant (***). c) Streudiagramm der Grauwert-Standardabweichung gegen den DCF zwei exemplarischer Datensätze. Im rechten Tomogramm wurde der DCV mit dem größten Wert für GVSD (schwarzes Quadrat) und der DCV mit dem größten DCF (schwarzer Kreis) markiert. Anhand dieser Werte wurde der Plot in vier Quadranten aufgeteilt (gestrichelte Linien). d) Verteilung von CCVs und NDs innerhalb der festgelegten Quadranten aller analysierten Tomogramme. Der grün hinterlegte Quadrant (links unten) beinhaltet alle DCVs. (Abbildung zeigt noch unveröffentlichte, eigene Daten aus dem von mir betreuten Masterpraktikum von Maria Theiss; Abbildung wurde von Maria Theiss erstellt)**

Abbildung 15 zeigt, dass CCVs und NDs sich, in Bezug auf r und distAZ , nicht signifikant oder nur schwach signifikant voneinander unterscheiden. Wohingegen sich die NDs von den DCVs meist hoch signifikant oder zumindest signifikant unterscheiden. Die Grauwerte der Vesikel stellen ein hochsignifikantes Unterscheidungsmerkmal für alle drei Gruppen dar, was wohl maßgeblich dazu beiträgt, dass die manuelle Zuordnung der Vesikel oft schwierig ist. Trotz dass der Grauwert zu 50 % in den DCF einfließt unterscheiden sich die NDs von den CCVs in Dauerlarven nur schwach signifikant, während die Unterschiede bei jungen adulten Hermaphroditen stark signifikant sind, wie auch beim Vergleich von NDs zu DCVs.

Insgesamt zeigt die Statistik, dass NDs im Mittel den CCVs ähnlicher sind als den DCVs. Daraus erfolgte die Annahme, dass es sich in Wirklichkeit bei den meisten ND Vesikeln wohl um etwas dunklere CCVs handelt und keine eindeutige dritte Gruppe anhand der von uns aufgeführten Daten ermittelt werden konnte. Desweiteren zeigt Abbildung 15d, dass mit Hilfe der analysierten Eigenschaften der Vesikel bereits eine relativ gute Trennung der DCVs und CCVs möglich ist. Um die Gewichtung der einzelnen Charakteristika jedoch exakt und unabhängig zu ermitteln, und somit möglicherweise noch bessere Ergebnisse zu erzielen, wurden verschiedene Algorithmen aus dem Bereich des maschinellen Lernens getestet. Hierfür musste zunächst ein manuell klassifizierter Referenzdatensatz, eine sogenannte „ground

truth“, erstellt werden. Dazu wurde von zwei Personen unabhängig voneinander Vesikel den beiden Gruppierungen zugeordnet. Bei nicht übereinstimmender Zuordnung der beiden Personen wurde erneut begutachtet. In Fällen in denen kein eindeutiger Entschluss gefasst werden konnte, wurde ein dritter Experte zu Rate gezogen. Wenn ein Vesikel immer noch nicht zugeordnet werden konnte wurde dieser vom Training des Algorithmus ausgeschlossen (1,1 % in Dauerlarven, n = 12; 1,3 % in jungen adulten Hermaphroditen, n = 14).

7.2.4 Vergleich maschineller Lernalgorithmen zur Klassifizierung von Vesikeln

Um den passenden Algorithmus zur automatisierten Klassifizierung zu finden wurden verschiedene Ansätze aus dem Bereich des maschinellen Lernens getestet. Hierzu wurden eine Support Vektor Maschine (SVM), „Random Forest“ (RF) und „K Nearest Neighbour“ (KNN) auf ihre Performance zur Klassifizierung von Vesikeln anhand der oben erläuterten Parameter (Abbildung 14) von Maria Theiss (im Zuge des Masterpraktikums, angeleitet von Philip Kollmannsberger und mir) getestet. Hierzu dienten 2186 manuell zugeordnete Vesikel von 15 verschiedenen Tomogrammen (7 von jungen adulten Hermaphroditen und 8 von Dauerlarven) als Trainingsdaten. Alle bis auf zwei der verwendeten Tomogramme wurden von mir hergestellt (*C. elegans* Kultivierung, HPF, GS, Einbettung, Herstellung der Ultradünnschnitte, Elektronentomographie). Um eine umfassende Analyse zu gewährleisten wurden zwei N2 *C. elegans* Tomogramme von Sebastian Markert (Zentrale Abteilung für Mikroskopie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) mit in Analyse aufgenommen. Die Charakteristika wurden mit Hilfe des leicht modifizierten 3D ART VeSElecT-Workflows bestimmt, als Tabelle abgespeichert und in einem Pythonskript, welches die „scikit-learn machine-learning“

Bibliothek [132] benutzt, prozessiert. Die Performance der getesteten Algorithmen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Durchschnittliche Performance unterschiedlicher Algorithmen des maschinellen Lernens

Algorithmus	Akkuratesse	„Precision _{DCV} “ ¹	„Recall _{DCV} “ ²	„F-Score _{DCV} “
SVM	0,98 ± 0,02	0,95 ± 0,06	0,91 ± 0,1	0,93 ± 0,7
RF (k = 10)	0,96 ± 0,03	0,88 ± 0,13	0,86 ± 0,13	0,86 ± 0,1
RF (k= 1500)	0,97 ± 0,02	0,93 ± 0,09	0,84 ± 0,13	0,88 ± 0,09
KNN	0,97 ±0,02	0,93 ±0,1	0,89 ±0,11	0,90 ±0,07

¹ „Precision“ =Genauigkeit

² „Recall“ = Trefferquote

Der Vergleich zwischen SVM, RF und KNN ergab, dass die SVM für die Klassifizierung der Vesikel am besten geeignet ist. Die SVM zeigt die geringsten Fehlerraten in allen vier Kategorien (siehe Methoden; alle Werte sind für die Erkennung der DCVs gegeben): Akkuratesse, „Precision_{DCV}“ (Genauigkeit), „Recall_{DCV}“ (Trefferquote) und „F-score_{DCV}“. KNN zeigt die zweitbesten Ergebnisse mit ~1-3 Prozent schlechteren Ergebnissen als die SVM. Beide RF Ansätze (k = 1500 und k = 10) zeigten die schlechtesten Ergebnisse. Wobei RF (k = 1500) in den meisten Fällen, außer für „Recall_{DCV}“, besser abschnitt als RF (k = 10).

Der Vergleich aller Klassifizierungs-Algorithmen ergab, dass der SVM-Algorithmus in seiner linearen Form ohne Anwendung des Kernel-Tricks alle anderen Klassifizierungsmethoden übertraf, inklusive einer nichtlinearen SVM und RF (k = 1500) (siehe Tabelle 6). Die Parameter der SVM wurden determiniert, indem ein Training mit allen zur Verfügung stehen Tomogrammen (N = 15, 7 von jungen adulten Hermaphroditen und 8 von Dauerlarven), durchgeführt wurde. Die daraus resultierenden Parameter (Tabelle 7) wurden ins Fiji-Makro

transferiert, wo sie zur automatisierten Einteilung der Vesikel in zwei Klassen (CCV und DCV) dienen. Die Endergebnisse der trainierten SVM sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: SVM Gewichtungen des trainierten Algorithmus und Standardisierungsparameter, die ins Klassifikationsmakro transferiert wurden

Parameter	r	gv	distAZ	GVSD
Mittelwert	10.4	129.1	259.1	5.9
SD	3.1	4.7	118.5	1.7
Gewichtung	-1.69	1.65	-0.76	1.21

7.2.5 Implementierung der SVM in das Fiji Makro

Der finale, trainierte SVM-Algorithmus benutzt folgende Gleichung der vier Vesikeleigenschaften zur Klassifizierung:

$$-4.36 = -1.69 * r + 1.65 * gv - 0.76 * distAZ + 1.21 * GVSD \quad (\text{Formel 5})$$

Das Ergebnis in Form einer linearen Gleichung hat den Vorteil, dass die sehr einfach in das Klassifizierungs-Makro integriert werden kann, indem die Koeffizienten der Hyperebene nach erfolgreichem Training extrahiert werden.

Da die lineare SVM parametrisch ist, konnte die Gleichung der separierenden Hyperebene unabhängig von den Trainingsdaten, mit x_i gleich der Eigenschaften und w_i gleich der zugeordneten Eigenschaften-Gewichtungen, transferiert werden. Alle Datenpunkte mit $\sum_{i=1}^n w_i x_i'' > 0$ wurden der Klasse 1 (CCV) und alle Datenpunkte mit $\sum_{i=1}^n w_i x_i'' < 0$ der Klasse -1 (DCV) zu geordnet.

7.2.6 Algorithmus des Klassifikationsmakros

Das, im Zuge des von mir betreuten Masterpraktikum von Maria Theiss, entwickelte Fiji Klassifikationsmakro zur automatischen Klassifizierung von DCVs und CCVs wird konsekutiv nach 3D ART VeSElecT angewandt. Der Workflow des Klassifikationsmakros ist in Abbildung 16 dargestellt.

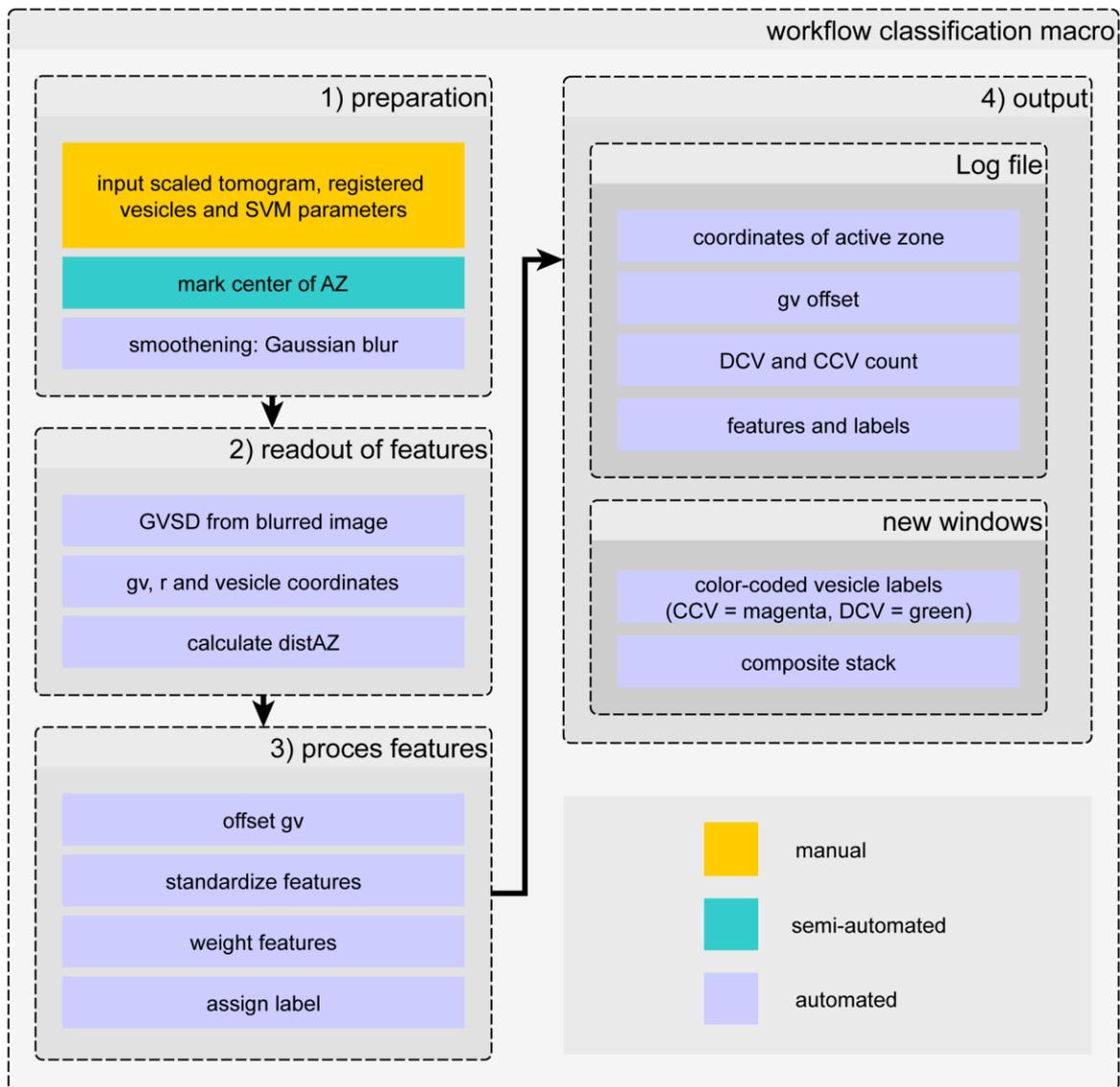


Abbildung 16: Workflow des Klassifizierungs-Makros. 1) Vorbereitung ("preparation"): "StackSegmented" (beinhaltet die registrierten Vesikel) und der "StackDuplicateScale" (skaliertes Tomogramm) aus dem Output von 3D ART VeSElecT [88] dienen hier als Input. Der Benutzer wird dazu aufgefordert mit einem einfachen Mausklick (Punktauswahl) das

Zentrum der AZ zu markieren. 2) Auslesen der Charakteristika: gv , r , Vesikelkoordinaten und GVSD in der mittleren Ebene jedes Vesikels und die $distAZ$ werden kalkuliert. 3) Prozessierung der Eigenschaften: Aufrechnung, Standardisierung und Gewichtung der Eigenschaften, gefolgt von der kategorischen Einteilung (Zuteilung der Label). 4) Output: beinhaltet die visuellen Ergebnisse als neue Bildstapels mit CCVs in Magenta und DCVs in Grün als auch ein Log-File, welches alle Parameter und zugeteilte Labels jedes Vesikels in Tabellenform enthält. (eigene Daten, noch unveröffentlicht)

Der Workflow des Fiji Klassifikationsmakros, zur automatisierten Unterscheidung von DCVs und CCVs in elektronenmikroskopischen Tomogrammen von Synapsen, wird primär in vier Schritte unterteilt: 1) Vorbereitung, 2) Auslesen der Eigenschaften, 3) Prozessierung der Eigenschaften, gefolgt vom Labeln der Vesikel und schließlich 4) die Generierung des Outputs.

Alle Schritte des Klassifikationsmakros funktionieren basierend auf den Input-Stacks, StackDuplicateScale und StackSegmented, die wiederum als Output aus der Anwendung des 3D ART VeSElect Erkennungs-Makros resultieren. Die in Fiji geöffneten Bildstapel wurden in das Programm eingelesen wodurch sich ein Fenster öffnete, welches alle wichtigen Parameter und Standardisierungswerte für die Klassifikation beinhaltete und dem Benutzer die Möglichkeit bietet Änderungen vorzunehmen, beispielsweise wenn die SVM neu trainiert wurde. In einem zweiten Schritt wurden vier charakteristische Vesikeleigenschaften aus den Bilddaten ausgelesen: Radius (r), Grauwert (gv), Grauwert-Standardabweichung (GVSD) und die Distanz zur aktiven Zone ($distAZ$). Die GVSD wird im mittleren Schnitt durch ein Vesikel ermittelt. Da CCVs einen helleren Kern im Vergleich zur Membran aufwiesen als DCVs, besaßen diese eine höhere Varianz, die sich in der GVSD widerspiegelte. Im dritten Schritt wurden die Eigenschaften verarbeitet, dies beinhaltete die Anwendung eines Grauwerteoffsets (falls der dunkelste Vesikel heller als ein festgesetzter Schwellwert ist), der Standardisierungsparameter, der Gewichtung der Eigenschaften basierend auf den Gewichtungen der SVM, und schließlich die Zuordnung der Labels gemäß der errechneten

Klasse (CCV = Magenta, DCV = Grün). Im letzten Schritt wurde der Output generiert, er beinhaltet eine Log-Datei und mehrere neue Fenster mit den visualisierten Ergebnissen. Die Log-Datei beinhaltet alle gemessenen Charakteristika (die Messwerte aller Eigenschaften), die Klassifikationszuordnungen (CCV = 1 und DCV = 0) und die Gesamtanzahl der Vesikel jeder Klasse. Zusätzlich zu den Input-Stacks (StackSegmented und StackDuplicateScale) wurden weitere Bilddateien erstellt, die Datei „label“ entspricht dem StackSegmented, jedoch mit farbkodierten Vesikeln je nach Klassenzuordnung. Zusätzlich wurde auch ein neuer Composit-Stack, namens „CompositLabel“ erstellt, eine Überlagerung aus dem Tomogramm (StackDuplicateScale) und dem „label“-Stack.

7.2.7 Anwendung des Klassifikationsmakros auf Tomogrammen von NME zweier *C. elegans* Entwicklungsstadien

Das erstellte Makro zur automatischen Klassifizierung wurde auf Tomogrammen von *C. elegans* NME angewandt um zwei unterschiedliche Entwicklungsstadien, Dauerlarven und junge adulte Hermaphroditen, zu vergleichen. Visuelle Ergebnisse des Klassifikations-Makros sind je an einem exemplarischen Tomogramm jedes analysierten Stadiums dargestellt (Abbildung 17).

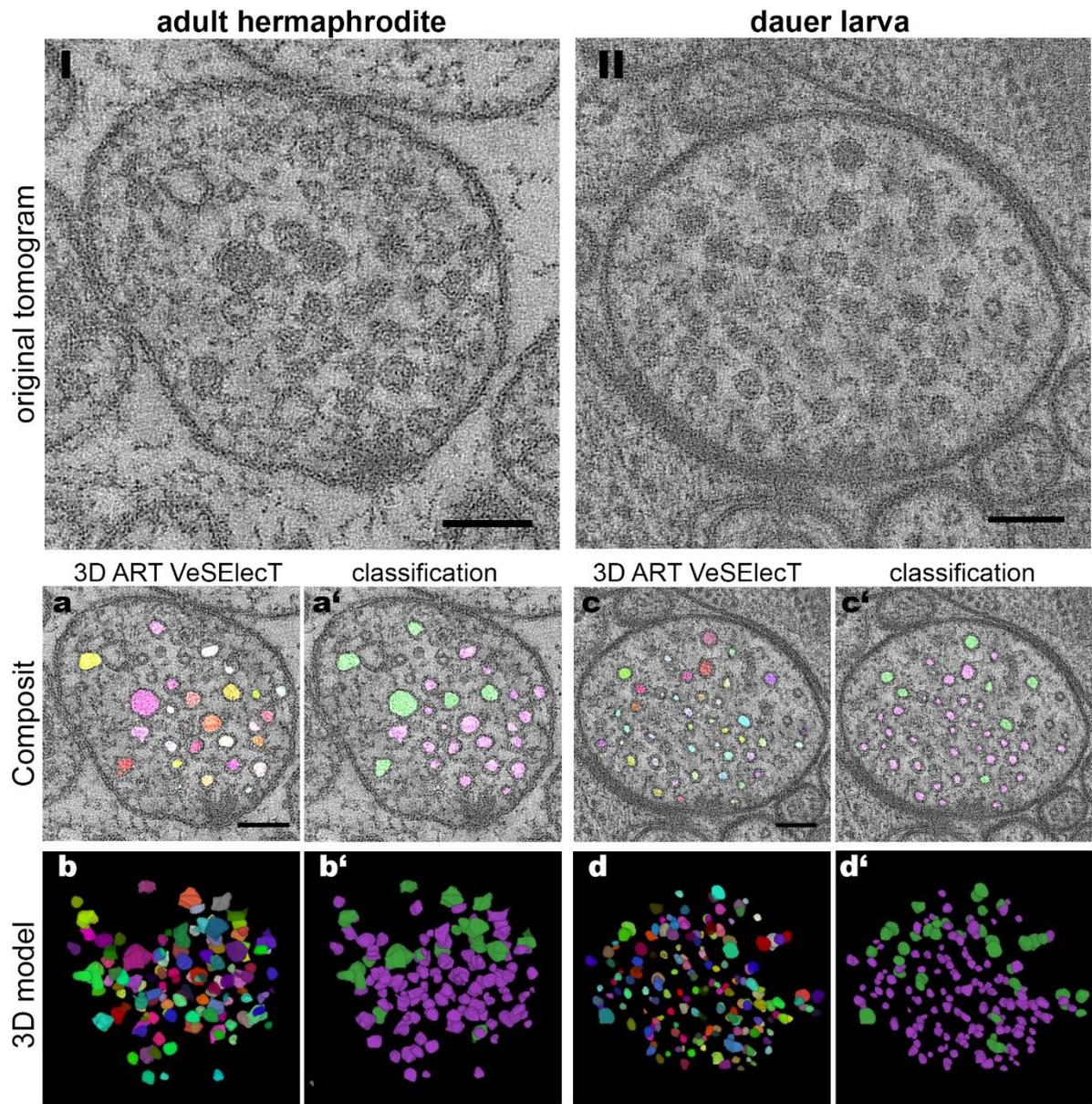


Abbildung 17: Vergleich der visuellen Ergebnisse des angepassten 3D ART VeSElect Makros und dem konsekutiv angewandten Klassifikations-Makros. Oben: I) and II) originale Tomogramme eines jungen adulten Hermaphroditen (I) und einer Dauerlarve (II). Unten: a) und c) zeigen „Composit“-Bilder von 3D ART VeSElect, Vesikel sind in beliebigen Farben ohne funktionale Zuordnung dargestellt, wohingegen a') und c') den „Comosit“-Bildstapel aus dem Klassifikation-Makro zeigen (CCVs = magenta, DCVs = grün). B) und d) 3D Modelle der jeweiligen Vesikelpools, b') und d') 3D Modelle mit Vesikeln in den Farben der zugeordneten Klasse. Skalierungsbalken = 100 nm. (eigene Daten, noch unveröffentlicht)

Das 3D Modell zeigt, dass DCVs meist am Rand des CCV Clusters lokalisieren. Die CCVs selbst wiederum sammeln sich um die „dense projections“. Dies sind elektronendichte Strukturen, die in direktem Kontakt zur Zellmembran stehen und die AZ, den Bereich an dem die Vesikel fusionieren, markieren. Zur weiteren Analyse und Vergleich der Vesikelcharakteristika wurden diese als Violin-Diagramm in Abbildung 18 dargestellt.

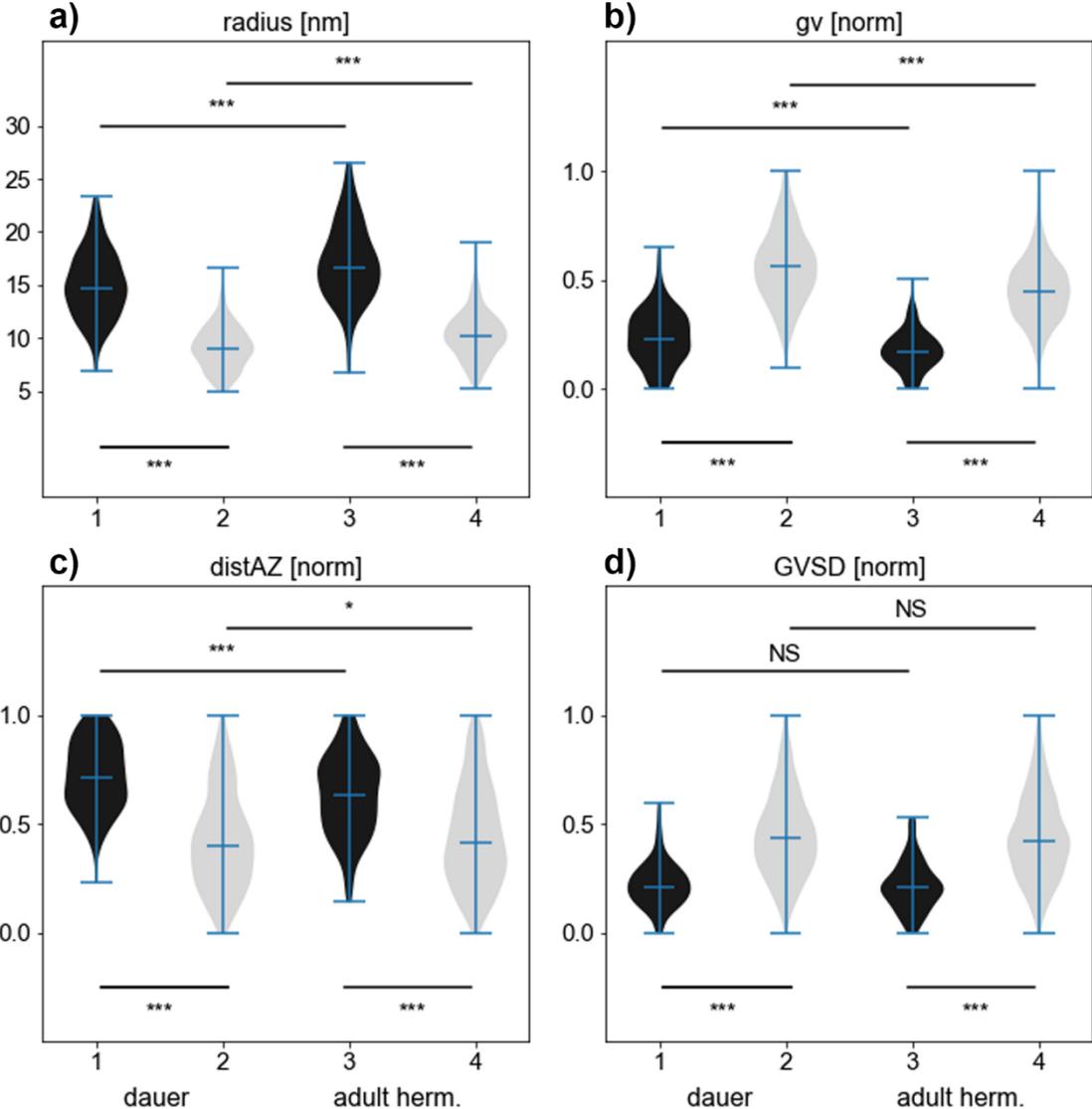


Abbildung 18: Vergleich von DCV-Charakteristika (Schwarz) mit CCV-Charakteristika (Hellgrau). Violin-Diagramme zeigen a) inneren Vesikelradius (r) in nm, b) gv, c) distAZ und d) GVSD. B) und d) zeigen normalisierte Werte von nH = 7 Tomogramme von N2 jungen

adulten Hermaphroditen; nD = 8 Tomogramme von N2 Dauerlarven (Datenerhebung und Auswertung wurde gemeinsam von Maria Theiss und mir im Rahmen eines von mir betreuten Masterpraktikums durchgeführt, Abbildung wurde von Maria Theiss erstellt und zeigt eigene noch unveröffentlichte Daten).

Abbildung 18 zeigt hochsignifikante Unterschiede bei der CCV- und DCV-Größe in beiden Entwicklungsstadien. Im nachfolgenden Text entsprechen die gemessenen Vesikelradien stets den originalen Messwerten, welche den „inneren Radius“ ohne Vesikelmembran widerspiegeln, wie es in Kaltdorf et al. [88] beschrieben ist. Um die Ergebnisse mit anderen Vesikelgrößen vergleichbarer zu machen, müssen die Ergebnisse mit zwei multipliziert werden, um den „inneren Diameter“ zu erhalten. Anschließend werden auf den „inneren Diameter“ 9 nm aufaddiert, was in etwa der Dicke der Vesikelmembran entspricht. Der daraus erhaltene „reelle Diameter“ ist nur eine Annäherung und kann nicht direkt mit manuell gemessenen Daten verglichen werden [88].

CCVs von Dauerlarven zeigen einen inneren Radius von 9 nm, wohingegen DCVs einen mittleren Radius von 14,7 nm aufweisen. Dies ergibt einen signifikanten Unterschied von 5,7 nm des inneren Radius. Hermaphroditen dagegen haben einen durchschnittlichen DCVs-Radius 16,7 nm, woraus sich ein 5,4 nm größerer Radius als bei CCVs mit 10,3 ergibt. Erwähnenswert ist dabei, dass beide Vesikeltypen in Hermaphroditen signifikant größer sind als in Dauerlarven. CCVs-Radien unterscheiden sich dabei um 1,3 nm, wohingegen DCVs in Hermaphroditen sogar einen 2 nm größeren Radius aufweisen. In allen Fällen zeigen DCVs signifikant dunklere normalisierte Grauwertintensitäten verglichen zu CCVs. Wie in Abbildung 18b zu sehen haben Hermaphroditen einen normalisierten Grauwert von 0,17 für CCVs und 0,45 für DCVs. Wo hingegen Dauerlarven einen normalisierten Grauwert von 0,23 für CCVs und 0,56 für DCVs aufzeigen. Daraus zeigt sich, dass Dauerlarven-Tomogramme prinzipiell dunklere Vesikel besitzen (beides CCVs und DCVs).

Der GVSD-Wert scheint sich dagegen nicht zwischen beiden Entwicklungsstadien zu unterscheiden. Die Werte zeigen jedoch eine Differenz von 0,22 [norm] im Vergleich von CCVs zu DCVs für beide Entwicklungsstadien (Abbildung 18d).

Die durchschnittliche normalisierte Distanz von CCVs zur aktiven Zone (distAZ) (Hermaphroditen: 0,42; Dauerlarven 0,4) ist kleiner als die von DCVs (Hermaphroditen: 0,64, Dauerlarven: 0,72) in beiden Larvenstadien (Abbildung 18c). Die normalisierte distAZ der DCVs von Hermaphroditen im Vergleich zu Dauerlarven zeigen einen hochsignifikanten Unterschied von 0,08. Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurden die Distanzen noch einmal in Abbildung 19 als Histogramme visualisiert.

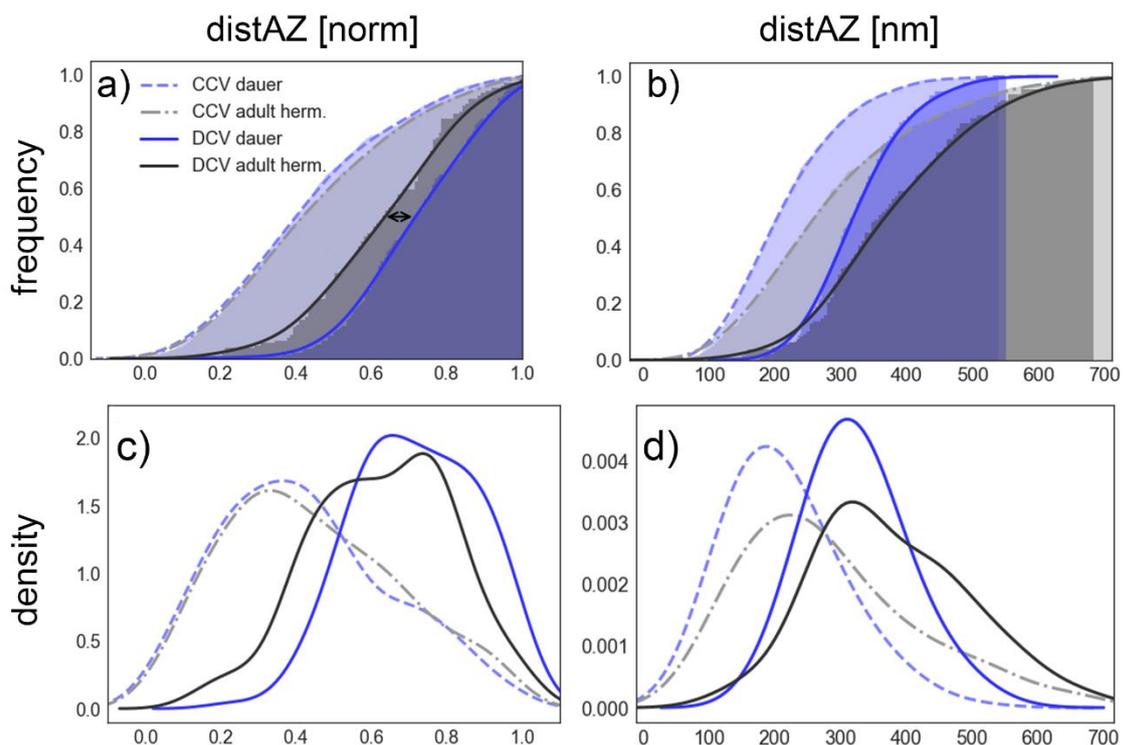


Abbildung 19: kumulatives Histogramm (a, b) und Kerndichteschätzungen (c, d; Bandbreite = 0,07*Maximalwert des kompletten Datensatzes) der Distanzen zur aktiven Zone (distAZ). Gegeben sind normalisierte Distanzen (links) und reelle Werte in nm (rechts). CCVs sind als gestrichelte Linie, DCVs als kontinuierliche Linie dargestellt. Vesikel junger adulter Hermaphroditen sind in Grautönen, Vesikel von Dauerlarven in Violett

dargestellt. (Datenerhebung und Auswertung wurde gemeinsam von Maria Theiss und mir im Rahmen eines von mir betreuten Masterpraktikums durchgeführt, Abbildung wurde von Maria Theiss erstellt und zeigt eigene, noch unveröffentlichte Daten).

Abbildung 19 zeigt, dass die normalisierten Distanzen der CCVs beider Entwicklungsstadien fast identisch sind, wohingegen die Distanzen der DCVs in beiden Diagrammen signifikant differieren. DCVs zeigen eine systematische Diskrepanz in ihrer Lokalisation: DCVs von jungen adulten Hermaphroditen clustern näher zur aktiven Zone als DCVs von Dauerlarven. Histogramme in Abbildung 19b und d zeigen die distAZ als reale Distanzen in nm. Interessanterweise zeigen die Statistiken, dass Vesikelpools in Dauerlarven generell eine kleinere maximale Distanz als bei jungen adulter Hermaphroditen. Die größte Distanz der Dauerlarvenvesikel zur aktiven Zone sind etwa 550 nm, bei Hermaphroditen ca. 700 nm.

7.2.8 Fehlerraten und Cross-Validierung

Um eine sogenannte "ground-truth", also absolute Wahrheit als Referenz zu erstellen, wurde ein Konsensuslabel erstellt (N = 15 Tomogramme, 8 Dauerlarven und 7 junge adulte Hermaphroditen Tomogramme): Als erstes wurden alle Vesikel je nach Vesikeltyp von mir und Maria Theiss unabhängig voneinander den Klassen zugeordnet (Zuteilung von Labels). Differierende Label wurden noch einmal überprüft. Falls keine gemeinsame Entscheidung bezüglich der Zuordnung getroffen werden konnte wurde ein dritter Experte (Christian Stigloher) zu Rate gezogen. Vesikel die daraufhin immer noch nicht zuordenbar waren (~1 %) wurden nicht in das Training der SVM mit aufgenommen. Die anfängliche Zuordnung beider Individuen wurde wiederum mit dem finalen Konsensuslabel verglichen um die manuelle Fehlerrate zu bestimmen (Tabelle 8).

Tabelle 8: manuelle Fehlerrate gegen Klassifizierungs-Makro (SVM Performance)

	„Precision _{DCV} “	„Recall _{DCV} “	„F-Score _{DCV} “
Manuell ⁽¹⁾	0,98 ± 0.05	0,96 ± 0.08	0,97 ± 0.05
SVM ⁽²⁾	0,95 ± 0.07	0,90 ± 0.10	0,92 ± 0.07

⁽¹⁾ Vergleicht zwei unabhängige manuelle Zuordnungen zum „Goldstandard“ („ground truth“)

⁽²⁾ Vergleicht die Zuordnung der zum „Goldstandard“ („ground truth“)

Tabelle 8 vergleicht die Ergebnisse aus der Zuordnung der SVM mit dem finalen Konsensuslabel. Die manuelle Annotation zeigt insgesamt bessere Ergebnisse als die SVM. Die manuelle Zuordnung erreicht eine „Precision_{DCV}“ von 98%, wo hingegen die SVM 95% erreicht. Die Ergebnisse für den „Recall_{DCV}“ liegen bei 96% für die manuelle Zuordnung und 90% für die SVM. Die Ergebnisse der Fehlerrate für die SVM sind zusätzlich als Scatterplot in Abbildung 20 gezeigt.

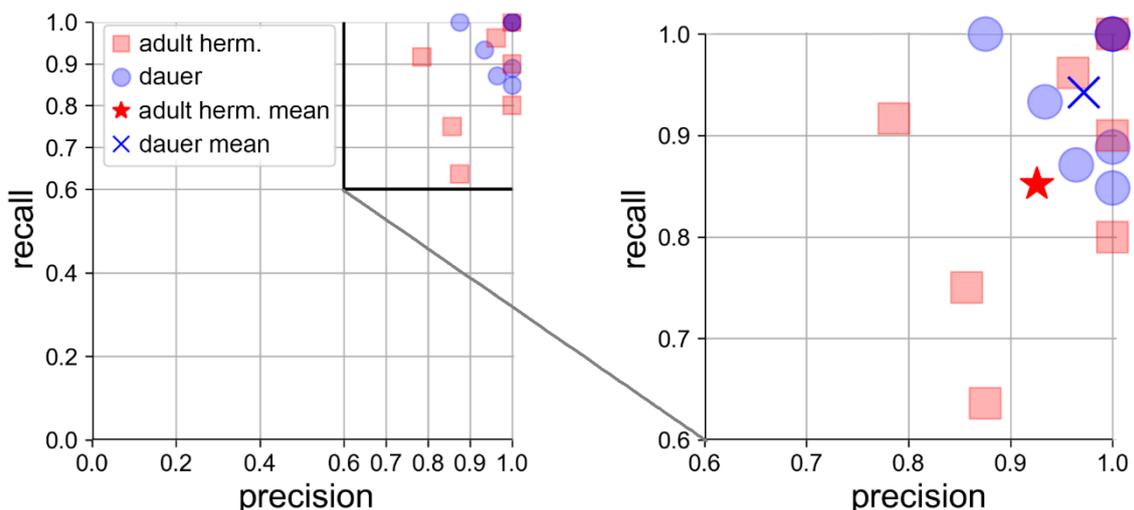


Abbildung 20: SVM Fehlerraten als „Precision_{DCV}“ (Genauigkeit) und „Recall_{DCV}“ (Trefferquote) Diagramm. Jeder Punkt repräsentiert ein validiertes Tomogramm. Rote Quadrate: junge adulte Hermaphroditen, blaue Kreise: Dauerlarven. Rechts: vergrößertes Diagramm. Roter Stern zeigt das mittlere Ergebnis der Daten der Hermaphroditen:

„Precision_{DCV}“ = 0,95, „Recall_{DCV}“ = 0,85. Das blaue Kreuz markiert das mittlere Ergebnis der Daten der Dauerlarven: „Precision_{DCV}“ = 0,96, „Recall_{DCV}“ = 0,95. 3 Dauerlarven- und 1 Hermaphroditen-Tomogramm wurden fehlerfrei klassifiziert. (Datenerhebung und Auswertung wurde gemeinsam von Maria Theiss und mir im Rahmen eines von mir betreuten Masterpraktikums durchgeführt, Abbildung wurde von Maria Theiss erstellt und zeigt eigene, noch unveröffentlichte Daten).

Die SVM-Klassifizierer wurde cross-validiert gegen jedes Tomogramm, während alle anderen Tomogramme als Trainingsdaten dienten. Abbildung 20 zeigt die Fehlerraten der automatischen SVM-Klassifizierung. Tomogramme junger adulter Hermaphroditen wurden als rote Quadrate, die von Dauerlarven als blaue Kreise dargestellt. Die mittleren Klassifizierungsergebnisse sind als roter Stern (Hermaphroditen: „Precision_{DCV}“ = 0.95, „Recall_{DCV}“ = 0.85) oder blaues Kreuz (Dauerlarven: „Precision_{DCV}“ = 0.96, „Recall_{DCV}“ = 0.95).

Die Ergebnisse der Dauerlarven clustern stärker in der rechten oberen Ecke und haben ein durchschnittlich besseres Ergebnis als junge adulte Hermaphroditen. 3 Dauerlarven- und ein Hermaphroditen-Tomogramm wurden fehlerfrei klassifiziert und liegen in der rechten, oberen Ecke („Precision_{DCV}“ = 1, „Recall_{DCV}“ = 1) übereinander.

7.3 Resultate III: Anwendung von 3D ART VeSElecT bei Thrombozyten

Die hier verwendeten Thrombozyten wurden von der AG Nieswand (Universitätsklinikum Würzburg) fertig präpariert und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet.

Um die Thrombozyten genauer zu untersuchen wurden von mir elektronenmikroskopische Tomogramme am TEM von murinen Plättchen (WT, UNC und Nbeal, siehe Abbildung 21) in ruhendem („resting“) und aktivem („active“) Zustand aufgenommen.

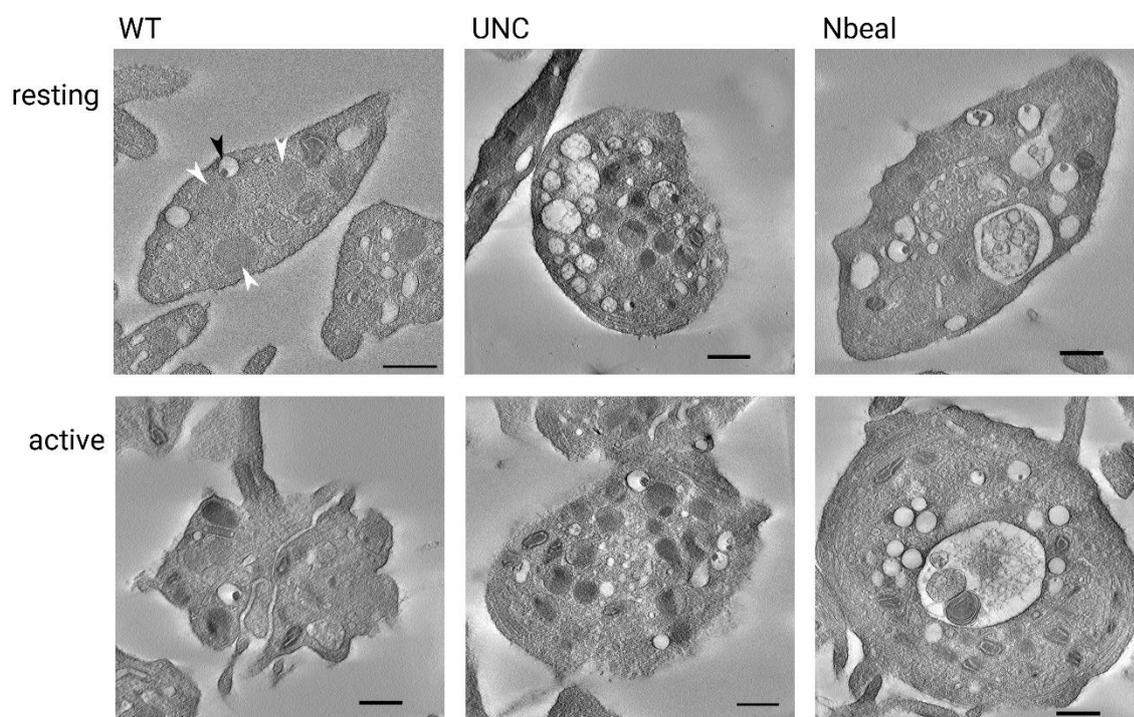


Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Tomogramme von murinen Thrombozyten verschiedener Genotypen: WT, UNC und Nbeal in jeweils aktivem und ruhendem Stadium. α -Granula sind exemplarisch im ruhenden Stadium des WT Plättchens mit weißen Pfeilspitzen, das δ -Granulum mit schwarzer Pfeilspitze gekennzeichnet. Skalierungsbalken = 500 nm. (eigene Daten, noch unveröffentlicht)

Das WT-Plättchen besitzt im ruhenden Stadium 3 α -Granula (weiße Pfeilspitzen) und ein δ -Granulum (schwarze Pfeilspitze). WT Plättchen zeigen eine deutliche Veränderung vom ruhenden zum aktiven Stadium. Plättchen im ruhenden Zustand sind rund oder oval, je nach

Schnittrichtung oder Lage der Plättchen. Die aktiviertem WT Plättchen bilden Arm-ähnliche Strukturen, Pseudopodien, aus. Im aktivierten Zustand sind keine α -Granula mehr zu erkennen. UNC-Plättchen beinhalten eine erhöhte Anzahl an α -Granula (ruhend: 5, aktiv: 9) und eine Anzahl von 2 δ -Granula in ruhendem und 3 δ -Granula in aktiviertem Zustand. Im Vergleich zum WT-Plättchen können hier im aktivierten Zustand keine Pseudopodien erkannt werden. Das ruhende Plättchen und das aktivierte Plättchen können nicht voneinander unterschieden werden. In Nbeal Plättchen können keine α -Granula gefunden werden. Es sind 2-3 δ -Granula erkennbar. Im aktivierten Zustand kam es zur Ausbildung von einigen Pseudopodien. Die Plättchen der Nbeal-Mutante scheinen im Vergleich zum WT und UNC vergrößert zu sein.

Des Weiteren wurden 2D elektronenmikroskopische Aufnahmen am TEM von Patienten mit Verdacht auf „storage-pool-disease“ (SPD) oder Hermansky-Pudlak Syndrome (HPS) erstellt (siehe Abbildung 22).

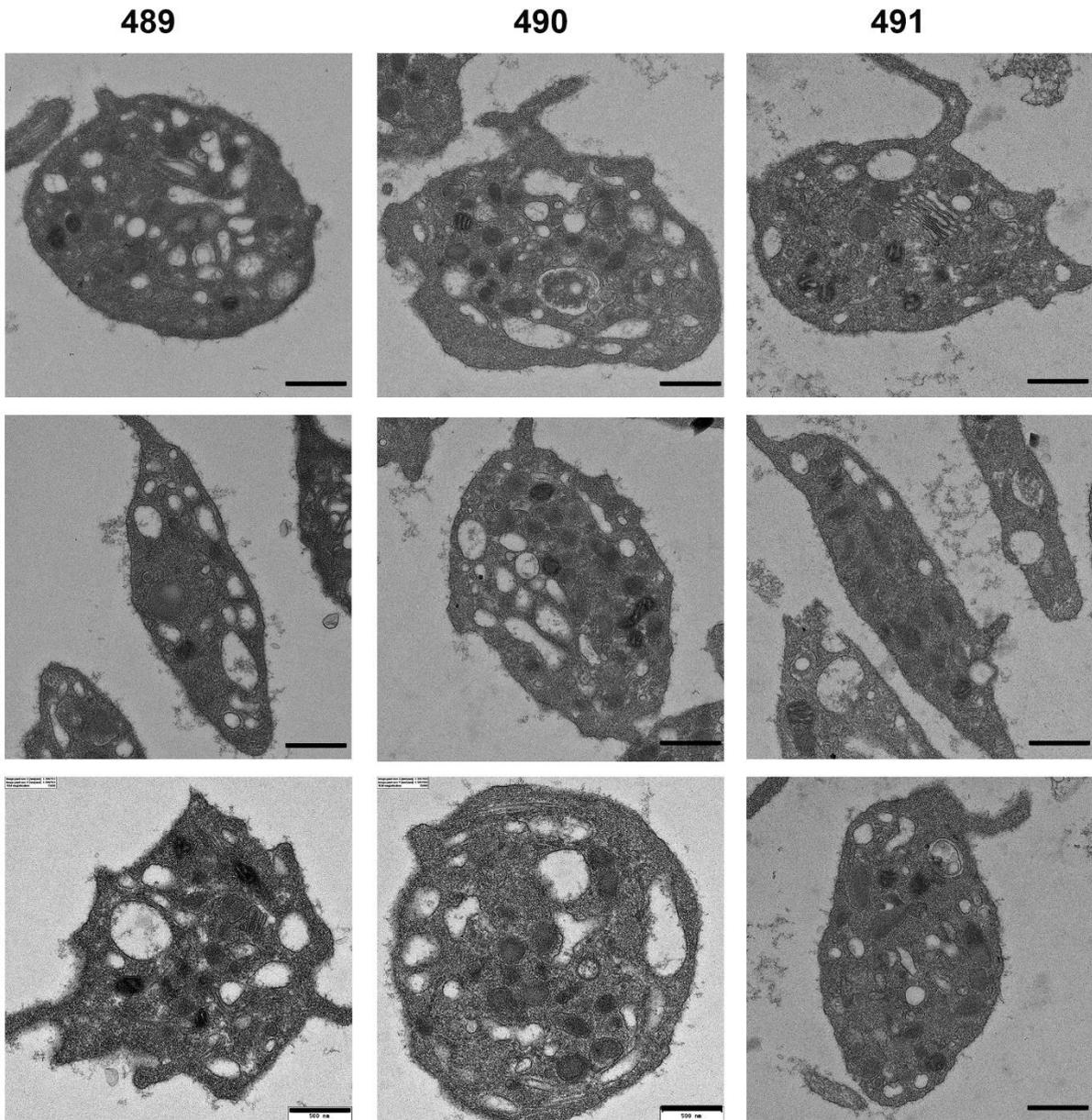


Abbildung 22: elektronenmikroskopische 2D Aufnahmen von Blutplättchen potentieller SPD- oder HPS-Patienten. 489, 490 und 491 stehen für anonymisierte Patienten-Bezeichnungen. Skalierungsbalken = 500 nm. (eigene Daten, noch unveröffentlicht)

Bei Patient 489 besitzt eine Vielzahl von α -Granula, jedoch fehlen die δ -Granula vollständig. Patient 490 besitzt ebenfalls eine Vielzahl an α -Granula, jedoch nur 1 δ -Granulum im mittleren Bild. Patient 491 besitzt ebenfalls α -Granula, jedoch keine δ -Granula.

Des Weiteren konnte durch die Betrachtung des Bildmaterials festgestellt werden, dass die α -Granula in 2D elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 22) teilweise nur schwer vom Hintergrund zu erkennen sind. In elektronenmikroskopischen Tomogrammen dagegen sind die Thrombozyten kontrastreicher und daher leichter zu erkennen und zu quantifizieren.

8 Diskussion

Neue mikroskopische Techniken ermöglichen die Erstellung hochauflösender, sehr großer Datensätze. Die Analyse und Auswertung des Bildmaterials ist dabei limitiert, da sie in vielen Fällen manuell von Experten ausgeführt werden muss. Um den Prozess der Erkennung und Quantifizierung von Vesikeln in elektronenmikroskopischen Tomogrammen zu beschleunigen wurde in dieser Arbeit Software entwickelt, die auf diese Aufgabe spezialisiert ist.

8.1 Diskussion I: Fiji-Macro 3D ART VeSElecT

Das Fiji Makro 3D ART VeSElecT wurde entwickelt um synaptische Vesikel in elektronenmikroskopischen Tomogrammen zu untersuchen. Es quantifiziert Vesikel erfolgreich in 4dpf und 8dpf embryonalen *Danio rerio* und vergleicht *C. elegans* N2 wildtypische NME mit Septin (*unc59(e261)*)-Mutanten. Das Tool ermöglicht die Detektion und Quantifizierung entwicklungspezifischer und Mutanten-spezifischer Veränderungen in synaptischen Vesikelpools in beiden Modellen.

In den Fiji Macros sind eine vollautomatische Vesikel-Registrierung und Charakterisierung implementiert. Die Aufteilung des Workflows in zwei Makros, eines zur Registrierung und eines zur Charakterisierung, erlaubt einen optionalen manuellen Zwischenschritt, in dem falsch positive Vesikel vom Anwender gelöscht werden können. Dieser Zwischenschritt wird über das RoiManager-Plugin ermöglicht, welches die erkannten Vesikel mit einer Farbcodierung durchnummeriert, wodurch Vesikel anhand ihres Farbwerts im Bild (z.B. im „Stack Segmented“) und in der Liste des RoiManagers wiedergefunden und bei Bedarf gelöscht werden können. Unser Tool wurde auf Performance (detektierte Vesikel) und Spezifität (wahre Vesikel) als auch auf „Precision“ und „Recall“ überprüft und jeweils sehr kleine Fehlerraten festgestellt. Es wird gezeigt, dass das Makro eine bessere Performance zeigt

als Ilastik [127] (siehe Abbildung 10) und eine bis zu 68-Mal schnellere Segmentierung im Vergleich zur manuellen Analyse mit IMOD ermöglicht. Die Resultate demonstrieren, dass die ermittelten Unterschiede in der Vesikelgröße in *Danio rerio* Embryonen durch die Analyse mit dem Makro bestätigt werden können. Die manuelle und semi-automatische Annotation der gleichen Vesikel zeigte vergleichbare Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass das Makro eine sehr hilfreiche Methode zur schnellen automatischen Erkennung und Annotation von Vesikeln in NME ist. Durch die Anwendung von 3D ART VeSElect wurde festgestellt, dass die original Vesikelgrößen für die automatische Annotation deutlich kleiner sind als die aus der manuellen Analyse (siehe Ergebnisse Abbildung 6D und Abbildung 7). Die Unterschiede kommen durch die grundsätzlich verschiedenen Ansätze der Größenmessungen zustande und können durch vier Gründe erklärt werden. Erstens, für die manuelle Annotation gilt der äußere Vesikelmembranrand als Begrenzung für die Vesikelgröße, wohingegen die automatische Annotation des Makros nur das innere Vesikellumen misst ohne die Vesikelmembran mit einzubeziehen. Um diesen Unterschied zu kompensieren wurde der durchschnittliche ermittelte Unterschied, zwischen innerem und äußerem Vesikeldiameter, auf die gemessenen Werte des Makros aufaddiert, worauf hin die Ergebnisse der automatischen Annotation ein wenig größer aber etwa im gleichen Größenbereich wie die der manuellen Analyse waren. Aus diesem Grund sollten manuell segmentierte Datensätze nicht direkt mit automatisch analysierten Datensätzen verglichen werden. Ein großer Nachteil des manuellen Ansatzes ist, seine Fehleranfälligkeit, da subjektive Wahrnehmungen der ausführenden Person die Ergebnisse mitunter stark beeinflussen können. Eine weitere Erklärung für die differierenden Ergebnisse der manuellen und automatischen Analyse könnte eine systematische Überschätzung der Vesikelgrößen bei der manuellen Annotation sein. Eine Unterschätzung bei

automatischer Segmentierung ist ein bekanntes Phänomen und könnte eventuell dadurch erklärt werden, dass die automatische Segmentierung präziser ist [136].

Trotz allem konnten die abweichenden Vesikelgrößen in 4dpf und 8dpf Zebrafisch Embryonen erfolgreich durch die Anwendung von 3D ART VeSElecT bestätigt werden. Die detektierten Unterschiede sind in beiden Analyseverfahren hochsignifikant (p -Wert < 0.001), wenn auch geringfügig kleiner bei der automatisierten Methode.

In einem zweiten Experiment wurden weitere Anwendungsmöglichkeiten des Makros präsentiert. Dazu wurden Datensätze von *C. elegans* Septin-Mutanten (Funktionsverlust im *unc-59(e261)*-Gen) zu N2 Wildtypen verglichen. Durch die Analyse wurden hochsignifikante Größenunterschiede der synaptischen Vesikel entdeckt. NME von *unc-59(e261)*-Mutanten zeigten einen durchschnittlich 0.7 nm kleineren Durchmesser und eine höhere Vesikelpooldichte als N2 NME. Für jeden Nachbarvesikel (nächster, zweitnächster und drittnächster) war eine ca. 4 nm größere Distanz in N2 NME detektiert worden, verglichen zu *unc59(e261)*. Demnach scheint die Septin-Mutation einen Effekt auf die Architektur des Vesikelpools zu haben was auf eine Rolle des Septins UNC-59 in der Organisation des Vesikelpools hinweist. Dies würde mit den bereits bekannten Funktionen von UNC-59 und UNC-61 übereinstimmen, welche dafür bekannt sind Heterodimere zu bilden, die wiederum dazu in der Lage sind sich zu Strukturen höherer Ordnung zusammenzulagern [37]. Neben ihrer Fähigkeit zur Assemblierung sind Septine außerdem in der Lage an Membranen zu binden und co-präzipitierten mit synaptischen Vesikeln und dem SNARE-Protein Syntaxin [137]. Eine potentielle Aufgabe der Septine im Vesikelpool könnte demnach die filamentöse Verbindung der einzelnen Vesikel sein. Eine Beeinträchtigung der Funktion der Septine könnte demnach zu einer unvollständigen Ausbildung und somit zu verkürzten Filamenten führen, was die dichteren Vesikelpools in Septin-Mutanten erklären könnte. Eine weitere Möglichkeit

ist eine regulatorische Rolle der Septine bei der Exozytose in *C. elegans* Synapsen. In Mäusen wurde SEPT5 bereits eine wichtige Rolle in der Exozytose nachgewiesen, die möglicherweise über die Ausbildung einer physikalischen Barriere die Fusion der Vesikel regulieren [59]. Dies könnte zum einen die Anreicherung synaptischer Vesikel und dadurch entstehende dichtere Vesikelpools erklären. Zum anderen könnte eine Funktion von UNC-59 und UNC-61 als Barriere zur Regulierung der Vesikelfusion den unkoordinierten Phänotyp in Septin-Mutanten erklären.

8.2 Diskussion II: Maschinelle Lernalgorithmen zur automatisierten Klassifizierung

Automatische Methoden zur Bildanalyse sind von großer Bedeutung, da sie helfen manuellen Arbeitsaufwand zu vermeiden oder zumindest auf ein Mindestmaß zu reduzieren. Automatisierte Verfahren haben außerdem den Vorteil eine unvoreingenommene Datenanalyse und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten und somit aufwändige Doppel-Blind Analysen zu ersetzen. Dies wurde noch einmal durch unsere eigene Erfahrung belegt, wo eine versehentliche wiederholte Analyse des gleichen Tomogramms eines Experten eine unterschiedliche Interpretation von CCV zu DCV und 6 weitere nicht übereinstimmende Zuordnungen bei $n = 134$ Vesikeln (z.B. CCV und ND oder CCV und „Error“ (fehlerhaft erkannter Vesikel)) ergab. Solche Abweichungen bei manueller Analyse können einen entscheidenden Einfluss auf das Endergebnis haben. Aus diesem Grund ließen wir zwei Experten unabhängig voneinander die Vesikel manuell zuordnen. Bei Differenzen in der Interpretation, berieten sich beide Personen um auf ein einvernehmliches Ergebnis zu kommen oder bezogen einen dritten Experten für den Entscheidungsprozess ein. Immer noch unzuordenbare Vesikel wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen ($\sim 1\%$). Da solche

Evaluierungsprozesse sehr arbeitsaufwändig und zeit-intensiv sind ist eine automatisierte Lösung, die eine schnellere Analyse gewährleistet, unabdingbar. Soweit uns bekannt ist gibt es keinen anderen Ansatz um die spezielle Aufgabe der automatisierten Vesikelklassifizierung in Elektronenmikroskopischen Tomogrammen zu lösen. Aus diesem Grund wurde ein neuer methodischer Ansatz basierend auf einer modifizierten Version des zuvor publizierten Fiji Makros 3D ART VeSElecT [88] entwickelt. Dieses Tool wurde sowohl zur automatischen Erkennung als auch zum Auslesen wichtiger Charakteristika angewandt, die zum Training eines „machine-learning“-Klassifizierungsalgorithmus benutzt wurden. Dieser wurde anschließend verwendet um die Ergebnisse durch Farbcodierung der klassifizierten Vesikel in 3D zu visualisieren und kann zukünftig für weitere Klassifikationen verwendet werden. Dieser neue methodische Ansatz wurde verwendet um NME zweier Entwicklungsstadien von *C. elegans*, junge adulte Hermaphroditen und Dauerlarven, zu vergleichen.

Bei der manuellen Analyse wurde eine dritte hypothetische Klasse von Vesikeln, namens nicht-determinierbare Vesikel (ND), festgelegt, welche jedoch höchstwahrscheinlich CCVs ohne perfekt klaren Kern sind. Dies scheint realistisch, da sie mit den CCVs in allen Charakteristika (Radius, distAZ) identisch sind und sich nur signifikant in ihrem Grauwert unterscheiden, welcher zwischen den Grauwertintensitäten der DCVs und CCVs liegt (Abbildung 15). Diese Untersuchung kann durch entweder biologische oder technische Aspekte erklärt werden. Zum einen könnten mittel-graue Vesikel DCVs mit teilweise entleertem Inhalt sein, wie z.B. nach „kiss-and-run“ Exocytose [138–140]. Trotzdem würde dies nicht erklären weshalb NDs die gleiche Größe wie CCVs haben, da DCVs für ihre deutlich größeren Durchmesser bekannt sind [89]. Zum anderen könnten Vesikel einfach nur dunkler erscheinen aufgrund von partiell geringerer Qualität der Datensätze. Fehlende Präzision bei der Tomogrammüberlagerung

beider einfach-getilteter Tomogramme zum Erhalt eines doppelt-getilteten Tomogramms, könnte zu dunkleren, verschwommenen Vesikeln mit nicht perfekt klarem Kern führen.

Der Vergleich der DCV Anzahl in Dauerlarven und jungen adulten Hermaphroditen zeigte Unterschiede im DCVs-Gehalt (9% in jungen adulten Hermaphroditen und 16% in Dauerlarven), wenn nur Datensätze cholinerg NME mit deutlichen „dense-projections“ und > 100 Vesikeln verglichen wurden. Des Weiteren zeigte der Vergleich, dass der DCV-Gehalt mit der Zellgrößenänderung innerhalb des Tomogramms korreliert (Abbildung 13). Eine große Zellgrößenänderung indiziert den Einschluss dezentraler Regionen des synaptischen Boutons im Tomogramm. Die Integration von Arealen außerhalb der aktiven Zone ist in Dauerlarven-Tomogrammen wahrscheinlicher, da ihre synaptischen Boutons generell kleiner (mittlerer Diameter \pm SD des Querschnitts 452 ± 85 nm) sind verglichen zu jungen adulten Hermaphroditen (mittlerer Diameter \pm SD des Querschnitts 542 ± 97 nm). Dadurch haben die, für die Tomographie typischen, 250 nm dicke Schnitte eine größere Wahrscheinlichkeit auch dezentrale Region in NME von Dauerlarven mit einzuschließen. Unabhängig vom Ursprung der Differenz des DCV-Gehalts wird gezeigt, dass der neu entwickelte Ansatz dazu genutzt werden kann solche quantitativen Unterschiede zu analysieren. Für ein umfassenderes Verständnis wären serielle Tomogramme vollständiger synaptischer Boutons notwendig. Serielle Tomogramme können anhand der enthaltenen weitgehend linear verlaufenden Mikrotubuli aligniert werden [141].

Des Weiteren wurde herausgefunden, dass junge adulte Hermaphroditen signifikant größere Vesikel (CCVs und DCVs) und Diameter der Synapsen haben im Vergleich zu Dauerlarven. Diese Entdeckung könnte entweder ein biologisches Phänomen von Dauerlarven oder ein Nebeneffekt der Probenpräparation sein. Dauerlarven haben eine besonders ausgeprägte

Kutikula, die dem Tier zum Schutz vor widrigen Umweltbedingungen, wie Hitze und Trockenheit, dient [70,72]. Dies kann jedoch auch ungünstig im Falle der Fixierung (Gefriersubstitution) der Proben sein, obwohl keine Anzeichen für unzureichende Probenpräparation gefunden wurden. Unterschiedliche synaptische Vesikelgrößen wurden bereits in NME anderer Organismen, wie Ratten [142] und Zebrafischen [89] gefunden. Für Zebrafische wurde eine Abhängigkeit der Vesikelgröße zum Reifestadium der NMEs gezeigt, welche möglicherweise im Zusammenhang mit der funktionalen Veränderung der Synapsen zur Kontrolle unterschiedlichen Schwimmverhaltens stehen [89]. Soweit bekannt, wurden bislang keine Unterschiede der synaptischen Vesikelgröße während des normalen Entwicklungszyklus für *C. elegans* berichtet. Nichts desto trotz könnte auch hier die Vesikelgröße in Verbindung zu verändertem Bewegungsverhalten der Dauerlarve stehen, welche sich unter anderem im sogenannten Nuktationsverhalten äußert [72]. Da manuelle Messungen oft nur ungenau sind können kleinere Unterschiede in der Vesikelgröße nur durch umfassende Analysen mittels replizierbarer Methoden festgestellt werden, weshalb automatisierte Methoden unabdingbar sind. Das zuvor publizierte Makro 3D ART VeSElect kann nachweislich dazu benutzt werden um differierende Vesikelgrößen nachzuweisen [88]. Dieser Ansatz kombiniert mit der neuen Erweiterung zur Klassifizierung könnte der Schlüssel sein um bislang nicht unterscheidbare Differenzen von Vesikeln zukünftig systematisch zu detektieren.

Obwohl die Nervenzellen, wie in Tabelle 5 Tabelle 5: Verhältnis von CCVs, NA und DCVs jedes Tomogramms und die gemessenen Zellgrößendurchmesser in x- und y-Richtung. gezeigt, in Dauerlarven kleiner sind wurde eine deutliche Abtrennung der DCVs von den CCVs beobachtet. DCVs in Dauerlarven scheinen folglich weiter entfernt von der aktiven Zone, am Rande des synaptischen Vesikelpools zu liegen, verglichen zu jungen adulten Hermaphroditen.

Solche charakteristischen Unterschiede in der synaptischen Architektur könnten z. B. durch eine Verschiebung hin zu einem höheren DCV-Gehalt in einem nicht fusionskompetenten, ruhenden Stadium in Dauerlarven verglichen zu jungen adulten Hermaphroditen erklärt werden. Darüber hinaus könnte eine Lokalisation von DCVs in Dauerlarven näher zum Rand der Zelle hin, verglichen zu jungen adulten Hermaphroditen, auf die Notwendigkeit einer schnelleren Peptidausschüttung hinweisen. Die festgestellte erhöhte Anzahl der DCV könnte außerdem, zumindest teilweise, das geringere Vesikelvolumen verglichen zu jungen adulten Hermaphroditen kompensieren.

Für die automatisierte Klassifikation der Vesikel wurden unterschiedliche „Machine-Learning“ Algorithmen getestet. Die SVM zeigte die besten Resultate im Vergleich zu „Random-Forest“ Entscheidungsbäumen und K-Nächste-Nachbarn-Klassifikation. Außerdem funktioniert die SVM unabhängig von der Dimensionalität der Daten, da sie nicht-lineare trennbare Klassen mit Hilfe eines mathematischen Tricks, dem sogenannten Kernel-Trick, separieren kann, sie erlaubt eine einfache Integration des trainierten linearen Klassifizier-Algorithmus in das Makro und kann prinzipiell für eine Auftrennung in mehr als zwei Klassen benutzt werden [143].

Die Cross-Validierung ergab sehr gute Resultate für die automatische Klassifizierung der Vesikel. Interessanterweise zeigten die Tomogramme der Dauerlarven bessere Ergebnisse als die von Hermaphroditen, was eventuell durch die unterschiedlichen Grauwertintensitäten der einzelnen Tomogramme erklärt werden könnte. Folglich wurden kontrastreichere Vesikel leichter erkannt und zeigten größere Abweichungen in der GVSD und dem gv. Eine andere Erklärung könnte die deutlichere Separierung der Lokalisation der Vesikeltypen in Dauerlarven sein.

Die vortrainierte SVM kann zukünftig zur Klassifizierung von DCVs und CCVs auf ähnlich aussehenden Tomogrammen angewandt werden. Das Fiji-Klassifikations-Makro inklusive der Trainingsparameter wurde öffentlich zur Verfügung gestellt. Zusätzlich können Anwender eine eigene SVM für ihre Daten trainieren, indem das ebenfalls zur Verfügung gestellte Python-Skript verwendet wird und anschließend die daraus neu gewonnenen Parameter ins Fiji-Makro integriert werden. Das Klassifikationsmakro, das Python-Skript, zum neu-trainieren der SVM, ein Tutorial und Testdatensätze werden auf: <https://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/bioinfo/computing/3dart-veselect/> zur Verfügung gestellt.

Um die in Teil I und II entwickelte Software auf ihr mögliches Anwendungsspektrum zu untersuchen, wurde die Anwendbarkeit anhand des Beispiels der Blutplättchen, die ebenfalls sekretorische Vesikel enthalten, überprüft.

8.3 Diskussion III: Anwendung von 3D ART VeSElect bei Thrombozyten

Da eine Quantifizierung der Vesikel in elektronenmikroskopischen Bildern von Blutplättchen für die Diagnose verschiedene Bluterkrankungen verwendet wird, sollte die in Teil 1 und 2 entwickelte Software zur automatischen Erkennung von synaptischen Vesikeln auf ihre Anwendbarkeit bei Plättchen getestet werden. Aus diesem Grund wurden 2D und 3D elektronenmikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten angefertigt.

Die betrachteten murinen Blutplättchen von NBEAL und UNC-13-Mutanten zeigten in der Analyse den bereits bekannten Phänotyp. Für UNC-13 wurde eine erhöhte Anzahl von Granula im Vergleich zum WT festgestellt. Sekretionsdefekte wurden bereits zuvor für UNC-13-Mutanten beschrieben und sind auf dessen Rolle bei der Entwicklung fusionskompetenter

Vesikel zurückzuführen[108–111]. NBEAL-Mutanten zeichnen sich dagegen, wie bereits publiziert [117], durch vergrößerte Plättchen und fehlende α -Granula aus. Die humanen Patientendaten zeigten in allen drei Fällen eine große Anzahl an α -Granula wohingegen δ -Granula meist vollkommen fehlten. Dies weist darauf hin, dass alle drei Patienten entweder unter HPS oder δ -Granula SPD leiden.

Der Vergleich von 2D und 3D TEM-Aufnahmen ergab kontrastreichere Bilder bei der Tomographie, wodurch Granula einfacher zu quantifizieren sind. Dies kann durch die deutlich bessere Auflösung der elektronenmikroskopischen Tomographie in der z-Ebene erklärt werden. Jedoch ist die Anwendung dieses Bildgebungsverfahrens für umfassende Analysen zu zeitaufwändig. Auch in den sehr viel schneller erstellbaren 2D elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte deutlich erkannt werden ob ein krankhaftes Erscheinungsbild, erkennbar durch fehlende oder erhöhte Anzahl von Granula, vorlag. Dies spricht dafür auch zukünftig 2D elektronenmikroskopischen Aufnahmen zur Diagnose zu verwenden. Für eine detaillierte morphologische Untersuchung der Ultrastruktur der Plättchen zu Forschungszwecken eignen sich jedoch Elektronentomographiedaten besser, da sie eine nahezu isotropische Auflösung von 4-5 nm bieten, was durch Messungen der Membrandicke herausgefunden wurde [1–5].

Aus biologischer Sicht sind sich synaptische Vesikel und Granula der Thrombozyten in vielerlei Hinsicht ähnlich. In beiden Fällen speichern die Vesikel wichtige chemische Komponenten, die nach Stimulation über einen Mechanismus mittels SNARE-Proteine [144–147] ausgeschüttet werden. Jedoch unterscheidet sich das Bildmaterial durch einige entscheidende Faktoren voneinander. Zum einen sind die Granula in Blutplättchen deutlich größer (200 – 500 nm) [95], also etwa 10-mal so groß wie synaptische Vesikel. Zum anderen enthalten synaptischen Boutons zu einem Großteil synaptische Vesikel, wohingegen Thrombozyten sehr viele

verschiedene Komponenten beinhalten und generell deutlich variabler in ihrem Erscheinungsbild sind, wodurch die zielgerichtete Erkennung einzelner Vesikel erschwert wird. Dazu kommt, dass die Mitochondrien in einem ähnlichen Größenbereich wie Granula und Lysosomen liegen, wodurch bereits vier Klassen von Organellen zu unterscheiden wären (α -Granula, δ -Granula, Lysosomen und Mitochondrien), was mit der im Klassifikations-Makro verwendeten linearen SVM nicht möglich wäre. Im Gegensatz dazu enthalten Synapsen nur zwei Arten von Vesikeln (CCVs und DCVs). Zusätzlich bergen Blutplättchen die Problematik, dass Lysosomen und δ -Granula leicht miteinander verwechselt werden können, wenn die elektronendichte Struktur innerhalb des δ -Granula nicht in der Schnittebene liegt. Dazu kommt, dass insbesondere die α -Granula sich oft anhand des Kontrasts und der Textur kaum vom Hintergrund abheben, was eine automatische Erkennung sehr erschwert. Ein weiteres Problem ist, dass die Thrombozyten mit ihrer Größe von 1-3 μm [95] die elektronenmikroskopische Schnittdicke (Ultradünnschnitte = etwa 60 nm, Tomographieschnitte etwa 250 nm) weit überschreiten, wodurch diese nie vollständig in einem einzigen Schnitt enthalten sind. Dies führt dazu, dass die in den Tomogrammen enthaltenen Granula nicht rund, sondern scheibenförmig sind, da sie meist nicht vollständig im Datensatz enthalten sind. Aus diesem Grund ist der im Makro verwendete „Watershed“-Algorithmus nicht zur Segmentierung der Granula geeignet, da er auf runde Vesikel spezialisiert ist.

Aufgrund dieser Argumente und da, wie im Bildmaterial in Abbildung 21 und Abbildung 22 deutlich zu sehen, die Anzahl der in den 2D elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennenden Granula meist < 10 ist (im Gegensatz zu den NME von *C. elegans*, die oft mehrere hundert Vesikel enthalten) wurde hier die Softwareentwicklung, im Sinne einer Anpassung des Makros, nicht fortgeführt. Bei wenig umfassenden Analysen ist im Falle der Plättchen eine

manuelle Quantifizierung immer noch eine sehr gute Option. Falls jedoch eine umfassendere Auswertung mit einer weitreichenden Stichprobenzahl nötig wäre, könnte das Training eines Deep-Learning Algorithmus sinnvoll sein. Dafür spräche, dass es relativ einfach wäre umfangreiche Trainingsdatensätze zu erstellen. Zum einen enthalten elektronenmikroskopische Proben von Blutplättchen eine enorm hohe Anzahl an Thrombozyten, wodurch schnell eine hohe Stückzahl an Aufnahmen gemacht werden kann. Außerdem sind 2D Aufnahmen, die einen enorm weniger arbeitsaufwändig und zeitintensiv sind als die Erstellung von 3D Tomographiedatensätzen, völlig ausreichend zur Quantifizierung der Granula. Trotz allem wäre jedoch immer noch ein manuelles Labeln der Daten notwendig, was einer der limitierenden Faktoren ist.

8.4 Zusammenfassende Diskussion

Computergestützte Analyse für eine bessere Interpretation von Bildern wird bereits seit längerem im Bereich der medizinischen Bildgebung thematisiert. Jüngste Entwicklungen im „Machine-Learning“-Bereich, besonders von „Deep-Learning“-Methoden, haben große Fortschritte beim Identifizieren, Klassifizieren und Quantifizieren von Strukturen in medizinischen Bildern gemacht. Grund für den Erfolg dieser Methode ist, dass repräsentierte Eigenschaften einzig von den Daten durch den Computer selbst erlernt werden anstatt von manuell festgelegten Charakteristika [23]. Aus diesem Grund erreichen „Deep-Learning“-Algorithmen verbesserte Performance in verschiedenen medizinischen Anwendungsbereichen und entwickeln sich dort gegenwärtig zu einer Spitzentechnologie [148]. Die Ansprüche an Algorithmen bei biologischen Fragestellungen, wie zum Beispiel bei der Bildanalyse von EM-Tomographiedaten sind sehr ähnlich und doch gibt es entscheidende Unterschiede. Aufgabenstellungen im Bereich der Forschung sind meist einzigartig und sehr

spezifisch, wie beispielsweise die Quantifizierung synaptischer Vesikel, was ebenso spezifische Lösungen erfordert. Außerdem ist die Generierung von Datensätzen limitiert und es ist schwierig, zeitaufwändig und kostspielig, zusätzlich große Datenmengen für die ausführlichen Trainingsperioden zu generieren wie sie bei „Deep-Learning“-Algorithmen benötigt werden [22]. Aus diesem Grund sind „Deep-Learning“-Methoden nicht zur Lösung aller Fragestellungen gleichermaßen geeignet. Speziell für die Lebenswissenschaften entwickelte Software, wie Imaris (Bitplane AG, Zürich, Schweiz), bietet zwar viele Möglichkeiten für die Bildanalyse, jedoch nur über den Kauf einer Lizenz. Die Open-Source Software Ilastik verwendet „Random-Forest“-Klassifikation und ermöglicht ein relativ einfaches und schnelles Training über eine interaktive Benutzeroberfläche [127]. Jedoch hat Ilastik im Vergleich zu dem in dieser Arbeit entwickelten ImageJ-Makro 3D ART VeSElect eine schlechtere Performance gezeigt. Die in dieser Arbeit entwickelte Software gewährleistet dagegen eine schnellere Quantifizierung mit sehr geringer Fehlerrate und damit sehr hoher Qualität speziell für synaptische Vesikel in elektronenmikroskopischen Tomogrammen, wie im Teil „Resultate I: 7.1.5 Vergleich zu Ilastik als Methode auf Basis von maschinellem Lernen“ genauer beschrieben.

Der im zweiten Teil der Arbeit (siehe 7.2 Resultate II: Maschinelle Lernalgorithmen zur automatisierten Klassifizierung) ins Makro implementierte Klassifikator ermöglicht außerdem eine einfache Anwendung selbst für Benutzer ohne Programmiererfahrung. Trotz allem ist ein erneutes Training des Klassifikators möglich, indem das zum Training verwendete Python-Skript zur Verfügung gestellt wird.

Die hier entwickelte Software (1. Veröffentlichung: 3D ART VeSElect Makro[88], 2. Veröffentlichung: Klassifikationsmakro mit SVM) ist in diesem Praxis-Fall daher eine sinnvolle, einfach umzusetzende Lösung, die zudem hoch performant ist. Ein Ansatz mit „Deep-

Learning“ wäre zu diesem Zeitpunkt noch nicht umsetzbar, da bislang nicht ausreichend Daten verfügbar sind.

Die Spezifität der Software, welche im Falle der synaptischen Vesikel die gute Performance sichert, limitiert das Anwendungsspektrum auf andere Fragestellungen, wie die Erkennung von Granula in Plättchen. Für die Anwendung der Makros auf andere Problemstellungen ist stets eine Anpassung notwendig. Deshalb sollte jeweils abhängig von der zu lösenden Fragestellung die dafür beste Methodik neu evaluiert werden.

Um langfristig verschiedene Strukturen unabhängig von ihren Charakteristika in elektronenmikroskopischen Tomogrammen zu Segmentieren und Quantifizieren, könnten wiederum „Deep-Learning“-Algorithmen sehr hilfreich sein. Das „Deep-Learning“ Toolkit ElektroNN [149] beispielsweise zeigt bereits hervorragende Ergebnisse bei der Erkennung von Membranen und Mitochondrien in elektronenmikroskopischen Bildern und wurde bereits für automatische Erkennung von Synapsen verwendet [150]. Die Weiterentwicklung eines solchen Netzwerks könnte - die erforderlichen sehr großen vorkuriierten Datensätze vorausgesetzt - anhand der erkannten Membranen die Segmentierung aller Strukturen und anschließende Klassifizierung mit Hilfe von festgelegten Filterungs-Parametern oder automatisch beispielsweise über „unsupervised Clustering“ ermöglichen. Interessanter Weise könnten aber die benötigten umfangreichen Trainingsdaten genau durch die Verwendung von den in dieser Arbeit entwickelten Ansätzen generiert werden.

9 Fazit

In der Promotionsarbeit wurden neue Strategien zur automatischen Bildverarbeitung vorgelegt, die das biologische Problem der Erkennung von synaptischen Vesikeln innovativ auf zwei verschiedenen Wegen lösen: Im ersten Falle wurde eine Segmentierung über ein ImageJ-Makro erreicht, das eine automatische Vesikelsegmentierung und Quantifizierung ermöglicht. Im zweiten Falle wurde eine Support Vektor Maschine als automatischer Klassifikator in ein weiteres Makro implementiert, welches dann eine Unterteilung der synaptischen Vesikel in „clear core“ und „dense core“ ermöglicht. In beiden Fällen gelang es eine hochwertige, praxistaugliche Lösung schnell zu entwickeln, die es nun ermöglicht Analysen von Vesikelpools deutlich schneller und effizienter durchzuführen.

10 Abkürzungsverzeichnis

µm: Mikrometer

2D: zweidimensional

3D: dreidimensional

C. elegans: *Caenorhabditis elegans*

ca.: circa

CCV: „clear core“-Vesikel

DCF: „dense core“-Faktor

DCV: „dense core“-Vesikel

distAZ: Distanz zur aktiven Zone

dpf: Tage nach der Fertilisation (in Englisch: „days past fertilisation“)

FN: falsch Negative (in Englisch: „false negatives“)

FP: falsch Positive (in Englisch: „false positives“)

GS: Gefriersubstitution

gv: Grauwert (in Englisch: „gray value“)

GVSD: Grauwert-Standardabweichung (in Englisch: „gray value standard deviation“)

HPF: Hochdruckgefrierung

IQA: Interquartilsabstand

kDa: Kilodalton

KNN: k-nächste-Nachbarn-Klassifikator (in Englisch: „k nearest neighbour“)

min: Minute(n)

nm: Nanometer

NME: neuromuskuläre Endplatte

PBR: polybasische Region

px: Pixel

r: Radius

RF: Random Forest

ROI: interessierende Region (in Englisch: „region of interest“)

RP: richtig Positive

SD: Standardabweichung

SDS: Sodium Dodecyl Sulfat

sek.: Sekunden

SUD: Septin-spezifische Domäne (in Englisch: „septin specific domain“)

SVM: Support Vektor Maschine

TEM: Transmissionselektronenmikroskop

w/v: Gewicht pro Volumen

WT: Wildtyp

z.B.: zum Beispiel

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Septin-Domänenstruktur und Komplexbildung.....	8
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> bei 22°C. 0 min ist der Zeitpunkt der Fertilisation...11	11
Abbildung 3: Ultradünnschnitt von transmissionselektronenmikroskopischen Bildern von Plättchen.....	18
Abbildung 4: Format der Input CSV-Datei.....	37
Abbildung 5: Workflow der automatisierten Vesikel-Annotation mit 3D ART VeSElecT.....	39
Abbildung 6: Analyse von NME von Zebrafisch-Embryonen mit 3D ART VeSElecT im Vergleich zur manuellen Analyse mit IMOD.....	45
Abbildung 7: Messergebnisse des inneren und äußeren synaptischen Vesikel Durchmessers.	47
Abbildung 8: Vergleich von N2 und <i>unc-59(e261)</i> <i>C. elegans</i> Tomogrammen mittels 3D ART VeSElecT.....	51
Abbildung 9: Fehlerraten bei der automatischen Vesikelerkennung mit 3D ART VeSElecT.....	54
Abbildung 10: Vergleich von 3D ART VeSElecT mit Ilastik.....	58
Abbildung 11: Verbesserungen des ursprünglichen 3D ART VeSElecT-Workflows.....	62
Abbildung 12: Beispiele für repräsentative CCVs, NDs und DCVs von jungen adulten Hermaphroditen (H) und Dauerlaven (D).....	65
Abbildung 13: Verhältnis von relativem DCV-Gehalt zur Zellgrößenveränderung in jedem analysierten Tomogramm.....	68

Abbildung 14: Visualisierung von Vesikeln in einem Dauerlarventomogramm mit farbkodierten Vesikel Eigenschaften: innerer r, gv, distAZ und GVSD.....	70
Abbildung 15: Statistische Analyse von CCV und DCV Eigenschaften. a + b) Boxplots des inneren r, normalisierte gv, distAZ und dem „Dense-Core-Factor“ (DCF) von Dauerlarven und junger adulter Hermaphroditen.....	71
Abbildung 16: Workflow des Klassifizierungs-Makros.....	76
Abbildung 17: Vergleich der visuellen Ergebnisse des angepassten 3D ART VeSElecT Makros und dem konsekutiv angewandten Klassifikations-Makros.....	79
Abbildung 18: Vergleich von DCV-Charakteristika (Schwarz) mit CCV-Charakteristika (Hellgrau).....	80
Abbildung 19: kumulatives Histogramm (a, b) und Kerndichteschätzungen (c, d; Bandbreite = $0,07 \cdot \text{Maximalwert des kompletten Datensatzes}$) der Distanzen zur aktiven Zone (distAZ).....	82
Abbildung 20: SVM Fehlerraten als „Precision _{DCV} “ (Genauigkeit) und „Recall _{DCV} “ (Trefferquote) Diagramm.....	84
Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Tomogramme von murinen Thrombozyten verschiedener Genotypen: WT, UNC und Nbeal in jeweils aktivem und ruhendem Stadium....	86
Abbildung 22: elektronenmikroskopische 2D Aufnahmen von Blutplättchen potentieller SPD- oder HPS-Patienten.....	88

12 Literaturverzeichnis

1. Mastronarde DN. Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution. *J Struct Biol.* 1997;120: 343–52. doi:10.1006/jsbi.1997.3919
2. Stigloher C, Zhan H, Zhen M, Richmond J, Bessereau J-L. The presynaptic dense projection of the *Caenorhabditis elegans* cholinergic neuromuscular junction localizes synaptic vesicles at the active zone through SYD-2/liprin and UNC-10/RIM-dependent interactions. *J Neurosci.* 2011;31: 4388–96. doi:10.1523/JNEUROSCI.6164-10.2011
3. Zampighi GA, Fain N, Zampighi LM, Cantele F, Lanzavecchia S, Wright EM. Conical Electron Tomography of a Chemical Synapse: Polyhedral Cages Dock Vesicles to the Active Zone. *J Neurosci.* 2008;28.
4. Zampighi GA, Zampighi L, Fain N, Wright EM, Cantele F, Lanzavecchia S. Conical tomography II: A method for the study of cellular organelles in thin sections. *J Struct Biol.* 2005;151: 263–274. doi:10.1016/j.jsb.2005.05.008
5. Robertson JD. The Early Days of Electron Microscopy of Nerve Tissue and Membranes. *Int Rev Cytol.* 1987;100: 129–201. doi:10.1016/S0074-7696(08)61700-3
6. Hopgood AA. Artificial intelligence: Hype or reality? *IEEE Comput Soc.* 2003;36: 24–28+4. doi:10.1109/MC.2003.1198233
7. Lawrence S, Giles CL, Ah Chung Tsoi, Back AD. Face recognition: a convolutional neural-network approach. *IEEE Trans Neural Networks.* 1997;8: 98–113. doi:10.1109/72.554195
8. Meng Joo Er, Shiqian Wu, Juwei Lu, Hock Lye Toh. Face recognition with radial basis function (RBF) neural networks. *IEEE Trans Neural Networks.* 2002;13: 697–710. doi:10.1109/TNN.2002.1000134
9. Lopes AT, de Aguiar E, De Souza AF, Oliveira-Santos T. Facial expression recognition with Convolutional Neural Networks: Coping with few data and the training sample order. *Pattern Recognit. Pergamon;* 2017;61: 610–628. doi:10.1016/J.PATCOG.2016.07.026
10. Howard AG, Zhu M, Chen B, Kalenichenko D, Wang W, Weyand T, et al. MobileNets: Efficient Convolutional Neural Networks for Mobile Vision Applications. 2017;
11. Sinha P, Balas B, Ostrovsky Y, Russell R. Face Recognition by Humans: Nineteen Results All Computer Vision Researchers Should Know About. *Proc IEEE.* 2006;94: 1948–1962. doi:10.1109/JPROC.2006.884093
12. Hinton G, Deng L, Yu D, Dahl G, Mohamed A, Jaitly N, et al. Deep Neural Networks for Acoustic Modeling in Speech Recognition: The Shared Views of Four Research Groups. *IEEE Signal Process Mag.* 2012;29: 82–97. doi:10.1109/MSP.2012.2205597
13. Graves A, Mohamed A, Hinton G. Speech recognition with deep recurrent neural networks. 2013 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing. *IEEE;* 2013. pp. 6645–6649. doi:10.1109/ICASSP.2013.6638947

14. Landi SM, Freiwald WA. Two areas for familiar face recognition in the primate brain. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2017;357: 591–595. doi:10.1126/science.aan1139
15. Bini SA. Artificial Intelligence, Machine Learning, Deep Learning, and Cognitive Computing: what do these terms mean and how will they impact health care? *J Arthroplasty*. Churchill Livingstone; 2018; doi:10.1016/J.ARTH.2018.02.067
16. Bonderman D. Artificial intelligence in cardiology. *Wien Klin Wochenschr*. Springer; 2017;129: 866–868. doi:10.1007/s00508-017-1275-y
17. Jiang F, Jiang Y, Zhi H, Dong Y, Li H, Ma S, et al. Artificial intelligence in healthcare: past, present and future. *Stroke Vasc Neurol*. BMJ Publishing Group; 2017;2: 230–243. doi:10.1136/svn-2017-000101
18. Houssami N, Lee CI, Buist DSM, Tao D. Artificial intelligence for breast cancer screening: Opportunity or hype? *Breast*. Elsevier; 2017;36: 31–33. doi:10.1016/j.breast.2017.09.003
19. Bassett DS, Mattar MG. A Network Neuroscience of Human Learning: Potential to Inform Quantitative Theories of Brain and Behavior. *Trends Cogn Sci*. Elsevier Current Trends; 2017;21: 250–264. doi:10.1016/J.TICS.2017.01.010
20. Kandel ER, Schwartz JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* (80-). American Association for the Advancement of Science; 1982;218: 433–443. doi:10.1126/science.715442
21. Angermueller C, Pärnamaa T, Parts L, Stegle O. Deep learning for computational biology. *Mol Syst Biol*. EMBO Press; 2016;12: 878. doi:10.15252/MSB.20156651
22. Chicco D. Ten quick tips for machine learning in computational biology. *BioData Min*. BioMed Central; 2017;10: 35. doi:10.1186/s13040-017-0155-3
23. LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep learning. *Nature*. Nature Publishing Group; 2015;521: 436–444. doi:10.1038/nature14539
24. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2012;9: 676–82. doi:10.1038/nmeth.2019
25. Rasband W. ImageJ. U S Natl Institutes Heal Bethesda, Maryland, USA. 2017; //imagej.nih.gov/ij/.
26. Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller CH. *Biologie*. 7th ed. Jürgen Markl, editor. München: Elsevier, Spektrum Akad. Verl; 2006.
27. Mostowy S, Cossart P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2012;13: 183–194. doi:10.1038/nrm3284
28. Hartwell LH. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res*. 1971;69: 265–76.

29. Kinoshita M, Noda M. Roles of Septins in the Mammalian Cytokinesis Machinery. *Cell Struct Funct.* Japan Society for Cell Biology; 2001;26: 667–670. doi:10.1247/csf.26.667
30. Pan F, Malmberg RL, Momany M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol.* BioMed Central; 2007;7: 103. doi:10.1186/1471-2148-7-103
31. Peterson E a., Petty EM. Conquering the complex world of human septins: Implications for health and disease. *Clin Genet.* 2010;77: 511–524. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01392.x
32. Menon MB, Kobarg J, Zieger B, Neubauer K. The Mammalian Septin Interactome. *Front Cell Dev Biol* *Front Cell Dev Biol.* 2017;5. doi:10.3389/fcell.2017.00003
33. Kinoshita a, Kinoshita M, Akiyama H, Tomimoto H, Akiguchi I, Kumar S, et al. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer’s disease. *Am J Pathol.* American Society for Investigative Pathology; 1998;153: 1551–1560. doi:10.1016/S0002-9440(10)65743-4
34. Chung KKK, Dawson VL, Dawson TM. The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson’s disease and other neurodegenerative disorders. 2001;24: 7–14.
35. Marttinen M, Kurkinen KM, Soininen H, Haapasalo A, Hiltunen M. Synaptic dysfunction and septin protein family members in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener.* 2015;10: 16. doi:10.1186/s13024-015-0013-z
36. Leipe DD, Wolf YI, Koonin E V, Aravind L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol.* Academic Press; 2002;317: 41–72. doi:10.1006/JMBI.2001.5378
37. John CM, Hite RK, Weirich CS, Fitzgerald DJ, Jawhari H, Faty M, et al. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *EMBO J.* 2007;26: 3296–307. doi:10.1038/sj.emboj.7601775
38. Macara IG, Baldarelli R, Field CM, Glotzer M, Hayashi Y, Hsu S-C, et al. Mammalian septins nomenclature. *Mol Biol Cell.* American Society for Cell Biology; 2002;13: 4111–3. doi:10.1091/mbc.E02-07-0438
39. Kinoshita M. The septins. *Genome Biol.* BioMed Central; 2003;4: 236. doi:10.1186/gb-2003-4-11-236
40. Sirajuddin M, Farkasovsky M, Zent E, Wittinghofer A. GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106: 16592–16597. doi:10.1073/pnas.0902858106
41. Sandrock K, Bartsch I, Bläser S, Busse A, Busse E, Zieger B. Characterization of human septin interactions. *Biological Chemistry.* 2011. pp. 751–761. doi:10.1515/BC.2011.081
42. Kim MS, Froese CD, Estey MP, Trimble WS. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J Cell Biol.* Rockefeller University Press; 2011;195: 815–26. doi:10.1083/jcb.201106131

43. Field CM, Al-Awar O, Rosenblatt J, Wong ML, Alberts B, Mitchison TJ. A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *J Cell Biol.* 1996;133: 605–616. doi:10.1083/jcb.133.3.605
44. John CM, Hite RK, Weirich CS, Fitzgerald DJ, Jawhari H, Faty M, et al. The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *EMBO J.* 2007;26: 3296–307. doi:10.1038/sj.emboj.7601775
45. Sellin ME, Sandblad L, Stenmark S, Gullberg M. Deciphering the rules governing assembly order of mammalian septin complexes. *Mol Biol Cell.* 2011;22: 3152–3164. doi:10.1091/mbc.E11-03-0253
46. Oh Y, Bi E. Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol.* Elsevier Ltd; 2011;21: 141–148. doi:10.1016/j.tcb.2010.11.006
47. Ageta-Ishihara N, Miyata T, Ohshima C, Watanabe M, Sato Y, Hamamura Y, et al. Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. *Nat Commun.* Nature Publishing Group; 2013;4: 2532. doi:10.1038/ncomms3532
48. Hagiwara A, Tanaka Y, Hikawa R, Morone N, Kusumi A, Kimura H, et al. Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2011;68: 512–25. doi:10.1002/cm.20528
49. Mavrikis M, Azou-Gros Y, Tsai F, Alvarado J, Bertin a, Iv F, et al. Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles. *Nat Cell Biol.* 2014;16: 322–334. doi:10.1038/ncb2921
50. Spiliotis ET, Hunt SJ, Hu Q, Kinoshita M, Nelson WJ. Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J Cell Biol.* 2008;180: 295–303. doi:10.1083/jcb.200710039
51. Okada S, Leda M, Hanna J, Savage NS, Bi E, Goryachev AB. Daughter cell identity emerges from the interplay of Cdc42, septins, and exocytosis. *Dev Cell.* The Authors; 2013;26: 148–61. doi:10.1016/j.devcel.2013.06.015
52. Tokhtaeva E, Capri J, Marcus EA, Whitelegge JP, Khuzakhmetova V, Bukharaeva E, et al. Septin dynamics are essential for exocytosis. *J Biol Chem.* 2015; M114.616201-. doi:10.1074/jbc.M114.616201
53. Maddox AS, Lewellyn L, Desai A, Oegema K. Anillin and the septins promote asymmetric ingression of the cytokinetic furrow. *Dev Cell.* 2007;12: 827–35. doi:10.1016/j.devcel.2007.02.018
54. Hall PA, Jung K, Hillan KJ, Russell SH. Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol.* 2005;206: 269–278. doi:10.1002/path.1789
55. Nakahira M, Macedo JNA, Seraphim TV, Cavalcante N, Souza TACB, Damalio JCP, et al. A Draft of the Human Septin Interactome. *PLoS One.* 2010;5. doi:10.1371/journal.pone.0013799
56. Fujishima K, Kiyonari H, Kurisu J, Hirano T, Kengaku M. Targeted disruption of Sept3, a

- heteromeric assembly partner of Sept5 and Sept7 in axons, has no effect on developing CNS neurons. *J Neurochem.* Wiley/Blackwell (10.1111); 2007;102: 77–92. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04478.x
57. Kinoshita A, Noda M, Kinoshita M. Differential localization of septins in the mouse brain. *J Comp Neurol.* Wiley-Blackwell; 2000;428: 223–239. doi:10.1002/1096-9861(20001211)428:2<223::AID-CNE3>3.0.CO;2-M
 58. Xue J, Tsang CW, Gai W-P, Malladi CS, Trimble WS, Rostas JAP, et al. Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals. *J Neurochem.* Wiley/Blackwell (10.1111); 2004;91: 579–590. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02755.x
 59. Yang Y-MM, Fedchyshyn MJ, Grande G, Aitoubah J, Tsang CW, Xie H, et al. Septins regulate developmental switching from microdomain to nanodomain coupling of Ca(2+) influx to neurotransmitter release at a central synapse. *Neuron.* Elsevier Ltd; 2010;67: 100–115. doi:10.1016/j.neuron.2010.06.003
 60. Versele M, Thorner J. Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol.* NIH Public Access; 2005;15: 414–24. doi:10.1016/j.tcb.2005.06.007
 61. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* Genetics Society of America; 1974;77: 71–94. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07894.x
 62. Tissenbaum HA. Using *C. elegans* for aging research. *Invertebr Reprod Dev.* Taylor & Francis; 2015;59: 59–63. doi:10.1080/07924259.2014.940470
 63. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. *A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis elegans.* *Genetics.* Genetics; 2015;200: 387–407. doi:10.1534/genetics.115.176099
 64. Altun ZF, Herndon LA, Crocker C, Lints R, Hall DH. WormAtlas [Internet]. p. <http://www.wormatlas.org>.
 65. White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1986;314: 1–340.
 66. Altun ZF, Hall DH. Nervous system, general description. In: *Worm Atlas.* 2013. doi:10.3908/wormatlas.1.18
 67. White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1976;275: 327–48.
 68. Varshney LR, Chen BL, Paniagua E, Hall DH, Chklovskii DB. Structural Properties of the *Caenorhabditis elegans* Neuronal Network. *PLoS Comput Biol.* 2011;7: 1–21. doi:10.1371/journal.pcbi.1001066
 69. Haueis P, Slaby J. Connectomes as constitutively epistemic objects: Critical perspectives on modeling in current neuroanatomy. *Progress in brain research.* 2017. pp. 149–177. doi:10.1016/bs.pbr.2017.05.002

70. Golden JW, Riddle DL. The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: Developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Dev Biol.* Academic Press; 1984;102: 368–378. doi:10.1016/0012-1606(84)90201-X
71. Erkut C, Kurzchalia T V. The *C. elegans* dauer larva as a paradigm to study metabolic suppression and desiccation tolerance. *Planta.* Springer Berlin Heidelberg; 2015;242: 389–396. doi:10.1007/s00425-015-2300-x
72. Cassada RC, Russel RL. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* Academic Press; 1975;46: 326–342. doi:10.1016/0012-1606(75)90109-8
73. Albert PS, Brown SJ, Riddle DL. Sensory control of dauer larva formation in *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol.* Wiley-Blackwell; 1981;198: 435–451. doi:10.1002/cne.901980305
74. Bargmann CI, Horvitz HR. Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Science (80-). American Association for the Advancement of Science*; 1991;251: 1243–1246. doi:10.1126/science.2006412
75. Hu PJ. Dauer. *WormBook*, ed. *WormBook*. 2007. pp. 1–19. doi:10.1895/wormbook.1.144.1
76. Hung WL, Wang Y, Chitturi J, Zhen M. A *Caenorhabditis elegans* developmental decision requires insulin signaling-mediated neuron-intestine communication. *Development.* Oxford University Press for The Company of Biologists Limited; 2014;141: 1767–79. doi:10.1242/dev.103846
77. Couteaux R, Pécot-Dechavassine M. Synaptic vesicles and pouches at the level of "active zones" of the neuromuscular junction]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1970;271: 2346–9.
78. Kittelmann M, Hegermann J, Goncharov A, Taru H, Ellisman MH, Richmond JE, et al. Liprin- α /SYD-2 determines the size of dense projections in presynaptic active zones in *C. elegans*. *J Cell Biol.* 2013;203: 849–863. doi:10.1083/jcb.201302022
79. Castillo J Del, Mello E, Morales T, Castillo JU, De Mello WC. The physiological role of acetylcholin in the neuromuscular system of ascaric lumbricoides. *Arch Int Physiol ei Biochim.* 1963;71: 741–757.
80. Richmond JE, Jorgensen EM. One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci.* Nature Publishing Group; 1999;2: 791–797. doi:10.1038/12160
81. del Castillo J, de Mello WC, Morales T. Inhibitory action of γ -aminobutyric acid (GABA) on *Ascaris* muscle. *Experientia.* Birkhäuser-Verlag; 1964;20: 141–143. doi:10.1007/BF02150701
82. Südhof TC. The Presynaptic Active Zone. *Neuron.* Cell Press; 2012;75: 11–25. doi:10.1016/J.NEURON.2012.06.012
83. Salio C, Lossi L, Ferrini F, Merighi A. Neuropeptides as synaptic transmitters. *Cell Tissue*

Res. Springer-Verlag; 2006;326: 583–598. doi:10.1007/s00441-006-0268-3

84. Salio C, Averill S, Priestley JV, Merighi A. Costorage of BDNF and neuropeptides within individual dense-core vesicles in central and peripheral neurons. *Dev Neurobiol*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2007;67: 326–338. doi:10.1002/dneu.20358
85. Walch-Solimena C, Takei K, Marek KL, Midyett K, Südhof TC, De Camilli P, et al. Synaptotagmin: a membrane constituent of neuropeptide-containing large dense-core vesicles. *J Neurosci*. Society for Neuroscience; 1993;13: 3895–903.
86. Li C. Neuropeptides. *WormBook*. 2008; 1–36. doi:10.1895/wormbook.1.142.1
87. Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, et al. Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron*. 2001;29: 131–43.
88. Kaldorf KV, Schulze K, Helmprobst F, Kollmannsberger P, Dandekar T, Stigloher C. FIJI Macro 3D ART VeSElecT: 3D Automated Reconstruction Tool for Vesicle Structures of Electron Tomograms. Dyer E, editor. *PLOS Comput Biol*. Public Library of Science; 2017;13: e1005317. doi:10.1371/journal.pcbi.1005317
89. Helmprobst F, Frank M, Stigloher C. Presynaptic architecture of the larval zebrafish neuromuscular junction. *J Comp Neurol*. 2015;523: 1984–97. doi:10.1002/cne.23775
90. Phillips MI, M.Ian. Neuropeptides: Regulators of Physiological Processes. *Regul Pept*. Elsevier; 2000;90: 101. doi:10.1016/S0167-0115(00)00102-6
91. Nguyen TQ, Sawa H, Okano H, White JG. The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 21: 3825–37.
92. Finger FP, Kopish KR, White JG. A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*. *Dev Biol*. 2003;261: 220–234. doi:10.1016/S0012-1606(03)00296-3
93. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008. doi:10.1161/ATVBAHA.107.150474
94. Machlus KR, Thon JN, Italiano JE. Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: A review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *British Journal of Haematology*. 2014. pp. 227–236. doi:10.1111/bjh.12758
95. Frojmovic MM, Milton JG. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol Rev*. 1982;62: 185–261. doi:10.1152/physrev.1982.62.1.185
96. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. NIH Public Access; 2009;23: 177–89. doi:10.1016/j.blre.2009.04.001
97. Yagi M, Zieger B, Roth GJ, Ware J. Structure and expression of the human septin gene *HCDCREL-1*. *Gene*. 1998;212: 229–236. doi:10.1016/S0378-1119(98)00146-2

98. Zieger B, Tran H, Hainmann I, Wunderle D, Zgaga-Griesz A, Blaser S, et al. Characterization and expression analysis of two human septin genes, PNUTL1 and PNUTL2. *Gene*. 2000;261: 197–203. doi:10.1016/S0378-1119(00)00527-8
99. Bläser S, Jersch K, Hainmann I, Zieger W, Wunderle D, Busse A, et al. Isolation of new splice isoforms, characterization and expression analysis of the human septin SEPT8 (KIAA0202). *Gene*. 2003;312: 313–320. doi:10.1016/S0378-1119(03)00635-8
100. Bartsch I, Blaser S, Roesler S, Sandrock K, Busse A, Huber M, et al. Human endothelial and platelet septin SEPT11: Cloning of novel variants and characterisation of interaction partners. *Thromb Haemost*. 2010;104: 1201–1210. doi:10.1160/TH10-07-0472
101. Bläser S, Horn J, Würmell P, Bauer H, Strümpell S, Nurden P, et al. The novel human platelet septin SEPT8 is an interaction partner of SEPT4. *Thromb Haemost*. 2004;91: 959–966. doi:10.1267/THRO04050959
102. Dent J, Kato K, Peng X-R, Martinez C, Cattaneo M, Poujol C, et al. A prototypic platelet septin and its participation in secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99: 3064–9. doi:10.1073/pnas.052715199
103. Martínez C, Corral J, Dent JA, Sesma L, Vicente V, Ware J. Platelet septin complexes form rings and associate with the microtubular network. *J Thromb Haemost*. 2006;4: 1388–1395. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01952.x
104. Kato K, Martinez C, Russell S, Nurden P, Nurden A, Fiering S, et al. Genetic deletion of mouse platelet glycoprotein Ibbeta produces a Bernard-Soulier phenotype with increased alpha-granule size. *Blood*. 2004;104: 2339–44. doi:10.1182/blood-2004-03-1127
105. Ambrosio AL, Di Pietro SM. Storage pool diseases illuminate platelet dense granule biogenesis. *Platelets*. Taylor & Francis; 2017;28: 138–146. doi:10.1080/09537104.2016.1243789
106. Santiago Borrero PJ, Rodríguez-Pérez Y, Renta JY, Izquierdo NJ, Del Fierro L, Muñoz D, et al. Genetic testing for oculocutaneous albinism type 1 and 2 and Hermansky-Pudlak syndrome type 1 and 3 mutations in Puerto Rico. *J Invest Dermatol*. NIH Public Access; 2006;126: 85–90. doi:10.1038/sj.jid.5700034
107. Starcevic M, Dell'Angelica EC. Identification of Snapin and Three Novel Proteins (BLOS1, BLOS2, and BLOS3/Reduced Pigmentation) as Subunits of Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex-1 (BLOC-1). *J Biol Chem*. 2004;279: 28393–28401. doi:10.1074/jbc.M402513200
108. Augustin I, Rosenmund C, Südhof TC, Brose N. Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature*. Nature Publishing Group; 1999;400: 457–461. doi:10.1038/22768
109. Varoqueaux F, Sigler A, Rhee J-S, Brose N, Enk C, Reim K, et al. Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99: 9037–9042. doi:10.1073/pnas.122623799

110. Varoquaux F, Sons MS, Plomp JJ, Brose N. Aberrant Morphology and Residual Transmitter Release at the Munc13-Deficient Mouse Neuromuscular Synapse. *Mol Cell Biol.* 2005;25: 5973–5984. doi:10.1128/MCB.25.14.5973-5984.2005
111. Yang F, Dong A, Ahamed J, Sunkara M, Smyth SS. Granule cargo release from bone marrow-derived cells sustains cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;307: H1529-38. doi:10.1152/ajpheart.00951.2013
112. Gunay-Aygun M, Zivony-Elboum Y, Gumruk F, Geiger D, Cetin M, Khayat M, et al. Gray platelet syndrome: natural history of a large patient cohort and locus assignment to chromosome 3p. *Blood.* 2010;116: 4990–5001. doi:10.1182/blood-2010-05-286534
113. Raccuglia G. Gray platelet syndrome. A variety of qualitative platelet disorder. *Am J Med.* 1971;51: 818–28.
114. Nurden AT, Nurden P. The gray platelet syndrome: Clinical spectrum of the disease. *Blood Rev.* 2007;21: 21–36. doi:10.1016/j.blre.2005.12.003
115. White JG. Ultrastructural studies of the gray platelet syndrome. *Am J Pathol.* 1979;95: 445–62.
116. Breton-Gorius J, Vainchenker W, Nurden A, Levy-Toledano S, Caen J. Defective alpha-granule production in megakaryocytes from gray platelet syndrome: ultrastructural studies of bone marrow cells and megakaryocytes growing in culture from blood precursors. *Am J Pathol.* 1981;102: 10–9.
117. Gunay-Aygun M, Falik-Zaccai TC, Vilboux T, Zivony-Elboum Y, Gumruk F, Cetin M, et al. NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet α -granules. *Nat Genet.* Nature Publishing Group; 2011;43: 732–734. doi:10.1038/ng.883
118. Hope I. *C. elegans a practical approach.* Oxford Univ Press. 1999;
119. Weimer RM. Preservation of *C. elegans* tissue via high-pressure freezing and freeze-substitution for ultrastructural analysis and immunocytochemistry. *Methods Mol Biol.* 2006;351: 203–21. doi:10.1385/1-59745-151-7:203
120. Rostaing P, Weimer RM, Jorgensen EM, Triller A, Bessereau J-L. Preservation of Immunoreactivity and Fine Structure of Adult *C. elegans* Tissues Using High-pressure Freezing. *J Histochem Cytochem.* 2004;52: 1–12. doi:10.1177/002215540405200101
121. REYNOLDS ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* The Rockefeller University Press; 1963;17: 208–12.
122. Mastronarde DN. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J Struct Biol.* 2005;152: 36–51. doi:10.1016/j.jsb.2005.07.007
123. Dahmen T, Marsalek L, Marniok N, Turoňová B, Bogachev S, Trampert P, et al. The Ettention software package. *Ultramicroscopy.* 2016;161: 110–118. doi:10.1016/j.ultramic.2015.10.012
124. Rasband WS. *ImageJ.* Natl Institutes Heal Bethesda, Maryland, USA. 1997;

125. Ollion J, Cochenne J, Loll F, Escudé C, Boudier T. TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics*. Oxford University Press; 2013;29: 1840–1. doi:10.1093/bioinformatics/btt276
126. Schmid B, Schindelin J, Cardona A, Longair M, Heisenberg M. A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. *BMC Bioinformatics*. 2010;11: 274. doi:10.1186/1471-2105-11-274
127. Sommer C, Straehle C, Kothe U, Hamprecht FA. Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit. *Proc - Int Symp Biomed Imaging*. 2011; 230–233. doi:10.1109/ISBI.2011.5872394
128. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2015.
129. Oliphant TE. SciPy: Open source scientific tools for Python. *Comput Sci Eng*. 2007;9: 10–20. doi:10.1109/MCSE.2007.58
130. Raschka S. Python Machine Learning [Internet]. Packt Publishing; 2015.
131. Kotsiantis SB. Supervised Machine Learning: A Review of Classification Techniques. *Informatica*. 2007;31: 249–268. doi:10.1115/1.1559160
132. Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, et al. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *J Mach Learn Res*. 2012;12: 2825–2830. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
133. McKinney W. Data Structures for Statistical Computing in Python. *Proc 9th Python Sci Conf*. 2010;1697900: 51–56.
134. Ollion J, Cochenne J, Loll F, Escudé C, Boudier T. TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics*. 2013;29: 1840–1. doi:10.1093/bioinformatics/btt276
135. Kremer JR, Mastrorade DN, McIntosh JR. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol*. 1996;116: 71–76. doi:10.1006/jsbi.1996.0013
136. Gardun E, Wong-barnum M, Volkmann N, Ellisman MH. Segmentation of electron tomographic data sets using fuzzy set theory principles. 2008;162: 368–379. doi:10.1016/j.jsb.2008.01.017
137. Beites CL, Xie H, Bowser R, Trimble WS. The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat Neurosci*. 1999;2: 434–9. doi:10.1038/8100
138. Artalejo CR, Elhamedani A, Palfrey HC. Secretion: Dense-core vesicles can kiss-and-run too. *Curr Biol*. Cell Press; 1998;8: R62–R65. doi:10.1016/S0960-9822(98)70036-3
139. Tsuboi T, McMahon HT, Rutter GA. Mechanisms of dense core vesicle recapture following “Kiss and Run” (“Cavcapture”) Exocytosis in Insulin-secreting Cells. *J Biol Chem*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2004;279: 47115–24. doi:10.1074/jbc.M408179200

140. Rutter GA, Tsuboi T. Kiss and run exocytosis of dense core secretory vesicles. *Neuroreport*. 2004;15: 79–81.
141. Weber B, Tranfield EM, Höög JL, Baum D, Antony C, Hyman T, et al. Automated Stitching of Microtubule Centerlines across Serial Electron Tomograms. Yang Y, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2014;9: e113222. doi:10.1371/journal.pone.0113222
142. Markus EJ, Petit TL, LeBoutillier JC. Synaptic structural changes during development and aging. *Brain Res*. 1987;432: 239–48.
143. Shawe-Taylor J, Cristianini N. *Kernel Methods for Pattern Analysis*. Elements. 2004. doi:10.2277
144. Serra-Millàs M. Are the changes in the peripheral brain-derived neurotrophic factor levels due to platelet activation? *World J psychiatry*. Baishideng Publishing Group Inc; 2016;6: 84–101. doi:10.5498/wjp.v6.i1.84
145. Amin ND, Zheng Y-L, Kesavapany S, Kanungo J, Guszczynski T, Sihag RK, et al. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of human septin SEPT5 (hCDCrel-1) modulates exocytosis. *J Neurosci*. 2008;28: 3631–3643. doi:10.1523/JNEUROSCI.0453-08.2008
146. Kreutzberger AJB, Kiessling V, Liang B, Seelheim P, Jakhanwal S, Jahn R, et al. Reconstitution of calcium-mediated exocytosis of dense-core vesicles. *Sci Adv*. American Association for the Advancement of Science; 2017;3: e1603208. doi:10.1126/sciadv.1603208
147. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23: 177–189. doi:10.1016/j.blre.2009.04.001
148. Shen D, Wu G, Suk H-I. Deep Learning in Medical Image Analysis. *Annu Rev Biomed Eng*. NIH Public Access; 2017;19: 221–248. doi:10.1146/annurev-bioeng-071516-044442
149. Dorkenwald S, Schubert PJ, Killinger MF, Urban G, Mikula S, Svava F, et al. Automated synaptic connectivity inference for volume electron microscopy. *Nat Methods*. Nature Publishing Group; 2017;14: 435–442. doi:10.1038/nmeth.4206
150. Staffler B, Berning M, Boergens KM, Gour A, Smagt P van der, Helmstaedter M. SynEM, automated synapse detection for connectomics. *Elife*. eLife Sciences Publications, Ltd; 2017;6. doi:10.7554/eLife.26414

13 Lebenslauf

14 Publikationen

Aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen direkt hervorgegangen:

- 1) **Kaltdorf KV**, Schulze K, Helmprobst F, Kollmannsberger P, Dandekar T, Stigloher C. FIJI Macro 3D ART VeSElecT: 3D Automated Reconstruction Tool for Vesicle Structures of Electron Tomograms. Dyer E, editor. PLOS Comput Biol. Public Library of Science; 2017;13: e1005317.
- 2) **Kaltdorf KV**, Theiss M, Markert SM, Zhen M, Dandekar T, Stigloher C, Kollmannsberger P. Automated classification of synaptic vesicles in electron tomograms of *C. elegans* using machine learning. (eingereicht seit 08.03.2018 bei PLOS Computational Biology)

Weitere Publikationen an denen ich beteiligt war:

- 3) Brietz A, **Schuch KV**, Wangorsch G, Lorenz K, Dandekar T. Analyzing ERK 1/2 signalling and targets. Mol Biosyst. 2016;12: 2436–46.
- 4) Gabed N, Yang M, Kreft J, **Kaltdorf KV**, Baba Hamed MB, Drici H, Dandekar C, Liang C. Sticky community: The lactic acid bacteria isolate HD9B from dromedary's milk consists of tightly associated *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Enterococcus faecium* strains. (wird beim Journal „Scientific Reports“ neu eingereicht)

15 Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Zuallererst möchte ich mich bei meinen Betreuern Thomas Dandekar und Christian Stigloher bedanken. Ihr seid mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich konnte unglaublich viel von euch lernen, sowohl auf fachlicher Ebene als auch auf menschlicher Ebene. Ich bin sehr dankbar, dass ich das Glück hatte mit euch zu arbeiten.

Vielen Dank an Philip Kollmannsberger, du warst ein echter Glücksfall zur Unterstützung meiner Doktorarbeit. Du warst sowohl auf fachlicher als auch auf persönlicher Ebene eine Bereicherung für unser Team und dieses Projekt.

Vielen Dank an Maria Theiss, die im zweiten Teil des Projekts eine wichtige Rolle gespielt hat und dort eine hervorragende Lernkurve gezeigt hat.

Das Projekt hat von der Interdisziplinarität unseres Teams gelebt. Besonders schätze ich unseren Umgang miteinander, der von gegenseitigem Respekt, Anerkennung, dem Austausch von Ideen und konstruktiver Kritik gelebt hat. Ich werde unser Team stets in bester Erinnerung behalten. Vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit!

Vielen Dank an meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht hat und auf die ich immer zählen kann.

Ein Weiterer Dank gilt meiner Freundin Cora für die Unterstützung in stressigen Zeiten und weil ich mit ihr einfach stundenlang über Gott und die Welt reden kann.

Vielen Dank an meinen Mann Martin für das Korrekturlesen meiner Arbeit und dafür, dass du mich stets unterstützt in allem was ich tue. Du bist mein Fels in der Brandung.