

# Super-Resolution-Mikroskopie zur Visualisierung und Quantifizierung von Glutamatrezeptoren und ADHS-assoziierten Proteinen

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

vorgelegt von  
**Sina Wäldchen**  
geboren in Buseck

Würzburg, 2019

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer

Gutachter: Prof. Dr. Robert J. Kittel

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Meinem geliebten Felix



# Zusammenfassung

Die Entwicklung hochauflösender Fluoreszenzmikroskopiemethoden hat die Lichtmikroskopie revolutioniert. Einerseits ermöglicht die höhere erzielte räumliche Auflösung die Abbildung von Strukturen, die deutlich unterhalb der beugungsbedingten Auflösungsgrenze liegen. Andererseits erhält man durch Einzelmoleküllokalisationsmikroskopiemethoden wie *d*STORM (Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) Informationen, welche man für quantitative Analysen heranziehen kann. Aufgrund der sich dadurch bietenden neuen Möglichkeiten, hat sich die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie rasant entwickelt und kommt mittlerweile zur Untersuchung einer Vielzahl biologischer und medizinischer Fragestellungen zum Einsatz. Trotz dieses Erfolgs ist jedoch nicht zu verleugnen, dass auch diese neuen Methoden ihre Nachteile haben. Dazu zählt die Notwendigkeit relativ hoher Laserleistungen, welche Voraussetzung für hohe Auflösung ist und bei lebenden Proben zur Photoschädigung führen kann.

Diese Arbeit widmet sich sowohl dem Thema der Photoschädigung durch Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie, als auch der Anwendung von *d*STORM und SIM (Structured Illumination Microscopy) zur Untersuchung neurobiologischer Fragestellungen auf Proteinebene.

Zur Ermittlung der Photoschädigung wurden lebende Zellen unter typischen Bedingungen bestrahlt und anschließend für 20–24 h beobachtet. Als quantitatives Maß für den Grad der Photoschädigung wurde der Anteil sterbender Zellen bestimmt. Neben der zu erwartenden Intensitäts- und Wellenlängenabhängigkeit, zeigte sich, dass die Schwere der Photoschädigung auch von vielen weiteren Faktoren abhängt und dass sich Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie bei Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse durchaus mit Lebendzellexperimenten vereinbaren lässt.

Ein weiteres Projekt in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert J. Kittel diente der Untersuchung der A- und B-Typ-Glutamatrezeptoren an der neuromuskulären Synapse von *Drosophila melanogaster* mittels *d*STORM. Dabei konnte eine veränderte Anordnung beider Rezeptortypen infolge synaptischer Plastizität beobachtet, sowie eine absolute Quantifizierung des A-Typ-Rezeptors durchgeführt werden.

Im Mittelpunkt eines zweiten Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch standen Cadherin-13 (CDH13) sowie der Glucosetransporter Typ 3 (GluT3), welche beide mit der Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung in Verbindung gebracht werden. CDH13 konnte mittels SIM in serotonergen Neuronen, sowie radiären Gliazellen der dorsalen Raphekerne des embryonalen Mausgehirns nachgewiesen werden. Die Rolle von GluT3 wurde in aus

## *Zusammenfassung*

induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierten Neuronen analysiert, welche verschiedene Kopienzahlvariation des für GluT3-codierenden *SLC2A3*-Gens aufwiesen. Die Proteine GluT3, Bassoon und Homer wurden mittels *d*STORM relativ quantifiziert. Während die Deletion des Gens zu einer erwartenden Verminderung von GluT3 auf Proteinebene führte, hatte die Duplikation keinen Effekt auf die GluT3-Menge. Für Bassoon und Homer zeigte sich weder durch die Deletion noch die Duplikation eine signifikante Veränderung.

# Abstract

The emergence of super-resolution microscopy techniques caused a revolution of light microscopy. On the one hand, the higher achieved structural resolution allows for the visualization of structures below the diffraction limit. On the other hand, single molecule localization microscopy methods like *d*STORM (Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) provide information that can be used for quantitative analysis. The new possibilities, offered by these approaches, lead to rapid development of the same and by now they are applied to investigate a broad range of biological and medical questions. Besides this success, it can't be denied, that these methods also have some disadvantages like the necessity of relative high laser intensities that are needed for the high resolution and might cause photodamage in living samples.

This work deals with the issue of photodamage induced by single molecule localization microscopy methods as well as the examination of neurobiological problems on protein level by the usage of *d*STORM and SIM (Structured Illumination Microscopy).

To identify photodamage, living cells were irradiated at typical conditions and were observed for 20–24 h afterwards. As a quantitative measure for the severity of photodamage, the fraction of dying cells was determined. Besides the expected dependency on intensity and wavelength, a lot of other factors showed to affect the severity. It could be demonstrated that single molecule localization microscopy can be combined with live-cell imaging if one takes those results into account.

Another project in cooperation with the group of Prof. Dr. Robert J. Kittel aimed for the investigation of A- and B-type Glutamate receptors at the neuromuscular junction of *Drosophila melanogaster* via *d*STORM. Thus, an altered arrangement of both receptor types could be observed and A-type receptors could be quantified absolutely.

A second cooperation project with the group of Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch focused on cadherin-13 (CDH13) and glucose transporter 3 (GluT3), which are connected with attention deficit hyperactivity disorder. CDH13 could be detected in serotonergic neurons and radial glial cells of dorsal raphe in embryonic mouse brains using SIM. The role of GluT3 was analyzed in neurons, differentiated from induced pluripotent stem cells, which possessed different copy-number variations of the gene *SLC2A3*, which codes for GluT3. Proteins GluT3, Bassoon and Homer were quantified relatively using *d*STORM. While the deletion of the gene resulted in an expected decrease of GluT3 at the protein level, the duplication didn't affect the amount of GluT3. In the case of Homer and Bassoon, neither the deletion, nor the duplication caused any significant changes.





# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>vii</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Theoretischer Hintergrund</b>	<b>5</b>
2.1. Lichtmikroskopie und Auflösung . . . . .	5
2.1.1. Auflösungsvermögen der konventionellen Lichtmikroskopie . .	6
2.1.2. Grundlagen der Fluoreszenz . . . . .	9
2.1.3. Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	10
2.2. Angewandte hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	15
2.2.1. Fluoreszenzmarkierung . . . . .	15
2.2.2. Lebendzellmessungen und Photoschädigung . . . . .	21
2.2.3. Quantifizierung . . . . .	23
2.3. Hochauflösung zur Beantwortung neurobiologischer Fragestellungen .	24
2.3.1. Synapsen . . . . .	24
2.3.2. Neuromuskuläre Synapse von <i>Drosophila melanogaster</i> . . . .	27
2.3.3. Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) . . .	28
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>33</b>
3.1. Biologische Proben . . . . .	33
3.1.1. Immortalisierte Zelllinien . . . . .	33
3.1.2. Larven von <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	33
3.1.3. Gehirnschnitte von Mäuseembryonen . . . . .	34
3.1.4. Menschliche Neurone aus induzierten pluripotenten Stammzellen . . . . .	34
3.2. Molekülmarkierungen . . . . .	36
3.2.1. Markierungsverfahren . . . . .	36
3.2.2. Verwendete Fluorophore . . . . .	37
3.3. Datenaufnahme <i>d</i> STORM . . . . .	38
3.3.1. Aufbau <i>d</i> STORM Mikroskope . . . . .	38
3.3.2. Beleuchtungskonfiguration . . . . .	40
3.3.3. Datenaufnahme und -prozessierung <i>d</i> STORM . . . . .	42
3.4. Quantifizierung . . . . .	43
3.4.1. Absolute Quantifizierung des A-Typ Glutamatrezeptors von <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	44
3.4.2. Relative Quantifizierung von GluT3, Bassoon und Homer . .	46

3.5. Photoschädigungsexperimente . . . . .	49
3.6. SIM . . . . .	50
3.7. Verwendete Software . . . . .	51
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>53</b>
4.1. Photoschädigung durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie . . .	53
4.1.1. Intensitätsabhängigkeit . . . . .	54
4.1.2. Wellenlänge . . . . .	57
4.1.3. Dosis, kontinuierliche und gepulste Bestrahlung . . . . .	58
4.1.4. Erstarrte Zellen - Fixierung durch Bestrahlung . . . . .	60
4.1.5. Photoschädigung durch hochauflösende Fluoreszenzmikro- skopie - Diskussion . . . . .	61
4.2. GluR der NMJ von <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	66
4.2.1. Räumliche Anordnung von GluRIIA und GluRIIB . . . . .	66
4.2.2. Quantifizierung der A-Typ-Glutamatrezeptoren pro PSD . .	68
4.2.3. Glutamatrezeptoren der NMJ von <i>Drosophila melanogaster</i> - Diskussion . . . . .	70
4.3. CDH13 und GluT3 im Zusammenhang mit ADHS . . . . .	72
4.3.1. CDH13 und 5-HT in dorsalen Raphekernen des embryonalen Mausgehirns. . . . .	73
4.3.2. Charakterisierung aus humanen iPS-Zellen differenzierter se- rotonerger Neurone . . . . .	75
4.3.3. Relative Quantifizierung von GluT3, Bassoon und Homer in aus iPS-Zellen differenzierten Neuronen mit verschiedenen Kopienzahlvariationen des <i>SLC2A3</i> -Gens . . . . .	77
4.3.4. CDH13 und GluT im Zusammenhang mit ADHS - Diskussion	84
<b>5. Fazit und Ausblick</b>	<b>87</b>
<b>A. Ergänzende Abbildungen und Tabellen</b>	<b>93</b>
<b>B. Abkürzungen</b>	<b>97</b>
<b>C. Tabellenverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>D. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>Danksagung</b>	<b>117</b>

# 1 | Einleitung

Man braucht nichts im Leben  
zu fürchten, man muss nur  
alles verstehen.

---

*(Marie Curie)*

In diesem Zitat der ersten Nobelpreisträgerin spiegelt sich das Streben der Menschheit nach umfassendem Wissen und damit die stärkste Antriebskraft der Wissenschaft wieder. Seit dem Altertum versuchen Menschen die sie umgebende Welt zu verstehen und die gewonnenen Kenntnisse zu nutzen. Ohne diesen nie endenden Forschungsdrang wäre die Welt heute eine andere. Wir wären immer noch der ständigen Gefahr tödlicher Infektionskrankheiten ausgesetzt. Es gäbe keine Elektrizität, keine modernen Verkehrsmittel, keine Globalisierung und schon gar keine Raumfahrt. Natürlich ist es unsinnig zu behaupten, die Wissenschaft hätte nur Gutes zu Tage gefördert. Ohne sie wären uns Atomwaffen und Klimawandel erspart geblieben und Diskussionen über Gentechnik, Tierversuche oder Biowaffen wären nie aufgekommen. Im Großen und Ganzen möchte aber wohl kaum jemand auf moderne Technologien und enorme Fortschritte in der Medizin verzichten.

Gerade letztere wurden insbesondere durch die Erfindung des Mikroskops ermöglicht und vorangetrieben, denn erst durch das Mikroskop konnten Zellen und Krankheitserreger entdeckt und somit Krankheitsursachen erkannt, untersucht und schließlich behandelt werden. Der Begriff des Mikroskops existiert wahrscheinlich seit 1625 und setzt sich aus den griechischen Wörtern mikros (klein) und skopein (sehen) zusammen. [MW15]

Lange Zeit kamen nur einfache, also einlinsige Mikroskope zum wissenschaftlichen Einsatz, obwohl das aus Okular und Objektiv zusammengesetzte Mikroskop, wie wir es heute kennen, bereits erfunden war. Der Grund hierfür waren unzureichende optische und mechanische Eigenschaften, welche vor allem in zusammengesetzten Mikroskopen zu starken Beeinträchtigungen der Abbildungsqualität führten. Erst die Beseitigung sphärischer und chromatischer Aberrationen verhalf dem zusammengebauten Mikroskop im 19. Jahrhundert zum Durchbruch. [Küh+18; MW15]

## 1. Einleitung

Die Mikroskopie wurde in den folgenden 200 Jahren stetig verbessert und es entwickelten sich neue lichtmikroskopische Methoden wie die Fluoreszenzmikroskopie, die konfokale Mikroskopie oder die Zwei-Photonen-Mikroskopie. Damit ließen sich immer komplexere und anspruchsvollere Fragestellungen beantworten. Bei allen Weiterentwicklungen blieb jedoch die Auflösung dieser Mikroskope aufgrund des Beugungslimits auf etwa die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts begrenzt. [MW15]

Natürlich gab man sich damit nicht zufrieden und es blieb nichts unversucht diese Auflösungsgrenze zu brechen. In den 1990er- und 2000er-Jahren begann schließlich die Entwicklung einer Reihe neuer Mikroskopietechniken, welche die Auflösungsgrenze zwar nicht brechen, sie aber durch verschiedene Strategien umgehen können und deshalb unter dem Begriff „hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie“ zusammengefasst werden. Die wichtigsten und bekanntesten dieser Methoden sind Structured Illumination Microscopy (SIM), Stimulated Emission Depletion Mikroskopie (STED Mikroskopie), Photo-activated Localization Microscopy (PALM), und (Direct) Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (*d*STORM). [Eva09]

Seit den Anfängen der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie hat sich das Feld in kürzester Zeit rasant entwickelt und Einzug in Biologie und Medizin erhalten. Im Jahr 2008 wurde die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie von Nature Methods zur Methode des Jahres gewählt [09] und 2014 erhielten William Moerner, Eric Betzig und Stefan Hell für ihre Arbeit in diesem Bereich den Nobelpreis für Chemie.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht *d*STORM, welche unter den genannten Methoden mit bis zu 20 nm die höchste Auflösung erzielt. Um dies zu erreichen, macht man sich das Blinken organischer Fluorophore, also den Wechsel zwischen einem dunklen und einem fluoreszenten Zustand, zunutze. Indem man ausreichend viele Fluorophore in den dunklen Zustand versetzt, sind die verbleibenden fluoreszenten Moleküle ausreichend weit voneinander entfernt, um getrennt wahrgenommen werden zu können. Nimmt man nun eine genügend lange Zeitserie auf, bei welcher in jedem Einzelbild stochastisch andere Farbstoffe fluoreszieren, detektiert man über die Zeit alle in der Probe vorhandenen Fluorophore. Diese können anschließend mathematisch lokalisiert und die Lokalisationen dann zu einem Bild rekonstruiert werden. [Hei+08] Die Datenerfassung mit Einzelmolekülsensitivität bringt jedoch nicht nur eine verbesserte Auflösung mit sich, sondern auch die Möglichkeit die aufgenommenen Daten quantitativ zu analysieren [Ehm+14].

Trotz der vielen Vorteile, welche neue Mikroskopietechniken wie *d*STORM bieten, sollte man nie aufhören, gewonnene Daten kritisch bezüglich ihrer Richtig-

keit zu hinterfragen. Jede Methode bringt Stärken und Schwächen mit sich und bei falscher Anwendung können beispielsweise Artefakte [Bur+15] entstehen oder andere Probleme auftreten. Im Zusammenhang mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie kommen in der Regel hohe Bestrahlungsintensitäten zum Einsatz, die zur Photoschädigung führen können [Bir17]. Aus diesem Grund ist es wichtig dieses Problem bei Lebendzellexperimenten im Hinterkopf zu behalten und auszuschließen oder zu minimieren. Bereits während meiner Masterarbeit konnte ich zeigen, dass die Bestrahlung, welche typischerweise bei *d*STORM oder PALM zum Einsatz kommt, unter Umständen zu enormen phototoxischen Effekten führen kann [Wäl13]. Diese Versuche wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit fortgeführt und ausgeweitet. Aufgrund der dabei erhaltenen Ergebnissen wurden die weiteren *d*STORM-Untersuchungen, die Bestandteil zweier Kooperationsprojekte waren, an fixierten Proben durchgeführt.

Das erste dieser Projekte, welches in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert J. Kittel erfolgte, widmete sich der neuromuskulären Synapse (NMJ) von *Drosophila melanogaster*, welche ein beliebtes Modellsystem zur Untersuchung glutamaterger Synapsen ist [DiA06]. Mittels *d*STORM wurden die Glutamaterezeptortypen A und B analysiert, welche sich in der postsynaptischen Verdichtung (PSD) der NMJ finden. A- und B-Typ-Rezeptoren unterscheiden sich in ihren physiologischen Eigenschaften, weshalb die Zusammensetzung beider Typen innerhalb der PSD eine wichtige Rolle für die synaptische Plastizität spielt [DiA06]. Diese könnte sich auch in einer veränderten räumlichen Anordnung beider Rezeptortypen innerhalb der PSD widerspiegeln. Im Fokus dieses Projekts standen deshalb die Charakterisierung der räumlichen Anordnung nach elektrischer Stimulation, sowie die Quantifizierung des A-Typ-Rezeptors.

Auch bei der Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS), einer der häufigsten psychiatrischen Störungen, sucht man auf neurobiologischer Ebene nach den Ursachen. Während des zweiten Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch standen deshalb die mit ADHS-assoziierten Proteine Cadherin-13 (CDH13, [Les+08]) und Glucosetransporter Typ 3 (GluT3, [Les+11]), sowie der Neurotransmitter Serotonin (5-HT, [She+05]) im Mittelpunkt. CDH13 wird eine wichtige Funktion bei der Regulation von Zellmigration, Neuronenwachstum und Axonführung beigemessen [Phi+09]. Mittels SIM wurde das Vorkommen von CDH13 in serotonergen Neuronen der dorsalen Raphekernen im embryonalen Mausgehirn untersucht. *d*STORM wurde genutzt, um die Rolle von GluT3 im Zusammenhang mit ADHS näher zu beleuchten. Dieser Transporter spielt

## 1. Einleitung

eine wichtige Rolle im Glucosemetabolismus des Gehirns [Sim+08] und es konnte gezeigt werden, dass ADHS-Patienten verschiedene Kopienzahlvariationen des für GluT3-codierenden *SLC2A3*-Gens tragen [Les+11]. Um die Auswirkungen dieser Kopienzahlvariationen näher zu beleuchten, wurden aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte Neurone untersucht, welche eine Deletion oder Duplikation des Gens aufweisen. GluT3, sowie die Synapsenproteine Homer und Bassoon wurden in diesen Zellen relativ quantifiziert.

Ich hoffe, dass diese Arbeit einerseits durch den Einsatz von *d*STORM und SIM in den beschriebenen Kooperationsprojekten zur Wissenserweiterung beitragen konnte und andererseits das oft vernachlässigte Thema Photoschädigung ein wenig mehr in den Vordergrund rücken und Möglichkeiten aufzeigen konnte, Lebendzelleexperimente und hochauflösende Mikroskopie zu kombinieren ohne Photoschädigung in Kauf zu nehmen.

## 2 | Theoretischer Hintergrund

### 2.1. Lichtmikroskopie und Auflösung

Die Mikroskopie ermöglicht es dem Menschen kleine, für das Auge nicht mehr wahrnehmbare Dinge sichtbar zu machen und zu untersuchen. Gerade in der Biologie ist sie deshalb längst nicht mehr wegzudenken und mikroskopische Methoden werden fortwährend weiterentwickelt und verbessert.

Die ersten Lichtmikroskope wurden vor etwa 400 Jahren von holländischen Optikern entwickelt und bereits damals wurden diese einfachen Mikroskope genutzt um biologische Proben zu untersuchen. So entdeckte Antoni van Leeuwenhoek im 17. Jahrhundert beispielsweise die Erythrozyten, die Spermien, einzellige Lebewesen und die Fotorezeptoren der Retina. In den folgenden Jahrhunderten wurden vor allem Mechanik und Optik immer weiterentwickelt und somit das Vergrößerungs- und Auflösungsvermögen stetig vorangetrieben. Allerdings geriet man schließlich an einen Punkt, an dem sich die Auflösung und damit auch die sinnvolle Vergrößerung nicht weiter verbessern lies, da die Lichtmikroskopie aufgrund der Physik des Lichts für sichtbares Licht eine Auflösungsgrenze von etwa 200 nm aufweist. [MW15]

Als dann in den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts die Elektronenmikroskopie erfunden wurde, die eine deutlich höhere Auflösung von maximal 0,2 nm erzielen kann, hielt ein großer Teil der Wissenschaftsgemeinde die Entwicklung der Lichtmikroskopie für beendet. Glücklicherweise war dies ein Irrtum: Immer neue lichtmikroskopische Methoden wie beispielsweise die konfokale Laserscanning- oder die Zwei-Photonen-Mikroskopie wurden entwickelt und bieten neue Möglichkeiten komplexe biologische Fragestellungen zu untersuchen, welche die Elektronenmikroskopie nicht zu beantworten vermag. [MW15]

Ende des 20. Jahrhundert kam es dann zu einer Entwicklung, welche das Feld der Lichtmikroskopie noch einmal völlig veränderte: Verschiedene hochauflösende Mikroskopiemethoden wurden erfunden, welche die Auflösungsgrenze zwar nicht brechen, sie aber auf verschiedene Art und Weise umgehen und so eine Auflösung im nahezu molekularen Bereich erreichen können. [MW15]

### 2.1.1. Auflösungsvermögen der konventionellen Lichtmikroskopie

Unter dem Auflösungsvermögen eines Mikroskops versteht man die Fähigkeit nahe beieinander liegende Punkte so abzubilden, dass sie unterschieden werden können: Je höher das Auflösungsvermögen, desto enger dürfen die zu unterscheidenden Strukturen angeordnet sein. In der konventionellen Lichtmikroskopie ist das Auflösungsvermögen auf etwa die halbe Wellenlänge des Lichts begrenzt. Diese Auflösungsgrenze ist auf Beugungseffekte zurückzuführen und wurde unter anderem von Ernst Abbe und Lord Rayleigh untersucht und beschrieben.

**Abbe-Limit.** Ernst Abbe stellte sich die zu untersuchende Probe vereinfacht als eine Art optisches Gitter vor. Wird diese beleuchtet, kommt es am Präparat selbst zur Beugung und zur Entstehung eines Interferenzmusters in der hinteren Brennebene des Objektivs, welches ein zentrales Intensitätsmaximum, sowie dieses umgebende Nebenmaxima aufweist. Die Entfernung der Nebenmaxima vom Hauptmaximum hängt hierbei von der Probenbeschaffenheit und der Wellenlänge des verwendeten Lichts ab: Je enger die beugenden Strukturen im Präparat angeordnet sind und je längerwellig das genutzte Licht ist, desto größer ist der Abstand zwischen Nebenmaxima und Hauptmaximum. [Küh+18]

Um nun zwei Punkte einer Struktur auflösen zu können, müssen nach Abbe das Hauptmaximum und mindestens das erste Nebenmaximum in das Objektiv eindringen. Je mehr Nebenmaxima von dem Objektiv eingefangen werden, desto höher ist die Auflösung. Aus diesem Grund spielt der Öffnungswinkel des verwendeten Objektivs eine entscheidende Rolle für das Auflösungsvermögen des Mikroskops, denn durch einen großen Öffnungswinkel können auch Nebenmaxima, die unter einem großen Winkel einfallen, noch eingesammelt und somit feinere Strukturen aufgelöst werden. Weiterhin verbessert wird die Auflösung durch die Verwendung von Immersionsflüssigkeit zwischen Deckglas und Objektiv, deren Brechungsindex dem von Glas ähnelt, da dies die auftretende Brechung verringert und somit mehr Licht die Öffnung des Objektivs passieren kann. [Küh+18]

Zusammengefasst hängt das Auflösungsvermögen eines Mikroskops also von der Wellenlänge des verwendeten Lichts  $\lambda$ , dem Öffnungswinkel des Objektivs  $\alpha$ , sowie dem Brechungsindex des verwendeten Immersionsmediums  $n$  ab und der minimale Abstand  $d_A$  zweier Strukturen, die gerade noch aufgelöst werden können, lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$d_A = \frac{\lambda}{n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{NA} \quad (2.1)$$



Der Term  $n \sin \alpha$  ist auch als numerische Apertur  $NA$  eines Objektivs bekannt. [Küh+18]

Der durch diese Gleichung beschriebene Zusammenhang gilt für den theoretischen Fall einer punktförmigen Lichtquelle, die sich in der optischen Achse befindet und so zu einer geraden Beleuchtung der Probe führt. In der Praxis wird das Präparat jedoch flächig beleuchtet. Unter der Annahme, dass sich die flächige Beleuchtung aus einer großen Zahl punktförmiger Lichtquellen innerhalb und außerhalb der optischen Achse zusammensetzt, wird die zu untersuchende Struktur in diesem Fall sowohl gerade als auch allseitig schief beleuchtet. Durch die schiefe Beleuchtung gelangen weitere Nebenmaxima in die Öffnung des Objektivs, sodass sich die Auflösung im Idealfall bei extrem schiefer Beleuchtung verdoppelt und sich folgende Formel ergibt: [Küh+18]

$$d_A = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.2)$$

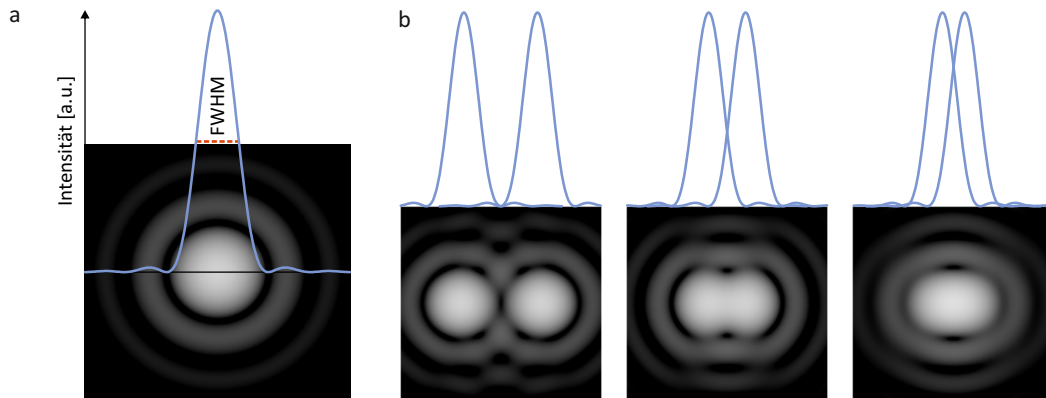
**Rayleigh Kriterium.** Während Ernst Abbe bei seiner Definition der Auflösungsgrenze von einem Präparat ausgeht, welches durch eine Lichtquelle extern beleuchtet wird, stammt das detektierte Licht in der Fluoreszenzmikroskopie aus der Probe selbst. Das Fluorophor als selbstleuchtender Punktemitter wird aufgrund von Beugungseffekten an einer kreisförmigen Öffnung (Objektivöffnung) nicht als Punkt sondern als eine von konzentrischen Ringen umgebene Kreisscheibe abgebildet. Dieses Muster wurde erstmals von George Biddell Airy mathematisch beschrieben und das zentrale Hauptmaximum wird als Beugungsscheibchen oder auch als Airy-Scheibchen bezeichnet. Bei den umgebenden Ringen handelt es sich um die auftretenden Nebenmaxima. [Bor16; Dem09]

Die Helligkeitsverteilung des Beugungsmusters lässt sich mit der sogenannten Punktspreizfunktion (PSF) darstellen, die in [Abbildung 2.1a](#) gezeigt ist und deren Aussehen von der emittierten Wellenlänge  $\lambda$  sowie der numerischen Apertur des Objektivs  $NA$  abhängt. Der Durchmesser  $D$  des Beugungsscheibchens entspricht dem Abstand der beiden Minima erster Ordnung und lässt sich mit folgender Formel bestimmen:

$$D = \frac{1,22\lambda}{NA} \quad (2.3)$$

Der Vorfaktor 1,22 stammt aus der Berechnung der Lage des ersten Minimums bei der Beugung an kreisförmigen Blenden, auf welche hier nicht näher eingegangen werden soll. [Bor16; Dem09]

## 2. Theoretischer Hintergrund



**Abbildung 2.1.: Rayleigh Kriterium.** (a) Das Beugungsmuster eines Punktemitters zeichnet sich durch das zentrale Airy-Scheibchen (Hauptmaximum) aus, welches von konzentrischen Ringen (Nebenmaxima) umgeben ist. Die Helligkeitsverteilung durch das Zentrum dieses Beugungsbildes wird durch die PSF (blaue Kurve) wiedergegeben und die Breite der PSF bei 50% des Intensitätsmaximums entspricht der Halbwertsbreite (FWHM). (b) Betrachtet man zwei benachbarte Punktemitter, müssen diese einen gewissen Mindestabstand zueinander haben, um einzeln erkennbar zu sein. Hier gezeigt sind jeweils zwei Punktemitter, die deutlich trennbar (links), nach dem Rayleigh-Kriterium gerade noch auflösbar (Mitte) und nicht mehr unterscheidbar (rechts) sind. Die Beugungsbilder in (a) und (b) sind berechnet und die Graustufenverteilung ist so angepasst, dass die Ringe gut sichtbar sind.

Hat man nun zwei benachbarte Punktemitter, sind diese laut dem nach Lord Rayleigh benannten Rayleigh-Kriterium gerade dann noch trennbar, wenn sie so weit von einander entfernt sind, dass das erste Minimum des Beugungsmusters des einen Emitters mit dem Hauptmaximum des zweiten Emitters zusammenfällt (siehe [Abbildung 2.1b](#)). Aus [Gleichung 2.3](#) ergibt sich für den minimal auflösbaren Abstand  $d_R$  also: [[Bor16](#); [Dem09](#)]

$$d_R = \frac{0,61\lambda}{NA} \quad (2.4)$$

**Halbwertsbreite.** Wie bereits erwähnt, kann die PSF herangezogen werden, um die Helligkeitsverteilung des Beugungsbildes eines Punktemitters zu beschreiben. Eine wichtige Kenngröße dieser Funktion ist ihre Halbwertsbreite (FWHM von englisch „Full Width at Half Maximum“), also die Breite der PSF bei 50% des Intensitätsmaximums (siehe [Abbildung 2.1a](#)). Diese lässt sich anhand der emittierten Wellenlänge  $\lambda$  und der numerischen Apertur des Objektivs  $NA$  mit der folgenden

Formel berechnen:

$$d_{\text{FWHM}} = \frac{0,51\lambda}{NA} \quad (2.5)$$

Des Weiteren lässt sie sich experimentell recht einfach messen, weshalb sie gerne zur Bestimmung des Auflösungsvermögens eines Mikroskops herangezogen wird. [Bor16]

Betrachtet man alle drei Methoden zur Ermittlung der Auflösungsgrenze, stellt man fest, dass sie sich in ihrem Ergebnis nicht deutlich voneinander unterscheiden und dass man mit einem konventionellen Lichtmikroskop, dessen Objektiv typischerweise eine numerische Apertur von  $NA = 1,4$  aufweist und bei der Verwendung einer mittleren Wellenlänge des sichtbaren Spektrums von  $\lambda = 550 \text{ nm}$ , Strukturen bis zu einem minimalen Abstand von etwa  $200 \text{ nm}$  auflösen kann. [Küh+18]

### 2.1.2. Grundlagen der Fluoreszenz

Viele heute in der Biologie verwendeten Methoden basieren auf dem physikalischen Phänomen der Fluoreszenz, so auch die Fluoreszenzmikroskopie, welche zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist.

Fluoreszenz ist eine Form der Lumineszenz, unter welcher man die Emission von Licht, welche auf einen elektronisch angeregten Zustand zurückzuführen ist, versteht. Eine zweite Form der Lumineszenz ist die Phosphoreszenz. Beide Formen unterscheiden sich durch die Art des angeregten Zustandes aus welchem sie hervorgehen. [Lak06]

Die zugrundeliegenden Prozesse der Fluoreszenz und Phosphoreszenz lassen sich in dem nach Professor Aleksander Jablonski benannten Jablonski-Diagramm (Abbildung 2.2a) veranschaulichen. Ein sich im Grundzustand ( $S_0$ ) befindendes Molekül kann durch die Absorption von Licht in einen elektronisch angeregten Zustand ( $S_1$  oder  $S_2$ ) versetzt werden, wobei es jeweils energetisch verschiedene Schwingungszustände einnehmen kann. Durch innere Umwandlung (IC von englisch „internal conversion“) gelangen die Moleküle strahlungsfrei in den energetisch niedrigsten Schwingungszustand von  $S_1$ , von wo sie dann meist unter Emission eines Photons in den Grundzustand  $S_0$  zurückkehren. Bei dieser Rückkehr in den Grundzustand spricht man von Fluoreszenz. [Lak06]

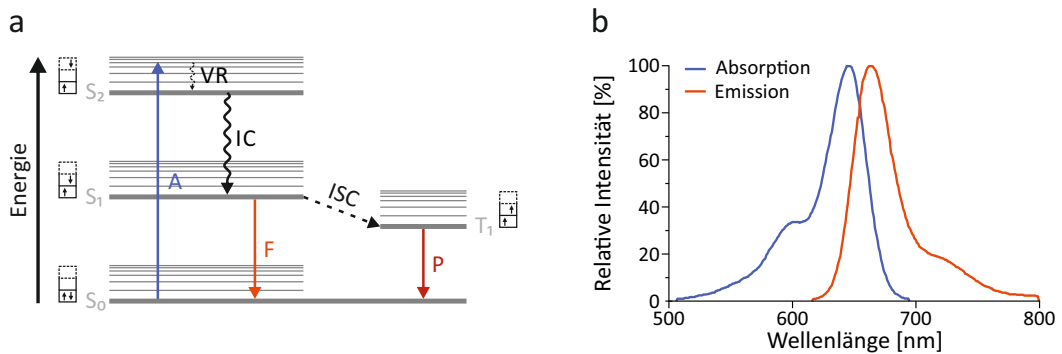
Seltener kommt es ausgehend vom  $S_1$ -Zustand zu einer Spinumkehr und somit zum Übergang in den Triplettzustand  $T_1$ , was als Interkombination (von englisch „intersystem crossing“) bezeichnet wird. Kehrt das Molekül aus dem Triplettzu-

## 2. Theoretischer Hintergrund

stand in den Grundzustand zurück, kommt es zur Phosphoreszenz. [Lak06]

Während sich angeregte Singulettzustände durch antiparallel ausgerichtete Spins auszeichnen, sind die Spins der Triplettzustände parallel ausgerichtet. Daraus resultierend ist die Rückkehr aus dem  $S_1$ -Zustand in den Grundzustand (Fluoreszenz) spinerlaubt und erfolgt sehr schnell ( $10^8 \text{ s}^{-1}$ ), während Phosphoreszenz spinverboten ist und deutlich langsamer ( $10^3\text{-}10^0 \text{ s}^{-1}$ ) abläuft. [Lak06]

Betrachtet man die Energie des absorbierten und emittierten Lichts, beobachtet man ein Phänomen, das nach seinem Entdecker Sir George Gabriel Stokes benannt ist, die sogenannte Stokes-Verschiebung (Abbildung 2.2b). Nach dieser ist die Energie der Emission typischerweise niedriger als die der Absorption und das Fluoreszenzlicht demzufolge längerwellig als das anregende Licht. Gründe für diesen Effekt sind unter anderem vibronische Relaxation (VR) und innere Umwandlung. [Lak06]



**Abbildung 2.2.: Grundlagen der Fluoreszenz.** (a) Das Jablonski-Diagramm zeigt die Singulettzustände  $S_i$  und den Triplettzustand  $T_1$  (dicke Linien) mit ihren verschiedenen Schwingungszuständen (dünne Linien). Die Ausrichtung der Spins in den jeweiligen Zuständen wird links bzw. rechts des Diagramms angedeutet. Durch die Absorption (A) eines Photons wird das Fluorophor in einen angeregten Zustand versetzt. Aufgrund vibronischer Relaxation (VR) und innerer Umwandlung (IC) gelangt es strahlungsfrei in den energetisch niedrigsten Schwingungszustand von  $S_1$ . Von hier aus kehrt es entweder durch Fluoreszenz (F) in den Grundzustand  $S_0$  zurück oder erreicht durch Interkombination (ISC) den angeregten Triplettzustand  $T_1$ . Durch Phosphoreszenz (P) kann die Rückkehr von  $T_1$  in den Grundzustand erfolgen. (b) Absorptions- und Emissionsspektrum von Cy5 zeigen die sogenannte Stokes-Verschiebung: Das emittierte (Fluoreszenz-)Licht ist längerwellig als das Anregungslicht.

### 2.1.3. Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt sicherlich eine der wichtigsten Methoden in den modernen Lebenswissenschaften dar. Biologische Zielstrukturen werden hierbei spezifisch mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert und heben sich dadurch deutlich

von der restlichen (häufig kontrastarmen) Probe ab. Durch die Verwendung von Fluorophoren mit verschiedenen Absorptions- und Emissionsspektren lassen sich gleichzeitig mehrere Strukturen färben, sodass man beispielsweise Kollokalisierungen oder Interaktionen untersuchen kann. Außerdem ist es möglich unfixierte Proben zu verwenden, wodurch sich biologische Prozesse in der lebenden Probe beobachten lassen. Hier spielt die Fluoreszenzmikroskopie also ihre Stärken gegenüber der höher auflösenden Elektronenmikroskopie aus, welche auf fixierte Proben angewiesen ist, nur in sehr geringem Umfang eine spezifische Markierung ermöglicht und auch einer deutlich aufwendigeren Probenpräparation bedarf.

Mit dem Aufkommen hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie, die häufig auch als Super-Resolution-Mikroskopie bezeichnet wird, wurde es schließlich möglich die Vorteile der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie mit einer deutlich verbesserten Auflösung zu kombinieren. Die drei weitverbreitetsten und erfolgreichsten Methode, die hier genannt werden sollten, sind (*d*)STORM, SIM und STED Mikroskopie [SHJ17; Sch+19; TVE16]. Sie umgehen auf unterschiedliche Art und Weise die Auflösungsgrenze konventioneller Lichtmikroskopie und erreichen so eine laterale Auflösung von bis zu 20 nm ((*d*)STORM), 100 nm (SIM) beziehungsweise 50 nm (STED) [Sch+19]. Im Folgenden werden die Prinzipien dieser drei Anwendungen kurz beschrieben, wobei *d*STORM am ausführlichsten behandelt wird, da es Mittelpunkt dieser Arbeit ist.

### Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (*d*STORM)

*d*STORM [Hei+08] gehört zu den Methoden der Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie (SMLM von englisch „Single Molecule Localization Microscopy“), zu welchen auch STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy [RBZ06]), PALM (Photo-activated Localization Microscopy [Bet+06]) und GSDIM (Ground State Depletion Microscopy followed by Individual molecule return [Föl+08]) zählen. Allen gemeinsam ist, dass es sich um stochastische Verfahren handelt, bei welchen einzelne Moleküle mathematisch sehr genau lokalisiert werden können und das endgültige hochaufgelöste Bild durch Datenrekonstruktion entsteht.

Wie in [Unterabschnitt 2.1.1](#) erläutert, lässt sich das Beugungsmuster, welches bei der mikroskopischen Abbildung eines einzelnen Fluorophors entsteht, durch seine PSF beschreiben. Das Zentrum dieser PSF kann mathematisch z.B. durch einen Gaußschen Fit berechnet und somit das Fluorophor sehr genau lokalisiert werden. Bei der Untersuchung einer biologischen fluoreszenz-gefärbten Probe findet man jedoch keinen einzelnen Emitter, sondern dicht markierte Zielstrukturen. Die Signale

## 2. Theoretischer Hintergrund

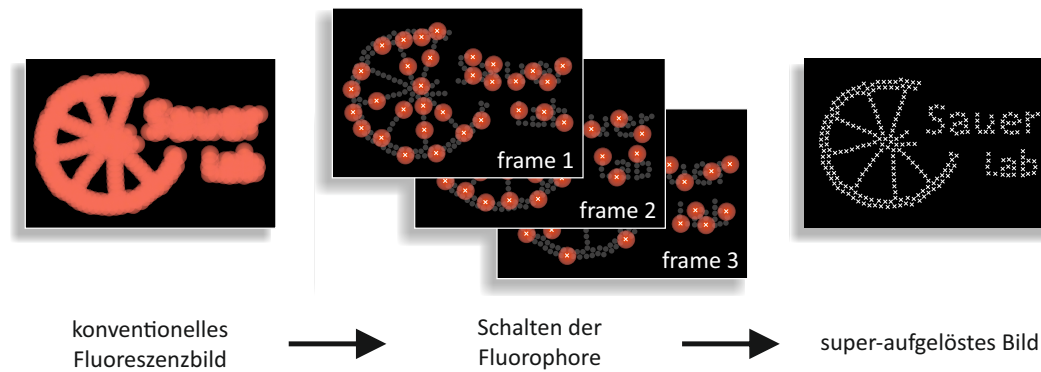
der Fluorophore überlappen zu stark, um diese noch räumlich voneinander trennen (siehe [Unterabschnitt 2.1.1](#)) und genau lokalisieren zu können. In der Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie löst man dieses Problem, indem man immer nur einer geringen Anzahl an Fluorophoren erlaubt, Licht zu emittieren (AN-Zustand), während sich der Großteil der Moleküle in einem nicht fluoreszierenden AUS-Zustand befindet. Durch die Wahl optimaler Bedingungen sind die Moleküle, die sich gerade im fluoreszierenden AN-Zustand befinden, so weit voneinander entfernt, dass sie räumlich deutlich unterscheidbar und ihr Zentrum somit genau berechenbar ist. Wenn sich nun stochastisch zu jedem Zeitpunkt andere Fluorophore im AN-Zustand befinden und man so durch die Aufnahme einer Zeitserie nach und nach alle oder zumindest die meisten Fluorophore lokalisiert, kann man die erhaltenen Lokalisationen schließlich zu einem supraaufgelösten Bild rekonstruieren (siehe [Abbildung 2.3](#)). [\[MW15\]](#)

Für die automatische Lokalisation der Fluorophore und die Rekonstruktion des finalen Bildes gibt es mittlerweile eine ganze Reihe zugänglicher Software z.B. rapidSTORM oder ThunderSTORM, die unterschiedliche Stärken und Schwächen aufweisen. [\[Ove+14; Sag+18; van19; Wol+12\]](#)

Mit welcher Genauigkeit die einzelnen Fluorophore dabei lokalisiert werden können, wird durch die Lokalisationspräzision angegeben, welche im Wesentlichen von der Anzahl der detektierten Photonen  $N$  und der Standardabweichung der PSF  $\sigma$  abhängt und sich bei vernachlässigbarem Hintergrundsignal durch  $\frac{\sigma}{\sqrt{N}}$  annähern lässt [\[Hei+08; Mor+10\]](#). Die Lokalisationspräzision bestimmt zusammen mit der Markierungsdichte der Probe die theoretisch erreichbare räumliche Auflösung [\[SH17\]](#). Für die Markierungsdichte gilt hierbei, dass der Abstand benachbarter Fluorophoren mindestens zweimal kleiner sein muss als die gewünschte strukturelle Auflösung, um das sogenannte Nyquist-Shannon-Abtasttheorem zu erfüllen [\[vHS12\]](#).

### **Structured Illumination Microscopy (SIM)**

SIM basiert auf der Verwendung strukturierter Beleuchtung und nutzt die dadurch auftretenden Interferenzeffekte, um eine verbesserte Auflösung zu erzielen. Überlagert man zwei feine Strukturen, beispielsweise hochfrequente Gitternetze, kommt es zur Entstehung von Interferenzmustern, welche deutlich gröber als die zugrundeliegenden Strukturen sind. Dieser Effekt wird auch als Moiré-Effekt bezeichnet. Stellt man sich nun eine Fluoreszenz-markierte Probe als feines und durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie nicht auflösbares Gitter vor und überlagert dieses mit einem bekannten Beleuchtungsmuster, erhält man ein Moiré-Muster, welches



**Abbildung 2.3.: Prinzip *d*STORM.** In einer dicht markierten Zielstruktur überlagern sich die Fluoreszenzsignale einzelner Emittter, sodass man diese in einem konventionellen Fluoreszenzbild nicht trennen und somit nicht auflösen kann. Bei *d*STORM wird dieses Problem umgangen, indem man sich das Photoschalten organischer Fluorophore zunutze macht. Man erlaubt zu jedem Zeitpunkt nur einem kleinen Teil der Fluorophore sich in einem fluoreszenten Zustand zu befinden, während der Rest in einem dunklen Zustand verharrt. Durch die Aufnahme einer Zeitserie mit mehreren Tausend Bildern detektiert man schließlich sämtliche Fluorophore, bestimmt mathematisch ihre genaue Position und rekonstruiert daraus ein supraufgelöstes Bild.

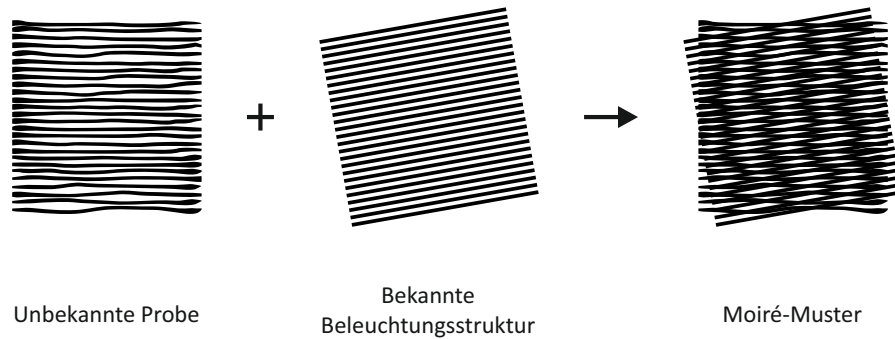
größer als die Probenstruktur und deshalb auflösbar ist (siehe [Abbildung 2.4](#)). Da das Beleuchtungsmuster bekannt ist, lässt sich nun von dem erhalten Moiré-Muster auf die Probenstruktur zurückrechnen. [[Gus00](#)]

### Stimulated Emission Depletion Mikroskopie (STED Mikroskopie)

Anders als (*d*)STORM und SIM ist STED Mikroskopie eine Rastermikroskopiemethode. Die zu untersuchende Probe wird also nicht komplett ausgeleuchtet, sondern mit einem Beleuchtungspunkt nach und nach abgetastet. Hierbei wirkt sich der Durchmesser des Beleuchtungspunktes entscheidend auf die Auflösung aus: Je kleiner die ausgeleuchtete Fläche, umso detailreicher kann die Probe abgebildet werden. Allerdings lässt sich der Durchmesser des Anregungsstrahls aufgrund von Beugung nicht beliebig verkleinern. Diese Beugungsbegrenzung wird in der STED Mikroskopie umgangen, indem man sich das Phänomen der stimulierten Emission zu nutze macht. [[MW15](#)]

Von stimulierter Emission spricht man, wenn ein durch die Absorption von Licht bereits angeregtes Fluorophor durch ein weiteres Lichtquant in den Grundzustand zurückgebracht wird bevor dies in Form von spontaner Fluoreszenz geschieht. Bei diesem Vorgang wird ebenfalls Licht ausgesandt, welches aber eine längere Wellenlänge aufweist als das Fluoreszenzlicht, sodass es von diesem unterschieden werden

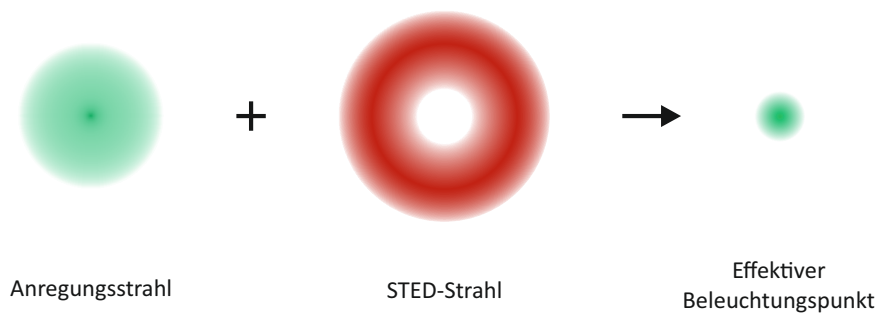
## 2. Theoretischer Hintergrund



**Abbildung 2.4.: Prinzip SIM.** Die Auflösungsverbesserung durch SIM beruht auf dem sogenannten Moiré-Effekt. Durch die Überlagerung der durch konventionelle Lichtmikroskopie nicht auflösbaren Probe mit einem bekannten Beleuchtungsmuster kommt es zur Entstehung eines Moiré-Musters, welches gröber als die überlagerten Strukturen ist und deshalb aufgelöst werden kann. Von diesem Muster kann auf die unbekanntene Probenstruktur zurückgerechnet werden.

kann. [MW15]

Überlagert man nun den kreisförmigen beugungsbegrenzten Anregungsstrahl mit einem zweiten ringförmigen Strahl (STED Strahl) passender Wellenlänge, kann man den effektiven Beleuchtungspunkt verkleinern, indem die Fluoreszenz im Bereich des Rings durch stimulierte Emission verhindert wird (siehe [Abbildung 2.5](#)). Je höher die Intensität des verwendeten STED Strahls, desto kleiner ist die resultierende fluoreszierende Fläche und desto größer somit die Auflösung. [HW94]



**Abbildung 2.5.: Prinzip der STED Mikroskopie.** Bei der STED Mikroskopie wird der beugungsbegrenzte Anregungsstrahl mit einem sogenannten ringförmigen STED-Strahl überlagert. Durch stimulierte Emission im Bereich des Rings wird der effektive Beleuchtungspunkt verkleinert und die Auflösung so erhöht.



## 2.2. Angewandte hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie

### 2.2.1. Fluoreszenzmarkierung

Um Strukturen für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, werden sie mit Fluorophoren markiert. Es gibt eine Reihe ganz unterschiedlicher Fluorophorklassen, die zu diesem Zweck genutzt werden, denen aber allen gemeinsam ist, dass sie durch die Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge in einen angeregten Zustand versetzt werden und unter Emission längerwelliger Lichts (Fluoreszenz) in den Grundzustand zurückkehren (siehe [Unterabschnitt 2.1.2](#)).

**Fluoreszenzproteine.** Durch genetische Fusion (Transfektion, Transformation) können fluoreszierende Proteine genutzt werden um andere Proteine sehr spezifisch zu markieren. Allerdings können die Funktionsweise und das Expressionslevel des Zielproteins durch die Fusion mit dem Fluoreszenzprotein beeinflusst werden. [[Bir17](#)]

**Organische Fluorophore.** Mit organischen Fluorophoren lassen sich prinzipiell alle Arten von Molekülen färben, also neben Proteinen beispielsweise auch Nucleinsäuren, Oligosaccharide oder niedermolekulare Verbindungen. Zur Kopplung des Fluorophors an die Zielstruktur existieren mittlerweile eine Vielzahl an Methoden. Die bekannteste ist sicherlich immer noch die sogenannte direkte oder indirekte Immunfluoreszenz, bei welcher das Fluorophor an einen Antikörper gekoppelt ist, welcher dann direkt beziehungsweise indirekt über einen zweiten Antikörper spezifisch an das Zielprotein bindet. Andere Möglichkeiten der Markierung mit organischen Fluorophoren sind etwa die Verwendung von Protein-Tags, die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder bioorthogonale Methoden (Click-Chemie, unnatürliche Aminosäuren). Für einige Zellstrukturen und -organellen existieren auch Substanzen, welche spezifisch und direkt an diese binden und mit einem beliebigen Farbstoff gekoppelt werden können z.B. Phalloidin an filamentöses Aktin, Taxol an  $\beta$ -Tubulin oder DAPI an DNA, wobei letzteres selbst schon ein Fluoreszenzfarbstoff ist. [[TVE16](#)]

Die Prinzipien der für diese Arbeit relevanten Methoden werden im [Abschnitt 3.2](#) beschrieben.

### Eigenschaften der Fluorophore und Fluoreszenzmarkierungen

Jede Methode und jede biologische Fragestellung bringt unterschiedliche Anforderungen an die zum Einsatz kommenden Fluorophore und Markierungsmethoden mit sich. Wichtige photophysikalische Eigenschaften von Fluorophoren, vor allem für die verschiedenen hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopiemethoden, sind Helligkeit, Photostabilität, Schaltbarkeit, sowie Absorptions- und Emissionswellenlängen. Aber auch die Verträglichkeit der Färbung mit lebenden Proben, die Größe von Fluorophor und Fluoreszenzmarkierung, bekannte Mengenverhältnisse von Fluorophor zu Zielstruktur und die Mehrfarben-Kompatibilität können die Wahl der Markierung beeinflussen.

SIM ist prinzipiell mit allen Fluorophoren kompatibel, die für konventionelle Fluoreszenzmikroskopie geeignet sind, wodurch sich SIM sehr gut für Mehrfarben-Bilder eignet. Auch bei STED ist ein breites Spektrum an Fluorophoren nutzbar, da prinzipiell jedes Fluorophor zur stimulierten Emission fähig ist. Für möglichst hohe Auflösung werden allerdings Fluorophore benötigt, welche bei hohen Intensitäten des STED Strahls photostabil sind. Für (*d*)STORM und PALM werden schaltbare Fluorophore mit einer möglichst hohen Photonenausbeute benötigt, um eine hohe Lokalisationsgenauigkeit und Auflösung zu erreichen (siehe [Abschnitt 2.1.3](#)). [[HBZ10](#); [TVE16](#)]

Im Folgenden soll auf die für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie wichtigsten Eigenschaften eingegangen werden.

**Helligkeit.** Die Helligkeit eines Fluorophors spiegelt die Anzahl der ausgesendeten Photonen wider. Sie spielt gerade für die hochauflösende Mikroskopie eine wichtige Rolle, da die erzielte Auflösung entscheidend von der Anzahl der detektierten Photonen abhängt (siehe [Abschnitt 2.1.3](#)). Außerdem ergibt sich durch eine höhere Intensität ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Organische Farbstoffe emittieren generell mehr Photonen als fluoreszierende Proteine. [[Bir17](#)]

**Photostabilität.** Die Photostabilität drückt aus, wie konstant ein Fluorophor Photonen emittiert. Eine hohe Photostabilität erlaubt längere Messungen und höhere Anregungsintensitäten. Auch hier sind organische Fluorophore fluoreszierenden Proteinen deutlich überlegen. [[Sch+19](#); [TVE16](#)]

**Schaltverhalten.** In der Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie hängt die Bildqualität entscheidend vom Schaltverhalten des Fluorophors ab z.B. wie effizient und wie häufig ein Fluorophor zwischen AN- und AUS-Zustand hin und her wechselt oder wie langlebig der AUS-Zustand ist. Das Schaltverhalten unterscheidet sich stark von Fluorophor zu Fluorophor und ist von einer Vielzahl an Faktoren abhän-

gig (siehe unten). Durch experimentelle Anpassung der Pufferbedingungen kann es optimiert werden. [Bir17]

**Spektrum.** Jedes Fluorophor weist ein einzigartiges Absorptions- und Emissionsspektrum auf, welches zu der jeweiligen mikroskopischen Anwendung passen muss. Das verwendete Mikroskop muss über eine geeignete Anregungslichtquelle, sowie passende Strahlteiler und Filter verfügen. Bei Mehrfarben-Aufnahmen ist darauf zu achten, dass die Spektren getrennt werden können. Auch Photoschädigung (Unterabschnitt 2.2.2), Autofluoreszenz und das Bleichen der Probe sind von der Bestrahlungswellenlänge abhängig und sollten wenn möglich bei der Wahl des Fluorophors berücksichtigt werden. [TVE16]

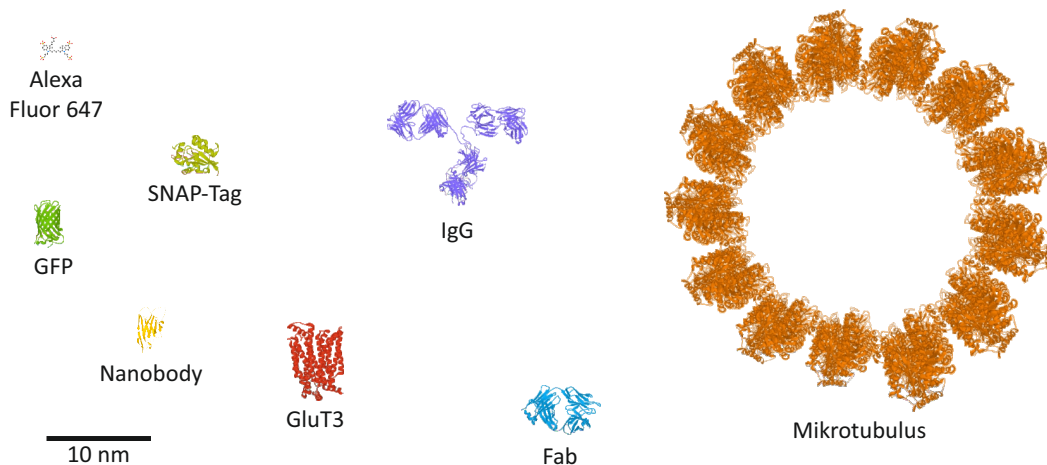
**Größe.** Bedenkt man, dass sich die Auflösung der Super-Resolution-Mikroskopie bei einem maximalen Auflösungsvermögen von bis zu 20 nm in der gleichen Größenordnung wie die Sondengröße selbst bewegt (siehe Abbildung 2.6), wird deutlich, dass sich die Größe der gewählten Fluoreszenzmarkierung entscheidend auf die Auflösung des resultierenden Bildes auswirkt. Außerdem wird natürlich auch die biologische Struktur selbst vor allem bei Lebendzellfärbungen durch kleinere Marker weniger stark verändert und in ihrer Funktionalität gestört als durch größere Strukturen. Monomere Fluoreszenzproteine und Protein-Tags sind nur etwa 3-4 nm groß und somit relativ klein. Organische Fluorophore sind mit einer Größe von 1-2 nm sogar noch kleiner, binden aber nicht direkt an die Zielstruktur, sondern müssen über einen Linker an diese gekoppelt werden (siehe oben). Hier kommt es also nun entscheidend auf die Größe des Linkers an. Ein einzelner Antikörper beispielsweise hat eine Größe von 10-15 nm, sodass das Fluorophor bei indirekter Immunfluoreszenz 20-30 nm vom eigentlichen Epitop entfernt ist, was man bei der Auswertung unbedingt berücksichtigen muss. Kleinere Linker sind beispielsweise Fab-Fragmente (von englisch „fragment antigen binding“) oder Nanobodies [Bir17; SHJ17].

**Zellpermeabilität.** Aufgrund ihrer Größe und Ladung sind nur wenige Fluorophore zellpermeabel, weshalb ein Großteil nur nach vorheriger Permeabilisierung der Zellmembran verwendet werden kann. [TVE16]

**Lebendzellverträglichkeit.** Aufgrund fehlender Zellpermeabilität oder toxischer Eigenschaften vieler organischer Fluorophore ist für Lebendzellmessungen die Markierung mit fluoreszierenden Proteinen, sowie mit Protein-Tags besonders geeignet. [Bir17; Kle+11]

**Mengenverhältnis.** Vor allem bei quantitativen Analysen ist es unverzichtbar zu wissen, mit wie vielen Fluorophore die Zielstruktur markiert ist. Bei der Verwendung fluoreszierender Proteine oder von Protein-Tags ist eine 1:1 Stöchiometrie

## 2. Theoretischer Hintergrund



**Abbildung 2.6.: Größenverhältnisse von Fluoreszenzmarkierungen und Zielstrukturen.** Hier gezeigt sind typische Fluorophore (Alexa Fluor 647 als organischer Farbstoff und GFP als Fluoreszenzprotein), sowie verschiedene Linker zur Kopplung organischer Farbstoffe an die Zielstrukturen (Nanobody, SNAP-Tag, Fab-Fragment und IgG Antikörper). Im Vergleich dazu sind ein Glucosetransporter Typ 3 (GluT3), welcher im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle spielt, sowie der Querschnitt eines Mikrotubulus als typische biologische Referenzstruktur, gezeigt. Die Strukturdaten wurden von der Protein Data Bank (PDB), sowie von der Datenbank Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI [Has+16]) bezogen und mithilfe des LiteMol Viewers visualisiert [Seh+17]: CHEBI 137394 (Alexa Fluor 647), PDB 1GFL (GFP), PDB 1MEL (Nanobody), PDB 3KZY (SNAP-Tag), PDB 4ZWC (GluT3), PDB 1IGT (IgG), PDB 1YEH (Fab), PDB 5SYG (Mikrotubulus).

sichergestellt. Bei Immunfärbungen hingegen ist die Anzahl an Fluorophoren pro markierter Struktur erst einmal unbekannt, kann aber experimentell bestimmt werden. [Bir17]

### Schaltmechanismen in der Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie

Wie bereits in [Abschnitt 2.1.3](#) beschrieben, basiert die Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie auf dem Schalten der Fluorophore zwischen einem fluoreszenten AN- und einem dunklen AUS-Zustand. Dieses wird bei den verschiedenen SMLM-Methoden auf unterschiedliche Art und Weise erreicht, unter anderem abhängig davon welche Art von Fluorophoren zum Einsatz kommt.

**Organische Fluorophore.** STORM und *d*STORM machen sich das sogenannte Photoblinken organischer Fluorophore zunutze (siehe [Abbildung 2.7](#)). Während bei STORM zwei Fluorophore – ein langwellig anregbarer Reporter und ein mit kürzerwelligem Licht anregbarer Aktivator – in engem räumlichen Abstand benötigt werden, kommt *d*STORM ohne Aktivator aus. [Hei+08; Hei+09]

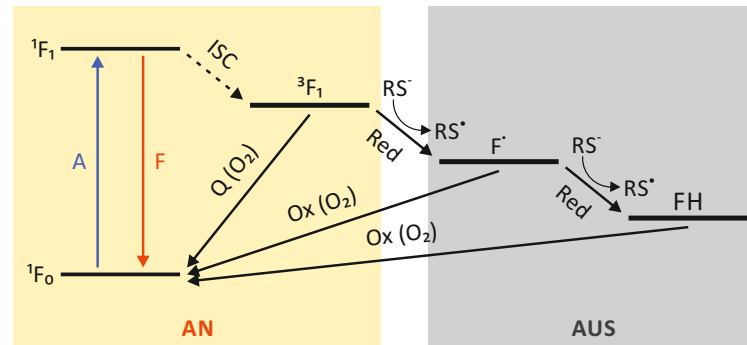
Wird ein Fluorophor durch Anregung mit Licht aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand versetzt, kann es entweder unter Abgabe von Fluoreszenzlicht direkt in den Grundzustand zurückkehren oder in einen angeregten Triplettzustand übergehen (siehe [Unterabschnitt 2.1.2](#)). Aus diesem kann mithilfe sogenannter Triplettlöcher (z.B. molekularem Sauerstoff) die quantenmechanisch verbotene Rückkehr in den Grundzustand erfolgen. Bei Anwesenheit eines Reduktionsmittels kann es aber auch zur Reduktion des Triplettzustandes kommen, wodurch das Fluorophor in die langlebige Form eines Radiaklanions und damit in einen sehr stabilen Dunkelzustand überführt wird. Einige organische Fluorophore können ein weiteres Mal reduziert werden, wodurch die sogenannte Leukoform entsteht. Von beiden Reduktionsformen kann das Molekül wieder in den Grundzustand zurückkehren. Dies kann spontan oder beschleunigt mithilfe eines Oxidationsmittels oder durch Bestrahlung mit UV-Licht erfolgen. [[Bir17](#); [van+13](#)]

Eine Grundvoraussetzung der Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie ist, dass sich zu jedem Zeitpunkt ein Großteil der Fluorophore im Dunkelzustand befindet (siehe [Abschnitt 2.1.3](#)). Die Anzahl der sich im AUS-Zustand befindenden Moleküle lässt sich wesentlich durch die Intensität des Anregungslichts und durch die Zusammensetzung des sogenannten Schaltpuffers beeinflussen: (1) Durch eine Erhöhung der Intensität werden mehr Fluorophore aus dem Grundzustand in den  $S_1$ -Zustand überführt, von wo aus ein Übergang in den Triplett- und schließlich in den Dunkelzustand möglich wird. (2) Wichtige Komponenten des Schaltpuffers sind Reduktionsmittel (zum Beispiel Moleküle mit einer freien Thiolgruppe wie  $\beta$ -Mercaptoethylamin (MEA) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol), da sie Fluorophore wie oben erläutert, aus dem Triplettzustand in den AUS-Zustand überführen. Außerdem können dem Puffer Enzyme mit passendem Substrat (z.B. Glucose-Oxidase mit Glucose) zugesetzt werden, welche dem System Sauerstoff entziehen und somit verhindern, dass dieser als Triplettlöcher wirken kann. Auch über den pH-Wert lässt sich Einfluss auf die Anzahl der sich im Dunkelzustand befindlichen Fluorophore nehmen, da eine Erniedrigung des pH-Werts zu einer Abnahme deprotonierter Thiole führt und dadurch die Schalteffizienz herabgesetzt wird. Möchte man wieder mehr Fluorophore aus dem AUS- in den AN-Zustand überführen, kann man dem System Triplettlöcher oder Oxidationsmittel zusetzen, den pH-Wert anpassen oder mit UV-Licht bestrahlen, wodurch die Moleküle wieder in den Grundzustand zurückkehren und zur Fluoreszenz angeregt werden können. [[Bir17](#)]

Während den beschriebenen Prozessen kann es an mehreren Stellen zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommen, was eine wichtige Rolle für poten-

## 2. Theoretischer Hintergrund

tielle Photoschädigung spielt (siehe [Unterabschnitt 2.2.2](#)): (1) Bei der Reduktion des Fluorophors durch Thiole entstehen Thiylradikale, welche mit Sauerstoff reagieren, wodurch Superoxidradikale und Wasserstoffperoxid gebildet werden. (2) Während der durch Triplettlöcher ermöglichten Rückkehr aus dem Triplett- in den Grundzustand, entsteht Singulett-Sauerstoff. (3) Durch die Oxidation des Radikalanions und der Leukoform des Fluorophors werden Superoxidradikale und Wasserstoffperoxid gebildet. [van+11a]

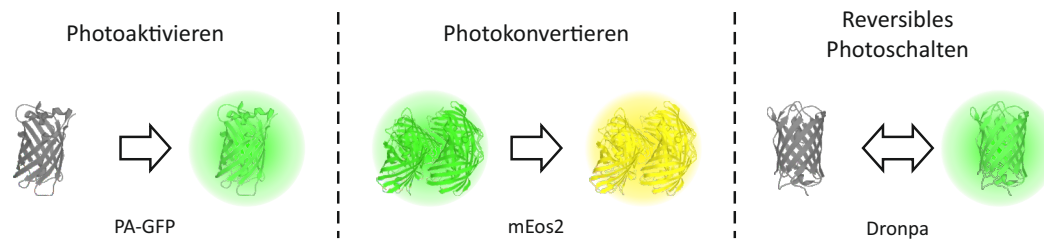


**Abbildung 2.7.: Schaltmechanismus organischer Fluorophore.** Ein angeregtes (A) Fluorophor kann entweder aus dem angeregten Singulettzustand ( $^1F_1$ ) direkt in den Grundzustand ( $^1F_0$ ) zurückkehren, wobei es zur Fluoreszenz (F) kommt, oder es geht durch Interkombination (ISC) in einen angeregten Triplettzustand ( $^3F_1$ ) über. Auch von hier kann es durch sogenannte Triplettlöcher (z.B. Sauerstoff) wieder in den Grundzustand gelangen (Q). Der Triplettzustand kann aber auch mithilfe eines Reduktionsmittels reduziert (Red) werden und das Fluorophor so als Radikalanion ( $F^*$ ) einen sehr stabilen Dunkelzustand einnehmen. Manche Fluorophore können ein weiteres Mal reduziert werden und dadurch die sogenannte Leukoform (FH) erreichen. Sowohl vom Zustand des Radikalanions als auch der Leukoform kann das Fluorophor spontan oder beschleunigt durch ein Oxidationsmittel (Ox) oder die Bestrahlung mit UV-Licht in den Grundzustand zurückkehren.

Die optimale Pufferzusammensetzung und Konzentration der einzelnen Komponenten ist für jedes Fluorophor spezifisch, was Mehrfarbenaufnahmen zu einer besonderen Herausforderung macht. Des Weiteren unterscheiden sich die optimalen Bedingungen nicht nur von Fluorophor zu Fluorophor, sondern hängen von einer Vielzahl an Faktoren ab zum Beispiel vom Zell- oder Gewebetyp, der Mikroumgebung der Zielstruktur oder auch dem Fixierungs- und Färbeprotokoll. Deshalb sollte der Puffer unter experimentellen Bedingungen getestet und optimiert werden.

**Fluoreszierende Proteine.** Anders als bei (*d*)STORM werden bei PALM schaltbare fluoreszierende Proteine verwendet, welche entweder photoaktivierbar, photokonvertierbar oder photoschaltbar sind (siehe [Abbildung 2.8](#)). Photoaktivier-

bare Proteine können einmalig von einem nicht fluoreszenten zu einem fluoreszenten Zustand wechseln, bei photokonvertierbaren Proteinen findet eine Verschiebung des Emissionsspektrum statt und photoschaltbare Proteine können reversibel zwischen einem fluoreszenten und nicht fluoreszenten Zustand hin- und herschalten. [Bir17]



**Abbildung 2.8.: Schaltmechanismen fluoreszenter Proteine.** Für die Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie geeignete Fluoreszenzproteine teilt man nach ihren Schaltmechanismen in drei Klassen ein: photoaktivierbare Proteine, die einmalig von einem dunklen in einen fluoreszenten Zustand versetzt werden, photokonvertierbare Proteine, die von einem fluoreszenten in einen rot verschobenen fluoreszenten Zustand übergehen und reversibel schaltbare Proteine, welche mehrfach zwischen einem dunklen und einem fluoreszenten Zustand wechseln. PA-GFP, mEos2 und Dronpa sind bekannte Vertreter der jeweiligen Gruppe. Die Strukturdaten wurden von der Protein Data Bank (PDB) bezogen und mithilfe des LiteMol Viewers visualisiert [Seh+17]: PDB 3GJ2 (PA-GFP), PDB 3S05 (mEos2), PDB 2Z1O (Dronpa).

### 2.2.2. Lebendzellmessungen und Photoschädigung

Bestimmte Fragestellungen sind nur durch Messungen an lebenden Zellen zu beantworten. Für Lebendzellexperimente in der Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie ergeben sich im Vergleich zu fixierten Proben einige Besonderheiten.

Nicht alle Markierungsmethoden sind für lebende Zellen geeignet, da einige Färbeprotokolle toxisch sind oder aufgrund nicht gegebener Membranpermeabilität eine Permeabilisierung der Zelle erfordern (siehe [Unterabschnitt 2.2.1](#)). Typischerweise kommen bei Lebendzellmessungen fluoreszierende Proteine, Protein-Tags oder zellpermeable, gegen eine spezifische zelluläre Struktur gerichtete Farbstoffe (z.B. „MitoTracker“) zum Einsatz. [SH17; Sch+19]

Innerhalb lebender Zellen findet man einen Redoxstatus vor, welcher die Verwendung eines Schaltpuffers überflüssig macht. Das in diesem Kontext wichtigste Redoxpaar bilden Glutathion (GSH) und Glutathion-Disulfid (GSSG), welche in hoher Konzentration im Zytosol der Zelle vorliegen und sich als Reduktionsmittel für eine Vielzahl organischer Fluorophore eignen. Die genaue Konzentration variiert stark von Zelllinie zu Zelllinie und zwischen verschiedenen Bereichen und Organel-

## 2. Theoretischer Hintergrund

len der Zelle. [SH17]

Aufgrund der hohen Lichtintensitäten (SIM: 0.001-0,1 kW cm<sup>-2</sup>, dSTORM: 1-10 kW cm<sup>-2</sup>, STED: 1-100 kW cm<sup>-2</sup> [Sch+19]) auf welche hochauflösende Fluoreszenzmikroskopiemethoden angewiesen sind, ist das Thema Phototoxizität vor allem bei Lebendzelluntersuchungen von enormer Wichtigkeit, wird aber leider häufig zu wenig berücksichtigt [13]. Einerseits können zelluläre Strukturen durch die Bestrahlung direkt geschädigt werden (primäre Photoschädigung), andererseits entstehen durch die hohen Intensitäten und das Photoblinken der Fluorophore (siehe [Abschnitt 2.2.1](#)) radikale Sauerstoffspezies (ROS), welche für biologische Proben toxisch sind und somit zu einer sekundären Photoschädigung führen [Bir17].

Anzeichen von Photoschädigung sind eine abweichende Zellmorphologie, die Ablösung adhärenter Zellen vom Substrat, das Erscheinen von Granula an der Zelloberfläche, die Kondensation des Zellkerns, eine übermäßige Vakuolenbildung, die Unterbrechung der Mitose, Nekrose oder Apoptose und eine stark erhöhte Autofluoreszenz. Wie hoch die Bestrahlungsdosis ist, welche eine Zelle ertragen kann, hängt unter anderem vom Zelltyp und der Wellenlänge des Lichts ab. [Hv09; KR06; MK13; vHS12]

Bereits während meiner Masterarbeit [Wäl13] habe ich die Photoschädigung durch dSTORM-typische Bestrahlung untersucht und die Experimente im Rahmen meiner Promotion fortgesetzt. An dieser Stelle fasse ich kurz die Erkenntnisse meiner Masterarbeit zusammen, während in [Abschnitt 4.1](#) sämtliche Ergebnisse des Photoschädigungsprojektes detailliert besprochen und dargestellt werden.

Nach der Bestrahlung unter bei dSTORM- oder PALM-Experimenten typischerweise verwendeten Bedingungen zeigten sich für die bestrahlten Zellen innerhalb der folgenden 24 h drei unterschiedliche vom Grad der Schädigung abhängige Verhalten (siehe [Abbildung 4.1](#)): (1) Bei keiner oder wenig Schädigung verhielten sie sich genauso wie nicht bestrahlte Zellen, bewegten und teilten sich. (2) Bei stärkerer Schädigung teilten sich die bestrahlten Zellen nicht oder langsamer, schrumpften und verformten sich und lösten sich schließlich vom Deckglas ab und starben. (3) Die stärkste Form der Schädigung zeigte sich durch einen abrupten Zelltod nach welchem die Zellen wie erstarrt wirkten und fest an der Oberfläche hafteten.

Ich konnte dabei zeigen, dass der Schädigungsgrad in erster Linie von Laserintensität und verwendeter Wellenlänge abhängt: Je höher die Intensität und je kürzer die verwendete Wellenlänge, desto mehr Zellen sterben oder erstarren sogar. Vor allem 405 nm, 488 nm und 514 nm zeigten sich als sehr schädlich, während 558 nm und 639 nm deutlich weniger Schaden verursachten. Dies hängt vermutlich mit der



höheren Energie kürzerwelligen Lichts und der stärkeren Lichtabsorption von kurzwelligem Licht zusammen.

Weiterhin konnte ich einen negativen Effekt durch die Färbung der Zellen beobachten. Gefärbte Zellen waren Photoschädigung gegenüber sensitiver als ungefärbte Zellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ging es darum die Auswirkung einer Vielzahl weiterer Faktoren zu untersuchen. Dazu gehörten der Einfluss von Transfektion, der Temperatur, der Zugabe von Ascorbinsäure als Antioxidans und des Zelltyps. Weiterhin wurde die Rolle der Lichtdosis untersucht, indem kontinuierliche (CW von englisch „Continuous Wave“) und gepulste Bestrahlung verglichen wurden. Außerdem wurden zusätzlich Messungen zur Wellenlängenabhängigkeit durchgeführt und der erstarrte Zustand weiter charakterisiert.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden bei der Planung weiterer *d*STORM-Versuche berücksichtigt.

### 2.2.3. Quantifizierung

Neben dem hohen Auflösungsvermögen ist eine der größten Stärken der Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie die Einzelmolekülsensitivität. Denn durch diese wird es möglich, Moleküle zu zählen und somit quantitative Aussagen über eine Zielstruktur zu treffen.

Bei der absoluten Quantifizierung eines Moleküls kann es leicht zu Unter- oder Überschätzungen kommen. Eine Unterschätzung kann auftreten, wenn nicht alle Moleküle markiert sind (z.B. weil bei einer Antikörperfärbung nicht alle Epitope zugänglich sind oder es bei einer Markierung mittels fluoreszenter Proteine zu Fehlfaltungen kommt) oder nicht alle Fluorophore detektiert werden (z.B. aufgrund von Aufnahme- und Auswertefehlern oder Bleichen der Fluorophore). Gründe für eine Überschätzung können Mehrfachmarkierungen (beispielsweise weil mehrere Fluorophore an einen Antikörper gekoppelt sind oder mehrere sekundäre Antikörper an einen primären binden) oder Blinken sein. Aus diesen Gründen bedarf die absolute Quantifizierung einer Vielzahl an Vorversuchen und Abschätzungen abhängig von der verwendeten Markierungs- und Auswertemethode. [BB18]

Eine häufig in Kombination mit PALM angewandte Strategie ist es, das Blinkverhalten des Fluorophors zu charakterisieren und somit sicherzustellen, dass das mehrfache Blinken eines einzigen Fluorophors auch nur diesem zugeordnet wird und somit eine Überschätzung vermieden wird. Eine andere Herangehensweise ist durch verschiedene Vorversuche (Titrations) die Anzahl der Lokalisationen pro

## 2. Theoretischer Hintergrund

Antikörper zu bestimmen und somit später von den gemessenen Lokalisationen auf die Anzahl der Antikörper zurück zuschließen. Bei beiden Methoden muss natürlich auch die Stöchiometrie von Fluorophor und Zielstruktur berücksichtigt werden, also die Anzahl der Fluorophore, die im Durchschnitt ein Zielmolekül markieren. Außerdem muss sichergestellt werden, dass alle Moleküle detektiert werden: Es muss ausreichend lange aufgenommen werden und die Messung sollte starten bevor die ersten Fluorophore bereits bleichen. Das Blinkverhalten muss gut eingestellt sein, sodass alle Moleküle von der Software lokalisiert werden können und die Auswerteparameter müssen korrekt eingestellt sein. [SHJ17]

Etwas weniger aufwendig und fehleranfällig als die absolute Quantifizierung ist die relative Quantifizierung. Hierbei vergleicht man beispielsweise die Lokalisationsdichte eines markierten Moleküls unter verschiedenen experimentellen oder biologischen Bedingungen. Die Aufnahmebedingungen sind dabei unbedingt konstant zu halten. [BB18]

### 2.3. Hochauflösung zur Beantwortung neurobiologischer Fragestellungen

Im Rahmen mehrerer wissenschaftlicher Kooperationsprojekte habe ich gemeinsam mit meinen Kooperationspartnern mittels *d*STORM und SIM verschiedene biologische Fragestellungen bearbeitet. In diesem Kapitel möchte ich kurz auf die biologischen und medizinischen Hintergründe dieser Projekte eingehen.

#### 2.3.1. Synapsen

Unter einer Synapse versteht man die Kontaktstelle zwischen einer Nervenzelle und einer weiteren Zelle (z.B. einer zweiten Nervenzelle oder einer Muskelzelle), an welcher Informationen von der Nervenzelle auf die zweite Zelle übertragen werden. Dies kann grundsätzlich elektrisch oder chemisch erfolgen. Da elektrische Synapsen in dieser Arbeit keine Rolle spielen, wird auf sie nicht weiter eingegangen.

Räumlich kann man die chemische Synapse grob in Präsynapse, synaptischen Spalt und Postsynapse unterteilen (siehe [Abbildung 2.9a](#)). Die Information kommt in Form elektrischer Impulse auf präsynaptischer Seite am Axonterminal oder auch synaptischen Endköpfchen an. Dort befinden sich synaptische Vesikel, welche einen Botenstoff - den Neurotransmitter - enthalten. Das eingehende Signal führt zu einer Verschmelzung des Vesikels mit der Membran. Die Stelle, an welcher die Ver-

### 2.3. Hochauflösung zur Beantwortung neurobiologischer Fragestellungen

schmelzung vonstatten geht, wird als aktiven Zone (AZ) bezeichnet (siehe unten). Es kommt zur Freisetzung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt, wobei die Menge an Neurotransmitter, die ein Vesikel enthält, als Quantum bezeichnet wird. Auf der gegenüberliegenden postsynaptischen Seite befindet sich im Dendrit oder Soma der empfangenden Zelle die sogenannte postsynaptische Verdichtung (PSD von englisch „postsynaptic density“), welche für den Botenstoff spezifische Rezeptoren enthält. Diese erkennen den Neurotransmitter und lösen in der Zielzelle eine bestimmte Reaktion aus z.B. die Änderung des Membranpotentials und damit eine erneute Umwandlung des chemischen Signals in einen elektrischen Reiz. Auch diese Antwort ist „gequantelt“: Die Reaktion, welche ein Quantum auslöst, bezeichnet man als Miniaturstrom oder auch „Mini“ und die Gesamtantwort ist immer ein Vielfaches dieses Stroms. [BCP18]

#### **Aktive Zone - Bassoon und Bruchpilot**

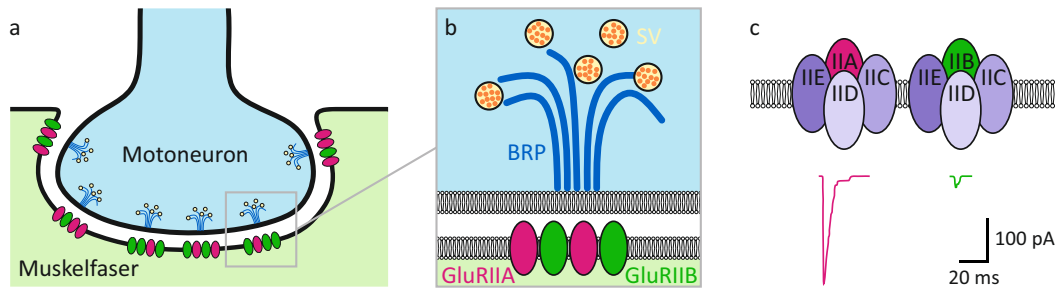
Die oben genannte aktive Zone weist ein dichtes Netzwerk verschiedener Proteine auf, welche die Freisetzung der Neurotransmitter vermitteln (siehe stark vereinfacht [Abbildung 2.9b](#)). Diese Proteinansammlung wird als Zytomatrix der aktiven Zone (CAZ von englisch „cytomatrix at the active zone“) bezeichnet. Ein CAZ-Protein, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, ist Bassoon. Zu seinen Funktionen zählen der Aufbau des AZ-Gerüsts, die Organisation der Maschinerie zur Neurotransmitterfreisetzung, die Aufrechterhaltung der synaptischen Integrität, sowie die Beteiligung an Signalwegen. Während Bassoon in Wirbeltieren vorkommt, findet man in *Drosophila melanogaster* ein entfernt verwandtes Protein mit ähnlicher Funktion und dem Namen Bruchpilot. [GRG15]

#### **Postsynaptische Verdichtung - Glutamaterezeptor und Homer**

Die in [Unterabschnitt 2.3.1](#) erwähnte postsynaptische Verdichtung enthält neben den Rezeptoren für die an der Präsynapse ausgeschütteten Neurotransmitter verschiedene assoziierte Signal- und Strukturmoleküle (siehe stark vereinfacht [Abbildung 2.9b](#)). Ihre Funktion besteht in der Apposition von prä- und postsynaptischer Membran, der Anreicherung postsynaptischer Rezeptoren und in der Weiterleitung eingehender Signale [Hay+09; SK11]. PSD-Proteine, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sind Homer und ionotrope Glutamaterezeptoren.

Homer stellt eine Familie an Gerüstproteinen (Homer1-3) dar, welche verschiedene Interaktionen in der PSD vermittelt. Es gehört zu den in der PSD am stärksten

## 2. Theoretischer Hintergrund



**Abbildung 2.9.: Schematische Darstellung einer Synapse am Beispiel der neuromuskulären Synapse (NMJ) von *Drosophila melanogaster*.** (a) Eine Synapse besteht aus Prä- (hellblau) und Postsynapse (hellgrün), die durch den synaptischen Spalt voneinander getrennt sind. Im Falle der neuromuskulären Synapse ist die präsynaptische Seite Teil eines Motoneurons, während die Postsynapse zu einer Muskelzelle gehört. (b) Erreicht ein elektrisches Signal die Präsynapse, kommt es dort im Bereich der aktiven Zone zur Verschmelzung synaptischer Vesikel (SV) und zur Freisetzung des Neurotransmitters. Dieser Prozess wird von einer Vielzahl an Proteinen vermittelt und reguliert. An der NMJ von *Drosophila* spielt das Gerüstprotein Bruchpilot (BRP) dabei eine wichtige Rolle. Der Neurotransmitter passiert den synaptischen Spalt und wird auf der postsynaptischen Seite im Bereich der postsynaptischen Verdichtung von spezialisierten Rezeptoren (in diesem Fall Glutamatrezeptoren des A- und B-Typs (GluRIIA und GluRIIB)) detektiert und führt zu einer spezifischen Reaktion, beispielsweise der Änderung des Membranpotentials. (c) Die ionotropen Glutamatrezeptoren an der NMJ von *Drosophila melanogaster* bestehen aus vier Untereinheiten: Sie weisen immer IIC, IID und IIE auf, während die vierte Untereinheit IIA oder IIB sein kann. Die physiologischen Eigenschaften der Rezeptoren unterscheiden sich abhängig von dieser vierten Untereinheit. Rezeptoren des A-Typs desensibilisieren deutlich langsamer und weisen größere Miniaturströme auf als B-Typ-Rezeptoren.

vertretenen Proteinen. [Hay+09; SK11]

Glutamatrezeptoren (GluR) erkennen den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat, welcher der Hauptbotenstoff erregender Synapsen des zentralen Nervensystems von Vertebraten ist. Man kann sie in zwei Gruppen einteilen: ionotrope (iGluR) und metabotrope Rezeptoren (mGluR). Bei iGluRs handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle, welche sich durch die Bindung von Glutamat öffnen, wodurch es zu einem Ionenstrom und somit zur Änderung des Membranpotentials kommt. Im Falle von mGluRs hingegen werden durch die Bindung von Glutamat unterschiedliche mittels sekundärer Botenstoffe vermittelte Signalwege in Gang gesetzt [DiA06]. Da letztere für diese Arbeit nicht von Bedeutung sind, wird auf sie im Folgenden nicht weiter eingegangen. Die untersuchten ionotropen Glutamatrezeptoren werden im Detail im [Unterabschnitt 2.3.2](#) behandelt.

### 2.3.2. Neuromuskuläre Synapse von *Drosophila melanogaster*

Besteht eine synaptische Verbindung zwischen einer Nerven- und einer Muskelzelle bezeichnet man diese als neuromuskuläre Synapse (NMJ von englisch „neuromuscular junction“, siehe [Abbildung 2.9a](#) und [b](#)) [[BCP18](#)].

Die NMJ der Larve von *Drosophila melanogaster* ist ein beliebtes Modellsystem zur Untersuchung synaptischer Funktionsweise, da sie der glutamatergen Synapse von Wirbeltieren in ihrer Ultrastruktur und ihrem molekularen Aufbau ähnelt und gleichzeitig relativ groß und deshalb sowohl für elektrophysiologische als auch mikroskopische Methoden leicht zugänglich ist. Des Weiteren verfügt *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus über eine Reihe an Vorteilen: Sie ist einfach und kostengünstig zu züchten, weist eine kurze Generationsfolge auf, zeugt eine große Zahl an Nachkommen und genetische Veränderungen sind relativ leicht einzubringen. [[BTT10](#); [DiA06](#); [Jen11](#); [RB06](#)]

Auch innerhalb des Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert J. Kittel, welches ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist, stand die *Drosophila* NMJ im Mittelpunkt unseres Interesses.

Bei der NMJ von *Drosophila melanogaster* handelt es sich um eine glutamaterge Synapse (siehe auch [Abschnitt 2.3.1](#)). Die hier vorkommenden ionotropen Glutamaterezeptoren bestehen jeweils aus vier Untereinheiten, wobei jeder der Rezeptoren die Untereinheiten IIC, IID und IIE aufweist, während die vierte Untereinheit entweder IIA oder IIB sein kann ([Abbildung 2.9c](#)). Anhand der vierten Untereinheit unterscheidet man zwischen Rezeptoren des Typ A (GluRIIA) beziehungsweise B (GluRIIB). Beide Typen zeigen physiologische Unterschiede (siehe [Abbildung 2.9c](#)). [[DiA06](#); [Qin+05](#)]

Betrachtet man die Ionenströme durch einzelne Kanäle, desensibilisieren Rezeptoren des B-Typs etwa zehnfach schneller als A-Typ-Rezeptoren. Gleichzeitig reagieren Rezeptoren des A-Typs mit deutlich größeren Miniaturströmen, sind also sensitiver gegenüber Glutamat als B-Typ-Rezeptoren. [[DiA+99](#); [DiA06](#); [Sch+08](#); [TS12](#)]

#### Synaptische Plastizität an der NMJ von *Drosophila melanogaster*

Aufgrund der funktionellen Unterschiede von GluRIIA und GluRIIB kann durch die Zusammensetzung beider Rezeptortypen die Stärke der synaptischen Übertragung beeinflusst werden. Die Synapse kann sich somit an Veränderungen der neuronalen Aktivität anpassen. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von synaptischer

## 2. Theoretischer Hintergrund

Plastizität. Einerseits beeinflusst das relative Verhältnis beider Rezeptortypen die Sensitivität der Postsynapse gegenüber dem Neurotransmitter. Auf der anderen Seite wird auch die präsynaptische Transmitterfreisetzung durch retrograde Signale reguliert [DiA+99; DiA06]. Auch die räumliche Anordnung beider Rezeptortypen innerhalb der PSD könnte eine Rolle spielen. Normalerweise findet man in den meisten postsynaptischen Verdichtungen eine Anreicherung der A-Typ-Rezeptoren im Zentrum, welche ringförmig von Rezeptoren des B-Typs umschlossen werden. Unter bestimmten Bedingungen kann sich diese Anordnung jedoch umkehren [DiA06; Owa+12].

Eine weitere wichtige Rolle für die synaptische Plastizität an der NMJ von *Drosophila* kommt dem cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) zu, welches als sekundärer Botenstoff bei der Signaltransduktion dient [GB06].

### ***d*STORM an der NMJ von *Drosophila melanogaster***

Mittels *d*STORM wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen induzierter synaptischer Plastizität auf die räumliche Anordnung der A- und B-Typ-Rezeptoren innerhalb der PSD untersucht, sowie die absolute Anzahl der A-Typ-Rezeptoren pro PSD bestimmt.

### **2.3.3. Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS)**

Die Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) gehört zu den häufigsten psychiatrischen Störungen und wird durch Hyperaktivität, Unaufmerksamkeit und impulsive Verhaltensweisen gekennzeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass ADHS vererbbar ist und in den letzten Jahren wurden eine Reihe potentieller Risikogene identifiziert. Zu diesen gehören die Gene *CDH13*, *SLC2A3* und *TPH2*, welche für die Proteine Cadherin-13, Glucosetransporter Typ 3 (GluT3) beziehungsweise Tryptophan-Hydroxylase 2 codieren und im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch am Mausmodellen und in induzierten pluripotenten Stammzellen untersucht wurden. [Les+08; Les+11; She+05]

### **Cadherin-13**

Cadherin-13, auch T- oder H-Cadherin genannt, gehört zur Superfamilie der Cadherine, einer Gruppe calciumabhängiger Zelladhäsionsmoleküle. In dieser nimmt

CDH13 jedoch eine Sonderrolle ein, da es anders als die anderen Cadherine weder eine Transmembran- noch eine cytoplasmatische Domäne aufweist. Stattdessen ist es über einen sogenannten Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Zellmembran verankert und wird aufgrund diesen Unterschieds als atypisches Cadherin bezeichnet. CDH13 ist an der Regulation der Zellmigration, des Neuritenwachstums und der Axonführung beteiligt und wird für die Entwicklung glutamaterger und GABAerger Synapsen benötigt. [Phi+09; Riv+13; Riv+15]

In mehreren unabhängigen Studien konnte CDH13 mit ADHS in Verbindung gebracht werden [Las+08; Les+08; Lio+11; Nea+08; Zho+08].

#### **Glucosetransporter Typ 3**

Der Glucosetransporter Typ 3 ist ein integrales Membrantransportprotein und vermittelt als solches den Glucosetransport über die Zellmembran. GLUT3 wird gerne als „neuronaler Glucosetransporter“ bezeichnet, da er in erster Linie in Nervenzellen vorkommt und eine zentrale Rolle im Glucosemetabolismus des Gehirns spielt. Durch die Bereitstellung von Energie hat er Einfluss auf die Entwicklung des Gehirns, sowie auf aktivitätsabhängige neuronale Plastizität. [Mer+17; Sim+08]

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch konnte in den vergangenen Jahren bei einigen ADHS-Patienten eine Duplikation [Les+11] oder Deletion des Gens *SLC2A3*, welches für GluT3 codiert, feststellen, was einen Zusammenhang zwischen GluT3 und ADHS nahelegt.

#### **Serotonin und Tryptophan-Hydroxylase 2**

Der Neurotransmitter Serotonin (5-HT von 5-Hydroxytryptamin) hat vielfältige wichtige Körperfunktion und wirkt sich beispielsweise auf Aufmerksamkeit, Schlaf, Gedächtnis und Lernen, Fortbewegung, Appetit und Angst aus. Störungen des Serotoninhaushaltes konnten mit ADHS in Verbindung gebracht werden. Aus diesem Grund sind Gene und Proteine, die eine Rolle im serotonergen System spielen, für die ADHS-Forschung von besonderem Interesse. Einer der Akteure, der in diesem Zusammenhang untersucht wurde, ist die Tryptophan-Hydroxylase 2 (TPH2), welche die Biosynthese von Serotonin aus Tryptophan katalysiert und somit die Serotonin-Konzentration beeinflusst. Die Ergebnisse der bisherigen Studien, ob TPH2 eine Rolle bei der Entstehung von ADHS hat, lassen jedoch keine eindeutige Aussage zu. Da TPH2 ausschließlich in serotonergen Neuronen des Gehirns vor kommt, wird es häufig als Marker dieser Zellen verwendet. [Ban+10; She+05;

## 2. Theoretischer Hintergrund

[She+07](#)]

Der größte Teil serotonerger Neurone befindet sich in den sogenannten Raphe-kernen, welche im Hirnstamm lokalisiert sind und von dort in unterschiedlich Gehirnregionen projizieren [[BCP18](#)].

### **Mausmodell und induzierte pluripotente Stammzellen**

Meistens findet die Grundlagenforschung zu neurologischen und psychiatrischen Krankheiten wie ADHS an Tiermodellen wie Ratten oder Mäusen statt. Auch einige Experimente innerhalb des Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch wurden an Mausgewebe durchgeführt. Es steht außer Frage, dass eine Menge Erkenntnisse durch Tierversuche gewonnen werden, deren Durchführung an menschlichem Gewebe oder gar Probanden aus ethischen und finanziellen Gründen häufig schwierig oder gar nicht durchzuführen sind. Nichtsdestotrotz lassen sich erhaltene Ergebnisse nicht immer ohne Weiteres auf den Menschen, dessen Gehirn deutlich komplexer ist, übertragen, sodass Untersuchungen an humanen Proben deutlich aussagekräftiger wären. [[Ard+17](#)]

Eine Möglichkeit um an menschliche Neurone oder andere Zelltypen zu gelangen, sind pluripotente Stammzellen. Dies sind Zellen aus welchen sich praktisch jeder Zelltyp entwickeln kann, was sie zu einem mächtigen biologischen und medizinischen Werkzeug macht – auch in der regenerativen Medizin. Allerdings konnten sie lange Zeit ausschließlich aus Embryonen gewonnen werden, was ethisch sehr umstritten ist. 2006 jedoch gelang es Takahashi *et al.* pluripotente Stammzellen aus bereits differenzierte somatische Mauszellen zu reprogrammieren, indem sie die Zellen mit den Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 mittels eines Retrovirus transfizierten [[TY06](#)]. Die so erzeugten Zellen wurden von da an als induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) bezeichnet. 2007 gelang die Reprogrammierung dann auch mit menschlichen Zellen [[Tak+07](#)] und 2012 wurde Shin'ya Yamanaka für seine Arbeit gemeinsam mit John Gurdon der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen. Die iPS-Zellen entwickelten sich vor allem für die Untersuchung menschlicher Krankheiten und im Bereich Medikamenten-Screening zu einem wichtigen Werkzeug. [[Scu16](#)]

### **dSTORM und SIM zur Untersuchung ADHS-assoziierter Proteine**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von CDH13 an der Entwicklung des serotonergen Systems untersucht. Dazu wurde SIM an Schnitten embryonaler Maus-



### 2.3. Hochauflösung zur Beantwortung neurobiologischer Fragestellungen

gehirne durchgeführt und die Verteilung von CDH13 in den dorsalen Raphekernen analysiert. In einem weiteren Teilprojekt kamen aus humanen iPS-Zellen differenzierte serotonerge Neurone zum Einsatz, welche verschiedene Kopienzahlvariationen des *SLC2A3*-Gens trugen. Mittels *d*STORM wurden GluT3, Bassoon und Homer in diesen Zellen relativ quantifiziert, um die Auswirkungen von Deletion und Duplikation des *SLC2A3*-Gens auf diese drei Proteine zu beleuchten.



## 3 | Material und Methoden

### 3.1. Biologische Proben

#### 3.1.1. Immortalisierte Zelllinien

Die Experimente im Rahmen des Photoschädigungsprojektes (siehe [Abschnitt 4.1](#)) wurden an U2OS-Zellen (Zelllinie aus einem Osteosarkom, *Homo sapiens*), COS-7-Zellen (Zelllinie aus Fibroblasten der Niere, *Cercopithecus aethiops*) und HeLa-Zellen (Zelllinie aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, *Homo sapiens*) durchgeführt. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Nährmedium für die U2OS- und COS-7-Zellen diente DMEM F12 mit L-Glutamin (Sigma, D8062), dem 10% FCS (Sigma, F7524) und 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma, P4333) zugesetzt wurde. Die HeLa-Zellen wuchsen in RPMI-1640 mit L-Glutamin (Sigma, R8758), versetzt mit 1% MEM Nicht-Essenzielle Aminosäuren Lösung (Sigma, M7145), 1% Natriumpyruvat (Sigma, S8636), 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Ein Teil der Versuche wurde an einer während meiner Masterarbeit [[Wäl13](#)] hergestellten stabil transfizierten U2OS-Zelllinie durchgeführt, welche das Konstrukt CLIP-H2B dauerhaft exprimiert. Dieses Konstrukt codiert für das Histon 2B (H2B), welches mit einem CLIP-Tag fusioniert ist und sich somit mit organischen Farbstoffen markieren lässt, welche an ein O<sup>6</sup>-Benzylcytosin gekoppelt sind (siehe [Abschnitt 3.2](#)).

#### 3.1.2. Larven von *Drosophila melanogaster*

Wie bereits in [Unterabschnitt 2.3.2](#) erwähnt, wurde in einem Kooperationsprojekt mit Prof. Dr. Robert J. Kittel die neuromuskuläre Synapse von *Drosophila melanogaster* Larven untersucht.

Für die Untersuchung der Glutamatrezeptoren (siehe [Abschnitt 4.2](#)) wurden von meiner Kooperationspartnerin Divya Sachidanandan Larven des dritten Larvenstadiums präpariert. Dabei wurden die inneren Organe entfernt ohne das neuromus-

### 3. Material und Methoden

kuläre Gewebe zu beschädigen (sogenannte semi-intakte Präparation, siehe [Abbildung 3.1](#)).

Zur Untersuchung inwiefern sich induzierte Aktivität auf die Anordnung der A- und B-Typ-Rezeptoren auswirkt, wurden die Muskeln 6 und 7 der präparierten Larven durch Divya Sachidanandan zuerst elektrophysiologisch manipuliert. Beide Muskeln liegen aufgrund des symmetrischen Aufbaus der Körperwandmuskulatur zweifach vor. Auf einer Körperseite wurde der Nerv, welcher die beiden Muskeln dieser Seite innerviert, mit einer Stimulationselektrode exzitatorisch stimuliert und Muskel 6 währenddessen mittels Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp (TEVC von englisch „Two Electrode Voltage-Clamp“) auf ein Potential von  $-60\text{ mV}$  geklemmt. Muskel 6 und 7 der anderen Körperseite wurden weder elektrisch stimuliert, noch geklemmt, sodass in jeder Larve für beide Muskeln eine Negativkontrolle für die nachfolgenden *d*STORM-Experimente vorlag.

Das Klemmen des Potentials in Muskel 6, welches eine Depolarisation verhindert, und die gleichzeitige Stimulation des Muskels induzieren synaptische Plastizität [[LEK13](#)]. Weiterhin wurden Versuche unter Zugabe von Forskolin durchgeführt, welches als cAMP-Aktivator fungiert und somit zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels führt [[AM12](#)]. Auch cAMP spielt eine wichtige Rolle für die synaptische Plastizität.

Nach Abschluss der Elektrophysiologieversuche wurden die Larven von Divya Sachidanandan fixiert und die Glutamatrezeptoren gefärbt (siehe [Abschnitt 3.2](#)). Anschließend nutzten wir sie um sie mittels *d*STORM weiter zu untersuchen.

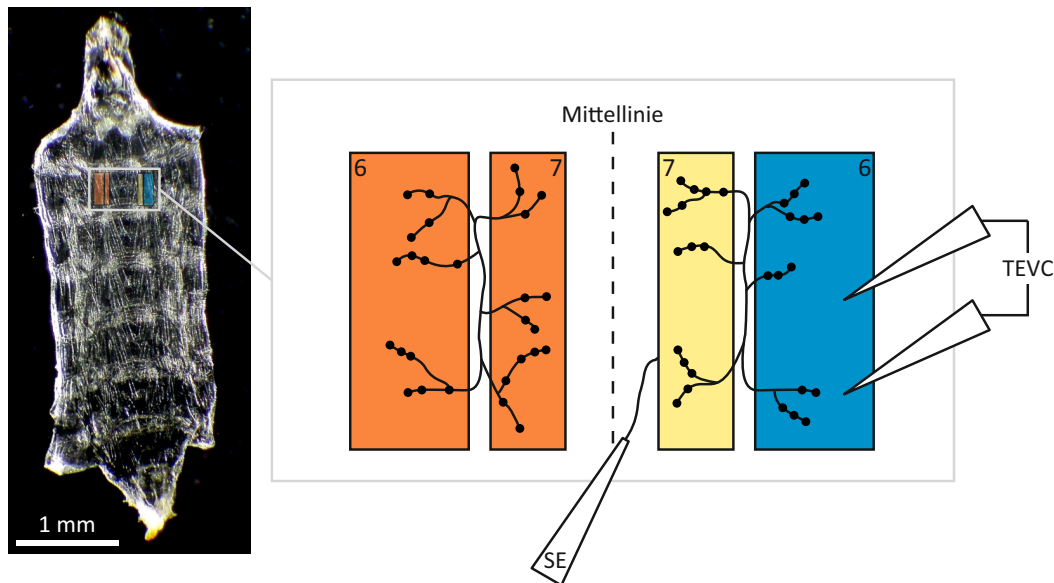
Semi-intakte Larvenpräparation zur Quantifizierung des A-Typ-Rezeptors (siehe [Unterabschnitt 3.4.1](#)) wurden direkt nach der Präparation fixiert und gefärbt.

#### 3.1.3. Gehirnschnitte von Mäuseembryonen

Während einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch wurden Gehirnschnitte von Mäuseembryonen des Entwicklungsstadiums E13.5 hinsichtlich des Expressionsmusters von CDH13 untersucht ([Unterabschnitt 4.3.1](#)). Die Schnitte waren  $20\text{ }\mu\text{m}$  dick und wurden von meiner Kooperationspartnerin Andrea Forero präpariert.

#### 3.1.4. Menschliche Neurone aus induzierten pluripotenten Stammzellen

Ebenfalls in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch wurden humane induzierte pluripotente Stammzellen verwendet, um Cadherin-13, den



**Abbildung 3.1.: Semi-intakte Larvenpräparation von *Drosophila melanogaster*.** Links zu sehen ist eine semi-intakte Larvenpräparation (aufgenommen mit dem Binokular). Alle inneren Organe wurden entfernt, während das neuromuskuläre Gewebe mit den neuromuskulären Synapsen noch intakt ist. Farblich markiert und schematisch auf der rechten Seite dargestellt sind Muskel 6 und 7, die aufgrund der vorhandenen Symmetrie zweifach vorliegen (rechts und links der Mittellinie). Auf der einen Körperseite wurden die beiden Muskeln (Muskel 6 in blau und Muskel 7 in gelb) beziehungsweise der sie innervierende Nerv durch eine Stimulationselektrode (SE) elektrisch stimuliert. Gleichzeitig wurde Muskel 6 (blau) mittels Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp (TEVC) auf ein Potential von  $-60$  mV geklemmt. Die beiden Muskeln der anderen Körperseite (orange) wurden weder elektrisch stimuliert, noch geklemmt.

Glucosetransporter Typ 3 (GluT3), die Tryptophan-Hydroxylase 2, sowie Homer und Bassoon zu untersuchen (siehe [Unterabschnitt 4.3.2](#)).

Für dieses Kooperationsprojekt wurden von meiner Kooperationspartnerin Charline Jansch menschliche Hautfibroblasten von gesunden und an ADHS-erkrankten Personen, welche Kopienzahlvariation (CNVs von englisch „copy number variants“) des *SLC2A3*-Gens aufweisen, entnommen, kultiviert und zu iPS-Zellen reprogrammiert (siehe [Unterabschnitt 2.3.3](#)). Die so entstandenen und in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien tragen je nach Herkunft der Fibroblasten, aus welchen sie entstanden sind, die Namen CJ1 (aus nicht an ADHS leidender Person, Kontrolle), CJ5 (aus an ADHS erkrankter Personen, die eine Duplikation des *SLC2A3*-Gens trägt) und CJ7 (aus an ADHS erkrankter Personen, die eine Deletion des *SLC2A3*-Gens trägt). Sie wurden nach der Reprogrammierung zu serotonergen Neuronen differenziert, wobei die sich ergebende Kultur nie zu 100% aus serotonergen, sondern immer

### 3. Material und Methoden

auch zu einem hohen Anteil aus Neuronen anderen Phänotyps z.B. katecholaminerger und GABAergen Neuronen besteht. Da sich aus iPS-Zellen differenzierte Zellen häufig von Differenzierung zu Differenzierung etwas unterscheiden, wurden immer mehrere Differenzierungen pro Genotyp untersucht.

## 3.2. Molekülmarkierungen

Wie in [Unterabschnitt 2.2.1](#) beschrieben, gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten Zielstrukturen für die Fluoreszenzmikroskopie zu markieren. Dabei hängt sowohl die Auswahl des Fluorophors als auch die Entscheidung für einen Linker mit welchem der Farbstoff im Fall von organischen Fluorophoren an das Zielmolekül gekoppelt wird, vom jeweiligen Versuch ab. Hier soll kurz auf die in dieser Arbeit verwendeten Molekülmarkierungen und die dabei angewendeten Protokolle, sofern ich die Markierung selbst vorgenommen habe, eingegangen werden.

### 3.2.1. Markierungsverfahren

**Immunfluoreszenz.** Sowohl im Rahmen des Kooperationsprojekts mit Prof. Dr. Robert J. Kittel als auch mit Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch kamen indirekte Immunfärbungen zum Einsatz. Da die Färbungen bei beiden Projekten von meinen Kooperationspartnern durchgeführt wurden, gehe ich hier nicht detaillierter auf das Färbeprotokoll ein, fasse aber kurz die prinzipielle Vorgehensweise zusammen. Die Proben wurden fixiert, permeabilisiert und geblockt, um die Struktur zu erhalten, für die Antikörper zugänglich zu machen und unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurde das Präparat zuerst mit einem primären Antikörper gegen die jeweilige Zielstruktur inkubiert und schließlich der Farbstoff-gekoppelte sekundäre Antikörper zugegeben, welcher spezifisch an den primären Antikörper bindet. Bei Mehrfarbenproben kamen entsprechend mehrere primäre und sekundäre Antikörper zum Einsatz.

**Proteine-Tags.** Für die Photoschädigungsexperimente wurde unter anderem eine stabil transfizierte Zelllinie verwendet, in welcher das Zielmolekül H2B mit einem CLIP-Tag fusioniert ist. Bei solchen Protein-Tags, zu welchen auch der SNAP- oder Halo-Tag gehören, wird das Zielprotein genetisch mit einem Polypeptid fusioniert, welches spezifisch mit einem bestimmten Substrat ( $O^6$ -Benzylcytosin für den CLIP-Tag) reagiert, das wiederum an ein organisches Fluorophor gekoppelt ist [[CT12](#)]. In unserem Fall wurde H2B mit dem Farbstoff TMR gefärbt, indem die Zellen für 30 min bei 37 °C mit 0,2  $\mu$ M CLIP-Cell TMR-Star (New England Biolabs, S9219S)

in Medium inkubiert wurden. Anschließend wurden sie dreimal mit Medium gewaschen und dann umgehend gemessen.

**Strukturspezifische Substanzen.** Im Rahmen des Photoschädigungsprojektes wurden Aktin und Mikrotubuli nach Erreichen des sogenannten erstarrten Zustandes gefärbt. Aktin wurde dabei mit Phalloidin markiert, das zu den Phallootoxinen gehört, im Grünen Knollenblätterpilz vorkommt und eine hohe Affinität zu filamentösem F-Aktin besitzt [Wul+79]. Dazu wurden die bestrahlten und erstarrten U2OS-Zellen bei Raumtemperatur für 30 min mit 33 nM Phalloidin, gekoppelt an Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, A22287), in 1× PBS gefärbt. Nach der Färbung wurden die Proben mit 1× PBS gewaschen. Mikrotubuli wurden mit Taxol, auch Paclitaxel genannt, gefärbt - einem wichtigen Krebsmedikament, das ursprünglich aus der Rinde der Pazifischen Eibe gewonnen wurde und an  $\beta$ -Tubulin bindet [Wan+11]. Die Mikrotubuli-Färbung erfolgte durch 30 min Inkubation bei 37 °C mit 1  $\mu$ M SiR-Taxol [CM13] in Medium und anschließendem Waschen mit 1× PBS.

In den Kooperationsprojekten mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch wurde der Zellkern von meinen Kooperationspartnern mit DAPI angefärbt, um einzelne Zellen und Zellkörper identifizieren zu können. DAPI steht für 4',6-Diamidin-2-phenylindol und ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich in der kleinen Furche AT-reicher Sequenzen der DNS anlagert [Kap95].

### 3.2.2. Verwendete Fluorophore

#### Fluorophore für *d*STORM

Wie in [Unterabschnitt 2.2.1](#) beschrieben, hängt die Bildqualität bei *d*STORM entscheidend vom Schaltverhalten des Fluorophors ab. Mit Abstand das beste Blinkverhalten zeigen Alexa Fluor 647 (AF647) oder alternativ Cy5, weshalb in sämtlichen Einfarbenexperimenten einer der beiden, sich sehr ähnlichen Farbstoffe, zum Einsatz kam. Da beide beinahe das gleiche Absorptions- und Emissionsspektrum aufweisen, kann man sie jedoch leider nicht gemeinsam für Zweifarbenmessungen verwenden. Deshalb wurde hierfür entweder Alexa Fluor 647 oder Cy5 mit dem Farbstoff Alexa Fluor 532 (AF532) kombiniert. Dieser weist ebenfalls ein akzeptables Blinkverhalten auf, ist spektral gut von Alexa Fluor 647 oder Cy5 zu trennen und es existiert eine Schaltpuffer-Zusammensetzung, bei welcher sowohl Alexa Fluor 532 als auch Alexa Fluor 647 bzw. Cy5 blinken. Der standardmäßig verwendete Schaltpuffer besteht aus 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethylamin (MEA) und 1% Glucose in 1× PBS und wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Wurde ein ande-

### 3. Material und Methoden

rer Schaltpuffer verwendet, ist dessen Zusammensetzung bei der Beschreibung des jeweiligen Versuchs angegeben.

Für die Färbung der mit CLIP-H2B stabil transfizierten U2OS-Zelllinie (Photoschädigungsprojekt) wurde wie oben bereits erwähnt CLIP-Cell TMR-Star (New England Biolabs, S9219S) zur Färbung verwendet. TMR zeigt unter optimierten Bedingungen ein akzeptables Blinkverhalten, was ich für die stabile Zelllinie während meiner Masterarbeit [Wäl13] überprüft habe.

Zur Erzeugung einfacher Weitfeldbilder kann man an beiden *d*STORM-Aufbauten auch nicht oder bedingt *d*STORM-geeignete gängige Fluorophore einsetzen z.B. Alexa Fluor 488 oder DAPI. So kann man beispielsweise eine dritte Struktur markieren, um bestimmte Bereiche zu identifizieren, von der man keine hochaufgelöste Information benötigt.

#### Fluorophore für SIM

Für SIM eignen sich nahezu alle gängigen Fluorophore (siehe [Unterabschnitt 2.2.1](#)). In dieser Arbeit wurden Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 555 (AF555), Alexa Fluor 488 (AF488), sowie DAPI verwendet.

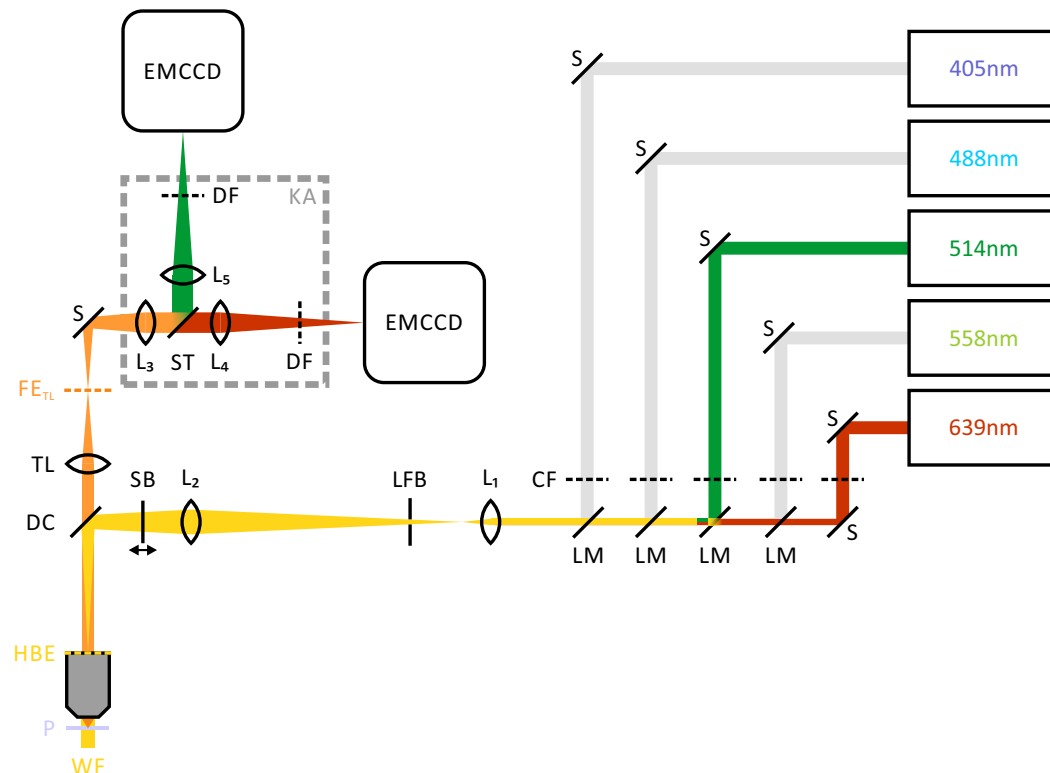
## 3.3. Datenaufnahme *d*STORM

### 3.3.1. Aufbau *d*STORM Mikroskope

Alle *d*STORM-Experimente wurden an zwei eigens am Lehrstuhl aufgebauten Mikroskopen durchgeführt [van+11b]. Der prinzipielle Aufbau eines solchen Mikroskops ist schematisch in [Abbildung 3.2](#) zu sehen und die wichtigsten Unterschiede der beiden verwendeten Mikroskope finden sich in [Tabelle 3.1](#).

Als Lichtquelle zur Anregung der Fluorophore in der Probe dienen Laser verschiedener Wellenlänge, deren Emissionslicht durch passende Clean-Up Filter (Semrock/Chroma) von unerwünschten Wellenlänge bereinigt wird. Anschließend werden alle Laserlinien durch entsprechende dichroitische Strahlteiler (LaserMUX, Semrock) kombiniert und der Laserstrahl wird durch geeignete Linsen auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert, welches sich im Objektiv-Revolver eines inversen Fluoreszenzmikroskops befindet. Das Anregungslicht verlässt das Objektiv als paralleles Lichtbündel und erreicht die Probe. Bei dieser Form der relativ großflächigen Beleuchtung spricht man auch von Weitfeld- oder Epi-Beleuchtung (siehe auch [Unterabschnitt 3.3.2](#)).





**Abbildung 3.2.: Schematische Darstellung eines typischen dSTORM Aufbaus.** Laserstrahlen verschiedener Wellenlänge (hier beispielhaft dargestellt für 514 nm (grün) und 639 nm (rot)) werden über Spiegel (S) und dichroitische Strahlteiler (LM) in einen gemeinsamen Strahlengang (gelb) kombiniert. Ihr Spektrum wird zuvor jeweils durch einen passenden Clean-Up Filter (CF) von unerwünschten Wellenlängen bereinigt. Durch zwei Linsen ( $L_1$  und  $L_2$ ) wird der Anregungsstrahl dann auf die hintere Brennebene (HBE) des Objektivs fokussiert, welches er als paralleles Strahlenbündel wieder verlässt und die Probe (P) in der Weitfeld- oder Epi-Konfiguration (WF) beleuchtet, wobei sich der beleuchtete Bereich mit der Leuchtblende (LFB) begrenzen lässt. Das durch die Anregung erzeugte Fluoreszenzlicht (orange) wird vom selben Objektiv wieder eingesammelt und durch einen dichroitischen Spiegel (DC) vom Anregungslicht getrennt. Es wird durch die Tubuslinse (TL) fokussiert, wodurch ein reelles Zwischenbild in der Fokalebene der Tubuslinse  $FE_{TL}$  entsteht. Schließlich erreicht es den Kameraadapter (KA). Hier wird das von zwei verschiedenen Fluorophoren stammenden Fluoreszenzlicht durch einen Strahlteiler (ST) aufgrund seiner unterschiedlichen Wellenlänge getrennt, durch entsprechende Detektionsfilter (DF) bereinigt und von zwei unabhängigen EMCCD-Kameras detektiert. Durch die Linsen im Kameraadapter ( $L_3$  und  $L_4$  bzw.  $L_3$  und  $L_5$ ) wird die resultierende Pixelgröße definiert.

Durch das Anregungslicht in der Probe hervorgerufene Fluoreszenz wird vom selben Objektiv wieder eingesammelt, durch einen dichroitischen Spiegel (Semrock) vom kürzerwelligen Anregungslicht getrennt, passiert eine Tubuslinse und erreicht den Kameraadapter. Bei einer Einfarbenmessung befinden sich in diesem

### 3. Material und Methoden

zwei weitere Linsen, welche die Pixelgröße definieren, sowie ein Detektionsfilter (Chroma/Semrock), welcher das Fluoreszenzlicht von unerwünschten Wellenlängen bereinigt. Bei Zweifarbenmessungen findet sich zwischen den beiden Linsen ein geeigneter Strahlteiler (Chroma), der das Fluoreszenzlicht der verwendeten Fluorophore trennt, sowie eine weitere Linse und ein weiterer Detektionsfilter (Chroma/Semrock). An den Kameraadapter anschließend befinden sich letztlich ein beziehungsweise zwei EMCCD-Kameras (iXon Ultra 897, Andor Technology), welche das Fluoreszenzlicht detektieren.

**Tabelle 3.1.: Wesentliche Unterschiede der genutzten dSTORM Mikroskope.**

	Mikroskop 1	Mikroskop 2
<b>Laser</b>	405 nm, 120 mW (iBeam smart, TOPTICA Photonics)	405 nm, 120 mW (iBeam smart, TOPTICA Photonics)
	488 nm, 200 mW (iBeam smart, TOPTICA Photonics)	488 nm, 200 mW (iBeam smart, TOPTICA Photonics)
	514 nm, 500 mW (Genesis MX STM, Coherent)	532 nm, 500 mW (gem, Laser Quantum)
	558 nm, 500 mW (Genesis MX STM, Coherent)	640 nm, 200 mW (iBeam smart, TOPTICA Photonics)
	639 nm, 1000 mW (Genesis MX STM, Coherent)	
<b>Objektiv</b>	APON 60XOTIRF (Olympus)	alpha Plan-Apochromat 100x / 1,46 Oil DIC (Zeiss)
<b>Stativ</b>	IX71 mit Z-Drift-Kompensator IX2-NPS (Olympus)	Axio Observer.Z1 mit automatisierter Fokuskorrektur Definite Focus (Zeiss)
<b>Experimente</b>	Photoschädigung durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 4.1)	Glutamatrezeptoren NMJ <i>Drosophila melanogaster</i> (Abschnitt 4.2) CDH13 und GluT3 im Zusammenhang mit ADHS (Abschnitt 4.3)

#### 3.3.2. Beleuchtungskonfiguration

Wie unter [Unterabschnitt 3.3.1](#) beschrieben wird der Laserstrahl auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert. Bei normaler Epi-Beleuchtung trifft er dabei ins Zentrum des Objektivs, wodurch das Anregungslicht parallelisiert wird und es zu einer relativ großflächigen Ausleuchtung der Probe kommt. Dadurch werden auch Bereiche unter- und oberhalb der Schärfeebene zur Fluoreszenz angeregt,

was sich einerseits negativ auf die Detektionseffizienz und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis auswirkt und andererseits auch zu einem Bleichen dieser Bereiche führt, sodass sie anschließend nicht mehr zur Verfügung stehen. Außerdem kommt es durch die großflächige Bestrahlung zu einer unnötig hohen Photoschädigung (siehe [Unterabschnitt 2.2.2](#)). [[Sch+19](#)]

Glücklicherweise gibt es die Möglichkeit das angeregte Volumen mit relativ einfachen Mitteln zu verkleinern. Dazu werden die Linsen im Anregungsarm des Mikroskops (siehe [Abbildung 3.2](#),  $L_1$  und  $L_2$ ) auf einer beweglichen Schiene montiert.

Durch diese Modifikation ist man nun in der Lage den Anregungsstrahl vom Zentrum des Objektivs in Richtung des Randes zu verschieben (siehe [Abbildung 3.3a](#)), sodass er nicht mehr senkrecht auf die Grenzfläche zwischen Deckglas und Probe fällt. Da er an dieser Grenzfläche von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium übergeht, kommt es nach dem Brechungsgesetz zu einer Brechung des Strahls vom Lot weg in Richtung des Deckglases [[Dem17](#)]. Dadurch entsteht ein schräges Lichtbündel, welches die Probe passiert, weshalb man diese Form der Beleuchtung als HILO-Konfiguration (von englisch „Highly Inclined and Laminated Optical sheet“) bezeichnet. Die Dicke  $dz$  des Lichtblattes ergibt sich aus:

$$dz = \frac{R}{\tan \Theta} \quad (3.1)$$

wobei  $R$  dem Durchmesser der beleuchteten Fläche in der Schärfenebene und  $\Theta$  dem Einfallswinkel des Laserstrahls in die Probe entspricht (siehe [Abbildung 3.3b](#)). Neben den gewünschten Effekten hat die Verkleinerung des angeregten Volumens durch die HILO-Konfiguration auch eine Erhöhung der Laserintensität pro Fläche zur Folge. [[TIS08](#); [TVE16](#)]

Wird der Laserstrahl noch weiter zum Rand des Objektivs hin bewegt, kommt es zur totalen internen Reflexion (TIR) an der Deckglas-Proben-Grenzfläche, sobald der Anregungsstrahl mit einem Winkel größer dem kritischen Winkel  $\alpha$  einfällt:

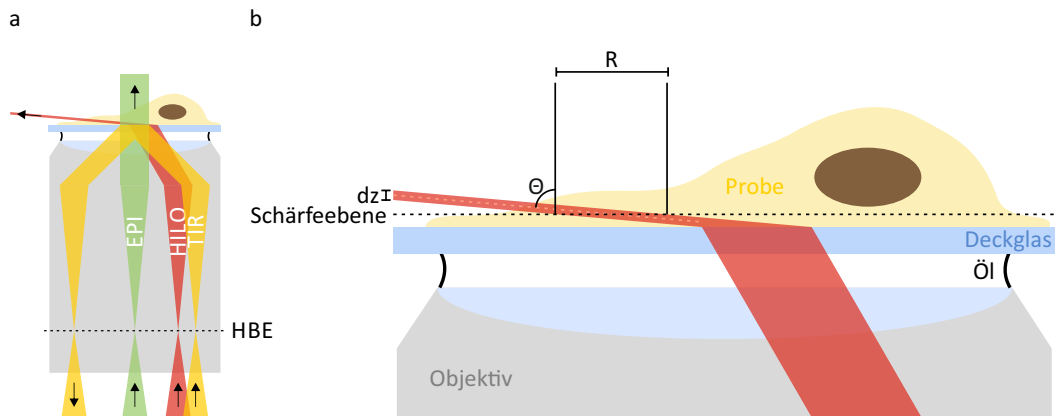
$$\alpha = \sin^{-1} \frac{n_2}{n_1} \quad (3.2)$$

mit  $n_1$  als Brechungsindex des optisch dichteren Deckglases und  $n_2$  als Brechungsindex der optischen dünneren wässrigen Probe [[Dem17](#)].

Hervorgerufen durch die Totalreflexion entsteht ein elektromagnetisches als evaneszent bezeichnetes Feld, welches sich in die Probe ausbreitet und dort Fluorophore anregt. Da die Stärke dieses evaneszenten Feldes exponentiell abfällt, fluoresziert jedoch nur ein sehr kleiner Bereich nahe des Deckglases, während der Rest der Pro-

### 3. Material und Methoden

be nicht beeinflusst wird. Macht man sich dieses Phänomen der totalen internen Reflexion zu nutze, spricht man von interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM). Sie eignet sich aufgrund der Eigenschaften des evaneszenten Feldes jedoch nur für sehr dünne Proben oder Präparate, bei welchen sich die Zielstruktur nah am Deckglas befindet. [Axe01; TVE16]



**Abbildung 3.3.: Beleuchtungskonfiguration.** (a) Der Anregungsstrahl wird auf die hinteren Brennebene (HBE) des Objektivs fokussiert. Trifft er dabei das Zentrum der HBE, wird das Licht parallelisiert und leuchtet einen großen Bereich der Probe aus (grün, Epi-Beleuchtung). Durch eine Verschiebung des Strahls hin zu den Rändern des Objektivs, verändert man die Art der Beleuchtung: Bei der HILO-Beleuchtung (rot) wird der Anregungsstrahl an der Grenzfläche zwischen Deckglas und Probe stark gebrochen, was eine Art schräges Lichtblatt hervorruft. Eine weitere Verschiebung des eintreffenden Anregungsstrahls zum Rand des Objektivs hin, führt dann zur Totalreflexion an der Glas-Proben-Grenzfläche (gelb, TIR). Dabei entsteht in der Probe ein evaneszentes Feld, was die Fluorophore zur Fluoreszenz anregt. (b) Wichtige Größen zur Charakterisierung der HILO-Beleuchtung sind die Dicke des Lichtblatts ( $dz_I$ ), der Winkel mit welchem das Lichtblatt auf die Probe trifft ( $\Theta$ ), sowie der Durchmesser der beleuchteten Fläche in der Schärfenebene ( $R$ ).

#### 3.3.3. Datenaufnahme und -prozessierung *d*STORM

Standardmäßig wurden pro finalem Bild 15000 Einzelbilder mit einer Integrationszeit von 10 ms aufgenommen und diese als Bildstapel abgespeichert. Auch für die absolute Quantifizierung der Glutamaterezeptoren hat sich herausgestellt, dass man davon ausgehen kann, über diesen Zeitraum alle Rezeptoren mindestens einmal erfasst zu haben.

Bei Zweifarbenmessungen wurden die beiden Kanäle sequentiell aufgenommen, wobei mit dem längerwelligen Kanal begonnen wurde um dessen Photozerstörung durch das kürzerwellige Licht zu verhindern.

**Rekonstruktion.** Die bei der Aufnahme gewonnenen Rohdaten wurden mit dem Fiji-Plugin ThunderSTORM [Ove+14] oder mit rapidSTORM [WOL+10] analysiert. Beide Programme dienen der automatisierten Lokalisation der einzelnen Fluorophore. So erhält man eine Lokalisationstabelle, welche unter anderem sämtliche ermittelten Koordinaten, sowie die dazugehörigen Intensitäten und Lokalisationshäufigkeiten enthält. Auch kann man sich basierend auf dieser Tabelle ein rekonstruiertes Bild mit einer definierten Pixelgröße (hier 10 oder 15 nm px<sup>-1</sup>) ausgegeben lassen.

Bei den mit ThunderSTORM rekonstruierten Bildern wurde die im Plugin integrierte laterale Driftkorrektur (mittels Kreuzkorrelation oder durch das Tracking in der Probe vorhandener Gold-Beads) verwendet.

**Ausrichtung von Zweifarbenbildern.** Licht verschiedener Wellenlänge wird von den optischen Elementen eines Mikroskops unterschiedlich gebrochen und führt zu chromatischen Aberrationen [Nor06]. Deshalb wurden bei Zweifarbenaufnahmen der grüne (Alexa Fluor 532) und der rote (Alexa Fluor 647) Kanal nach der Rekonstruktion mit dem Fiji-Plugin bUnwarpJ [Arg+06] zueinander ausgerichtet. Dazu wurden alle zwei Stunden mehrere Bilder von einer Probe mit fluoreszierenden Beads (TetraSpeck Fluorescent Microspheres Size Kit, Thermo Fisher, T14792) aufgenommen und dann auf die gleiche Art und Weise rekonstruiert wie die auszurichtenden Bilder. Hierbei ist insbesondere die selbe Pixelgröße zu wählen. Anhand der beiden rekonstruierten TetraSpeck-Bilder (grüner und roter Kanal) wurde dann mit bUnwarpJ eine elastische Transformationsmatrix erstellt. Um diese zu optimieren, wurden in beiden Kanälen neun, über das ganze Bild verteilte Stellen als sogenannte Landmarks markiert, an welchen sich einander entsprechende Beads befanden. Die ausgegebene Transformationsdatei wurde abgespeichert, zur Kontrolle auf die TetraSpeck-Bilder angewendet und dann zur Ausrichtung der eigentlichen Zweifarbenbilder eingesetzt.

### 3.4. Quantifizierung

Zur relativen und absoluten Quantifizierung wurden die Rohdaten mit ThunderSTORM prozessiert und aus der Lokalisationstabelle ein Bild in Form eines 2D Histogramms rekonstruiert, in welchem in jedem Pixel die zugehörige Lokalisationshäufigkeit gespeichert wird. Anschließend wurden diese Histogramme mittels selbstgeschriebener Fiji Makros ausgewertet, welche sich an der von Ehmman *et al.* [Ehm+14] beschriebenen Quantifizierung von Bruchpilot orientieren. Im Detail

### 3. Material und Methoden

wurden die Makros an die jeweils durch die Struktur und das Experiment vorgegebenen Bedingungen angepasst (siehe unten), funktionieren prinzipiell aber alle nach dem gleichen Prinzip: Anhand der zu quantifizierenden Struktur oder, falls sich diese nicht eignet, anhand einer passenden Referenzstruktur, wird eine Maske erstellt. Dann wendet man diese Maske auf die 2D Histogramme an und lässt sich von Fiji die gewünschten Werte innerhalb der Maske ausgeben. In unserem Fall sind dies vor allem die Anzahl der Lokalisationen, sowie die Fläche.

#### 3.4.1. Absolute Quantifizierung des A-Typ Glutamatrezeptors von *Drosophila melanogaster*

Zur Bestimmung der absoluten Anzahl des A-Typ Glutamatrezeptors pro postsynaptischer Verdichtung (PSD) mussten eine Reihe an Vorversuchen durchgeführt werden (siehe [Unterabschnitt 2.2.3](#)), da nicht bekannt war, bei welcher Konzentration des primären Antikörpers sämtliche Rezeptoren erkannt werden, wie viele sekundäre Antikörper pro primärem Antikörper binden und wie viele Fluorophore an jeden sekundären Antikörper gekoppelt sind. Dabei gingen wir ähnlich wie in einem früheren Kooperationsprojekt der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Markus Sauer und Prof. Dr. Robert J. Kittel vor, in welchem Bruchpilot auf der präsynaptischen Seite der NMJ von *Drosophila melanogaster* [\[Ehm+14\]](#) quantifiziert wurde.

**Datenerfassung.** In einer ersten Versuchsreihe bestimmten wir die Anzahl der Lokalisationen pro PSD bei verschiedenen Konzentrationen (Verdünnungsreihe von 1 bis 1 : 100000) des sekundären mit Cy5-gekoppelten Antikörpers, wobei eine Verdünnung von 1 einer Konzentration von 52 nM entspricht. Die Konzentration des primären Antikörpers wurde dabei konstant gehalten (Arbeitskonzentration von 1 : 2000) und der Rezeptor wurde mit einem zweiten sekundären Antikörper, der mit Alexa Fluor 532 markiert war, co-gefärbt, um die Gesamtkonzentration des sekundären Antikörpers gleich zu halten und die PSD auch bei geringen Konzentrationen des Cy5-gekoppelten Antikörpers noch verlässlich identifizieren zu können. Konkret wurden beispielsweise die „fehlenden“ 90% sekundären Antikörpers bei einer Verdünnung des Cy5-gekoppelte Sekundärantikörpers von 1 : 10 durch den zweiten mit Alexa Fluor 532 markierten Antikörper „aufgefüllt“, um so bei einer Gesamtkonzentration von 52 nM zu bleiben. Pro Verdünnung wurden zwischen 50 und 247 PSD erfasst.

Als nächstes wurde der primäre Antikörper titriert (Verdünnungsreihe von 1 : 20 bis 1 : 40000), wobei nun die Konzentration des sekundären Antikörpers konstant gehalten wurde (10% Cy5- und 90% Alexa Fluor 532-gekoppelter Antikörper). Für

jede Verdünnung wurden zwischen 94 und 325 PSD gemessen.

Dann wurde der Glutamatrezeptor mit einer sehr geringen Konzentration des primären Antikörpers (1 : 80000) und 100% Cy5-gekoppeltem sekundären Antikörper markiert, um später das Signal, das auf einzelne primäre Antikörper zurückzuführen ist, ermitteln zu können. Hierfür wurden 114 PSD aufgenommen. Um die PSD zumindest grob lokalisieren zu können wurde gegen Bruchpilot co-gefärbt.

Zu guter Letzt wurden dann noch einige Messungen (327 PSD) unter experimentellen Bedingungen (primärer Antikörpers 1 : 2000 verdünnt und 52 nM des sekundären mit Cy5 gekoppelten Antikörpers) durchgeführt.

**Bestimmung der Lokalisationshäufigkeiten mit Fiji.** Aus den Rohdaten wurden mit ThunderSTORM Lokalisationstabellen erstellt. Anschließend wurde eine Driftkorrektur mittels Kreuzkorrelation durchgeführt. Bei sehr geringen Konzentrationen der Antikörper musste auf diese verzichtet werden, da die Kreuzkorrelation aufgrund der undeutlichen Strukturen zu Fehlern führte. Durch die Filterung der Lokalisationsdaten wurden nur Lokalisationen ausgewertet, welche eine Intensität von 150 bis 2000 (Cy5) bzw. 1500 (Alexa Fluor 532) Photonen, einen Sigmawert (Standardabweichung des Gauss-Fits) unter 200 nm und eine laterale Fitungenauigkeit von weniger als 30 nm aufwiesen. Die verbliebenen Lokalisationen wurden dann als 2D Histogramm mit einer Pixelgröße von 10 nm px<sup>-1</sup> ausgegeben.

Aus dem 2D Histogramm wurde wie oben erwähnt mithilfe eines selbstgeschriebenen Fiji Makros die Lokalisationshäufigkeit pro PSD extrahiert. Für die Messungen unter experimentellen Bedingungen sowie die Antikörpertitrationen bei hohen Konzentration (100%) des sekundären Antikörpers wurde die Maske direkt anhand des Signals des Cy5-markierten Glutamatrezeptors erstellt. Bei geringeren Konzentrationen wurde das Signal der Co-Färbung (Alexa Fluor 532) verwendet. Bei der Ermittlung des Signals einzelner primärer Antikörper wurde die Maske anhand des Bruchpilot-Signals erstellt. Von den erhaltenen Masken wurden Bereiche abgezogen, welche eine Fläche unter 300 px<sup>2</sup> aufwiesen. Die durch das Makro identifizierten PSD wurden manuell überprüft. Im Falle der Analyse einzelner primärer Antikörper wurden nur einzelne Spots innerhalb einer PSD ausgewertet.

**Berechnung der absoluten Anzahl.** Die Anzahl der Glutamatrezeptoren pro PSD ergibt sich nach der Methode vom Ehmman *et al.* aus:

$$GluRIIA_{\text{PSD}} = \frac{Loc_{\text{PSD}}}{L_E(1.AK)} \times \frac{L_1(2.AK)}{L_{\text{PSD}}(2.AK_{\text{EB}})} \times \frac{L_1(1.AK)}{L_{\text{PSD}}(1.AK_{\text{EB}})} \quad (3.3)$$

wobei sämtliche Variablen dieser Gleichung durch die beschriebenen Vorversuche

### 3. Material und Methoden

folgendermaßen gewonnen wurden:

Die bei den Titrations des primären und sekundären Antikörpers erhaltenen Lokalisationen pro PSD ( $L_{\text{PSD}}$ ) wurde gegen die jeweilige Antikörperkonzentration aufgetragen und dann mit der logistischen Funktion

$$L_{\text{PSD}} = L_1 + \frac{L_2 - L_1}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad (3.4)$$

gefittet. Aus der Titration des sekundären Antikörpers erhält man auf diesem Weg die Anzahl der Lokalisationen pro PSD bei Sättigung mit dem sekundären Antikörper  $L_1(2.AK)$  und die Anzahl der Lokalisationen pro PSD unter experimentellen Bedingungen des sekundären Antikörpers  $L_{\text{PSD}}(2.AK_{\text{EB}})$ . Durch die Antikörpertitration des primären Antikörpers lässt sich entsprechend die Anzahl der Lokalisationen pro PSD bei Sättigung mit dem primären Antikörper  $L_1(1.AK)$  und die Anzahl der Lokalisationen pro PSD unter experimentellen Bedingungen des primären Antikörpers  $L_{\text{PSD}}(1.AK_{\text{EB}})$  ermitteln.  $x_0$  beschreibt die Verdünnung bei welcher die mittlere Anzahl an Lokalisationen erreicht wird und  $p$  die Steilheit der Kurve.  $L_2$  gibt jeweils den unteren Sättigungswert oder auch die Lokalisationen pro Antikörper an, wurde für die Berechnung aber nicht benötigt.

Durch die beschriebene Markierung mit einer extrem geringen Konzentration des primären Antikörpers (1 : 80000), 100% Cy5-gekoppeltem Antikörper und einer Co-Färbung mit Bruchpilot wurde die Anzahl der Lokalisationen pro primärem Antikörper  $L_E(1.AK)$  ermittelt.

Als letzte fehlende Variable zur Ermittlung der absoluten Anzahl bleibt dann noch  $Loc_{\text{PSD}}$ , welche die Anzahl der Lokalisationen pro PSD unter experimentellen Bedingungen angibt und entsprechend durch einige Messungen unter experimentellen Bedingungen bestimmt wird.

Die tatsächlichen ermittelten Werte und Graphen finden sich in [Abschnitt 4.2](#).

#### 3.4.2. Relative Quantifizierung von GluT3, Bassoon und Homer

Wie unter [Unterabschnitt 3.1.4](#) beschrieben, weisen die im Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Prof. Klaus-Peter Lesch untersuchten iPS-Zelllinien Kopienzahlvariationen des *SLC2A3*-Gens auf. Um herauszufinden, ob sich diese Mengenunterschiede auch auf Proteinebene zeigen und ob sie sich auf die Synapsenbildung - genauer gesagt auf die Menge der Synapsenproteine Bassoon und Homer, auswirken, wurde die Lokalisationshäufigkeit der drei Proteine in allen drei Zelllinien bestimmt und relativ zwischen den Genotypen verglichen. Außerdem wurde untersucht, ob



und wie sich der Entzug von Glucose auf die Menge des Glucosetransporters auswirkt. Dazu wurde bei allen drei Zelllinien acht Tage lang kein Mediumwechsel durchgeführt, sodass die Glucosekonzentration nach und nach absinkt.

**Datenerfassung.** Die Datenerfassung aller drei Proteine erfolgte in unabhängigen Experimenten. GluT3 war mit Alexa Fluor 647 markiert. Bassoon war ebenfalls mit Alexa Fluor 647 markiert, allerdings wurden die Proben gegen TPH2 co-gefärbt. Die Daten zur Homer-Quantifizierung stammen aus Zweifarbenmessungen bei denen Bassoon mit Alexa Fluor 647 und Homer mit Alexa Fluor 532 gefärbt waren. Zur späteren Driftkorrektur wurden alle Proben vor der Messung für 30 min mit Gold-Beads (Nanopartz, Gold Nanorods) in  $1 \times$  PBS (1:100) beschichtet.

Eine Übersicht über die untersuchten Differenzierungen, sowie die Stichprobenzahl finden sich in [Tabelle 3.2](#).

**Bestimmung der Lokalisationshäufigkeiten mit Fiji.** Wie im Falle des Glutamatrezeptors wurden aus den Rohdaten mit ThunderSTORM Lokalisations Tabellen erstellt. Die Driftkorrektur erfolgte anhand der Gold-Beads in der Probe. Es wurden nur Lokalisationen berücksichtigt, deren Intensität über 150 (Cy5) bzw. zwischen 150 und 1500 (Alexa Fluor 532) Photonen lag und die einen Sigmawert (Standardabweichung des Gauss-Fits) unter 200 nm und eine laterale Fitungenauigkeit von weniger als 30 nm aufwiesen. Für die so gefilterten Lokalisationen wurden dann ein 2D Histogramm mit einer Pixelgröße von  $10 \text{ nm px}^{-1}$  erstellt.

Um aus dem 2D Histogramm die Lokalisationen pro Fläche zu gewinnen, wurde ein Makro geschrieben, welches die im Bild vorhandenen Fasern erkennt und als Maske auf das 2D Histogramm angewendet. Für GluT3 und Bassoon konnte die Maske direkt anhand der eigenen Struktur erstellt werden. Für Homer wurde die Maske aus dem co-gefärbten Bassoon-Signal generiert. Für Bassoon wurde zusätzlich, wenn möglich, auch eine Maske anhand des zugehörigen TPH2-Bildes erstellt, um die Analyse auf serotonerge Neurone zu begrenzen. Allerdings war das Signal dafür in vielen Fällen zu schwach. Die durch das Makro erkannten Fasern wurden manuell überprüft bevor die Daten weiter analysiert wurden.

**Berechnung der Lokalisationen pro Fläche.** Die durch das Fiji Makro erhaltenen Werte wurden gesammelt, die Lokalisationen pro Fläche berechnet und die Ergebnisse für die unterschiedlichen Genotypen und Differenzierungen verglichen.

### 3. Material und Methoden

**Tabelle 3.2.: Genotypen und Differenzierungen für die relative Quantifizierung von Bassoon, Homer und GluT3.** Für jede relativ quantifizierte Struktur (Bassoon, Homer und GluT3) und jeden Genotypen (CJ1, CJ5 und CJ7) sind die untersuchten Differenzierungen (z.B. 2018-5, durchnummeriert) und in Klammern jeweils die Anzahl ausgewerteter Bilder angegeben. Unter der Auflistung der Differenzierungen steht jeweils die Gesamtzahl an Bildern  $n$  (Summe der Bilder pro Differenzierung). CJ1 ist die gesunde Kontrolle, CJ5 und CJ7 sind an ADHS-erkrankte Patienten mit einer Duplikation (CJ5) bzw. Deletion (CJ7) des *SLC2A3*-Gens.

	<b>CJ1</b>	<b>CJ5</b>	<b>CJ7</b>
<b>Bassoon (Bassoon-Maske)</b>	2018-5 (20)	2018-5 (22)	2018-5 (23)
	2018-7 (21)	2018-7 (21)	2018-7 (20)
	2018-10 (9)	2018-8 (15)	2018-8 (15)
	2019-4 (5)	2019-4 (6)	2019-4 (5)
	<b><math>n = 55</math></b>	<b><math>n = 64</math></b>	<b><math>n = 63</math></b>
<b>Bassoon (TPH2-Maske)</b>	2018-5 (21)	2018-5 (21)	2018-5 (22)
	2018-7 (22)	2018-7 (20)	2018-7 (20)
	<b><math>n = 43</math></b>	<b><math>n = 41</math></b>	<b><math>n = 42</math></b>
<b>Homer</b>	2018-5 (8)	2018-5 (5)	2018-5 (5)
	MEA2 (5)	2018-7 (5)	2018-7 (6)
	2018-8 (6)	2018-8 (4)	2018-8 (4)
	2019-4 (5)	2019-4 (5)	2019-4 (5)
	<b><math>n = 24</math></b>	<b><math>n = 19</math></b>	<b><math>n = 20</math></b>
<b>GluT3</b>	2018-11 (10)	2018-11 (9)	2018-11 (10)
	2018-13 (10)	2018-13 (10)	2018-13 (12)
	2019-1 (5)	2019-1 (5)	2019-1 (2)
	2019-2 (5)	2019-2 (5)	2019-2 (5)
	2019-4 (7)	2019-4 (9)	2019-4 (5)
	<b><math>n = 37</math></b>	<b><math>n = 38</math></b>	<b><math>n = 34</math></b>
<b>GluT3 nach Glucoseentzug</b>	2019-1 (5)	2019-1 (5)	2019-1 (5)
	2019-2 (5)	2019-2 (5)	2019-2 (8)
	2019-4 (6)	2019-4 (10)	2019-4 (6)
	<b><math>n = 16</math></b>	<b><math>n = 20</math></b>	<b><math>n = 19</math></b>

### 3.5. Photoschädigungsexperimente

Für die Experimente zur Photoschädigung wurden die Zellen ein oder zwei Tage vor den Experimenten in Petrischalen mit eingepägtem Gitter (ibidi, 81168) ausgesät, sodass man sie nach der Bestrahlung wieder finden kann.

**Bestrahlung.** Die Versuche selbst wurden an lebenden Zellen vorgenommen, weshalb sie in Medium ohne Phenolrot (U2OS und COS-7: DMEM F12 mit 15 mM HEPES (Sigma, D6434), HeLa: RPMI-1640 (Sigma, R7509)) stattfanden. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen standardmäßig bei 21 °C Raumtemperatur mit der gewünschten Wellenlänge, einer bestimmten Laserintensität und für eine Dauer von 240 s in Epi- oder HILO-Konfiguration bestrahlt, wobei die Gesamtzeit des Experiments konstant bei 2,5 h gehalten wurde. Durch die Leuchtfeldblende wurde die Bestrahlung exakt auf die Zellen im Sichtfeld ( $65,5 \mu\text{m} \times 65,5 \mu\text{m}$ ) begrenzt und durch eine starke Aufweitung des Laserstrahls wurden eine nahezu homogene Ausleuchtung erreicht. Neben der Variation von Wellenlänge, Laserleistung, Bestrahlungsdauer und Beleuchtungs-Konfiguration wurden weiterhin Versuche bei 37 °C und unter Zugabe von Ascorbinsäure durchgeführt. Die Messung bei 37 °C wurde durch die Verwendung einer am Lehrstuhl gebauten Inkubationskammer, welche auf den x-y-Tisch des Mikroskops gestellt wird, ermöglicht. Die Ascorbinsäure wurde eine Stunde vor der Messung mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu den Zellen gegeben und nach der Bestrahlung wieder durch Medium ohne Ascorbinsäure ersetzt.

**Bestimmung der Laserleistungsdichte.** Die Laserleistung wurde oberhalb des Objektivs gemessen (LabMax-TO, Coherent). Ausgehend davon lässt sich die Leistungsdichte  $I$  in der Probe berechnen. In der Epi-Konfiguration ergibt sich diese einfach aus der gemessenen Leistung  $P$  und der bekannten Fläche des Sichtfeldes  $A_{\text{SF}}$ :

$$I_{\text{Epi}} = \frac{P}{A_{\text{SF}}} \quad (3.5)$$

In der HILO-Konfiguration entspricht die bestrahlte Fläche  $A_{\text{HILO}} = R \cdot dz$  mit  $R$  als Durchmesser der beleuchteten Fläche in der Schärfeebene und  $dz$  als Dicke des gebrochenen Lichtbündels ([Unterabschnitt 3.3.2](#)). Nach Tokunaga *et al.* lässt sich  $dz$  durch  $dz = \frac{R}{\tan \Theta}$  berechnen, wobei  $\Theta$  der Einfallswinkel des Lichtblatts ist und  $R$  aufgrund der Begrenzung der Bestrahlung auf das Sichtfeld bekannt ist ( $R = 65,5 \mu\text{m}$ ). Um  $\Theta$  zu erhalten, wurde ein realistischer HILO-Winkel einmalig mithilfe einer gefärbten Probe eingestellt, die Position, an welcher der Laserstrahl

### 3. Material und Methoden

die Wand trifft, als Referenzpunkt für zukünftige Messungen markiert und der Winkel dann mittels einfacher Trigonometrie berechnet. Somit kann dann auf  $dz$  rückgeschlossen und die Leistungsdichte bestimmt werden:

$$I_{\text{HILO}} = \frac{P}{A_{\text{HILO}}} = \frac{P}{R \cdot dz} = \frac{P}{R^2} \tan \Theta \quad (3.6)$$

Durch Fehler bei der Justierung der Leuchtfeldblende, der Bestimmung von  $\Theta$  und der Messung der Laserleistung, ist bei der Berechnung der Leistungsdichte von einer Ungenauigkeit von 5 – 6% auszugehen.

**Langzeitbeobachtung nach Bestrahlung.** Nach der Gesamtdauer von 2,5 h wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt und die bestrahlten Zellen in einem Tischmikroskop mit Inkubator (BioStation IM, Nikon) für 20 – 24 h im Phasenkontrast beobachtet. Dazu wurde alle 5 min ein Bild aufgenommen und diese Bilder schließlich zu einem Film zusammengesetzt, welcher dann hinsichtlich Teilungsfähigkeit, Apoptose und anderer morphologischer Veränderungen analysiert wurde. Insbesondere wurde der Anteil toter und erstarrter Zellen bestimmt und als quantitatives Maß der Photoschädigung verwendet.

**Aktin- und Mikrotubuli-Färbung.** Um herauszufinden, ob Zellen, die durch die Bestrahlung erstarren (siehe [Unterabschnitt 2.2.2](#)), einen ähnlichen Zustand aufweisen wie nach einer chemischen Fixierung, wurde das Cytoskelett (Mikrotubuli und Aktin) solcher Zellen gefärbt. Dazu wurden U2OS-Zellen der stabil transfizierten Zelllinie bei 37 °C für 240 s bei 405 nm mit einer Leistungsdichte von 0,05 kW cm<sup>-2</sup> (Mikrotubuli-Färbung) beziehungsweise 0,24 kW cm<sup>-2</sup> (Aktin-Färbung) bestrahlt und anschließend gefärbt und mikroskopiert. Der hierzu verwendete Schaltpuffer bestand aus 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethylamin (MEA), 4% Glucose, 10 U/ml Glucoseoxidase und 200 U/ml Catalase in 1× PBS und wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

### 3.6. SIM

SIM-Bilder wurden an einem kommerziellen Mikroskop (ELYRA, Zeiss) mit einem Ölimmersionsobjektiv (Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil Dic M27) aufgenommen. Die Fluorophore wurden mit Lasern der Wellenlänge 643 nm (Alexa Fluor 647), 561 nm (Alexa Fluor 555), 488 nm (Alexa Fluor 488) und 405 nm (DAPI) angeregt und das Fluoreszenzlicht mit passenden Detektionsfiltern aufgereinigt: LP 655 (Alexa Fluor 647), BP 570–620 + LP 750 (Alexa Fluor 555), BP 495–550 + LP 750 (Alexa Fluor

488) und BP 420–480 + LP 750 (DAPI). Die Aufnahmen erfolgten mit fünf Rotationen und fünf Verschiebungen der Phasen des Beleuchtungsmusters. Die erhaltenen Daten wurden mit der ZEN Software (Zeiss) im manuelle Modus prozessiert. Hierbei wurden die Standard ELYRA Einstellungen übernommen, jedoch die Option „Raw Scale“ aktiviert, um den dynamischen Umfang unverändert beizubehalten und somit die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proben zu garantieren. Anschließend wurden die vier Farbkanäle mit der ZEN Software zueinander ausgerichtet.

Zur Visualisierung dreidimensionaler Strukturen wurden Z-Stapel mit 125 nm Intervallen aufgenommen. Die Prozessierung erfolgte wie oben beschrieben. Die 3D-Rekonstruktion und Animation der prozessierten Bilder wurden anschließend mit Imaris (Bitplane) vorgenommen.

### 3.7. Verwendete Software

**Solis.** Mit der Software Solis der Firma Andor wurden die an den *d*STORM-Eigenbauten genutzten Kameras von Andor gesteuert. Sie wurde genutzt um sämtliche kamerabedingten Aufnahmeeinstellungen (z.B. Integrationszeit, Gain, Anzahl der aufgenommen Bilder) vorzunehmen.

**Lasersteuerung.** Um die Laserleistung an den *d*STORM-Aufbauten zu regulieren wurde die jeweils vom Hersteller zur Verfügung gestellte Software verwendet: TOPAS iBeam smart GUI von TOPTICA, OPSP gui von Coherent und RemoteApp von Laser Quantum.

**ZEN.** Die Steuerung des SIM ELYRA (Zeiss), sowie die Prozessierung und Ausrichtung der SIM-Daten erfolgte mit der von Zeiss herausgegebenen Mikroskopsoftware ZEN.

**BioStation IM.** Das Tischmikroskop BioStation IM (Nikon) wurde mit der von Nikon mitgelieferten Software bedient.

**Fiji.** Die auf ImageJ basierende Open Source Software Fiji [Sch+12] wurden für verschiedenen Analysen mikroskopisch aufgenommener Bilder verwendet (siehe oben). Unter anderem kamen die Plugins ThunderSTORM [Ove+14] und bUnwarppJ [Arg+06] zur Anwendung. Außerdem habe ich einige eigene Makros zur Datenauswertung geschrieben.

**rapidSTORM.** Neben ThunderSTORM (Fiji Plugin) wurde die Software rapidSTORM [Wol+12] zur Prozessierung aufgenommener *d*STORM Daten (Lokalisation der Fluorophore und Rekonstruktion des hochaufgelösten Bildes) verwendet.

**Imaris.** Die von Bitplane entwickelte Bildanalysesoftware Imaris wurde zur Vi-

### *3. Material und Methoden*

sualisierung dreidimensionaler SIM-Daten verwendet.

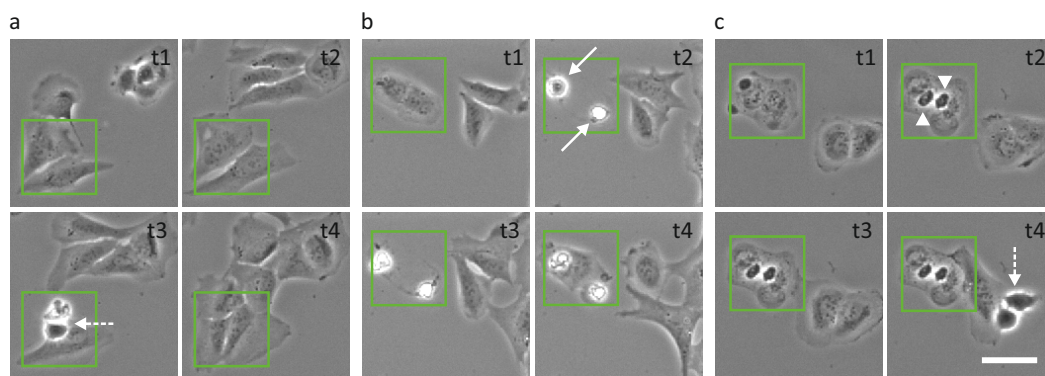
**OriginLab.** Mit der Software OriginLab wurden quantitative Daten analysiert und grafisch dargestellt.

**CorelDraw.** Die Erstellung sämtlicher Abbildungen erfolgte mit dem Vektorgrafikprogramm Corel Draw.

## 4 | Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Photoschädigung durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie

Die Bestrahlung mit bei SMLM-Versuchen typischerweise verwendeten Laserintensitäten ( $1\text{--}3\text{ kW cm}^{-2}$ ) kann zur Photoschädigung der untersuchten Zellen führen (siehe [Unterabschnitt 2.2.2](#)). Eine relativ einfache Methode um zu überprüfen, ob und wie stark die bestrahlten Zellen beschädigt sind, besteht darin, sie nach der Bestrahlung 20-24 h zu beobachten.



**Abbildung 4.1.: Kategorisierung nach Schwere der Photoschädigung.** Beobachtet man bestrahlte Zellen (innerhalb der grünen Quadrate) nach der Bestrahlung für 20-24 h, kann man sie abhängig vom Grad der Photoschädigung in drei Kategorien einteilen: (a) Ungeschädigte Zellen sehen morphologisch aus wie unbestrahlte Zellen, bewegen und teilen sich. (b) „Apoptotische“ Zellen leben nur noch wenige Stunden weiter, lösen sich dann ab und sterben. (c) „Erstarrete“ Zellen wirken wie fixiert und haften fest an der Oberfläche. Die gezeigten Bilder wurden 1,15 h ( $t_1$ ), 6,15 h ( $t_2$ ), 10,30 h ( $t_3$ ) und 16,30 h ( $t_4$ ) nach der Bestrahlung ( $0,00\text{ kW cm}^{-2}$  (a),  $0,49\text{ kW cm}^{-2}$  (b) bzw.  $1,50\text{ kW cm}^{-2}$  (c) bei  $514\text{ nm}$  für 240 s) in einem Tismikroskop mit Inkubator aufgenommen. Die zugehörigen Videos sind in [\[Wäl+15\]](#) veröffentlicht. Die Pfeile markieren sich teilende (gestrichelte Pfeile), apoptotische (durchgezogene Pfeile) beziehungsweise erstarrete (Pfeilköpfe) Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht  $50\text{ }\mu\text{m}$ . Diese Abbildung wurde leicht abgewandelt aus: „[Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy](#)“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [\[Wäl+15\]](#), lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](#) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Bereits in meiner Masterarbeit konnte ich so zeigen, dass man die bestrahlten Zellen in drei unterschiedlich stark geschädigte Kategorien einteilen kann ([Abbildung 4.1](#)): (1) „Gesunde“ Zellen, die sich in Morphologie und Zellteilung während der Beobachtungszeit nicht von unbestrahlten Zellen unterscheiden. (2) „Apoptotische“ Zellen, die keine oder eine verlangsamte Zellteilung zeigen, sich von der Oberfläche ablösen und sterben, wobei hier nicht sicher ist, ob es sich um Apoptose oder eine andere Art von Zelltod handelt. (3) „Erstarrte“ Zellen, die sich nicht mehr teilen oder bewegen und fest an der Oberfläche zu haften scheinen. Im Folgenden werden „apoptotische“ und „erstarrte“ Zellen in den meisten Fällen der Einfachheit halber als „tot“ zusammengefasst.

Mit Hilfe dieser Einteilung wurde der durch Bestrahlung hervorgerufene Grad der Photoschädigung unter verschiedenen Bedingungen untersucht und quantifiziert. Dazu ermittelte ich jeweils den Anteil apoptotischer, erstarrter oder toter Zellen in Folge der Bestrahlung. Wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, wurden die Messungen an der stabil mit dem Konstrukt CLIP-H2B transfizierte U2OS-Zelllinie (siehe [Unterabschnitt 3.1.1](#)) durchgeführt und die Zellen mit einer Wellenlänge von 514 nm, für eine Dauer von 240 s und bei Raumtemperatur (21 °C) bestrahlt. Um die gefunden Zusammenhänge verständlich und vollständig darzustellen, werden hier auch einige Messdaten, die ich während meiner Masterarbeit ([\[Wäl13\]](#)) erfasst habe, mit einbezogen (Zuordnung siehe [Tabelle 4.1](#)). Der Großteil der gezeigten Ergebnisse wurde in [\[Wäl+15\]](#) veröffentlicht.

### 4.1.1. Intensitätsabhängigkeit

In einer ersten Reihe an Versuchen, habe ich analysiert, inwiefern der Grad der Photoschädigung von der verwendeten Laserintensität ( $0\text{-}3\text{ kW cm}^{-2}$ ) abhängt. Wie zu erwarten, nimmt die Photoschädigung mit steigender Laserintensität zu. Trägt man den Anteil toter Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Laserintensität ( $I$ ) auf, zeigt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf (siehe [Abbildung 4.2](#) für unbehandelte U2OS-Zellen), welcher sich mit einer logistischen Funktion der Form

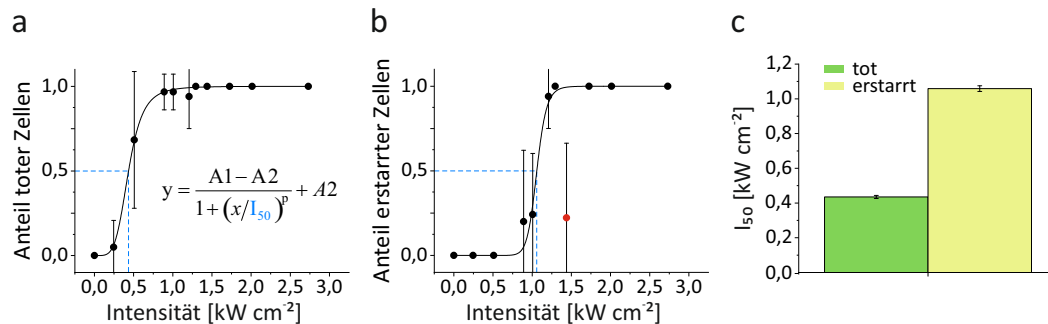
$$\text{Anteil toter Zellen} = \frac{A1 - A2}{1 + (I/I_{50})^p} + A2 \quad (4.1)$$

fitte lässt, wobei  $A1$  und  $A2$  dem unteren beziehungsweise oberen Sättigungswert entsprechen,  $I_{50}$  den Wendepunkt darstellt und damit die Laserintensität widerspiegelt, bei welcher 50% aller Zellen tot sind und  $p$  die Steilheit der Kurve



beschreibt. Der Fit erfolgte ungewichtet.  $A1$  und  $A2$  wurden auf 0 beziehungsweise 1 gesetzt. Bei manchen Datensätzen mussten wenige Ausreißer maskiert werden, damit der Fit konvergiert. Diese sind in den jeweiligen Grafen kenntlich gemacht. Alle Diagramme, welche nicht in diesem Kapitel gezeigt werden, finden sich im Anhang (Abbildung A.1).

Den  $I_{50}$ -Wert kann man als quantitatives Maß der Sensitivität gegenüber Photoschädigung verwenden. Je höher  $I_{50}$ , desto widerstandsfähiger sind die untersuchten Zellen hinsichtlich der erfahrenen Bestrahlung.



**Abbildung 4.2.: Intensitätsabhängigkeit der Photoschädigung bei unbehandelten U2OS-Zellen.** Mit steigender Intensität der Bestrahlung (514 nm, 240 s, 21 °C) nimmt der Anteil toter (a) und erstarrter (b) Zellen zu. Dabei zeigt sich ein sigmoidaler Verlauf, welcher sich durch die angegebene logistische Funktion fitten lässt. Aus diesem Fit erhält man den Wert bei, welchem 50% aller bestrahlten Zellen tot beziehungsweise erstarrt sind ( $I_{50}$ , durch blaue gestrichelte Linien kenntlich gemacht). Dieser ist für die beiden hier gezeigten Datensätze in c dargestellt. Rote Datenpunkte mussten maskiert werden, damit der Fit konvergiert. Fehlerbalken in den Punktdiagrammen zeigen die Standardabweichung, in den Balkendiagrammen den Standardfehler des Fits. Die Grafen a und b wurden abgewandelt aus: „Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [Wäl+15], lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### Einfluss zusätzlicher Stressfaktoren: Transfektion und Färbung

Sowohl stabile Transfektion, als auch Färbung und Photoschalten des Farbstoffes (hier TMR), können für Zellen zusätzlichen Stress bedeuten. Um zu überprüfen, ob sie dadurch anfälliger für Photoschädigung sind, wurden die  $I_{50}$ -Werte wildtypischer U2OS-Zellen, stabil mit CLIP-H2B transfizierter U2OS-Zellen und stabil mit CLIP-H2B transfizierter und mit TMR gefärbter U2OS-Zellen verglichen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die stabile Transfektion als auch die Färbung zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Photoschädigung führen (Abbildung 4.3 und Tabelle 4.1): Liegt der  $I_{50}$ -Wert unbehandelter und ungefärbter U2OS-Zellen bei  $0,43 \text{ kW cm}^{-2}$ ,

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

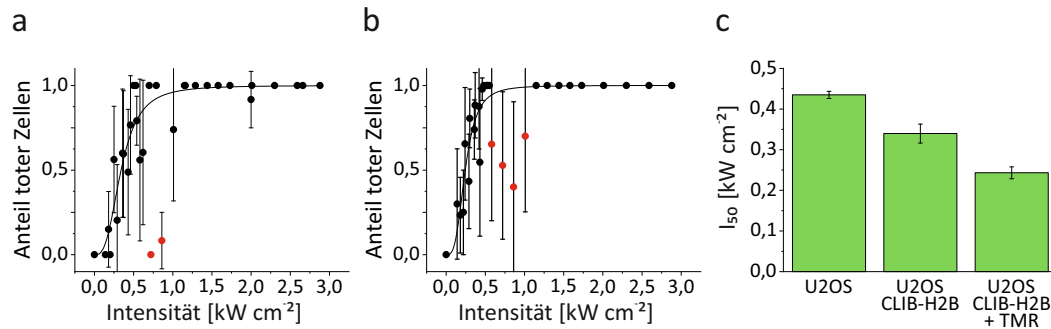
**Tabelle 4.1.: Intensitätsabhängigkeit der Photoschädigung.** Als quantitatives Maß für die Schwere der Photoschädigung wurde der  $I_{50}$ -Wert für verschiedene Zelltypen und im Falle von U2OS-Zellen bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (CLIP-H2B: stabil mit CLIP-H2B transfizierte Zelllinie, TMR: mit TMR gefärbte Zellen, 37 °C: Bestrahlung bei 37 °C, AS: Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Ascorbinsäure während der Bestrahlung) ermittelt (angegebener Fehler entspricht dem Standardfehler aus dem Fit, n.e.: nicht ermittelbar). Die Anzahl der insgesamt bestrahlten und ausgewerteten Zellen zur Berechnung des  $i_{50}$ -Werts ist durch  $n$  angegeben. Einen Teil der Daten habe ich im Rahmen meiner Masterarbeit erfasst (MSc), die restlichen Daten sind während meiner Promotion (PhD) entstanden. Diese Tabelle stammt leicht abgewandelt und erweitert aus: „Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [Wäl+15], lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Zelltyp	Bedingung	$I_{50}$ [ $\text{kW cm}^{-2}$ ]		n	MSc/PhD
		tot	erstarrt		
U2OS	-	$0,43 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,02$	404	PhD
U2OS	CLIP-H2B	$0,34 \pm 0,02$	$1,31 \pm 0,06$	707	MSc
U2OS	CLIP-H2B + TMR	$0,24 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,03$	599	MSc
U2OS	CLIP-H2B + 37 °C	$0,58 \pm 0,05$	$1,06 \pm 0,03$	385	PhD
U2OS	CLIP-H2B + AS	$0,54 \pm 0,06$	n.e.	458	PhD
COS-7	-	$0,53 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,04$	239	PhD
HeLa	-	$2,82 \pm 0,62$	n.e.	256	PhD

ist er für transfizierte Zellen noch  $0,34 \text{ kW cm}^{-2}$  und für transfizierte und gefärbte Zellen nur noch  $0,24 \text{ kW cm}^{-2}$ .

#### Photoschädigung verringern: 37 °C und Ascorbinsäure

Wenn zusätzliche Stressfaktoren die Sensitivität gegenüber phototoxischen Effekten erhöhen, kommt die Frage auf, ob sie gleichfalls verringert werden kann, wenn man den Zellen besonders gute Bedingungen bietet. Um dies zu beantworten wurden zwei weitere Messreihen durchgeführt (Abbildung 4.4). Im ersten Fall wurden die Zellen statt bei Raumtemperatur bei 37 °C (Kulturbedingung) bestrahlt. Dadurch konnte der  $I_{50}$ -Wert deutlich erhöht werden (von  $0,34 \text{ kW cm}^{-2}$  auf  $0,58 \text{ kW cm}^{-2}$ ). Im zweiten Experiment wurde dem Medium während der Bestrahlung 100  $\mu\text{M}$  Ascorbinsäure als Antioxidans zugesetzt. Auch hierdurch wurden die Zellen toleranter gegenüber Photoschädigung ( $I_{50}$ -Wert von  $0,54 \text{ kW cm}^{-2}$  anstelle von  $0,34 \text{ kW cm}^{-2}$ ).



**Abbildung 4.3.: Photoschädigung bei stabil transfizierten und gefärbten Zellen.**

Durch die stabile Transfektion mit dem Konstrukt CLIP-H2B (a), sowie durch die Färbung dieser stabilen Zelllinie mit TMR (b) erfahren die Zellen zusätzlich zur Bestrahlung (514 nm, 240 s, 21 °C) Stress. Vergleicht man die aus dem Fit gewonnenen  $I_{50}$ -Werte mit denen der untransfizierten und ungefärbten U2OS-Zellen (Abbildung 4.2 und Tabelle 4.1), zeigt sich eine schrittweise Abnahme diesen Werts und damit eine höhere Sensitivität gegenüber Photoschädigung (c). Rote Datenpunkte mussten maskiert werden, damit der Fit konvergiert. Fehlerbalken in den Punktdiagrammen zeigen die Standardabweichung, in den Balkendiagrammen den Standardfehler des Fits. Die Grafen a und b wurden leicht abgewandelt aus: „Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [Wäl+15], lizenziert unter CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

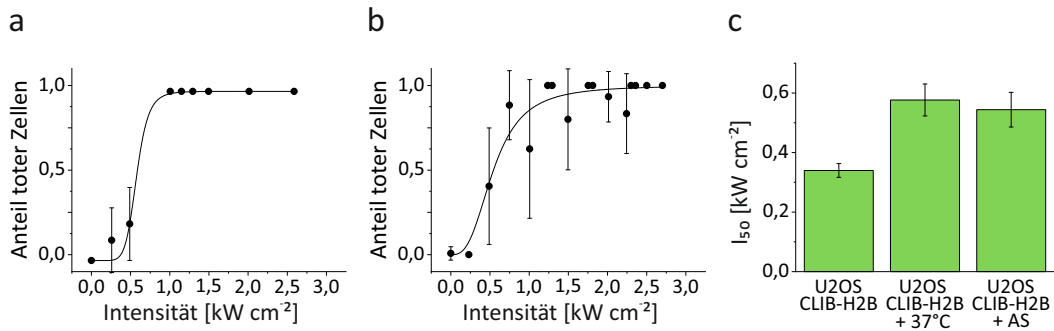
## Verschiedene Zelltypen

Verschiedene Zelltypen unterscheiden sich stark in ihren Eigenschaften und ihrer Reaktion auf äußere Einflüsse [MK13], sodass zu erwarten ist, dass sie auch hinsichtlich Photoschädigung von einander abweichen. Aus diesem Grund habe ich neben U2OS-Zellen auch HeLa- und COS-7-Zellen bestrahlt und analysiert (Abbildung 4.5). Hierbei zeigten die COS-7-Zellen eine mit der von U2OS-Zellen vergleichbare Sensitivität gegenüber Photoschädigung ( $I_{50} \sim 0,5 \text{ kW cm}^{-2}$ ), während sich die HeLa-Zellen als deutlich widerstandsfähiger erwiesen und selbst bei der höchsten verwendeten Laserintensität ( $2,5 \text{ kW cm}^{-2}$ ) noch eine Überlebensrate von ungefähr 50% aufwiesen. Der berechnete  $I_{50}$ -Wert liegt mit  $2,8 \text{ kW cm}^{-2}$  mehr als fünffach so hoch wie für U2OS- und COS-7-Zellen.

### 4.1.2. Wellenlänge

Kurzwelliges Licht ist energiereicher als langwellige Strahlung [Dem17], weshalb die Vermutung nahe liegt, dass die Wellenlänge den Grad der Photoschädigung beeinflusst. Bereits in meiner Masterarbeit habe ich Zellen der stabil transfizierten U2OS-Zelllinie mit verschiedenen Wellenlängen (405 nm, 488 nm, 514 nm, 561 nm, 639 nm)

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.4.: Photoschädigung bei 37 °C und unter Zugabe von Ascorbinsäure.** Die Bestrahlung (514 nm, 240 s) bei 37 °C (a) und die Zugabe von 100 µM Ascorbinsäure (b) erhöhen den  $I_{50}$ -Wert (c). Die stabil mit CLIP-H2B transfizierten Zellen werden also durch die Bestrahlung weniger stark geschädigt als bei 21 °C und ohne den Zusatz von Ascorbinsäure (Abbildung 4.3 und Tabelle 4.1). Fehlerbalken in den Punktdiagrammen zeigen die Standardabweichung, in den Balkendiagrammen den Standardfehler des Fits. Die Grafen a und b wurden leicht abgewandelt aus: „Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [Wäl+15], lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

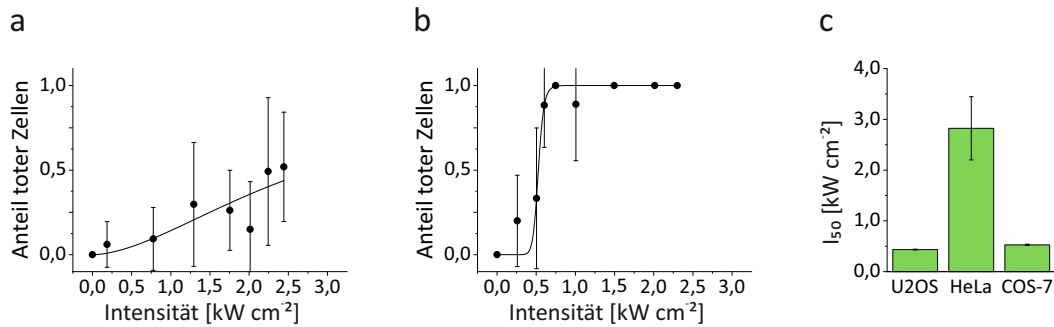
und unterschiedlichen Intensitäten (0, 2-2 kW cm<sup>-2</sup>) bestrahlt [Wäl13]. Im Rahmen meiner Promotion habe ich diese Messungen um weitere Intensitäten (0,02 kW cm<sup>-2</sup> bei 405 nm, sowie 4 und 6 kW cm<sup>-2</sup> bei 639 nm) ergänzt.

Durch diese Experimente konnte ich zeigen, dass die Bestrahlung mit kurzwelligem Licht um ein Vielfaches schädlicher ist als mit längeren Wellenlängen (Abbildung 4.6 und Tabelle A.1). Wurden die Zellen beispielsweise mit 0,02 kW cm<sup>-2</sup> bestrahlt, sterben bei 405 nm alle Zellen, während Zellen die mit der gleichen Intensität bei 514 nm bestrahlt wurden, zu 100% überleben. Im Falle von 639 nm führt selbst die Bestrahlung mit 6 kW cm<sup>-2</sup> nur bei weniger als 5% der Zellen zum Tod.

##### 4.1.3. Dosis, kontinuierliche und gepulste Bestrahlung

Wie sich gezeigt hat, reichen bei einer Bestrahlung mit 405 nm bereits geringe Intensitäten aus, um einen hohen Grad an Photoschädigung zu verursachen. Vor allem bei PALM wird genau diese Wellenlänge benötigt, um Fluoreszenzproteine zu aktivieren, konvertieren oder schalten (siehe Abschnitt 2.2.1). Allerdings werden die Zellen dabei häufig nicht kontinuierlich, sondern gepulst bestrahlt. Die folgende Versuchsreihe diente dazu, herauszufinden, ob sich CW und gepulste Bestrahlung unterschiedlich auf den Grad der Photoschädigung auswirken. Dazu wurden die Zellen einer Intensität von 0,02 kW cm<sup>-2</sup> bei einer Wellenlänge von 405 nm ausgesetzt.

#### 4.1. Photoschädigung durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie



**Abbildung 4.5.: Photoschädigung bei verschiedenen Zelltypen.** HeLa- (a) und COS-7-Zellen (b) werden durch Bestrahlung (514 nm, 240 s, 21 °C) weniger beziehungsweise ähnlich stark geschädigt wie U2OS-Zellen (c, [Abbildung 4.2](#) und [Tabelle 4.1](#)). Selbst bei der höchsten angewendeten Bestrahlungsintensität sterben nur etwa 50% der bestrahlten HeLa-Zellen (a). Fehlerbalken in den Punktdiagrammen zeigen die Standardabweichung, in den Balkendiagrammen den Standardfehler des Fits. Die einzelnen Grafen wurden leicht abgewandelt aus: „[Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy](#)“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [[Wäl+15](#)], lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](#) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

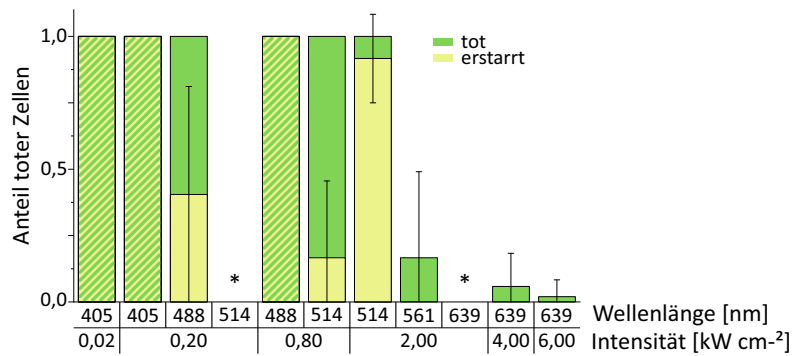
Die Aufnahmezeit wurde konstant bei 240 s gehalten, während Pulsfrequenz (CW, 10 Hz, 5 Hz, 1 Hz) und Pulsdauer (CW, 500 ms, 100 ms, 50 ms, 20 ms, 10 ms, 2 ms, 1 ms) variiert wurden, sodass die Gesamtbestrahlungszeit zwischen 2,4 s und 120 s lag und die Zellen somit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen ausgesetzt waren.

Die Auswertung der erhaltenen Daten ([Abbildung 4.7](#) und [Tabelle A.2](#)) zeigt, dass bereits eine Gesamtbestrahlungszeit von 60 s oder mehr ausreicht, um bei 100% der bestrahlten Zellen zum Zelltod zu führen. Hierbei spielt es keine Rolle, ob die Zellen kontinuierlich oder gepulst bestrahlt wurden, eine niedrige Pulsfrequenz mit einer langen Pulsdauer oder eine hohe Pulsfrequenz mit einer kurzen Pulsdauer kombiniert wurden. Bezüglich des Anteils erstarrter Zellen, ist der Anteil jedoch für gepulst bestrahlte Zellen höher als für Zellen, die durchgängig bestrahlt wurden.

Betrachtet man Zellen, die insgesamt für 24 s bestrahlt wurden, beobachtet man, dass Zellen, die durchgängig (CW) bestrahlt wurden, eine höhere Überlebensrate (etwa 85%) zeigen als jene, die eine gepulste Bestrahlung erfahren haben (ungefähr 1-10%), obwohl sie alle der gleichen Bestrahlungsdosis ausgesetzt waren. Vergleicht man den Grad der Photoschädigung der gepulst bestrahlten Zellen untereinander, findet man zwischen variierenden Pulsfrequenzen und Pulsdauern keinen Unterschied, so lange die Gesamtbestrahlungszeit bei 24 s bleibt.

Bei einer Gesamtbestrahlungszeit von 2,4 s erweist sich die Kombination aus einer kurzen Pulsdauer und einer hohen Frequenz als weniger schädlich als die Bestrah-

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



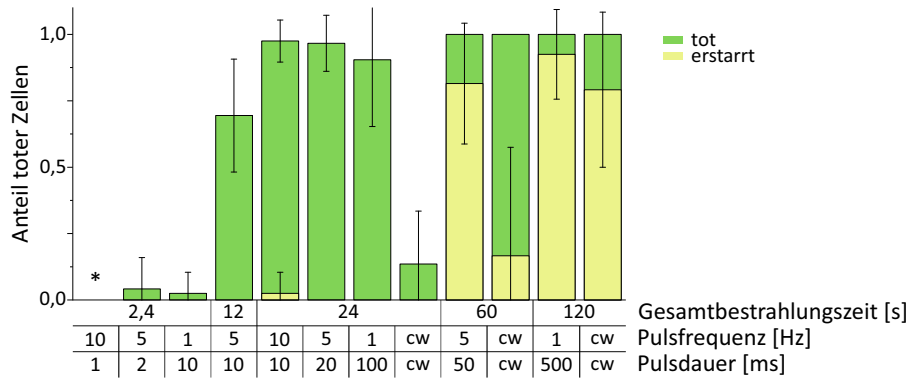
**Abbildung 4.6.: Wellenlängenabhängigkeit der Photoschädigung.** Die durch Bestrahlung (240 s, 21 °C) verursachte Photoschädigung der mit CLIP-H2B stabil transgenierten U2OS-Zellen ist stark wellenlängenabhängig. Je kürzer die Wellenlänge, desto höher ist der Anteil der toten beziehungsweise erstarrten Zellen (siehe auch [Tabelle A.1](#)). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Im Fall des Sternchens wurden keine toten Zellen beobachtet. Für jede Bedingung wurden 10 – 50 Zellen untersucht. Die Abbildung wurde leicht abgewandelt aus: „[Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy](https://doi.org/10.1038/srep15348)“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [[Wäl+15](#)], lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

lung mit längeren Pulsdauern und niedrigeren Frequenzen, auch wenn die Bestrahlungsdosis die selbe ist. Bei einer Bestrahlung mit einer Pulsfrequenz von 10 Hz und einer Pulsdauer von 1 ms konnten keine phototoxischen Auswirkungen beobachtet werden.

##### 4.1.4. Erstarrte Zellen - Fixierung durch Bestrahlung

Wie oben beschrieben, scheinen erstarrte Zellen durch die Bestrahlung abrupt zu sterben. Sie zeigen keinerlei Mobilität mehr und haften fest an der Oberfläche. Somit erinnern sie stark an chemisch fixierte Zellen. Um zu testen, ob sie sich wirklich in einem der chemischen Fixierung ähnlichen Zustand befinden, wurden in zwei separaten Experimenten nach ausreichend intensiver Bestrahlung Aktin (Phalloidin) beziehungsweise  $\beta$ -Tubulin (Taxol) gefärbt und die Zellen mittels *d*STORM mikroskopiert. Es wurde dabei keine zusätzliche chemische Fixierung oder Permeabilisierung vorgenommen. Auf den aufgenommenen Bildern ist zu sehen, dass das Aktinskelett in den nicht bestrahlten Bereiche der Zelle intakt und fixiert ist, während es im bestrahlten Teil der Zelle zerstört wurde ([Abbildung 4.8a](#)). Die Mikrotubuli sind in der gesamten Zelle depolymerisiert ([Abbildung 4.8b](#)).

#### 4.1. Photoschädigung durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie

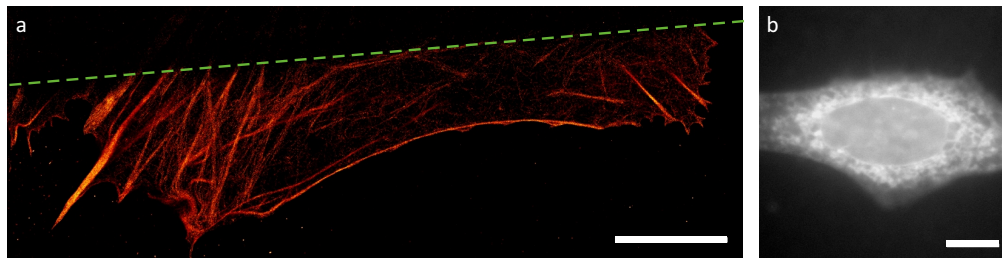


**Abbildung 4.7.: Photoschädigung bei kontinuierlicher und gepulster Bestrahlung.** Bei gleicher Gesamtbestrahlungszeit werden mit CLIP-H2B stabil transfierte U2OS-Zellen durch gepulste und kontinuierliche (CW) Bestrahlung (405 nm,  $0,02 \text{ kW cm}^{-2}$ , 240 s Aufnahmezeit,  $21 \text{ }^\circ\text{C}$ ) unterschiedlich stark geschädigt (siehe auch [Tabelle A.2](#)), wobei sich CW-Bestrahlung weniger schädlich auswirkt als gepulste Bestrahlung. Die Einhaltung sehr kurzer Gesamtbestrahlungszeiten (2,4 s) ermöglicht die Verwendung der sonst sehr schädlichen Wellenlänge von 405 nm ohne den Tod der bestrahlten Zellen zu verursachen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Im Fall des Sternchens wurden keine toten Zellen beobachtet. Für jede Bedingung wurden 10 – 50 Zellen untersucht. Die Abbildung wurde leicht abgewandelt aus: „[Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy](https://doi.org/10.1038/srep15348)“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [[Wäl+15](#)], lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### 4.1.5. Photoschädigung durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie - Diskussion

Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass in lebenden Zellen durch Bestrahlung mit hohen Laserintensitäten starke phototoxische Effekte hervorgerufen werden. Die Schwere dieser Photoschädigung hängt dabei wie zu erwarten stark von Intensität und Wellenlänge ab, wird aber auch von vielen weiteren Faktoren beeinflusst. Im Folgenden möchte ich die Ergebnisse des Projektes Schritt für Schritt diskutieren und gleichzeitig herausstellen, inwiefern man das gewonnene Wissen anwenden kann, um SMLM mit lebenden Proben zu vereinbaren.

**Photoschädigung erkennen.** Eine sehr wichtige Erkenntnis des Photoschädigungsprojektes ist, dass es nicht ausreicht, den Zustand und die Vitalität bestrahlter Zellen unmittelbar nach der Messung zu beurteilen wie es bisher häufig gängige Praxis war [[Jon+11](#); [Shr+08](#); [Wom+10](#)]. Die in dieser Arbeit als „apoptisch“ bezeichneten Zellen zeigten in den meisten Fällen direkt an die Bestrahlung anschließend eine normale Morphologie und Mobilität und begannen sich erst mehrere Stunden nachdem sie bestrahlt wurden zu verändern und schließlich zu sterben,



**Abbildung 4.8.: dSTORM-Aufnahme des Cytoskeletts erstarrender Zellen.** Durch intensive Bestrahlung erleiden die bestrahlten U2OS-Zellen einen abrupten Zelltod und erscheinen wie erstarret. Für diese Aufnahmen wurden die Zellen nach der Bestrahlung ( $0,24 \text{ kW cm}^{-2}$  (a) bzw.  $0,05 \text{ kW cm}^{-2}$  (b), 405 nm, 240 s,  $37^\circ\text{C}$ ) ohne zusätzliche Fixierung oder Permeabilisierung mit AF647-gekoppeltem Phalloidin gegen Aktin (a) beziehungsweise Taxol gegen  $\beta$ -Tubulin (b) gefärbt. Die gezeigten Aufnahmen sind durch dSTORM (a) beziehungsweise einfache Weitefeldfluoreszenzmikroskopie (b) entstanden. Die grüne, gestrichelte Linie in (a) zeigt die Grenze zwischen bestrahltem und unbestrahltem Bereich. Während das Aktinnetzwerk im nicht bestrahlten Bereich intakt ist, ist es im bestrahlten Bereich komplett zerstört. Die Mikrotubuli (b) depolymerisieren durch die Bestrahlung. Die Maßstabsbalken entsprechen  $10 \mu\text{m}$ . Die Abbildung wurden leicht abgewandelt aus: „Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [Wäl+15], lizenziert unter CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

da die zur Verfügung stehenden Reparaturmechanismen nicht ausreichen, um den entstandenen Schaden zu kompensieren. Sicherlich kann man aber davon ausgehen, dass dieser Prozess bereits zum Zeitpunkt der Bestrahlung einsetzte. Somit ist abzuwägen, ob die Zellen während der Messung noch als gesund angenommen und die beobachteten zellulären Prozesse als unbeeinflusst gelten können. Am Anfang jedes Lebendzellexperimentes unter der Verwendung hoher Bestrahlungsintensitäten sollte man sich mit dem Thema Photoschädigung auseinandersetzen und durch Langzeitbeobachtung beurteilen, ob und wie stark die bestrahlten Zellen im durchgeführten Versuch geschädigt werden.

**Intensität.** Die unter [Unterabschnitt 4.1.1](#) beschriebenen Ergebnisse bestätigen die erwartete starke Abhängigkeit der Photoschädigung von der verwendeten Laserintensität ([Abbildung 4.2](#) und [Tabelle 4.1](#)). Eine effektive und sehr direkte Möglichkeit die Photoschädigung zu reduzieren, besteht darin die verwendete Laserleistung so weit wie möglich zu senken. Weiterhin sollten Methoden wie TIRF- [[Wag+10](#)] oder Lattice-Light-Sheet(LLS)-Mikroskopie [[Che+14](#)] in Erwägung gezogen werden, da bei diesen die Photoschädigung aufgrund des deutlich kleineren bestrahlten Volumens verringert sein sollte. Während sich TIRFM nur für Proben eignet, bei



#### 4.1. Photoschädigung durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie

welchen sich die Zielstruktur nah am Deckglas befindet (siehe [Unterabschnitt 3.3.2](#)), gibt es diesbezüglich bei der LLS-Mikroskopie keine Einschränkungen, was sie besonders interessant macht. Hier wird ein ultradünnes Lichtblatt Ebene für Ebene durch die Probe gefahren, wobei die Probe immer nur in der aktuellen Fokusebene bestrahlt wird. Aus diesem Grund und weil die in der Probe ankommende Bestrahlungsintensität äußerst gering ist [[Che+14](#)], kann davon ausgegangen werden, dass die Photoschädigung deutlich reduziert wird.

**Stress.** Durch unterschiedliche Experimente zeichnete sich ab, dass sich verschiedene experimentelle Bedingungen negativ ([Abbildung 4.3](#)), aber auch positiv ([Abbildung 4.4](#)) auf die Gesundheit bestrahlter Zellen auswirken können. Erfahren die Zellen zusätzlich zur Bestrahlung weiteren Stress, etwa durch eine Transfektion oder durch die Färbung einer Zielstruktur, kann dies die Sensitivität gegenüber Photoschädigung deutlich steigern. Andererseits kann man äußeren Stress z.B. durch die Messung bei einer optimalen Kulturtemperatur (37 °C) oder durch die Zugabe von Ascorbinsäure als Antioxidans reduzieren und die Zellen somit widerstandsfähiger gegenüber der Bestrahlung machen. Demzufolge ist es empfehlenswert, abzuwägen, welche Stressfaktoren vermieden oder reduziert werden können.

Bezüglich der Transfektion sind vor allem zwei Faktoren zu berücksichtigen: (1) Das transfizierte Protein und wie stark dieses aufgrund seiner Funktion, aber auch seiner Größe, in die Viabilität der Zelle eingreift. (2) Die Transfektionsmethode (z.B. viral, chemisch oder physikalisch) und wie gut die jeweiligen Zellen diese verkraften [[KE10](#)]. Dies spielt vermutlich vor allem bei der transienten Transfektion eine wichtige Rolle, da diese nur wenige Stunden bis Tage vor der Messung stattfindet und den Zellen deshalb nicht viel Zeit lässt sich zu erholen.

Der durch die Färbung verursachte Stress geht vermutlich sowohl auf die Färbung an sich zurück z.B. Toxizität des Farbstoffs, als auch auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch das Photoblinken während der Messung (siehe [Abschnitt 2.2.1](#)). Wahrscheinlich liegt hierin auch der positive Effekte der Zugabe von Ascorbinsäure begründet. Diese gilt als Antioxidans und reduziert oxidativen Stress, indem sie ROS neutralisiert [[Peh17](#)]. Zusätzlich kann Ascorbinsäure als Reduktionsmittel selbst zum Photoschalten führen [[Vog+09](#)]. Auf die Verwendung eines Schaltpuffers hingegen sollte bei Lebendzell-Experimenten verzichtet werden, da dieser vermutlich zusätzlichen Stress auslöst und lebende Zellen, mit dem im Zytosol in ausreichend hoher Konzentration vorliegenden Glutathion, bereits ein für viele Fluorophore geeignetes Reduktionsmittel aufweisen (siehe [Unterabschnitt 2.2.2](#)).

Als optimale Kultur- und Wachstumsbedingungen gelten für Säugetierzellen wie

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

U2OS-, COS-7 oder HeLa-Zellen eine Umgebungstemperatur von 37 °C, ein  $CO_2$ -Konzentration von 5% und eine relativ hohe Luftfeuchtigkeit, um Verdunstung und in Folge dessen eine Veränderung der Osmolarität des Mediums zu verhindern [Sch11]. Diese Bedingungen waren hier sowohl vor als auch nach der Bestrahlung durch einen Inkubator gegeben. Standardmäßig erfolgte die Messung selbst aber bei 21 °C und ohne die Kontrolle von  $CO_2$ -Gehalt und Luftfeuchtigkeit. Deshalb verwundert es nicht, dass Zellen, die bei einer Temperatur von 37 °C und somit unter weniger zusätzlichem Stress, bestrahlt wurden, eine höhere Bestrahlungsdosis vertragen als jene deren Bestrahlung bei 21 °C und somit bei einer deutlich unter dem Optimum liegenden Temperatur erfolgte. Dies lässt auch vermuten, dass ein vollständiger Inkubator, welcher zusätzlich  $CO_2$ -Gehalt und Luftfeuchtigkeit optimal einstellt, eine weitere Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegenüber Photoschädigung bewirken könnte.

**Zelltyp.** U2OS-Zellen, COS-7-Zellen und HeLa-Zellen werden durch Bestrahlung unterschiedlich stark geschädigt (Abbildung 4.5), was darauf hindeutet, dass es Zelltypen gibt, die aus unbekanntem Grund besser mit Photoschädigung umgehen können als andere. Ist man nicht auf einen bestimmten Zelltyp festgelegt, kann es also lohnenswert sein, bei der Zellwahl auch die Widerstandsfähigkeit gegenüber Photoschädigung miteinzubeziehen. Außerdem bedeutet die unterschiedliche Anfälligkeit für Photoschädigung, dass die hier beschriebenen Erkenntnisse nicht einfach auf jeden anderen Zelltyp oder gar lebenden Organismus übertragen werden können, sondern im Einzelfall überprüft werden müssen.

Auch innerhalb eines Zelltyps beziehungsweise einer Zellpopulation sind Fluktuationen deutlich zu beobachten (siehe große Fehlerbalken in den einzelnen Diagrammen). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Zellen abhängig von ihrer aktuellen Zellzyklusphase unterschiedlich anfällig für Bestrahlung sind [MK13].

**Wellenlänge.** Ich konnte zeigen, dass kurze Wellenlängen, vor allem 405 nm, um ein Vielfaches schädlicher sind als längere Wellenlängen (Abbildung 4.6 und Tabelle A.1). Der Grund hierfür sind wahrscheinlich die höhere Energie kurzer Wellenlängen [Dem17], sowie die stärkere Absorption kurzwelligeren Lichts durch die Zellen. Dies sollte bei der Wahl des Farbstoffes berücksichtigt werden, indem Farbstoffe mit langer Anregungswellenlänge bevorzugt werden. Die für dSTORM präferierten Fluorophore Alexa Fluor 647 und Cy5 (siehe Abschnitt 3.2.2) lassen sich bei etwa 640 nm anregen und sind somit auch in Bezug auf Photoschädigung eine gute Wahl, da bei dieser Wellenlänge selbst bei hohen Intensitäten ( $2-6 \text{ kW cm}^{-2}$ ) zumindest nach der in dieser Arbeit angewendeten Methode kaum Photoschädigung

feststellbar ist. Vielversprechend sind auch die in den letzten Jahren entwickelten Silizium-Rhodamin-Derivate [Luk+13], da sie im nahen Infrarot angeregt werden und zellpermeabel sind.

Deutlich problematischer gestaltet sich die Situation für PALM-Experimente, da diese in vielen Fällen auf die Bestrahlung mit 405 nm angewiesen sind, um Fluoreszenzproteine zu aktivieren, konvertieren oder schalten. Bei 405 nm werden selbst bei äußerst geringen Intensitäten ( $0,02 \text{ kW cm}^{-2}$ ) alle bestrahlten Zellen so stark geschädigt, dass sie sterben und sogar erstarren. Allerdings erfolgt die Bestrahlung zur Aktivierung, Konvertierung oder zum Schalten in PALM-Versuchen häufig gepulst, sodass die Zellen nicht über die gesamte Aufnahmezeit kontinuierlich mit 405 nm bestrahlt werden und die Gesamtbestrahlungszeit deutlich kürzer ausfallen kann als die Aufnahmezeit. Es hat sich gezeigt (Abbildung 4.7), dass man auf diesem Weg bei ausreichend geringer Gesamtbestrahlungszeit (z.B. 2,4 s) durch sehr kurze Pulsdauern (z.B. 1 ms) mit geringen Intensitäten ( $0,02 \text{ kW cm}^{-2}$ ) bei 405 nm bestrahlen kann (in diesem Beispiel für eine Aufnahmezeit von 240 s) ohne die Zellen zu schädigen.

**Art der Bestrahlung.** Beim Vergleich kontinuierlicher und gepulster Bestrahlung (Abbildung 4.7 und Tabelle A.2) stellte sich kontinuierliche Bestrahlung bei gleicher Gesamtbestrahlungszeit als weniger schädlich heraus, obwohl die erfahrene Bestrahlungsdosis die gleiche ist. Scheinbar ist die Strahlungsdosis also nicht alleine entscheidend für die Schwere der Photoschädigung und Zellen können eine dauerhafte Bestrahlung über einen insgesamt kurzen Zeitraum besser kompensieren als wiederholte kurze Pulse, die von Zeiten ohne Bestrahlung unterbrochen werden.

**Fixierung durch Licht.** Wie in Abbildung 4.8 gezeigt, lassen sich Zellen vor allem durch die Bestrahlung mit kurzen Wellenlängen z.B. 405 nm in einen fixierten Zustand überführen, der keine weitere chemische Fixierung oder Permeabilisierung erforderlich macht. Hier wurde durch die Bestrahlung leider auch das Cytoskelett zumindest in den bestrahlten Bereichen zerstört. Gelänge es aber die Methode insofern zu verbessern, dass man eine Fixierung erreicht ohne die zellulären Strukturen zu schädigen, wäre dies eine elegante Methode, um Zellen auf dem Mikroskop zu beobachten und sie dann zu einem bestimmten gewünschten Zeitpunkt durch einen Lichtpuls zu fixieren.

**Relevanz der Ergebnisse für weitere dSTORM-Projekte.** In den beiden Kooperationsprojekten, die Teil dieser Arbeit waren, wurde dSTORM zur Visualisierung und Quantifizierung von Glutamatrezeptoren in *Drosophila melanogaster* Larven (Abschnitt 4.2) und von ADHS-assoziierten Proteinen in aus humanen iPS-

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Zellen differenzierten serotonergen Neuronen ([Abschnitt 4.3](#)) verwendet. Zwar zeigen die im Rahmen des Photoschädigungsprojekts erworbenen Erkenntnisse, dass dSTORM an lebenden Proben unter Berücksichtigung bestimmter Voraussetzungen ohne Photoschädigung möglich ist, doch wäre die Einhaltung dieser Bedingungen hier aus folgenden Gründen schwierig bis unmöglich gewesen. (1) Für einen Großteil der Experimente war es nötig zwei Strukturen zu markieren und visualisieren, sodass neben einem eher unproblematischem roten Farbstoff, auch ein bei kurzwelligem und damit photoschädlichem Licht anregbares Fluorophor zum Einsatz kommen musste. (2) Auch würde man bei der Verwendung lebender Proben optimaler Weise auf fluoreszierende Proteine und damit auf PALM zurückgreifen, was sich aufgrund der notwendigen Bestrahlung mit 405 nm als sehr problematisch erwiesen hat, zumal man insbesondere bei der Quantifizierung auf lange Aufnahmezeiten angewiesen ist, um alle Moleküle zu detektieren. (3) Gerade die aus humanen iPS-Zellen differenzierten serotonergen Neurone sind sehr empfindlich, sodass sie vermutlich in Bezug auf Photoschädigung noch sensibler als die untersuchten immortalisierten Zelllinien reagieren würden. Aus diesen Gründen wurden die Versuche beider Projekte an fixierten Proben durchgeführt.

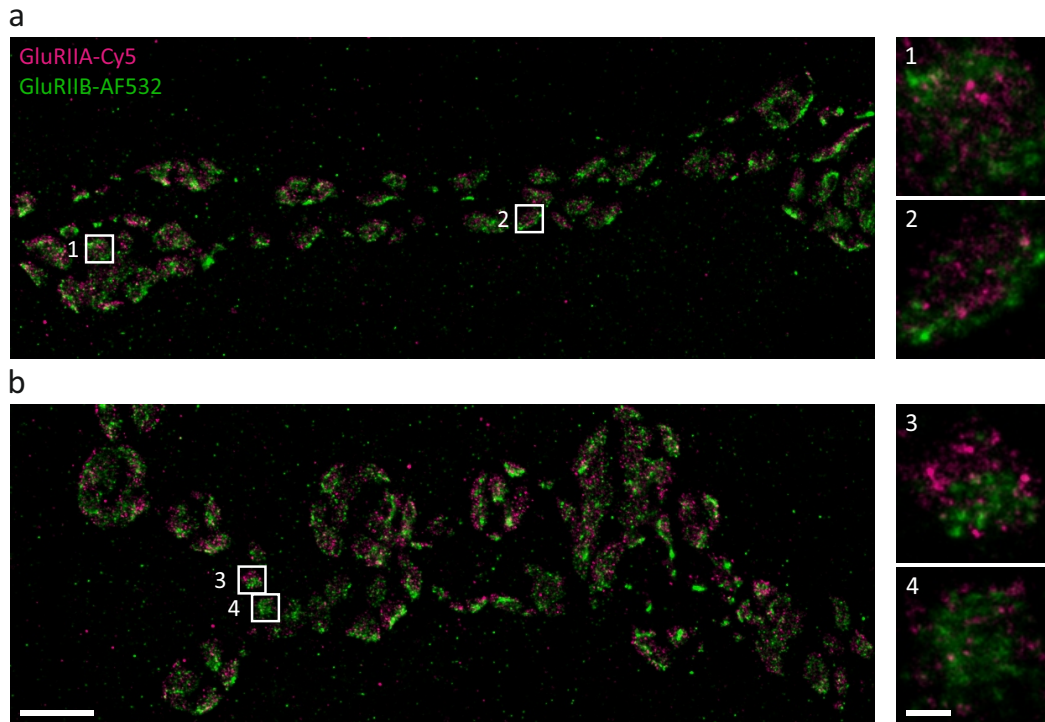
### 4.2. GluR der NMJ von *Drosophila melanogaster*

Das Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert J. Kittel widmete sich der Untersuchung der Glutamaterezeptoren an der NMJ von *Drosophila melanogaster* und teilte sich in zwei Unterprojekte, deren Ergebnisse in [Unterabschnitt 4.2.1](#) und [Unterabschnitt 4.2.2](#) besprochen werden.

#### 4.2.1. Räumliche Anordnung von GluRIIA und GluRIIB

Die räumliche Anordnung der funktionell unterschiedlichen A- und B-Typ-Glutamaterezeptoren spielt eine wichtige Rolle für die Stärke der synaptischen Übertragung an der NMJ (siehe [Unterabschnitt 2.3.2](#)). In den meisten postsynaptischen Verdichtungen findet man eine ringförmige Anordnung von Rezeptoren des B-Typs, welche A-Typ-Rezeptoren im Zentrum umschließen. Es hat sich aber gezeigt, dass diese Anordnung variieren kann.

In diesem Teilprojekt waren wir daran interessiert, inwiefern sich die Anordnung in Folge elektrischer Stimulation, also durch induzierte Aktivität, verändert. Dazu hat Divya Sachidanandan die Muskeln 6 und 7 von *Drosophila melanogaster* Larven im Voraus elektrophysiologisch mittels TEVC stimuliert und Muskel 6 zusätzlich



**Abbildung 4.9.: dSTORM-Aufnahme der Anordnung von A- und B-Typ-Glutamatrezeptoren.** Hier zu sehen sind beispielhafte dSTORM-Aufnahmen (pro Farbe 15000 Einzelbilder, 10 ms Integrationszeit) des stimulierten Muskels 7 (a), sowie des stimulierten und geklemmten Muskels 6 (b) einer *Drosophila melanogaster* Larve. Mittels indirekter Immunfärbung wurden Glutamatrezeptoren des A- (Cy5) und B-Typs (AF532) markiert. Die quadratischen Bilder auf der rechten Seite zeigen einzelne postsynaptische Verdichtungen und stellen Vergrößerungen der in den beiden linken Bildern eingezeichneten Regionen (weiße durchnummerierte Rahmen) dar. Während sich bei Muskel 7 in vielen PSDs die typische Anordnung (GluRIIA im Zentrum, GluRIIB als äußere Ring) zeigt, ist sie in Muskel 6 häufig umgekehrt. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 2,5  $\mu\text{m}$  (linke Bilder) beziehungsweise 0,25  $\mu\text{m}$  (rechte Bilder).

auf eine Potential von  $-60\text{ mV}$  geklemmt (siehe [Unterabschnitt 3.1.2](#)). Anschließend hat sie die Larven fixiert und GluRIIA und GluRIIB mittels Immunfärbung mit Cy5 beziehungsweise AF532 markiert. Dank des symmetrischen Aufbaus der Körperwandmuskulatur konnten Muskel 6 und 7 der anderen Körperseite als nicht stimulierte und nicht geklemmte Kontrolle verwendet werden, sodass eine gute Vergleichbarkeit garantiert ist.

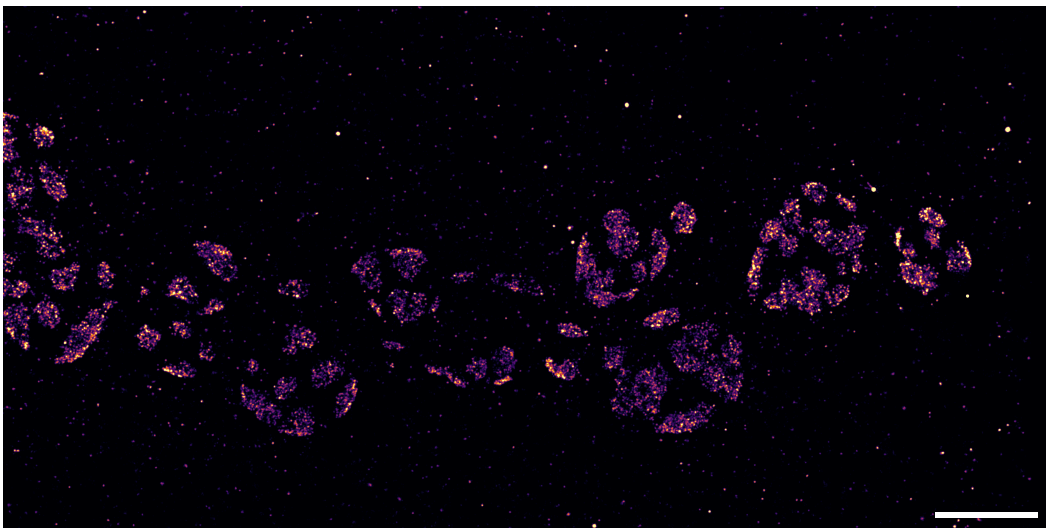
Die so vorbereiteten Larven wurden schließlich mittels Zweifarben-dSTORM (15000 Einzelbilder, 10 ms Integrationszeit) untersucht und die erhaltenen Bilder hinsichtlich der Anordnung der beiden Rezeptortypen analysiert. Beispielhafte Bilder für die stimulierten Muskeln 6 und 7 sind in [Abbildung 4.9](#) zu sehen.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Es zeigt sich, dass man im stimulierten Muskel 7 in den meisten postsynaptischen Verdichtungen die typische Anordnung findet, bei welcher die A-Typ-Rezeptoren im Zentrum liegen und ringförmig von B-Typ-Rezeptoren umgeben werden. Durch zusätzliches Klemmen des Muskels auf ein Potential von  $-60$  mV (Muskel 6) findet eine Neuordnung statt, sodass Rezeptoren des A-Typs nun einen Ring um Rezeptoren des B-Typs bilden. Die Kontrollmuskeln auf der unstimulierten Seite wiesen die gleiche Anordnung wie der stimulierte Muskel 7 (nicht gezeigt) auf. Die Zugabe von Forskolin, eines cAMP-Aktivators, führte dazu, dass sich die stimulierten Muskeln 6 und 7 hinsichtlich der Anordnung der beiden Rezeptortypen nicht mehr unterscheiden, da nun auch in Muskel 6 die typische Anordnung zu beobachten ist (nicht gezeigt).

##### 4.2.2. Quantifizierung der A-Typ-Glutamaterezeptoren pro PSD

Das zweite Teilprojekt dieser Kooperation widmete sich ausschließlich dem A-Typ-Glutamaterezeptor ([Abbildung 4.10](#)), dessen absolute Anzahl pro synaptischer Verdichtung mittels *d*STORM ermittelt wurde. Dafür wurden die Lokalisationen pro PSD bestimmt und von diesen auf die Anzahl rückgeschlossen, wozu eine Reihe an Vorversuchen benötigt wurden (siehe [Unterabschnitt 3.4.1](#) und [\[Ehm+14\]](#)).



**Abbildung 4.10.: *d*STORM-Aufnahme von A-Typ-Glutamaterezeptoren an der NMJ von *Drosophila melanogaster*** Die A-Typ-Glutamaterezeptoren der neuromuskulären Synapse einer *Drosophila melanogaster* Larve wurden durch indirekte Immunfärbung mit Cy5 markiert und dieses Bild mittels *d*STORM (15000 Einzelbilder, 10 ms Integrationszeit) aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht  $2,5$   $\mu\text{m}$ .

Als erstes wurde eine Titration des sekundären Cy5-gekoppelten Antikörpers bei konstanter primärer Antikörperkonzentration (1:2000) durchgeführt und die erhaltenen Lokalisationen pro PSD gegen die jeweilige Verdünnung aufgetragen (Abbildung 4.11a). Durch die Co-Färbung mit einem AF532-gekoppelten sekundären Antikörper gegen den gleichen primären Antikörper wurde die Gesamtkonzentration an sekundärem Antikörper konstant gehalten und das Auffinden der PSD auch bei geringen Konzentration ermöglicht (Abbildung 4.11c). Wie in Abbildung 4.11a zu sehen, beginnt die Kurve bei einer Verdünnung von 1 (100% Cy5-gekoppelter Antikörper) gerade in Sättigung zu gehen. Dies entspricht der Konzentration des sekundären mit Cy5 gekoppelten Antikörpers unter experimentellen Bedingungen, sodass  $L_1(2.AK) = L_{PSD}(2.AK_{EB})$ , wodurch sich die in Unterabschnitt 3.4.1 beschriebene Gleichung zu

$$GluRIIA_{PSD} = \frac{Loc_{PSD}}{L_E(1.AK)} \times \frac{L_1(1.AK)}{L_{PSD}(1.AK_{EB})} \quad (4.2)$$

vereinfachen lässt. Die aus der Titration des sekundären Antikörpers erhaltenen Werte sind somit für die Berechnung nicht mehr von Belang.

Der nächste Schritt bestand in der Titration des primären Antikörpers bei konstanter Konzentration des sekundären Antikörpers (10% Cy5- und 90% AF532-gekoppelter Antikörper). Die erhaltenen Lokalisationen pro PSD wurden nach dem gleichen Prinzip geplottet und gefittet wie im Fall des sekundären Antikörpers (Abbildung 4.11b). Aus dem Fit ergaben sich für  $L_1(1.AK)$   $1583 \pm 216$  Lokalisationen und für  $L_{PSD}(1.AK_{EB})$   $676 \pm 179$  Lokalisationen. Für  $L_1(1.AK)$  entspricht der angegebene absolute Fehler dem Standardfehler des Fits, für  $L_{PSD}(1.AK_{EB})$  wurde er mittels Gaußscher Fehlerfortpflanzung berechnet.

Zur Ermittlung des  $L_E(1.AK)$ -Werts wurde mit einer sehr geringen Konzentration des primären Antikörpers (1 : 80000) und 100% Cy5-gekoppeltem Antikörper gefärbt (Abbildung 4.11d). Zur Identifikation der PSD wurde Bruchpilot mit AF532 co-gefärbt. Innerhalb der identifizierten PSDs wurden dann einzelne fluoreszente Spots, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit einem einzelnen primären Antikörper zugeordnet werden können, manuell ausgewertet. Aus den erhaltenen Lokalisationen/Spot wurde der Mittelwert gebildet und so für  $L_E(1.AK)$  ein Wert von  $31 \pm 1$  (Standardfehler) erhalten.

Für  $Loc_{PSD}$  wurde durch mehrere Messungen unter experimentellen Bedingungen (1 : 2000-Verdünnung des primären Antikörpers und 100% Cy5-gekoppelter Antikörper) und Bildung des Mittelwerts ein Wert von  $2862 \pm 68$  (Standardfehler)

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

bestimmt.

Schließlich wurde aus den experimentell erhaltenen Werten für  $L_1(1.AK)$ ,  $L_{PSD}(1.AK_{EB})$ ,  $L_E(1.AK)$  und  $Loc_{PSD}$  (siehe auch [Tabelle 4.2](#)) mit oben beschriebener Gleichung die Anzahl der A-Typ-Glutamatrezeptoren pro PSD berechnet:

$$GluRIIA_{PSD} = \frac{2862 \pm 68}{31 \pm 1} \times \frac{1583 \pm 216}{676 \pm 179} = 215 \pm 65. \quad (4.3)$$

Der angegebene absolute Fehler wurde mittels Gaußscher Fehlerfortpflanzung aus den relativen Fehlern der einzelnen Variablen berechnet.

**Tabelle 4.2.: Quantifizierung der A-Typ-Glutamatrezeptoren pro PSD.** Durch verschiedene Vorversuche wurden die Werte für  $L_1(1.AK)$ ,  $L_{PSD}(1.AK_{EB})$ ,  $L_E(1.AK)$  und  $Loc_{PSD}$  experimentell ermittelt. Daraus wurde dann die Anzahl der A-Typ-Glutamatrezeptoren  $GluRIIA_{PSD}$  berechnet. Bei den angegebenen absoluten Fehlern handelt es sich um den Standardfehler des Fits ( $L_1(1.AK)$ ), die per Gaußscher Fehlerfortpflanzung berechneten Fehler ( $L_{PSD}(1.AK_{EB})$  und  $GluRIIA_{PSD}$ ) beziehungsweise die Standardfehler ( $L_E(1.AK)$ ,  $Loc_{PSD}$ ).

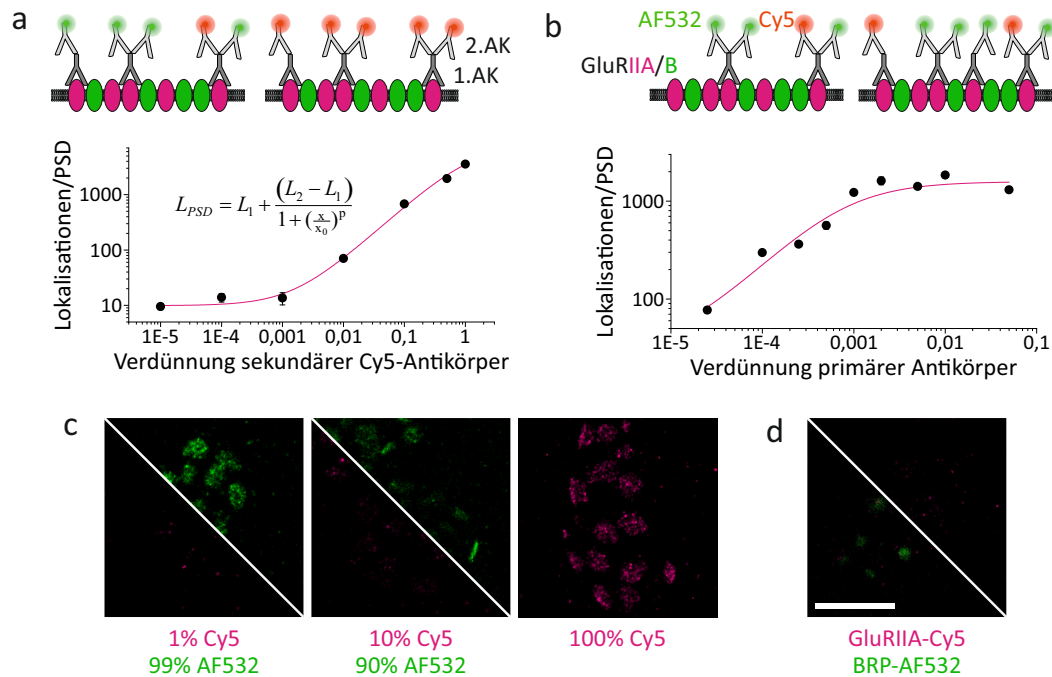
$L_1(1.AK)$	$L_{PSD}(1.AK_{EB})$	$L_E(1.AK)$	$Loc_{PSD}$	$GluRIIA_{PSD}$
$1583 \pm 216$	$676 \pm 179$	$31 \pm 1$	$2862 \pm 68$	<b><math>215 \pm 65</math></b>

#### 4.2.3. Glutamatrezeptoren der NMJ von *Drosophila melanogaster* - Diskussion

**Räumliche Anordnung der A- und B-Typ-Glutamatrezeptoren.** Die Auswertung der mittels *d*STORM erhaltenen Daten hat gezeigt, dass sich die räumliche Anordnung von GluRIIA und GluRIIB verändert, wenn der Muskel während der elektrischen Stimulation auf ein Potential von  $-60$  mV geklemmt wird. Dies lässt sich mit den unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften der beiden Rezeptortypen erklären, die sich darin äußern, dass GluRIIA deutlich langsamer desensibilisiert und größere Miniaturströme aufweist als GluRIIB [[Sch+08](#)]. Durch diese funktionelle Verschiedenheit nehmen GluRIIA und GluRIIB unterschiedlichen Einfluss auf die synaptische Übertragung und durch Veränderungen ihrer Zusammensetzung innerhalb der PSD kann die NMJ auf veränderte neuronale Aktivität reagieren. Diese synaptische Plastizität wird durch das Klemmen und die dadurch unterbundene Depolarisation induziert und scheint sich unseren Ergebnissen zur Folge in einer veränderten räumlichen Anordnung zu zeigen, bei welcher nicht mehr GluRIIA im Zentrum und GluRIIB in der Peripherie vorliegen, sondern umgekehrt.



## 4.2. GluR der NMJ von *Drosophila melanogaster*



**Abbildung 4.11.: Quantifizierung der A-Typ-Glutamatrezeptoren.** Zur absoluten Quantifizierung der A-Typ-Glutamatrezeptoren (GluRIIA) pro PSD wurden eine Reihe an Vorversuchen benötigt (siehe [Unterabschnitt 3.4.1](#)): (1) Eine Titration des sekundären mit Cy5-gekoppelten Antikörpers (a+c) bei konstanter primärer Antikörperkonzentration (1 : 2000), sowie einer Co-Färbung mit einem sekundären AF532-gekoppelten Antikörper. (2) Eine Titration des primären Antikörpers (b) bei konstanter sekundärer Antikörperkonzentration (90% Cy5- und 10% AF532-gekoppelt). (3) Ermittlung der Lokalisierungen pro primärem Antikörper durch ein sehr geringe Konzentration des primären Antikörpers (1 : 80000, 100% Cy5-gekoppelter sekundärer Antikörper) und Co-Färbung (AF532) gegen Bruchpilot (BRP). Die durch die Titrations (a+b) erhaltenen Lokalisierungen pro PSD (Mittelwert) wurden gegen die jeweilige Verdünnung aufgetragen und mit der angegebenen logistischen Funktion gefittet. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Oberhalb der Punktdiagramme (a+b) ist die GluRIIA-Färbung schematisch bei hohen (jeweils links) und niedrigen (jeweils rechts) Verdünnungen des sekundären (2.AK) beziehungsweise primären (1.AK) Antikörpers dargestellt. Die dSTORM-Aufnahmen (15000 Einzelbilder, 10 ms Integrationszeit) zeigen beispielhaft einzelne PSDs, welche für die Titration des sekundären Antikörpers (c) und die Ermittlung der Lokalisierungen pro primärem Antikörper (d) ausgewertet wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 250 nm.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Durch die Zugabe von Forskolin, einem cAMP-Aktivator, wird diese Neuordnung jedoch interessanterweise unterbunden. Es ist bekannt, dass cAMP eine wichtige Rolle für synaptische Plastizität spielt [GB06] und unsere hier gemachte Beobachtung passt auch zu von Divya Sachidanandan durchgeführten TEVC-Messungen: Ohne Forskolin beobachtet man im Verlaufe der elektrischen Stimulation, dass die Zeitkonstante, welche beschreibt wie schnell das exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) wieder abklingt, immer weiter sinkt, was sich durch die Entfernung der langsamer desensitisierenden A-Typ-Rezeptoren erklären lässt. Durch die Zugabe von Forskolin wird dieser Effekt deutlich abgemildert. Diese Beobachtung in Kombination mit unseren durch *d*STORM erhaltenen Erkenntnisse, weist daraufhin, dass Forskolin und somit cAMP einen Einfluss auf die Zusammensetzung und räumliche Anordnung der A- und B-Typ-Rezeptoren innerhalb der PSD und somit auf die synaptische Plastizität nimmt.

**Quantifizierung der A-Typ-Glutamatrezeptoren pro PSD.** Uns ist es gelungen den A-Typ-Rezeptor anhand von mittels *d*STORM aufgenommenen Daten zu quantifizieren. Der Wert von  $215 \pm 65$  liegt etwas höher als der elektrophysiologisch abgeschätzte veröffentlichte Wert von 160 [PDH04], was darin begründet liegen könnte, dass durch Elektrophysiologie ausschließlich funktionelle Rezeptoren und geöffnete Kanäle detektiert werden, während durch eine Antikörperfärbung und *d*STORM alle A-Typ-Rezeptoren erfasst werden sollten. Im Nachhinein betrachtet, könnte man die Qualität der Ergebnisse verbessern, indem man eine etwas höhere Konzentration des sekundären Antikörpers einsetzt, da hier bei der Titration bei 100% noch keine vollständige Sättigung erreicht war, sodass die von uns gemachte Annahme, dass  $L_1(2.AK) = L_{PSD}(2.AK_{EB})$  lediglich eine Abschätzung darstellt. Alternativ zu dieser Annahme wäre die Ermittlung der beiden Werte aus dem Fit gewesen. Da die Daten aber nicht eindeutig in Sättigung gehen, konvergiert der Fit schlecht und führt zu großen Fehlern, weshalb wir uns für die hier angewendete Alternative entschieden haben.

### 4.3. CDH13 und GluT3 im Zusammenhang mit ADHS

Die Untersuchung von CDH13 und GluT3 im Zusammenhang mit ADHS mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie, welche in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch erfolgte, lässt sich in zwei Unterprojekte gliedern, deren Resultate in [Unterabschnitt 4.3.1](#), sowie [Unterabschnitt 4.3.2](#) und [Unterabschnitt 4.3.3](#) dargestellt werden.

#### 4.3.1. CDH13 und 5-HT in dorsalen Raphekernen des embryonalen Mausgehirns.

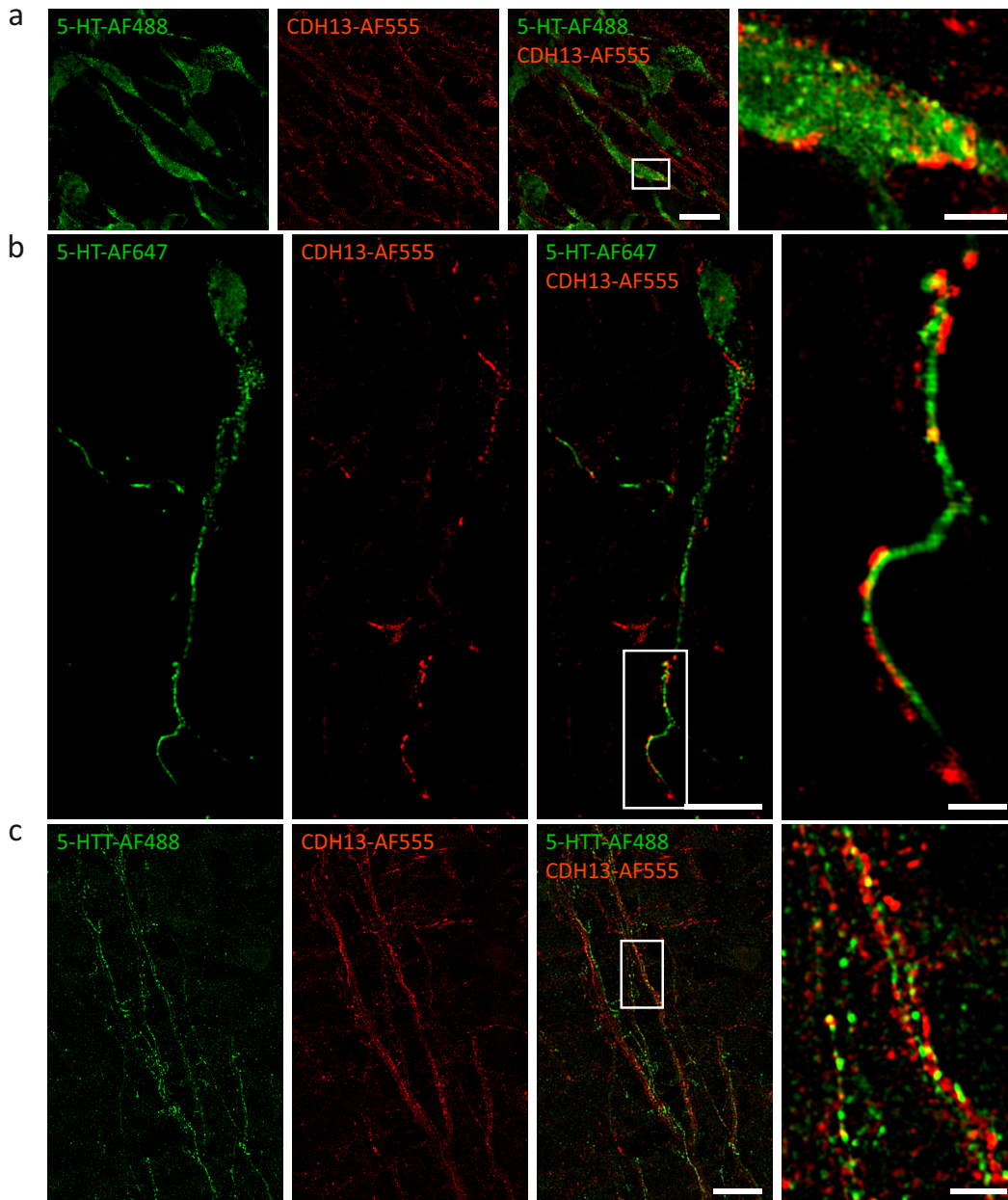
Cadherin-13 (CDH13) ist an Zellmigration, Neuritenwachstum und Axonführung beteiligt (siehe [Unterabschnitt 2.3.3](#)) und es konnte gezeigt werden, dass es in serotonergen (5-HT) Neuronen der dorsalen Raphekernen angereichert ist [[Oka+15](#)]. Sowohl Cadherin-13 als auch das serotonerge System werden mit ADHS in Verbindung gebracht (siehe [Unterabschnitt 2.3.3](#)), sodass dieser Zusammenhang besonders interessant ist. Im Rahmen dieser Kooperation sollte daher mittels SIM untersucht werden, inwiefern CDH13 an der Entwicklung des serotonergen Systems im embryonalen Mausgehirn beteiligt ist. Dazu präparierte meine Kooperationspartnerin Andrea Forero embryonale Mausgehirne (Entwicklungsstadium E13.5), fertigte 20 µm dicke Kryoschnitte an und markierte mittels indirekter Immunfärbung die jeweiligen Zielproteine. Anschließend analysierten wir diese mittels SIM. Die Ergebnisse wurden in [[For+17](#)] veröffentlicht.

Zuerst wurde die Verteilung von 5-HT und CDH13 in den dorsalen Raphekerne untersucht und wir konnten zeigen, dass CDH13 sowohl im Soma ([Abbildung 4.12a](#)) als auch in den Axonen ([Abbildung 4.12b](#)) serotonerger Neurone vorkommt. In einem weiteren Experiment wurden CDH13 und der Serotonintransporter (5-HTT oder SERT) co-gefärbt und auch hier war zu beobachten, dass CDH13 in 5-HTT-positiven Neuronen präsent ist ([Abbildung 4.12c](#)).

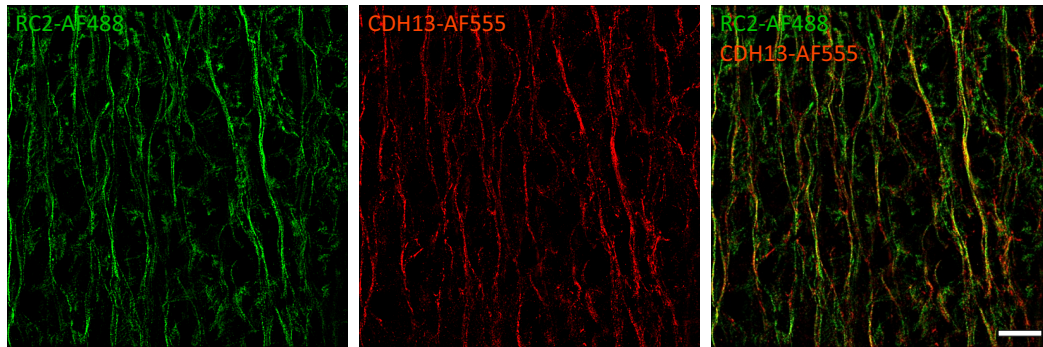
Da die Aufnahmen weiterhin zeigten, dass CDH13 nicht nur in 5-HT-positiven Neuronen vorhanden ist, sondern auch in benachbarten parallel verlaufenden 5-HT-negativen Zellen, untersuchten wir im nächsten Schritt, ob es sich bei diesen Zellen um radiäre Gliazellen handelt. Diese neuronalen Vorläuferzellen spielen eine wichtige Rolle als Gerüststruktur für migrierende Neurone [[BCP18](#)] und lassen sich mithilfe des RC2-Antikörpers färben [[Par+09](#)]. Wie in [Abbildung 4.13](#) zu sehen, bestätigte sich die Vermutung als richtig und CDH13 findet sich auch in radiären Gliazellen der dorsalen Raphekerne im embryonalen Mausgehirn.

Aufgrund der Erkenntnis, dass CDH13 sowohl in 5-HT-positiven Neuronen als auch in radiären Gliazellen vorkommt, wurden im folgenden Versuch alle drei Strukturen simultan zwei- und dreidimensional abgebildet ([Abbildung 4.14](#)). Die 3D-Aufnahmen wurden mit Imaris (Bitplane) zu einer 3D-Animation verarbeitet (Videos unter [[For+17](#)] veröffentlicht) und analysiert. Die erhaltenen 2D-Bilder und 3D-Animationen verhalfen uns zu zwei interessanten Beobachtungen: (1) Es gibt serotonerge Neurone der dorsalen Raphekerne, welche mit radiären Gliazellen ver-

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.12.: SIM-Aufnahmen von CDH13 in Neuronen der dorsalen Raphekerne.** In den dorsalen Raphekerne embryonaler Mausgehirne wurde CDH13 mit AF555 markiert und 5-HT mit AF488 (a) bzw. AF647 (b) oder SERT mit AF488 (c) co-gefärbt. Gezeigt sind die Einzelsignale, sowie die Überlagerung der Kanäle in der Übersicht und eine Vergrößerung der markierten Region. CDH13 kommt in den Somata (a) und Axonen (b) 5-HT-positiver Neurone sowie in 5-HTT-positiven Zellen (c) vor. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$  in den Übersichtsbildern und 2  $\mu\text{m}$  in den Vergrößerungen. Diese Abbildung wurde leicht abgewandelt aus: „[Cadherin-13 Deficiency Increases Dorsal Raphe 5-HT Neuron Density and Prefrontal Cortex Innervation in the Mouse Brain](https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00307)“ (https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00307) von Forero *et. al.* [For+17], lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



**Abbildung 4.13.: SIM-Aufnahmen von *CDH13* in radiären Gliazellen der dorsalen Raphekerne.** In den dorsalen Raphekerne embryonaler Mausgehirne wurde *CDH13* mit AF555 markiert und die radiären Gliazellen mittels des RC2-Antikörpers mit AF488 co-gefärbt. Das linke und mittlere Bild zeigen jeweils die Einzelsignale und das rechte Bild die Überlagerung beider Kanäle. Demnach kommt *CDH13* in radiären Gliazellen der dorsalen Raphekerne vor. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ . Diese Abbildung wurde leicht abgewandelt aus: „[Cadherin-13 Deficiency Increases Dorsal Raphe 5-HT Neuron Density and Prefrontal Cortex Innervation in the Mouse Brain](https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00307)“ (https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00307) von Forero *et. al.* [For+17], lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

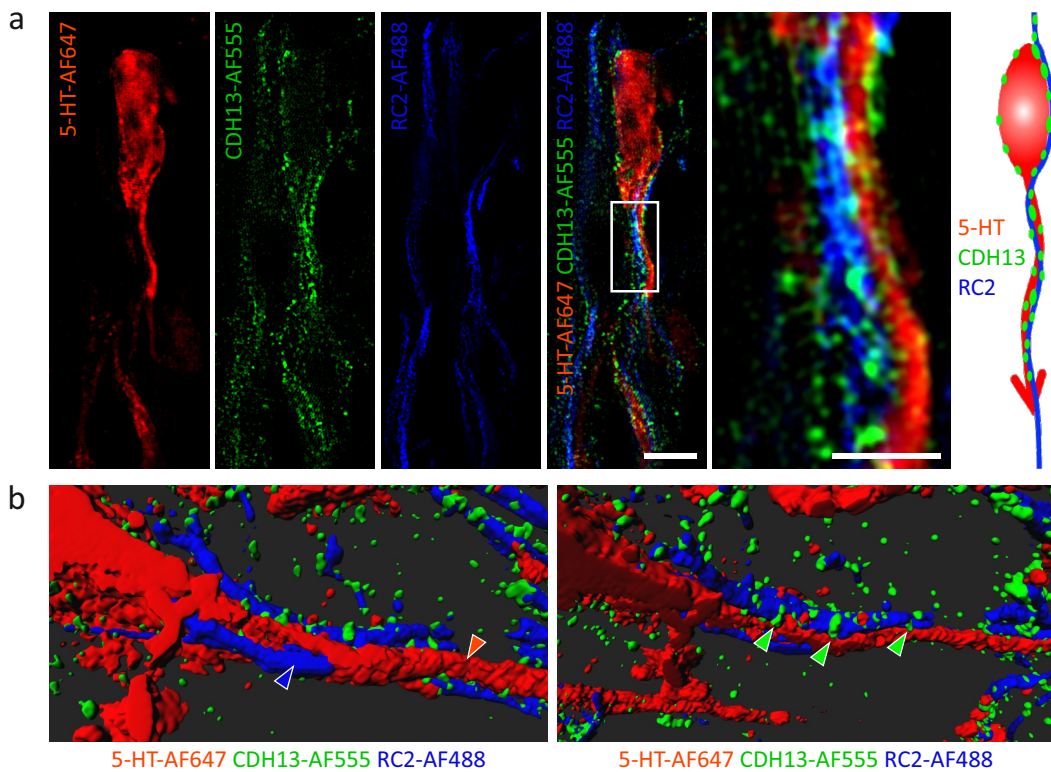
flochten sind. (2) In manchen Fällen ist an den Überschneidungspunkten beider Zelltypen eine Anreicherung von *CDH13* auszumachen, sowohl im Bereich der Somata als auch der Axone.

#### 4.3.2. Charakterisierung aus humanen iPS-Zellen differenzierter serotonerger Neurone

Neben den Experimenten an murinen Gehirnschnitten, nutzen wir in einem weiteren Teilprojekt humane induzierte pluripotente Stammzellen, welche von meiner Kooperationspartnerin Charline Jansch aus Hautfibroblasten gewonnen und zu serotonergen Neuronen differenziert wurden. Dass es sich tatsächlich um serotonerge Neurone handelt, überprüfte sie durch den Nachweis spezifischer Marker (TPH2, 5-HTT und 5-HT) und typischer elektrophysiologischer Eigenschaften, wobei sich zeigte, dass die Kultur neben 42% serotonergen Neuronen auch 40% katecholaminerge und 12% GABAerge Neurone aufweist. Anschließend nutzten wir hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie um die serotonergen Neurone weiter zu charakterisieren. Die Ergebnisse sind zur Veröffentlichung eingereicht [Jan+].

Mittels SIM wurde überprüft, ob in der erhaltenen Kultur serotonerge Neurone (TPH2-positiv) zu finden sind, welche *CDH13* exprimieren, wie wir es für serotonerge Neurone der dorsalen Raphekerne im embryonalen Mausgehirn vorgefunden

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.14.: SIM-Aufnahmen von CDH13, 5-HT und RC2 in radiären Gliazellen der dorsalen Raphekerne.** In 20 µm dicken Kryoschnitten embryonaler Mausgehirne wurden CDH13 (AF555), 5-HT (AF647) und radiäre Gliazelle (RC2, AF488) gefärbt. Mittels SIM wurden 2D- (a) und 3D-Aufnahmen (b) der dorsalen Raphekerne angefertigt. Die erhaltenen Daten zeigen, dass sich serotonerge Neurone (rote Pfeilköpfe) und radiäre Gliazellen (blaue Pfeilköpfe) umeinanderwinden und dass sich CDH13 in beiden Zelltypen finden lässt und sich in manchen Fällen an Überschneidungspunkten beider Zelltypen anreichert (grüne Pfeilköpfe), was schematisch oben rechts verdeutlicht wird. In (a) werden repräsentative 2D-Daten gezeigt (Einzelsignale und überlagertes Signal als Übersicht, sowie eine Vergrößerung der weiß-umrandeten Region). Die beiden Bilder in (b) stammen aus anhand der 3D-Daten mit Imaris (Bitplane) erstellten Animationen. Aus 3D Daten erzeugte Videos sind in [For+17] veröffentlicht. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm in der 2D-Übersicht und 2 µm in der 2D-Vergrößerung. Diese Abbildung wurde leicht abgewandelt aus: „*Cadherin-13 Deficiency Increases Dorsal Raphe 5-HT Neuron Density and Prefrontal Cortex Innervation in the Mouse Brain*“ (<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00307>) von Forero *et. al.* [For+17], lizenziert unter CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

haben (siehe [Abbildung 4.12](#) und [\[For+17\]](#)). Tatsächlich konnten wir Neurone identifizieren, welche sowohl für TPH2 als auch für CDH13 positiv sind und beobachten dass CDH13 dabei wie im Mausgehirn sowohl im Bereich der Somata als auch der Axone vorkommt ([Abbildung 4.15 a, c und d](#)). Allerdings fand sich auch ein großer Teil serotonerger Neurone, die CDH13-negativ sind ([Abbildung 4.15 b](#)). Durch die Erfassung und Rekonstruktion dreidimensionaler Daten konnte man weiterhin beobachten, dass sich CDH13 an den Kontaktstellen eng beieinander liegender TPH2- und CDH13-positiver Neurone ansammelt ([Abbildung 4.16](#)).

Um die synaptische Struktur nach acht Wochen Reifung der serotonergen Neurone zu kontrollierten, untersuchten wir die Synapsenproteine Homer und Bassoon mittels *d*STORM in TPH2-positiven Zellen. Dabei konnten sowohl Bassoon (Präsynapse) als auch Homer (Postsynapse) gleichmäßig über das ganze Neuron verteilt lokalisiert werden, wobei Bassoon deutlich stärker exprimiert zu sein scheint ([Abbildung 4.17](#)).

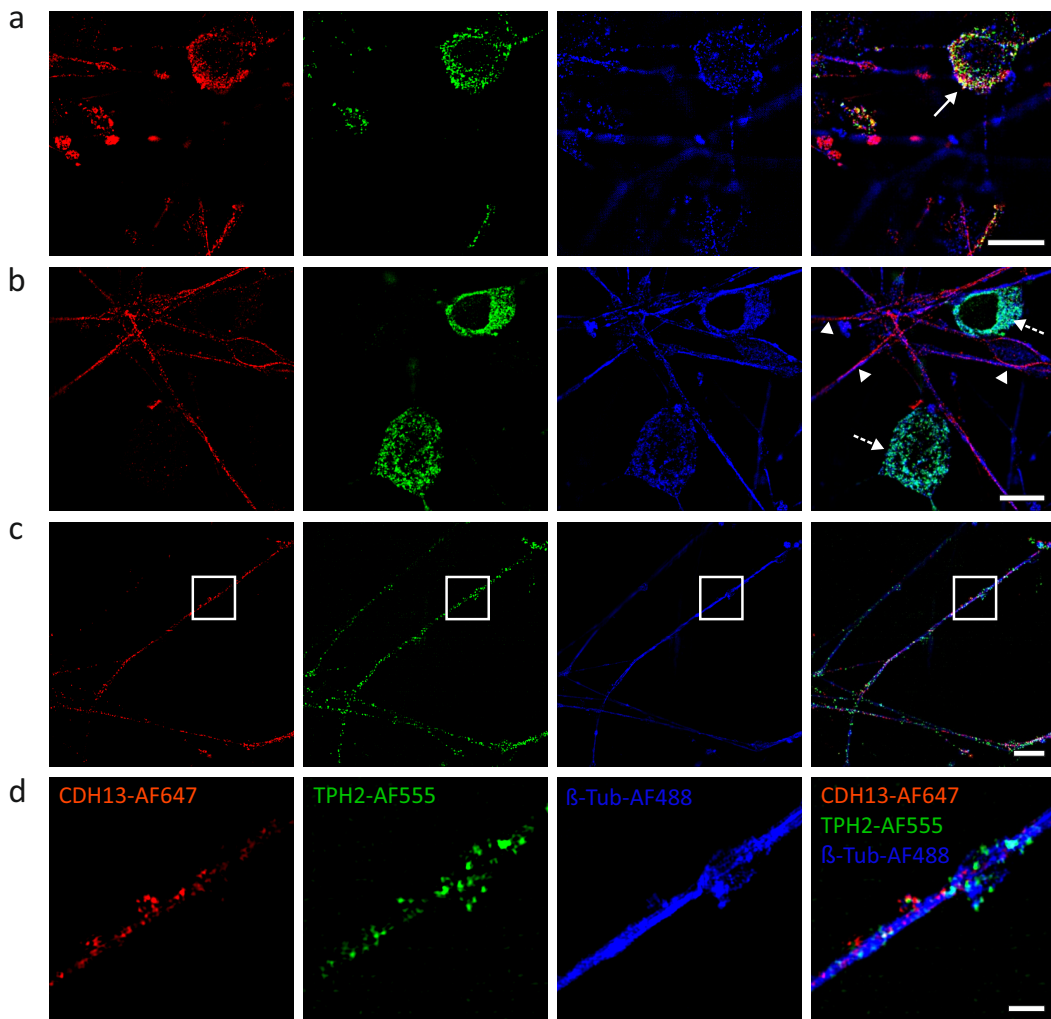
#### 4.3.3. Relative Quantifizierung von GluT3, Bassoon und Homer in aus iPS-Zellen differenzierten Neuronen mit verschiedenen Kopienzahlvariationen des *SLC2A3*-Gens

Der als „neuronaler“ Glucosetransporter bezeichnete Glucosetransporter Typ 3 (GluT3) ist neben CDH13 und 5-HT ein weiteres Protein, das mit ADHS in Verbindung gebracht wird (siehe [Unterabschnitt 2.3.3](#)). So konnte bei ADHS-Patienten eine Duplikation oder Deletion des GluT3-codierenden Gens *SLC2A3* nachgewiesen werden [[Les+11](#)].

Um die Rolle dieser Kopienzahlvariationen besser verstehen zu können, hat Charline Jansch iPS-Zelllinien aus Hautfibroblasten von drei Versuchspersonen generiert: CJ1 (nicht an ADHS erkrankte Person), CJ5 (an ADHS erkrankte Patientin mit *SLC2A3*-Duplikation) und CJ7 (an ADHS erkrankte Patientin mit *SLC2A3*-Deletion). Diese hat sie wiederum wie oben beschrieben zu serotonergen Neuronen ausdifferenziert, wobei auch hier ebenso katecholaminerge und GABAerge Neurone in der jeweiligen Kultur zu finden sind. Die Färbung von GluT3 zeigt in diesen Zelllinien die typische Verteilung in Somata und Fasern [[Sim+08](#)], wobei wir unsere Analyse im Folgenden auf die Fasern ([Abbildung 4.18](#)) beschränkt haben.

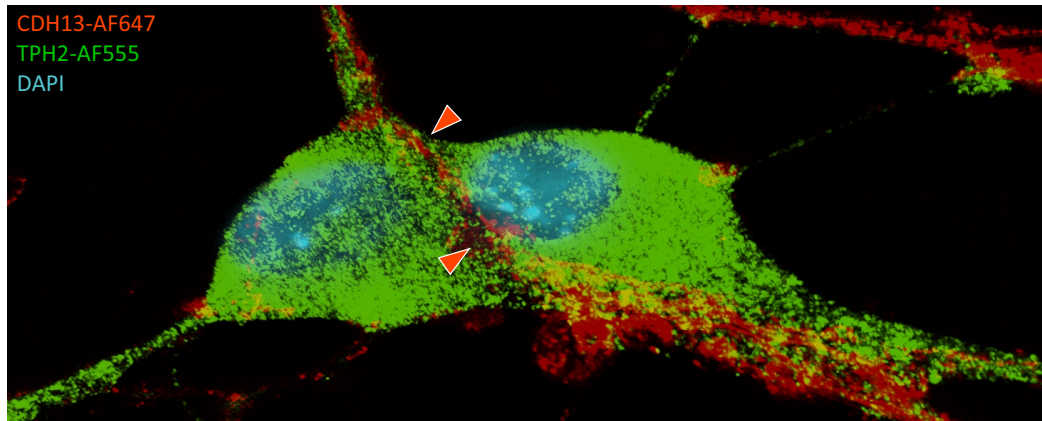
Unter Verwendung der drei generierten Zelllinien wurde eine Reihe an *d*STORM-Messungen vorgenommen und durch relative Quantifizierung von GluT3, Homer und Bassoon die Auswirkungen von Deletion und Duplikation untersucht. Dazu wurden aus den durch *d*STORM erhaltenen Lokalisationsdaten die Lokalisationen

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.15.: SIM-Aufnahmen von CDH13 und TPH2 in zu Neuronen differenzierten iPS-Zellen.** Zu Neuronen differenzierte iPS-Zellen wurden gegen TPH2 (AF555),  $\beta$ -Tubulin ( $\beta$ -Tub, AF488) und CDH13 (AF647) gefärbt. Man kann sowohl serotonerge Neurone (TPH2-positiv) finden, welche CDH13 exprimieren (durchgezogene Pfeile) als auch serotonerge Neurone, die CDH13-negativ sind (gestrichelte Pfeile). Bei ersteren kann CDH13 sowohl in den Somata (a) als auch in den Axonen (c+d) beobachtet werden. Die Bilder in d stellen eine Vergrößerung des in c markierten Bereichs dar. Weiterhin kann man erkennen, dass nicht alle Neurone (durch  $\beta$ -Tubulin sichtbar gemacht) serotonerg sind und dass man auch unter diesen CDH13-positive Zellen ausmachen kann (Pfeilköpfe). Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m in a, b und c, sowie 2  $\mu$ m in d.





**Abbildung 4.16.:** SIM-Aufnahmen von CDH13 und TPH2 in zu Neuronen differenzierte iPS-Zellen. Mittels SIM wurden 3D-Aufnahmen von zu Neuronen differenzierte iPS-Zellen, welche gegen TPH2 (AF555) und CDH13 (AF647) gefärbt waren, erfasst. Die erhaltenen Daten wurden mit Imaris (Bitplane) zu einer 3D-Animation verarbeitet. Der hier gezeigte Ausschnitt aus dieser Animation zeigt zwei dicht beieinander liegende serotonerge Neurone (TPH2-positiv), an deren Kontaktstelle CDH13 angereichert ist (rote Pfeilköpfe).

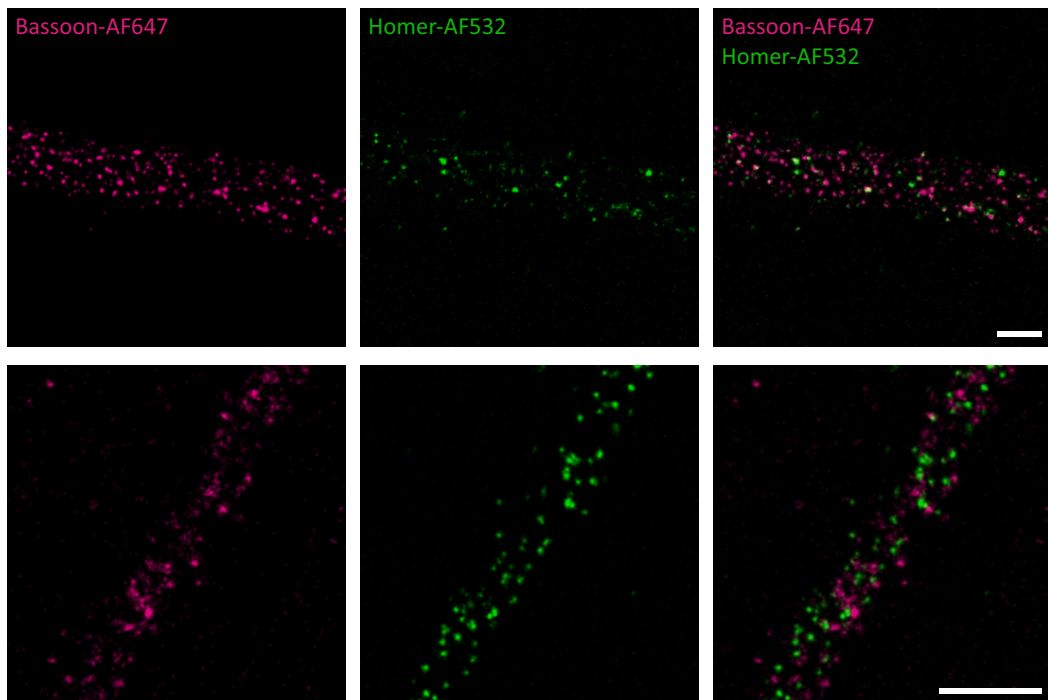
pro  $\mu\text{m}^2$  innerhalb der Fasern, welche durch ein selbstgeschriebenes Fiji Makro identifiziert wurden, ermittelt (siehe [Unterabschnitt 3.4.2](#)) und analysiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden für jede Kopienzahlvariation und jede untersuchte Struktur zwischen drei und fünf Differenzierungen betrachtet ([Tabelle 3.2](#)), da sich verschiedene Differenzierungen deutlich voneinander unterscheiden können.

Im Falle von GluT3, würde man entsprechend der Anzahl an Genkopien, für CJ5 ungefähr eine Verdopplung und für CJ7 etwa eine Halbierung der Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  im Vergleich zu CJ1 erwarten. Für CJ7 bestätigt sich diese Erwartung: Die Anzahl der Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  verringern sich signifikant ( $p \leq 0,001$ ) auf etwa 40% des für CJ1 ermittelten Werts ([Abbildung 4.19a](#)). CJ5 hingegen zeigt überraschenderweise keinen signifikanten Unterschied zu CJ1 ([Abbildung 4.19a](#)).

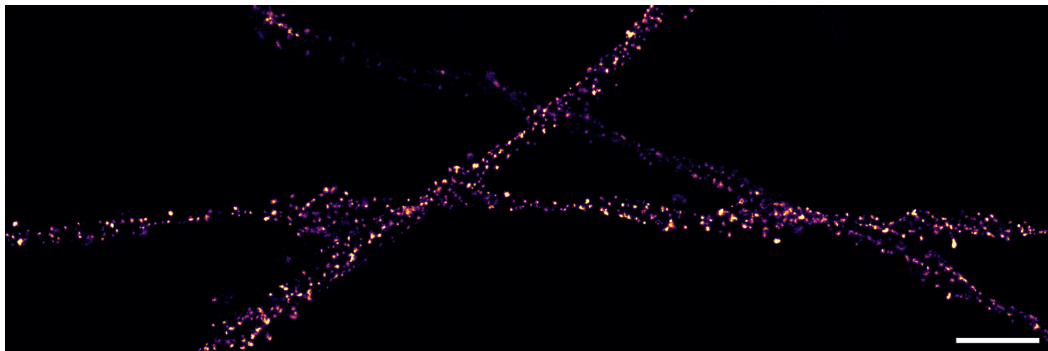
Betrachtet man die statistische Verteilung der Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$ , stellt sich einerseits heraus, dass sie nicht normal-verteilt sind, weshalb zur Berechnung der Signifikanzniveaus der Kolmogorow-Smirnow-Test herangezogen wurde. Andererseits offenbart die Kernel-Glättung der Daten ([Abbildung 4.19b](#)), dass es innerhalb der Datensätze zwei Subpopulationen mit weniger beziehungsweise mehr Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  zu geben scheint. Dies ist bei allen drei Kopienzahlvariationen zu erkennen.

Da schon in früheren Studien veröffentlicht wurde, dass der Entzug von Glucose zu einem Anstieg der GluT3 mRNA führen kann [[FSS03](#)], untersuchten wir

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

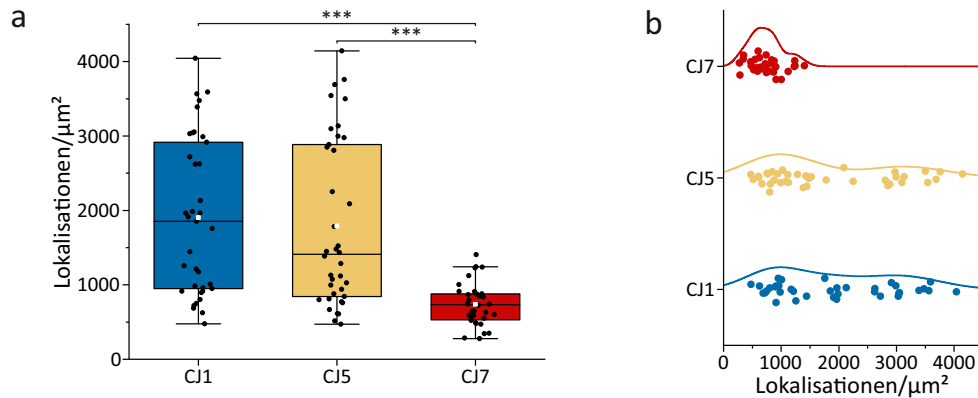


**Abbildung 4.17.: *d*STORM-Aufnahme von Bassoon und Homer in zu serotonergen Neuronen differenzierten iPS-Zellen.** Aus iPS-Zellen differenzierte TPH2-positive Neurone wurden mittels *d*STORM hinsichtlich ihrer synaptischen Struktur untersucht. Dafür wurden Bassoon (AF647) und Homer (AF532) als Marker der Prä- beziehungsweise Postsynapse gefärbt. Es zeigt sich eine relativ gleichmäßige Verteilung beider Proteine über die Zellen, wobei Bassoon im Vergleich zu Homer stärker exprimiert zu sein scheint. Die Maßstabsbalken entsprechen 1 µm.



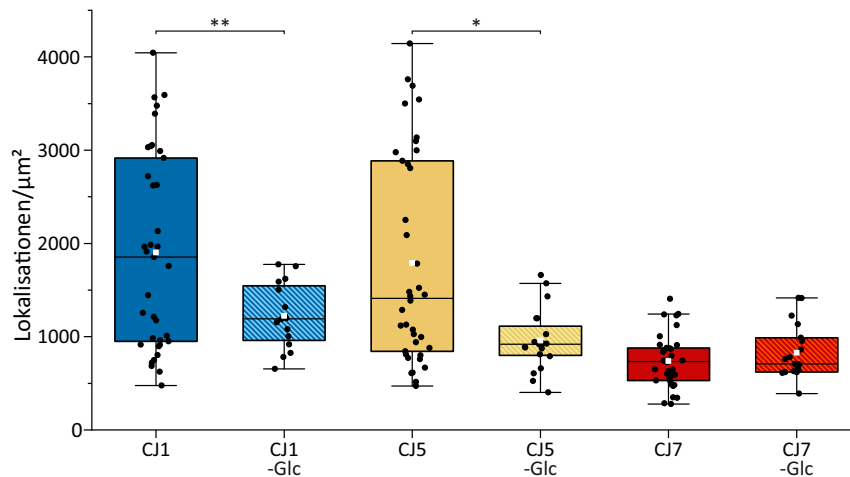
**Abbildung 4.18.: *d*STORM-Aufnahme von GluT3 in zu serotonergen Neuronen differenzierten iPS-Zellen.** In Neuronen der Zelllinie CJ1, welche aus iPS-Zellen einer nicht an ADHS erkrankten Person differenziert wurden, wurde der Glucosetransporter Typ 3 durch indirekte Immunfluoreszenz mit AF647 markiert und mittels *d*STORM (15000 Einzelbilder, 10 ms) abgebildet. Der Maßstabsbalken entspricht 2 µm.

### 4.3. CDH13 und GluT3 im Zusammenhang mit ADHS



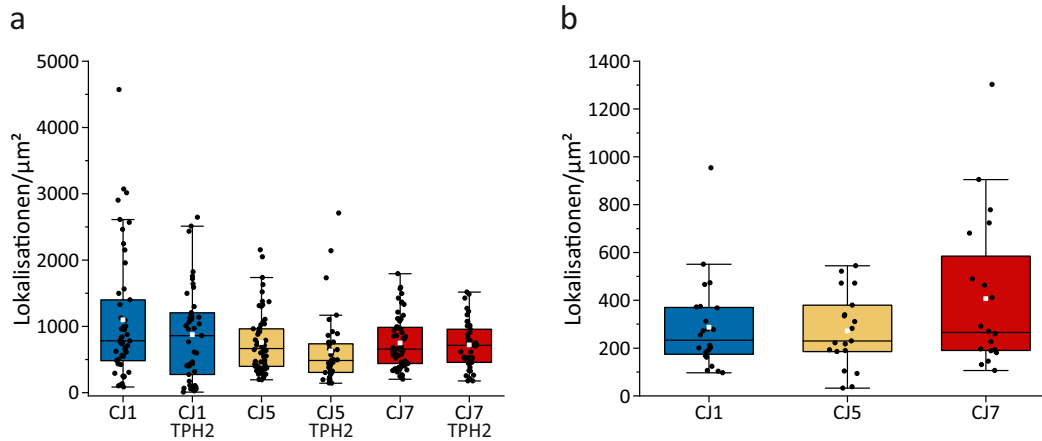
**Abbildung 4.19.: Relative Quantifizierung von GluT3 in zu Neuronen differenzierten iPS-Zellen mit verschiedenen Kopienzahlvariationen.** Aus den durch *d*STORM erhaltenen Lokalisationsdaten für GluT3 wurden die Lokalisationen pro µm<sup>2</sup> extrahiert und für die Zelllinien CJ1 (Kontrolle), CJ5 (Duplikation des *SLC2A3*-Gens) und CJ7 (Deletion des *SLC2A3*-Gens) in einem Box-Plot dargestellt (a). Dabei umfasst die Box die mittleren 50% der Datenpunkte (schwarze Punkte), die Antennen zeigen den 1,5-fachen Interquartilsabstand, der Strich innerhalb der Box repräsentiert den Median und das weiße Quadrat den Mittelwert. Da die Verteilung der Datenpunkte keiner Normalverteilung entspricht (b), wurde die Signifikanz mittels Kolmogorow-Smirnow-Test überprüft und für CJ7 eine signifikante Abnahme der für GluT3 erhaltenen Lokalisationen im Vergleich zu CJ5 und CJ7 festgestellt ( $p \leq 0,001$ ). Die Verteilung der Daten ist in b durch eine Kernel-Glättung angedeutet, wobei sich für alle Kopienzahlvariationen zwei Subpopulationen andeuten.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4.20.: Relative Quantifizierung von GLUT3 in zu Neuronen differenzierten iPSC-Zellen nach Glucoseentzug.** Aus den durch *d*STORM erhaltenen Lokalisationsdaten für GLUT3 wurden die Lokalisierungen pro  $\mu\text{m}^2$  extrahiert und für die Zelllinien CJ1 (Kontrolle), CJ5 (Duplikation des *SLC2A3*-Gens) und CJ7 (Deletion des *SLC2A3*-Gens) ohne und mit Glucoseentzug (-Glc) in einem Box-Plot dargestellt. Dabei umfasst die Box die mittleren 50% der Datenpunkte (schwarze Punkte), die Antennen zeigen den 1,5-fachen Interquartilsabstand, der Strich innerhalb der Box repräsentiert den Median und das weiße Quadrat den Mittelwert. Da die Verteilung der Datenpunkte keiner Normalverteilung entspricht, wurde die Signifikanz mittels Kolmogorow-Smirnow-Test überprüft. Eine signifikante Abnahme der für GLUT3 erhaltenen Lokalisierungen durch den Glucoseentzug zeigte sich bei CJ1 ( $p \leq 0,01$ ) und CJ5 ( $p \leq 0,05$ ).

### 4.3. CDH13 und GluT3 im Zusammenhang mit ADHS



**Abbildung 4.21.: Relative Quantifizierung von Bassoon und Homer in zu Neuronen differenzierten iPS-Zellen mit verschiedenen Kopienzahlvariationen.** Aus den durch *d*STORM erhaltenen Lokalisationsdaten für Bassoon (a) und Homer (b) wurden die Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  extrahiert und für die Zelllinien CJ1 (Kontrolle), CJ5 (Duplikation des *SLC2A3*-Gens) und CJ7 (Deletion des *SLC2A3*-Gens) in einem Box-Plot dargestellt. Dabei umfasst die Box die mittleren 50% der Datenpunkte (schwarze Punkte), die Antennen zeigen den 1,5-fachen Interquartilsabstand, der Strich innerhalb der Box repräsentiert den Median und das weiße Quadrat den Mittelwert. Für Bassoon wurden die Lokalisationen jeweils in allen oder nur in serotonergen (TPH2) Neuronen bestimmt. Weder für Bassoon noch für Homer sind signifikante Unterschiede zwischen den Kopienzahlvariationen zu erkennen.

in unserem nächsten Experiment, ob sich dieser Anstieg auch auf Proteinebene in den drei generierten Zelllinien anhand der Lokalisationen zeigt (Abbildung 4.20). Interessanterweise findet sich jedoch für keine der Zelllinien ein Anstieg der Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$ . Im Gegenteil ist für die Anzahl der Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  bei CJ1 und CJ5 durch den Glucosemangel sogar ein signifikanter ( $p \leq 0,01$  bzw.  $p \leq 0,05$ ) Rückgang um ungefähr 35% zu beobachten. Bei CJ7 ist keine signifikante Veränderung durch den Glucoseentzug auszumachen.

Um herauszufinden, ob sich Deletion und Duplikation des *SLC2A3*-Gens auf die Synapsenbildung auswirken, wurden in einem nächsten Schritt die Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  für Bassoon und Homer bestimmt. Weder für Bassoon (Abbildung 4.21a), noch für Homer (Abbildung 4.21b) waren signifikante Unterschiede zwischen den Kopienzahlvariationen auszumachen. Für Bassoon wurde weiterhin eine Messreihe durchgeführt, bei der ausschließlich serotonerge (TPH2-positive) Neurone ausgewertet wurden. Doch auch für diese zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, weder im Vergleich zu allen Neuronen, noch zwischen den Kopienzahlvariationen. Allerdings ist hier anzumerken, dass das Erstellen einer Maske anhand der TPH2-

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Daten nicht immer funktionierte, sodass für serotonerge Neurone weniger Daten und auch nur zwei Differenzierungen vorliegen (Tabelle 3.2).

Die für Bassoon und Homer erhaltenen Daten waren wie auch schon für GluT3 nicht normal-verteilt, scheinen aber erneut zwei Subpopulationen aufzuweisen (Abbildung A.2).

##### 4.3.4. CDH13 und GluT im Zusammenhang mit ADHS - Diskussion

**Serotonerge Neurone und CDH13.** Im embryonalen Mausmodell konnten wir zeigen, dass CDH13 spezifisch in serotonergen Neuronen der dorsalen Raphekerne exprimiert wird [For+17]. Interessanterweise konnten wir auch in einigen der zu serotonergen (TPH2-positiven) Neuronen differenzierten iPS-Zellen die Expression von CDH13 feststellen. Aufgrund der Erkenntnisse aus dem Mausmodell liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Zellen um Neurone der dorsalen Raphekerne handelt. CDH13 könnte infolgedessen als Marker für serotonerge Neurone der dorsalen Raphekerne dienen. Ob es jedoch wirklich als zuverlässiger Marker geeignet ist, müsste durch weitere Untersuchungen verifiziert werden.

Die SIM-Aufnahmen der murinen Gehirnschnitte offenbarte weiterhin, dass CDH13 nicht nur in 5-HT-positiven Neuronen, sondern auch in radiären Gliazellen exprimiert wird, was darauf hinweisen könnte, dass CDH13 an der durch die radiären Gliazellen vermittelten Migration der serotonergen Nervenzellen und somit an der Entwicklung des serotonergen Systems während der Embryonalentwicklung beteiligt ist. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung, dass serotonerge Neurone und radiäre Gliazellen in den animierten 3D-Aufnahmen miteinander verflochten sind und sich CDH13 an Überschneidungspunkten zwischen beiden Zelltypen findet, noch verstärkt. Möglicherweise werden die serotonergen Neurone durch radiäre Gliazellen physisch geleitet, während CDH13 durch homophile Interaktionen zum Migrationsprozess beiträgt.

Für die aus iPS-Zellen differenzierten Neurone zeigte sich, dass dicht beieinanderliegende serotonerge und CDH13-positive Neurone ebenfalls an den Kontaktstellen eine Anreicherung von CDH13 zeigen, was auf eine Beteiligung an Zell-Zell-Interaktionen hindeuten könnte.

**Synapsenstruktur der zu serotonergen Neuronen differenzierten iPS-Zellen.** Die Bassoon- und Homerfärbung acht Wochen alter aus iPS-Zellen differenzierter serotonerger Neurone zeigte die Expression beider Synapsenmarker über die gesamte Zelle. Allerdings scheint Bassoon deutlich stärker exprimiert zu sein

als Homer und die für andere Synapsen veröffentlichte typische Struktur, bei welcher Bassoon und Homer sich auf der prä- beziehungsweise postsynaptischen Seite in einer Art Balken anreichern und getrennt durch den synaptischen Spalt gegenüber liegen [And+14; Dan+10], konnte nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die aus iPS-Zellen generierten serotonergen Neurone nicht ausschließlich durch synaptische, sondern auch nicht-synaptische Übertragung kommunizieren [Viz+10].

**Kopienzahlvariationen des *SLC2A3*-Gens.** Die relative Quantifizierung von GluT3 in aus iPS-Zellen differenzierten Neuronen mit verschiedenen Kopienzahlvariationen des für GluT3-codierenden *SLC2A3*-Gens hat zu unerwarteten, nichtsdestotrotz interessanten Ergebnissen geführt. Hätte man bei einer naiven Betrachtung erwartet, dass die Duplikation und Deletion des *SLC2A3*-Gens zu einer Verdoppelung beziehungsweise einer Halbierung der vorhandenen Transporter und somit der ermittelten Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  führen, hat sich herausgestellt, dass der Zusammenhang komplexer sein muss. Zwar nimmt die Anzahl der Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  bei CJ7 tatsächlich um circa 60% im Vergleich zu CJ1 ab, für CJ5 jedoch zeigt sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Diese Beobachtung ist umso interessanter, wenn man berücksichtigt, dass Charline Jansch auf mRNA-Ebene eine Zunahme im Fall von CJ5 und eine Verringerung bei CJ7 nachweisen konnte. Dies deutet also daraufhin, dass es nach der Transkription zu einer Regulation der Proteinmenge kommen muss. Während das Herunterregeln in Zellen der CJ5-Linie mit erhöhter mRNA-Menge kein Problem zu sein scheint, findet eine Hochregulation bei CJ7 scheinbar nicht statt. Dadurch spiegelt sich nur die Deletion des *SLC2A3*-Gens auch auf Proteinebene in der Proteinmenge und somit der Anzahl der Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  wider.

Dass sich durch Glucoseentzug keine Erhöhung der Anzahl der Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  zeigt, sondern für CJ1 und CJ5 sogar eine signifikante Abnahme, ist schwierig mit den bisher veröffentlichten Daten [FSS03], sowie mit ergänzenden Experimenten von Charline Jansch auf mRNA-Ebene, in Einklang zu bringen, bei welchen der Glucoseentzug eine Zunahme der mRNA-Menge bewirkte. Andererseits ist es auch durchaus sinnvoll, dass bei geringen Glucosekonzentrationen weniger Glucosetransporter in die Membran eingebaut werden, da es weniger Glucose zu transportieren gibt. Möglicherweise findet auch hier, wie bereits oben vermutet, eine Regulation nach der Transkription statt. Eine Möglichkeit wäre, dass nicht alle Transporter in die Membran eingebaut werden. Da GluT3 hier extrazellulär mit einem N-terminalen Antikörper markiert und die Zellen dafür nicht permeabilisiert

#### 4. Ergebnisse und Diskussion

wurden, werden nur Transporter gefärbt, welche auch in die Membran eingebaut und deshalb extrazellulär für den Antikörper zugänglich sind. Es könnte also sein, dass sich intrazellulär eine der mRNA-entsprechenden Erhöhung an GluT3 zeigt.

Auch auf die Synapsenbildung scheinen sich Duplikation und Deletion weder positiv noch negativ auszuwirken, da für Bassoon und Homer keine signifikanten Unterschiede der Anzahl der Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  zwischen den Kopienzahlvariationen zu erkennen sind.

Weiterhin sehr interessant ist die Beobachtung, dass die Daten weder für GluT3, noch für Bassoon und Homer, eine Normalverteilung zeigen, sondern stattdessen bei allen Kopienzahlvariationen zwei Subpopulationen mit unterschiedlicher Anzahl an Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  vorhanden zu sein scheinen. Die erste in den Sinn kommende Vermutung, es könne sich dabei um serotonerge und katecholaminerge Neurone, die zu ähnlichen Anteilen in den Zelllinien vorkommen, handeln, wird durch die Tatsache entkräftet, dass sich diese Verteilung für Bassoon selbst dann findet, wenn man nur serotonerge Neuronen auswertet.



## 5 | Fazit und Ausblick

What we know is a drop, what  
we don't know is an ocean.

---

*(Isaac Newton)*

Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopiemethoden haben sich seit ihren Anfängen in den 1990er-Jahren rasant entwickelt und finden mittlerweile aufgrund ihrer unterschiedlichen Stärken breite Anwendung in Biologie und Medizin. Auch in dieser Arbeit konnte ich *d*STORM und SIM erfolgreich zur Beantwortung biologischer und medizinischer Fragestellungen in enger Zusammenarbeit mit meinen Kooperationspartnern einsetzen. Auf der anderen Seite habe ich mich intensiv mit dem Thema Photoschädigung beschäftigt, welches aufgrund der hohen verwendeten Laserintensitäten, von enormer Wichtigkeit ist.

**Photoschädigung durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie.** Die Langzeitbeobachtung bestrahlter Zellen hat es mir ermöglicht interessante Zusammenhänge zwischen den Bestrahlungsbedingungen und der verursachten Photoschädigung aufzudecken und zu zeigen, wie wichtig es ist, potentielle Photoschädigung bei Lebendzelleexperimenten zu bedenken und auszuschließen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Dass die Bestrahlung lebender Zellen mit hohen Laserintensitäten generell photoschädlich ist und dass die Schwere der Photoschädigung stark von der Intensität sowie der Wellenlänge abhängt, mag dabei nicht sonderlich überraschend erscheinen. Die Auswertung meiner Versuche offenbarte jedoch wie dramatisch die durch Bestrahlung hervorgerufenen Effekte sein können und dass der Grad der Photoschädigung von vielen weiteren Faktoren wie zusätzlichem Stress, dem Zelltyp oder der Art der Bestrahlung (kontinuierlich oder gepulst) abhängt. Bezieht man die gesammelten Erkenntnisse bei der Planung seiner Experimente mit ein, ist es aber durchaus möglich lebende Zellen mittels Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie zu untersuchen ohne die Probe dabei zu schädigen. Eine sorgfältige Abwägung kann jedoch auch darin resultieren, dass man sich gegen lebende Proben entscheidet, wenn sich Photoschädigung nicht verhindern lässt. Aus die-

## 5. Fazit und Ausblick

sem Grund wurden auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *d*STORM-Experimente zur Visualisierung und Quantifizierung von Glutamatrezeptoren und ADHS-assoziierten Proteinen an fixierten Proben durchgeführt.

Ob die für SMLM gefundenen Abhängigkeiten und Werte ohne Weiteres auf andere Super-Resolution-Methoden übertragen werden können, lässt sich ohne weitere Versuche nicht sagen, da die Zusammenhänge, wie wir gesehen haben, häufig komplex sind. Eine sehr vielversprechende Methode die hier genannt werden sollte, ist allerdings die LLS-Mikroskopie (LLSM), da die untersuchten Zellen hier eine weitaus geringere Bestrahlungsdosis erfahren als bei normaler Weitfeldbeleuchtung.

Neben den in dieser Arbeit untersuchten Faktoren gibt es sicherlich eine Vielzahl weiterer Einflüsse, welche sich auf die Schwere verursachter Photoschädigung auswirken und deren Rolle man weiter untersuchen könnte. Ausgehend von meiner Arbeit würde sich beispielsweise die Suche nach weiteren schützenden Substanzen anbieten. Auch wäre es interessant zu überprüfen, ob die Verwendung eines vollständigen Inkubators, welcher neben der Temperatur, auch  $CO_2$ -Gehalt und Luftfeuchte kontrolliert, einen positiven Effekt zeigt. Weiterhin ist die Neu- und Weiterentwicklung photoschaltbarer Fluorophore, deren Anregungsmaximum möglichst weit im langwelligen Bereich liegt, von großem Interesse, da die verursachte Photoschädigung bei diesen Wellenlängen, wie hier gezeigt, am geringsten ist.

Während ich durch dieses Projekt methodisch einige Fragen klären konnte, bleibt unbekannt, was in Folge der Bestrahlung auf zellulärer Ebene passiert. Weder ist bekannt, welche Art von Zelltod die hier als „apoptotisch“ bezeichneten Zellen durchlaufen, noch welche Prozesse zu dem erstarrten Zustand führen. Ein besseres Verständnis des Letzteren würden eventuell die Weiterentwicklung des erstarrten Zustandes als neue Fixierungsmethode begünstigen. Eine weitere Beobachtung, die wir bisher nicht erklären können, ist dass gepulste Bestrahlung bei gleicher Bestrahlungsdosis schädlicher ist als kontinuierliche Bestrahlung. Möglicherweise hängt dies mit ablaufenden Reparaturmechanismen zusammen, was weiter untersucht werden könnte.

**Glutamatrezeptoren der NMJ von *Drosophila melanogaster*.** Durch die Verwendung von *d*STORM ist es uns gelungen neue Erkenntnisse über die Glutamatrezeptoren der NMJ von *Drosophila melanogaster* zu erhalten. Einerseits konnten wir die veränderte Anordnung der A- und B-Typ-Rezeptoren innerhalb der PSD als Auswirkung induzierter synaptischer Plastizität, sowie die Unterbindung diesen Effekts durch Forskolin, zeigen. Andererseits konnten wir den A-Typ-Rezeptor mittels *d*STORM quantifizieren. Die Ergebnisse beider Teilprojekte lassen sich gut mit

den von Divya Sachidanandan gewonnenen elektrophysiologischen Daten in Einklang bringen, was zeigt, dass sich beide Methoden sehr gut ergänzen, sodass es sinnvoll erscheint, die Kombination beider Anwendungen auch zur Beantwortung zukünftiger Fragestellungen einzusetzen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zur Anordnung der beiden Rezeptortypen innerhalb der PSD beruhen ausschließlich auf qualitativen Beobachtungen. Grundsätzlich wäre es natürlich wünschenswert die veränderte Anordnung auch quantitativ belegen zu können, zumal die durch *d*STORM gewonnenen Lokalisations Tabellen eine Fülle an quantitativen Analysemöglichkeiten bieten. Tatsächlich hat Dr. Felix Repp, ein ehemaliger Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Heckmann, im Laufe des Projekts versucht anhand unserer Lokalisationsdaten die radiale Verteilung beider Rezeptortypen zu analysieren. Allerdings gestaltete sich die Auswertung aufgrund zu viel Hintergrundsignals und eines leichten Drifts als schwierig, sodass dieses Vorhaben vorerst nicht weiter verfolgt wurde. Für die Zukunft wäre es aber interessant, entweder eine Möglichkeit zu finden, die radiale Verteilung quantitativ zu beschreiben oder sich einen anderen Parameter zu überlegen, welcher die Anordnung beider Rezeptortypen quantitativ zeigen kann.

Neben der Anordnung der beiden Glutamaterezeptortypen zueinander, könnte man weiterhin die Lokalisation der Rezeptoren in Bezug auf die Präsynapse z.B. zu Bruchpilot bestimmen. Da Prä- und Postsynapse je nach Ausrichtung der NMJ auf dem Deckglas nicht in einer Ebene liegen, da sie durch den synaptischen Spalt getrennt sind, sollte hier über dreidimensionale Datenerfassung nachgedacht werden.

Nach der Quantifizierung des A-Typ-Rezeptors wäre die Quantifizierung des B-Typ-Rezeptors, sowie beider Rezeptortypen im elektrisch stimulierten beziehungsweise im elektrisch stimulierten und geklemmten Muskel und unter Zugabe von Forskolin die nächsten logischen Schritte.

**CDH13 und GluT3 im Zusammenhang mit ADHS.** Die Untersuchung von CDH13 und GluT3 im embryonalen Mausgehirn sowie in aus iPS-Zellen differenzierten Neuronen mittels SIM und *d*STORM resultierte in einigen interessanten Erkenntnissen über die molekularen Hintergründe dieser mit ADHS in Verbindung gebrachten Proteine. Gleichzeitig sind aber auch eine Reihe neuer Fragen aufgetaucht, deren Beantwortung weiterer Versuche bedarf. Sicherlich zeigen die hier durchgeführten Versuche jedoch, dass bei entsprechender Fragestellung, also wenn etwa nach einem relativen Unterschied zwischen verschiedenen Bedingungen gefragt ist, die relative Quantifizierung eine gute und deutlich weniger komplexe Alternative zur absoluten Quantifizierung sein kann.

## 5. Fazit und Ausblick

In den embryonalen Gehirnschnitten hat sich CDH13, das in 5-HT positiven Neuronen der dorsalen Raphekerne und in radiären Gliazellen nachweisbar war, als wichtiger Faktor in der Entwicklung des serotonergen System herausgestellt, wobei unsere Beobachtungen vermuten lassen, dass es seine Funktion während der Zellmigration durch Zell-Zell-Interaktionen vermittelt. Es wäre von großem Interesse diese Interaktionen weiter zu untersuchen. Da eine höhere strukturelle Auflösung als bisher dafür wünschenswert wäre, sich die Datenaufnahme mittels *d*STORM im dichten Mausgewebe aufgrund des hohen Hintergrundsignals jedoch bisher als schwierig gestaltete (Daten nicht gezeigt), gäbe es zwei Ansätze für das weitere Vorgehen. Erstens könnte man auch hier auf aus humanen iPS-Zellen differenzierte Neuronen zurückgreifen. Dies hätte einerseits die in [Unterabschnitt 2.3.3](#) erläuterten Vorteile humaner Proben gegenüber dem Mausmodell. Andererseits hat sich im Rahmen dieses Kooperationsprojektes die Verwendung von iPS-Zellen gerade für die Untersuchung mittels *d*STORM als deutlich unkomplizierter herausgestellt, da die Zellen im Vergleich zu Gewebeschnitten flacher und weniger dicht sind und deshalb ein geringes Hintergrundsignal aufweisen. Zweitens, könnte man die murinen Gewebeschnitte mittels LLSM untersuchen. Eine der großen, wenn nicht die größte Stärke der LLSM liegt darin, dass dicke Präparate aufgrund der Lichtblattbeleuchtung Ebene für Ebene bei geringem Hintergrundsignal abgebildet werden. Kombiniert mit *d*STORM, würden sich so sicherlich auch in Gehirnschnitten interessante Daten erfassen lassen. Diese könnte man dann mit den anhand von iPS-Zellen gewonnenen Daten vergleichen. So würde sich eine gute Kombination an Experimenten mit humanen und murinen Proben, sowie in Zellen als auch im Gewebe ergeben.

Die relative Quantifizierung von GluT3, Bassoon und Homer in aus iPS-Zellen differenzierten Neuronen mit Kopienzahlvariationen des *SLC2A3*-Gens haben teils zu unerwarteten Ergebnissen geführt. Beispielsweise hat die Duplikation des Gens nicht zu einer Erhöhung der für GluT3 erhaltenen Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  geführt, während die Deletion eine erwartete Verminderung bewirkt hat. Auch der Glucoseentzug hatte nicht den aufgrund vorheriger Publikationen erwarteten Effekt: Anstelle einer Erhöhung der Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$ , beobachten wir keine (CJ7) Veränderung oder sogar eine Reduktion (CJ1 und CJ5). Die molekularen Mechanismen hinter diesen Effekten zu verstehen, wäre ein wichtiger nächster Schritt. Hinsichtlich des Glucoseentzugs wäre es dabei sinnvoll zuvor noch weitere Messungen durchzuführen, um sicher ausschließen zu können, dass die unerwarteten Ergebnisse nicht in einem zu geringen Stichprobenumfang begründet liegen.

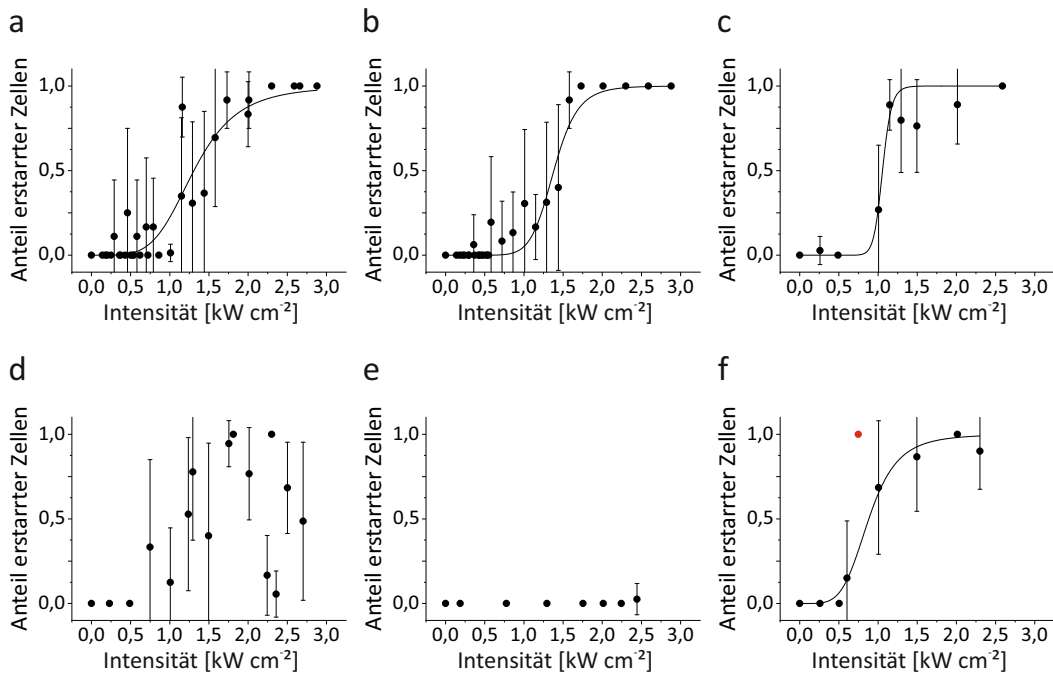
Weitere Aufmerksamkeit sollte man auch der Verteilung der Daten zur Lokalisa-

tionshäufigkeit schenken und versuchen die beiden beobachteten Subpopulationen zu erklären. Ein erster Versuch wäre die Quantifizierung jeweils auf bestimmte Neuronentypen zu beschränken. Die gezeigten Daten für Bassoon in serotonergen Neuronen sprechen jedoch dagegen, dass sich die Subpopulationen so erklären lassen.

Zusätzlich wäre eine weitere Untersuchung der Synapsenstruktur hinsichtlich Bassoon und Homer interessant, da wir in den generierten serotonergen Zelllinien nicht die typische Anordnung beobachten konnten, bei welcher sich Bassoon und Homer jeweils auf prä- und postsynaptischer Seite als eine Art Balken, getrennt durch den synaptischen Spalt, gegenüber liegen. Es wäre lohnend herauszufinden, woran die ungewöhnliche Anordnung liegt, ob die Zellen tatsächlich durch nicht-synaptische Übertragung kommunizieren und wenn dem so ist, wie diese abläuft. Außerdem könnte man beide Strukturen noch einmal umgekehrt färben, sodass Bassoon mit Alexa Fluor 532 und Homer mit Alexa Fluor 647 markiert wird. Dadurch würde man ausschließen, dass die scheinbar geringere Expression von Homer auf das schlechtere Blinkverhalten von Alexa Fluor 532 im Vergleich zu Alexa Fluor 647 zurückzuführen ist.



# A | Ergänzende Abbildungen und Tabellen



**Abbildung A.1.: Intensitätsabhängigkeit der Photoschädigung für den erstarrten Zustand.** Mit steigender Bestrahlungsintensität nimmt der Anteil erstarrter Zellen zu. Hier gezeigt werden alle Datensätze, die der Übersicht halber in [Abschnitt 4.1](#) nicht abgebildet wurden: Stabil mit CLIP-H2B transfizierte U2OS-Zellen (ungefärbt) (a), mit TMR gefärbt (b), bei 37 °C bestrahlt (c) und unter Zugabe von 100  $\mu$ M Ascorbinsäure bestrahlt), HeLa-Zellen (e) und COS-7-Zellen (f). Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Bestrahlung mit 514 nm, für 240 s und bei 21 °C. Die Daten wurden mit einer logistischen ungewichteten Funktion gefittet. Roten Datenpunkte mussten maskiert werden, damit der Fit konvergiert. Für d und e war kein Fit möglich. Der aus dem jeweiligen Fit erhaltene  $I_{50}$ -Wert ist in [Tabelle 4.1](#) angegeben. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Abbildung wurden abgewandelt aus: „[Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy](#)“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [[Wäl+15](#)], lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](#) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

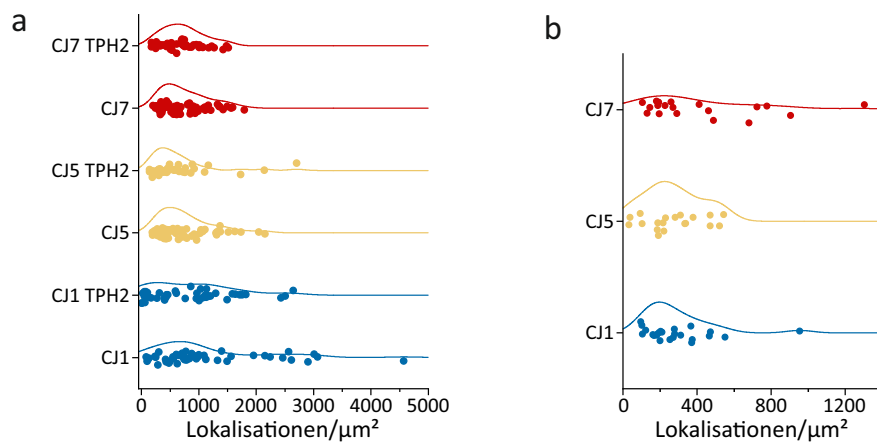
**Tabelle A.1.: Wellenlängenabhängigkeit der Photoschädigung.** Als quantitatives Maß für die Schwere der Photoschädigung wurde der Anteil der toten beziehungsweise erstarrten Zellen (angegebener Fehler entspricht der Standardabweichung) bei unterschiedlichen Wellenlängen und Intensitäten bestimmt (240 s Bestrahlung). Die Anzahl der untersuchten Zellen wird durch  $n$  angegeben. Ein Teil der Daten habe ich im Rahmen meiner Masterarbeit erfasst (MSc), die restlichen Daten sind während meiner Promotion (PhD) entstanden. Diese Tabelle stammt leicht abgewandelt aus: „[Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy](https://doi.org/10.1038/srep15348)“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [Wäl+15], lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Wellenlänge [nm]	Intensität [ $\text{kWcm}^{-2}$ ]	Anteil Zellen [%]		$n$	MSc/PhD
		tot	erstarrt		
405	0,02	$100 \pm 0$	$100 \pm 0$	38	PhD
405	0,20	$100 \pm 0$	$100 \pm 0$	21	MSc
488	0,20	$100 \pm 0$	$40 \pm 41$	19	MSc
514	0,20	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	9	MSc
488	0,80	$100 \pm 0$	$100 \pm 0$	21	MSc
514	0,80	$100 \pm 0$	$17 \pm 29$	10	MSc
514	2,00	$100 \pm 0$	$92 \pm 17$	10	MSc
558	2,00	$17 \pm 32$	$0 \pm 0$	32	MSc
639	2,00	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	34	MSc
639	4,00	$6 \pm 13$	$0 \pm 0$	36	PhD
639	6,00	$2 \pm 6$	$0 \pm 0$	37	PhD



**Tabelle A.2.: Photoschädigung bei kontinuierlicher und gepulster Bestrahlung.** Als quantitatives Maß für die Schwere der Photoschädigung wurde der Anteil der toten beziehungsweise erstarrten Zellen (angegebener Fehler entspricht der Standardabweichung) bei kontinuierlicher (CW) und gepulster Bestrahlung (405 nm,  $0,02 \text{ kW cm}^{-2}$ , 240 s Aufnahmezeit) bestimmt. Die Anzahl der untersuchten Zellen wird durch  $n$  angegeben. Diese Tabelle stammt leicht abgewandelt aus: „Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy“ (<https://doi.org/10.1038/srep15348>) von Wäldchen *et. al.* [Wäl+15], lizenziert unter [CC BY-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Gesamtbestrahlungszeit [s]	Pulsfrequenz [Hz]	Pulsdauer [ms]	Anteil Zellen [%]		$n$
			tot	erstarrt	
2.4	10	1	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	28
	5	2	$4 \pm 12$	$0 \pm 0$	30
	1	10	$3 \pm 8$	$0 \pm 0$	36
12	5	10	$69 \pm 21$	$0 \pm 0$	29
24	10	10	$98 \pm 8$	$3 \pm 8$	30
	5	20	$97 \pm 11$	$0 \pm 0$	33
	1	100	$90 \pm 25$	$0 \pm 0$	23
	CW	CW	$14 \pm 20$	$0 \pm 0$	25
60	5	50	$100 \pm 0$	$81 \pm 23$	25
	CW	CW	$100 \pm 0$	$17 \pm 41$	18
120	1	500	$100 \pm 0$	$93 \pm 17$	31
	CW	CW	$100 \pm 0$	$79 \pm 29$	27



**Abbildung A.2.: Stochastische Verteilung der relativen Quantifizierung von Bassoon und Homer für verschiedenen Kopienzahlvariationen.** Aus den durch dSTORM erhaltenen Lokalisationsdaten für Bassoon (a) und Homer (b) wurden die Lokalisationen pro  $\mu\text{m}^2$  für die Zelllinien CJ1 (Kontrolle), CJ5 (Duplikation des *SLC2A3*-Gens) und CJ7 (Deletion des *SLC2A3*-Gens) gewonnen (Abbildung 4.21). Die erhaltenen Daten sind nicht normal-verteilt. Hier wird die Verteilung der Daten durch Kernel-Glättung angedeutet, wobei sich für alle Kopienzahlvariationen zwei Subpopulationen zu zeigen scheinen. Für Bassoon wurden die Lokalisationen jeweils in allen oder nur in serotonergen (TPH2) Neuronen bestimmt.

## B | Abkürzungen

5-HT	5-Hydroxytryptamin/Serotonin
5-HTT	Serotonintransporter
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
AF488	Alexa Fluor 488
AF532	Alexa Fluor 532
AF555	Alexa Fluor 555
AF647	Alexa Fluor 647
AZ	aktive Zone
BRP	Bruchpilot
°C	Grad Celsius
cAMP	cyclischen Adenosinmonophosphat
CAZ	Zytomatrix der aktiven Zone (englisch „cytomatrix at the active zone“)
CDH13	Cadherin-13
ChEBI	Chemical Entities of Biological Interest
cm	Zentimeter
CNVs	Kopienzahlvariation (englisch „copy number variants“)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CW	Continuous Wave
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dSTORM	Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
Fab	Fragment antigen binding
FCS	Fötales Kälberserum (englisch „fetal calf serum“)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FWHM	Halbwertsbreite (englisch „Full Width at Half Maximum“)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GluR	Glutamatrezeptor
GluRIIA	A-Typ Glutamatrezeptor
GluRIIB	B-Typ Glutamatrezeptor
GluT3	Glucosetransporter Typ 3
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
GSDIM	Ground State Depletion Microscopy followed by Individual molecule return
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
h	Stunden

## B. Abkürzungen

H2B	Histon 2B
HILO	Highly Inclined and Laminated Optical sheet
IC	innere Umwandlung (englisch „internal conversion“)
IgG	Immunglobulin G
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
ISC	Interkombination (englisch „intersystem crossing“)
J	Joule
kW	Kilowatt
LLSM	Lattice-Light-Sheet Mikroskopie
MEA	$\beta$ -Mercaptoethylamin
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	mikromolar
ml	Milliliter
mM	millimolar
mV	Millivolt
mW	Milliwatt
min	Minuten
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NMJ	neuromuskuläre Synapse (englisch „neuromuscular junction“)
PA-GFP	photoaktivierbares grün fluoreszierendes Protein
PALM	Photo-activated Localization Microscopy
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (englisch „phosphate-buffered saline“)
PDB	Protein Data Bank
PSD	postsynaptische Verdichtung (englisch „postsynaptic density“)
PSF	Punktspreizfunktion
px	Pixel
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunden
SERT	Serotonintransporter
$S_i$	Singulettzustände
SIM	Structured Illumination Microscopy
SiR	Siliconrhodamine
SMLM	Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie („Single Molecule Localization Microscopy“)
STED	Stimulated Emission Depletion Mikroskopie (STED Mikroskopie)
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
SV	synaptische Vesikel
$T_i$	Tripletzustände
TEVC	Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp (englisch „Two Electrode Voltage-Clamp“)
TIR	totale interne Reflexion

TIRFM	interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM)
TMR	Tetramethylrhodamin
TPH2	Tryptophan-Hydroxylase 2
VR	vibronische Relaxation



# C | Tabellenverzeichnis

3.1. Wesentliche Unterschiede der genutzten <i>d</i> STORM Mikroskope . . .	40
3.2. Genotypen (CJ1, CJ5 und CJ7) und Differenzierungen für die relative Quantifizierung von Bassoon, Homer, GluT3 . . . . .	48
4.1. Intensitätsabhängigkeit der Photoschädigung . . . . .	56
4.2. Quantifizierung der A-Typ-Glutamatrezeptoren pro PSD . . . . .	70
A.1. Wellenlängenabhängigkeit der Photoschädigung . . . . .	94
A.2. Photoschädigung bei kontinuierlicher und gepulster Bestrahlung . . .	95





## D | Abbildungsverzeichnis

2.1.	Rayleigh Kriterium . . . . .	8
2.2.	Grundlagen der Fluoreszenz . . . . .	10
2.3.	Prinzip <i>d</i> STORM . . . . .	13
2.4.	Prinzip SIM . . . . .	14
2.5.	Prinzip STED Mikroskopie . . . . .	14
2.6.	Größenverhältnisse von Fluoreszenzmarkierungen und Zielstrukturen . . . . .	18
2.7.	Schaltmechanismus organischer Fluorophore . . . . .	20
2.8.	Schaltmechanismen fluoreszenter Proteine . . . . .	21
2.9.	Schematische Darstellung einer Synapse am Beispiel der neuromuskulären Synapse von <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	26
3.1.	Semi-intakte Larvenpräparation von <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	35
3.2.	Schematische Darstellung eines typischen <i>d</i> STORM Aufbaus . . . . .	39
3.3.	Beleuchtungskonfigurationen . . . . .	42
4.1.	Kategorisierung nach Schwere der Photoschädigung . . . . .	53
4.2.	Intensitätsabhängigkeit der Photoschädigung bei unbehandelten U2OS-Zellen . . . . .	55
4.3.	Photoschädigung bei stabil transfizierten und gefärbten Zellen . . . . .	57
4.4.	Photoschädigung bei 37 °C und unter Zugabe von Ascorbinsäure . . . . .	58
4.5.	Photoschädigung bei verschiedenen Zelltypen . . . . .	59
4.6.	Wellenlängenabhängigkeit der Photoschädigung . . . . .	60
4.7.	Photoschädigung bei kontinuierlicher und gepulster Bestrahlung . . . . .	61
4.8.	<i>d</i> STORM-Aufnahme des Cytoskeletts erstarrter Zellen . . . . .	62
4.9.	<i>d</i> STORM-Aufnahme der Anordnung von A- und B-Typ-Glutamatrezeptoren . . . . .	67
4.10.	<i>d</i> STORM-Aufnahme von A-Typ-Glutamatrezeptoren an der NMJ von <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	68
4.11.	Quantifizierung der A-Typ-Glutamatrezeptoren pro PSD . . . . .	71
4.12.	SIM-Aufnahmen von CDH13 in Neuronen der dorsalen Raphekerne . . . . .	74
4.13.	SIM-Aufnahmen von CDH13 in radiären Gliazellen der dorsalen Raphekerne . . . . .	75
4.14.	SIM-Aufnahmen von CDH13, 5-HT und RC2 in radiären Gliazellen der dorsalen Raphekerne . . . . .	76
4.15.	SIM-Aufnahmen von CDH13 und TPH2 in zu Neuronen differenzierten iPS-Zellen . . . . .	78

D. *Abbildungsverzeichnis*

4.16. SIM-Aufnahmen von CDH13 und TPH2 in zu Neuronen differenzierten iPS-Zellen . . . . .	79
4.17. <i>d</i> STORM-Aufnahme von Bassoon und Homer in zu serotonergen Neuronen differenzierten iPS-Zellen . . . . .	80
4.18. <i>d</i> STORM-Aufnahme von GluT3 in zu serotonergen Neuronen differenzierten iPS-Zellen . . . . .	80
4.19. Relative Quantifizierung von GluT3 in zu Neuronen differenzierten iPS-Zellen mit verschiedenen Kopienzahlvariationen . . . . .	81
4.20. Relative Quantifizierung von GluT3 in zu Neuronen differenzierten iPS-Zellen nach Glucoseentzug . . . . .	82
4.21. Relative Quantifizierung von Bassoon und Homer in zu Neuronen differenzierten iPS-Zellen mit verschiedenen Kopienzahlvariationen . . . . .	83
A.1. Intensitätsabhängigkeit der Photoschädigung für den erstarrten Zustand . . . . .	93
A.2. Stochastische Verteilung der relativen Quantifizierung von Bassoon und Homer für verschiedenen Kopienzahlvariationen . . . . .	96

# Literaturverzeichnis

- [AM12] R. H. Alasbahi und M. F. Melzig. „Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP“. In: *Die Pharmazie* 67.1 (2012), Seiten 5–13.
- [And+14] Thomas Andreska, Sarah Aufmkolk, Markus Sauer und Robert Blum. „High abundance of BDNF within glutamatergic presynapses of cultured hippocampal neurons“. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 8 (2014), Seite 107. DOI: [10.3389/fncel.2014.00107](https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00107).
- [Ard+17] Karthikeyan Ardhanareeswaran, Jessica Mariani, Gianfilippo Coppola, Alexej Abyzov und Flora M. Vaccarino. „Human induced pluripotent stem cells for modelling neurodevelopmental disorders“. In: *Nature reviews. Neurology* 13.5 (2017), Seiten 265–278. DOI: [10.1038/nrneuro1.2017.45](https://doi.org/10.1038/nrneuro1.2017.45).
- [Arg+06] Ignacio Arganda-Carreras, Carlos O. S. Sorzano, Roberto Marabini, José María Carazo, Carlos Ortiz-de-Solorzano und Jan Kybic. „Consistent and Elastic Registration of Histological Sections Using Vector-Spline Regularization“. In: *Computer vision approaches to medical image analysis. Second international ECCV workshop, CVAMIA 2006, Graz, Austria, May 12, 2006 ; revised papers*. Herausgegeben von Reinhard R. Beichel und Milan Sonka. Band 4241. Lecture Notes in Computer Science 4241. Berlin: Springer, 2006, Seiten 85–95. DOI: [10.1007/11889762\\_8](https://doi.org/10.1007/11889762_8).
- [13] „Artifacts of light“. In: *Nature Methods* 10.12 (2013), Seite 1135. DOI: [10.1038/nmeth.2760](https://doi.org/10.1038/nmeth.2760).
- [Axe01] Daniel Axelrod. „Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology“. In: *Traffic* 2.11 (2001), Seiten 764–774. DOI: [10.1034/j.1600-0854.2001.21104.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.21104.x).
- [BB18] David Baddeley und Joerg Bewersdorf. „Biological Insight from Super-Resolution Microscopy: What We Can Learn from Localization-Based Images“. In: *Annual review of biochemistry* 87 (2018), Seiten 965–989. DOI: [10.1146/annurev-biochem-060815-014801](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014801).
- [Ban+10] Tobias Banaschewski, Katja Becker, Susann Scherag, Barbara Franke und David Coghill. „Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview“. In: *European child & adolescent psychiatry* 19.3 (2010), Seiten 237–257. DOI: [10.1007/s00787-010-0090-z](https://doi.org/10.1007/s00787-010-0090-z).

- [BCP18] Mark F. Bear, Barry W. Connors und Michael A. Paradiso. *Neurowissenschaften. Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*. Herausgegeben von Andreas K. Engel. 4. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018. 1023781 Seiten. DOI: [10.1007/978-3-662-57263-4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-57263-4). URL: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-57263-4>.
- [BTT10] Hugo J. Bellen, Chao Tong und Hiroshi Tsuda. „100 years of Drosophila research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future“. In: *Nature reviews. Neuroscience* 11.7 (2010), Seiten 514–522. DOI: [10.1038/nrn2839](https://doi.org/10.1038/nrn2839).
- [Bet+06] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz u. a. „Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution“. In: *Science* 313.5793 (2006), Seiten 1642–1645. DOI: [10.1126/science.1127344](https://doi.org/10.1126/science.1127344).
- [Bir17] Udo J. Birk. *Super-resolution microscopy. A practical guide*. Mainz: Wiley-VCH, 2017. 11 Seiten. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527802074>.
- [Bor16] Rolf Theodor Borlinghaus. *Unbegrenzte Lichtmikroskopie. Über Auflösung und Super-Hochauflösung und die Frage, ob man Moleküle sehen kann*. essentials. Wiesbaden: Springer Spektrum, 2016. DOI: [10.1007/978-3-658-09874-2](https://doi.org/10.1007/978-3-658-09874-2). URL: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&AN=1023053>.
- [Bur+15] Anne Burgert, Sebastian Letschert, Sören Doose und Markus Sauer. „Artifacts in single-molecule localization microscopy“. In: *Histochemistry and cell biology* 144.2 (2015), Seiten 123–131. DOI: [10.1007/s00418-015-1340-4](https://doi.org/10.1007/s00418-015-1340-4).
- [CM13] Lina Carlini und Suliana Manley. „Live intracellular super-resolution imaging using site-specific stains“. In: *ACS chemical biology* 8.12 (2013), Seiten 2643–2648. DOI: [10.1021/cb400467x](https://doi.org/10.1021/cb400467x).
- [Che+14] Bi-Chang Chen, Wesley R. Legant, Kai Wang, Lin Shao, Daniel E. Milkie, Michael W. Davidson, Chris Janetopoulos, Xufeng S. Wu u. a. „Lattice light-sheet microscopy: imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution“. In: *Science (New York, N.Y.)* 346.6208 (2014), Seite 1257998. DOI: [10.1126/science.1257998](https://doi.org/10.1126/science.1257998).
- [CT12] Georgeta Crivat und Justin W. Taraska. „Imaging proteins inside cells with fluorescent tags“. In: *Trends in Biotechnology* 30.1 (2012), Seiten 8–16. DOI: [10.1016/j.tibtech.2011.08.002](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.08.002).

- [Dan+10] Adish Dani, Bo Huang, Joseph Bergan, Catherine Dulac und Xiaowei Zhuang. „Superresolution imaging of chemical synapses in the brain“. In: *Neuron* 68.5 (2010), Seiten 843–856. DOI: [10.1016/j.neuron.2010.11.021](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.021).
- [Dem09] Wolfgang Demtröder. *Experimentalphysik 2. Elektrizität und Optik*. 5. Auflage. Berlin: Springer, 2009. Online-Ressource.
- [Dem17] Wolfgang Demtröder. *Experimentalphysik 2. Elektrizität und Optik*. 7., korrigierte und erweiterte Auflage. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer, 2017. 449 Seiten. DOI: [10.1007/978-3-662-55790-7](https://doi.org/10.1007/978-3-662-55790-7). URL: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-55790-7>.
- [DiA06] Aaron DiAntonio. „Glutamate Receptors At The Drosophila Neuromuscular Junction“. In: *The Fly Neuromuscular Junction: Structure and Function. Second Edition*. Herausgegeben von Vivian Budnik und Catalina Ruiz-Canada. 1. Aufl. Band 75. Fly Neuromuscular Junction v.75. s.l.: Elsevier textbooks, 2006, Seiten 165–179. DOI: [10.1016/S0074-7742\(06\)75008-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)75008-5).
- [DiA+99] Aaron DiAntonio, Sophie A. Petersen, Manfred Heckmann und Corey S. Goodman. „Glutamate Receptor Expression Regulates Quantal Size and Quantal Content at the Drosophila Neuromuscular Junction“. In: *The Journal of Neuroscience* 19.8 (1999), Seiten 3023–3032.
- [Ehm+14] Nadine Ehm, Sebastian van de Linde, Amit Alon, Dmitriy Ljashchenko, Xi Zhen Keung, Thorger Holm, Annika Rings, Aaron DiAntonio u. a. „Quantitative super-resolution imaging of Bruchpilot distinguishes active zone states“. In: *Nature communications* 5 (2014), Seite 4650. DOI: [10.1038/ncomms5650](https://doi.org/10.1038/ncomms5650).
- [Eva09] Daniel Evanko. „Primer: fluorescence imaging under the diffraction limit“. In: *Nature Methods* 6.1 (2009), Seiten 19–20. DOI: [10.1038/nmeth.f.235](https://doi.org/10.1038/nmeth.f.235).
- [FSS03] Cathrine Fladeby, Robert Skar und Guldborg Serck-Hanssen. „Distinct regulation of glucose transport and GLUT1/GLUT3 transporters by glucose deprivation and IGF-I in chromaffin cells“. In: *Biochimica et biophysica acta* 1593.2-3 (2003), Seiten 201–208.
- [Föl+08] Jonas Fölling, Mariano Bossi, Hannes Bock, Rebecca Medda, Christian A. Wurm, Birka Hein, Stefan Jakobs, Christian Eggeling u. a. „Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return“. In: *Nature methods* 5.11 (2008), Seiten 943–945. DOI: [10.1038/nmeth.1257](https://doi.org/10.1038/nmeth.1257).

- [For+17] Andrea Forero, Olga Rivero, Sina Wäldchen, Hsing-Ping Ku, Dominik P. Kiser, Yvonne Gärtner, Laura S. Pennington, Jonas Waider u. a. „Cadherin-13 Deficiency Increases Dorsal Raphe 5-HT Neuron Density and Prefrontal Cortex Innervation in the Mouse Brain“. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11 (2017), Seite 965. DOI: [10.3389/fncel.2017.00307](https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00307).
- [GB06] Leslie C. Griffith und Vivian Budnik. „Plasticity and second messengers during synapse development“. In: *International review of neurobiology* 75 (2006), Seiten 237–265. DOI: [10.1016/S0074-7742\(06\)75011-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)75011-5).
- [GRG15] Eckart D. Gundelfinger, Carsten Reissner und Craig C. Garner. „Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone“. In: *Frontiers in synaptic neuroscience* 7 (2015), Seite 19. DOI: [10.3389/fnsyn.2015.00019](https://doi.org/10.3389/fnsyn.2015.00019).
- [Gus00] M. G. L. Gustafsson. „Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy.“ In: *Journal of Microscopy* 198.2 (2000), Seiten 82–87. DOI: [10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x).
- [Has+16] Janna Hastings, Gareth Owen, Adriano Dekker, Marcus Ennis, Namrata Kale, Venkatesh Muthukrishnan, Steve Turner, Neil Swainston u. a. „ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites“. In: *Nucleic acids research* 44.D1 (2016), Seiten D1214–9. DOI: [10.1093/nar/gkv1031](https://doi.org/10.1093/nar/gkv1031).
- [Hay+09] Mariko Kato Hayashi, Chunyan Tang, Chiara Verpelli, Radhakrishnan Narayanan, Marissa H. Stearns, Rui-Ming Xu, Huilin Li, Carlo Sala u. a. „The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure“. In: *Cell* 137.1 (2009), Seiten 159–171. DOI: [10.1016/j.cell.2009.01.050](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.050).
- [Hei+09] Mike Heilemann, Sebastian van de Linde, Anindita Mukherjee und Markus Sauer. „Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores“. In: *Angewandte Chemie International Edition* 48.37 (2009), Seiten 6903–6908. DOI: [10.1002/anie.200902073](https://doi.org/10.1002/anie.200902073).
- [Hei+08] Mike Heilemann, Sebastian van de Linde, Mark Schüttpelz, Robert Kasper, Britta Seefeldt, Anindita Mukherjee, Philip Tinnefeld und Markus Sauer. „Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes“. In: *Angewandte Chemie International Edition* 47.33 (2008), Seiten 6172–6176. DOI: [10.1002/anie.200802376](https://doi.org/10.1002/anie.200802376).
- [HW94] S. W. Hell und J. Wichmann. „Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy“. In: *Optics letters* 19.11 (1994), Seiten 780–782.

- [Hv09] Peter Hinterdorfer und Antoine van Oijen. *Handbook of single-molecule biophysics*. Dordrecht und New York: Springer, 2009. 1 online resource (xxi, 626).
- [HBZ10] Bo Huang, Hazen Babcock und Xiaowei Zhuang. „Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells“. In: *Cell* 143.7 (2010), Seiten 1047–1058. DOI: [10.1016/j.cell.2010.12.002](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.002).
- [Jan+] Charline Jansch, Andrea Forero, Sina Wäldchen, Jonas Waider, Raphael Kern, Georg C. Ziegler, Frank Edenhofer, Markus Sauer u. a. „Reproducible generation of functionally active and mature serotonergic neurons from human induced pluripotent stem cells“. (in submission).
- [Jen11] Barbara H. Jennings. „Drosophila – a versatile model in biology & medicine“. In: *Materials Today* 14.5 (2011), Seiten 190–195. DOI: [10.1016/S1369-7021\(11\)70113-4](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4).
- [Jon+11] Sara A. Jones, Sang-Hee Shim, Jiang He und Xiaowei Zhuang. „Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells“. In: *Nature Methods* 8.6 (2011), Seiten 499–505. DOI: [10.1038/nmeth.1605](https://doi.org/10.1038/nmeth.1605).
- [Kap95] J. Kapuscinski. „DAPI: a DNA-specific fluorescent probe“. In: *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* 70.5 (1995), Seiten 220–233.
- [KR06] Alexey Khodjakov und Conly L. Rieder. „Imaging the division process in living tissue culture cells“. In: *Methods* 38.1 (2006), Seiten 2–16. DOI: [10.1016/j.ymeth.2005.07.007](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.07.007).
- [KE10] Tae Kyung Kim und James H. Eberwine. „Mammalian cell transfection: the present and the future“. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 397.8 (2010), Seiten 3173–3178. DOI: [10.1007/s00216-010-3821-6](https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6).
- [Kle+11] Teresa Klein, Anna Löschberger, Sven Proppert, Steve Wolter, Sebastian van de Linde und Markus Sauer. „Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins“. In: *Nature Methods* 8.1 (2011), Seiten 7–9. DOI: [10.1038/nmeth0111-7b](https://doi.org/10.1038/nmeth0111-7b).
- [Küh+18] Susanne Kühn, Bert Ilsinger, Sabine Lenz und Marlene Thaler. *Grundlagen der Licht- und Elektronenmikroskopie*. Herausgegeben von Susanne Kühnle. Band 4864. UTB. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer, 2018. 1397 Seiten. URL: <http://www.utb-studie-book.de/9783838548647>.
- [Lak06] Joseph R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. Auflage. New York und N.Y.: Springer, op. 2006. xxvi, 954 s.

- [Las+08] Jessica Lasky-Su, Benjamin M. Neale, Barbara Franke, Richard J. L. Anney, Kaixin Zhou, Julian B. Maller, Alejandro Arias Vasquez, Wai Chen u. a. „Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations“. In: *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B.8 (2008), Seiten 1345–1354. DOI: [10.1002/ajmg.b.30867](https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30867).
- [Les+11] K-P Lesch, S. Selch, T. J. Renner, C. Jacob, T. T. Nguyen, T. Hahn, M. Romanos, S. Walitza u. a. „Genome-wide copy number variation analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: association with neuropeptide Y gene dosage in an extended pedigree“. In: *Molecular psychiatry* 16.5 (2011), Seiten 491–503. DOI: [10.1038/mp.2010.29](https://doi.org/10.1038/mp.2010.29).
- [Les+08] Klaus-Peter Lesch, Nina Timmesfeld, Tobias J. Renner, Rebecca Halperin, Christoph Röser, T. Trang Nguyen, David W. Craig, Jasmin Romanos u. a. „Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies“. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 115.11 (2008), Seiten 1573–1585. DOI: [10.1007/s00702-008-0119-3](https://doi.org/10.1007/s00702-008-0119-3).
- [Lio+11] Anath C. Lionel, Jennifer Crosbie, Nicole Barbosa, Tara Goodale, Bhooma Thiruvahindrapuram, Jessica Rickaby, Matthew Gazzellone, Andrew R. Carson u. a. „Rare copy number variation discovery and cross-disorder comparisons identify risk genes for ADHD“. In: *Science translational medicine* 3.95 (2011), 95ra75. DOI: [10.1126/scitranslmed.3002464](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002464).
- [LEK13] Dmitrij Ljaschenko, Nadine Ehmann und Robert J. Kittel. „Hebbian plasticity guides maturation of glutamate receptor fields in vivo“. In: *Cell reports* 3.5 (2013), Seiten 1407–1413. DOI: [10.1016/j.celrep.2013.04.003](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.003).
- [Luk+13] Gražvydas Lukinavičius, Keitaro Umezawa, Nicolas Olivier, Alf Honigsmann, Guoying Yang, Tilman Plass, Veronika Mueller, Luc Raymond u. a. „A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins“. In: *Nature chemistry* 5.2 (2013), Seiten 132–139. DOI: [10.1038/nchem.1546](https://doi.org/10.1038/nchem.1546).
- [MK13] Valentin Magidson und Alexey Khodjakov. „Circumventing photodamage in live-cell microscopy“. In: *Methods in cell biology* 114 (2013), Seiten 545–560. DOI: [10.1016/B978-0-12-407761-4.00023-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407761-4.00023-3).
- [Mer+17] Sören Merker, Andreas Reif, Georg C. Ziegler, Heike Weber, Ute Mayer, Ann-Christine Ehlis, Annette Conzelmann, Stefan Johansson u. a. „SLC2A3 single-nucleotide polymorphism and duplication influence cognitive processing and population-specific risk for attention-deficit/hyperactivity disorder“. In: *Journal of child psychology and*



- psychiatry, and allied disciplines* 58.7 (2017), Seiten 798–809. DOI: [10.1111/jcpp.12702](https://doi.org/10.1111/jcpp.12702).
- [09] „Method of the Year 2008“. In: *Nature Methods* 6.1 (2009), Seite 1. DOI: [10.1038/nmeth.f.244](https://doi.org/10.1038/nmeth.f.244).
- [Mor+10] Kim I. Mortensen, L. Stirling Churchman, James A. Spudich und Henrik Flyvbjerg. „Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy“. In: *Nature methods* 7.5 (2010), Seiten 377–381. DOI: [10.1038/nmeth.1447](https://doi.org/10.1038/nmeth.1447).
- [MW15] Maria Mulisch und Ulrich Welsch, Herausgeber. *Romeis Mikroskopische Technik*. 19. Auflage. Berlin und Heidelberg: Springer Spektrum, 2015. 611 Seiten. DOI: [10.1007/978-3-642-55190-1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-55190-1). URL: <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=4107756>.
- [Nea+08] Benjamin M. Neale, Jessica Lasky-Su, Richard Anney, Barbara Franke, Kaixin Zhou, Julian B. Maller, Alejandro Arias Vasquez, Philip Asherson u. a. „Genome-wide association scan of attention deficit hyperactivity disorder“. In: *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B.8 (2008), Seiten 1337–1344. DOI: [10.1002/ajmg.b.30866](https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30866).
- [Nor06] Alison J. North. „Seeing is believing? A beginners’ guide to practical pitfalls in image acquisition“. In: *The Journal of cell biology* 172.1 (2006), Seiten 9–18. DOI: [10.1083/jcb.200507103](https://doi.org/10.1083/jcb.200507103).
- [Oka+15] Benjamin W. Okaty, Morgan E. Freret, Benjamin D. Rood, Rachael D. Brust, Morgan L. Hennessy, Danielle deBairos, Jun Chul Kim, Melloni N. Cook u. a. „Multi-Scale Molecular Deconstruction of the Serotonin Neuron System“. In: *Neuron* 88.4 (2015), Seiten 774–791. DOI: [10.1016/j.neuron.2015.10.007](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.007).
- [Ove+14] Martin Ovesný, Pavel Křížek, Josef Borkovec, Zdeněk Svindrych und Guy M. Hagen. „ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging“. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 30.16 (2014), Seiten 2389–2390. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu202](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu202).
- [Owa+12] David Oswald, Omid Khorramshahi, Varun K. Gupta, Daniel Banovic, Harald Depner, Wernher Fouquet, Carolin Wichmann, Sara Mertel u. a. „Cooperation of Syd-1 with Neurexin synchronizes pre- with post-synaptic assembly“. In: *Nature neuroscience* 15.9 (2012), Seiten 1219–1226. DOI: [10.1038/nn.3183](https://doi.org/10.1038/nn.3183).

- [Par+09] Donghyun Park, Andy Peng Xiang, Li Zhang, Frank Fuxiang Mao, Noah M. Walton, Sun Shim Choi und Bruce T. Lahn. „The radial glia antibody RC2 recognizes a protein encoded by Nestin“. In: *Biochemical and biophysical research communications* 382.3 (2009), Seiten 588–592. DOI: [10.1016/j.bbrc.2009.03.074](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.074).
- [PDH04] Christian Pawlu, Aaron DiAntonio und Manfred Heckmann. „Post-fusional control of quantal current shape“. In: *Neuron* 42.4 (2004), Seiten 607–618.
- [Peh17] Fadime Eryilmaz Pehlivan. „Vitamin C: An Antioxidant Agent“. In: *Vitamin C*. Herausgegeben von Amal H. Hamza. InTech, 2017. DOI: [10.5772/intechopen.69660](https://doi.org/10.5772/intechopen.69660).
- [Phi+09] Maria Philippova, Manjunath B. Joshi, Emmanouil Kyriakakis, Dennis Pfaff, Paul Erne und Therese J. Resink. „A guide and guard: The many faces of T-cadherin“. In: *Cellular Signalling* 21.7 (2009), Seiten 1035–1044. DOI: [10.1016/j.cellsig.2009.01.035](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.01.035).
- [Qin+05] Gang Qin, Tobias Schwarz, Robert J. Kittel, Andreas Schmid, Tobias M. Rasse, Dennis Kappei, Evgeni Ponimaskin, Manfred Heckmann u. a. „Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of Drosophila“. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25.12 (2005), Seiten 3209–3218. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.4194-04.2005](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4194-04.2005).
- [Riv+15] O. Rivero, M. M. Selten, S. Sich, S. Popp, L. Bacmeister, E. Amendola, M. Negwer, D. Schubert u. a. „Cadherin-13, a risk gene for ADHD and comorbid disorders, impacts GABAergic function in hippocampus and cognition“. In: *Translational psychiatry* 5 (2015), e655. DOI: [10.1038/tp.2015.152](https://doi.org/10.1038/tp.2015.152).
- [Riv+13] Olga Rivero, Sarah Sich, Sandy Popp, Angelika Schmitt, Barbara Franke und Klaus-Peter Lesch. „Impact of the ADHD-susceptibility gene CDH13 on development and function of brain networks“. In: *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 23.6 (2013), Seiten 492–507. DOI: [10.1016/j.euroneuro.2012.06.009](https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.06.009).
- [RB06] Catalina Ruiz-Cañada und Vivian Budnik. „Introduction on The Use of The Drosophila Embryonic/Larval Neuromuscular Junction as A Model System to Study Synapse Development and Function, and A Brief Summary of Pathfinding and Target Recognition“. In: *The Fly Neuromuscular Junction: Structure and Function. Second Edition*. Herausgegeben von Vivian Budnik und Catalina Ruiz-Canada. 1. Aufl. Band 75. Fly Neuromuscular Junction v.75. s.l.: Elsevier textbooks, 2006, Seiten 1–31. DOI: [10.1016/S0074-7742\(06\)75001-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)75001-2).

- [RBZ06] Michael J. Rust, Mark Bates und Xiaowei Zhuang. „Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)“. In: *Nature Methods* 3.10 (2006), Seiten 793–796. DOI: [10.1038/nmeth929](https://doi.org/10.1038/nmeth929).
- [Sag+18] Daniel Sage, Thanh-An Pham, Hazen Babcock, Tomas Lukes, Thomas Pengo, Jerry Chao, Ramraj Velmurugan, Alex Herbert u. a. *Super-resolution fight club: A broad assessment of 2D & 3D single-molecule localization microscopy software*. 2018. 25 Seiten. DOI: [10.1101/362517](https://doi.org/10.1101/362517).
- [SHJ17] Steffen J. Sahl, Stefan W. Hell und Stefan Jakobs. „Fluorescence nanoscopy in cell biology“. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 18.11 (2017), Seiten 685–701. DOI: [10.1038/nrm.2017.71](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.71).
- [SH17] Markus Sauer und Mike Heilemann. „Single-Molecule Localization Microscopy in Eukaryotes“. In: *Chemical reviews* 117.11 (2017), Seiten 7478–7509. DOI: [10.1021/acs.chemrev.6b00667](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00667).
- [Sch+19] Lothar Schermelleh, Alexia Ferrand, Thomas Huser, Christian Egge-ling, Markus Sauer, Oliver Biehlmaier und Gregor P. C. Drummen. „Super-resolution microscopy demystified“. In: *Nature cell biology* 21.1 (2019), Seiten 72–84. DOI: [10.1038/s41556-018-0251-8](https://doi.org/10.1038/s41556-018-0251-8).
- [Sch+12] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden u. a. „Fiji: an open-source platform for biological-image analysis“. In: *Nature methods* 9.7 (2012), Seiten 676–682. DOI: [10.1038/nmeth.2019](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019).
- [Sch+08] Andreas Schmid, Stefan Hallermann, Robert J. Kittel, Omid Khorramshahi, Andreas M. J. Frolich, Christine Quentin, Tobias M. Rasse, Sara Mertel u. a. „Activity-dependent site-specific changes of glutamate receptor composition in vivo“. In: *Nature neuroscience* 11.6 (2008), Seiten 659–666. DOI: [10.1038/nn.2122](https://doi.org/10.1038/nn.2122).
- [Sch11] Sabine Schmitz. *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Aufl. Experimentator. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011. Online-Ressource.
- [Scu16] Megan Scudellari. „How iPS cells changed the world“. In: *Nature* 534.7607 (2016), Seiten 310–312. DOI: [10.1038/534310a](https://doi.org/10.1038/534310a).
- [Seh+17] David Sehnal, Mandar Deshpande, Radka Svobodová Vařeková, Saqib Mir, Karel Berka, Adam Midlik, Lukáš Pravda, Sameer Velankar u. a. „LiteMol suite: interactive web-based visualization of large-scale macromolecular structure data“. In: *Nature methods* 14.12 (2017), Seiten 1121–1122. DOI: [10.1038/nmeth.4499](https://doi.org/10.1038/nmeth.4499).

- [She+05] K. Sheehan, N. Lowe, A. Kirley, C. Mullins, M. Fitzgerald, M. Gill und Z. Hawi. „Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene variants associated with ADHD“. In: *Molecular psychiatry* 10.10 (2005), Seiten 944–949. DOI: [10.1038/sj.mp.4001698](https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001698).
- [She+07] Karen Sheehan, Ziarh Hawi, Michael Gill und Lindsey Kent. „No association between TPH2 gene polymorphisms and ADHD in a UK sample“. In: *Neuroscience letters* 412.2 (2007), Seiten 105–107. DOI: [10.1016/j.neulet.2006.10.043](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.10.043).
- [SK11] Morgan Sheng und Eunjoon Kim. „The postsynaptic organization of synapses“. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.12 (2011). DOI: [10.1101/cshperspect.a005678](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005678).
- [Shr+08] Hari Shroff, Catherine G. Galbraith, James A. Galbraith und Eric Betzig. „Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics“. In: *Nature Methods* 5.5 (2008), Seiten 417–423. DOI: [10.1038/nmeth.1202](https://doi.org/10.1038/nmeth.1202).
- [Sim+08] Ian A. Simpson, Donard Dwyer, Daniela Malide, Kelle H. Moley, Alexander Travis und Susan J. Vannucci. „The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction“. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 295.2 (2008), E242–53. DOI: [10.1152/ajpendo.90388.2008](https://doi.org/10.1152/ajpendo.90388.2008).
- [Tak+07] Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda und Shinya Yamanaka. „Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors“. In: *Cell* 131.5 (2007), Seiten 861–872. DOI: [10.1016/j.cell.2007.11.019](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019).
- [TY06] Kazutoshi Takahashi und Shinya Yamanaka. „Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors“. In: *Cell* 126.4 (2006), Seiten 663–676. DOI: [10.1016/j.cell.2006.07.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024).
- [TS12] Ulrich Thomas und Stephan J. Sigrist. „Glutamate receptors in synaptic assembly and plasticity: case studies on fly NMJs“. In: *Advances in experimental medicine and biology* 970 (2012), Seiten 3–28. DOI: [10.1007/978-3-7091-0932-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_1).
- [TIS08] Makio Tokunaga, Naoko Imamoto und Kumiko Sakata-Sogawa. „Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells“. In: *Nature methods* 5.2 (2008), Seiten 159–161. DOI: [10.1038/nmeth1171](https://doi.org/10.1038/nmeth1171).
- [TVE16] Bartosz Turkowyd, David Virant und Ulrike Endesfelder. „From single molecules to life: microscopy at the nanoscale“. In: *Analytical and bio-analytical chemistry* 408.25 (2016), Seiten 6885–6911. DOI: [10.1007/s00216-016-9781-8](https://doi.org/10.1007/s00216-016-9781-8).

- [van19] Sebastian van de Linde. „Single-molecule localization microscopy analysis with ImageJ“. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 52.20 (2019), Seite 203002. DOI: [10.1088/1361-6463/ab092f](https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab092f).
- [van+13] Sebastian van de Linde, Sarah Aufmkolk, Christian Franke, Thorge Holm, Teresa Klein, Anna Löschberger, Sven Proppert, Steve Wolter u. a. „Investigating Cellular Structures at the Nanoscale with Organic Fluorophores“. In: *Chemistry & Biology* 20.1 (2013), Seiten 8–18. DOI: [10.1016/j.chembiol.2012.11.004](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.11.004).
- [vHS12] Sebastian van de Linde, Mike Heilemann und Markus Sauer. „Live-Cell Super-Resolution Imaging with Synthetic Fluorophores“. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 63.1 (2012), Seiten 519–540. DOI: [10.1146/annurev-physchem-032811-112012](https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-032811-112012).
- [van+11a] Sebastian van de Linde, Ivan Krstić, Thomas Prisner, Sören Doose, Mike Heilemann und Markus Sauer. „Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* 10.4 (2011), Seite 499. DOI: [10.1039/c0pp00317d](https://doi.org/10.1039/c0pp00317d).
- [van+11b] Sebastian van de Linde, Anna Löschberger, Teresa Klein, Meike Heidebreder, Steve Wolter, Mike Heilemann und Markus Sauer. „Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes“. In: *Nature protocols* 6.7 (2011), Seiten 991–1009. DOI: [10.1038/nprot.2011.336](https://doi.org/10.1038/nprot.2011.336).
- [Viz+10] E. S. Vizi, A. Fekete, R. Karoly und A. Mike. „Non-synaptic receptors and transporters involved in brain functions and targets of drug treatment“. In: *British journal of pharmacology* 160.4 (2010), Seiten 785–809. DOI: [10.1111/j.1476-5381.2009.00624.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00624.x).
- [Vog+09] Jan Vogelsang, Thorben Cordes, Carsten Forthmann, Christian Steinhauer und Philip Tinnefeld. „Controlling the fluorescence of ordinary oxazine dyes for single-molecule switching and superresolution microscopy“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.20 (2009), Seiten 8107–8112. DOI: [10.1073/pnas.0811875106](https://doi.org/10.1073/pnas.0811875106).
- [Wag+10] Michael Wagner, Petra Weber, Thomas Bruns, Strauss, Wolfgang S L, Rainer Wittig und Herbert Schneckenburger. „Light dose is a limiting factor to maintain cell viability in fluorescence microscopy and single molecule detection“. In: *International journal of molecular sciences* 11.3 (2010), Seiten 956–966. DOI: [10.3390/ijms11030956](https://doi.org/10.3390/ijms11030956).
- [Wäl13] Sina Wäldchen. „Standards for Live-cell Localization Microscopy“. Department of Biotechnology and Biophysics. Masterthesis. Würzburg: University of Wuerzburg, 2013.

- [Wäl+15] Sina Wäldchen, Julian Lehmann, Teresa Klein, Sebastian van de Linde und Markus Sauer. „Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy“. In: *Scientific reports* 5 (2015), Seite 15348. DOI: [10.1038/srep15348](https://doi.org/10.1038/srep15348).
- [Wan+11] Yu-Fang Wang, Qing-Wen Shi, Mei Dong, Hiromasa Kiyota, Yu-Cheng Gu und Bin Cong. „Natural taxanes: developments since 1828“. In: *Chemical reviews* 111.12 (2011), Seiten 7652–7709. DOI: [10.1021/cr100147u](https://doi.org/10.1021/cr100147u).
- [WOL+10] S. WOLTER, M. Schüttelpelz, M. TSCHEREPAHOW, S. van de LINDE, M. HEILEMANN und M. SAUER. „Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images“. In: *Journal of Microscopy* 237.1 (2010), Seiten 12–22. DOI: [10.1111/j.1365-2818.2009.03287.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03287.x).
- [Wol+12] Steve Wolter, Anna Löschberger, Thorge Holm, Sarah Aufmkolk, Marie-Christine Dabauvalle, Sebastian van de Linde und Markus Sauer. „rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy“. In: *Nature methods* 9.11 (2012), Seiten 1040–1041. DOI: [10.1038/nmeth.2224](https://doi.org/10.1038/nmeth.2224).
- [Wom+10] Richard Wombacher, Meike Heidbreder, Sebastian van de Linde, Michael P. Sheetz, Mike Heilemann, Virginia W. Cornish und Markus Sauer. „Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates“. In: *Nature methods* 7.9 (2010), Seiten 717–719. DOI: [10.1038/nmeth.1489](https://doi.org/10.1038/nmeth.1489).
- [Wul+79] E. Wulf, A. Deboben, F. A. Bautz, H. Faulstich und T. Wieland. „Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76.9 (1979), Seiten 4498–4502.
- [Zho+08] Kaixin Zhou, Astrid Dempfle, Mauricio Arcos-Burgos, Steven C. Bakker, Tobias Banaschewski, Joseph Biederman, Jan Buitelaar, F. Xavier Castellanos u. a. „Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder“. In: *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B.8 (2008), Seiten 1392–1398. DOI: [10.1002/ajmg.b.30878](https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30878).

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den wunderbaren Menschen bedanken, die mich in den letzten Jahren begleitet und unterstützt haben und direkt oder indirekt zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Zu aller erst danke ich Markus Sauer für die Möglichkeit, Teil seiner Arbeitsgruppe zu werden und in diesem aufregenden und faszinierenden Bereich zu forschen. Danke für dein immer offenes Ohr, deine Unterstützung, deinen Optimismus und deine nie endende Begeisterung.

Ebenfalls danken möchte ich Robert Kittel für die bereitwillige Übernahme des Zweigutachtens, die spannende Kooperation und den Einblick in die für mich neue Welt von *Drosophila* und der Elektrophysiologie.

Ein besonderer Dank gilt Teresa Klein, dich mich schon während meiner Masterarbeit betreut hat. Danke, dass du mir auch während meiner Doktorarbeit stets mit Rat und Tat zur Seite standest und ich mit jeder Frage und jedem Problem zu dir kommen konnte. Auch bei Sebastian van de Linde möchte ich mich hier für die Unterstützung während des Photoschädigungsprojekts bedanken.

Vielmals danken möchte ich meine Kooperationspartnerinnen und mittlerweile Freundinnen Divya, Andrea und Charline. Die vielen Stunden am Mikroskop mit euch wurden nie langweilig und die wissenschaftlichen und weniger wissenschaftlichen Gesprächsthemen gingen uns nie aus.

Dem gesamten Lehrstuhl danke ich für die außergewöhnliche Arbeitsatmosphäre, die Kollegen zu Freunden werden lies und die ich jetzt schon vermisse. Danke für die tolle Zusammenarbeit, die vielen lustigen Stunden während und außerhalb der Arbeitszeit, sowie die unvergesslichen Dienstreisen und sportlichen Lehrstuhlaktivitäten.

Petra, Lisa, Albert, Oli, Marcus, sowie Frau Thal gilt mein Dank dafür, dass sie den Labor- und Arbeitsalltag am Laufen halten und jedem stets hilfsbereit zur Seite stehen.

Besonders danken möchte ich meinem Büro für die wohnliche Atmosphäre zwischen LIDL-Einkäufen, trocknenden Sportklamotten und Kletterschuhen ;-). Danke Felix, Christian, Franz, Andi und Fabi für die tollen Gespräche und die schönen gemeinsamen Stunden.

Außerdem gilt mein Dank natürlich meinen Freunden, welche die letzten Jahren zu einer aufregenden und prägenden Zeit gemacht haben. Ob beim Klettern, Bouldern, Radeln, Wandern, Ski fahren, HIIT oder Grillen und Feiern - Ihr seid die Besten!

Ein großer Dank gebührt meinen Eltern und Großeltern, sowie meinem Bruder Fabian. Ihr seid immer für mich da und unterstützt mich in jeglicher Hinsicht. Ohne

## *Danksagung*

euch wäre ich nicht der Mensch, der ich heute bin. Danke, dass ich immer auf euch zählen kann.

Zu guter Letzt geht das größte Dankeschön an meinen Mann und besten Freund Felix, der stets an meiner Seite steht und mit mir durch Dick und Dünn geht. Danke für all die großen und kleinen gemeinsamen Abenteuer und dass ich mich immer auf dich verlassen kann. Du gibst mir die Gewissheit, dass letztendlich immer alles gut wird. Ich liebe dich!



# Eidesstattliche Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotions- ordnung der Fakultät für Biologie

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Super-Resolution-Mikroskopie zur Visualisierung und Quantifizierung von Glutamatrezeptoren und ADHS-assoziierten Proteinen“ 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 versichere an Eides statt, die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt bekommen zu haben und insbesondere nicht eine Person oder Organisation eingeschaltet zu haben, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht. Weiterhin erkläre ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Neben dem Grad des Bachelor und Master of Science im Fach Biologie wurden bisher keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

## **Affidavit**

I hereby declare that my thesis entitled „Super-resolution microscopy for visualization and quantification of Glutamate receptors and ADHD-associated proteins“ 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. I declare that the opportunity for this doctoral project was not arranged commercially. No person or organization that searches supervisors to prepare dissertations for money was commissioned. I also declare that the rules for good scientific practice given by the University of Würzburg were observed.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form. Besides the Bachelor's and Master's degree in Biology, no other academic degrees were acquired or attempted to acquire.

Würzburg, August 2019

Sina Wäldchen