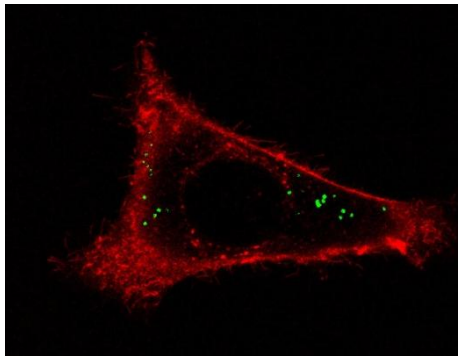




JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Analyse der Aufnahme von Nanopartikeln in Zellen und deren automatische Quantifizierung mit Hilfe von *Image J*



Diplomarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Diplomchemikers (Dipl.-Chem.)
am Fachbereich für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von:

Stephanie Tomcin

Mainz, April 2011



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Max Planck Institute for Polymer Research



Erklärung

Diese Diplomarbeit wurde in der Zeit vom 1. Oktober 2010 bis zum 28. April 2011 am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz angefertigt.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen (auch Internet) entnommen sind, habe ich als solche eindeutig kenntlich gemacht.

Mainz, 28.04.2011

Stephanie Tomcin

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Methoden.....	3
2.1.1 konfokales Laser-Raster-Mikroskop (<i>engl.</i> Confocal Laser Scanning Microscope)	3
2.1.2 Rasterelektronenmikroskop (REM)	9
2.1.3 Durchflusszytometrie	9
2.3 verwendete Zelllinie HeLa	12
2.4 Verwendeter Partikel	13
2.5 <i>Image J</i>	14
3 experimenteller Teil	16
3.1 verwendete Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	16
3.2 Zellpräparation für die CLSM-Versuche	17
3.3 Einstellungen am CLSM	18
3.4 Zellpräparation für die Durchflusszytometrie.....	20
3.5 Probenpräparation für die REM-Aufnahmen.....	21
3.6 Vorgehensweise zum Erstellen des Macros mit <i>Image J</i>	22
3.6.1 Aufbau des Macros.....	22
4 Ergebnisse und Diskussion	26
4.1 Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	26
4.2 Entwicklung des Macros an einem Modellstack	27
4.2.1 Entwicklung der Maske für die Zelle	29
4.2.2 Entwicklung der Maske für die Partikel.....	33
4.2.3 Erfassen von Anzahl, Fläche und relativer Fluoreszenz-Intensität der Partikel	35
4.2.4 Öffnen eines z-Stacks	39
4.2.5 Ergebnisse der Anwendung des Macros auf die Einzelbilder des Modellstacks	41
4.2.6 Weiterentwicklung des Macros zur Anwendung auf eine z-Projektion.....	45

4.3 Anwenden des Macros auf den Modellstack als z-Projektion	47
4.3.1 Vergleich der verschiedenen Arten der z-Projektion	47
4.4 Ergebnisse der Macro-Anwendung auf weitere z-Stacks.....	57
4.4.1 z-Stacks nach 4 h Inkubationszeit.....	57
4.4.2 z-Stacks nach 24 h Inkubationszeit.....	59
4.5 Herausforderung bei <i>Image J</i>	61
4.6 Vergleich der CLSM- und REM-Aufnahmen von Partikeln	62
4.7 Vergleich der Ergebnisse von Durchflusszytometrie und CLSM.....	65
5 Zusammenfassung und Ausblick	67
6 Literatur	68
7 Anhang.....	69
Danksagung	120

Abkürzungsverzeichnis

AE	Airy-Einheit
AEMH	2-Aminoethylmethacrylat-Hydrochlorid
CLSM	konfokales Laser-Raster-Mikroskop (<i>engl.</i> Confocal Laser Scanning Microscope)
DMEM	Kultivierungsmedium der HeLa-Zellen (<i>engl.</i> Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium)
CDR	Zellmembranfarbstoff (<i>engl.</i> Cellmask TM Deep Red)
HeLa	verwendete Zelllinie
JPEG	Speicherformat für Bilder benannt nach dem Gremium Joint Photographic Experts Group
NA	Numerische Apertur
NK	Negativkontrolle
PBS(+)	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Calcium- und Magnesium-Ionen (<i>engl.</i> Phosphate Buffered Saline)
PBS(-)	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Calcium- und Magnesium-Ionen (<i>engl.</i> Phosphate Buffered Saline)
PMI	Perylenmonoimid
PMT	Sekundärelektronenvervielfacher (<i>engl.</i> Photomultiplier Tube)
REM	Rasterelektronenmikroskop
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TIFF	Speicherformat für Bilder (<i>engl.</i> Tagged Image File Format)

1 Einleitung

Die Erforschung der Aufnahme von polymeren Nanopartikeln in Zellen haben sich viele wissenschaftliche Gruppen in Biologie, Medizin und Chemie zur Aufgabe gemacht. Dabei wird besonders die biomedizinische Anwendung von Nanopartikeln in Bezug auf das Targeting beleuchtet. Eine gezielte Aufnahme von Nanopartikeln in bestimmte Zellen oder Gewebe bietet die Möglichkeit, einen Wirkstoff direkt an seinen Bestimmungsort zu bringen^[1] und erst dort wirken zu lassen, was vor allem in der Krebstherapie von großem Nutzen ist. Durch Funktionalisierungen an der Partikeloberfläche ist es möglich, die Aufnahme in Zellen zu fördern. Der gezielte Einbau von hydrophoben Gruppen wie Amino- oder Carboxylgruppen ermöglicht eine verbesserte Aufnahme dieser Partikel in Zellen^[2]. Neben der Oberflächenbeschaffenheit spielen bei der intrazellulären Partikelaufnahme auch Faktoren wie Partikelgröße, Inkubationszeit sowie Partikelkonzentration eine Rolle^[3]. Die intrazelluläre Partikelaufnahme erfolgt über den Mechanismus der Endocytose, wobei ein oder mehrere Partikel von der Zellmembran umschlossen und als Vesikel beziehungsweise Endosomen ins Zellinnere abgeschnúrt werden. Die Analyse, ob und wieviele Partikel eine Zelle aufnehmen kann, ist essentiell. Für die Analyse macht man sich den Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen in die Partikel zunutze, wodurch auf Analysemethoden wie Durchflusszytometrie und speziell konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) zurückgegriffen wird. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wird die relative Fluoreszenz-Intensität der Partikel, die die Zelle aufgenommen hat, gemessen. Die semiquantitativen Ergebnisse weisen eine gute Statistik auf, da mit einer einzigen Messung eine Vielzahl von Zellen analysiert werden kann. Jedoch kann nicht zwischen Aufnahme der Partikel in die Zelle oder Adhäsion an der Zellmembran unterschieden werden. Auch Kollokalisationsexperimente oder die Verfolgung von Prozessen wie Langzeitbeobachtungen der Partikelaufnahme sind nicht möglich. Die Vorteile der Untersuchung von Kollokalisierung und intrazellulärer Lokalisation von Partikeln sowie Prozessverfolgungen bringt die Methode der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie mit sich. Meist werden jedoch mit CLSM-Messungen qualitative Aussagen über die Partikelaufnahme getroffen. Ein quantitatives Ergebnis ist oft nur durch zeitaufwendiges manuelles Auszählen der aufgenommenen Partikel möglich. Muss dies für eine große Anzahl an Zellen mit sehr hohem Partikelgehalt durchgeführt werden, so ist der Zeitaufwand immens. Aus diesem Grund muss ein Automatismus entwickelt werden, der die Quantifizierung der Partikel ermöglicht. Auf dem Markt existieren bereits Programme, die Partikel innerhalb von Zellen automatisch auszählen. Jedoch ist diese Software nicht flexibel genug, um auf Fragestellungen wie der genauen intrazellulären Lokalisation von Partikeln oder der Auswertung der Zeitverfolgung

von Prozessen einzugehen. Desweiteren kann sie nicht variiert werden und Lizenzbeschränkungen machen es unmöglich, dass viele Personen gleichzeitig mit der Software arbeiten. Diese Arbeit soll aufzeigen, wie Partikel automatisch mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogrammes, das frei zugänglich und einfach zu nutzen ist, quantifiziert und zusätzliche Parameter wie Größe oder Pixelintensität ausgewertet werden. Das Bildbearbeitungsprogramm, das dafür ausgewählt wurde, ist *Image J*. *Image J* ist im Moment das flexibelste Programm, um eine Analyse hinsichtlich Partikelquantifizierung und intrazellulärer Lokalisation der Partikel durchzuführen. Die verwendeten Algorithmen für die Bildverarbeitung sind publiziert und als Zusatzmodule („Plugins“) frei zugänglich für eigene Weiterentwicklungen. Somit kann im Gegensatz zu kommerziellen Programmen mit proprietären Algorithmen genau nachvollzogen werden, wie die Bilddaten manipuliert werden. Dies ist wichtig, um etwaige Artefakte zu verstehen, beziehungsweise um die am besten passenden Algorithmen auswählen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden Polystyrol-Partikel als Modell gewählt, da sie bioinert und nicht toxisch für Zellen sind^[3]. Das heißt, diese Partikel werden in der Zelle nicht abgebaut und können unabhängig von Abbau-Mechanismen am CLSM detektiert werden. Eine Herausforderung ist dabei die Detektion der Fluoreszenzpunkte („Spots“), da die Auflösung am CLSM in lateraler Richtung auf 200 nm und in axialer Richtung auf 500 nm begrenzt ist. Es kann somit bei den aufgenommenen Fluoreszenz-Bildern nicht eindeutig bestimmt werden, ob die Fluoreszenzspots auf Einzelpartikel oder Partikelaggregate innerhalb eines Endosoms hinweisen. Weitere Analysemethoden wie die Rasterelektronenmikroskopie (REM) müssen eingesetzt werden, um diesen Sachverhalt zu klären. Die Analyse von Polystyrol-Partikeln stellt die Grundlage für die Etablierung eines Macros mit der Open-Source-Software *Image J* dar, welches die automatische Quantifizierung von Partikeln in Zellen ermöglichen soll.

2 Theoretische Grundlagen

Im nachfolgenden Kapitel werden die biophysikalischen Untersuchungsmethoden, die zum Verständnis dieser Diplomarbeit beitragen, kurz vorgestellt.

Weiterhin wird auf die verwendete Zelllinie sowie den verwendeten Partikel eingegangen, wobei die Partikel-Synthese nicht näher beschrieben wird, da diese nicht selbst durchgeführt wurde und auch zum Verständnis der vorliegenden Arbeit nicht notwendig ist. Auf das Bildverarbeitungsprogramm *Image J* wird zum Schluss dieses Kapitels eingegangen.

2.1 Methoden

Die in dieser Diplomarbeit verwendeten Methoden beschränken sich hauptsächlich auf die Mikroskopie, wobei das konfokale Laser-Raster-Mikroskop überwiegend eingesetzt wurde. Die Rasterelektronenmikroskopie diente lediglich zur Durchführung eines korrelativen Versuchs. Der Einsatz der Durchflusszytometrie erfolgte, um Verhältnismäßigkeiten von Messergebnissen am CLSM zu überprüfen.

2.1.1 konfokales Laser-Raster-Mikroskop (*engl. Confocal Laser Scanning Microscope*)

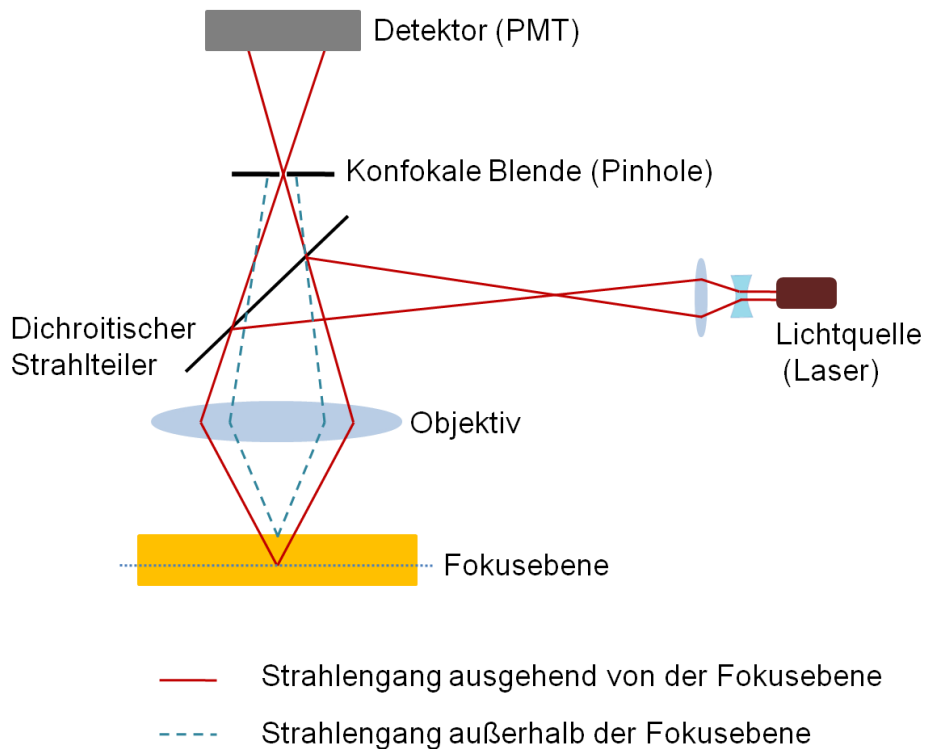
Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie stellt eine grundlegende Untersuchungsmethode der heutigen Biologie und Medizin dar. Von großem Vorteil ist die Möglichkeit, nicht nur fixierte Präparate zu untersuchen, sondern auch *in vitro*-Experimente durchzuführen, wie zum Beispiel die Beobachtung der Aufnahme von Partikeln in lebenden Zellen. Dabei macht man sich vor allem die Eigenschaft des CLSM als Fluoreszenzmikroskop zunutze. An dieser Stelle soll deshalb kurz der Begriff Fluoreszenz erläutert werden. Fluoreszenz ist ein Strahlung emittierender Vorgang, welcher mit anderen Relaxationsprozessen eines angeregten Systems in Konkurrenz tritt. Bevor ein System fluoreszieren kann, müssen dessen Elektronen angeregt werden. In der vorliegenden Diplomarbeit erfolgte die Anregung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ausschließlich mit Laserlicht im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums. Um die Zellen detektieren zu können, wurde für das Anfärben der Zellmembran der Fluoreszenzfarbstoff CellmaskTM Deep Red (CDR) verwendet. Allerdings tritt bei Zellen durch zelleigene Moleküle wie Tryptophan, einer Aminosäure, auch Autofluoreszenz auf, die eine gewisse Fehlerquelle darstellt, aber

durch entsprechende Grundeinstellungen am CLSM sowie die Wahl von Anregungs- und Detektionswellenlängen soweit minimiert werden kann, dass sie für die Auswertung der Daten nicht mehr ins Gewicht fällt. Der im verwendeten Partikel enthaltene Farbstoff ist PMI (Perylenmonoimid). Beide Fluoreszenzfarbstoffe werden in Kapitel 3 näher beschrieben. Absorptions- und Emissionsspektrum der Fluoreszenzfarbstoffe verhalten sich meist wie Bild und Spiegelbild. Das Emissionsspektrum weist eine Rotverschiebung, den sogenannten Stokes-Shift, auf. Die Ursache für die verringerte Energie der Fluoreszenz im Vergleich zur Anregungs-Energie ist zum einen die Schwingungsrelaxation und zum anderen die Lösemittel-Relaxation, welche schneller als die Fluoreszenz erfolgen. Beide Relaxationsarten stellen damit Konkurrenzprozesse zur Fluoreszenz dar, welche zu Energieverlusten führen und somit die Fluoreszenz hin zu höheren Wellenlängen verschieben.

2.1.1.1 Funktionsprinzip

Das Funktionsprinzip, welches die konfokale Mikroskopie auszeichnet, basiert auf dem Einsatz einer konfokalen Blende (*engl.* Pinhole), durch welche nur das (Fluoreszenz-)Licht aus der Fokusebene der Probe zum Detektor gelangt. Dies soll anhand des schematischen Strahlengangs (Abbildung 1) eines CLSM näher beschrieben werden.

Das für die Fluoreszenzanregung benötigte Laserlicht wird punktförmig auf das Objekt geleitet. Um nur das emittierte Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene zu detektieren, macht man sich den Vorteil der konfokalen Blende zunutze, die vor den Detektor, üblicherweise einen Sekundärelektronenvervielfacher (*engl.* PhotoMultiplier Tube), angebracht wird. So wird gewährleistet, dass die Strahlen von anderen Ebenen, die außerhalb des Fokus liegen, von der Blende abgeblockt werden und den Detektor nicht erreichen. Mit Hilfe von beweglichen Scannerspiegeln wird die Fokusebene in x-y-Richtung mit dem fokussierten Laserstrahl Zeile für Zeile abgerastert. Die Bezeichnung „konfokal“ bezieht sich darauf, dass der Detektionsfokus in der zur Fokusebene des Objektivs konjugierten Ebene liegt und dadurch beide Foki übereinander liegen^[4].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des konfokalen Strahlengangs eines CLSM (nach ^[5])
Beruhend auf dem Einsatz einer konfokalen Blende wird nur das Licht aus der Fokusebene detektiert.**

Durch eine deutliche Verringerung des Streulichtanteils aus anderen Ebenen wird die Auflösung, die man mit einem CLSM im Vergleich zu einem konventionellen Mikroskop erreichen kann, erheblich erhöht. Dadurch lassen sich auch dicke Präparate wie zum Beispiel Zellen sehr gut abbilden, und man hat die Möglichkeit, mehrere optische Schnitte von verschiedenen Ebenen desgleichen Präparats mit erhöhter z-Auflösung aufzunehmen und somit eine 3-D-Darstellung zu erzeugen. Das Aufnehmen von mehreren optischen Schnitten an der gleichen x-y-Position des Präparats nennt man z-Stack oder z-Stapel. In dieser Diplomarbeit wurden hauptsächlich z-Stacks aufgenommen und analysiert. Unter einem optischen Schnitt versteht man das Abbilden einer Fokusebene mit definierter Schnittdicke, die sogenannte Tiefendiskriminierung, die das axiale Auflösungsvermögen widerspiegelt. Die Tiefendiskriminierung wird vor allem von dem Durchmesser der konfokalen Blende beeinflusst. Je kleiner dieser Durchmesser ist, desto besser ist die axiale Auflösung (siehe auch 2.1.1.2). Um einen z-Stack mit optimalem Abstand zwischen zwei Schnitten in z-Richtung aufzunehmen, sollte die Abtastrate in z-Richtung die Hälfte der optischen Schnittdicke betragen^[5].

2.1.1.2 Auflösung

Das Auflösungsvermögen ist definiert als die Fähigkeit eines Objektivs zwei benachbarte Punkte als getrennte Punkte darzustellen und nicht zu einem einzigen großen verschmelzen zu lassen^[6]. Die typischen Auflösungswerte eines CLSM in x-y-Richtung (lateral) liegen bei circa 200 nm und in z-Richtung (axial) bei circa 500 nm. Dabei beeinflussen Faktoren wie das verwendete Objektiv oder der Durchmesser der konfokalen Blende im Wesentlichen den Grad der Auflösung.

Das Auflösungsvermögen des Objektivs ist durch seine Numerische Apertur (NA) festgelegt. Die Numerische Apertur ist definiert durch den Brechungsindex n des Mediums zwischen Deckglas und Objektivlinse und den halben Öffnungswinkel α des Objektivs (Gleichung 1).

$$NA = n \cdot \sin\alpha \quad (1)$$

Die Numerische Apertur stellt einen Zahlenwert dar, der die Lichtaufnahmekapazität eines Objektivs beschreibt. Je höher dieser Wert ist, desto höher ist die zu erreichende Auflösung mit diesem Objektiv und desto mehr Licht kann auch für die Anregung der Fluoreszenz verwendet werden^[7]. Immersionsobjektive haben im Vergleich zu Trockenobjektiven, deren Umgebungsmedium zwischen Objektiv und Deckglas Luft ist, eine höhere Numerische Apertur ($NA > 1$). Dies liegt darin begründet, dass die Immersionsflüssigkeit, zum Beispiel Öl, einen höheren Brechungsindex als Luft aufweist. Der höhere Brechungsindex gleicht dem des Objektivglases beziehungsweise des Deckglases, wodurch gewährleistet wird, dass auch bei großem Öffnungswinkel des Objektivs, die Lichtstrahlen vom Mittelstrahl nicht mehr weg gebrochen oder total reflektiert werden, sondern ebenfalls das Objektiv erreichen.

Ernst Abbé erkannte schon um 1900, dass die Auflösungsgrenze d neben der Numerischen Apertur auch durch die Wellenlänge λ des Lichts bestimmt wird. Er hat folgenden Zusammenhang definiert, der in Gleichung 2 dargestellt ist^[8]:

$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} \quad (2)$$

Je größer die Numerische Apertur des verwendeten Objektivs und je kleiner die Wellenlänge des erzeugten Fluoreszenzlichts wird, desto kleiner wird die laterale Auflösungsgrenze und desto besser die Auflösung.

Bei der Verwendung von konfokalen Lochblenden wird das Licht gebeugt, und es entstehen aufgrund von Interferenzerscheinungen sogenannte Beugungsscheibchen, die in Abbildung 2 schematisch dargestellt sind. Dies bedeutet, dass ein exakt punktförmiges Objekt durch ein beugungsbegrenztes optisches System nicht als exakter Punkt, sondern als verwaschenes punktförmiges Objekt dargestellt wird.

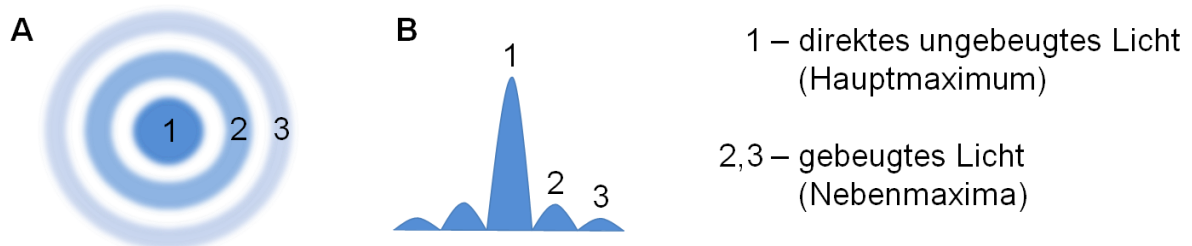


Abbildung 2: Beugungsscheibchen (nach [7]), die durch Interferenz beim Durchstrahlen durch eine Lochblende entstehen (A: Aufsicht, B: Intensitätsprofil).

Objekte können gerade noch gut voneinander getrennt werden, wenn sich ihre Beugungsscheibchen nur wenig überlappen^[8]. Das zentrale Maximum (Hauptmaximum) wird auch als „Airy“-Scheibchen bezeichnet und stellt einen physikalisch nicht mehr zu verkleinernden, durch Beugung begrenzten Lichtfleck dar^[9].

Um das Prinzip der Konfokalität, das heißt die punktförmige Anregung/ Beleuchtung sowie die punktförmige Abbildung eines Objektes, auszuschöpfen, muss die Öffnung der konfokalen Blende entsprechend klein sein. Je kleiner diese Öffnung ist, desto höher ist die zu erreichende axiale Auflösung beziehungsweise desto dünner ist der optische Schnitt. Allerdings gelangt immer weniger Licht durch die Blende je kleiner ihre Öffnung ist und desto weniger Fluoreszenz-Intensität kann detektiert werden. Deswegen sollte immer ein gewisser Mindestdurchmesser eingestellt sein. Als Kompromiss hat man sich auf einen Durchmesser von 1 Airy-Einheit (AE) geeinigt. Die Definition der Airy-Einheit ist in Gleichung 3^[5] gezeigt, wobei $\bar{\lambda}$ die mittlere Wellenlänge und NA die Numerische Apertur darstellt:

$$1 \text{ AE} = \frac{1,22 \cdot \bar{\lambda}}{NA} \quad (3)$$

Diese Einstellung wird meist, wie auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten CLSM, automatisch vorgenommen. Man erreicht damit nicht den dünnsten optischen Schnitt, der möglich ist, kommt diesem jedoch sehr nahe.

2.1.1.3 Bilderzeugung am CLSM

Um bei optimaler Auflösung keinen Informationsverlust zu erhalten, muss beachtet werden, dass die Digitalisierung der vom Detektor registrierten Objektinformation korrekt erfolgt. Die Umwandlung der optischen Information erfolgt über einen Analog/Digital-(A/D-) Wandler, der das kontinuierliche elektrische Signal des Detektors durch periodisches Abtasten in eine diskrete, äquidistante Folge von Messwerten (Pixel) transformiert^[5]. Die so entstehende Bildmatrix enthält in jedem Pixel die spektrale Information. Weitere Informationen zur Definition eines Pixels sind Abschnitt 2.5 zu entnehmen.

In Abbildung 3 ist die Punktabtastung (Sampling) eines A/D-Wandlers schematisch dargestellt. Man erkennt, dass es leicht zur Unterabtastung (Undersampling) kommen kann, wenn der Abstand zwischen zwei Abtastpunkten T erheblich größer ist als die Dauer der Messwertaufnahme t und so zum Informationsverlust führt. Um dies zu vermeiden, muss das Nyquistsche Theorem eingehalten werden. Danach sollte die digitale Auflösung die optische Auflösung um mindestens das Doppelte übersteigen, um zu gewährleisten, dass die Details eines Bildes optimal dargestellt werden^[7]. Allerdings bewirkt eine zu große Überabtastung (Oversampling) eine sehr große Anzahl an Messwerten, die aber keinen zusätzlichen Informationsgewinn mit sich bringen.

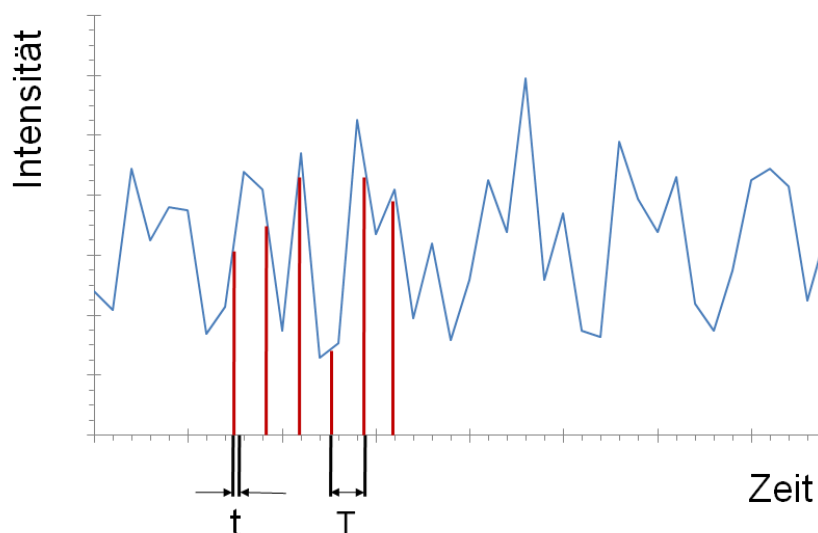


Abbildung 3: Punktabtastung eines kontinuierlichen Signals (nach ^[5]);
 t = Dauer der Messwertaufnahme;
 T = Abstand zwischen zwei Abtastpunkten.

2.1.2 Rasterelektronenmikroskop (REM)

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) zeichnet sich dadurch aus, dass ein von einer Elektronenquelle erzeugter Elektronenstrahl mit Hilfe von elektromagnetischen Kondensator- und Objektivlinsen punktförmig auf die Probe geleitet wird. Dabei wird die Probenoberfläche zeilenförmig abgerastert, wodurch ein Bild entsteht, das die Oberflächenstruktur der Probe wiedergibt^[8]. Schnitte aus dem Inneren eines Objektes sind dagegen nicht möglich. Die Entstehung des Oberflächenbildes basiert vorwiegend darauf, dass die Ausbeute der Sekundärelektronen, die von einem Detektor erfasst werden, von Punkt zu Punkt verschieden ist. Als Sekundärelektronen bezeichnet man die Elektronen, die aus der Probe nach dem Zusammenstoßen mit dem Elektronenstrahl freigesetzt werden. Neben den Sekundärelektronen sind auch Rückstreuielektronen an der Bildgebung beteiligt. Durch die Variation der Spulenströme der elektromagnetischen Linsen lässt sich die Bildvergrößerung steuern, wodurch eine Vergrößerung von bis zum 10^5 -fachen erreicht werden kann. Desweiteren erzielt man mit einem Rasterelektronenmikroskop eine Auflösung von bis zu $3 \text{ nm}^{[7]}$, welche der Auflösung eines CLSM deutlich überlegen ist. Bezeichnend für das REM ist seine große Tiefenschärfe, die es zulässt, dass eine Probe mit starken Höhenunterschieden scharf eingestellt werden kann. Zur Vermeidung von elektrostatischer Aufladung der Probe wird diese häufig mit einer dünnen, gut leitenden Graphit- oder Metallschicht überzogen. Entfällt dieser Schritt kann es zu lokalen Aufladungen innerhalb der Probe kommen, wodurch Bildstörungen entstehen können.

Die Anwendung des REM auf lebende Objekte, wie es mit dem CLSM möglich ist, entfällt, da das Mikroskop auf der einen Seite unter Vakuum betrieben werden muss und auf der anderen Seite der Elektronenstrahl eine zu hohe Energie aufweist, um lebendes Gewebe zu untersuchen.

2.1.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode der quantitativen Vermessung der Fluoreszenz bei gleichzeitiger molekularer Charakterisierung von Zellen dar. Es werden Zellgröße sowie Granularität und bei Verwendung von geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszenzmarkierten Antikörpern gleichzeitig Fluoreszenzsignale detektiert. Das grundsätzliche Funktionsprinzip liegt neben der optischen Vermessung im hydrodynamischen Transport. Dabei wird eine Zellsuspension langsam angesaugt und von

einem Hüllstrom derart verdünnt und fokussiert, dass es möglich ist, Einzelzellen nacheinander als Sequenz zu vermessen (siehe Abbildung 4).

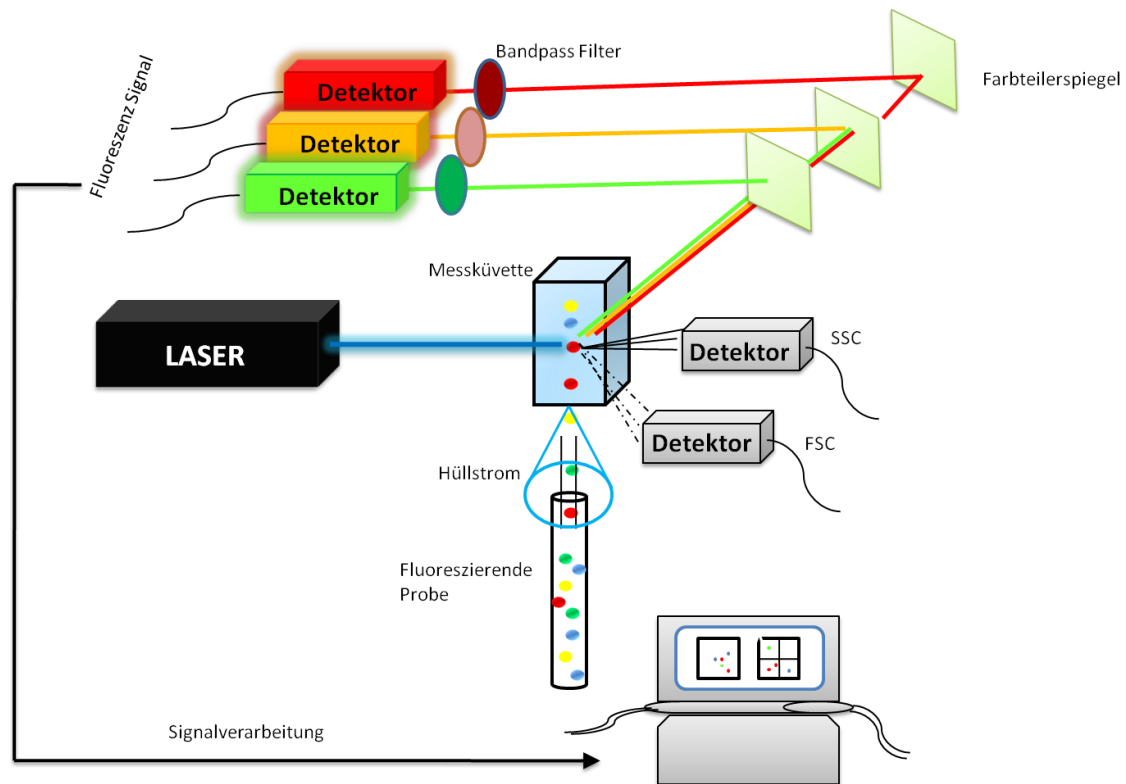


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines Durchflusszytometers (mit freundlicher Genehmigung von Ivonne Brüstle, Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz).

Am Messpunkt kreuzt ein Laserstrahl im rechten Winkel den Probenstrom, wodurch Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden und Einzelzellen das Laserlicht streuen. Typische Geschwindigkeiten des Hüllstroms am Fokus des Laserstrahls liegen zwischen 200 und 2000 Ereignissen pro Sekunde^[10]. Das gestreute Licht wird von zwei unterschiedlichen Detektoren erfasst. Zum einen wird das seitwärts gestreute Licht (*engl.* Side Scatter, SSC) im rechten Winkel zum Laserstrahl detektiert und gibt Aufschluss über die Granularität sowie die Binnenstruktur der Zellen, da diese Art von Streuung vor allem von den intrazellulären Kompartimenten abhängt. Zum anderen wird das vorwärts gestreute Licht (*engl.* Forward Scatter, FSC) in einem kleinen Winkel zum Laserstrahl erfasst und lässt Rückschlüsse auf die Größe der Zellen zu. Ebenfalls im rechten Winkel zum Laserstrahl werden die ausgesendeten Fluoreszenzsignale detektiert. Dabei trennen Farbteilerspiegel (dichroitische Spiegel) und entsprechende Filter das SSC von den Fluoreszenzsignalen sowie die unterschiedlichen Emissionsspektren. Ein Durchflusszytometer enthält je nach Ausstattung unterschiedliche Fluoreszenz-Detektoren, welche durchnummeriert werden (FL1, FL2, ...).

Als Detektoren werden PMTs eingesetzt, die das Licht für jede Zelle einzeln erfassen und in elektrische Signale umwandeln. Die einzelnen Messwerte, die für Einzelzellen stehen, können als Histogramm (siehe Abbildung 5 B) eindimensional oder als Punktwolkendarstellung (siehe Abbildung 5 A), dem sogenannten Dot-Plot, zweidimensional dargestellt werden. In einem Histogramm gibt die x-Achse die gemessene Intensität (zum Beispiel einer Fluoreszenz) und die y-Achse die Zahl der Zellen wieder, die mit einer bestimmten Intensität erfasst wurden. Im Dot-Plot hingegen wird sowohl auf x- und y-Achse die Intensität eines Messparameters (zwei unterschiedliche Fluoreszenzsignale) aufgetragen. Jede Zelle wird anschließend als Punkt (*engl.* dot) gemäß der gemessenen Fluoreszenzintensitäten an der entsprechenden x- beziehungsweise y-Position eingetragen, wodurch man Rückschlüsse auf den Zusammenhang der beiden Messsignalen ziehen kann. Außerdem ist es möglich, Gruppen von Zellen mit ähnlichen Eigenschaften, auch Populationen genannt, zu identifizieren, datentechnisch zu selektieren und in weiteren Histogrammen oder Dot-Plots darzustellen.

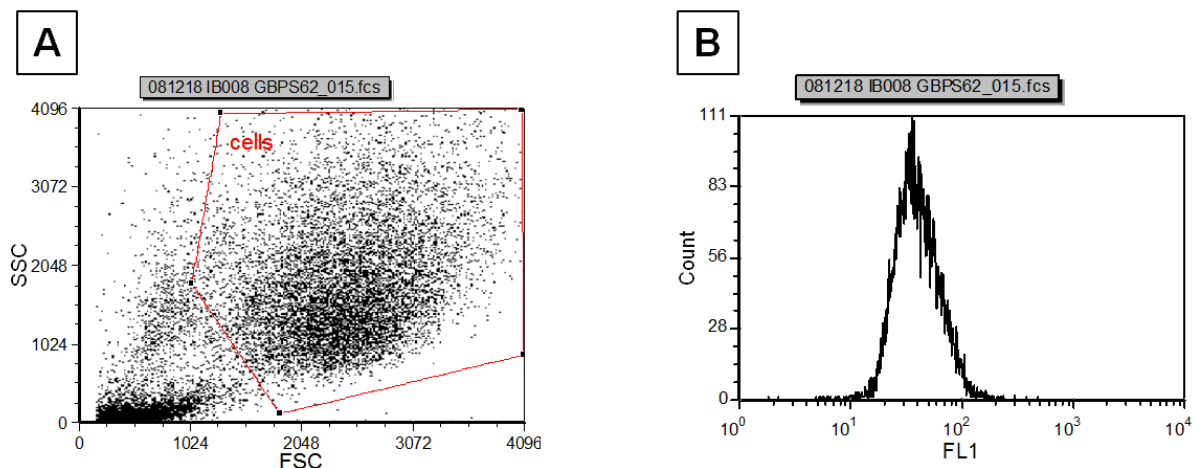


Abbildung 5: Darstellung eines Dot-Plots (A) und eines Histogramms (B). Die rote Markierung innerhalb des Dot-Plots (B) gibt eine Population wieder. Histogramme können beispielsweise aus selektierten Daten des Dot-Plots erstellt werden.

Die Durchflusszytometrie wird unter anderem bei der Analyse des DNA-Gehalts von Tumorzellen oder zur Bestimmung der Konzentration von Zellen, die über Antikörper indentifiziert werden, eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit diente die Durchflusszytometrie dazu, den Gehalt an Polystyrol-Partikeln (GB-PS-26; Charakteristika der Probe siehe 2.4) über die relative Fluoreszenzintensität nach 4 h und nach 24 h in HeLa-Zellen festzustellen und das Verhältnis der Aufnahme mit den Werten aus den CLSM-Versuchen zu vergleichen.

2.3 verwendete Zelllinie HeLa

HeLa-Zellen wurden Anfang der 50er Jahre des 20. Jahrhunderts aus dem aggressiven Gebärmutterhalskrebs der 31-jährigen Afroamerikanerin Henrietta Lacks isoliert, wobei die Anfangsbuchstaben ihres Namens zur Bezeichnung der Zelllinie dienen. George Gey gelang es diese Zellen 1951 als erste menschliche Zelllinie zu kultivieren, indem er als Kultivierungsmedium eine ungewöhnliche Mischung, die unter anderem das Blut menschlicher Plazentas und einen Extrakt aus Kälberembryonen enthielt, verwendet hat^[11]. Bis zu dieser Zeit gelang es nicht menschliche Zellen für mehr als ein paar Wochen in Laboratorien am Leben zu erhalten. Die Tumorzellen von Henrietta Lacks wiesen ein ungewöhnlich schnelles Wachstum auf und vermehren sich bis heute als Zelllinie in Kulturgefäßen kontinuierlich weiter, wobei sich ihre Zahl innerhalb von 48 Stunden verdoppelt^[12].

Weltweit werden HeLa-Zellen als Modell zum Verständnis der Vorgänge innerhalb menschlicher (Tumor-) Zellen herangezogen. Sie stellen die Grundlage für die Krebsforschung dar und liefern wichtige Erkenntnisse in der Biomedizin hinsichtlich der biochemischen Signalwege innerhalb menschlicher Zellen.

Bei HeLa-Zellen handelt es sich um eine adhärenzte Zelllinie, die wie Epithelgewebe als Monolayer auf Kulturgefäßen wächst. In Abbildung 6 ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der HeLa-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, dargestellt.

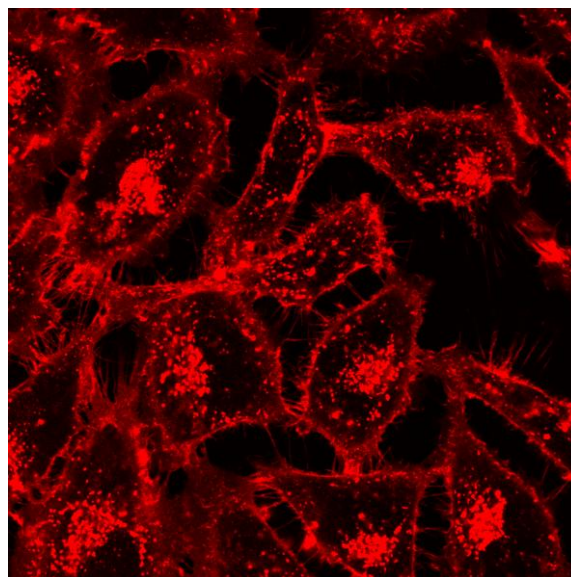


Abbildung 6: CLSM-Aufnahme von HeLa-Zellen, deren Zellmembran mit Cellmask™ Deep Red angefärbt wurde und in der Abbildung rot dargestellt ist.

2.4 Verwendeter Partikel

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Partikel trägt die Bezeichnung GB-PS-26. Es handelt sich um einen aminofunktionalisierten Polystyrol (PS)-Partikel, der durch das nicht-ionische Tensid Lutensol® AT50 (Abbildung 7) stabilisiert wird. Die Aminofunktion, die durch das kationische Co-Monomer 2-(Aminoethyl)-methacrylat-hydrochlorid (AEMH, Abbildung 7) bei der Synthese in den PS-Partikel eingebracht wird, dient der verbesserten Zellaufnahme^[2].

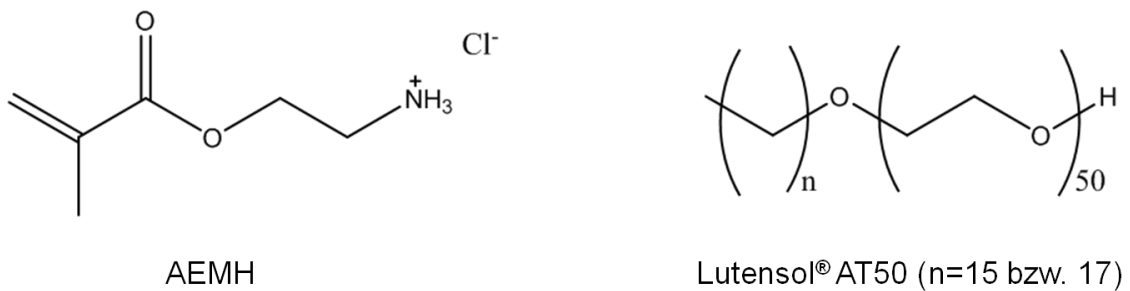


Abbildung 7: Strukturformeln des Co-Monomers AEMH und des Tensids Lutensol® AT50.

Der Partikel enthält zu Detektionszwecken den Fluoreszenzfarbstoff Perylenmonoimid (PMI), der bei einer Wellenlänge von $\lambda(\text{ex}) = 488 \text{ nm}$ angeregt wird und das Emissionsmaximum bei $\lambda(\text{em}) = 525 \text{ nm}$ aufweist. In Tabelle 1 sind die Eigenschaften des Partikels zusammengefasst.

Tabelle 1: Eigenschaften des aminofunktionalisierten PS-Partikels GB-PS-26.

Zusammensetzung von GB-PS-26	Oberflächenfunktionalisierung (funktionelle Gruppe/ nm^2)	PMI $\frac{\text{mg}}{\text{g}_{\text{Polymer}}}$	d $\frac{\text{nm}}{\text{nm}}$	Zeta Potential mV
Monomer - Styrol Co-Monomer - AEMH Tensid - Lutensol Partikelinhalt - PMI	0,14	0,43	170	+8,0 (bei pH6)

In der REM-Aufnahme aus Abbildung 8 ist gut zu erkennen, dass sich der Partikel GB-PS-26 durch eine hohe Monodispersität auszeichnet, weshalb er auch als Modellpartikel verwendet wird. Ausschlaggebend für die Verwendung als Modellpartikel sind außerdem folgende

Eigenschaften, die aus Versuchen innerhalb der Gruppe bekannt sind: gute Aufnahme in Zellen, keine Toxizität und kein Auftreten von Agglomerationen.

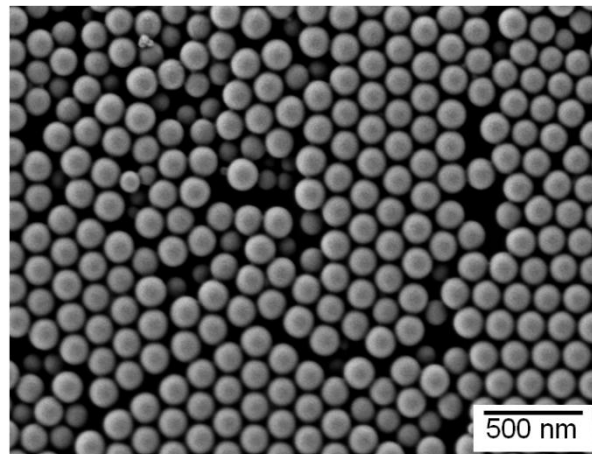


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Auftropfprobe des Partikels GB-PS-26 (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Grit Baier, Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz).

2.5 *Image J*

Unser Auge ist imstande, ca. 50-60 Graustufen zu unterscheiden^[7]. Ein digitales Bild enthält aber weitaus mehr Informationen, als unser Auge verarbeiten kann. Die Bilder, die während dieser Arbeit am CLSM entstanden, sind 8-bit Bilder. Das heißt, sie beinhalten 256 Graustufen. Um alle Informationen auszuwerten, bedarf es geeigneter Bildbearbeitungsprogramme, die die aufgenommenen Bilder analysieren. Für die Bearbeitung und Analyse der Bilder wurde das Programm *Image J* gewählt, da es sich um eine Open-Source-Software handelt, die jedem zugänglich ist und beliebig erweitert werden kann, wodurch man unabhängig von Software-Anbietern ist. Die verwendeten Algorithmen sind bekannt und publiziert. Dadurch kann genau nachvollzogen werden, wie die Datenmanipulation erfolgt. Diese Möglichkeit besteht bei käuflich erworbener Software nicht. *Image J* zeichnet sich besonders durch die hohe Flexibilität aus, mit der Befehlsabfolgen zusammengestellt und auf besondere Fragestellungen abgestimmt werden können. Vor allem das Lösen der in dieser Diplomarbeit auftretenden Fragestellung nach der Lokalisation von Nanopartikeln innerhalb einer Zelle mit der weiterführenden Zielsetzung auf die zeitliche Erfassung von Prozessen ist mit derzeitigen kommerziellen Programmen nicht möglich. Alle Bilder, die am CLSM aufgenommen wurden, sind als TIFF (Tagged Image File Format) abgespeichert und werden als solche bearbeitet. Ein grundlegender Vorteil dieses Formats

ist, dass alle Rohdaten erhalten bleiben, wodurch auch quantitative Analysen möglich sind. Andere Formate wie zum Beispiel das JPEG-Format (Joint Photographic Experts Group) enthalten keine Metadaten wie zum Beispiel Größenangaben oder Grauwert-Kalibrierung. Außerdem wird bei der Verwendung des JPEG-Formats die Größe des Bildes reduziert, wodurch es zum Datenverlust kommt und die Qualität des Bildes gemindert wird. Aufgrund der Tatsache, dass TIFF-Dateien keine Datenkomprimierung enthalten, benötigt man allerdings wesentlich mehr Speicherkapazitäten.

Jedes digitale Bild ist aus Pixeln (Picture Elements) aufgebaut. Ein Pixel stellt keine Farbe dar, sondern ist das kleinste Bauelement eines Bildes, das einen Zahlenwert, die sogenannte Pixel-Intensität, aufweist, der einen bestimmten Grauwert zwischen schwarz und weiß widerspiegelt. Diese Pixel-Intensitäten können verschieden codiert sein, je nachdem in welcher Bit-Tiefe das Bild definiert ist. Ein 2-bit Bild zum Beispiel weist $2^2 = 4$ unterschiedlich Grautöne auf, in der die Pixel-Intensitäten angegeben werden können. Dabei werden die Grautöne wie folgt eingeteilt: 00 (schwarz), 01 (grau), 10 (grau) und 11 (weiß)^[13]. Wie oben erwähnt, sind die Bilder in der vorliegenden Arbeit 8-bit Bilder und enthalten $2^8 = 256$ Graustufen, wobei die Codierung 00000000 dem Grauwert Null, also schwarz, entspricht und 11111111 dem Grauwert 255, also weiß, entspricht. Diese Codierung ist in der sogenannten LUT (*engl.* Lookup Table) gespeichert, die beim Abspeichern des Bildes als TIFF auch mit übertragen wird. In dieser Arbeit wurde zum besseren Verständnis mit inverser LUT gearbeitet. Das heißt, der Grauwert 255 entspricht schwarz und Null entspricht weiß.

Mit *Image J* können alle Bildinformationen verarbeitet werden. Die Grauwerte der Pixel können für markierte Regionen innerhalb des Bildes oder auch für das gesamte Bild in Tabellen aufgelistet, miteinander verrechnet, aber auch verändert werden. Da es sich um Fluoreszenzbilder handelt, sind die Grauwerte als relative Fluoreszenzwerte zu verstehen. Die Veränderungen von zum Beispiel Helligkeit oder Kontrast werden nur an Bildern vorgenommen, die nicht zu quantitativen Aussagen über die Fluoreszenz herangezogen werden, da diese Veränderungen natürlich Veränderungen der Pixel-Intensitäten mit sich bringen und die Ergebnisse verfälschen würden.

Image J befähigt den reinen Nutzer, der keine Programmier-Vorkenntnisse hat, durch das Verwenden von vorhandenen Plugins selbständig Macros zu schreiben. Diese Macros bestehen aus einer Aneinanderreihung von Befehlen, die dazu dienen, Bilder automatisch zu verändern oder miteinander zu verrechnen. In dieser Arbeit wurde ein Macro erstellt, welches bei der Auszählung und Charakterisierung von Partikeln in Zellen helfen beziehungsweise diesen Vorgang automatisieren soll. Die Vorgehensweise wird detailliert in Kapitel 3.6 beschrieben.

3 experimenteller Teil

3.1 verwendete Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: verwendete Reagenzien und deren Hersteller

Reagenzien	Hersteller
Ampuwa (steriles Wasser)	Fresenius Kabi
Cellmask™ Deep Red	Invitrogen
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Invitrogen
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Invitrogen
FCS (fetal calf serum)	Invitrogen
L-Glutamin (GlutaMAX™)	Invitrogen
Streptomycin/ Penicillin	Invitrogen
Trypan-Blau (0,4%ige Lösung)	Sigma
Trypsin (2,5%)	Invitrogen

Tabelle 3: verwendete Geräte und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Heraeus Instruments
CLSM Leica SP5 II mit CW-STED	Leica
Durchflusszytometer: FACS CyFlow ML	Partec
Pipetten	Eppendorf
REM Hitachi SU8000	Hitachi
Invertiertes Mikroskop CKX41	Olympus

Tabelle 4: verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
15 und 50 mL Tubes (Cellstar® Tubes)	Greiner Bio-one
Deckglas (Menzel-Glas)	Thermo Scientific®
Kulturgefäß Ibitreat µ-Dish ^{35mm, low} (Ibidi)	Ibidi
Serologische Einmalpipetten	Greiner Bio-one
Sterile Pipettenspitzen	Biozym
Zellkulturflaschen Tissue cultur Cellstar	Greiner Bio-one

3.2 Zellpräparation für die CLSM-Versuche

Die Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgte in DMEM, welches mit 10% FCS, 100 Einheiten Penicillin sowie 100 mg Streptomycin pro mL und 2 mM L-Glutamin versetzt wurde. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 5% CO₂ und einer Temperatur von 37 °C. Aufgrund der hohen Proliferationsrate wurde alle drei Tage 1:3 gesplittet, indem altes Medium aus der Zellkulturflasche abgegossen, mit 20 mL PBS(-) gewaschen und anschließend 5 mL 2,5%ige Trypsinlösung zugegeben wurde, die nach kurzer Einwirkzeit abgegossen wurde. Die Zellen blieben weiterhin mit einer dünnen Schicht aus Trypsin bedeckt, wodurch das Ablösen der adhärenen Zellen initiiert wurde. Anschließend wurden die Zellen circa 6 min im Brutschrank inkubiert. Um die Wirkung des Verdauungsenzyms Trypsin zu stoppen, wurden 12 mL DMEM mit FCS zugeführt und die Zellsuspension mit der Pipette homogenisiert. Für das Splitten entnahm man 8 mL der Zellsuspension und teilte diese auf neue Flaschen auf oder verwarf sie. Die restlichen 4 mL in der Zellkulturflasche wurden mit 16 mL DMEM verdünnt.

Bevor die Zellen für die CLSM-Versuche in den Kulturgefäßen von Ibidi ausgesät wurden, erfolgte das Auszählen der Zellen. Hierfür entnahm man der abtrypsinieren, noch nicht gesplitteten Zellsuspension 20 µL und versetzte diese mit 20 µL einer 0,4%igen Trypan-Blau-Lösung. Unter dem Lichtmikroskop von Olympus wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Dabei erschienen lebende Zellen als helle Punkte, die toten Zellen wurden vollständig blau angefärbt.

In den Kulturgefäßen von Ibidi (Ibidi) wurden 10.000 HeLa-Zellen pro Gefäß in einem Volumen von 1 mL DMEM ausgesät. Der Grund für das relativ dünne Aussäen ist die Möglichkeit, z-Stacks von Einzelzellen aufnehmen zu können. Die Zellen ließ man einen Tag adhären. Danach wurde das Medium abgezogen, die Zellen mit 1 mL PBS(-) gewaschen und anschließend mit 1 mL Partikellösung der Konzentration 150 µg/mL DMEM versetzt. Die Zellen wurden für 4 und 24 h mit den Partikeln GB-PS-26 im Brutschrank inkubiert.

Für die Aufnahmen am CLSM mussten vorab die überschüssigen, nicht aufgenommenen Partikel abgenommen und die Zellmembran der HeLas mit CDR angefärbt werden. Dabei wurden folgende Schritte durchgeführt:

- a) Abziehen der Partikellösung und dreimaliges Waschen der Zellen mit je 1 mL PBS(+)
- b) Ansetzen der Farbstofflösung für die Zellmembran:
1 mL PBS(+) und 0,75 µL CDR
- c) 1 mL der Farbstofflösung zugeben und 5 min einwirken lassen, dann abziehen
- d) dreimaliges Waschen der Zellen mit je 1 mL DMEM
- e) Zellen mit 1 mL DMEM bedecken

Bei allen Versuchen mit dem CLSM ist eine Negativkontrolle (NK) mitgeführt worden. Bei dieser wurden keine Partikel zugegeben, allerdings alle anderen Schritte zur Probenvorbereitung genauso wie bei den anderen Proben durchgeführt.

3.3 Einstellungen am CLSM

Alle Aufnahmen der z-Stacks am CLSM wurden unter den gleichen Bedingungen und Einstellungen durchgeführt, die in Tabelle 5 zusammengefasst sind. Als Objektiv wurde das Öl-Objektiv HCX PL APO CS 63x/1.40-0.60 oil verwendet. Durch das Einsetzen von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, die mit verschiedenen Wellenlängen angeregt werden, müssen zwei Laserlinien verwendet werden. Der Zellmembranfarbstoff CDR wurde mit einem Helium-Neon-Laser (HeNe-Laser) bei $\lambda(\text{ex}) = 633 \text{ nm}$ und der Partikelfarbstoff PMI mit einem Argonlaser bei $\lambda(\text{ex}) = 488 \text{ nm}$ angeregt. Die Detektion der Emission erfolgte für CDR in einem Bereich von $\lambda(\text{em}) = 660\text{-}710 \text{ nm}$ und für PMI in einem Bereich von $\lambda(\text{em}) = 505\text{-}580 \text{ nm}$. Obwohl der Bereich der Emission der beiden Farbstoffe weit genug auseinander liegt, so dass ein Crosstalk unwahrscheinlich ist, erfolgten die Aufnahmen sequenziell. Unter Crosstalk versteht man das Auftreten des Fluoreszenzsignals eines Farbstoffes in anderen Detektionskanälen als dem für diesen Farbstoff ausgewählten Kanal. Da die Emission im „falschen“ Kanal zur Signalgebung beiträgt, werden dadurch Ergebnisse verfälscht. Sequentielles Abtasten („Scannen“) bedeutet, dass der Abtastvorgang für die zwei oder mehr Fluoreszenzfarbstoffe nacheinander abläuft. Es wird zunächst nur ein Farbstoff angeregt (Scan 1) und deshalb auch nur dessen Emission detektiert. Anschließend wird der zweite Farbstoff angeregt (Scan 2) und wiederum nur dessen Emission detektiert. Das wird bei jeder Zeile, die gescannt wird, wiederholt, wodurch man eine sehr gute Trennung der Signale erzielt und ein Crosstalk deutlich verringert wird.

Tabelle 5: CLSM-Einstellungen für die Aufnahmen der z-Stacks.

Scanvorgang	Bildinformationen	Scan 1	Scan 2
Geschwindigkeit 700 Hz	Bildformat: 2048x2048 Pixel	für CDR	für PMI
bidirektional	Pixelgröße: 70,70 x 70,70 nm	Anregung mit HeNe- Laser bei 633 nm und 7% Laserleistung	Anregung mit Argon- Laser bei 488 nm und 3% von 20% Laserleistung
1,7-facher Zoom	Bildgröße: 144,72 x 144,72 μm	Detektion mit PMT4 bei 600 V smart gain, -0,3% smart offset und einer Wellenlänge von 660-710 nm	Detektion mit PMT2 bei 654 V smart gain, -1,0% smart offset und einer Wellenlänge von 505-580 nm

Die verwendeten Laserintensitäten sind sehr niedrig gehalten, um der Phototoxizität und dem schnellen Ausbleichen der Farbstoffe entgegen zu wirken, beziehungsweise diese Faktoren zu verringern. Durch das Aufnehmen von z-Stacks wird eine Zelle über einen relativ langen Zeitraum bestrahlt im Vergleich zu der Aufnahme eines Einzelbildes.

Bei der Planung der Versuche wurde festgelegt, dass Einzelzellen als z-Stack aufgenommen werden. Jeder z-Stack beinhaltet zweidimensionale Bilder aus 10 Fokusebenen, das heißt 10 optische Schnitte mit definierter Schrittweite. Als Beginn des Stacks wurde der Ibidi-Boden festgelegt (siehe Abbildung 9), auf dem die Zellen adhären. Das Ende eines Stacks wurde durch das obere Ende der Zelle definiert. Aufgrund dieser Vorgaben variierte die Schrittweite der verschiedenen Stacks.

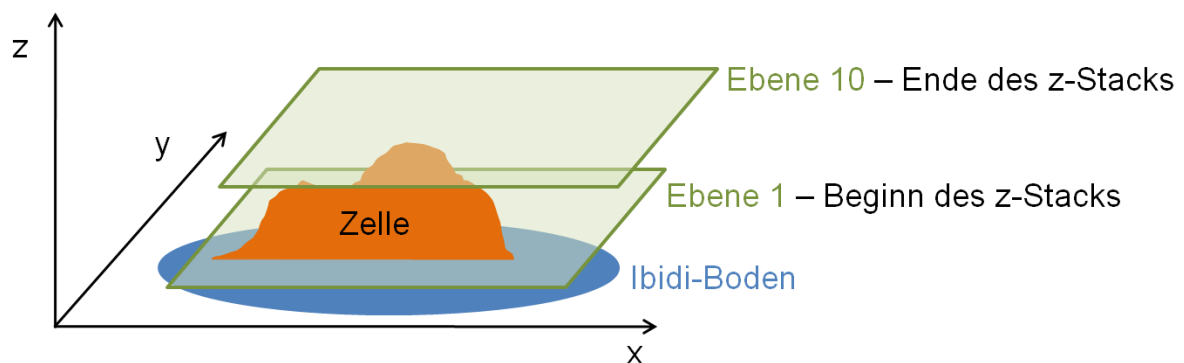


Abbildung 9: Schematische Darstellung der ersten und letzten Ebene eines z-Stacks.

Durch die Einstellungen für die Scangeschwindigkeit, Zoom und Bildformat wurde bei jeder Aufnahme ein 3-faches Oversampling erzielt. Das heißt, die digitale Auflösung (entspricht der Pixelgröße in Tabelle 5) von etwa 70 nm ist dreimal so groß wie die optische laterale Auflösung, die bei circa 200 nm liegt. Dadurch wurde sichergestellt, dass keine Objektinformation bei der Umwandlung des elektronischen Detektorsignals in das digitale Bild verloren geht (siehe auch 2.1.1.3).

3.4 Zellpräparation für die Durchflusszytometrie

Da es sich bei diesem Versuch um eine vergleichende Messung handelt, sind alle Bedingungen, die unter 3.2 beschrieben wurden, eingehalten worden. Das Aussäen der HeLa-Zellen erfolgte in 12-well-Platten, da diese die gleiche Wachstumsfläche wie die Ibidi aufweisen. Auf ein Anfärben der Zellmembran wurde verzichtet, da es für das Erkennen der Zellen im Durchflusszytometer nicht nötig ist.

Für die Anregung von PMI wurde ein Argon-Laser verwendet, der mit einer Leistung von 200 mW den Farbstoff bei 488 nm anregte. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 527 nm (+/- 12 nm) im Fluoreszenzkanal (FL) 1. Das gleiche wurde bei einer Laserleistung von 40 mW wiederholt.

Als Kontrollexperiment wurde jedesmal eine Negativkontrolle mit vermessen, die nicht mit Partikeln inkubiert wurde. Das detektierte Signal entstammt der Autofluoreszenz der Zellen.

3.5 Probenpräparation für die REM-Aufnahmen

Mit Hilfe der REM-Aufnahmen wird untersucht, ob die im CLSM detektierten Fluoreszenzpunkte („Spots“) nur von einem Partikel stammen oder von einer Ansammlung von Partikeln, die in einem Endosom vorliegt. Dazu musste die Größe der Einzelpartikel aus den REM-Bildern mit der Größe der Fluoreszenzsignale aus den CLSM-Aufnahmen verglichen werden. Um Einzelpartikel detektieren zu können, wurden 4 μL des Partikels GB-PS-26 mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampuwa-Wasser (entspricht 40 ng Partikel) auf ein Deckglas (Menzel-Glas) aufgetropft. Auf das Deckglas wurde vorher ein Goldnetzchen (Grid) aufgebracht (siehe Abbildung 10). Dieses Grid hat ein definiertes Raster, das es ermöglicht, die gleichen Stellen am CLSM sowie am REM zu finden und zu detektieren, wodurch die Vergleichbarkeit der Bilder gewährleistet ist. Nach dem Eintrocknen der Auftropfprobe wurden zuerst die CLSM-Aufnahmen durchgeführt. Die Einstellungen für die Aufnahmen und die Detektion von PMI waren die gleichen, die unter 3.4 beschrieben sind. Anschließend wurde die gleiche Probe mit einer dünnen Graphitschicht überzogen, um sie für die REM-Aufnahmen leitfähig zu machen und schließlich am REM vermessen. Die Bilder wurden bei einer Spannung von 10 kV aufgenommen.

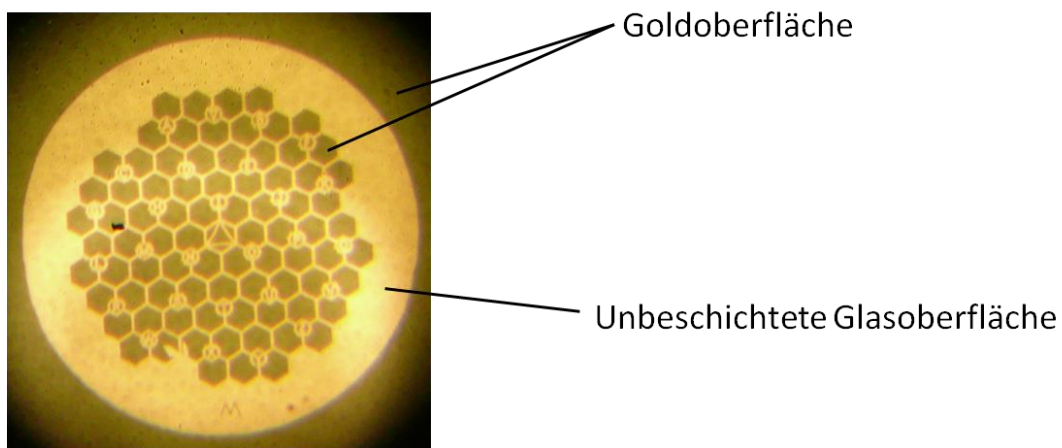


Abbildung 10: Digitale Aufnahme des Goldgrids, mit welchem der korrelative Versuch durchgeführt wurde. Die Goldoberfläche zeichnet sich dunkel in der Aufnahme ab, die hellen Flächen stellen die unbeschichtete Glasoberfläche dar (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Martin Dass, Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz).

3.6 Vorgehensweise zum Erstellen des Macros mit *Image J*

Ziel dieser Diplomarbeit ist es, automatisch Partikel innerhalb von Zellen zu zählen und die Partikelfläche sowie den durchschnittlichen Grauwert beziehungsweise die relative Fluoreszenz-Intensität des identifizierten Partikels zu erfassen.

Hierfür wurde ein einfaches Modellsystem geschaffen. Deshalb wurden fast ausschließlich z-Stacks von Einzelzellen aufgenommen, um die als Partikel erfassten Objekte genau dieser Zelle zuweisen zu können. Desweiteren wurde der Partikel GB-PS-26 aufgrund seiner unter 2.4 genannten Eigenschaften als Modellpartikel gewählt. Auf Langzeituntersuchungen wie der Beobachtung der Partikelaufnahme innerhalb einer Stunde in lebenden Zellen wurde ebenfalls verzichtet, da die Position des z-Stacks über den Beobachtungszeitraum nicht stabil bleibt, wodurch die Auswertung der Stacks zusätzlich erschwert wird.

3.6.1 Aufbau des Macros

Image J zeichnet sich durch eine hohe Flexibilität in der Bildbearbeitung aus und lässt sich für spezielle Fragestellungen ideal nutzen, da Befehlsabfolgen individuell zusammengestellt werden können. Im Folgenden ist der Aufbau des Macros schematisch als Befehlsabfolge, so wie sie in *Image J* erfolgte, dargestellt. Dieses Macro wurde zur Auswertung aller z-Stacks angewendet. Grundsätzlich werden die als Einzelbilder gespeicherten Aufnahmen aus beiden Detektionskanälen zunächst getrennt voneinander bearbeitet, wobei die Bildabfolge des z-Stacks geöffnet und in eine z-Projektion umgewandelt wird. Das heißt, alle Ebenen werden übereinander gelegt und ein einziges Bild generiert. Dies wird separat sowohl für die Aufnahmen von der Zellmembran als auch von den Partikeln durchgeführt. Anschließend wird eine Maske von der z-Projektion erstellt (siehe Abbildung 11). Eine Maske stellt die Umwandlung eines Bildes mit definierten Grauwerten in ein Bild mit nur zwei Grauwerten dar, nämlich schwarz und weiß. Die Bilder der z-Projektion und die Masken werden derart miteinander verrechnet, dass am Ende der Auswertung nur Objekte innerhalb der Zelle erfasst werden. Der durchschnittliche Grauwert, der der relativen Fluoreszenz-Intensität entspricht, und die Fläche des erfassten Objekts werden in einer Excel-Datei dokumentiert. Die Anzahl der „counts“ wird in einer Zusammenfassung („Summary“) angezeigt, die ebenfalls als Excel-Datei abgespeichert wird.

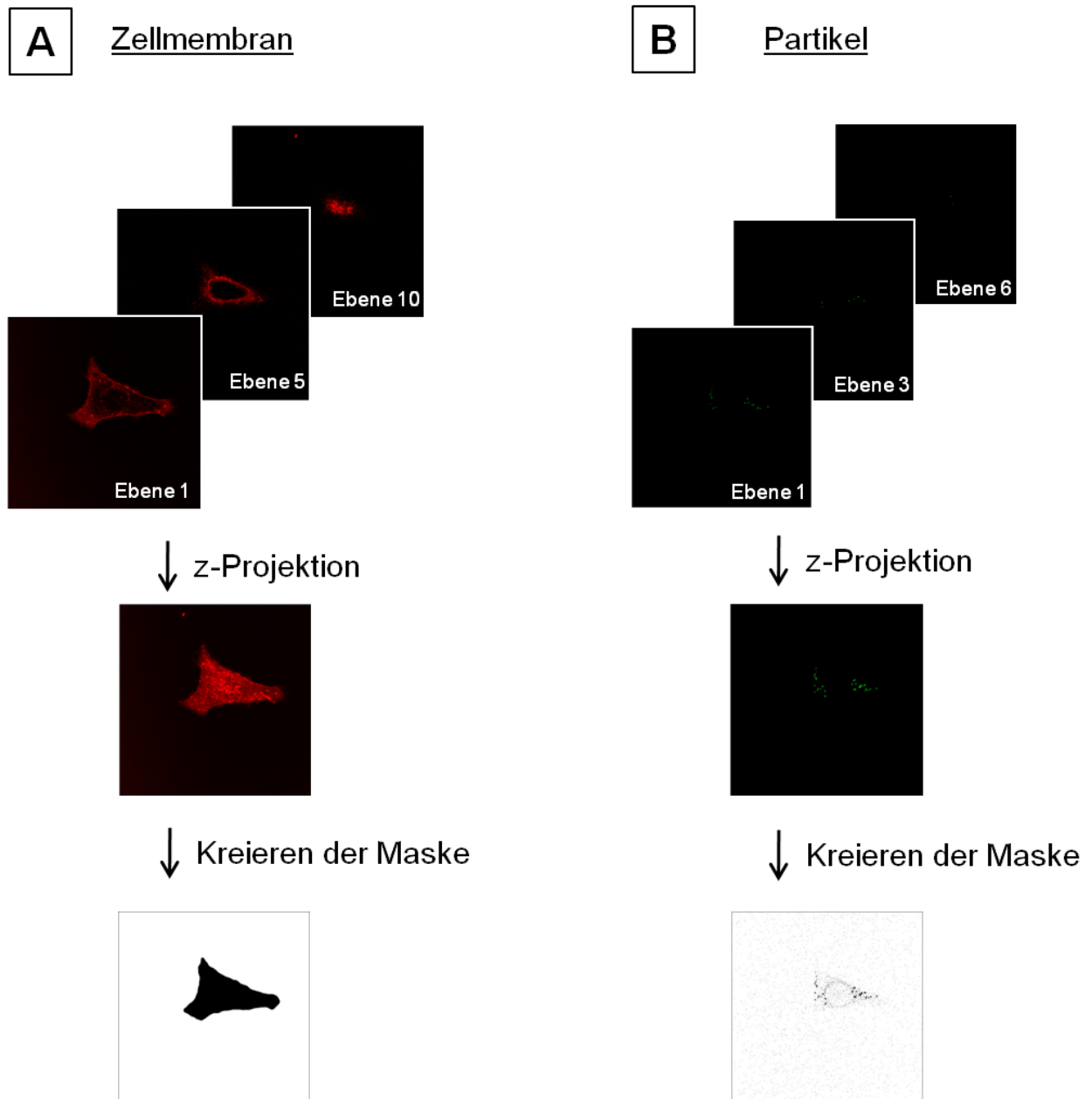


Abbildung 11: Schematische Darstellung zur Erstellung der Masken:
A beschreibt die Entwicklung der Zell-Maske aus den Aufnahmen des Detektionskanals für die Zellmembran.
B beschreibt die Entwicklung der Partikel-Maske aus den Aufnahmen des Detektionskanals für die Partikel (im Ausdruck sind die Fluoreszenzspots nicht gut zu erkennen).

Die nachfolgenden zwei Seiten zeigen die Befehlsabfolge des Macros in *Image J*.

Generieren der Maske für
die Fläche, die die Zelle
einnimmt mit den Werten
0 oder 255
weiß=0
schwarz=255

1. run("Image Sequence...",
"open=[C:\\Users\\tomcin\\Documents\\MPIP\\Protokolle\\ST013\\
\\20110125 Ibidi 3 series050\\Series050_z0_ch00.tif] number=20
starting=1 increment=2 scale=100 file=[] or=[] sort");
2. run("Z Project...", "start=1 stop=10 projection=[Max Intensity]");
3. rename("Maske Zelle");
4. selectWindow("20110125 Ibidi 3 series050");
5. close();
6. run("Image Sequence...",
"open=[C:\\Users\\tomcin\\Documents\\MPIP\\Protokolle\\ST013\\
\\20110125 Ibidi 3 series050\\Series050_z0_ch00.tif] number=20
starting=2 increment=2 scale=100 file=[] or=[] sort");
7. run("Z Project...", "start=1 stop=10 projection=[Max Intensity]");
8. rename("Originalbilder Partikel");
9. selectWindow("20110125 Ibidi 3 series050");
10. close();
11. selectWindow("Maske Zelle");
12. setAutoThreshold("Default dark");
13. setThreshold(15, 255);
14. setThreshold(15, 255);
15. run("Convert to Mask");
16. run("Median...", "radius=2");
17. run("Dilate");
18. run("Dilate");
19. run("Dilate");
20. run("Dilate");
21. run("Dilate");
22. run("Fill Holes");
23. run("Erode");
24. run("Erode");
25. run("Erode");
26. run("Erode");
27. run("Erode");
28. run("Remove Outliers...", "radius=30 threshold=50
which=Bright");
29. run("Remove Outliers...", "radius=30 threshold=50 which=Dark");
30. run("Median...", "radius=10");

Durch Subtrahieren von 254
bleiben nur noch Werte von 0
oder 1 → wenn die Maske
mit einem anderen Bild
verrechnet wird, ändern sich
die Werte (0 bis 255) des
anderen Bildes nicht!

31. run("Subtract...", "value=254");

Zusammen mit den Befehlen 6. bis 10. → Generieren der Maske für die Partikel mit den Werten 0 oder 255

Threshold: es sollen alle Werte zwischen 1-255 erfasst werden

```
32. selectWindow("Originalbilder Partikel");
33. run("Duplicate...", "title=[Maske Partikel]");
34. //run("Threshold...");
35. setAutoThreshold("Default");
36. setThreshold(1, 255);
37. setThreshold(1, 255);
38. run("Convert to Mask");
```

Verrechnen der beiden Masken, um nur die Partikel (bzw. die Werte) zu erhalten, die innerhalb der Fläche der Zelle vorzufinden sind. Das entstehende Bild ist wieder eine Maske.

```
39. imageCalculator("Multiply create", "Maske Zelle", "Maske Partikel");
40. selectWindow("Result of Maske Zelle");
41. rename("Partikel in der Zelle");
```

Verrechnen der Maske der Zelle mit dem Originalbild der Partikel, um nur die Partikel mit den entsprechenden Werten für die relative Fluoreszenz-Intensität zu erhalten, die in der Zelle sind

```
42. imageCalculator("Multiply create", "Maske Zelle", "Originalbilder Partikel");
43. rename("Partikelintensity in der Zelle");
```

Anwenden des „Particle Analyzers“ von *Image J*, um die als Partikel gefundenen counts zu charakterisieren, die Ergebnisse als Excel-Datei abzuspeichern und die counts als Maske sowie als Umriss in einem extra Fenster darzustellen

```
44. run("Set Measurements...", "area mean min median display redirect=[Partikelintensity in der Zelle] decimal=3");
45. selectWindow("Partikel in der Zelle");
46. run("Analyze Particles...", "size=0.1419-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks display summarize");
47. selectWindow("Results");
48. saveAs("Results", "C:\\Users\\tomcin\\Documents\\MPIP\\Protokolle\\ST013\\Ergebnisse fuer series050\\Results von maxInt z-proj von Fiji.xls");
49. selectWindow("Summary");
50. saveAs("Text", "C:\\Users\\tomcin\\Documents\\MPIP\\Protokolle\\ST013\\Ergebnisse fuer series050\\Summary von maxInt z-proj von Fiji.xls");
51. selectWindow("Partikel in der Zelle");
52. run("Analyze Particles...", "size=0.1419-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines clear");
```


4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Neben den Einfachbestimmungen der Negativkontrollen (NK) wurden Doppelbestimmungen der mit Partikeln beladenen Zellen durchgeführt. Die Messungen erfolgten nach 4 und 24 h Inkubationszeit bei jeweils 40 mW und 200 mW Laserleistung. Anhand der tabellarischen (siehe Tabelle 6) und graphischen (siehe Abbildung 12) Darstellung der ermittelten Ergebnisse ist zu erkennen, dass die gemessene relative Fluoreszenz-Intensität nach 24 h Inkubationszeit höher ist als nach 4 h. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da die Zellen länger die Möglichkeit hatten, Partikel aufzunehmen.

Tabelle 6: Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Messung

Probe	relative Fluoreszenz-Intensität (Median)	Mittelwert	s
NK-40mW-4h	2,03	/	/
NK-40mW-24h	3,26		
NK-200mW-4h	1,81		
NK-200mW-24h	1,56		
GB-PS-26_40mW_4h_1	30,40	29,90	0,71
GB-PS-26_40mW_4h_2	29,39		
GB-PS-26_40mW_24h_1	110,65	109,42	1,74
GB-PS-26_40mW_24h_2	108,19		
GB-PS-26_200mW_4h_1	34,91	34,60	0,44
GB-PS-26_200mW_4h_2	34,29		
GB-PS-26_200mW_24h_1	65,23	66,96	2,45
GB-PS-26_200mW_24h_2	68,69		

Pro Messung wurden circa 5000 Zellen analysiert. Die ermittelten Ergebnisse sind semiquantitativ. Die relative Fluoreszenz-Intensität jeder Einzelzelle wird erfasst und das Messergebnis als Median aller Einzelmessungen dargestellt.

Nach 24 h Inkubationszeit enthalten die Zellen circa 70% (Messung bei 40 mW) beziehungsweise circa 50% (Messung bei 200 mW) mehr Partikel als nach 4 h (Vergleich Balkendiagramme aus Abbildung 12, jeweils bezogen auf das Maximum von 24 h).

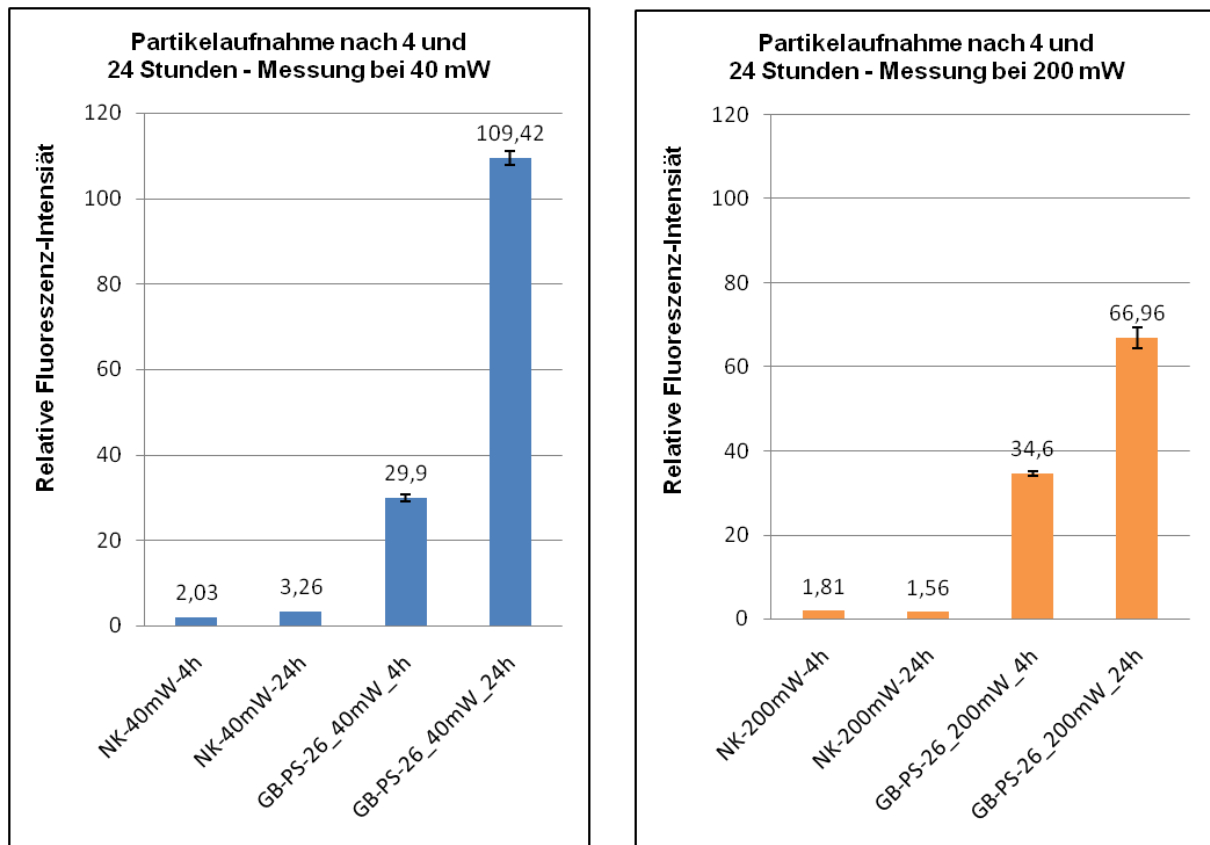


Abbildung 12: Vergleich der Messungen bei 40 mW und 200 mW am Durchflusszytometer

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie erhält man mit guter Statistik Aussagen über die Höhe der Partikelaufnahme. Durch die gemessene Fluoreszenz-Intensität erkennt man, ob Zellen viel oder wenig Partikel aufgenommen haben, jedoch kann nicht über die Lokalisation der Partikel oder die exakte Partikelanzahl in einer Einzelzelle entschieden werden. Genau das ist aber mit CLSM-Aufnahmen möglich. Allerdings erfolgt die Erfassung von Partikelanzahl und Lokalisation im CLSM bislang auf optischer beziehungsweise manueller Basis. Um viele Zellen wie im Durchflusszytometer analysieren zu können, muss ein Automatismus generiert werden, der dies ermöglicht. Die Entwicklung dieses Automatismus ist auf den folgenden Seiten beschrieben.

4.2 Entwicklung des Macros an einem Modellstack

Wie oben beschrieben, ist es mit Hilfe der Durchflusszytometrie nicht möglich, Partikel innerhalb einer Zelle zu lokalisieren oder zu analysieren, wie viele Partikel eine Einzelzelle beinhaltet. Gemessen wird lediglich die relative Fluoreszenz-Intensität einer Probe aus vielen Zellen. Um jedoch die Partikel innerhalb einer Einzelzelle lokalisieren zu können und eine

automatische Quantifizierung durchzuführen, muss eine Vorgehensweise entwickelt werden, die die aufgenommenen Fluoreszenzbilder (siehe Abbildung 13) entsprechend auswertet. Bislang können die aufgenommenen Partikel (Vergleich Abbildung 13 grüne Punkte) nur rein optisch gezählt werden. Anhand der CLSM-Aufnahmen kann außerdem entschieden werden, welche Partikel innerhalb der Zelle sind, an der Membran anlagern oder sich außerhalb der Zelle befinden. Da dieses Vorgehen für jede Zelle einzeln durchgeführt werden muss, ist es bei einer Vielzahl von Zellen sehr zeitaufwendig. Deswegen soll ein Automatismus auf der Grundlage eines Macros von *Image J* entwickelt werden, der diese Vorgehensweise automatisiert und gleichzeitig Partikelanzahl, relative Fluoreszenz-Intensität pro Partikel sowie die Partikelfläche als Ergebnis angibt.

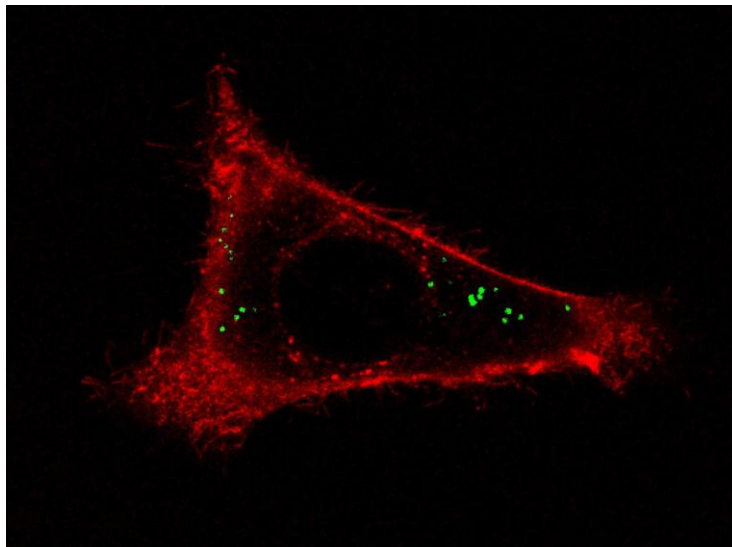


Abbildung 13: CLSM-Aufnahme der ersten Ebene des Modellstacks. Dargestellt ist die Überlagerung der Fluoreszenzkanäle von Zellmembran (rot) und Partikel (grün).

Bevor das Macro in der Art und Weise angewendet werden konnte, wie es unter 3.6.1 beschrieben ist, mussten einige Vorarbeiten geleistet werden. Unter anderem musste eine Maske entwickelt werden, die die Fläche der ganzen Zelle wiedergibt. Weiterhin war es erforderlich, ebenfalls für die Partikel eine geeignete Maske zu entwickeln. Außerdem musste ein System erdacht werden, mit dem es möglich ist, trotz der Partikelmaske die relativen Fluoreszenz-Intensitäten (durchschnittlichen Grauwerte) der erfassten Objekte zu dokumentieren. Denn eine Maske besteht nur aus zwei Werten, nämlich schwarz und weiß. Viele Vorarbeiten wurden an Einzelaufnahmen von Zellen und nicht am Modellstack durchgeführt.

4.2.1 Entwicklung der Maske für die Zelle

CLSM-Aufnahmen enthalten trotz optimierter Einstellungen am Gerät immer etwas Hintergrundrauschen, welches durch das Generieren einer Maske eliminiert wird. Außerdem ist es mit Hilfe einer Maske, die die Fläche einer Zelle wiedergibt möglich, nur Objekte (zum Beispiel Partikel) innerhalb dieser Fläche zu erfassen und Objekte außerhalb der Zelle zu ignorieren. Eine Maske ist ein Schwarz/Weiß-Bild, in welchem schwarze Pixel anzeigen, dass an dieser Stelle ein Objekt ist. Die weißen Pixel hingegen machen deutlich, dass an diesen Stellen nur Hintergrund (und kein Objekt) vorhanden ist. Durch das Festlegen eines „Thresholds“ (Grenzbereich) zu Beginn der Maskenentwicklung wird entschieden, welche Grauwerte des Fluoreszenzbildes angezeigt und zur Maske beitragen sollen (siehe Abbildung 14 A und B). Dadurch wird erreicht, dass Hintergrundrauschen fast vollständig eliminiert wird, da nur ein Grenzbereich an Grauwerten angezeigt wird. Setzt man den Threshold beispielsweise auf die Grauwerte zwischen 30 und 255 fest, so werden nur diese als schwarze Pixel angezeigt und bekommen in der Maske den Wert 255 zugesprochen. Alle Grauwerte, deren Intensität unterhalb 30 liegt, erscheinen weiß und erhalten in der Maske den Wert Null.

Nachdem der Threshold festgesetzt wurde, muss die Maske so angepasst werden, dass sie die Form der Zelle vollständig wiedergibt. Das wird erreicht, indem die Befehle „Median“ (Medianwert, Halbwert), „Dilate“ (Ausdehnen), „Fill Holes“ (Füllen von Leerstellen) und „Erode“ (Vermindern) ausgeführt werden. Zunächst muss die Fläche der Zellmembran eindeutig festgelegt werden. Der Befehl „Median“ eignet sich hierzu im Besonderen, da durch diesen speziellen Filter noch vorhandenes Hintergrundrauschen reduziert wird, indem jeder Pixel durch den Medianwert der benachbarten Pixel-Intensitäten ausgetauscht wird. Es wird eine Art „Glättung“ der Fläche der Zellmembran erzielt (Vergleich Abbildung 14 B und C). Die Zellmembran erscheint aufgrund der Färbeprozedur in der Probenpräparation lückenhaft. Um diese Lücken zu schließen nutzt man den Befehl „Dilate“, wodurch ein Ausdehnen der schwarzen Pixel erzielt wird, indem zusätzliche Pixel an die Ecken der bereits vorhandenen Pixel addiert werden (Vergleich Abbildung 14 C und D). Das Zellinnere muss ebenfalls schwarz erscheinen, also einen Wert von 255 zugesprochen bekommen, so dass die vollständige Fläche der gesamten Zelle angezeigt wird. Indem der Befehl „Fill Holes“ ausgeführt wird, werden Leerstellen innerhalb eines Objekts aufgefüllt (Vergleich Abbildung 14 D und E). Die durch den Befehl „Dilate“ ausgedehnte Zellfläche muss zur Originalgröße zurückgeführt werden. Durch das Anwenden des Befehls „Erode“ werden Pixel an den Ecken von schwarzen Objekten entfernt und man erhält die Originalgröße der Zelle zurück (Vergleich Abbildung 14 E und F).

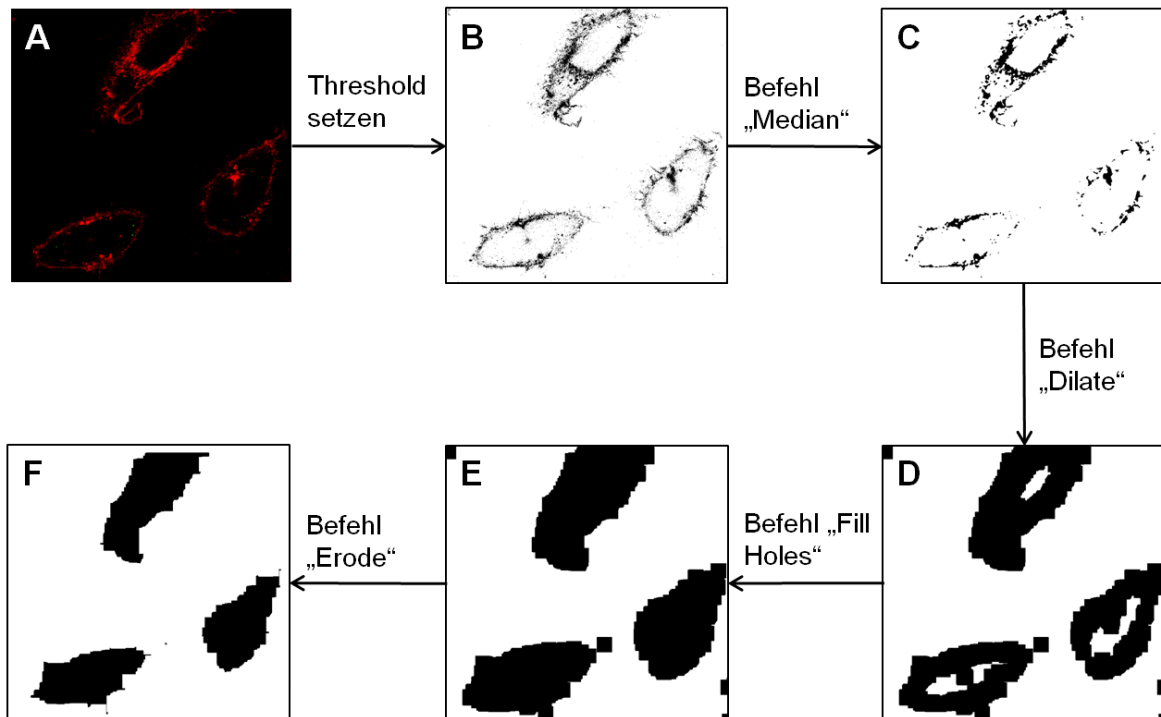


Abbildung 14: Darstellung der Entwicklung einer Maske für die Zellfläche.
 Das Originalbild (A) wird durch Festlegen eines Thresholds (B) in eine Maske umgewandelt, aus welcher durch das Ausüben der Befehle „Median“ (C), „Dilate“ (D), „Fill Holes“ (E) und „Erode“ (F) schließlich die Maske für die gesamte Zellfläche entsteht.

Die Anpassung der Maske an die Form der Zelle wird erreicht, indem einige Befehle im Macro variiert wurden. Durch das Einsetzen des Befehls „Median“ erzielte man eine deutliche Verkleinerung der Masken-Fläche (Vergleich Abbildung 15 B mit C). Das Abrunden beziehungsweise das Glätten des Randes der entstandenen Maske erreichte man durch das Anwenden des Befehls „Remove Outliers“ (Entfernen von Ausreißern, Vergleich Abbildung 15 C mit D) und das nochmalige Anwenden des Filters „Median“ (Vergleich Abbildung 15 D mit E).

Um die immer besser werdende Anpassung an die Zellform noch deutlicher hervorzuheben, wurden die entstandenen Masken (Abbildung 15 B-E) mit dem Originalbild der CLSM-Aufnahme (Abbildung 15 A) übereinander gelegt, wodurch ein sogenanntes „Overlay“ (Überlagerung) entstand (Abbildung 15 F-I).

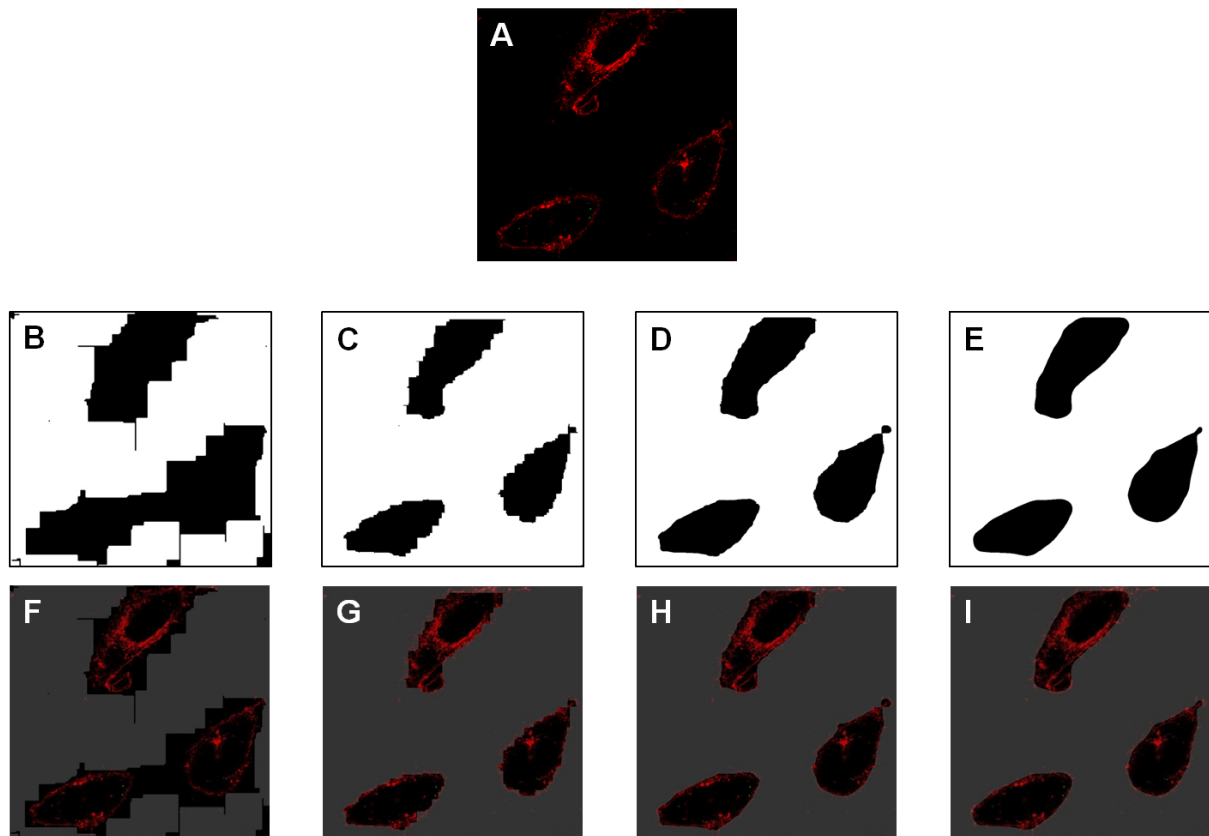


Abbildung 15: Anpassung der Maskenform an die Zellform durch Abändern oder Hinzufügen von Befehlen innerhalb des Macros:
A: CLSM-Aufnahme der mit CDR angefärbten Zellen – Originalbild, aus welchem die Masken generiert wurden;
B-E: mit unterschiedlicher Befehlsabfolge generierte Masken;
F-I: Überlagerung (Overlay) der Masken mit dem Originalbild A.

Das Variieren der oben genannten Befehle hat bei diesem Bild zum Erfolg geführt, denn die letzte Stufe der Maske (Abbildung 15 E) gibt sehr genau die Form der Zelle inklusive Zellmembran wieder. Eine 100%ige Übereinstimmung konnte jedoch nicht erzielt werden. Das Macro erwies sich jedoch als sehr robust gegen Schwankungen in den Aufnahmebedingungen, so dass für die Etablierung des Macros eine 100% exakte Passform der Zellmaske in den Hintergrund gerückt ist.

In einem weiteren Schritt musste geprüft werden, ob die gute Übereinstimmung von Maske und Originalbild auch grundsätzlich für andere Bilder gilt. Zu diesem Zweck wurde das Macro für das Erstellen einer Zellmaske auf mehrere andere Einzelbilder angewendet. Dabei ist aufgefallen, dass neben den oben genannten Befehlen auch Änderungen am Originalbild das Aussehen der Maske beeinflussen. Veränderungen in Helligkeit und Kontrast, die am Originalbild vorgenommen und abgespeichert werden, haben Auswirkung auf die Pixel-Intensitäten beziehungsweise die Grauwerte, die sich dadurch verändern. Dies beeinflusst

den Threshold, der im Macro festgelegt ist. Demzufolge werden andere Bereiche im Bild als Wert (schwarz) beziehungsweise als Hintergrund (weiß) erfasst, wodurch sich das Aussehen der Maske drastisch ändert (siehe Abbildung 16).

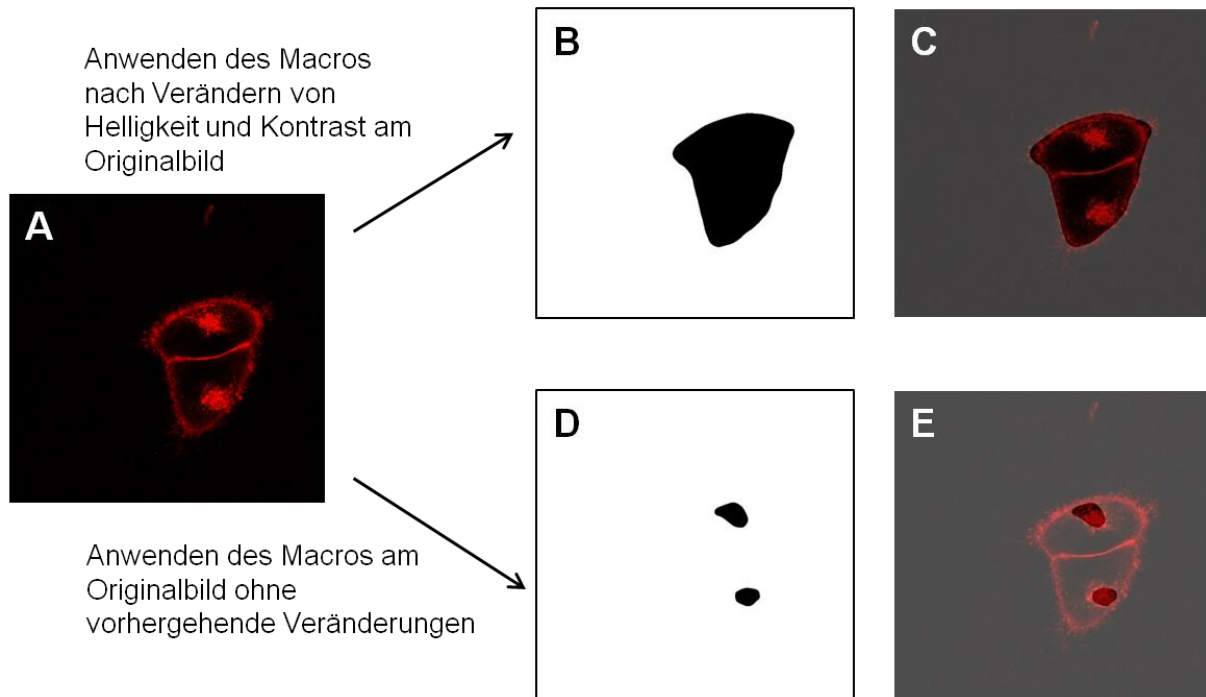


Abbildung 16: Auswirkung der Veränderung von Helligkeit und Kontrast am Originalbild und der Formveränderung der Zell-Maske:
A: Originalbild (Helligkeit und Kontrast verändert zur besseren Darstellung);
B und C: resultierende Zell-Maske (B) nach Anwenden des Macros und Overlay (C) mit dem Originalbild, nachdem Helligkeit und Kontrast verändert wurden;
D und E: resultierende Zell-Maske (D) nach Anwenden des gleichen Macros und Overlay (E) mit dem Originalbild ohne vorher Helligkeit und Kontrast zu verändern.

Fallen Membranfärbungen schwächer aus, muss das Originalbild durch Änderungen in Helligkeit und Kontrast angepasst werden, damit die Zellmaske gut mit der Zellform übereinstimmt (Vergleich Abbildung 16). Das gleiche Ergebnis erzielt man allerdings auch, wenn der Threshold verändert wird. Das Abändern des Thresholds ist besser, da hierbei keine Manipulation der Originaldaten erfolgt und dieser Befehl als feste Beschreibung innerhalb des Macros aufgelistet wird. Festgeschriebene Befehle hinsichtlich des Abänderns von Helligkeit und Kontrast innerhalb des Macros sind allerdings nicht möglich

Als guter Kompromiss erwies sich also das Verwenden der unveränderten Originalbilder (ohne Veränderung von Helligkeit und Kontrast) mit dem Threshold 15-255. Zur Überprüfung wurde unter anderem auf alle Ebenen des Modellstacks das gleiche Macro für die Entstehung der Zellmaske angewendet (siehe Abbildung 17). Stellvertretend für alle Ebenen

des Stacks wurde jede zweite Ebene dargestellt und sowohl das Originalbild der CLSM-Aufnahme (siehe Abbildung 17 A-E) als auch die Zellmaske (siehe Abbildung 17 F-J) und deren Overlay mit dem Originalbild (siehe Abbildung 17 K-O) abgebildet. Man kann auch hier erkennen, dass die Zellmaske sehr gut mit der Form der Zelle aus den verschiedenen Ebenen übereinstimmt.

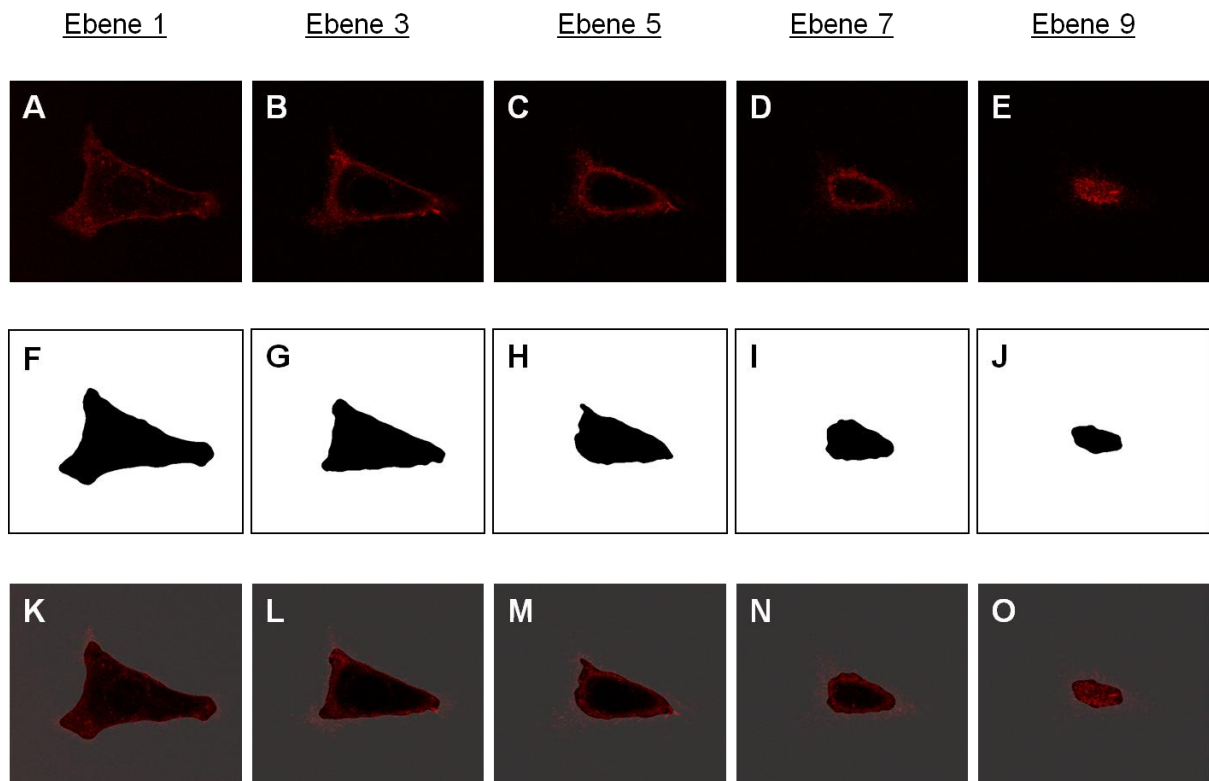


Abbildung 17: Anwenden des Macros für das Entstehen der Zellmaske auf alle Ebenen des Modellstacks. Dargestellt ist eine Auswahl an Ebenen:
A-E: Originalbilder der CLSM-Aufnahmen;
F-J: aus den Originalbildern erstellte Masken;
K-O: Overlay aus Originalbild und der dazugehörigen Maske.

4.2.2 Entwicklung der Maske für die Partikel

Zum Erstellen einer Maske, die die Position der Partikel wiedergibt, muss beachtet werden, dass keine Manipulation an den Originaldaten erfolgt, da auch die relative Fluoreszenz-Intensität der Partikel unverfälscht erfasst werden soll. Jedoch muss auch beachtet werden, dass sich die Partikelgröße innerhalb einer ganz anderen Größenskala bewegt als die einer Zelle (Vergleich Abbildung 18). Weiterhin ist die Fluoreszenz-Intensität des Partikelfarbstoffs PMI deutlich geringer als die des Zellmembranfarbstoffs CDR, aufgrund der getroffenen

CLSM-Einstellungen hinsichtlich der verwendeten Laserintensitäten. Dadurch kann das Anwenden bestimmter Befehle von *Image J* dazu führen, dass die Partikel gar nicht erfasst werden, sondern als Hintergrundrauschen interpretiert werden.

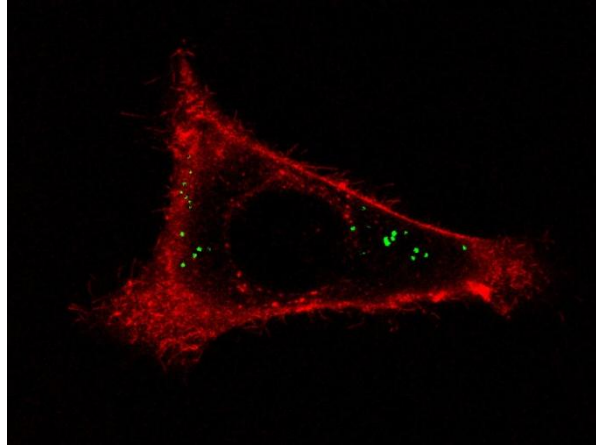


Abbildung 18: CLSM-Aufnahme der ersten Ebene des Modellstacks. Dargestellt ist die Überlagerung der Fluoreszenzkanäle von Zellmembran (rot) und Partikel (grün).

Am Anfang wurde versucht, die Maske für die Partikel auf ähnliche Art und Weise zu generieren wie bei der Vorgehensweise zur Erstellung der Zellmaske. Jedoch führen jegliche Veränderungen im Threshold oder das Einsetzen von Befehlen wie „Median“ oder „Remove Outliers“ zu Verfälschungen an den Ergebnissen, da die Grauwerte verändert werden. Jedoch möchte man bei den Partikeln unter keinen Umständen die Rohdaten verändern, weil die tatsächlichen relativen Fluoreszenz-Intensitäten erfasst werden sollen, die unter den gegebenen Einstellungen am CLSM detektiert wurden. Deswegen wurde entschieden, dass der Threshold auf einen Bereich von 1-255 festgelegt wird. Das heißt, dass alles angezeigt werden soll, was einen Grauwert verschieden von Null aufweist. Natürlich werden dabei nicht nur die eigentlichen Partikel angezeigt, sondern auch Hintergrundrauschen, obwohl dies durch die Detektoreinstellungen (siehe Tabelle 5) weitestgehend eliminiert wurde. Um trotzdem nur Objekte zu erfassen, die Partikel darstellen, wurden die generierten Masken miteinander verrechnet und die Einstellungen im „Particle Analyzer“ von *Image J* genutzt. Dieses Vorgehen wird eingehend in Abschnitt 4.2.3 beschrieben.

Neben dem Festlegen des Thresholds wird an den Originalbildern der Partikel nichts verändert. Anhand der ersten Ebene des Modellstacks aus den CLSM-Aufnahmen des Detektionskanals für die Partikel wird das Generieren der Partikelmaske gezeigt (siehe Abbildung 19).

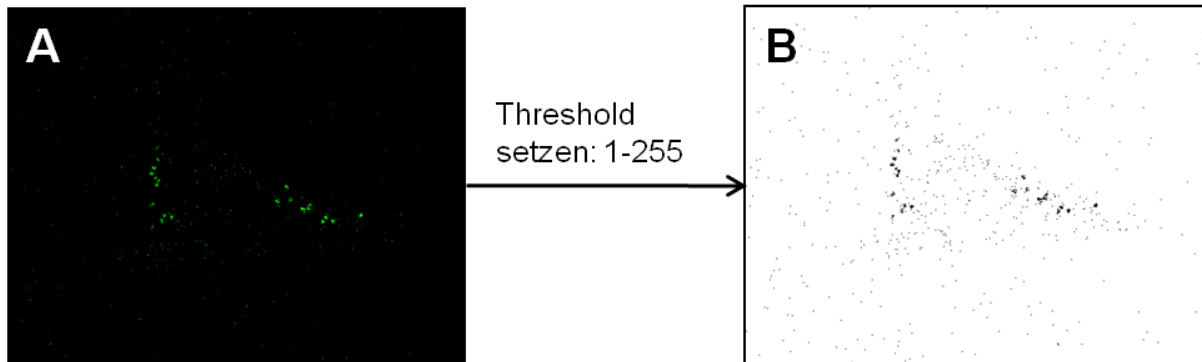


Abbildung 19: Entwicklung der Maske für die Partikel der ersten Ebene des Modellstacks:
A: Originalbild der Partikel aus den CLSM-Aufnahmen;
B: generierte Partikelmaske nachdem der Threshold festgelegt wurde.

4.2.3 Erfassen von Anzahl, Fläche und relativer Fluoreszenz-Intensität der Partikel

Das grundsätzliche Ziel dieser Arbeit ist die Quantifizierung von Partikeln anhand von CLSM-Aufnahmen möglich zu machen und das Vorgehen zu automatisieren. Um die Partikelanzahl pro Zelle, deren intrazelluläre Verteilung sowie Membranadhäsion zu erfassen, muss ein Macro definiert werden, das automatisch die Anzahl der Partikel, deren Einzelflächen und die dazugehörigen relativen Fluoreszenz-Intensitäten beziehungsweise die durchschnittlichen Grauwerte erfasst. Um dieses Ziel zu verwirklichen, müssen entsprechende Masken entwickelt werden, die die Fläche der Zelle und auch die Positionen der Partikel in der Zelle wiedergeben. Dies wurde unter 4.2.1 und 4.2.2 ausführlich beschrieben. Die Masken müssen nun so miteinander und auch mit den Originalbildern der CLSM-Aufnahmen verrechnet werden, dass alle Punkte der Zielstellung abgedeckt werden. Als Rechenoperation wird ausschließlich die Multiplikation verwendet. Anhand der ersten Ebene des Modellstacks werden die verschiedenen Schritte der Maskenverrechnung dargestellt (siehe Abbildung 20).

Zunächst muss die Zellmaske mit der Partikelmaske verrechnet werden, um eine neue Maske zu kreieren, die nur die Partikel anzeigt, die innerhalb der Zellmaske (also auch innerhalb der Zelle) vorliegen (Vergleich Abbildung 20 B-D). Um zu gewährleisten, dass bei der Verrechnung der Zellmaske mit anderen Bildern deren Original-Pixel-Intensitäten erhalten bleiben, muss vorher der Befehl „Subtract value 254“ an der Zellmaske ausgeführt werden. Dadurch erhalten alle schwarzen Pixel den Wert 1 (255 minus 254), alle weißen Pixel behalten den Wert Null bei (Vergleich Abbildung 20 A und B). Multipliziert man diese Zellmaske mit einem anderen Bild, bleiben dessen Original-Pixel-Intensitäten erhalten, da die Multiplikation nur mit 1 oder Null erfolgt. Anschließend wird die Zellmaske mit dem

Originalbild der Partikel aus den CLSM-Aufnahmen verrechnet, was zur Folge hat, dass ein Bild (keine Maske!) entsteht, welches die Partikel innerhalb der Zelle anzeigt, aber gleichzeitig die Original-Pixel-Intensitäten enthält (Vergleich Abbildung 20 B, E und F).

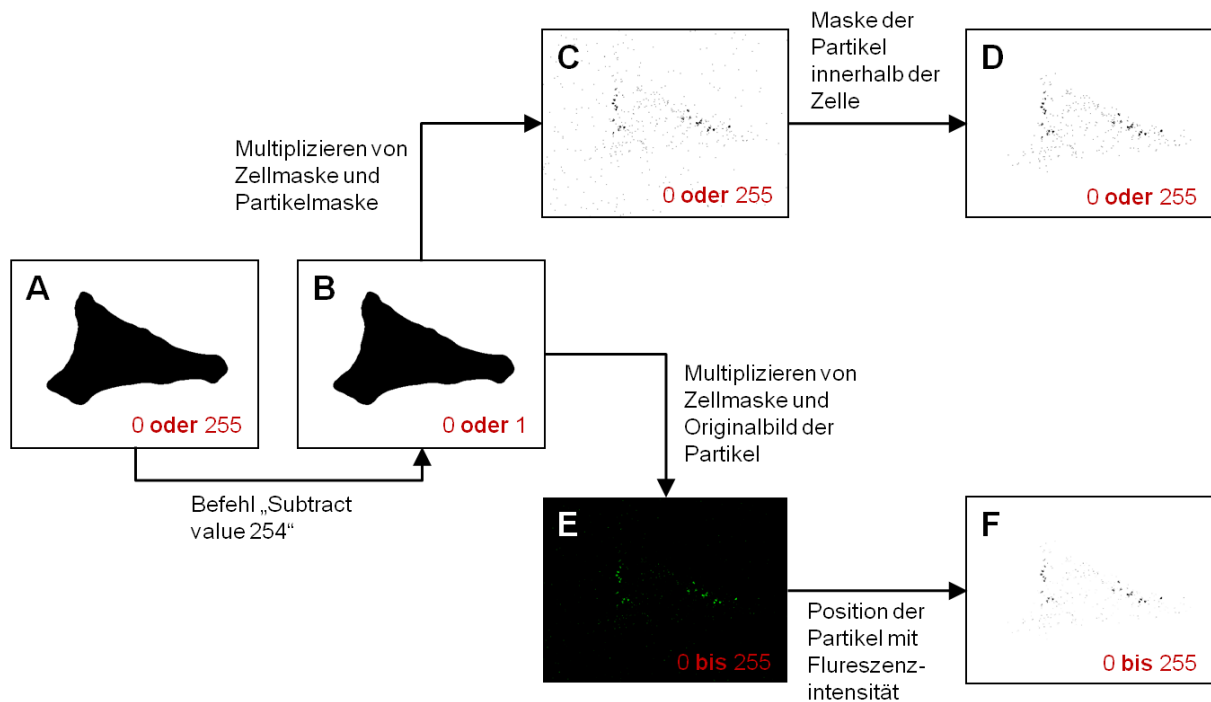


Abbildung 20: Verrechnen der Zellmaske mit der Partikelmaske und dem Originalbild der Partikel:
A: Zellmaske mit den Grauwerten 0 (weiß) oder 255 (schwarz);
B: Zellmaske mit den Grauwerten 0 (weiß) oder 1 (schwarz);
C: Partikelmaske mit den Grauwerten 0 (weiß) oder 255 (schwarz);
D: Maske der Partikel innerhalb der Zelle beziehungsweise innerhalb der Zellmaske mit den Werten 0 (weiß) oder 255 (schwarz);
E: Originalbild der Partikel mit Grauwerten zwischen 0 und 255;
F: generiertes Bild, das Partikelposition und die durchschnittlichen Grauwerte im Bereich zwischen 0 und 255 wiedergibt.

Die Partikelmaske (Abbildung 20 C) und die aus der Verrechnung mit der Zellmaske entstandene Maske (Abbildung 20 D) ist in Bezug auf die größeren Objekte, die auf Partikel hinweisen, identisch. Das Generieren dieser Maske, die nur die Partikel innerhalb der Zelle wiedergibt, ist allerdings erforderlich, um eventuelle Partikel, die sich außerhalb der Zelle befinden, von weiteren Berechnungen auszuschließen. Partikel außerhalb der Zelle können zum Beispiel dann auftreten, wenn vor den CLSM-Aufnahmen ungenügend gespült wird oder während der Aufnahmen Zellen sterben und ihren Inhalt ausschütten. Um Partikel, die sich innerhalb der Zelle befinden, quantifizieren zu können, müssen weitere Befehle in das Macro eingebaut werden. Das Zählen der Partikel erfolgt anhand der Maske, die nur die Partikel innerhalb der Zelle wiedergibt (Abbildung 20 D). Dazu wird der „Particle Analyzer“ von

Image J verwendet (siehe Abbildung 21 B), der sich nur auf Masken anwenden lässt, also keine Bilder analysieren kann, deren Grauwerte von Null (weiß) oder 255 (schwarz) verschieden sind. Man erhält somit also nur die Partikelanzahl. Die Informationen über Partikelfläche sowie die relative Fluoreszenz-Intensität (äquivalent zu durchschnittlichem Grauwert) der Partikel erhält man durch die Analyse des Bildes, das die Partikel innerhalb der Zelle mit ihren dazugehörigen Original-Grauwerten enthält (Abbildung 20 F). Das Bindeglied zwischen beiden Analysen stellt der Befehl „Set Measurements“ (siehe Abbildung 21 A) dar, in welchem über das Feld „Redirect to“ eine Verbindung zwischen den zu analysierenden Bildern erfolgt. Man erhält also eine Analyse der gezählten Partikel („Particle Analyzer“) hinsichtlich ihrer Fläche und relativen Fluoreszenz-Intensität („Set Measurements“).

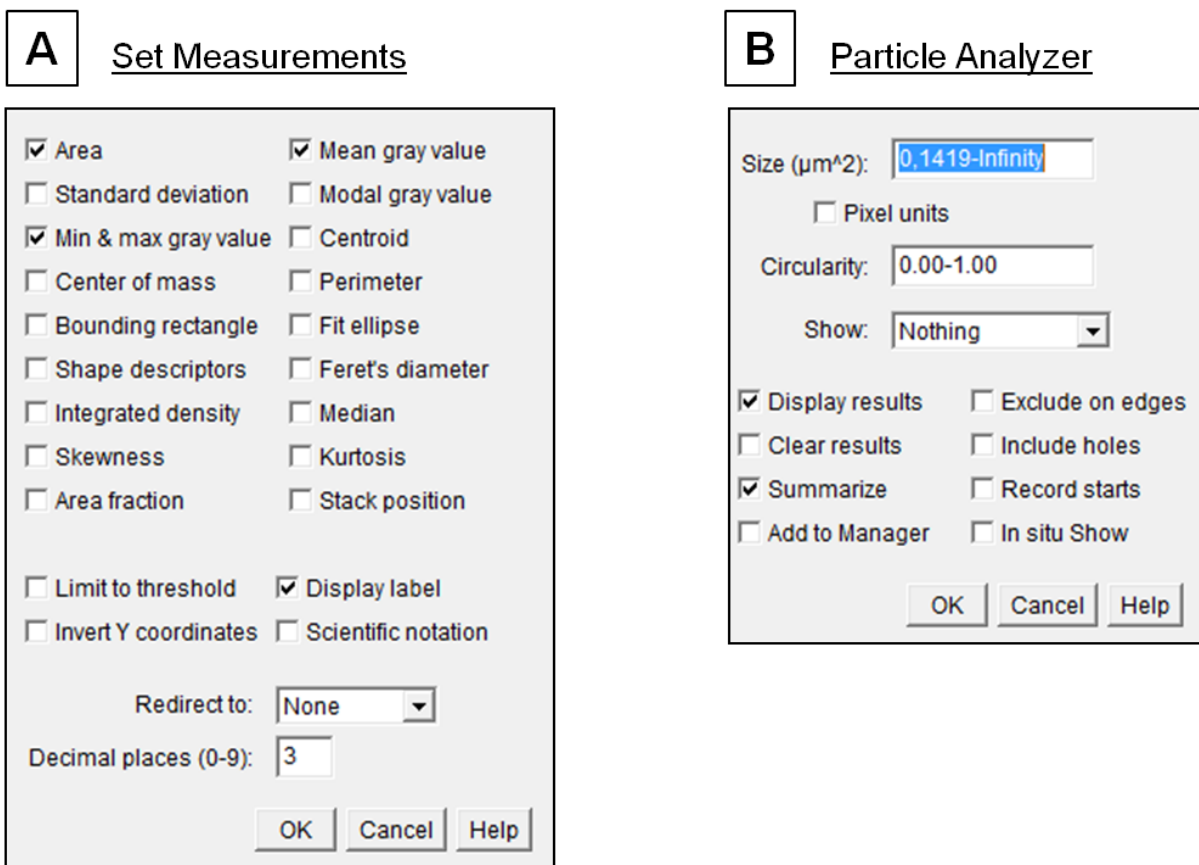


Abbildung 21: Ansicht der Fenster für „Set Measurements“ und „Particle Analyzer“:

A: Fenster „Set Measurements“ - hier werden die Felder für Fläche (Area), minimaler und maximaler Grauwert (Min & max gray value) sowie durchschnittlicher Grauwert (Mean gray value) als zu vermessende Parameter ausgewählt;

B: Fenster „Particle Analyzer“ – Festlegen der Einstellungen für Objekt-Zirkularität und die Mindestfläche, die ein Objekt aufweisen muss, um erfasst zu werden.

Die Einstellungen unter „Set Measurements“ müssen vor dem Anwenden des „Particle Analyzers“ erfolgen, da hier nur eingestellt werden kann, ob Resultate der Messung angezeigt werden sollen oder nicht. Im Feld „Size“ des „Particle Analyzers“ wird die Mindestgröße festgelegt, die ein Objekt aufweisen muss, um erfasst zu werden. Versuche am Modellstack (siehe Abbildung 22) haben gezeigt, dass eine Mindestfläche von $0,1419 \mu\text{m}^2$ einen guten Kompromiss darstellt, um alle Objekte zu erfassen, die man auch rein optisch erfassen würde (Vergleich Abbildung 22 A und D). Diese Größe erhält man, indem man den 2,5-fachen Durchmesser d der Partikel (entspricht 425 nm) in die Formel aus Gleichung 4 einsetzt, welche die Berechnung der Fläche eines Kreises wiedergibt:

$$A = \left(\frac{d}{2}\right)^2 \cdot \pi \quad (4)$$

Die Analyse des Modellstacks sowie aller weiteren z-Stacks erfolgte mit dieser Einstellung für die Mindestfläche. Das heißt, jedes Objekt, das $0,1419 \mu\text{m}^2$ und größer ist, wird erfasst und hinsichtlich der festgelegten Parameter analysiert. An der Zirkularität wurde nichts verändert, da auch nicht runde Objekte (zum Beispiel Zusammenlagerungen von Partikeln) erfasst werden sollen.

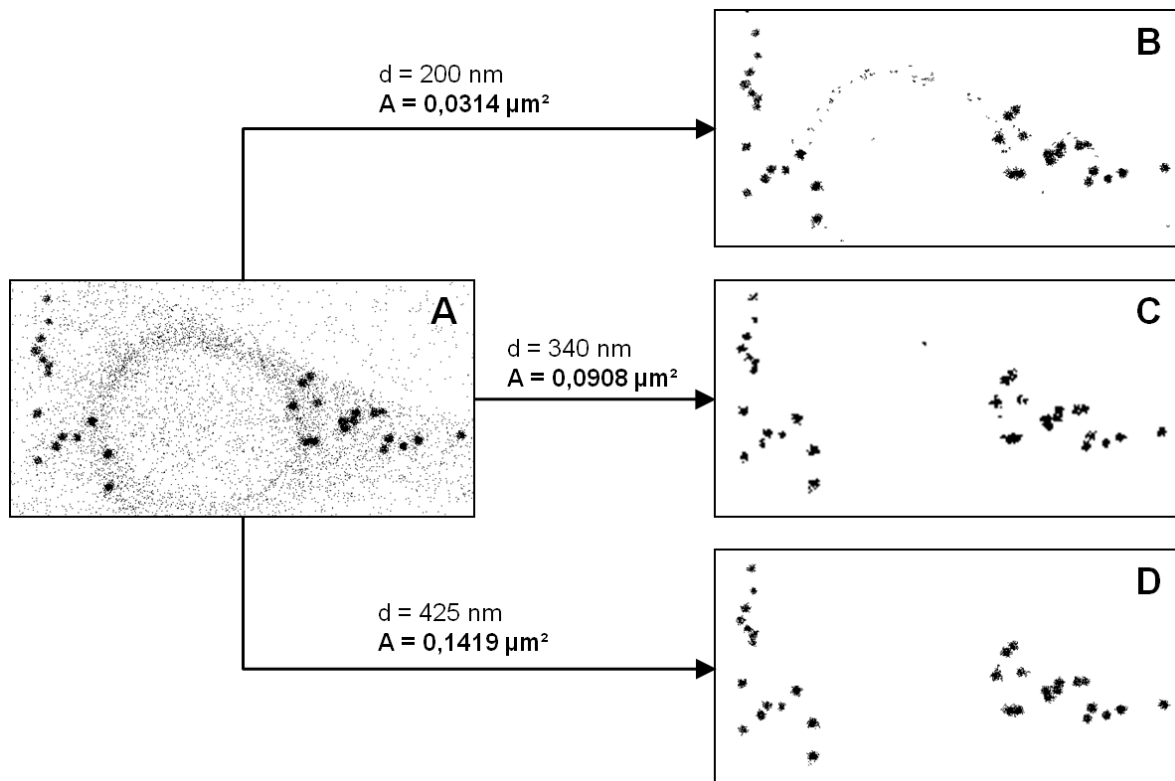


Abbildung 22: Einsetzen von verschiedenen Mindestgrößen im „Particle Analyzer“ und daraus resultierende Darstellung der erfassten Objekte:
A: Partikelmaske – aus dem Originalbild der CLSM-Aufnahme erstellt – optische Erfassung der als Partikel gewerteten Objekte möglich;
B: Darstellung der erfassten Objekte bei einer Mindestfläche von $0,0314 \mu\text{m}^2$;
C: Darstellung der erfassten Objekte bei einer Mindestfläche von $0,0908 \mu\text{m}^2$;
D: Darstellung der erfassten Objekte bei einer Mindestfläche von $0,1419 \mu\text{m}^2$.

Wie schon in Abbildung 22 dargestellt ist, werden die durch den „Particle Analyzer“ erfassten Objekte als Masken dargestellt. Zusätzlich wird ein Bild generiert, das den Umriss der erfassten Objekte wiedergibt und gleichzeitig die Nummerierung der Objekte anzeigt (wird in Kapitel 4.3 gezeigt).

Durch das Anwenden der oben genannten Einstellung ist es nun möglich, mit dem Macro die Einzelebenen eines z-Stacks hinsichtlich Partikelanzahl und Partikelfläche sowie der dazugehörigen relativen Fluoreszenz-Intensität zu analysieren.

4.2.4 Öffnen eines z-Stacks

Die separate Analyse jeder Einzelebene mit Hilfe des Macros ist sehr zeitaufwendig. Deshalb wurde ein zusätzlicher Befehl in das Macro eingebaut, der alle Ebenen in einem Bild darstellt, wodurch eine einmalige Anwendung des Macros alle Ebenen gleichzeitig analysiert. Durch das Anwenden des Befehls „Import Image Sequence“ wird dies ermöglicht (siehe Abbildung 23).

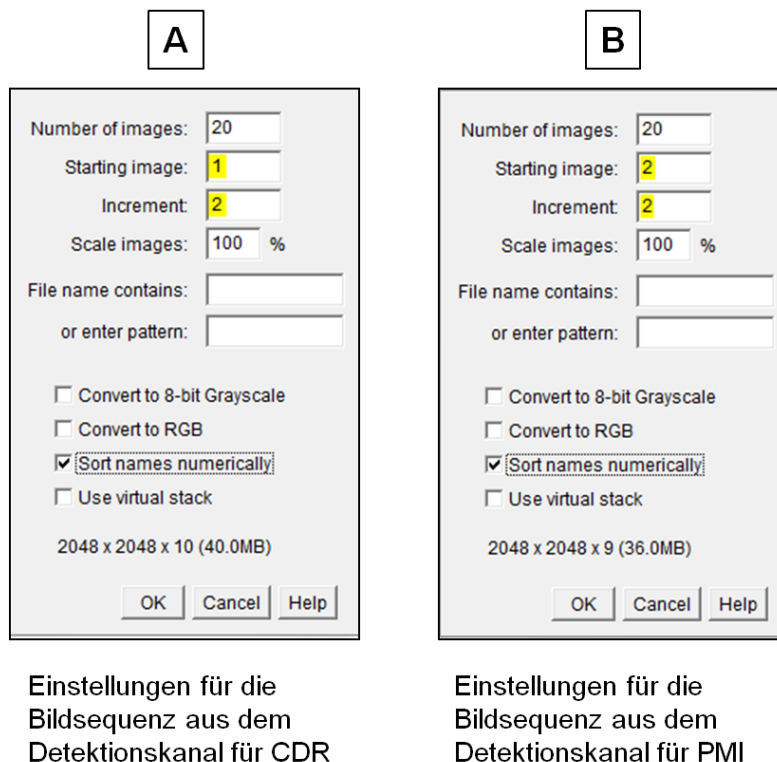


Abbildung 23: Ansicht der Fenster für Sequenz-Einstellungen:
A: Einstellungen für die Bildsequenz aus dem Detektionskanal für CDR;
B: Einstellungen für die Bildsequenz aus dem Detektionskanal für PMI.

Der Befehl kann nur optimal ausgeführt werden, wenn die Bildsequenz aus einem Ordner geöffnet wird, der ausschließlich Bilder des z-Stacks enthält. Es dürfen keine Bilder eines anderen z-Stacks oder anderen Dateien enthalten sein, wie zum Beispiel die Metadaten, die in einem Textfile mit abgespeichert werden. Wäre das der Fall, führt die Angabe der Schrittweite („Increment“ siehe Abbildung 23) dazu, dass auch andere Bilder als die, die man haben möchte, in die Bildsequenz einfließen.

Die Bilder eines z-Stacks werden durch die Software des Mikroskops chronologisch geordnet (siehe Abbildung 24), wodurch sicher gestellt wird, dass sie auch in der richtigen Reihenfolge in der generierten Bildsequenz aufgelistet werden (Vergleich Abbildung 23 „Sort names numerically“). Der Befehl wird separat sowohl für die Bilder aus dem Detektionskanal für CDR und dem Detektionskanal für PMI ausgeführt. Deswegen unterscheidet sich die Auswahl des Startbildes (siehe Abbildung 23 „Starting Image“) bei den Sequenzeinstellungen. Die Schrittweite bleibt allerdings bei beiden gleich.

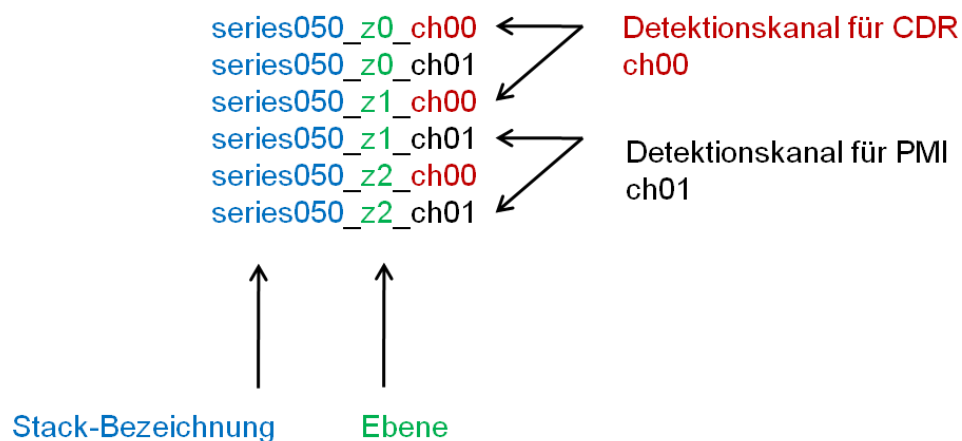


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Beschriftung der Einzelebenen eines z-Stacks analog der Beschriftung, die am CLSM erfolgt.

Das Einfügen der Befehle zum Öffnen einer Bildsequenz ermöglicht jetzt das Anwenden des Macros auf die Einzelbilder eines z-Stacks. Dabei wird jeweils die Ebene aus dem Detektionskanal für CDR (Zellmembran) mit der dazugehörigen Ebene aus dem Kanal für PMI (Partikel) verrechnet. Die Ergebnisse der Anwendung werden detailliert anhand des Modellstacks in 4.2.5 diskutiert.

4.2.5 Ergebnisse der Anwendung des Macros auf die Einzelbilder des Modellstacks

Als erste Anwendung des Macros untersuchten wir die Verteilung der Partikel in z-Richtung pro Ebene. Durch das Anwählen von „Summarize“ im „Particle Analyzer“ (siehe Abbildung 21 B) erhält man eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller Ebenen und man kann erkennen, wie viele Objekte pro Ebene erfasst wurden. In allen folgenden Formulierungen wird der Begriff „Objekte“ beziehungsweise „ObjektcounTs“ (Objektnummer/ Objektanzahl) anstatt „Partikel“ verwendet, da nicht sicher ist, ob es sich bei den erfassten Objekten um Einzelpartikel oder Partikelaggregate handelt. Tabelle 7 gibt die Zusammenfassung der Ergebnisse des Modellstacks wieder. Neben der Anzahl der erfassten Objekte wird auch die Gesamtfläche aller ObjektcounTs sowie der dazugehörige durchschnittliche Grauwert und die durchschnittliche Fläche eines erfassten Objekts dargestellt.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse aller Ebenen nach Anwenden des Macros auf die Einzel-ebenen des Modellstacks (NaN = Not a Number).

Ebene des Modellstacks	ObjektcounT	Gesamtfläche in μm^2	durchschnittliche Fläche der ObjektcounTs in μm^2	durchschnittlicher Grauwert bezogen auf die Gesamtfläche der ObjektcounTs
Ebene 1	24	10,492	0,437	7,841
Ebene 2	27	9,478	0,351	7,413
Ebene 3	24	4,754	0,198	6,808
Ebene 4	12	3,730	0,311	8,964
Ebene 5	8	2,442	0,305	8,462
Ebene 6	3	0,974	0,325	7,072
Ebene 7	0	0,000	NaN	NaN
Ebene 8	0	0,000	NaN	NaN
Ebene 9	0	0,000	NaN	NaN
Ebene 10	0	0,000	NaN	NaN

Im nachfolgenden Diagramm (Abbildung 25) sind die ObjektcounTs graphisch dargestellt. Man erkennt, dass sich die Partikel vor allem in den ersten Ebenen konzentrieren. Das entspricht der Unterseite der Zelle, mit der sie am Ibidi adhärirt ist.

Neben der Zusammenfassung werden auch die Einzelergebnisse aus den verschiedenen Ebenen dokumentiert. Abbildung 26 gibt einen Auszug des Resultatefensters wieder. In *Image J* ist es nicht möglich, für jede Ebene ein separates Resultatefenster zu erzeugen, wenn eine Bildsequenz aus Ebenen analysiert wird.

Stellvertretend für alle Ebenen des Modellstacks werden die Ergebnisse der Ebenen 1, 3 und 6 als Diagramme dargestellt (siehe Abbildung 28-30). Zusätzlich sind die resultierenden Masken der erfassten Objekte nach Anwenden des „Particle Analyzers“ gezeigt (siehe Abbildung 27).

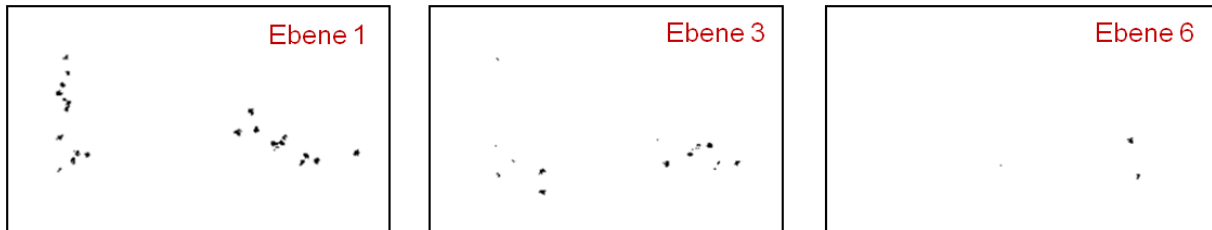


Abbildung 27: Masken der erfassten Objekte aus den Ebenen 1, 3 und 6 des Modellstacks nach der Analyse durch den „Particle Analyzer“

Man erkennt in Abbildung 27, dass der in 4.2.3 erwähnte Kompromiss in Bezug auf die Mindestfläche, die ein erfasstes Objekt haben muss, durchaus sinnvoll ist. In den repräsentativen Ebenen erscheinen keine Artefakte von Hintergrundrauschen oder ähnlichem.

In den graphischen Darstellungen (Vergleich Abbildung 28-30) wird sowohl der ermittelte durchschnittliche Grauwert (entspricht der relativen Fluoreszenz-Intensität) als auch die Fläche des erfassten Objekts gegen die Objektnummer (Objektcount) aufgetragen. Jedoch kann kein direkter Vergleich der Ebenen miteinander erfolgen, da zum Beispiel Objektcount 1 der Ebene 1 nicht dem Objektcount 1 einer anderen Ebene entspricht. Aus diesem Grund kann man nur Aussagen über jede Ebene an sich treffen.

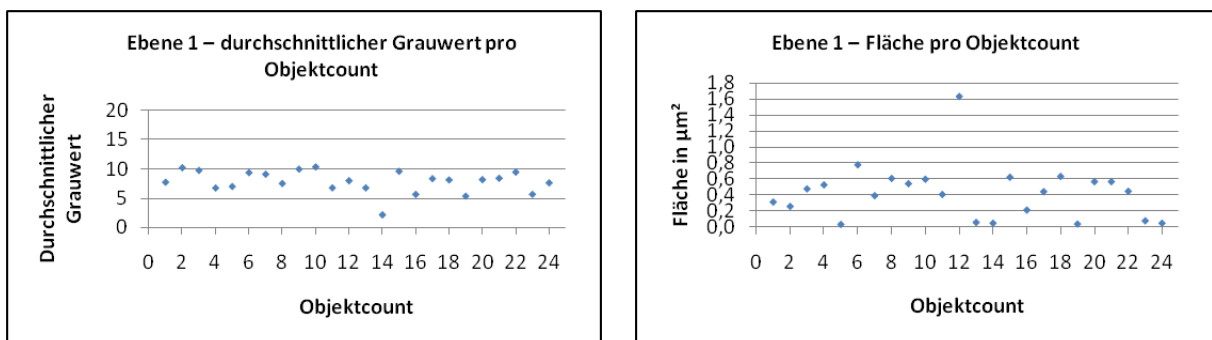


Abbildung 28: Graphische Darstellung des ermittelten durchschnittlichen Grauwerts und der Fläche pro erfasstem Objekt der Ebene 1.

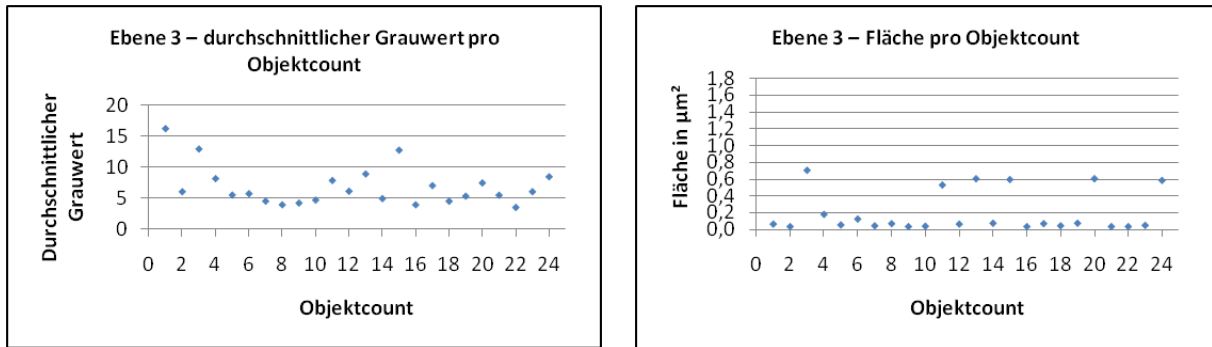


Abbildung 29: Graphische Darstellung des ermittelten durchschnittlichen Grauwerts und der Fläche pro erfasstem Objekt der Ebene 3.

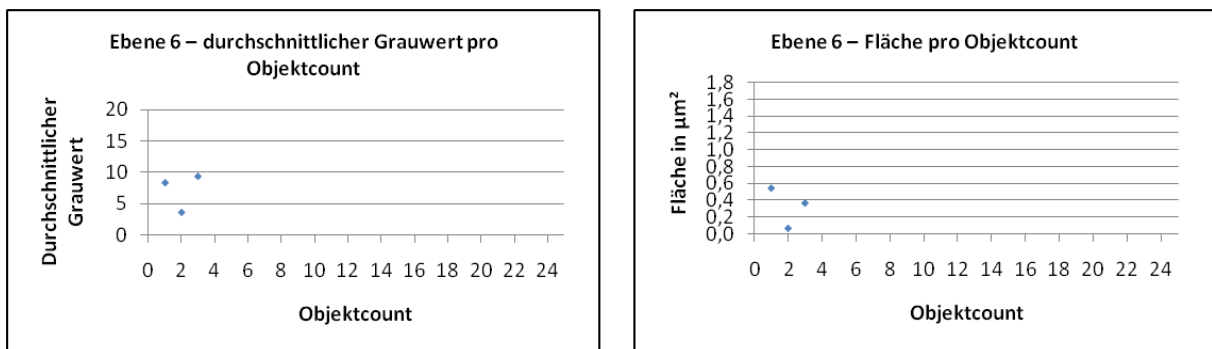


Abbildung 30: Graphische Darstellung des ermittelten durchschnittlichen Grauwerts und der Fläche pro erfasstem Objekt der Ebene 6.

Bei genauerer Betrachtung der resultierenden Masken, die die erfassten Objekte zeigen, wird deutlich, dass viele Objekte doppelt erfasst werden. Ein Vergleich dieser Masken aus den Ebenen 4 (Abbildung 31 A), 5 (Abbildung 31 B) und 6 (Abbildung 31 C) zeigt diese Mehrfachzählung.

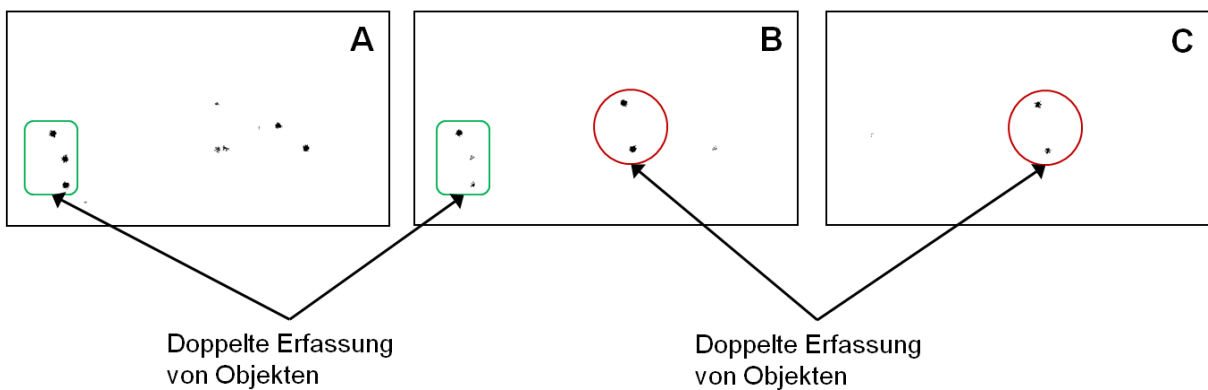


Abbildung 31: Darstellung der resultierenden Masken der erfassten Objekte von Ebene 4 (A), 5 (B) und 6 (C) des Modellstacks: Grüne Vierecke und rote Kreise markieren die Mehrfachzählung von Objekten.

Aufgrund der mehrfachen Zählung von Objekten werden natürlich mehr erfasst als eigentlich vorhanden sind. Addiert man alle Objektcounts der Ebenen, so enthält die Zelle des Modellstacks 98 Objekte (Vergleich Objektcount aus Tabelle 7). Im Vergleich zur Analyse einer z-Projektion wie sie in Kapitel 4.2.6 vorgestellt wird, ist diese Objektanzahl viermal so hoch wie die aus der z-Projektion erfasste Anzahl an Objekten. Aufgrund der Mehrfachzählungen wird also eine deutlich höhere Anzahl ermittelt als tatsächlich vorhanden ist.

Aus diesem Grund sowie den oben genannten Gründen zur Vergleichbarkeit der Ebenen und der aufwendigen Arbeit die Objektcounts der Ebenen aus dem Resultatefenster zu extrahieren, wurde entschieden, das Macro weiter zu entwickeln und auf eine z-Projektion anzuwenden.

4.2.6 Weiterentwicklung des Macros zur Anwendung auf eine z-Projektion

Eine z-Projektion lässt sich aus einer Bildsequenz erstellen, wenn der Befehl „Z Project...“ ausgeführt wird (siehe Abbildung 32). Neben den Angaben zu Start- und Endbild der für die z-Projektion gewählten Bildsequenz kann auch ausgewählt werden, welche Art der z-Projektion durchgeführt werden soll. Je nach Projektionsart werden die Pixel der Ebenen unterschiedlich miteinander verrechnet.

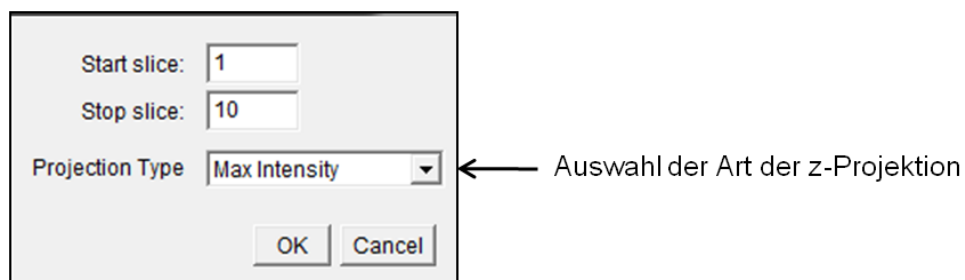


Abbildung 32: Ansicht des Fensters für die Einstellungen der z-Projektion.

Für die z-Projektionen der analysierten z-Stacks wurden alle 10 Ebenen des jeweiligen Stacks verwendet. Das Erstellen der z-Projektion erfolgt für die Bilder der Zellmembran und der Partikel separat. Die Projektionsart „Max Intensity“ erwies sich als beste Art, um die z-Projektion darzustellen. Die Vorteile dieser Projektionsart gegenüber den anderen werden in Kapitel 4.3.1 erläutert. „Max Intensity“ bedeutet, dass die Pixel, die in den unterschiedlichen Ebenen an der gleichen Position übereinander liegen, bezüglich ihres

Grauwertes analysiert werden. Der Pixel mit dem höchsten Grauwert wird anschließend in der z-Projektion abgebildet. Ein Vergleich der ersten Ebene des Modellstacks und der Darstellung aller Ebenen als z-Projektion vom Typ „Max Intensity“ macht die Unterschiede deutlich, die nach Anwenden des Macros entstehen (siehe Abbildung 33). Besonders auffällig sind diese Unterschiede bei der Darstellung der Partikel-Originalbilder als z-Projektion (Vergleich Abbildung 33 D und I) sowie die daraus resultierende Maske der erfassten Objekte (Vergleich Abbildung 33 E und J).

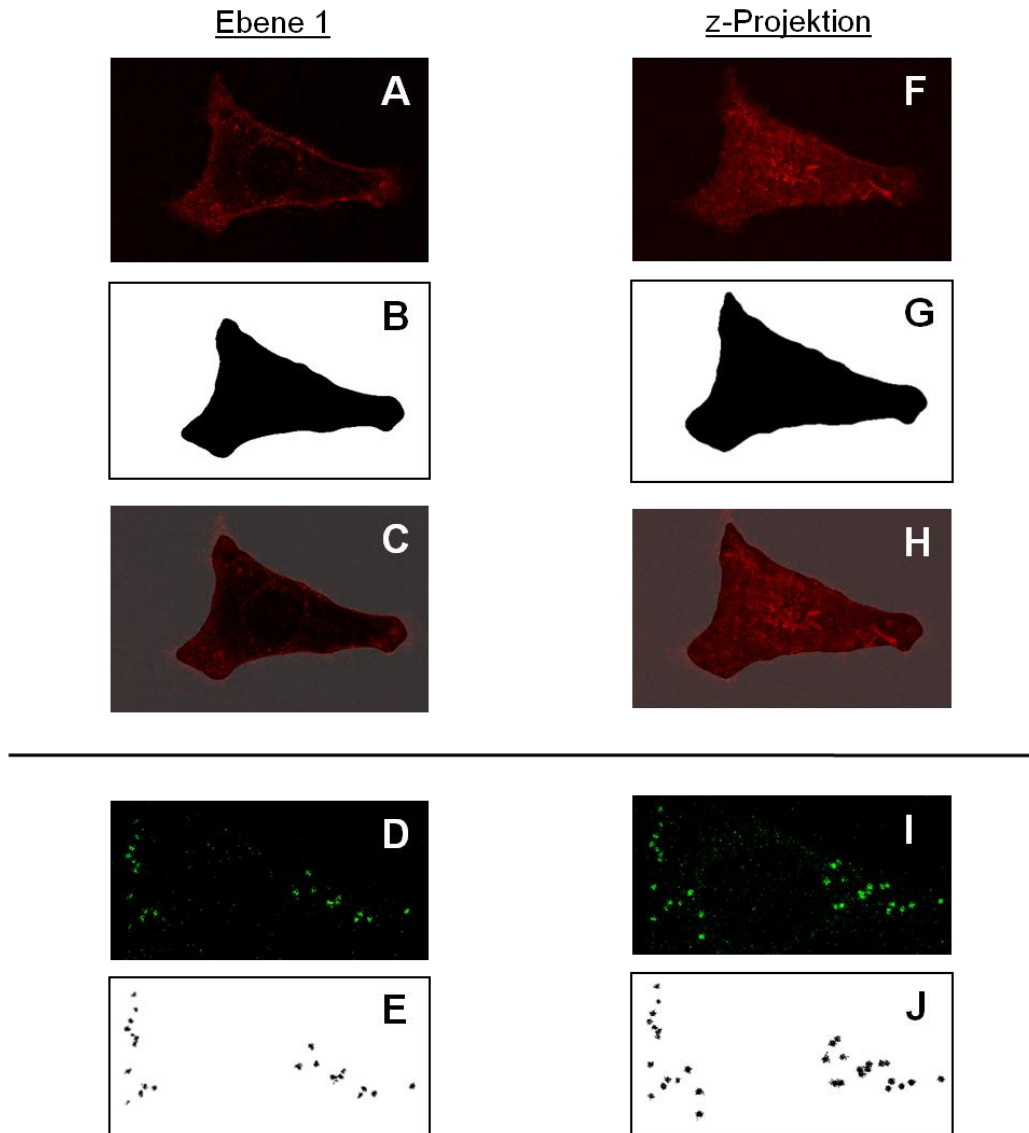


Abbildung 33: Vergleich der ersten Ebene des Modellstacks mit der z-Projektion:
A,F: Originalbilder der Zellmembran;
B,G: Zellmaske;
C,H: Überlagerung aus A und B beziehungsweise aus F und G;
D,I: Originalbilder der Partikel;
E,J: resultierende Masken der erfassten Objekte nach Anwenden des Macros.

Die Zellmaske (Vergleich Abbildung 33 B und G) ist nahezu identisch und man erkennt in der Überlagerung (Vergleich Abbildung 33 C und H) mit den Originalbildern der Zellmembran (Vergleich Abbildung 33 A und F), dass die Maske auch sehr gut die Zellform als z-Projektion wiedergibt.

Die Unterschiede hinsichtlich der Auswahl der Projektionsart und die damit verbundene Auswirkung auf die Ergebnisse nach dem Anwenden des Macros werden ausführlich in 4.3.1 dargestellt.

4.3 Anwenden des Macros auf den Modellstack als z-Projektion

4.3.1 Vergleich der verschiedenen Arten der z-Projektion

Der Vergleich der Projektionsarten dient der Ermittlung der besten Übereinstimmung von Zellform und deren Maske. Die unterschiedlichen Projektionsarten „Max Intensity“, „Average Intensity“ und „Sum Slices“ sind auf den Modellstack angewendet worden. Der Unterschied dieser Arten liegt in der Verrechnung der Pixel. In Abschnitt 4.2.6 wurde bereits die Verrechnung der Pixel der Projektionsart „Max Intensity“ erläutert. Grundsätzlich erfolgt die Verrechnung bei den anderen Arten ähnlich. Allerdings wird bei „Average Intensity“ nicht der Pixel mit dem höchsten Grauwert in der z-Projektion dargestellt, sondern es werden die Grauwerte aller Pixel gemittelt, die in den verschiedenen Ebenen an gleicher Position übereinander liegen. Dieser Mittelwert wird anschließend in der z-Projektion abgebildet. Die Verrechnung bei „Sum Slices“ beruht auf der Addition aller Pixel-Intensitäten und das Abbilden dieser Summe in der z-Projektion.

Entscheidend für die Auswahl einer Projektionsart, die auf alle weiteren Stacks angewendet werden soll, ist die gute Übereinstimmung der Zellmaske mit den Originalbildern. Dadurch wird gewährleistet, dass auch wirklich nur die Objekte erfasst werden, die in der Zelle und an der Zellmembran vorhanden sind. Passungenaue beziehungsweise zu kleine Masken können dazu führen, dass zu wenige Objekte gezählt werden. Zu große Masken hingegen stellen ein Risiko dar auch Objekte mit zu zählen, die außerhalb der Zelle vorliegen. Vergleicht man die verschiedenen Projektionsarten hinsichtlich Zellmasken (Vergleich Abbildung 34 D-F) und deren Overlays (Vergleich Abbildung 34 G-I) mit den z-Projektionen (Vergleich Abbildung 34 D-C) erkennt man, dass alle Masken die Zellform recht gut wiedergeben. Allerdings erscheint die Maske aus der z-Projektion „Sum Slices“ etwas zu groß. Bei der Anwendung des Macros auf andere z-Stacks wurde außerdem festgestellt,

dass bei dieser Projektionsart oftmals die Form der Zellmaske sehr wenig mit der Zellform übereinstimmt. Dies trat verstärkt auch bei „Average Intensity“ auf. Bei der Projektionsart „Max Intensity“ wurde die Passungsgenauigkeit nur sehr selten beobachtet.

Die Anwendung des Macros auf die Projektionsart „Sum Slices“ ist im Vergleich zu den anderen Projektionsarten zeitaufwendiger, da die benötigte Bearbeitungszeit beziehungsweise Rechenzeit dreifach höher ist, dabei aber kein besseres Ergebnis geliefert wird. Weiterhin muss ein zusätzlicher Befehl in den Ablauf des Macros eingebaut werden. Dies liegt darin begründet, dass nach dem Erstellen der z-Projektion ein 32-bit Bild entsteht, welches wieder in ein 8-bit Bild umgewandelt werden muss, um eine korrekte Verrechnung mit den anderen Bildern und Masken zu gewährleisten.

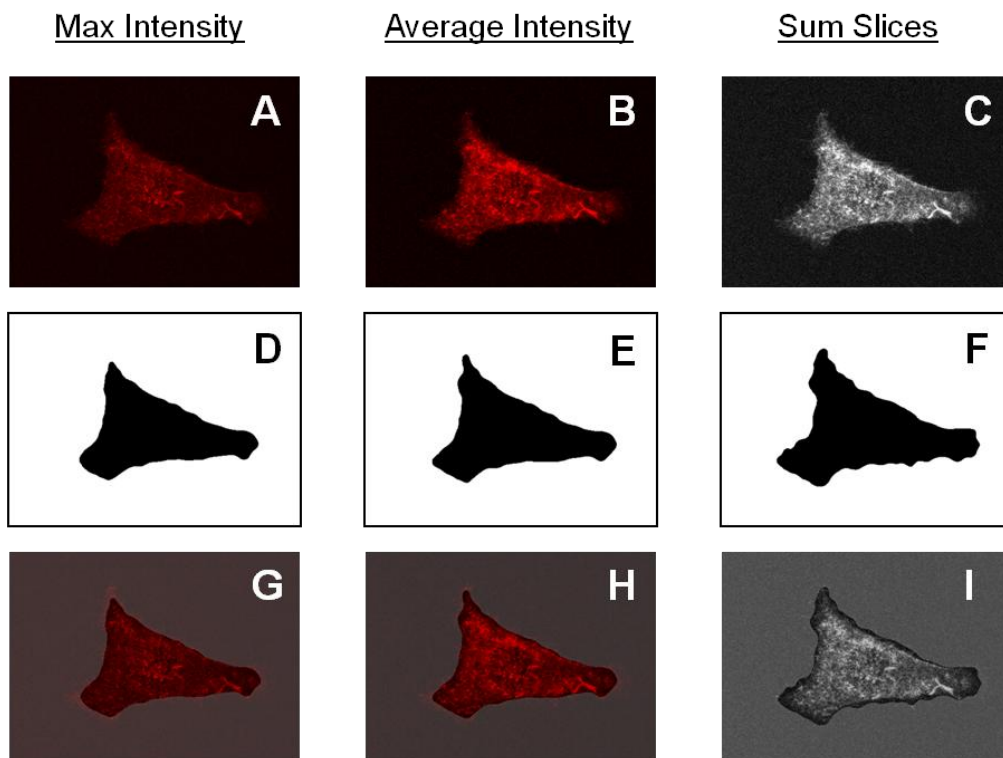
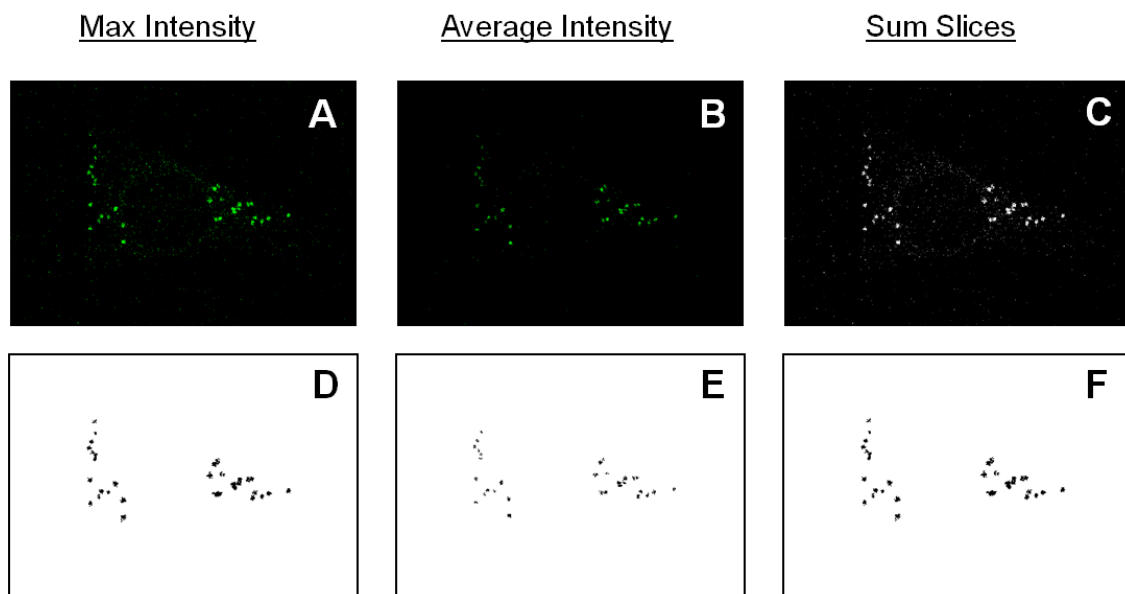


Abbildung 34: Vergleich der Zellmasken nach Anwenden des Macros auf die z-Projektionen „Max Intensity“, „Average Intensity“ und „Sum Slices“:
A-C: z-Projektion der Ebenen des Modellstacks für die Zellmembran;
D-F: Zellmaske nach Anwenden des Macros auf die jeweilige Projektionsart;
G-I: Overlay der Zellmaske mit der jeweiligen z-Projektion.

Vergleicht man die z-Projektionen der Partikelbilder (Vergleich Abbildung 35 A-C) und die resultierenden Masken für die erfassten Objekte (Vergleich Abbildung 35 D-F) nach der Anwendung des Macros, wird ersichtlich, dass die Anzahl der erfassten Objekte bei den Projektionsarten „Max Intensity“ und „Sum Slices“ identisch ist. Bestätigt wird dies durch die Ergebnisse aus Tabelle 8, in welcher man außerdem erkennen kann, dass die Fläche der

erfassten Objekte ebenfalls identisch ist. Der einzige Unterschied besteht in den Angaben zur relativen Fluoreszenz-Intensität (durchschnittlicher Grauwert), was in der unterschiedlichen Verrechnung der übereinanderliegenden Pixel begründet ist, die beim Erstellen der z-Projektion erfolgt.

Der Vergleich der resultierenden Masken für die erfassten Objekte aus den Projektionen „Max Intensity“ und „Average Intensity“ (Vergleich Abbildung 35 D und E) zeigt, dass die Fläche der erfassten Objekte aus „Average Intensity“ in der Regel kleiner ist als bei „Max Intensity“ (siehe auch Tabelle 8). Die gleiche Tendenz ist auch bei dem Vergleich der relativen Fluoreszenz-Intensitäten zu verzeichnen. Auch das ist bedingt durch die unterschiedliche Verrechnung der Pixel zum Erstellen der jeweiligen z-Projektion.



**Abbildung 35: Vergleich der resultierenden Masken der erfassten Objekte nach Anwenden des Macros auf die verschiedenen Arten der z-Projektion des Modellstacks:
A-C: z-Projektionen der Ebenen für die Partikel;
D-F: resultierende Masken der erfassten Objekte.**

Neben den kleineren Werten für Fläche und Intensität werden weitere Unterschiede der Projektionsarten „Max Intensity“ und „Average Intensity“ deutlich, wenn man sich die Darstellung der Umrisse der erfassten Objekte genauer ansieht (siehe Abbildung 36). In beiden Darstellungen ist zu erkennen, dass Mehrfachereignisse vorliegen. Das heißt, ein Objektcount beinhaltet nach optischem Ermessen mehrere Objekte. Diese Mehrfachereignisse sind in Tabelle 8 gelb markiert. Durch Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Average Intensity“ werden mehr Objekte erfasst als bei den anderen Projektionsarten. Allerdings handelt es sich hierbei nicht um andere Objekte. Aufgrund der kleineren Fläche werden manche Objekte, die bei der Anwendung des Macros auf die

Projektion „Max Intensity“ als Mehrfachereignis erscheinen (Vergleich Abbildung 36 A), getrennt dargestellt (Vergleich Abbildung 36 B). Daraus resultiert die angeblich größere Anzahl an erfassten Objekten. Die bessere Auftrennung der Einzelobjekte stellt im Hinblick auf die anderen Projektionsarten einen Vorteil dar, der jedoch durch den großen Nachteil zunichte gemacht wird, dass an anderer Stelle keine Partikel erfasst werden (Vergleich Abbildung 36 A und B).

Das Problem der Erfassung von Mehrfachereignissen wurde versucht zu lösen, indem das Macro durch einen weiteren Befehl erweitert wurde. Nach dem Generieren der Maske für die Partikel innerhalb der Zelle wird ein automatisches Separieren zusammenhängender Objekte durchgeführt („Watershed“)

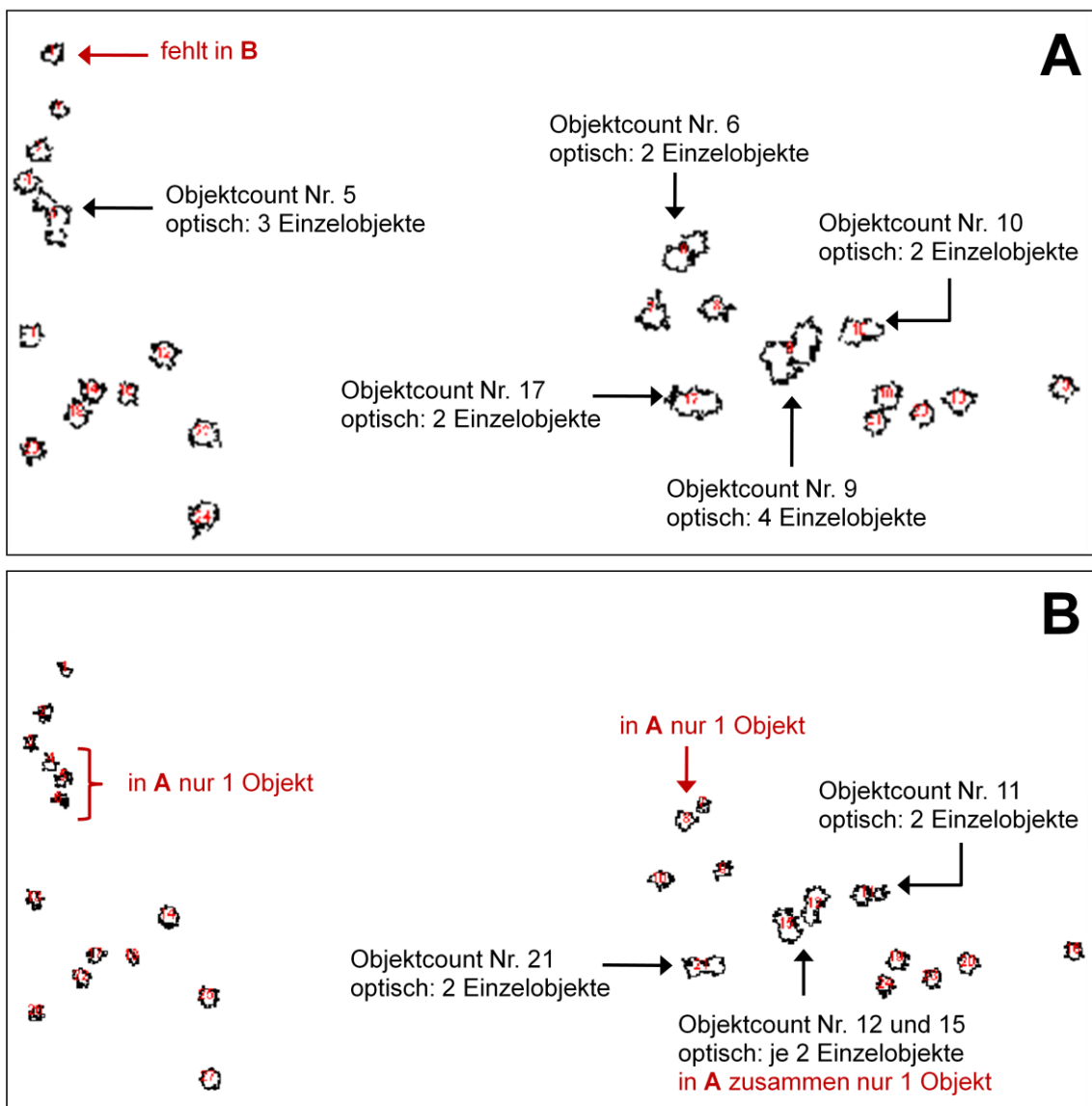


Abbildung 36: Vergleich der Umrisse der erfassten Objekte – die dazugehörige Objektzahl ist innerhalb des Umrisses wiedergegeben:
A: Darstellung der Umrisse der erfassten Objekte aus „Max Intensity“;
B: Darstellung der Umrisse der erfassten Objekte aus „Average Intensity“.

Das Macro, das das automatische Separieren („Watershed“-Befehl) beinhaltet, wurde an der z-Projektion „Max Intensity“ exemplarisch angewendet. Anhand von Ausschnitten der Masken für die Partikel innerhalb der Zelle (Vergleich Abbildung 37 A und D) und den nach Anwenden des Macros resultierenden Masken (Vergleich Abbildung 37 B und E) und Umrissen (Vergleich Abbildung 37 C und F) der erfassten Objekte werden die Unterschiede bei der Objekterfassung verdeutlicht.

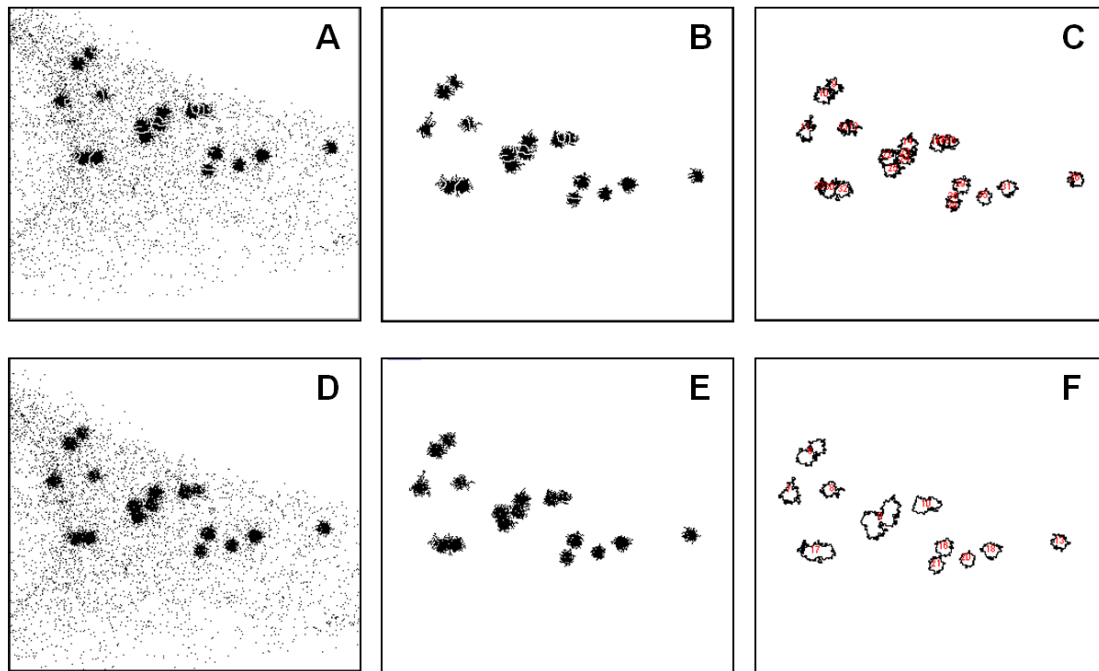


Abbildung 37: Vergleich der Ergebnisse durch die Anwendung des Macros mit „Watershed“ (A-C) und ohne diesen Befehl (D-F):
A und D: Maske für die Partikel innerhalb der Zelle;
B und E: resultierende Maske der erfassten Objekte nach Anwenden des entsprechenden Macros;
C und F: resultierende Umrisse der erfassten Objekte.

Durch den „Watershed“-Befehl werden feine weiße Linien innerhalb der Masken zur Abgrenzung der Einzelobjekte gezogen (Vergleich Abbildung 37 A und B). Im Vergleich zur Darstellung, die sich ergibt, wenn man das Macro ohne „Watershed“ anwendet, wird deutlich, dass weitaus mehr Objekte erfasst werden als man optisch ermitteln würde. Das ist besonders an den Darstellungen der resultierenden Umrisse zu erkennen (Vergleich Abbildung 37 C und F). Zur Verifikation des Macros wurde das automatische Separieren auch auf andere z-Stacks angewendet. Es wurden die gleichen Tendenzen wie bei der Anwendung auf den Modellstack festgestellt. Das heißt, es werden deutlich mehr Objekte erfasst, als wirklich vorhanden sind. Die Idee, mithilfe des „Watershed“-Befehls eine Trennung von Mehrfachereignissen herbei zu führen, wurde deshalb wieder verworfen.

Eine andere Vorgehensweise zur Objektrennung bietet eine mathematische Lösung. Dazu wird die Gesamtfläche der erfassten Objekte durch die mittlere Fläche eines Einzelobjekts geteilt. Dabei muss vorher diese mittlere Fläche ohne die Fläche der Mehrfachereignisse ermittelt werden. Gesamtfläche und Einzelflächen der erfassten Objekte werden als Resultate in Excel-Dateien abgespeichert. Das Herausfiltern der Flächen von Mehrfachereignissen und Berechnen des Mittelwerts für eine Einzelfläche erfolgt nicht automatisch und muss für jeden z-Stack manuell durchgeführt werden.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse nach Anwenden des Macros auf die verschiedenen Projektionsarten: Dargestellt sind die Objektcounts mit der dazugehörigen Fläche und der relativen Fluoreszenz-Intensität (rel. F-Int.), die dem durchschnittlichen Grauwert entspricht. Die gelben Markierungen geben die Mehrfachereignisse wieder.

Objektcount	z-Projektion Maximum Intensity		z-Projektion Average Intensity		z-Projektion Sum Slices	
	Fläche	rel. F-Int.	Fläche	rel. F-Int.	Fläche	rel. F-Int.
1	0,459	8,739	0,145	1,828	0,459	20,837
2	0,345	10,203	0,250	1,760	0,345	25,435
3	0,619	9,911	0,185	1,568	0,619	24,476
4	0,619	8,976	0,225	1,644	0,619	21,266
5	1,533	9,941	0,240	1,604	1,533	23,577
6	1,643	10,863	0,160	1,750	1,643	29,301
7	1,054	9,711	0,220	1,545	1,054	25,517
8	0,704	9,773	0,454	2,593	0,704	23,085
9	3,331	11,132	0,265	1,642	3,331	30,408
10	1,328	12,071	0,424	1,988	1,328	27,508
11	0,684	9,241	0,644	1,829	0,684	24,212
12	0,894	13,469	0,914	1,820	0,894	37,514
13	0,724	10,503	0,295	1,695	0,724	26,421
14	0,654	9,130	0,504	2,396	0,654	22,557
15	0,519	8,904	0,909	1,984	0,519	20,740
16	0,869	10,333	0,355	1,620	0,869	28,868
17	1,863	11,761	0,270	1,537	1,863	32,024
18	0,879	13,273	0,16	1,469	0,879	37,307
19	0,734	9,265	0,449	1,911	0,734	24,156
20	0,674	9,889	0,514	2,350	0,674	27,437
21	0,704	9,993	0,954	2,251	0,704	26,489
22	0,959	10,536	0,335	1,672	0,959	29,073
23	0,549	9,391	0,370	1,662	0,549	23,918
24	0,974	13,056	0,370	1,662	0,974	36,749
25			0,464	2,054		
26			0,215	1,698		
27			0,554	2,342		

Nachfolgend (siehe Tabelle 9) sind alle Ergebnisse für die Anzahl der erfassten Objekte aufgelistet, die mit den unterschiedlichen Methoden und einer jeweiligen manuellen „Nachzählung“ erzielt wurden.

Tabelle 9: Vergleich der Anzahl der mit Hilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte innerhalb des Modellstacks.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max. Int.	z-Projektion Max Int. watershed	z-Projektion Average Int.	manuelle Erfassung Average Int.	z-Projektion Sum Slices	manuelle Erfassung Sum Slices.
Anzahl der Objekte	24	32	42	27	31	24	32

Die Anwendung der mathematischen Berechnung wurde nur an den Ergebnissen vorgenommen, die durch die Anwendung des Macros (ohne „Watershed“-Befehl) auf die z-Projektion „Max Intensity“ ermittelt wurden. Die berechnete Objektanzahl ergab 32,5. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit dem Ergebnis überein, das erzielt wird, wenn eine manuelle „Nachzählung“ der erfassten Objekte durchgeführt wird (Vergleich Tabelle 9).

Aus bereits erwähnten Gründen im Hinblick auf die Nachteile verschiedener Projektionsarten wurde entschieden, dass auf alle weiteren z-Stacks nur noch die Projektionsart „Max Intensity“ angewendet wird. Die Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf den Modellstack ermittelt wurden, sind im Folgenden graphisch und tabellarisch dargestellt (siehe Abbildung 38 und Tabelle 10). Neben der Darstellung von Objektfläche und relativer Fluoreszenz-Intensität pro erfasstem Objekt wird in den Diagrammen auch die berechnete Objektanzahl pro „Objektcount“ gezeigt (Vergleich Abbildung 38). Daran kann abgelesen werden, wie viele Einzelobjekte tatsächlich in einem erfassten Objekt vorhanden sind. Ermittelt wurde die berechnete Objektanzahl, indem jede Objektfläche durch den Mittelwert der Fläche (ohne Mehrfachereignisse) dividiert wurde. Eine andere Darstellungsmöglichkeit, mit der auf einen Blick erfasst werden kann, wie viele Einzelobjekte in einem Objektcount vorhanden sind, ist die Auftragung der Objektfläche gegen die berechnete Objektanzahl (Vergleich Abbildung 38). Beispielsweise kann man ablesen, dass circa 3-4 Objektcounts vorhanden sind, die aus 2 Einzelobjekten bestehen. Jedoch stimmen diese berechneten Werte nicht eindeutig mit den manuell erfassten Werten überein (Vergleich Tabelle 10 gelbe Markierungen mit Abbildung 36 A). Die berechnete Anzahl an Einzelobjekten ist meist etwas höher als die Anzahl, die optisch erfasst wird, beziehungsweise manuell nachgezählt wurde. Die Bestimmung der Gesamtanzahl durch diese Art der Berechnung (wie oben bereits gezeigt) ist hinsichtlich der tatsächlichen Anzahl an Einzelobjekten, die auch manuell ausgezählt würden, aussagekräftiger.

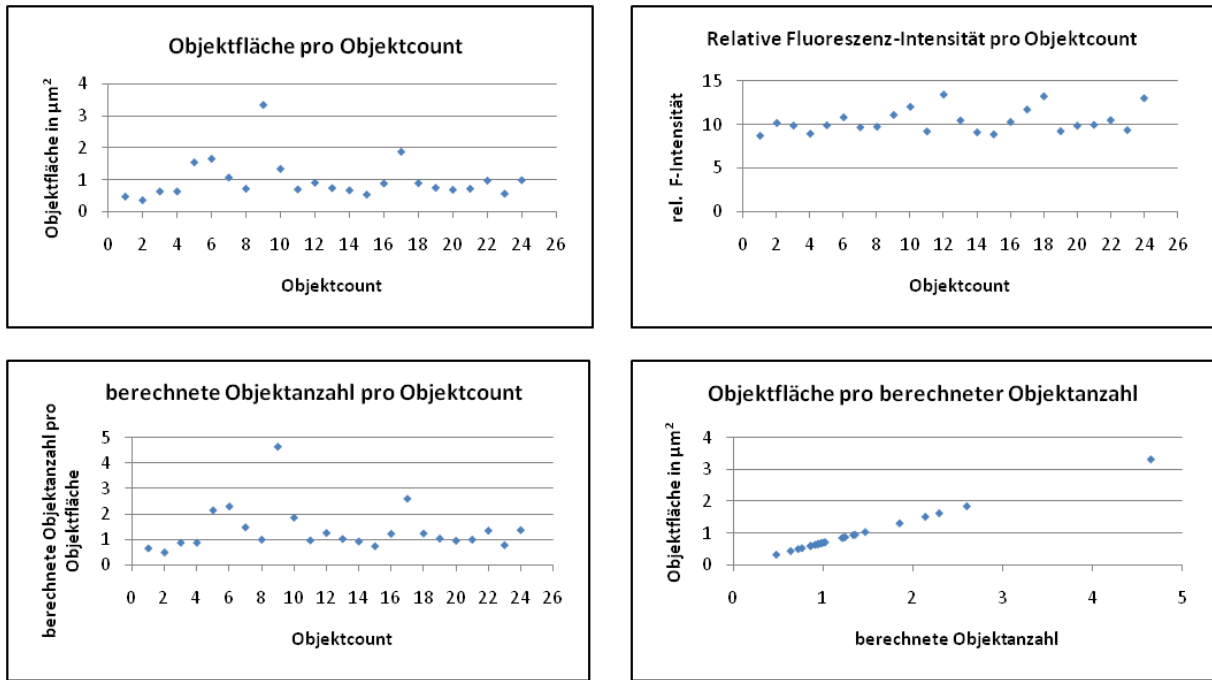


Abbildung 38: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf die Projektionsart „Max Intensity“ des Modellstacks erzielt wurden.

Aus den Diagrammen (Abbildung 38) kann weiterhin abgeleitet werden, dass die Fläche, die ein erfasstes Objekt einnimmt, im Bereich von 0,5 und 1 μm^2 liegt. Die Werte, die darüber liegen, beziehen sich auf die Mehrfachereignisse der Objektcounts Nr. 5, 6, 9, 10 und 17 (Vergleich Tabelle 10). Jedoch impliziert eine größere Fläche nicht automatisch einen größeren Wert hinsichtlich der relativen Fluoreszenz, da dieser Wert dem durchschnittlichen Grauwert bezogen auf die ermittelte Fläche entspricht. Demzufolge kann es dazu kommen, dass ein Objekt mit relativ kleiner Fläche eine höhere relative Fluoreszenz-Intensität aufweist als ein Objekt mit deutlich größerer Fläche (Vergleich Tabelle 10 Objektcount Nr. 9 mit Objektcount Nr. 12). Sind also die durchschnittlichen Grauwerte der Pixel innerhalb einer großen Fläche insgesamt klein, so ist natürlich auch ihr Mittelwert gering, wodurch eine große Fläche eine kleine relative Fluoreszenz-Intensität aufweist. Analog verhält es sich mit einer kleinen Fläche, deren Pixel insgesamt große durchschnittliche Grauwerte aufweisen.

Der oben bereits erwähnte berechnete Mittelwert einer Objektfläche beträgt ohne das Einfließen der Mehrfachereignisse 0,717 μm^2 . Als Mehrfachereignis (Vergleich Tabelle 10 gelbe Markierung) wurden diejenigen Objekte gewertet, die aufgrund ihrer großen Fläche in Abgleich mit der optischen Auswertung der resultierenden Masken und Umriss der erfassten Objekte (Vergleich Abbildung 36 A) auffielen. Hätte man sich nur auf die tabellarischen Werte gestützt, wären mehr Mehrfachereignisse ermittelt worden, da auch Einzelobjekte mitunter große Flächen aufweisen (Vergleich Tabelle 10 Objektcount Nr. 7). Deswegen muss bei der Auswahl der Mehrfachereignisse immer eine optische Kontrolle

anhand der resultierenden Masken beziehungsweise Umrisse der erfassten Objekte erfolgen. Diese Vorgehensweise lässt sich nicht automatisieren und ist mit hohem zeitlichem Aufwand verbunden. Generell ist der Mittelwert einer Einzelfläche recht groß, wenn man ihn mit dem Wert vergleicht, der als Mindestfläche im „Particle Analyzer“ festgelegt wurde. Dieser Wert betrug $0,1419 \mu\text{m}^2$ und basierte auf der Grundlage des 2,5-fachen Durchmessers eines Partikels. Würde man den einfachen Durchmesser eines Partikels Gleichung 4 zugrunde legen, dann betrüge der Wert einer Partikelfläche $0,0227 \mu\text{m}^2$. Der berechnete Mittelwert einer Objektfläche (ohne Mehrfachereignisse) übersteigt um ein Vielfaches den Wert, den ein einzelner Partikel aufweisen würde. Die Vermutung liegt nahe, dass bei den gegebenen Einstellungen für das CLSM keine Einzelpartikel, sondern Partikelaggregate als Fluoreszenzspot detektiert werden. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde ein korrelativer Versuch mittels REM und CLSM durchgeführt, dessen Ergebnisse unter 4.6 beschrieben sind.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte des Modellstacks nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Gelbe Markierungen verweisen auf die erfassten Mehrfachereignisse. Der maximale Grauwert stellt innerhalb der entsprechenden Fläche eines Objekts den höchsten ermittelten Grauwert eines Pixels dar.

Objektcoun	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert
1	0,459	0,64	8,739	1	45
2	0,345	0,48	10,203	1	40
3	0,619	0,86	9,911	1	37
4	0,619	0,86	8,976	1	31
5	1,533	2,14	9,941	1	49
6	1,643	2,29	10,863	1	80
7	1,054	1,47	9,711	1	46
8	0,704	0,98	9,773	1	37
9	3,331	4,65	11,132	1	58
10	1,328	1,85	12,071	1	49
11	0,684	0,95	9,241	1	35
12	0,894	1,25	13,469	1	47
13	0,724	1,01	10,503	1	49
14	0,654	0,91	9,130	1	37
15	0,519	0,72	8,904	1	35
16	0,869	1,21	10,333	1	40
17	1,863	2,60	11,761	1	55
18	0,879	1,23	13,273	1	55
19	0,734	1,02	9,265	1	40
20	0,674	0,94	9,889	1	35
21	0,704	0,98	9,993	1	33
22	0,959	1,34	10,536	1	57
23	0,549	0,77	9,391	1	34
24	0,974	1,36	13,056	1	58

Vergleicht man die Summe der erfassten Objekte, die durch das Anwenden des Macros auf die z-Projektion ermittelt wurde, so ist diese deutlich niedriger als die Summe der Objekte, die durch das Addieren der Objekte aus den Einzelebenen erzielt wurde. Diese lag bei 98 erfassten Objekten, was in der Mehrfachzählung der gleichen Objekte begründet lag. Mit dem Anwenden des Macros auf die z-Projektion kommt man also dem wahren (manuell ermittelten) Wert der Objektanzahl weitaus näher als durch das Anwenden auf die Einzelebenen. Jedoch ist bei der Anwendung auf die z-Projektion nicht ausgeschlossen, dass Objekte, die in den verschiedenen Ebenen direkt übereinander liegen, nur als ein Objekt erfasst werden. Allerdings ist dieser Fehler statistisch gesehen geringer als der Fehler, der bei Mehrfachzählungen auftritt. Eine weitere Fehlerquelle, die die Analyse der z-Projektion beinhaltet, ist die Gefahr, dass auch Partikel/Objekte erfasst werden, die außerhalb der Zellen liegen: denn sowohl Zellmaske als auch Partikelmaske werden erst nach dem Verrechnen der Pixel aus allen Ebenen, also nach dem Erstellen der z-Projektion kreiert. So ist es möglich, dass beispielsweise ein Objekt aus Ebene 5, das normalerweise außerhalb der Zelle/ Zellmaske in dieser Ebene liegt (Vergleich Abbildung 39 A), trotzdem miterfasst wird, weil es innerhalb der Zellmaske der z-Projektion lokalisiert wird (Vergleich Abbildung 39 B). Die Zellmaske der z-Projektion ist immer größer als die Masken aus den Einzelebenen. Diese Fehlerquelle wird demzufolge bei der Analyse der Einzelebenen ausgeschlossen. Allerdings ist auch dieser Fehler statistisch sehr gering, so dass er vernachlässigt werden kann.

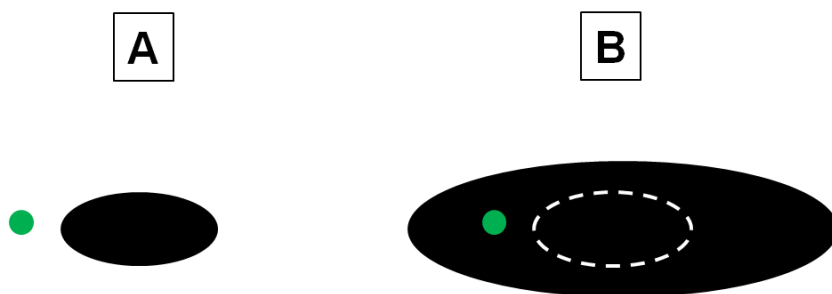


Abbildung 39: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Maskengröße von z-Projektion (B) und einer Einzelebene (A) und die damit verbundene Gefahr Objekte außerhalb der Zelle/ Zellmaske zu erfassen:

A: Maske einer Einzelebene mit Objekt (grün) außerhalb der Zelle/ Zellmaske;
B: Maske der entsprechenden z-Projektion mit dem gleichen Objekt aus A innerhalb der Zellmaske – im Vergleich ist die Maske aus der Einzelebene als weiße Strichlinie gezeigt.

4.4 Ergebnisse der Macro-Anwendung auf weitere z-Stacks

Die Zusammenfassungen der Ergebnisse werden nachfolgend tabellarisch aufgelistet. Ausführliche Beschreibungen der z-Stacks und weitere tabellarische und graphische Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

4.4.1 z-Stacks nach 4 h Inkubationszeit

Alle zur Interpretation relevanten Ergebnisse sind nachfolgend tabellarisch dargestellt (siehe Tabelle 11). Vergleicht man die ermittelte Objektanzahl eines z-Stacks anhand der Erfassung durch das Macro von *Image J*, der optischen (manuellen) Erfassung und dem berechneten Wert, so wird deutlich, dass der berechnete Wert sehr gut mit dem manuell erfassten Wert übereinstimmt. Die Berechnung der Objektanzahl nach der Formel aus Gleichung 5 erweist sich als gute Näherung zur Erfassung der tatsächlichen Anzahl an Objekten. Dabei ist n die Objektanzahl, A_{ges} die Gesamtfläche der erfassten Objekte und \bar{A} der berechnete Mittelwert einer Objektfläche ohne Einbeziehung von Mehrfachereignissen:

$$n = \frac{A_{\text{ges}}}{\bar{A}} \quad (5)$$

Der durch *Image J* ermittelte Wert ist in der Regel kleiner als die anderen Werte. Begründet ist dies durch das Auftreten von Mehrfachereignissen, die als ein einzelnes Objekt gezählt werden.

Vergleicht man die Objektanzahl der verschiedenen z-Stacks miteinander, so kann man keinen Trend feststellen. Einzelne Zellen können viele bis fast keine Partikel/Objekte enthalten (Vergleich Tabelle 11 Stack 4 und Stack 11). Bei der Analyse von 2 aneinander liegenden (sich teilenden) Zellen ist das gleiche festzustellen (Vergleich Tabelle 11 Stack 7 und Stack 8). Die Vermutung, dass bei gleichzeitiger Analyse von zwei Zellen in einem Stack eine höhere Objektanzahl ermittelt wird als bei einer Einzelzelle, kann nicht bestätigt werden.

Die Werte der berechneten Mittelwerte \bar{A} und Durchmesser d macht deutlich, dass die erfassten Objekte im Vergleich zu einem Einzelpartikel sehr groß sind. Selbst der kleinste berechnete Durchmesser ist mehr als dreimal so groß wie der eigentliche Durchmesser eines Partikels (Vergleich Tabelle 11 Stack 1). Diese Werte müssen jedoch kritisch betrachtet werden, denn die Berechnung des Mittelwertes \bar{A} und dem daraus abgeleiteten Wert für d basiert auf der subjektiven Entscheidung, welche Objekte als Mehrfachereignisse zählen und welche nicht. Mitunter kann dies auch dazu führen, dass sich die Werte für die ermittelten Durchmesser sehr unterscheiden und in einem Bereich zwischen 0,5 und 1 μm

liegen, obwohl die Partikel eine hohe Monodispersität aufweisen. Außerdem könnte die Größe der Fläche auch in Zusammenhang mit der Schrittweite, also dem Abstand der optischen Schnitte, stehen. Die Schrittweite ist bei jedem z-Stack unterschiedlich, da darauf geachtet wurde, dass jeder Stack aus 10 Ebenen besteht. In weiterführenden Untersuchungen muss geprüft werden, ob bei einheitlicher Schrittweite gleiche Werte für die Objektflächen ermittelt werden können.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse nach Anwenden des Macros auf z-Stacks nach 4 Stunden Inkubationszeit:

counts: erfasste beziehungsweise berechnete (nach der Formel aus Gleichung 5) Anzahl an Objekten;

\bar{A} : berechneter Mittelwert einer Objektfläche ohne Einbeziehen der Mehrfachereignisse;

d: berechneter Durchmesser eines Objektes auf der Grundlage von \bar{A} und der in Gleichung 4 beschriebenen Formel;

rel. F-Int. (min. Wert): minimaler Wert der relative Fluoreszenz-Intensität beziehungsweise des durchschnittlichen Grauwerts innerhalb aller Werte der erfassten Objekte (ohne Berücksichtigung von Mehrfachereignissen) eines z-Stacks;

rel. F-Int. (max. Wert): maximaler Wert der relative Fluoreszenz-Intensität beziehungsweise des durchschnittlichen Grauwerts innerhalb aller Werte der erfassten Objekte (ohne Berücksichtigung von Mehrfachereignissen) eines z-Stacks;

Schrittweite: Abstand der optischen Schnitte (Ebenen) innerhalb des Stacks in z-Richtung.

z-Stack	counts Macro	counts manuelle Erfassung	counts berechnet	\bar{A} in μm^2	d in nm	rel. F-Int. (min. Wert)	rel. F-Int. (max. Wert)	Schrittweite in nm
Stack 1	19	21	24,7	0,234	545,8	4,579	15,405	880
Stack 2 (Modellstack)	24	32	32,5	0,717	955,5	8,739	13,469	670
Stack 3	27	31	29,2	0,444	751,9	4,818	23,068	590
Stack 4	39	nicht zu erfassen	58,6	0,256	570,9	4,079	8,714	910
Stack 5	5	5	5	0,282	599,2	7,147	21,362	1260
Stack 6	34	34	34	0,357	674,2	4,278	66,268	800
Stack 7 (2 Zellen)	38	44	48,7	0,748	975,9	4,688	27,031	920
Stack 8 (2 Zellen)	6	6	6	0,213	520,8	5,500	7,862	1090
Stack 9	6	6	6	0,302	620,1	4,550	29,750	1180
Stack 10	5	5	5	0,278	594,9	6,882	33,066	1340
Stack 11	3	3	3	0,659	916,0	14,288	51,941	590
Stack 12	14	21	21,2	0,331	649,2	4,532	7,109	840

Der minimale und maximale Wert der relativen Fluoreszenz-Intensität, der innerhalb aller Werte der erfassten Objekte eines z-Stacks ermittelt wurde, soll zeigen, in welchem Bereich sich die Fluoreszenz-Intensitäten bewegen. Es ist auffällig, dass auch hier kein Trend festgestellt werden kann. Zum Beispiel weisen die Fluoreszenz-Intensitäten bei ähnlichen z-Stacks hinsichtlich analysierter Zellzahl, erfasster Objektanzahl und Schrittweite ganz unterschiedliche Bereiche auf, in welchen sich die Fluoreszenz-Intensitäten bewegen (Vergleich Tabelle 11 Stack 4 und Stack 6).

4.4.2 z-Stacks nach 24 h Inkubationszeit

Die Aussagen, die für die z-Stacks unter 4.4.1 getroffen wurden, treffen auch auf die nachfolgenden Ergebnisse zu (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse nach Anwenden des Macros auf z-Stacks nach 24 h Inkubationszeit.
Die Erklärungen zu Symbolen und Abkürzungen sind Tabelle 11 zu entnehmen.

z-Stack	counts Macro	counts manuelle Erfassung	counts berechnet	\bar{A} in μm^2	d in nm	rel. F-Int. (min. Wert)	rel. F-Int. (max. Wert)	Schrittweite in nm
Stack 1 2 Zellen	25	26	27,5	0,205	510,9	4,100	21,541	970
Stack 2	12	13	12,8	0,400	713,6	5,618	18,561	760
Stack 3 2 Zellen	41	46	48,1	0,606	878,4	3,568	14,463	800
Stack 4 2 Zellen	50	51	52,1	0,317	635,3	4,349	13,590	760
Stack 5	9	nicht zu erfassen	19,8	0,377	692,8	5,290	23,639	630
Stack 6	4	4	4	0,175	472,0	5,250	6,788	1090
Stack 7 2 Zellen	73	89 (schwer zu erfassen)	97,9	0,289	606,6	3,600	29,211	970
Stack 8	12	13	15,9	0,312	630,3	5,091	8,902	920
Stack 9	27	38	42,6	0,389	703,8	3,977	15,421	840

Vergleicht man die z-Stacks der verschiedenen Inkubationszeiten miteinander, kann bei einigen Stacks die Tendenz erkannt werden, dass nach 24 h mehr Partikel/Objekte von den Zellen aufgenommen wurden als nach 4 h Inkubationszeit (Vergleich Tabelle 12 Stack 3, 4

und 7). Allerdings handelt es sich bei diesen Stacks, um die Analyse zweier Zellen. Auf die Zellen, die 24 h mit Partikeln inkubiert wurden, trifft also die Vermutung zu, dass bei gleichzeitiger Analyse zweier Zellen in einem Stack eine höhere Objektanzahl ermittelt wird als bei der Analyse einer Einzelzelle. Bei der Analyse der z-Stacks nach 4 h Inkubationszeit konnte dieser Sachverhalt allerdings nicht bestätigt werden (Vergleich Kapitel 4.4.1).

In Kapitel 3.6 wurde erwähnt, dass die Anwendung des Macros auf ein einfaches System bestehend aus nur einer Zelle erfolgen soll. Jedoch ist es schwierig, ausschließlich Aufnahmen von Einzelzellen zu erhalten, da sich HeLa-Zellen eher zusammen lagern. Deswegen wurden sowohl bei den Aufnahmen nach 4 h als auch nach 24 h oftmals zwei Zellen in einem z-Stack dokumentiert. Bei den z-Stacks in Tabelle 12 wurde ebenfalls kein Trend der relativen Fluoreszenz-Intensitäten erkannt. Deshalb wurde für die Stacks beider Inkubationszeiten der Median der relativen Fluoreszenz-Intensitäten bestimmt (Vergleich Tabelle 13), da dieser Wert resistenter gegenüber Ausreißern ist.

Tabelle 13: Mediane der relativen Fluoreszenz-Intensitäten der z-Stacks nach 4 und 24 h Inkubationszeit. s: Standardabweichung

4 Stunden		24 Stunden	
z-Stack	Median	z-Stack	Median
Stack 1	5,474	Stack 1	5,320
Stack 2	8,000	Stack 2	5,417
Stack 3	6,519	Stack 3	6,220
Stack 4	4,744	Stack 4	5,280
Stack 5	9,400	Stack 5	6,556
Stack 6	6,618	Stack 6	5,000
Stack 7	6,868	Stack 7	5,877
Stack 8	5,167	Stack 8	5,500
Stack 9	11,833	Stack 9	5,519
Stack 10	11,800		
Stack 11	13,000		
Stack 12	4,714		

Mittelwert = 7,845

s = 2,969

Mittelwert = 5,632

s = 0,495

Alle Mediane weisen niedrige Werte auf, wobei die Werte des z-Stacks nach 24 h Inkubationszeit untereinander wesentlich ähnlicher sind als die Werte der Stacks nach 4 h Inkubationszeit (Vergleich Tabelle 13 s). Generell ist damit zu verzeichnen, dass die erfassten Objekte eine sehr geringe relative Fluoreszenz-Intensität aufweisen. Ein Grund hierfür ist die geringe Laserintensität, die eingestellt wird, um die Zellen zu schonen.

In Kapitel 4.7 werden die Ergebnisse aus der Analyse der z-Stacks beider Inkubationszeiten hinsichtlich des Verhältnisses der aufgenommenen Partikel interpretiert.

4.5 Herausforderung bei *Image J*

Obwohl mit dem erstellten Macro gute Ergebnisse im Hinblick auf die Quantifizierung von Partikeln erreicht werden, müssen jedoch Optimierungen in Bezug auf das Separieren von Mehrfachereignissen erfolgen. Täglich werden neue Befehle, Plugins oder Verbesserungen von beidem als Update für *Image J* zur Verfügung gestellt, welche man sich für die Optimierungen zunutze machen kann. Das Erstellen einer Befehlskette, die automatisch Mehrfachereignisse in Einzelobjekte auftrennt und eine nachträgliche, manuelle Analyse überflüssig macht, steht als Herausforderung für die Weiterführung der Arbeiten an erster Stelle.

Bislang erzielt man mit dem Macro gute Ergebnisse für die Analyse von ein bis zwei Zellen pro z-Stack. Eine Weiterentwicklung zur Bulkanalyse von 10 oder mehr Zellen ist ratsam, da die Schwierigkeiten im Hinblick auf die Aufnahmen von nur einer einzelnen Zelle dann entfallen und außerdem repräsentative Ergebnisse erzielt würden.

Vorab sollten jedoch noch Versuche an Einzelzellen erfolgen, die Aufschluss darüber geben, ob eine Abhängigkeit zwischen der Schrittweite der Ebenen und der Größe einer Objektfläche vorliegt. Die Abtastraten, das heißt der Abstand der optischen Schnitte beziehungsweise die Schrittweite der Ebenen eines z-Stacks, waren in der vorliegenden Arbeit meist zu hoch gewählt und nicht einheitlich für die verschiedenen Stacks. Eine optimale Abtastrate entspricht etwa der Hälfte der optischen Schnittdicke (entspricht der axiale Auflösung). Mit dem verwendeten CLSM erreicht man eine axiale Auflösung von circa 500 nm. Demzufolge liegt die optimale Abtastrate bei 250 nm.

Als ebenfalls sehr aufwendig erwies sich das Umschreiben des Macros an den Stellen, die auf Ordner verweisen, aus welchen die Bilder verwendet beziehungsweise die Ergebnisse abgespeichert werden. Für jeden neuen z-Stack mussten die entsprechenden Befehle abgeändert werden, da jeder Stack in einem extra Ordner vorliegt. Zusätzliche Zeit erforderte

auch das Erstellen der Ordner, die ausschließlich die Bilder des jeweiligen z-Stacks enthielten. Von großem Nutzen wäre ein Programm, welches automatisch diese Bildordner erstellt. Besser wäre jedoch, wenn das Macro immer auf ein und denselben Ordner für die Auswahl der Bilder zurückgreifen könnte. Es müsste also ein Programm kreiert werden, dass die Bilder entsprechend umbenennt und nach der Analyse automatisch löscht, wodurch der Ordner für die neuen Bilder des nächsten Stacks freigegeben wird. Gleiches müsste auch für den Ergebnisordner erfolgen. Dadurch würde das manuelle Umschreiben des Macros und das Separieren der Bilder in extra Ordner entfallen.

4.6 Vergleich der CLSM- und REM-Aufnahmen von Partikeln

Aufgrund der Tatsache, dass die ermittelten Durchmesser der erfassten Objekte weitaus größer sind als der tatsächliche Durchmesser eines Partikels, wurde ein erster korrelativer Versuch an REM und CLSM durchgeführt. Die mikroskopischen Aufnahmen aus beiden Methoden sollen Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den Fluoreszenzspots in den Bildern der z-Stacks um einzelne Partikel oder Partikelaggregate handelt. Dazu wurde eine Auftropfprobe der reinen Partikellösung untersucht, um zunächst festzustellen, wie groß die Fluoreszenzspots der Partikel ohne Zellaufnahme sind. Die Übersichtsbilder (siehe Abbildung 40) zeigen die Stelle des Goldgrids (Vergleich Abbildung 10), an welcher die REM- und CLSM-Aufnahmen erfolgten. Beide Aufnahmen wurden an der gleichen Stelle durchgeführt.

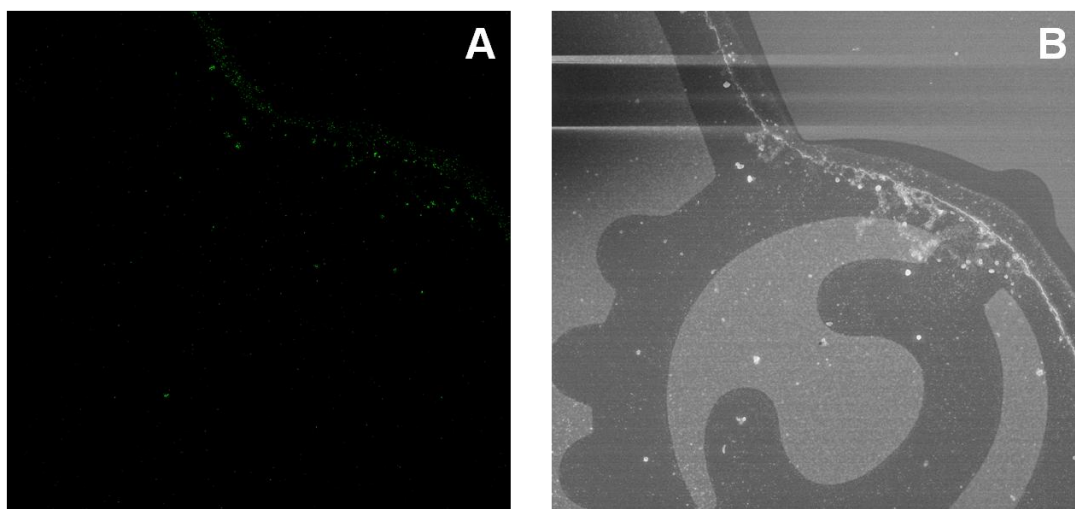
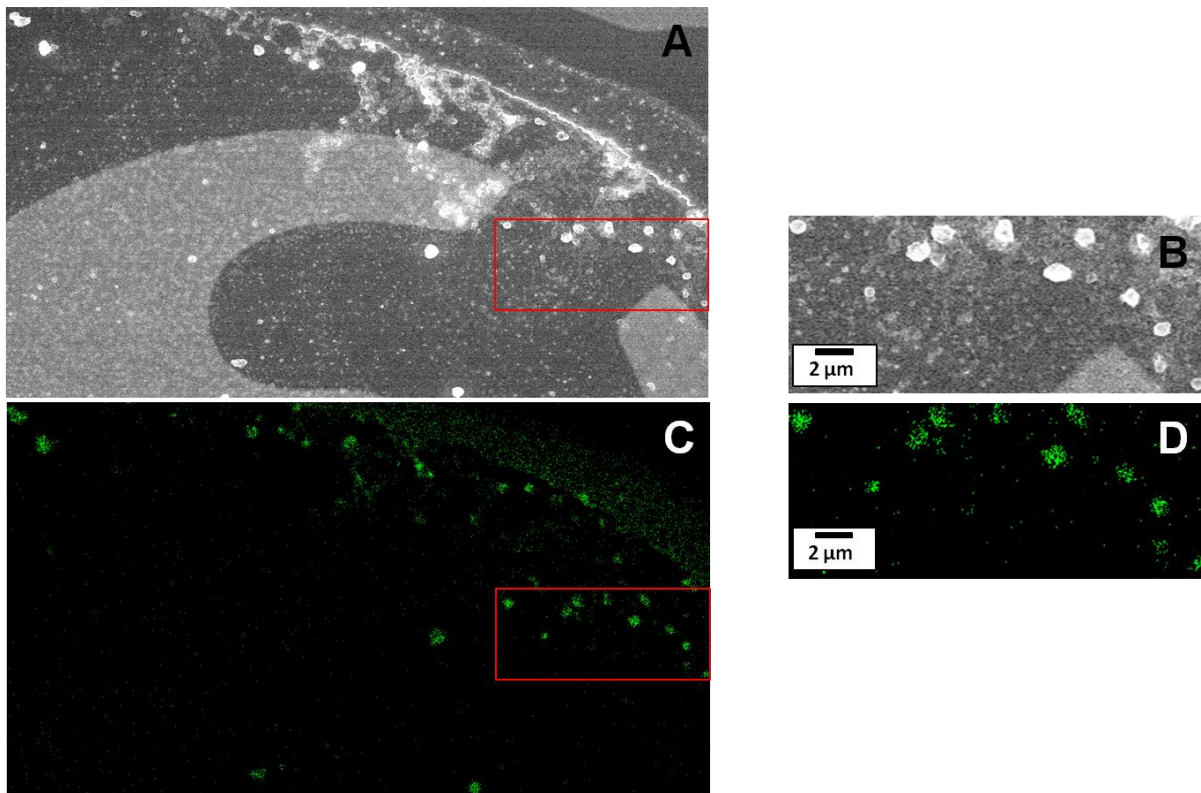


Abbildung 40: Übersichtsbilder des Trocknungsrandes der Auftropfprobe:
A: CLSM-Aufnahme der Partikel GB-PS-26;
B: REM-Aufnahme der Partikel GB-PS-26.

Durch die in Kapitel 3.5 beschriebene Vorgehensweise konnte die gleiche Stelle sehr leicht am REM wieder gefunden werden, nachdem die CLSM-Aufnahmen abgeschlossen waren.

Für die Aufnahmen wurde der Trocknungsrand der Auftropfprobe gewählt, da sich hier die meisten Partikel angesammelt hatten. In Vergrößerungen der aufgenommenen Stelle (siehe Abbildung 41) kann eindeutig festgestellt werden, dass die Größe der detektierten Fluoreszenzspots mit der Größe der im REM erfassten Objekte übereinstimmt (Vergleich Abbildung 41 B und D).



**Abbildung 41: Vergrößerungen der Übersichtsbilder aus Abbildung 40:
A und B: vergrößerte Ausschnitte der REM-Aufnahme;
C und D: vergrößerte Ausschnitte der CLSM-Aufnahme;
Der rote Rahmen in A und C gibt die Stelle der zweiten Vergrößerung wieder.**

Jedoch stimmt die Größe nicht mit dem Partikeldurchmesser überein, so dass die Objekte, die mit dem CLSM erfasst werden, vermutlich „Riesenpartikel“ beziehungsweise Partikelaggregate sind. In den REM-Aufnahmen (Vergleich Abbildung 41 B) kann man einzelne Partikel erahnen, die auch die entsprechende Größe aufweisen. Jedoch werden diese nicht als Fluoreszenzspots angezeigt. Die Einstellungen am CLSM wurden so gewählt, dass nur die großen Objekte erfasst werden, da davon ausgegangen wurde, dass es sich um einzelne Partikel handelt.

Die Größe der Fluoreszenzspots ist allerdings identisch mit der Größe der Spots aus den Aufnahmen der z-Stacks (Vergleich Abbildung 41 D und Abbildung 42).

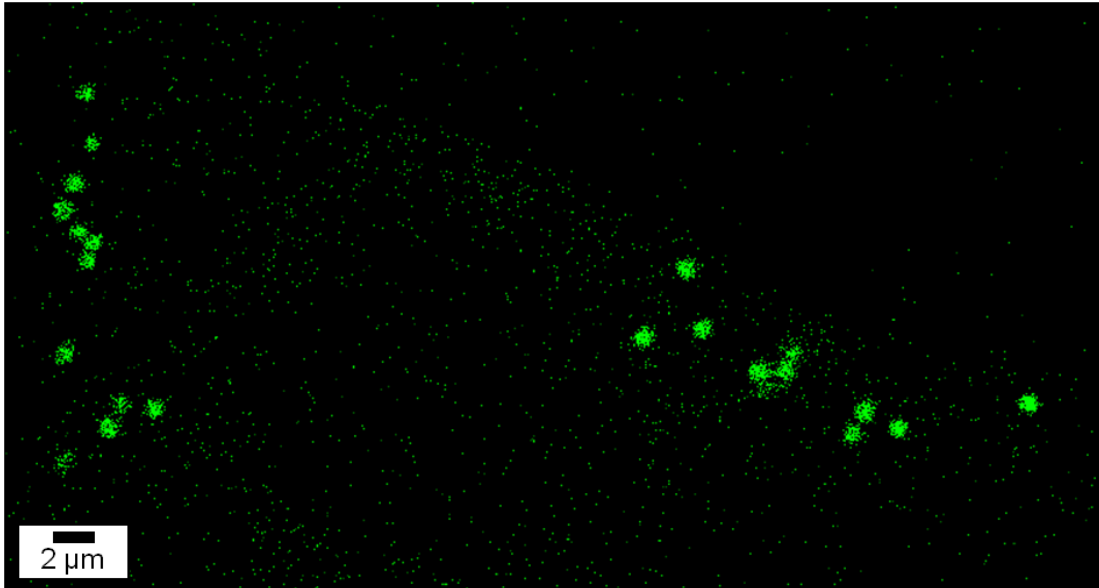


Abbildung 42: CLSM-Aufnahme der ersten Ebene des Modellstacks.

Man kann deshalb davon ausgehen, dass in den Zellen unter den gewählten Einstellungen für das CLSM nur sehr große Partikel beziehungsweise Partikelaggregate detektiert werden. Um jedoch sicher zu stellen, dass es sich bei den Fluoreszenzspots innerhalb der Zellen nicht um Partikelaggregate in Endosomen handelt, sollten weiterführende korrelative Versuche durchgeführt werden. Ein Vergleich zwischen Aufnahmen von fixierten mit Partikeln beladenen Zellen am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) und am CLSM bietet sich hierfür an, da das TEM aufgrund seiner Funktionsweise die Membran von Endosomen kenntlich macht. Weiterhin wird eine Optimierung der Einstellungen am CLSM angestrebt, um auch Einzelpartikel als Fluoreszenzspots erfassen zu können.

4.7 Vergleich der Ergebnisse von Durchflusszytometrie und CLSM

Die ermittelten Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind in Kapitel 4.1 bereits vorgestellt worden. Es konnten mit Hilfe der Mediane der relativen Fluoreszenz-Intensitäten Aussagen über den Partikelgehalt in den Zellen getroffen werden. Dabei wurde festgestellt, dass 50% beziehungsweise 70% mehr Partikel nach 24 h aufgenommen wurden als nach 4 h. Um eine vergleichbare Auswertung der Daten aus der CLSM-Messung zu erzielen, wird zunächst der Wert aus der Gesamtfläche aller erfassten Objekte des jeweiligen z-Stacks multipliziert mit der dazugehörigen relativen Fluoreszenz-Intensität bestimmt. Dies wird für beide Inkubationszeiten durchgeführt (siehe Tabelle 14). Die berechneten Werte streuen sehr stark (Vergleich Tabelle 14 s) und es kann nicht eindeutig bestimmt werden, welcher Wert als Ausreißer zu behandeln ist und welcher nicht. Deswegen wurden alle berechneten Werte einer Inkubationszeit zur Bildung eines Mittelwertes herangezogen. Der Vergleich dieser Mittelwerte ergibt ein Verhältnis der relativen Fluoreszenz-Intensität von circa 80 (4 h) zu 100 (24 h). Das heißt, nach 24 h Inkubationszeit liegt die relative Fluoreszenz-Intensität nur circa 20% höher als nach 4 h.

**Tabelle 14: Vergleich der durchschnittlichen relativen Fluoreszenz-Intensität der z-Stacks beider Inkubationszeiten anhand des berechneten Wertes aus der Gesamtfläche (A_{ges}) aller erfassten Objekte multipliziert mit der dazugehörigen relativen Fluoreszenz-Intensität (rel. F-Int.)
s: Standardabweichung**

4 h				24 h			
z-Stack	A_{ges} in μm^2	rel. F-Int. von A_{ges}	A_{ges} x rel. F-Int. in a.u.	z-Stack	A_{ges} in μm^2	rel. F-Int. von A_{ges}	A_{ges} x rel. F-Int. in a.u.
Stack 1	5,928	7,833	46,4	Stack 1	5,618	6,671	37,5
Stack 2	10,841	1,847	20,0	Stack 2	5,114	7,702	39,4
Stack 3	12,969	9,236	119,8	Stack 3	29,133	8,179	238,3
Stack 4	14,986	6,488	97,2	Stack 4	16,514	6,915	114,2
Stack 5	1,408	12,893	18,2	Stack 5	7,476	10,314	77,1
Stack 6	12,155	11,548	140,4	Stack 6	0,699	6,068	4,2
Stack 7	36,449	9,650	351,7	Stack 7	29,183	9,008	262,9
Stack 8	1,278	6,645	8,5	Stack 8	4,969	7,384	36,7
Stack 9	1,613	15,763	25,4	Stack 9	16,564	7,112	117,8
Stack 10	1,388	18,716	26,0				
Stack 11	1,978	34,034	67,3				
Stack 12	7,011	5,948	41,7				

Mittelwert = 80,2
s = 95,6

Mittelwert = 103,1
s = 91,8

Diese Verhältnismäßigkeiten entsprechen nicht den ermittelten Verhältnismäßigkeiten aus den Messungen der Durchflusszytometrie. Allerdings wurden mit dem Durchflusszytometer mehr als 400 Mal so viele Zellen analysiert als mit *Image J* ausgewertet wurden. Außerdem wurden die Werte der Durchflusszytometrie aus zwei Ansätzen gemittelt. Beide Ansätze erfolgten am gleichen Tag, so dass hier die Intra-Assay-Variabilität abgebildet ist, welche die Streuung der Werte bei wiederholten Messungen innerhalb eines Experiments beschreibt. Allerdings ist bei Ansätzen an verschiedenen Versuchstagen bekannt, dass hierbei die Abweichung (als Inter-Assay-Variabilität) deutlich höher ist. Die CLSM-Aufnahmen der verschiedenen z-Stacks wurden an mehreren Versuchstagen durchgeführt, so dass hier schon mit einer höheren Variabilität der ermittelten Werte zu rechnen ist und damit die beiden Bedingungen (4 h und 24 h) schlechter zu unterscheiden sind. Außerdem ist zu bedenken, dass selbst in der durchflusszytometrischen Bestimmung die Werte für die Zellen, die die Partikel am besten aufgenommen haben (z.B. als 90. Percentile gemessen) im Vergleich zu den Zellen, die die Nanopartikel schlecht aufgenommen haben (z.B. als 10. Percentile gemessen) um den Faktor 10 innerhalb derselben Probe auseinanderliegen kann. Nur durch die große Anzahl an analysierten Ereignissen ist ein stabiler Median zu erreichen. Die geringe Anzahl an analysierten z-Stacks mit *Image J* lässt allerdings noch keine sichere Aussage bezüglich der aufgenommen Menge an Nanopartikeln zu. Um eine repräsentative Aussagen über die Verhältnismäßigkeiten der relativen Fluoreszenz-Intensitäten aus beiden Inkubationszeiten treffen zu können, müssen mehr z-Stacks ausgewertet werden. Grundsätzlich kann aber mit beiden Methoden festgestellt werden, dass der Partikelgehalt nach 24 h Inkubationszeit höher ist als nach 4 h. Allerdings sind weitere Optimierungsschritte in der Befehlsabfolge des Macros und den Einstellungen am CLSM nötig, um quantitative Aussagen auf dem Niveau der Durchflusszytometrie treffen zu können.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Quantifizierung von Partikeln in Zellen konnte mit dem mit *Image J* geschriebenen Macro automatisiert werden. Die Analyse von z-Stacks erwies sich grundsätzlich als erfolgreich, denn sowohl Objektanzahl als auch die dazugehörige Fläche und relative Fluoreszenz-Intensität werden ermittelt. Eine Optimierung hinsichtlich der Separation von Mehrfachereignissen ist allerdings notwendig. Eine weitere Herausforderung stellt die genaue intrazelluläre Lokalisation der Partikel mit Hilfe des Automatismus dar. Um zwischen Adhäsion und Aufnahme der Partikel unterscheiden zu können, müssen in weiteren Optimierungsschritten Masken für Zellinneres, Zellmembran und Gesamtzelle kreiert und entsprechend miteinander verrechnet werden. Dadurch wäre es möglich zu unterscheiden, welche Partikel sich wirklich im Zellinneren befinden und welche an der Zellmembran anlagern. Durch die Verwendung von anderen Farbstoffen, die nur das Cytosol der Zellen anfärben, könnte die Entwicklung dieser Art von Masken erleichtert werden. Der erste korrelative Versuch der REM- und CLSM-Messungen hat ergeben, dass nicht Einzelpartikel, sondern eher Partikelaggregate als Fluoreszenzspots detektiert werden. Um auch Einzelpartikel detektieren zu können, müssen die getroffenen Einstellungen am CLSM optimiert werden und gegebenenfalls auch Befehle innerhalb des Macros abgeglichen werden. Versuche mit höherer Auflösung unter Verwendung der Stimulated Emission Depletion (STED)-Mikroskopie oder korrelative Versuche mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) sind für die Detektion von Einzelpartikeln hilfreich. Nachdem die Anwendung des Macros auf Einzelpartikel in einer Zelle etabliert ist, kann eine Weiterentwicklung und Optimierung des Macros hinsichtlich Bulkanalysen und der Anwendung auf andere Partikelarten angestrebt werden.

6 Literatur

- [1] M. Goldberg, R. Langer, X. Q. Jia, *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2007**, 18, 241-268
- [2] J. Dausend, A. Musyanovych, M. Dass, P. Walther, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailander, *Macromolecular Bioscience* **2008**, 8, 1135-1143
- [3] K. Y. Win, S. S. Feng, *Biomaterials* **2005**, 26, 2713-2722
- [4] <http://www.konfokalmikroskopie.de>, **2011**
- [5] Zeiss, *Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie*
- [6] K. Henkel, *Die Mikrofibel*, **2003**
- [7] M. Mulisch, U. Welsch, *Romeis Mikroskopische Technik, 18. Auflage*, Spektrum, **2010**
- [8] R. Winter, F. Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner, **1998**
- [9] Leica, *Leica TCS SP5 Betriebsanleitung*, **2008**
- [10] U. Sack, A. Tárnok, G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Karger, **2007**
- [11] J. R. Masters, *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, 2, 315–319
- [12] http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, **2011**
- [13] *The Image J User Guide*, Version 1.43, **2010**

7 Anhang

Stack 1 – Inkubationszeit 4 h

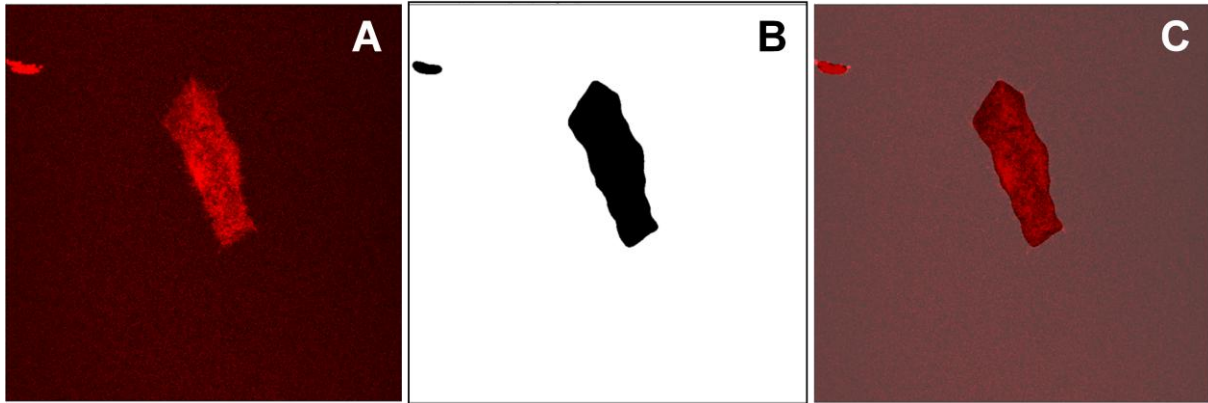


Abbildung 43: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 1 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

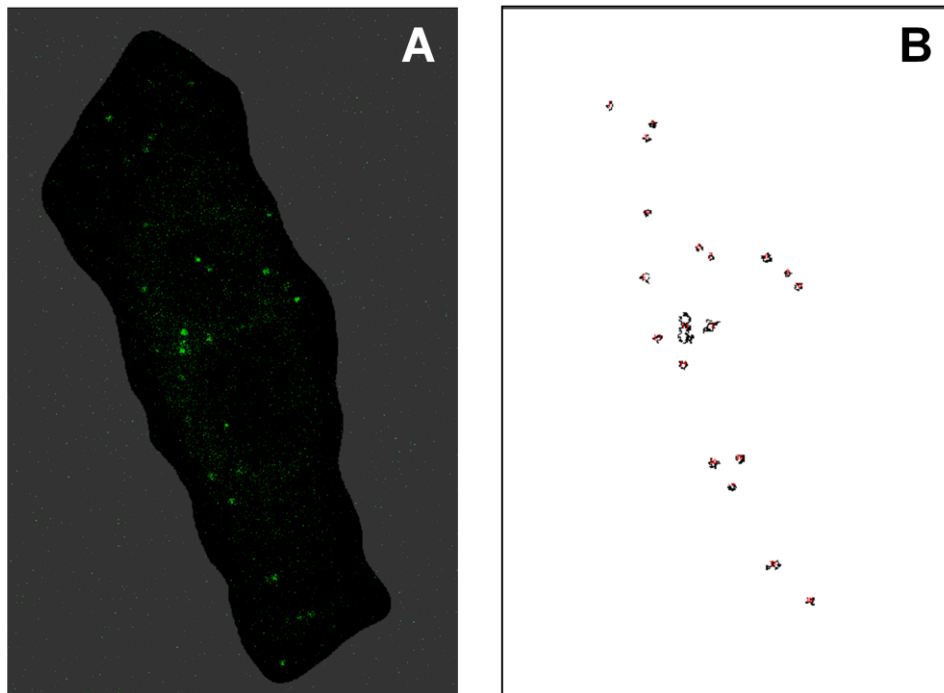


Abbildung 44: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 15: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	19	21	24,7

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 1 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcoun	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlich er Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,195	0,81	6,564	1	22	6
2	0,165	0,69	6,273	1	23	5
3	0,145	0,61	6,483	1	25	4
4	0,165	0,69	4,727	1	12	4
5	0,185	0,77	15,405	1	82	12
6	0,345	1,44	10,043	1	42	7
7	0,145	0,61	8,621	1	42	5
8	0,165	0,69	5,455	1	14	4
9	0,290	1,21	6,983	1	32	5
10	0,260	1,08	15,904	1	97	9
11	1,618	6,75	11,824	1	120	6
12	0,539	2,25	5,565	1	30	3
13	0,190	0,79	4,579	1	21	3
14	0,250	1,04	4,780	1	16	4
15	0,270	1,13	5,833	1	29	4
16	0,285	1,19	6,807	1	30	6
17	0,215	0,90	8,791	1	26	7
18	0,355	1,48	9,197	1	48	6
19	0,150	0,63	5,000	1	16	4

Mittelwert = 0,240

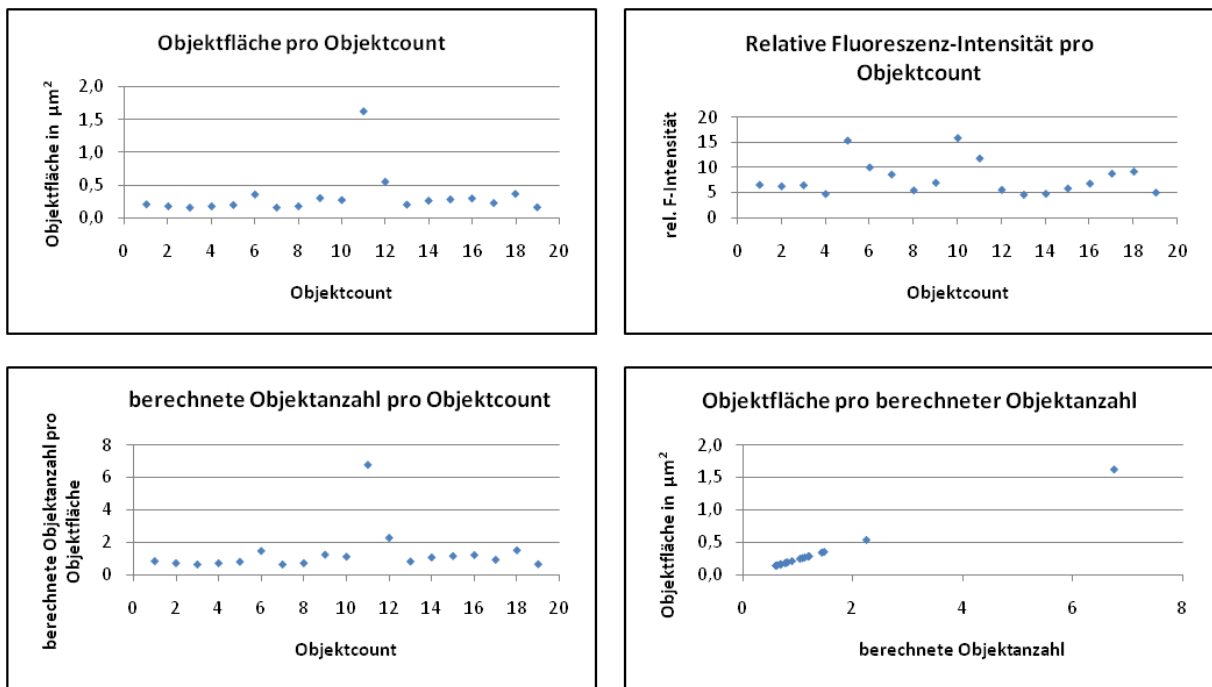


Abbildung 45: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 1 erzielt wurden.

Stack 2 – Inkubationszeit 4 h

Dieser Stack ist der Modellstack, welcher ausführlich in Kapitel 4.3 beschrieben wurde. Deswegen wurde auf die Auflistung der Ergebnisse an dieser Stelle verzichtet.

Stack 3 – Inkubationszeit 4 h

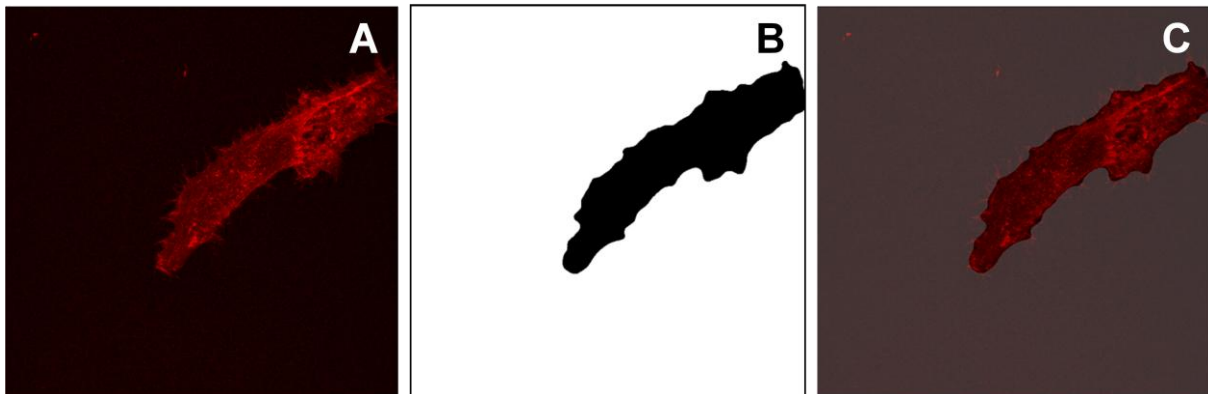


Abbildung 46: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 3 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

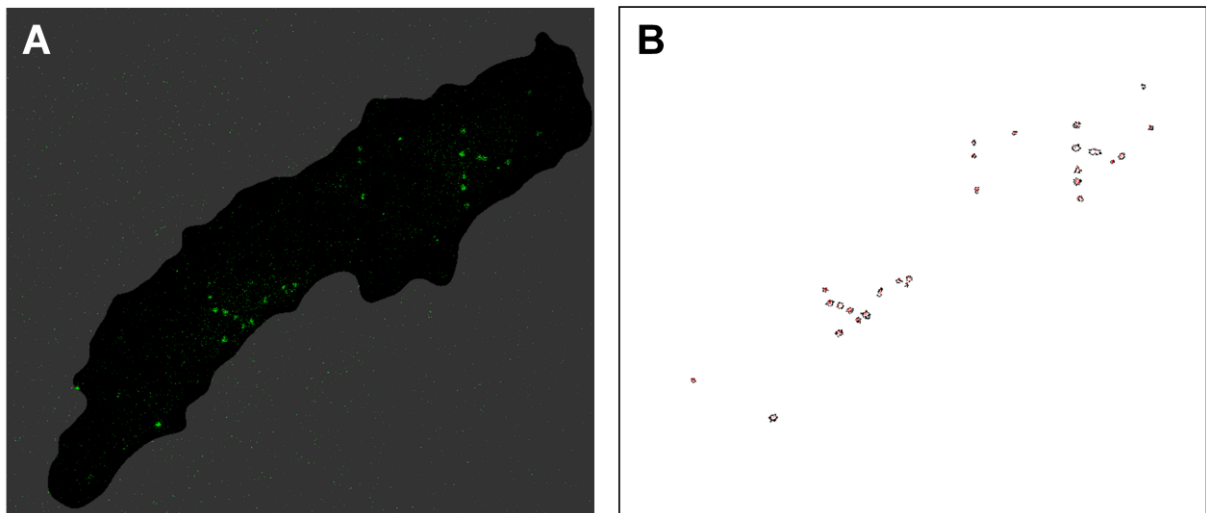


Abbildung 47: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 17: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	27	31	29,2

Tabelle 18: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 3 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,290	0,65	5,069	1	21	4
2	0,609	1,37	6,951	1	26	5
3	0,265	0,60	5,415	1	22	5
4	0,245	0,55	16,469	1	71	11
5	0,255	0,57	6,275	1	20	5
6	0,859	1,94	10,052	1	39	8
7	1,119	2,52	7,594	1	37	5
8	0,554	1,25	7,486	1	27	6
9	0,220	0,50	4,818	1	18	4
10	0,180	0,41	9,833	1	31	6
11	0,454	1,02	8,791	1	28	7
12	0,754	1,70	9,397	1	39	7
13	0,419	0,94	13,893	1	66	9
14	0,424	0,96	7,047	1	23	5
15	0,544	1,23	7,945	1	25	6
16	0,310	0,70	9,113	1	34	6
17	0,160	0,36	9,781	1	73	4
18	0,509	1,15	7,167	1	28	6
19	0,315	0,71	7,111	1	21	6
20	0,584	1,32	8,897	1	50	6
21	0,674	1,52	8,926	1	42	7
22	0,479	1,08	6,260	1	31	5
23	0,804	1,81	6,534	1	36	5
24	0,330	0,74	8,152	1	38	7
25	0,579	1,31	8,224	1	27	7
26	0,380	0,86	17,908	0	109	11
27	0,739	1,67	19,095	1	90	10

Mittelwert = 0,444

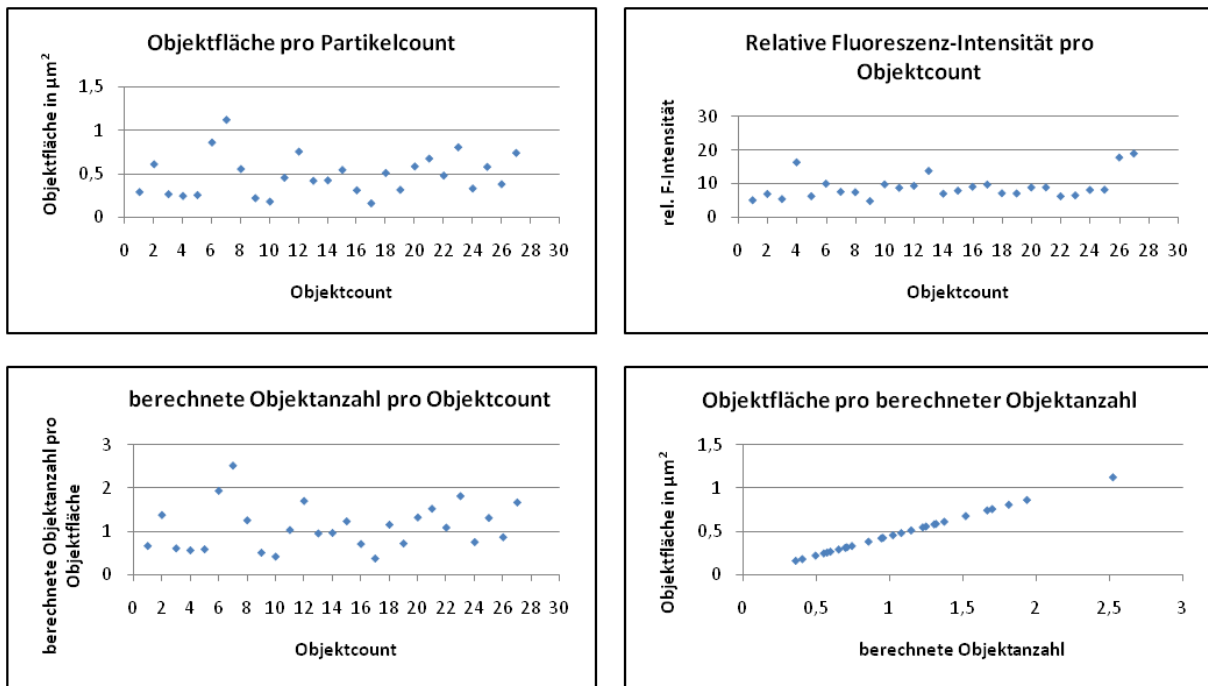


Abbildung 48: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 3 erzielt wurden.

Stack 4 – Inkubationszeit 4 h

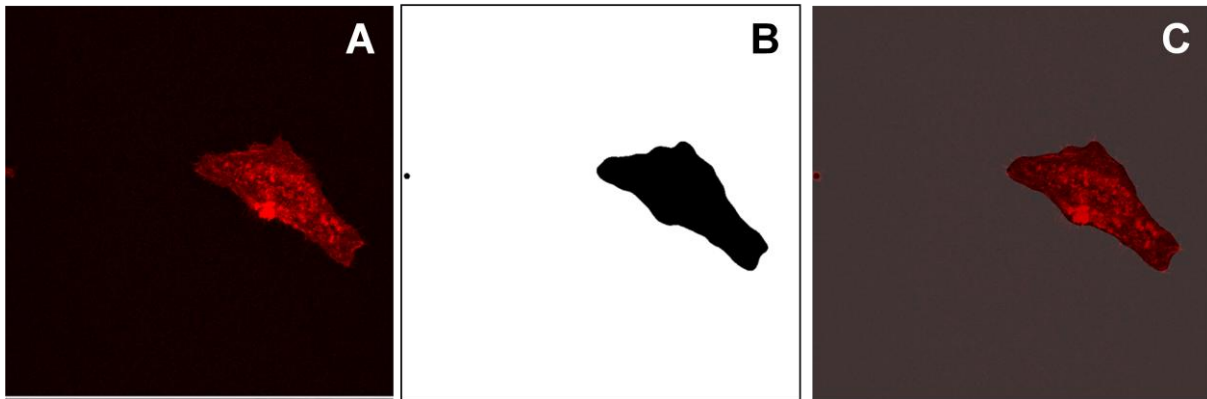


Abbildung 49: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 4 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

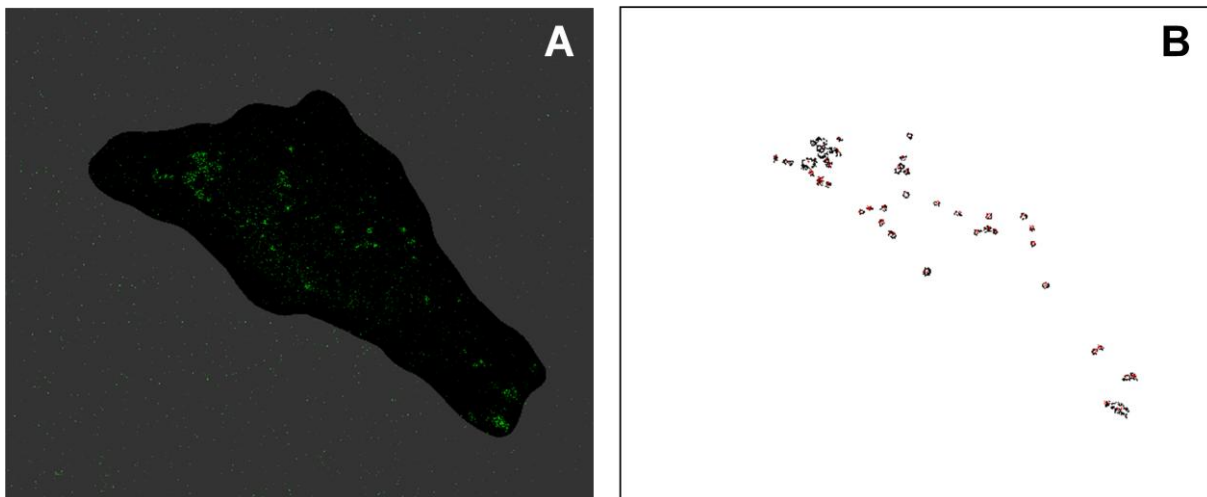


Abbildung 50: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 19: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	39	nicht zu erfassen	58,6

Tabelle 20: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 4 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,245	0,96	7,469	1	28	6
2	2,197	8,59	5,689	1	27	4
3	0,155	0,61	5,065	1	23	4
4	0,385	1,51	6,662	1	31	5
5	0,195	0,76	5,385	1	22	4
6	0,270	1,06	7,815	1	44	6
7	1,303	5,09	6,533	1	36	5
8	0,195	0,76	4,667	1	14	3
9	0,345	1,35	7,319	1	35	6
10	0,280	1,09	8,714	1	30	8
11	0,549	2,15	5,618	1	24	4
12	0,260	1,02	6,615	1	22	6
13	0,210	0,82	6,714	1	22	5
14	0,205	0,80	7,610	1	23	6
15	0,200	0,78	6,425	1	35	5
16	0,260	1,02	5,654	1	19	5
17	0,315	1,23	6,571	1	29	4
18	0,240	0,94	8,104	1	30	5
19	0,285	1,11	7,018	1	37	5
20	0,145	0,57	6,552	1	28	4
21	0,215	0,84	6,326	1	33	4
22	0,255	1,00	4,627	1	13	4
23	0,320	1,25	6,953	1	24	5
24	0,325	1,27	6,615	1	32	4
25	0,285	1,11	6,912	1	31	4
26	0,345	1,35	6,406	1	28	5
27	0,190	0,74	6,211	1	20	4
28	0,215	0,84	6,674	1	21	5
29	0,245	0,96	8,612	1	28	6
30	0,424	1,66	6,141	1	22	4
31	0,210	0,82	7,429	1	30	5
32	0,514	2,01	8,252	1	37	5
33	0,330	1,29	5,591	1	26	4
34	0,175	0,68	5,714	1	19	4
35	0,275	1,08	6,145	1	17	5
36	0,255	1,00	4,863	1	21	4
37	0,380	1,49	6,500	1	21	5
38	0,190	0,74	4,079	1	15	3
39	1,608	6,29	6,795	1	39	5

Mittelwert = 0,256

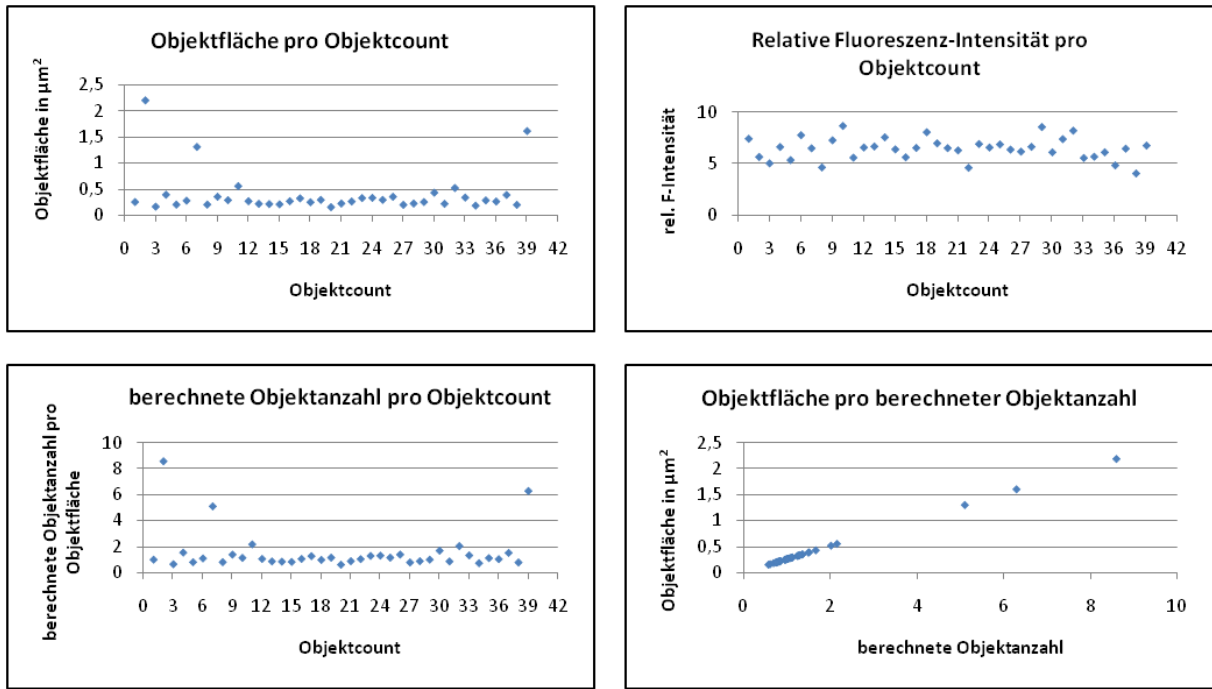


Abbildung 51: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 4 erzielt wurden.

Stack 5 – Inkubationszeit 4 h

Abbildung 52: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 5 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

Hier tritt einer der seltenen Fälle auf, dass die Zellmaske nicht gut mit der Zellform übereinstimmt.

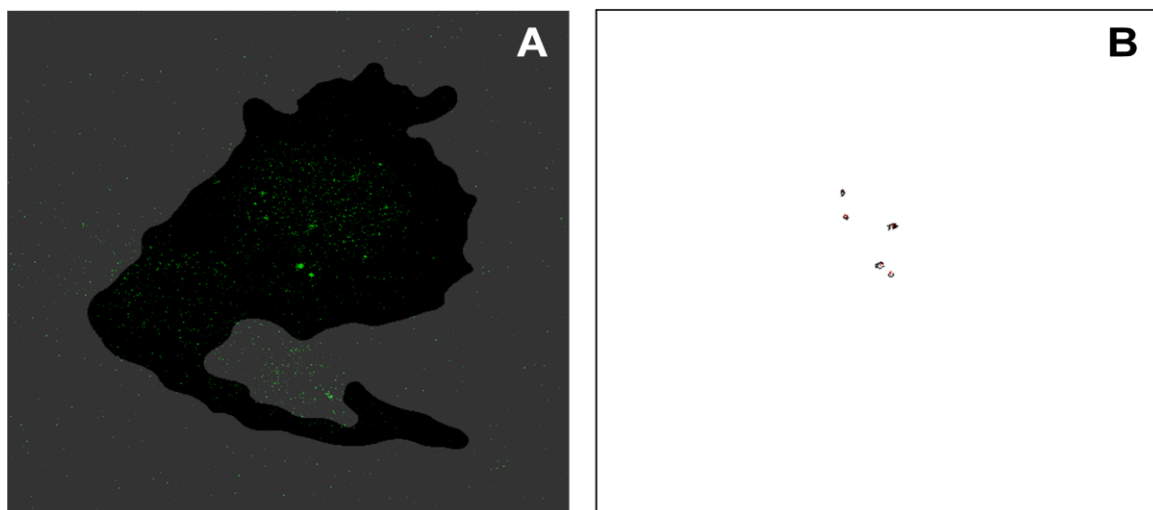


Abbildung 53: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 21: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	5	5	5

Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 5 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,175	enfällt Grund: keine Mehrfachereignisse	9,371	1	38	7
2	0,150		10,000	1	51	8
3	0,340		7,147	1	29	5
4	0,454		16,582	1	85	12
5	0,290		21,362	1	100	15

Mittelwert = 0,282

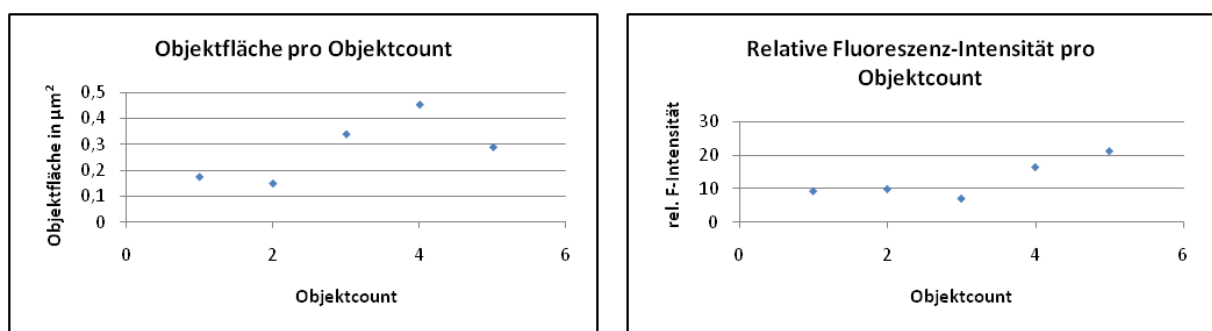


Abbildung 54: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 5 erzielt wurden. Die Diagramme, die die berechnete Objektanzahl pro Objektcount enthalten, fehlen, da keine Mehrfachereignisse erfasst wurden.

Stack 6 – Inkubationszeit 4 h

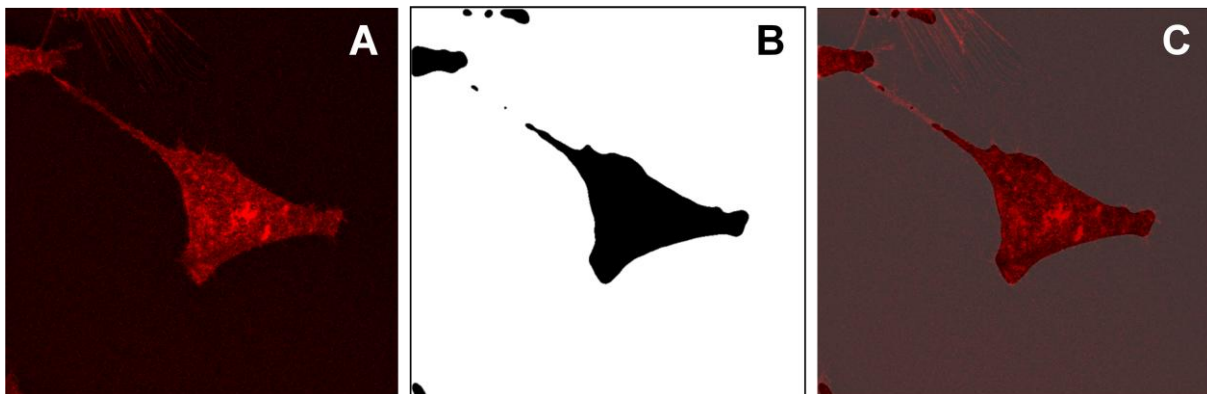


Abbildung 55: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 6 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

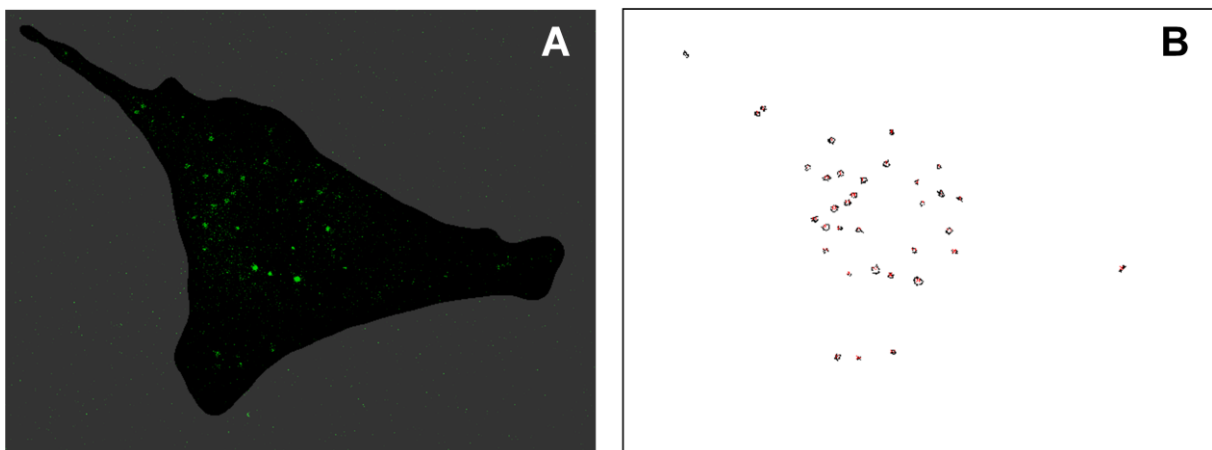


Abbildung 56: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 23: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	34	34	34

Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 4 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,265	enfällt Grund: keine Mehrfachereignisse	5,302	1	22	3
2	0,285		8,175	1	24	6
3	0,3		7,367	1	28	7
4	0,22		6,341	1	18	5
5	0,459		8,967	1	35	6
6	0,419		7,69	1	26	5
7	0,404		8,37	1	33	6
8	0,16		5,812	1	16	4
9	0,484		7,722	1	46	5
10	0,419		8,417	1	33	6
11	0,434		8,31	1	36	6
12	0,195		13	1	63	9
13	0,395		6,582	1	23	4
14	0,449		7,756	1	34	6
15	0,18		6,444	1	28	4
16	0,449		8,656	1	41	7
17	0,25		13,9	1	43	9
18	0,594		8,084	1	37	6
19	0,399		6,112	1	31	4
20	0,544		9,147	1	35	8
21	0,17		5,088	1	17	4
22	0,305		15,803	1	89	8
23	0,474		10,032	1	40	8
24	0,28		15,768	1	69	9
25	0,21		9,619	1	42	6
26	0,22		6,318	1	30	5
27	0,854		44,842	1	255	14
28	0,18		4,278	1	16	3
29	0,145		5,483	1	16	4
30	0,33		30,227	1	136	16
31	0,969		66,268	1	255	19
32	0,24		6,396	1	25	5
33	0,33		5,697	1	17	4
34	0,145		4,655	1	16	4

Mittelwert = 0,357

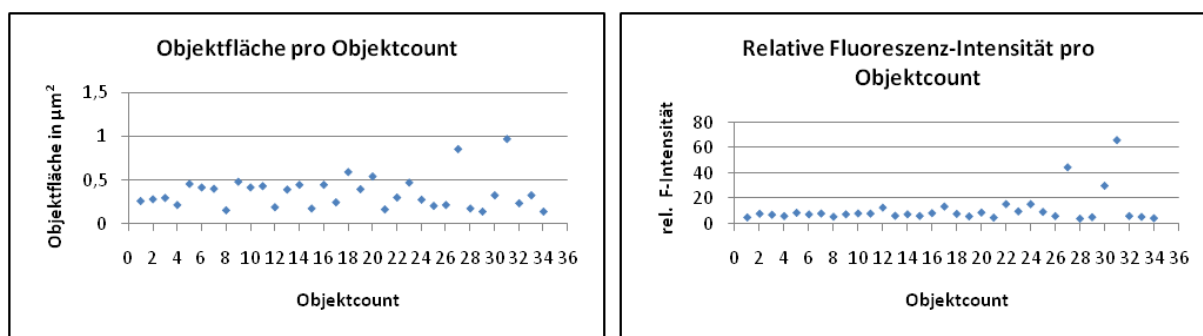


Abbildung 57: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 5 erzielt wurden. Die Diagramme, die die berechnete Objektanzahl pro Objektcount enthalten, fehlen, da keine Mehrfachereignisse erfasst wurden.

Stack 7 – Inkubationszeit 4 h

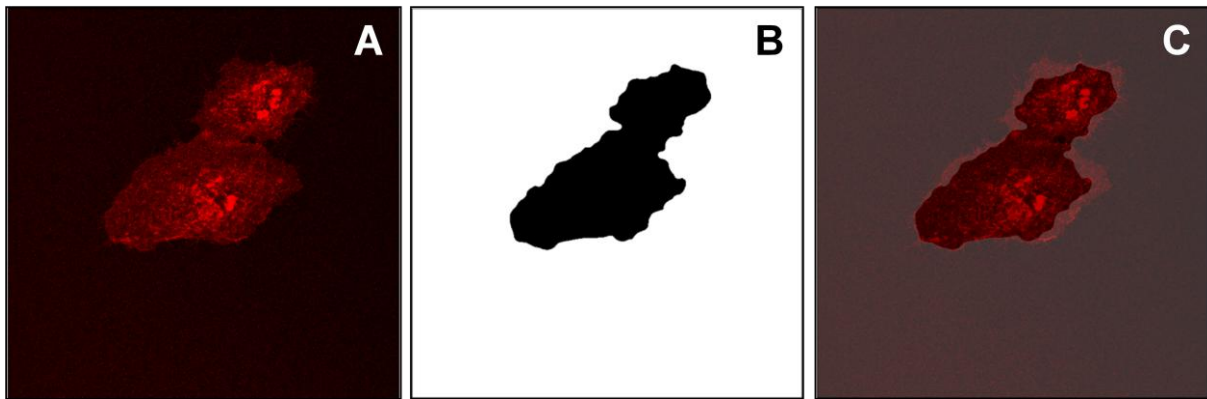


Abbildung 58: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 7 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

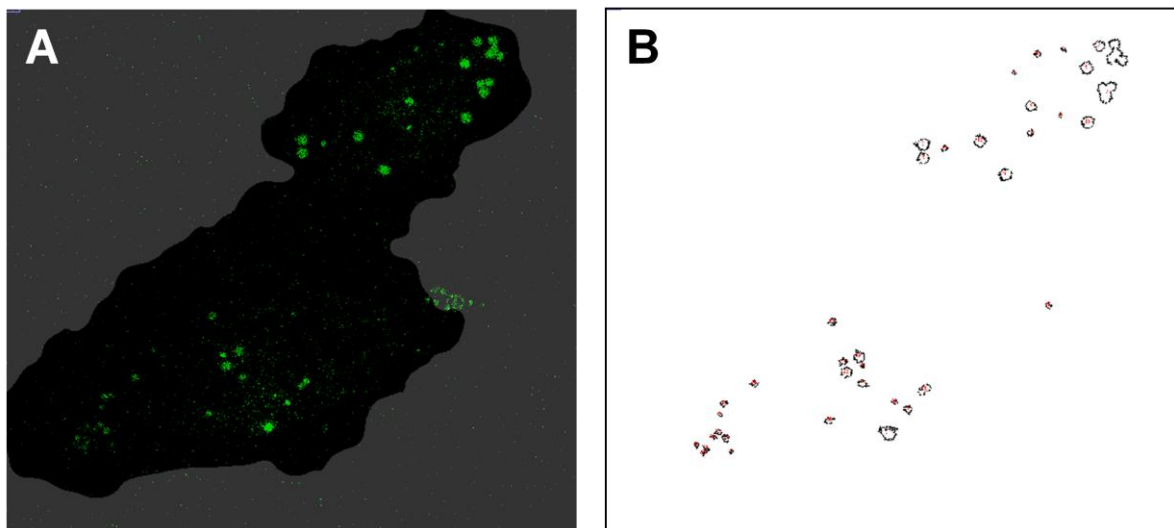


Abbildung 59: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 25: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	38	44	48,7

Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 4 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	4,759	6,36	10,116	1	43	8
2	1,303	1,74	9,207	1	72	7
3	0,165	0,22	7,455	1	25	7
4	0,434	0,58	6,655	1	28	5
5	1,888	2,52	14,847	1	54	14
6	0,170	0,23	11,235	1	38	6
7	4,245	5,67	10,527	1	51	9
8	1,228	1,64	11,484	1	42	9
9	0,170	0,23	6,059	1	33	5
10	1,868	2,50	10,917	1	44	9
11	0,429	0,57	15,395	1	67	10
12	1,693	2,26	9,676	1	38	8
13	1,753	2,34	9,396	1	47	7
14	0,380	0,51	7,408	1	28	6
15	1,468	1,96	8,755	1	37	7
16	1,773	2,37	10,648	1	58	8
17	0,290	0,39	6,052	1	29	4
18	0,574	0,77	6,922	1	29	5
19	1,228	1,64	6,675	1	29	5
20	0,574	0,77	13,243	1	80	9
21	0,150	0,20	5,467	1	21	3
22	1,328	1,77	10,346	1	45	8
23	0,679	0,91	7,279	1	41	6
24	0,414	0,55	7,096	1	28	6
25	1,258	1,68	9,722	1	36	8
26	0,240	0,32	21,979	1	113	11
27	0,360	0,48	7,639	1	26	6
28	0,689	0,92	24,449	1	107	13
29	0,170	0,23	5,765	1	16	5
30	0,584	0,78	8,299	1	37	6
31	2,417	3,23	27,031	1	194	10
32	0,320	0,43	5,812	1	26	4
33	0,504	0,67	6,535	1	21	5
34	0,185	0,25	6,297	1	27	5
35	0,240	0,32	5,833	1	18	5
36	0,185	0,25	4,946	1	18	4
37	0,160	0,21	4,688	1	15	4
38	0,175	0,23	4,829	1	18	4

Mittelwert = 0,748

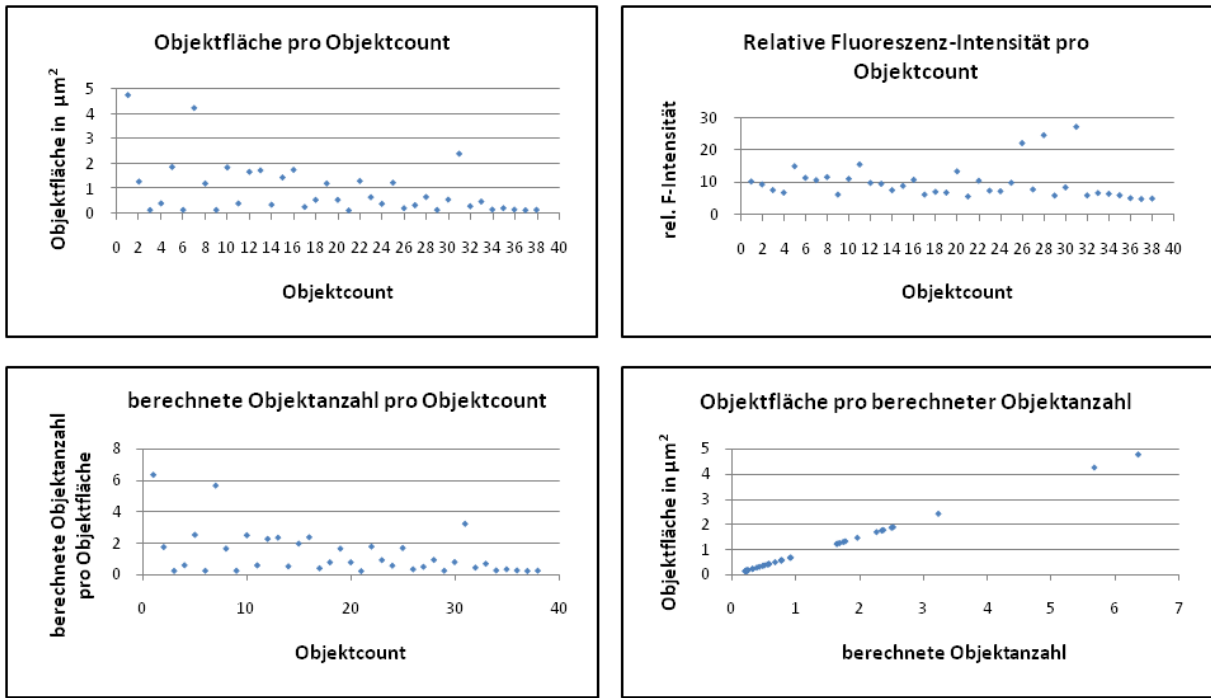


Abbildung 60: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 7 erzielt wurden.

Stack 8 – Inkubationszeit 4 h

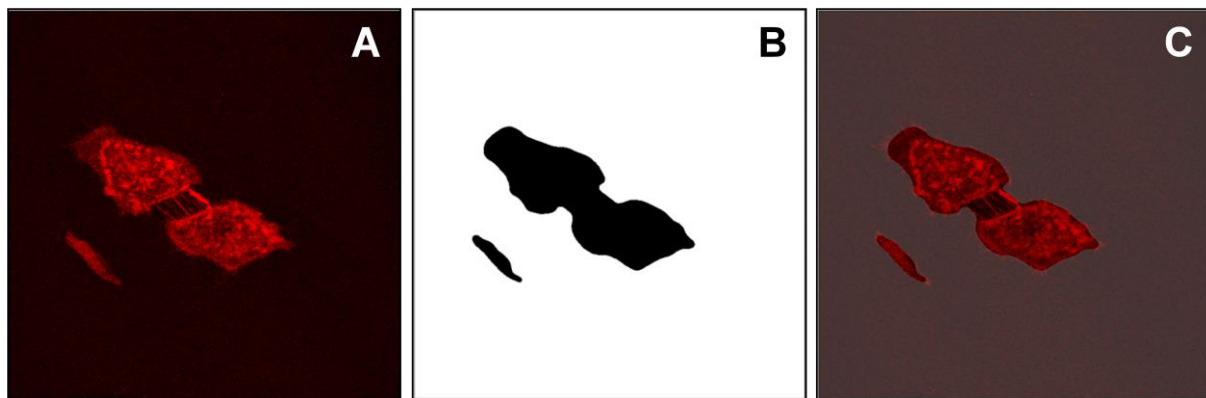


Abbildung 61: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 8 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

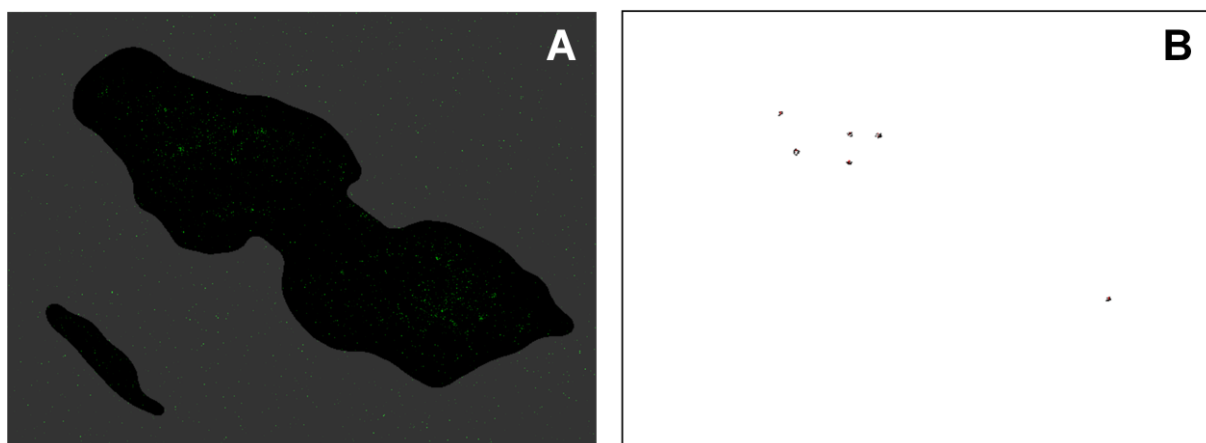


Abbildung 62: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 27: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	6	6	6

Tabelle 28: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 4 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,160	entfällt Grund: keine Mehrfachereignisse	5,500	1	18	5
2	0,255		7,294	1	31	6
3	0,230		5,717	1	31	4
4	0,315		6,413	1	32	5
5	0,145		7,862	1	19	6
6	0,175		7,086	1	21	5

Mittelwert = 0,213

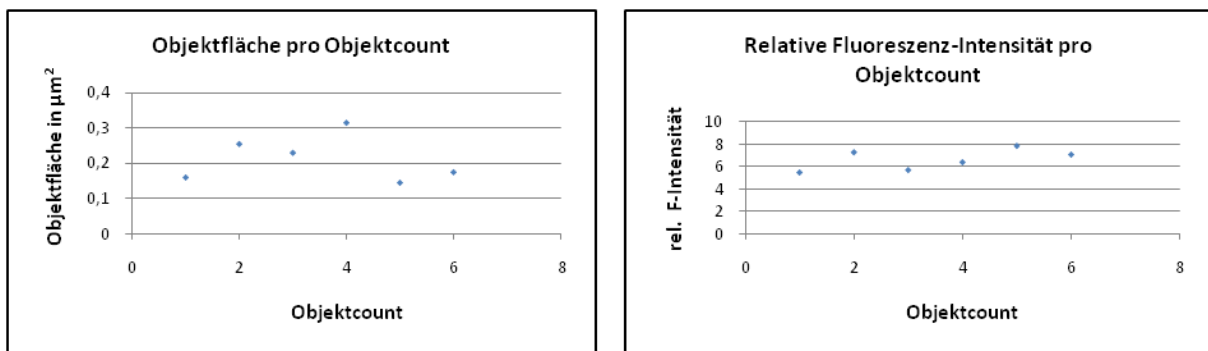


Abbildung 63: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 5 erzielt wurden. Die Diagramme, die die berechnete Objektanzahl pro Objektcount enthalten, fehlen, da keine Mehrfachereignisse erfasst wurden.

Stack 9 – Inkubationszeit 4 h

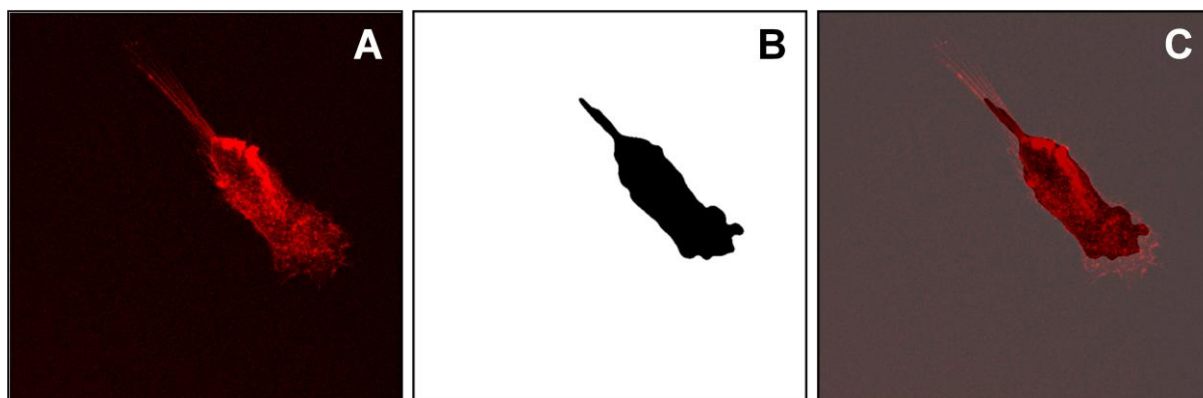


Abbildung 64: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 9 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

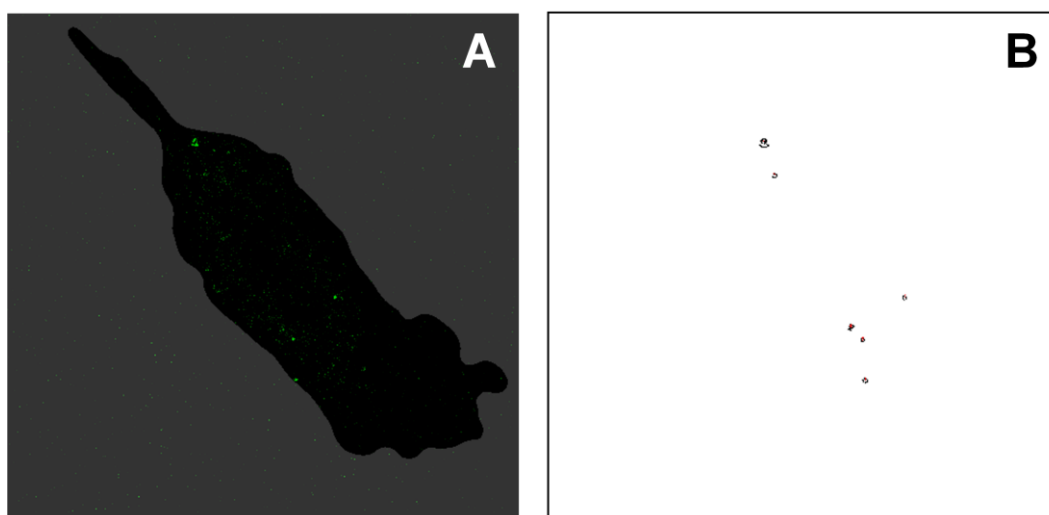


Abbildung 65: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 29: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	6	6	6

Tabelle 30: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 9 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,759	entfällt Grund: keine Mehrfachereignisse	16,382	1	58	12
2	0,190		5,868	1	41	4
3	0,220		29,750	1	111	22
4	0,200		4,550	1	14	4
5	0,195		15,205	1	50	10
6	0,250		22,820	1	92	19

Mittelwert = 0,302

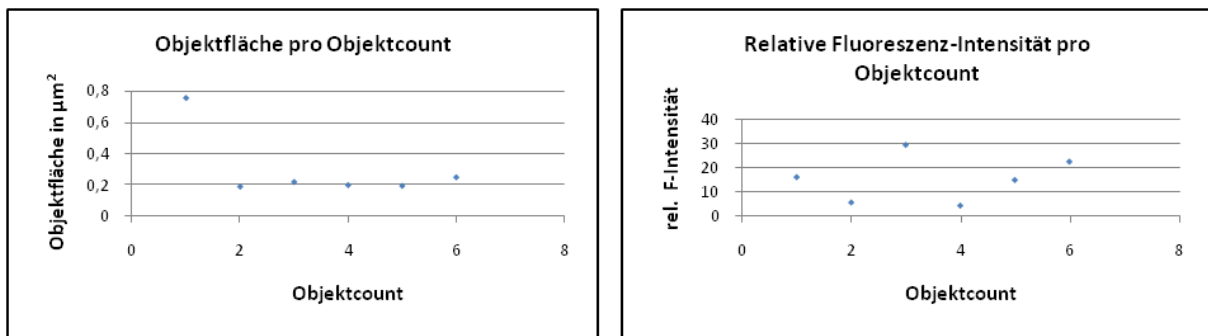


Abbildung 66: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 9 erzielt wurden. Die Diagramme, die die berechnete Objektanzahl pro Objektcount enthalten, fehlen, da keine Mehrfachereignisse erfasst wurden.

Stack 10 – Inkubationszeit 4 h

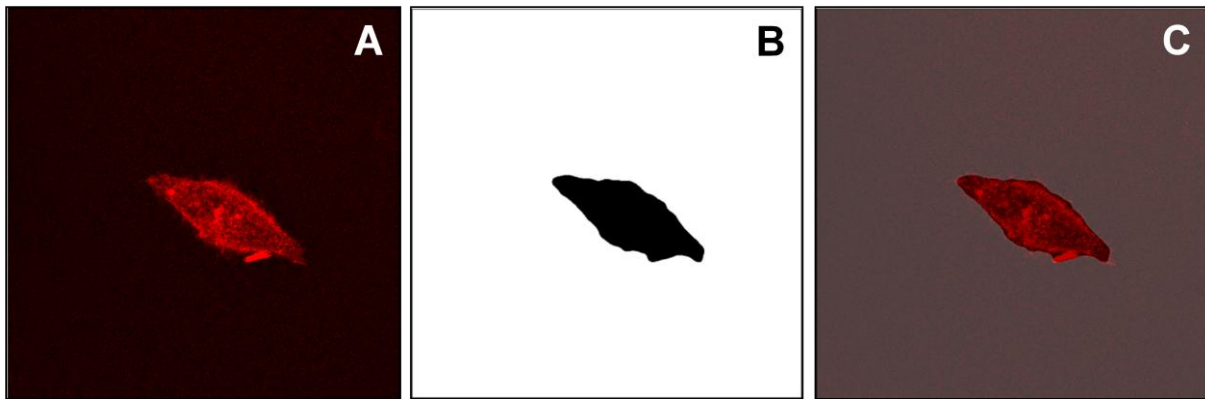


Abbildung 67: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 10 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

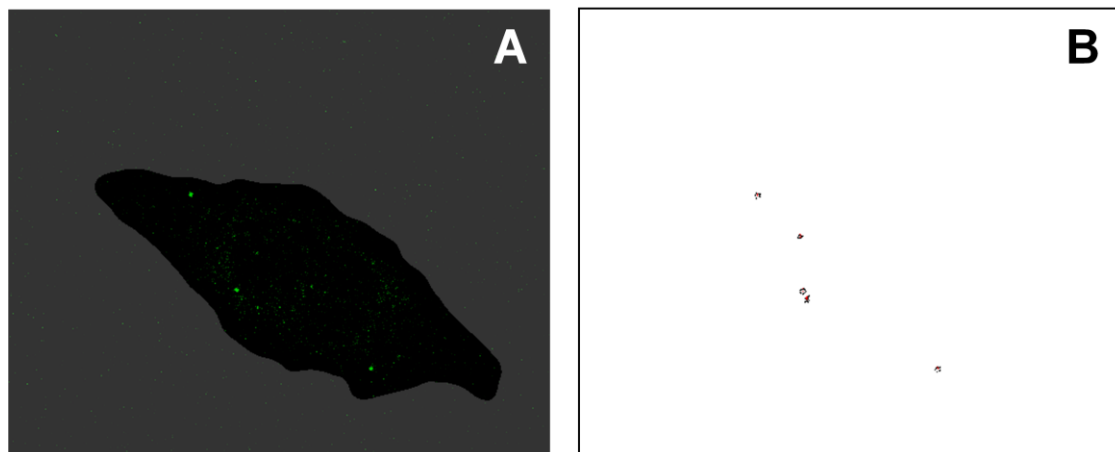


Abbildung 68: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 31: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	5	5	5

Tabelle 32: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 9 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,380	entfällt Grund: keine Mehrfachereignisse	33,066	1	146	20
2	0,155		7,032	1	20	5
3	0,380		26,487	1	117	16
4	0,170		6,882	1	31	5
5	0,305		20,115	1	72	13

Mittelwert = 0,278

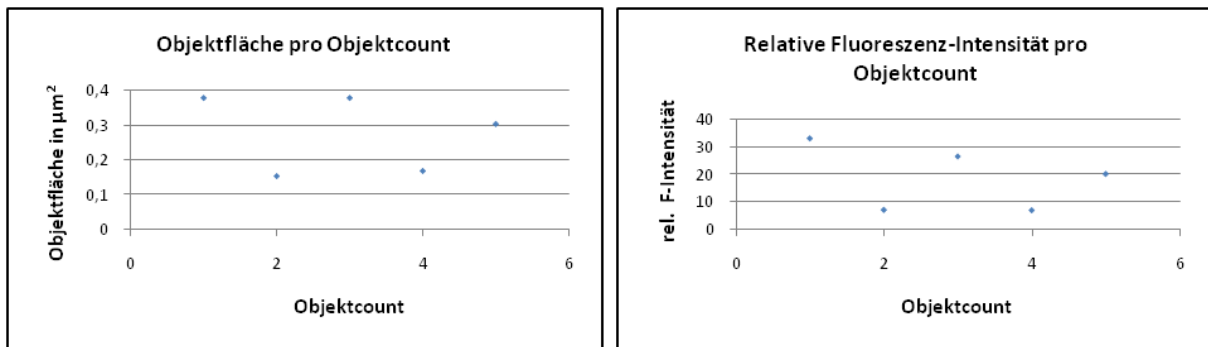


Abbildung 69: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 9 erzielt wurden. Die Diagramme, die die berechnete Objektanzahl pro Objektcount enthalten, fehlen, da keine Mehrfachereignisse erfasst wurden.

Stack 11 – Inkubationszeit 4 h



Abbildung 70: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 11 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

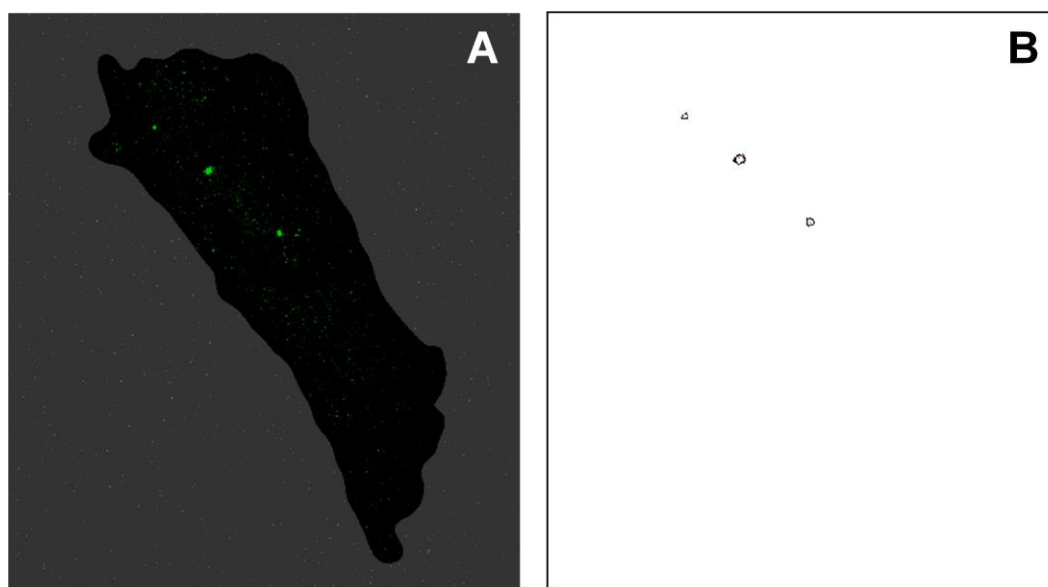


Abbildung 71: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 33: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	3	3	3

Tabelle 34: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 11 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,33	entfällt Grund: keine Mehrfachereignisse	14,288	1	70	9
2	1,019		51,941	1	255	14
3	0,629		35,873	1	172	16

Mittelwert = 0,659

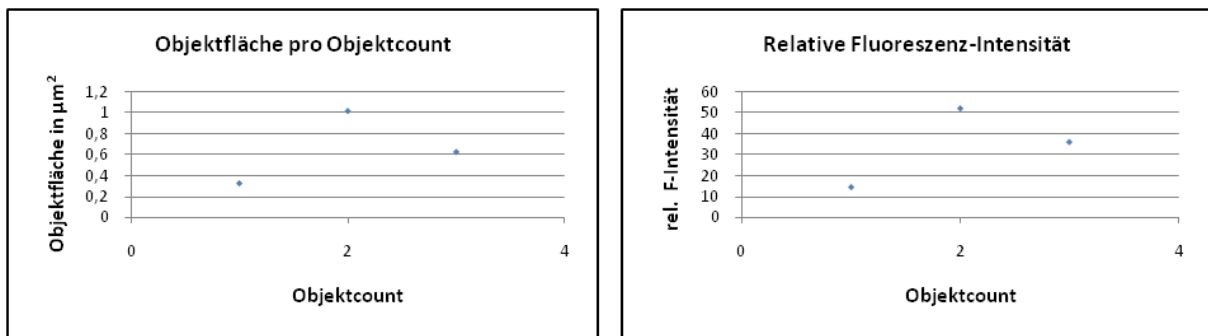


Abbildung 72: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 11 erzielt wurden. Die Diagramme, die die berechnete Objektanzahl pro Objektcount enthalten, fehlen, da keine Mehrfachereignisse erfasst wurden.

Stack 12 – Inkubationszeit 4 h

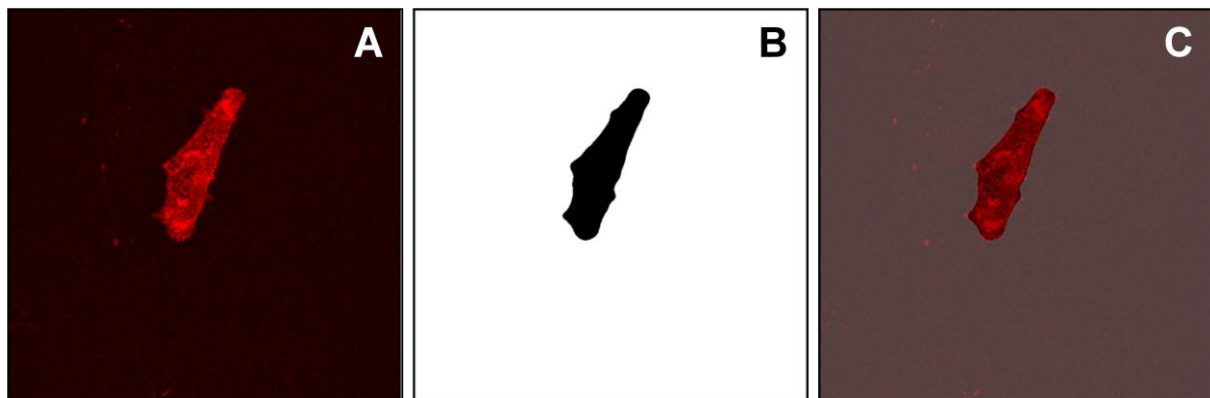


Abbildung 73: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 11 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

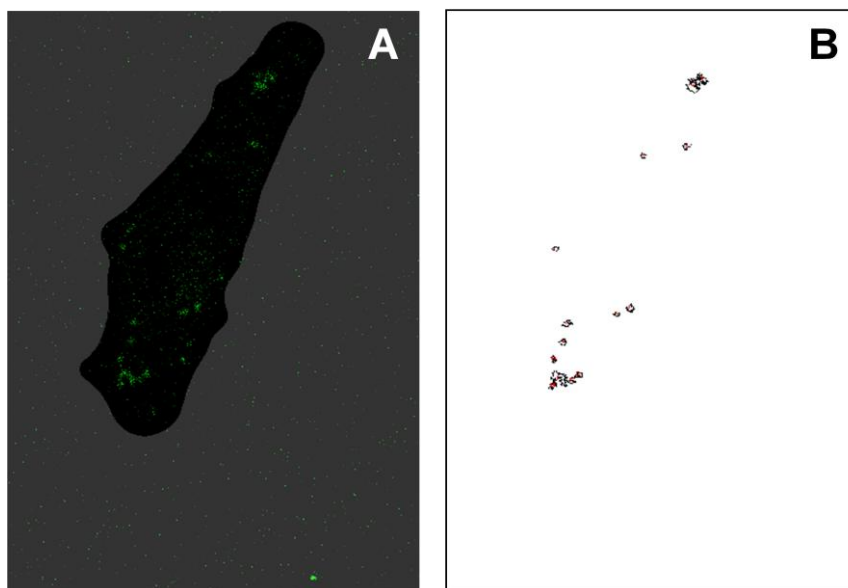


Abbildung 74: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 35: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	14	21	21,2

Tabelle 36: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 4 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,614	1,85	5,585	1	23	4
2	1,398	4,22	5,739	1	26	5
3	0,335	1,01	6,940	1	24	5
4	0,260	0,79	6,481	1	21	5
5	0,245	0,74	5,347	1	19	5
6	0,504	1,52	7,109	1	32	6
7	0,230	0,69	6,674	1	28	5
8	0,404	1,22	4,580	1	17	3
9	0,370	1,12	5,014	1	21	4
10	0,235	0,71	4,532	1	12	4
11	1,358	4,10	5,702	1	27	5
12	0,355	1,07	7,859	1	29	7
13	0,330	1,00	5,561	1	22	4
14	0,375	1,13	6,147	1	25	4

Mittelwert = 0,331

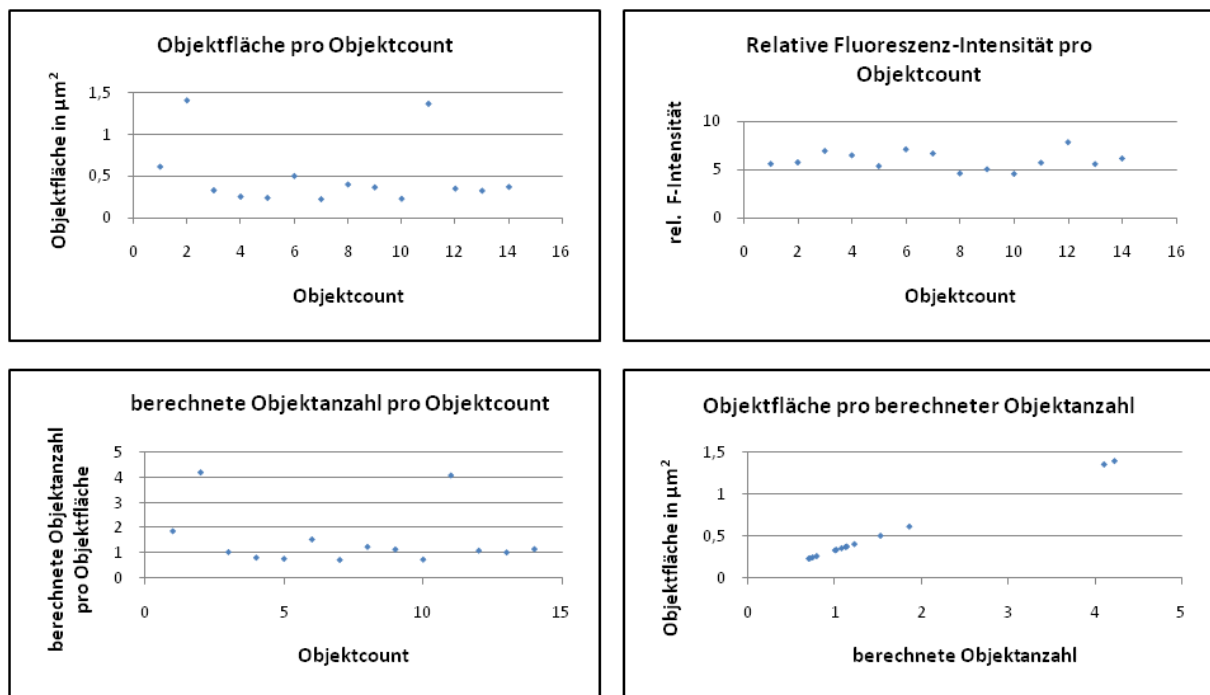


Abbildung 75: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 11 erzielt wurden.

Stack 1 – Inkubationszeit 24 h

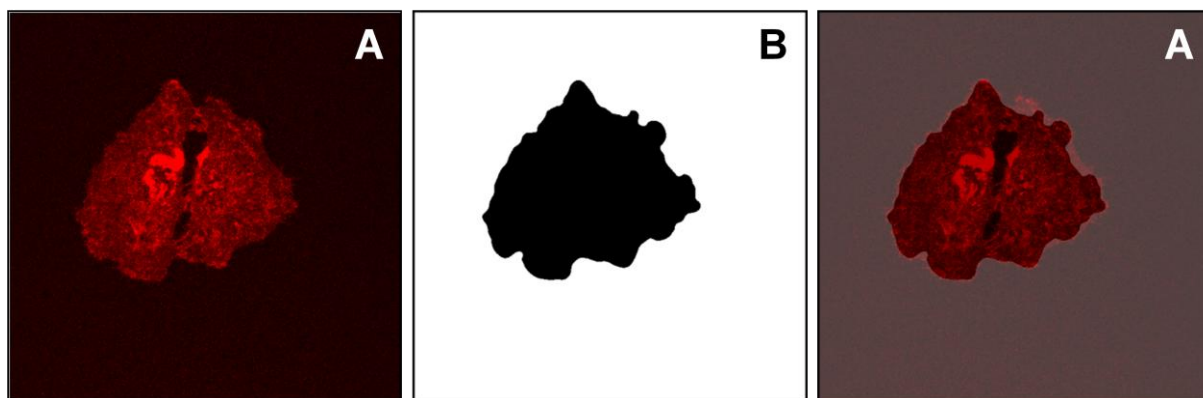


Abbildung 76: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 1 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

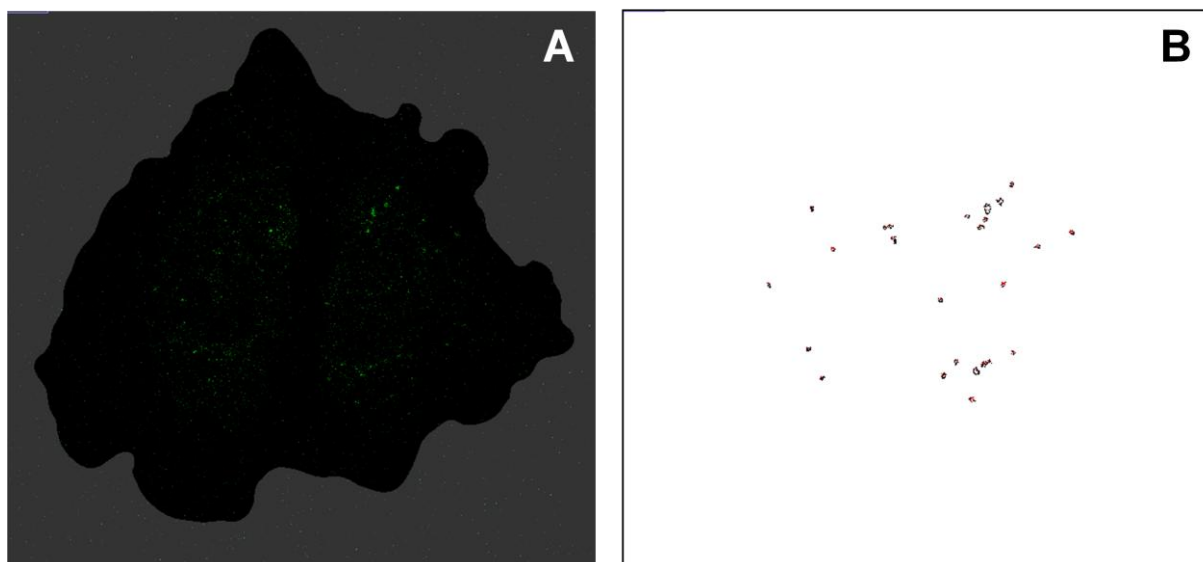


Abbildung 77: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 37: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	25	26	27,5

Tabelle 38: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 1 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,220	1,08	7,341	1	27	6
2	0,404	1,98	6,222	1	22	5
3	0,714	3,49	8,035	1	30	6
4	0,160	0,78	4,719	1	16	4
5	0,155	0,76	4,484	1	12	3
6	0,215	1,05	5,907	1	23	4
7	0,150	0,73	4,100	1	14	4
8	0,305	1,49	8,016	1	50	5
9	0,185	0,90	21,541	1	81	16
10	0,165	0,81	5,636	1	12	5
11	0,260	1,27	5,423	1	25	4
12	0,155	0,76	6,419	1	21	6
13	0,175	0,86	8,829	1	51	6
14	0,150	0,73	6,600	1	18	7
15	0,155	0,76	5,548	1	19	5
16	0,170	0,83	6,118	1	17	5
17	0,175	0,86	6,657	1	26	4
18	0,150	0,73	7,067	1	23	6
19	0,175	0,86	5,686	1	21	4
20	0,210	1,03	4,024	1	11	4
21	0,215	1,05	5,907	1	17	5
22	0,399	1,95	6,138	1	19	5
23	0,190	0,93	4,789	1	15	4
24	0,160	0,78	5,531	1	15	5
25	0,210	1,03	6,048	1	21	5

Mittelwert = 0,205

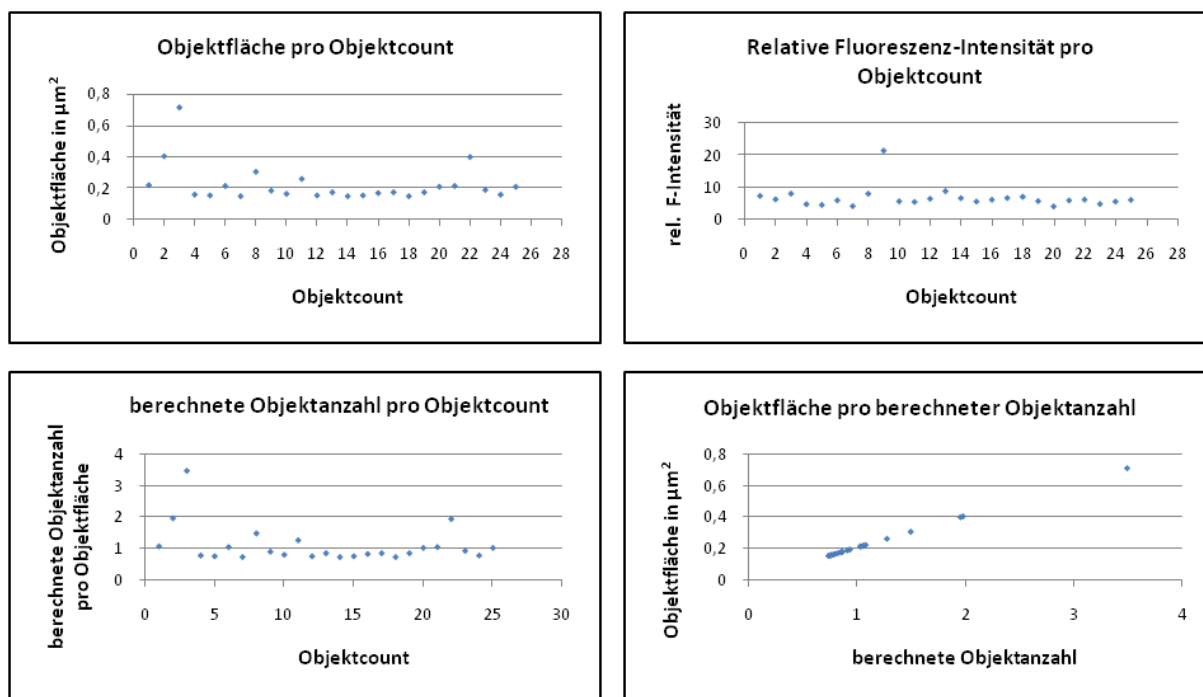


Abbildung 78: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 1 erzielt wurden.

Stack 2 – Inkubationszeit 24 h

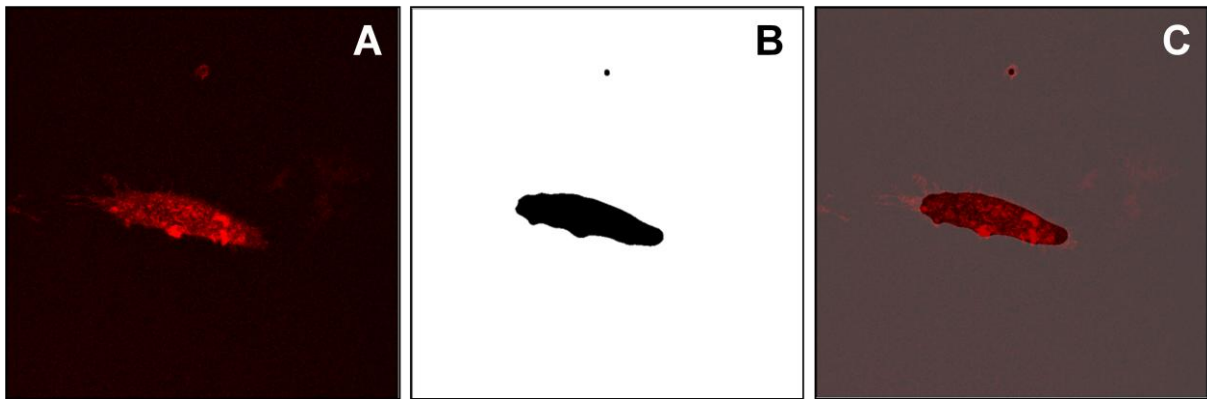


Abbildung 79: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 2 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

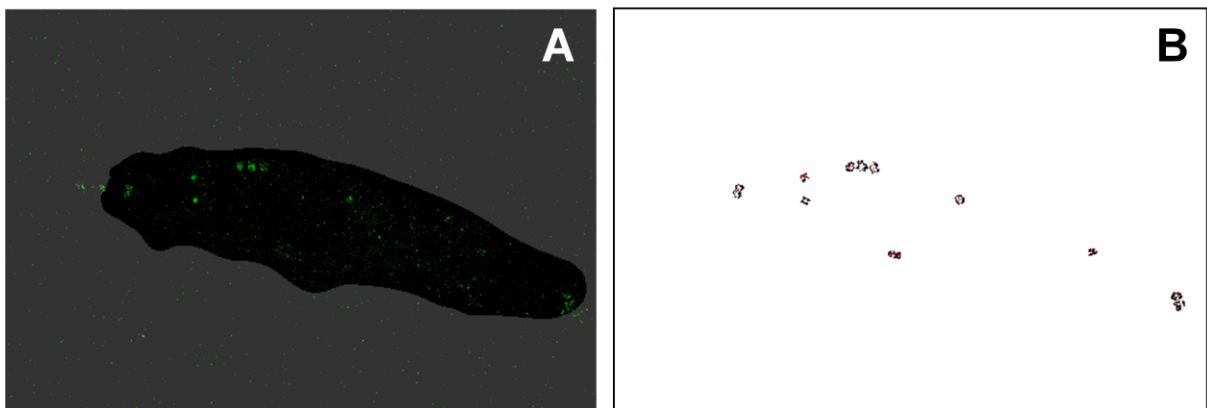


Abbildung 80: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 39: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max. Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	12	13	12,8

Tabelle 40: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 2 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,649	1,62	7,808	1	33	6
2	0,499	1,25	7,510	1	51	6
3	0,509	1,27	7,804	1	27	6
4	0,335	0,84	6,701	1	34	6
5	0,719	1,80	6,854	1	29	6
6	0,479	1,20	6,052	1	28	5
7	0,330	0,83	18,561	1	141	9
8	0,260	0,65	6,885	1	21	6
9	0,170	0,43	5,618	1	30	3
10	0,215	0,54	6,651	1	25	4
11	0,439	1,10	6,057	1	26	4
12	0,509	1,27	5,922	1	24	4

Mittelwert = 0,400

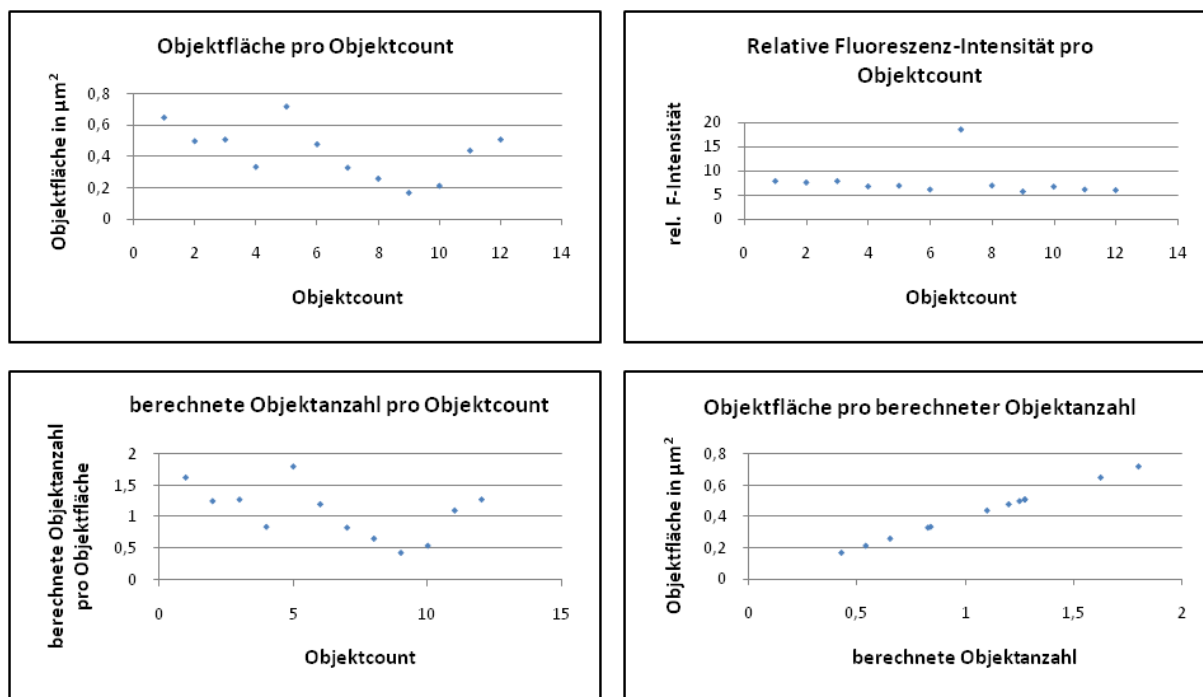


Abbildung 81: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 2 erzielt wurden.

Stack 3 – Inkubationszeit 24 h

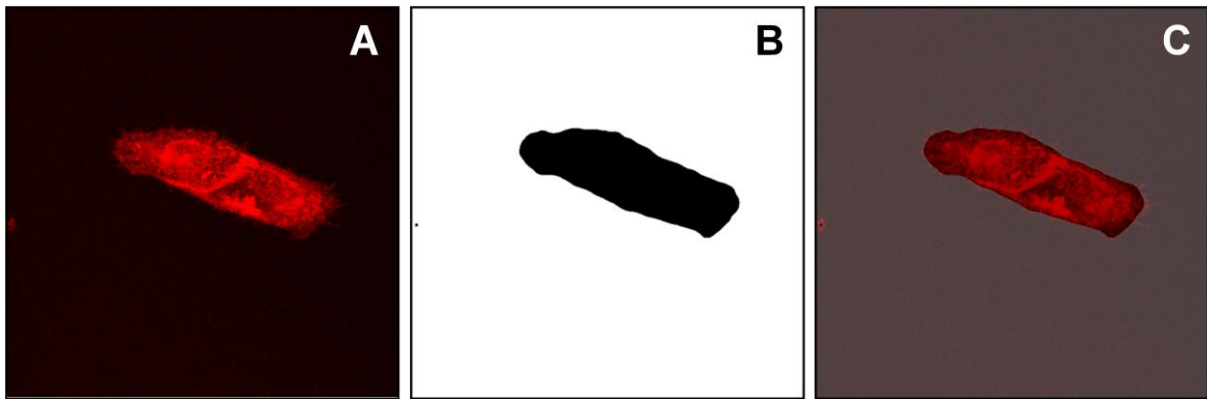


Abbildung 82: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 3 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

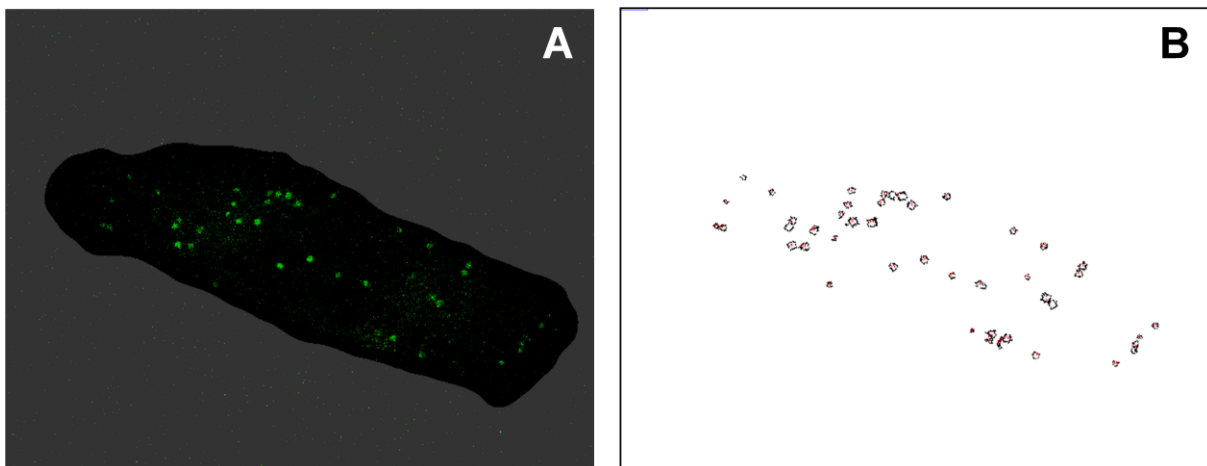


Abbildung 83: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 41: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	41	46	48,1

Tabelle 42: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 3 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,285	0,47	6,579	1	29	5
2	0,559	0,92	7,973	1	28	7
3	0,380	0,63	6,026	1	22	5
4	0,534	0,88	8,140	1	32	7
5	2,062	3,40	9,249	1	45	7
6	0,609	1,01	7,984	1	43	5
7	0,679	1,12	8,412	1	46	6
8	0,205	0,34	5,951	1	31	4
9	1,009	1,67	9,119	1	35	7
10	0,744	1,23	9,396	1	49	6
11	0,419	0,69	9,762	1	47	7
12	1,513	2,50	9,974	1	65	7
13	1,154	1,90	11,061	1	84	6
14	1,218	2,01	10,816	1	39	8
15	0,325	0,54	6,662	1	19	5
16	0,494	0,82	6,707	1	33	5
17	0,884	1,46	8,220	1	36	6
18	0,524	0,86	9,010	1	40	7
19	0,185	0,31	3,568	1	10	3
20	1,059	1,75	11,316	1	50	10
21	0,924	1,52	8,443	1	35	6
22	0,679	1,12	7,625	1	45	6
23	0,884	1,46	14,463	1	51	13
24	0,784	1,29	7,815	1	33	6
25	0,844	1,39	12,994	1	59	9
26	0,784	1,29	9,815	1	50	7
27	0,529	0,87	9,094	1	28	8
28	0,280	0,46	6,696	1	29	5
29	0,904	1,49	7,967	1	42	6
30	0,310	0,51	7,500	1	40	6
31	1,978	3,26	7,995	1	39	6
32	0,439	0,72	6,591	1	23	6
33	0,180	0,30	5,361	1	19	5
34	0,799	1,32	6,262	1	33	5
35	1,004	1,66	9,642	1	39	7
36	0,215	0,35	5,628	1	28	5
37	0,409	0,68	5,780	1	20	4
38	0,310	0,51	7,887	1	41	5
39	0,864	1,43	6,925	1	28	5
40	0,724	1,19	7,593	1	36	6
41	0,449	0,74	7,344	1	29	6

Mittelwert = 0,606

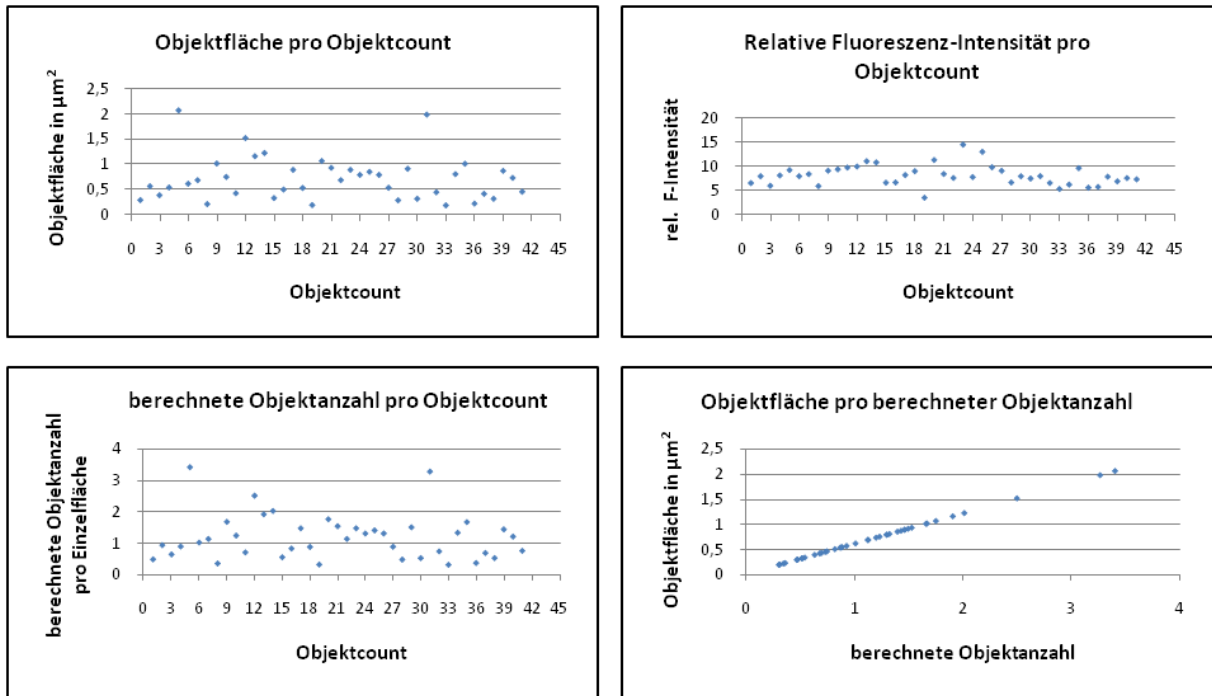


Abbildung 84: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 3 erzielt wurden.

Stack 4 – Inkubationszeit 24 h

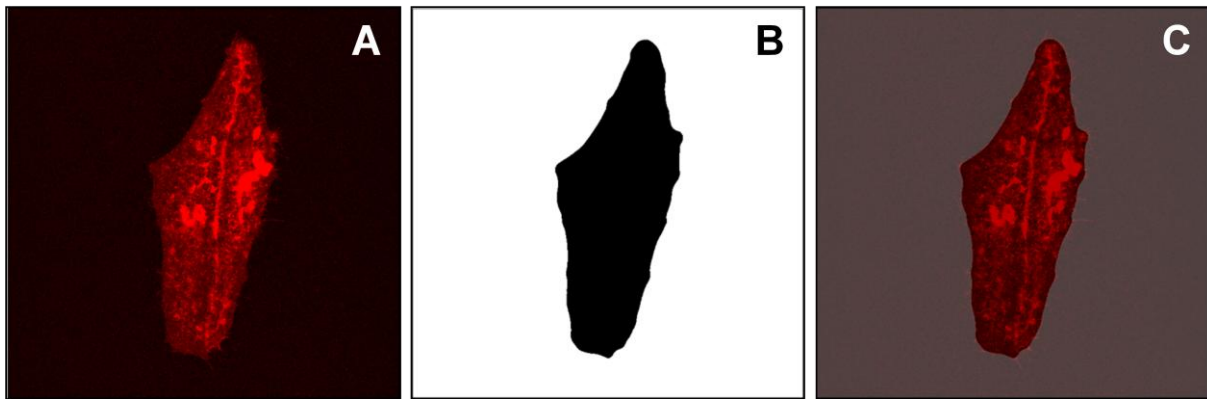


Abbildung 85: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 4 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

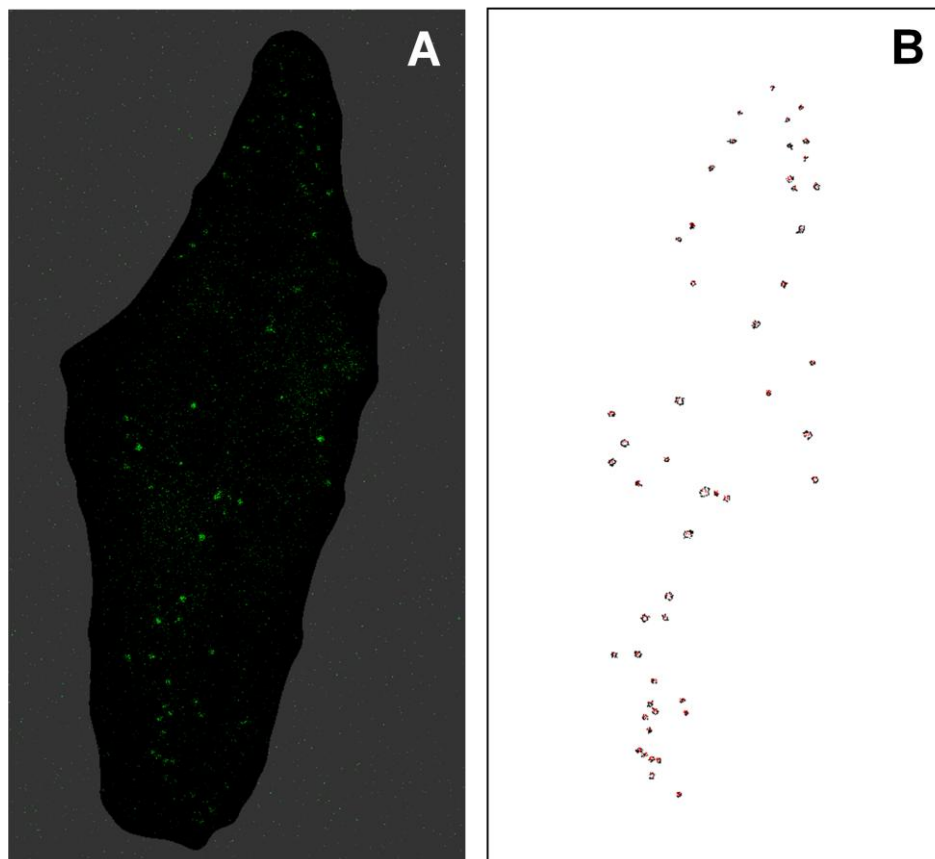


Abbildung 86: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 43: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	50	51	52,1

Tabelle 44: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 4 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen. Die Weiterführung der Tabelle erfolgt auf der nachfolgenden Seite.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,160	0,51	6,625	1	23	5
2	0,180	0,57	8,556	1	24	6
3	0,145	0,46	5,069	1	15	3
4	0,155	0,49	5,129	1	19	4
5	0,290	0,92	7,190	1	26	6
6	0,290	0,92	5,293	1	22	4
7	0,205	0,65	5,512	1	17	4
8	0,215	0,68	6,233	1	25	4
9	0,225	0,71	7,267	1	24	5
10	0,404	1,28	6,568	1	23	5
11	0,390	1,23	7,628	1	28	6
12	0,195	0,62	5,513	1	16	4
13	0,190	0,60	5,500	1	27	4
14	0,464	1,46	7,140	1	20	6
15	0,225	0,71	5,200	1	15	5
16	0,215	0,68	7,000	1	29	6
17	0,340	1,07	5,529	1	18	4
18	0,569	1,80	6,807	1	28	6
19	0,260	0,82	6,981	1	29	5
20	0,195	0,62	13,590	1	65	6
21	0,684	2,16	8,467	1	38	6
22	0,355	1,12	6,268	1	33	5
23	0,704	2,22	9,674	1	33	9
24	0,589	1,86	9,203	1	37	8
25	0,220	0,69	8,409	1	27	6
26	0,454	1,43	5,165	1	21	5
27	0,350	1,10	6,471	1	26	5
28	0,255	0,80	5,980	1	25	4
29	0,999	3,15	9,230	1	54	7
30	0,180	0,57	6,806	1	15	6
31	0,385	1,22	8,338	1	55	6

32	0,729	2,30	9,240	1	41	8
33	0,679	2,14	8,941	1	38	7
34	0,524	1,65	8,371	1	29	7
35	0,340	1,07	8,015	1	30	7
36	0,479	1,51	6,552	1	31	5
37	0,305	0,96	7,836	1	30	6
38	0,265	0,84	6,283	1	23	5
39	0,150	0,47	6,967	1	24	5
40	0,250	0,79	4,680	1	21	3
41	0,335	1,06	5,776	1	20	4
42	0,180	0,57	6,889	1	18	6
43	0,290	0,92	6,172	1	21	5
44	0,185	0,58	7,243	1	40	5
45	0,245	0,77	6,184	1	22	5
46	0,165	0,52	6,273	1	23	4
47	0,230	0,73	6,543	1	31	5
48	0,215	0,68	4,349	1	14	3
49	0,300	0,95	6,367	1	23	5
50	0,170	0,54	4,735	1	17	4

Mittelwert = 0,317

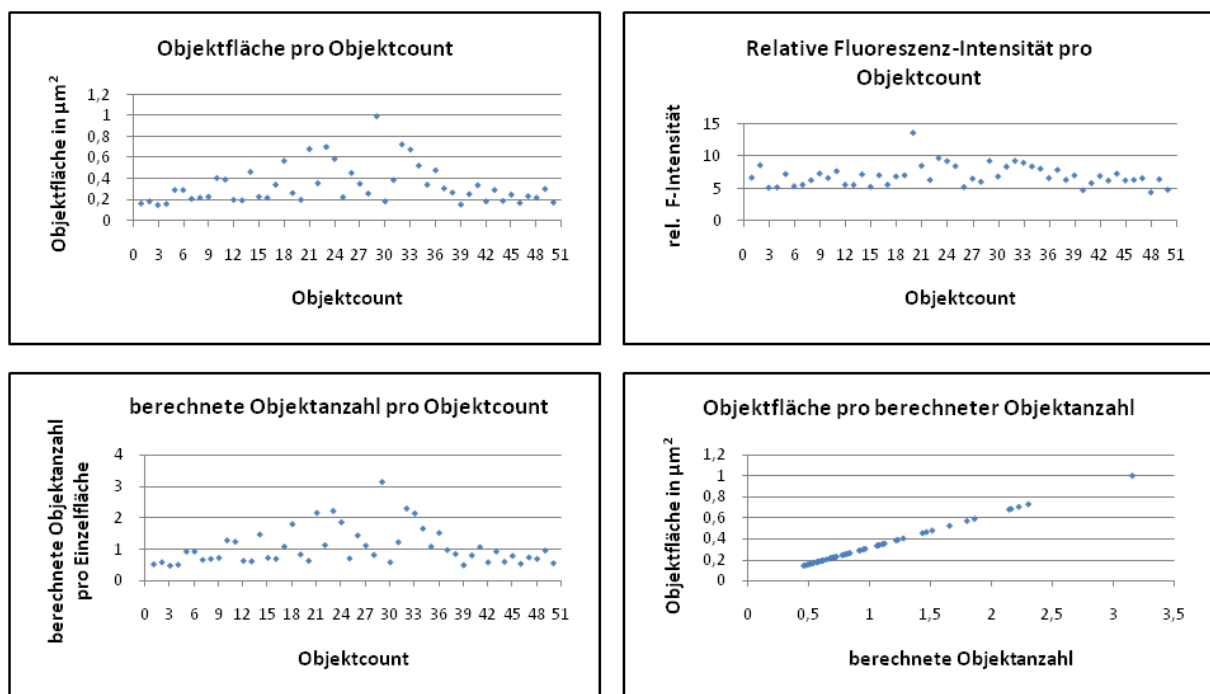


Abbildung 87: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 4 erzielt wurden.

Stack 5 – Inkubationszeit 24 h

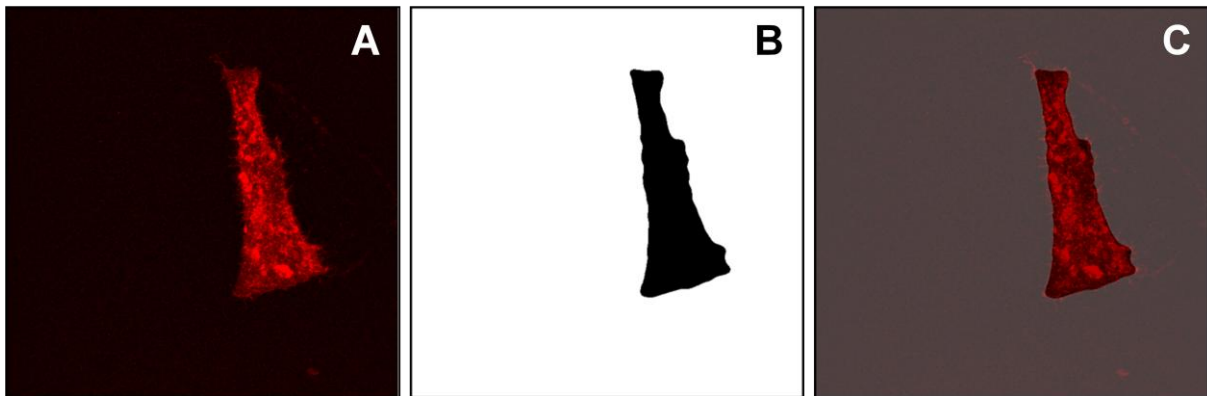


Abbildung 88: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 5 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

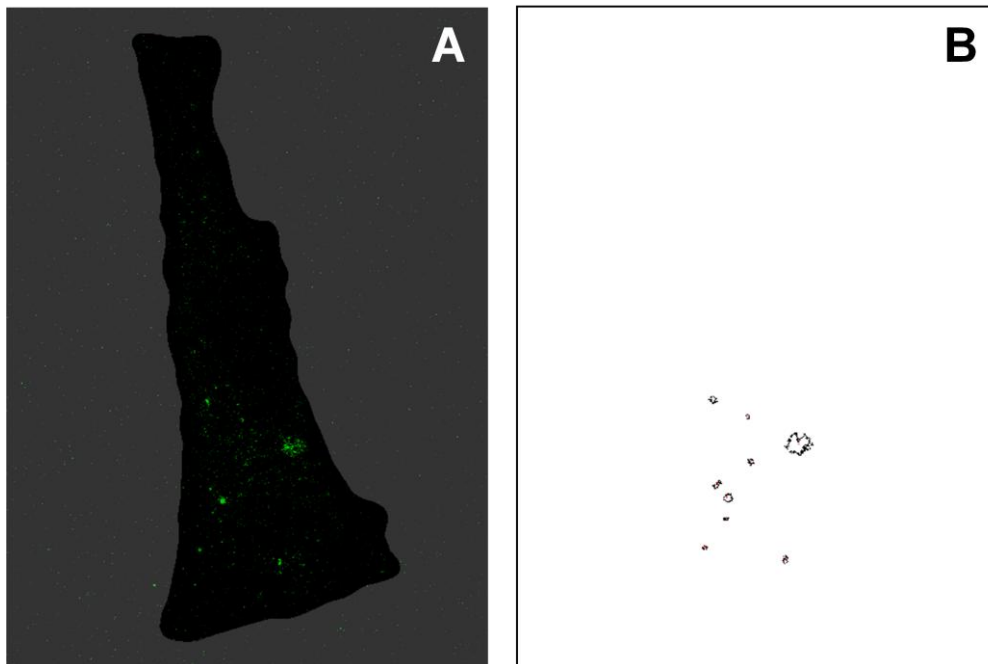


Abbildung 89: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 45: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	9	nicht zu erfassen	19,8

Tabelle 46: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 5 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,524	1,39	10,848	1	63	7
2	0,155	0,41	5,290	1	20	4
3	4,459	11,82	7,396	1	46	5
4	0,320	0,85	7,328	1	39	6
5	0,390	1,03	7,744	1	29	5
6	0,844	2,24	23,639	1	115	11
7	0,150	0,40	8,100	1	29	5
8	0,215	0,57	9,163	1	41	7
9	0,419	1,11	13,321	1	60	9

Mittelwert = 0,377

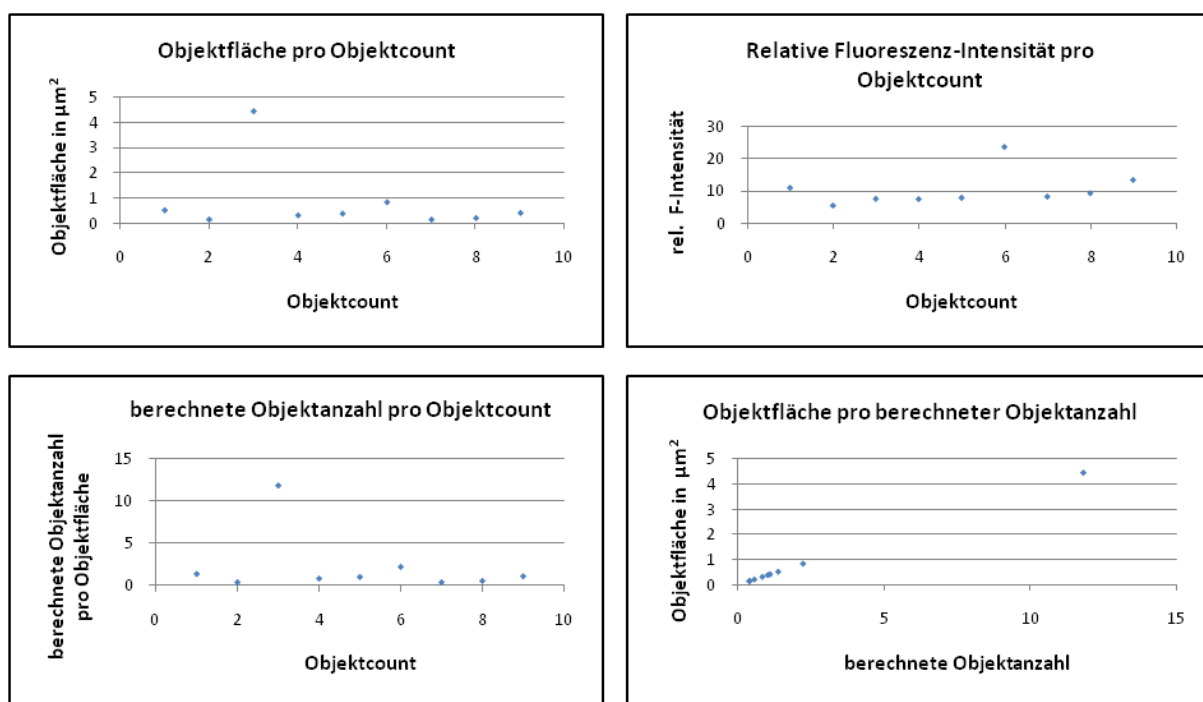


Abbildung 90: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 5 erzielt wurden.

Stack 6 – Inkubationszeit 24 h

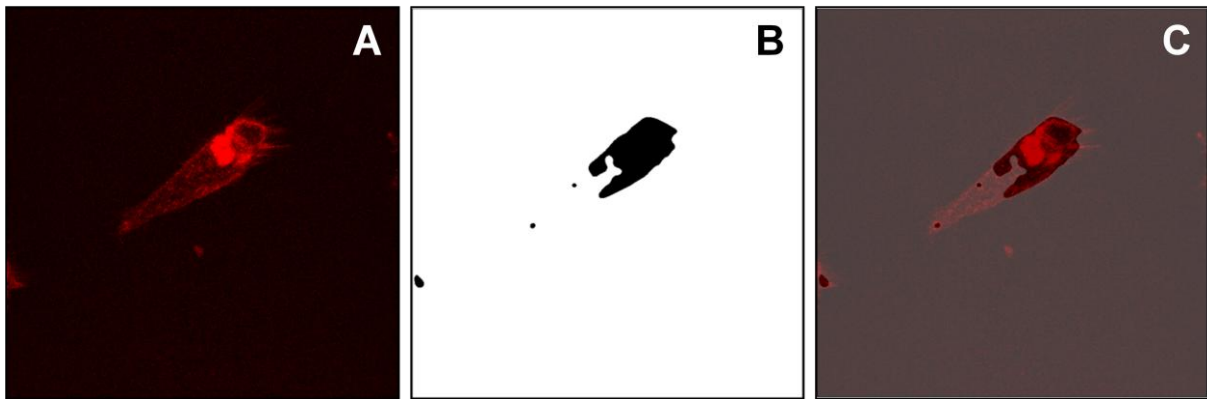


Abbildung 91: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 6 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C). Hier tritt wieder der seltene Fall auf, dass die Form der Zelle nicht mit der Zellmaske übereinstimmt.

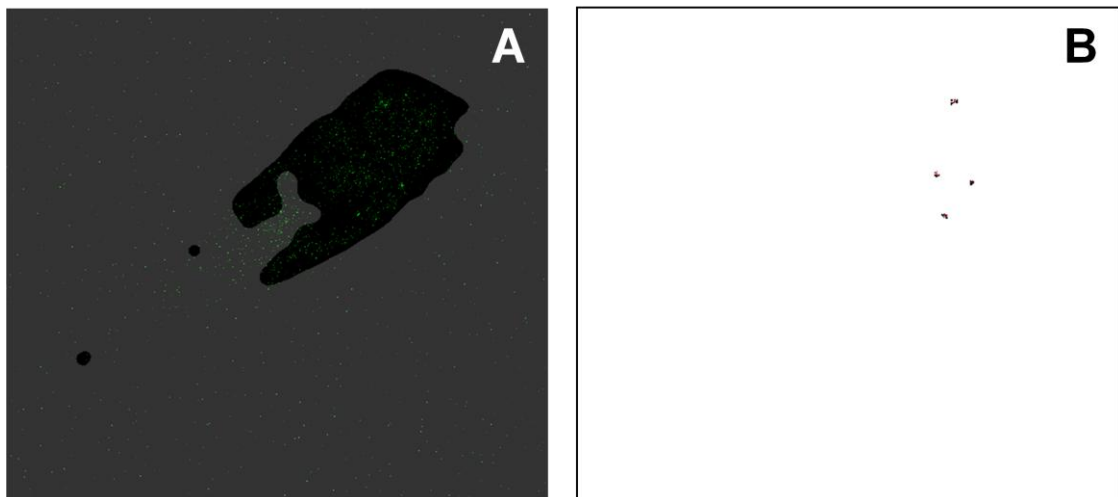


Abbildung 92: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 47: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	4	4	4

Tabelle 48: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 6 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“.

Objektcoun	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,2	entfällt Grund: keine Mehrfachereignisse	5,25	1	24	4
2	0,17		6,294	1	28	5
3	0,165		6,788	1	27	6
4	0,165		5,939	1	20	5

Mittelwert = 0,175

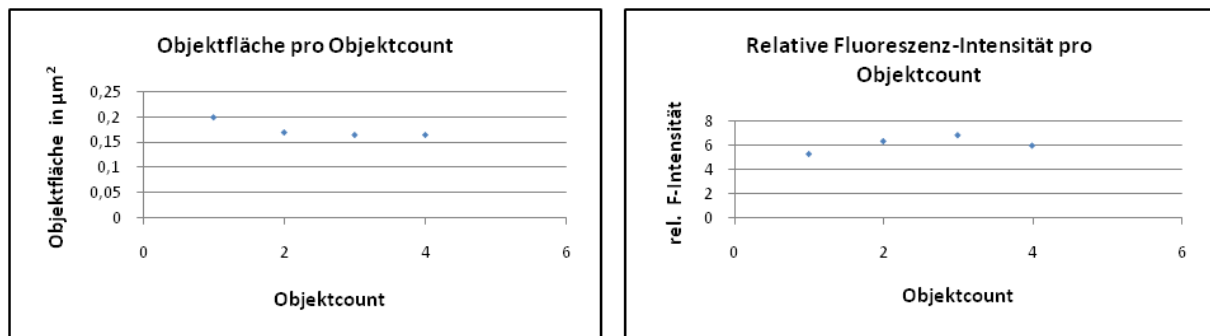


Abbildung 93: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 6 erzielt wurden. Die Diagramme, die die berechnete Objektanzahl pro Objektcoun enthalten, fehlen, da keine Mehrfachereignisse erfasst wurden.

Stack 7 – Inkubationszeit 24 h

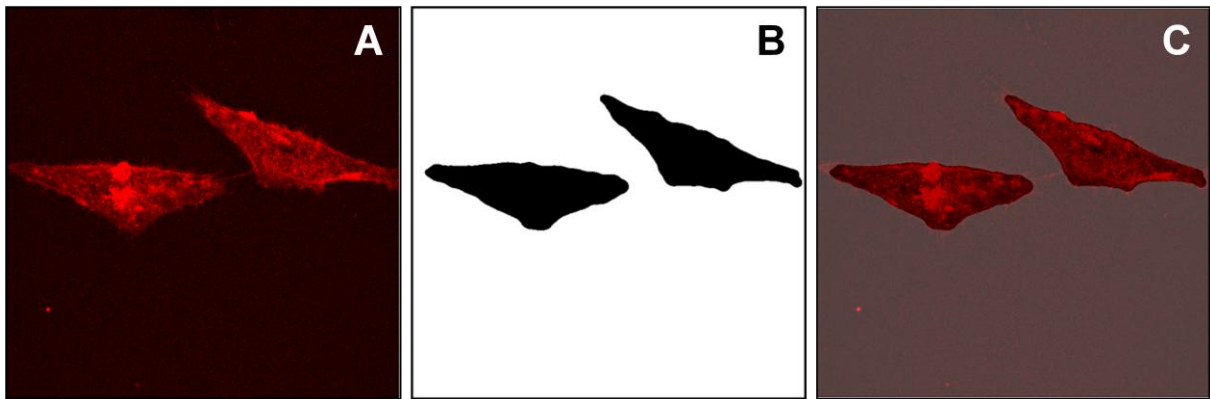


Abbildung 94: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 7 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

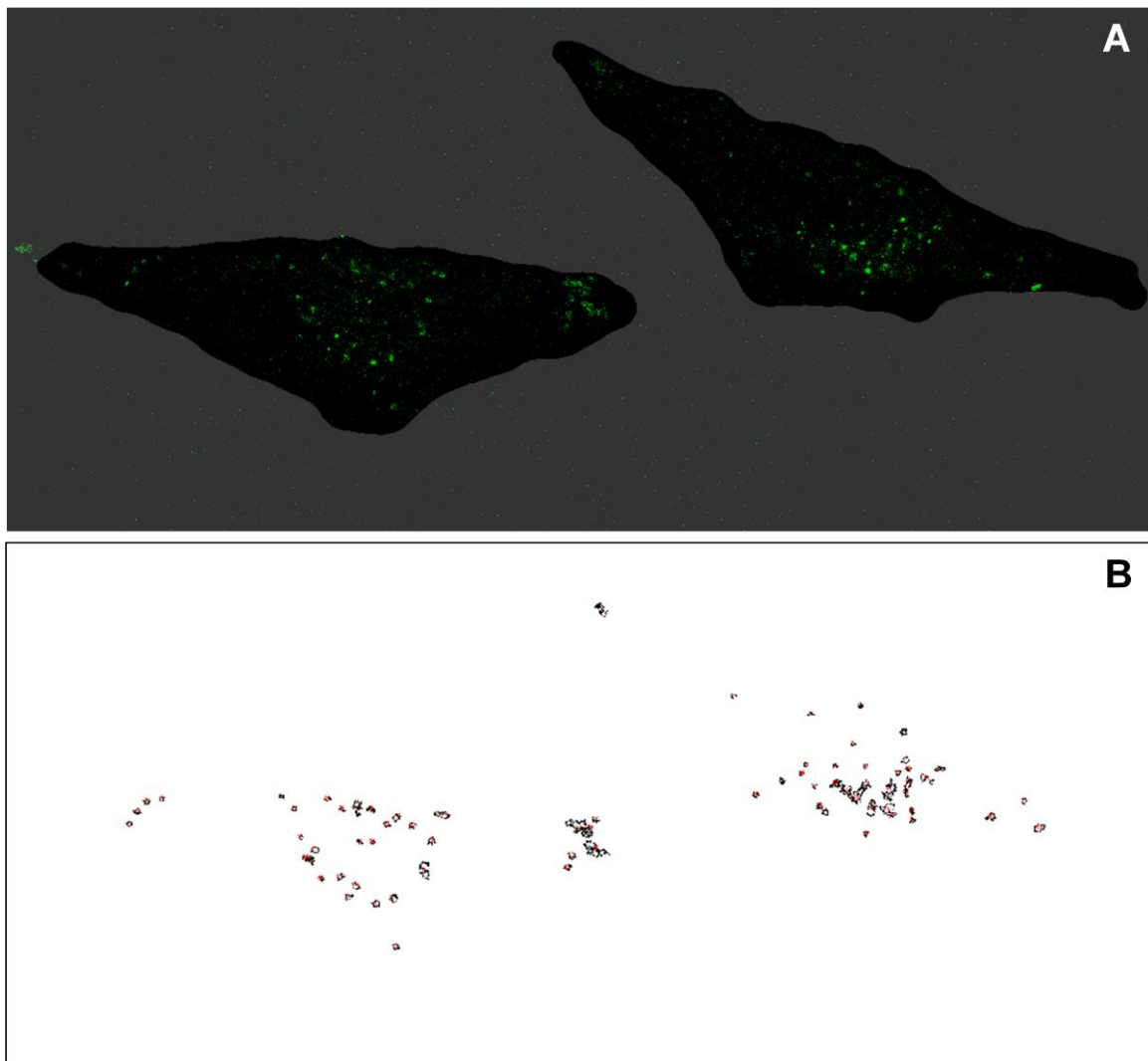


Abbildung 95: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 49: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z- Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	73	89 (schwer zu erfassen)	97,9

Tabelle 50: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 7 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen. Die Weiterführung der Tabelle erfolgt auf der nachfolgenden Seite.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,699	2,42	5,243	1	22	4
2	0,220	0,76	6,159	1	28	5
3	0,195	0,67	4,564	1	15	3
4	0,150	0,52	5,333	1	18	4
5	0,380	1,31	8,605	1	30	6
6	0,150	0,52	7,467	1	25	5
7	0,474	1,64	29,211	1	134	17
8	0,145	0,50	12,345	1	56	6
9	0,165	0,57	13,182	1	47	8
10	0,150	0,52	5,733	1	14	5
11	0,380	1,31	10,053	1	32	7
12	0,175	0,61	9,886	1	41	6
13	0,260	0,90	12,481	1	59	8
14	0,170	0,59	11,912	1	55	9
15	0,380	1,31	8,053	1	27	6
16	0,459	1,59	7,402	1	24	6
17	0,205	0,71	4,463	1	16	3
18	1,228	4,25	6,772	1	44	4
19	0,479	1,66	5,344	1	24	4
20	0,634	2,19	9,732	1	49	5
21	0,210	0,73	15,833	1	52	9
22	0,175	0,61	12,200	1	45	7
23	0,899	3,11	15,572	1	137	7
24	0,200	0,69	5,300	1	21	3
25	0,959	3,32	8,354	1	56	6
26	0,210	0,73	6,238	1	24	5
27	0,145	0,50	4,655	1	16	4
28	0,175	0,61	5,200	1	20	4
29	0,225	0,78	10,600	1	45	7
30	0,295	1,02	6,000	1	22	4

31	0,210	0,73	5,810	1	18	5
32	1,104	3,82	32,466	1	214	8
33	0,844	2,92	7,562	1	45	5
34	0,225	0,78	5,822	1	24	4
35	0,989	3,42	8,061	1	33	6
36	0,260	0,90	3,769	1	14	3
37	0,195	0,67	6,795	1	32	3
38	0,155	0,54	4,194	1	29	3
39	0,155	0,54	7,194	1	26	4
40	0,280	0,97	5,196	1	16	4
41	0,335	1,16	13,224	1	55	6
42	0,235	0,81	7,255	1	32	5
43	0,404	1,40	7,494	1	38	6
44	0,175	0,61	3,600	1	14	2
45	0,424	1,47	5,600	1	25	4
46	0,414	1,43	5,940	1	16	5
47	0,205	0,71	6,951	1	23	5
48	0,185	0,64	5,108	1	16	3
49	2,072	7,16	6,373	1	33	5
50	0,230	0,80	14,326	1	81	7
51	0,315	1,09	10,444	1	33	9
52	0,305	1,05	7,344	1	24	6
53	0,794	2,75	13,566	1	48	11
54	0,180	0,62	6,111	1	19	5
55	0,165	0,57	7,091	1	29	5
56	0,165	0,57	15,515	1	44	10
57	0,429	1,48	7,919	1	30	6
58	0,160	0,55	4,656	1	13	4
59	0,155	0,54	13,258	1	43	12
60	1,833	6,34	6,232	1	27	5
61	0,385	1,33	8,351	1	41	6
62	0,395	1,37	6,759	1	33	5
63	0,335	1,16	4,343	1	28	3
64	0,155	0,54	6,581	2	18	6
65	1,139	3,94	7,136	1	36	6
66	0,260	0,90	6,212	1	17	5
67	0,370	1,28	24,730	1	110	13
68	0,165	0,57	5,909	1	26	4
69	0,315	1,09	7,317	1	29	6
70	0,335	1,16	7,403	1	24	6
71	0,469	1,62	8,128	1	27	7
72	0,434	1,50	28,966	1	166	13
73	0,250	0,86	6,960	1	20	6

Mittelwert = 0,289

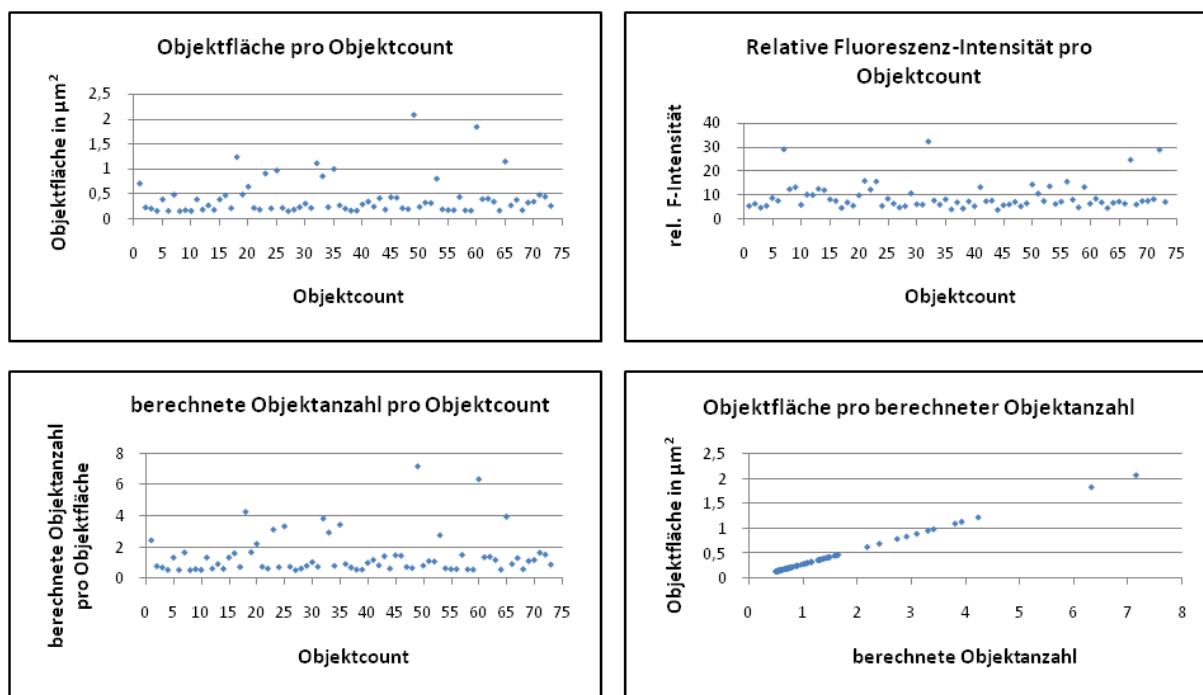


Abbildung 96: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 7 erzielt wurden.

Stack 8 – Inkubationszeit 24 h

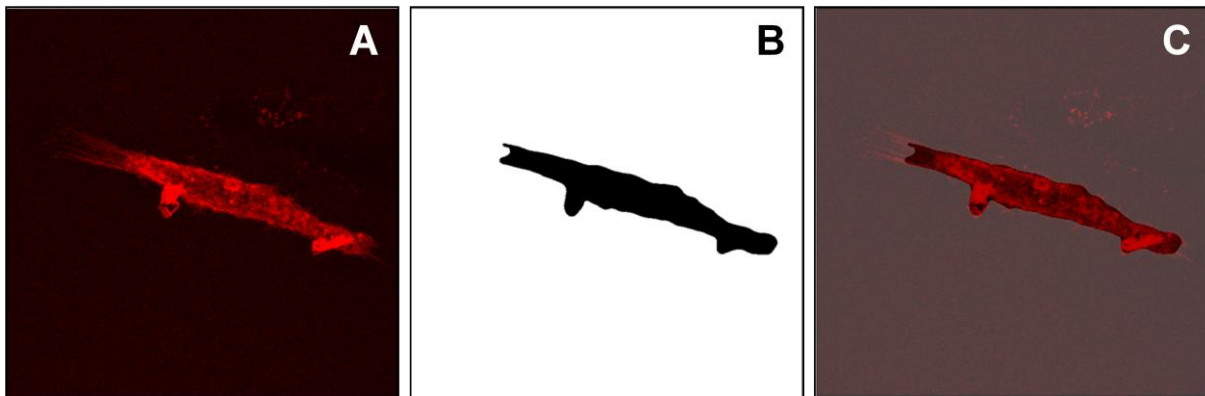


Abbildung 97: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 8 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

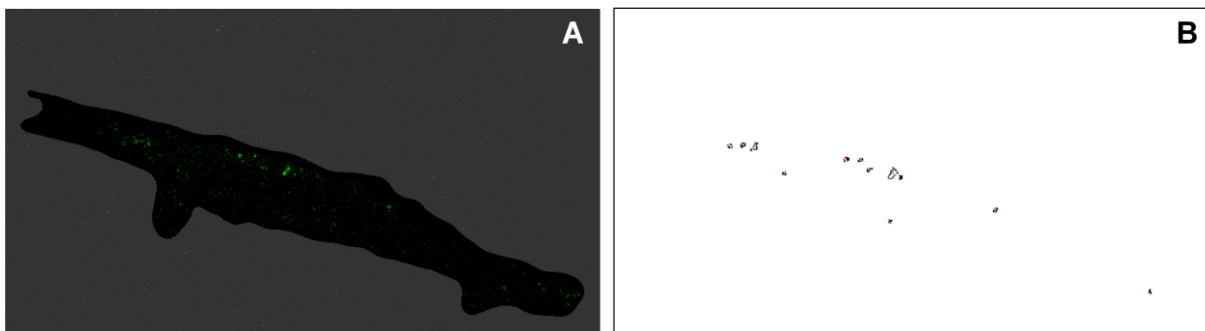


Abbildung 98: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 51: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	12	13	15,9

Tabelle 52: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 8 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,629	2,02	5,492	1	35	4
2	0,390	1,25	6,667	1	25	5
3	0,325	1,04	5,862	1	25	4
4	0,459	1,47	8,565	1	29	8
5	0,235	0,75	8,617	1	43	6
6	1,543	4,95	11,492	1	67	8
7	0,255	0,82	8,902	1	40	5
8	0,265	0,85	7,358	1	25	6
9	0,210	0,67	7,976	1	45	6
10	0,305	0,98	7,344	1	23	7
11	0,190	0,61	5,237	1	19	4
12	0,165	0,53	5,091	1	30	3

Mittelwert = 0,312

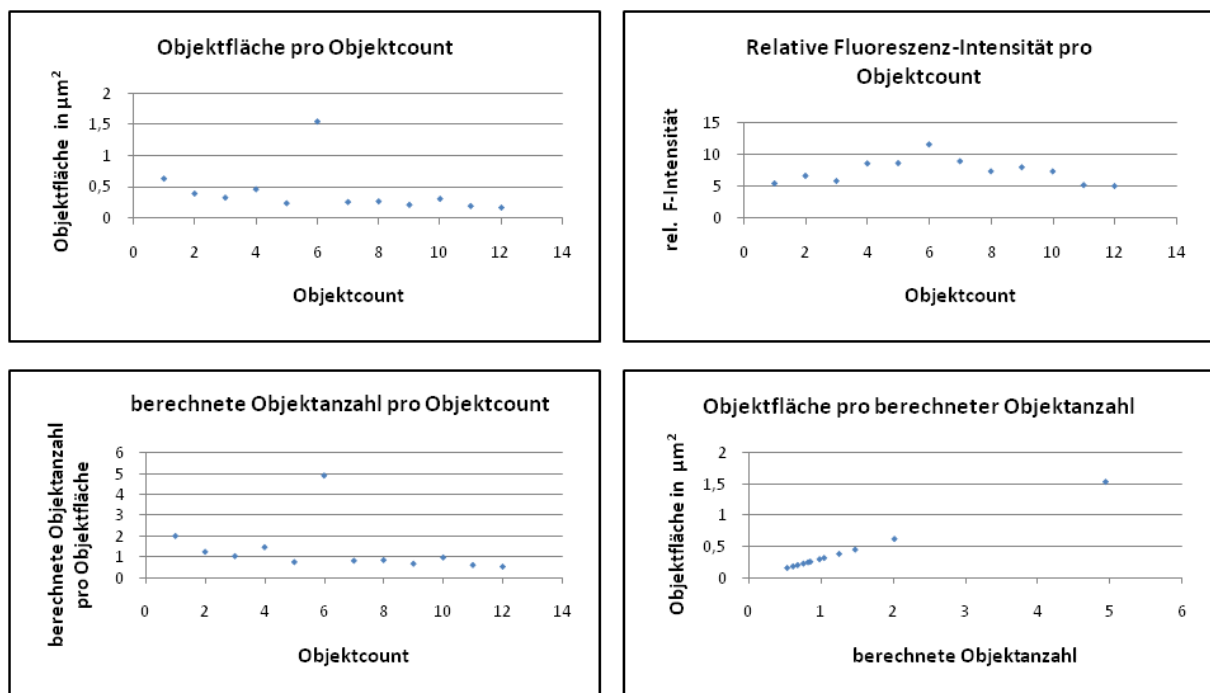


Abbildung 99: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 8 erzielt wurden.

Stack 9 – Inkubationszeit 24 h

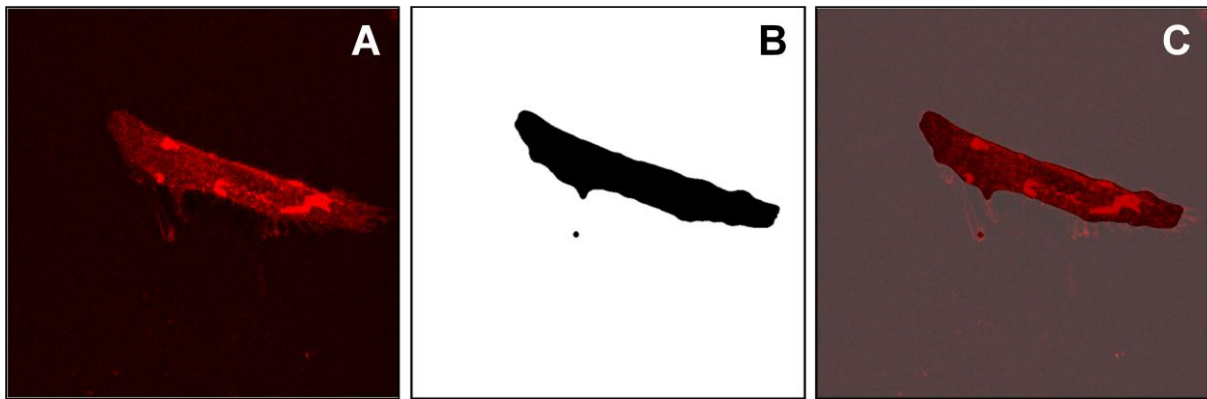


Abbildung 100: Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Zellmembran als z-Projektion „Max Intensity“ (A) von Stack 9 mit dazugehöriger Zellmaske (B) und dem Overlay (C).

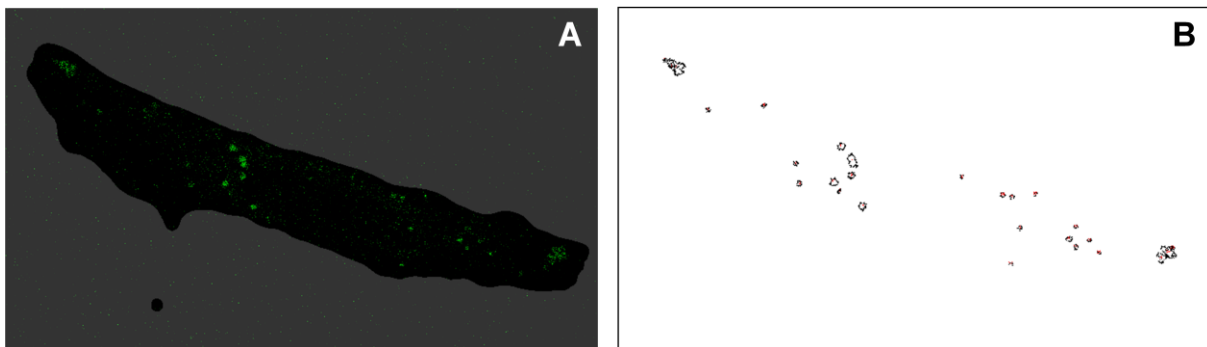


Abbildung 101: Vergrößerte Darstellung der CLSM-Aufnahmen der Partikel als z-Projektion „Max Intensity“ als Overlay mit der Zellmaske (A) und den resultierenden Umrissen der erfassten Objekte (B).

Tabelle 53: Vergleich der Anzahl der mithilfe der verschiedenen Methoden erfassten Objekte.

	z-Projektion Max Int.	manuelle Erfassung Max Int.	berechnet
Anzahl der Objekte	27	38	42,6

Tabelle 54: Zusammenfassung der Ergebnisse aller erfassten Objekte von Stack 9 nach Anwenden des Macros auf die z-Projektion „Max Intensity“. Mehrfachereignisse sind gelb markiert und wurden nicht zur Mittelwertberechnung der Fläche eines Einzelobjekts herangezogen.

Objektcount	Objektfläche in μm^2	berechnete Objektanzahl pro Objektfläche	durchschnittlicher Grauwert (rel. F-Int.)	minimaler Grauwert	maximaler Grauwert	Median
1	0,200	0,51	6,025	1	20	5
2	2,647	6,81	6,308	1	28	5
3	0,205	0,53	5,756	1	23	4
4	0,315	0,81	4,714	1	16	4
5	0,240	0,62	7,021	1	36	6
6	0,844	2,17	8,604	1	33	6
7	2,142	5,51	9,650	1	57	8
8	0,290	0,75	5,707	1	23	4
9	0,779	2,00	6,942	1	29	6
10	0,155	0,40	7,097	1	32	5
11	1,029	2,65	8,825	1	31	7
12	0,459	1,18	5,565	1	28	5
13	0,195	0,50	6,564	1	36	5
14	0,409	1,05	6,183	1	28	4
15	0,200	0,51	9,600	1	33	9
16	0,380	0,98	7,316	1	28	6
17	0,944	2,43	6,952	1	31	5
18	0,200	0,51	4,925	1	18	4
19	0,345	0,89	6,739	1	34	5
20	0,569	1,46	7,386	1	41	5
21	0,230	0,59	6,413	1	29	5
22	0,325	0,84	5,215	1	22	4
23	0,220	0,57	3,977	1	12	3
24	1,788	4,60	5,433	1	25	4
25	0,190	0,49	15,421	1	67	10
26	1,049	2,70	5,695	1	23	5
27	0,220	0,57	12,000	1	44	10

Mittelwert = 0,389

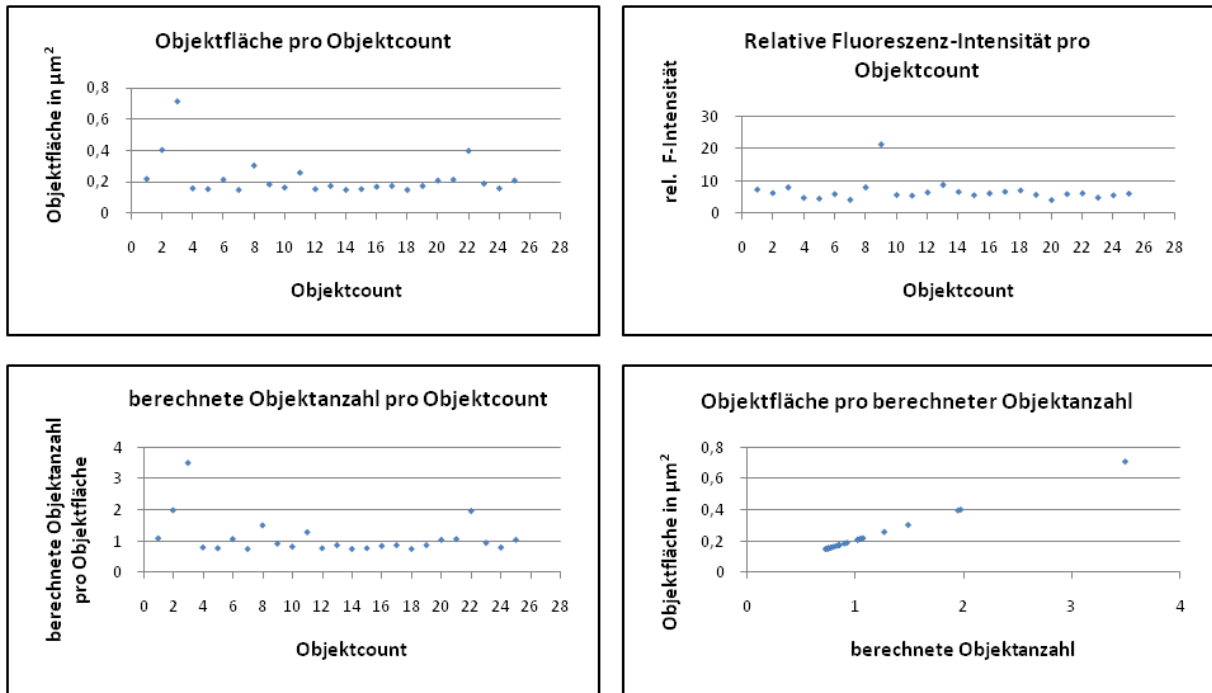


Abbildung 102: Graphische Darstellung der Ergebnisse, die durch die Anwendung des Macros auf Stack 9 erzielt wurden.

Danksagung

Ich danke Prof. Katharina Landfester, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Polymerforschung durchführen zu können sowie Dr. Volker Mailänder für die gute Betreuung während der gesamten Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt den Mitgliedern des Zelllabors der Arbeitsgruppe Mailänder, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen – vielen Dank an Daniela Baumann, Ivonne Brüstle, Melanie Dröge, Jens-Michael Cramer, Anita Höcherl, Niklas Kotman, Simone Lerch, und Dr. Steffen Lorenz, der nicht müde wurde meine Fragen bezüglich des CLSM zu beantworten. Ivonne Brüstle danke ich vor allem für ihre Geduld, die Rohfassung meiner Diplomarbeit gelesen und sehr hilfreiche Korrekturen vorgenommen zu haben.

Weiterhin danke ich Dr. Grit Baier für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Partikel sowie Dr. Martin Dass und Dr. Ingo Lieberwirth für die Aufnahmen am REM.

Für die Hilfe im Umgang mit dem Programm *Image J* möchte ich meinen Dank ebenfalls an Dr. Ingo Lieberwirth sowie Dr. Clemens Weiss und Dr. Sandra Ritz aussprechen.

Gedankt sei dem gesamten Arbeitskreis Landfester für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Studienzzeit unterstützten und immer daran geglaubt haben, dass ich mein Ziel erreiche. Vielen Dank für eure Geduld und die Gabe, immer die richtigen Worte gefunden zu haben, um mich zum Weitermachen zu motivieren.