

Analyse des Amyloid-Beta Peptids ($A\beta$) mit superauflösender optischer Mikroskopie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Pia Kempis

aus Neuss

Neuss, September 2013

aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Dieter Willbold
Korreferent: Prof. Dr. Kurt Gottmann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2012

Für Sebastian

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Alzheimersche Demenz.....	1
1.1.1 Überblick über die Alzheimersche Demenz.....	1
1.1.2 Neurobiologie der Alzheimerschen Demenz.....	2
1.1.3 Amyloid-beta (A β) und APP.....	3
1.1.4 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese.....	5
1.1.5 Aggregationsformen von A β	7
1.1.6 Diagnose der AD.....	8
1.2 Lichtmikroskopie.....	11
1.2.1 Fluoreszenzmikroskopie.....	12
1.2.2 Beugungsbegrenzung.....	12
1.2.3 Superaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie.....	13
1.3 Fragestellung.....	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Materialien.....	20
2.1.1 Chemikalien.....	20
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	21

2.1.3	Antikörper und Peptide	21
2.1.4	Kits	22
2.1.5	Geräte und Materialien	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Fluoreszenz.....	23
2.2.2	Fluoreszenzfarbstoffe	29
2.2.3	Photoschaltbare Fluoreszenzfarbstoffe.....	30
2.2.4	Markieren von Antikörpern und Peptiden.....	33
2.2.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	34
2.2.6	Software zur Bildrekonstruktion	42
2.2.7	Präparation von synthetischem A β	43
2.2.8	Immobilisierungsprotokoll	44
2.2.9	Datenaufnahme.....	46
3	Ergebnisse	48
3.1	PAINT	48
3.1.1	Messbedingungen.....	49
3.1.2	Driftmessung	57
3.1.3	Laserleistung	57
3.1.4	Konzentrationsreihen	60
3.1.5	Zeitserien.....	60
3.2	dSTORM	63
3.2.1	Messbedingungen.....	64

3.2.2	Messungen mit synthetischem A β	70
3.2.3	Messungen mit menschlichen Proben	79
4	Diskussion	82
4.1	PAINT	83
4.1.1	Reduktion der Hintergrundfluoreszenz	83
4.1.2	Variante 5 des D1-Peptids zeigt Eignung als Detektionssonde	84
4.1.3	Eine Driftkorrektur in der x-y-Ebene ist nicht notwendig	85
4.1.4	Mittlere Laserleistungen erzielen optimale Messergebnisse.....	85
4.1.5	Eine Belichtungszeit zwischen 50 ms und 100 ms zeigt optimale Zeitspuren... 86	
4.2	dSTORM	87
4.2.1	Alexa 488 und Alexa 647 eignen sich für Messungen nach dem dSTORM-Prinzip 87	
4.2.2	Co-Lokalisation als Entscheidungskriterium für A β -Aggregate.....	88
4.3	PAINT und dSTORM im Vergleich.....	91
4.4	Ausblick.....	93
	Zusammenfassung.....	94
	Summary	95
	Literaturverzeichnis.....	96
	Danksagung.....	103
	Eidesstattliche Erklärung.....	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reduziertes Hirnvolumen durch Alzheimerische Demenz in schematischer Darstellung	2
Abbildung 2: Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (amyloid precursor protein, APP)	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese.....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der A β -Aggregation.....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung von surface-FIDA zur Detektion von Proteinaggregaten.....	10
Abbildung 6: PAINT-Bilder von Vesikeln.	15
Abbildung 7: Schematisches Funktionsprinzip von STORM-Abbildungen am Beispiel einer hexameren Struktur.	16
Abbildung 8: dSTORM-Bilder von Mikrotubuli.	17
Abbildung 9: Jablonski-Diagramm.	24
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Franck-Condon-Prinzips für elektronische Übergänge.	26
Abbildung 11: Energieschema des photoinduzierten Elektronentransfers eines angeregten Fluorophors.	28
Abbildung 12: Beispiele für verschiedene Farbstoffklassen.....	30
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop.	35
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Strahlengangs bei einem Weitfeldmikroskop.	36
Abbildung 15: Prinzip der totalen internen Reflexion.	38
Abbildung 16: Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung für PAINT-Messungen.....	39

Abbildung 17: Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung für dSTORM-Messungen.....	41
Abbildung 18: Prinzip der Einzelmolekül-Lokalisations-Mikroskopie.....	42
Abbildung 19: Idealer Verlauf einer Zeitspur.....	49
Abbildung 20: Fluoreszenzintensität von A β und D-Peptiden.....	51
Abbildung 21: Fluoreszenzintensität von PEG und Dextran.....	52
Abbildung 22: Fluoreszenzintensität von Ethanolamin (EA) und BSA.....	53
Abbildung 23: Exemplarische Zeitspuren der Variante 1 des D1-Peptids.....	54
Abbildung 24: Exemplarische Zeitspuren der Variante 2 des D1-Peptids.....	55
Abbildung 25: Exemplarische Zeitspuren der Variante 3 des D1-Peptids.....	55
Abbildung 26: Exemplarische Zeitspuren der Variante 4 des D1-Peptids.....	56
Abbildung 27: Exemplarische Zeitspuren der Variante 5 des D1-Peptids.....	56
Abbildung 28: Verhalten der Probe für verschiedene Laserintensitäten.....	59
Abbildung 29: Weitfeldbilder und rekonstruierte Bilder von immobilisierten A β -Aggregaten für verschiedene Belichtungszeiten.....	62
Abbildung 30: Einzelbildaufnahme einer dSTORM-Messung.....	65
Abbildung 31: Intensitätsprofil eines einzelnen Fluorophors.....	65
Abbildung 32: Zeitspuren zur Bestimmung der Belichtungszeit für dSTORM-Messungen an A β -Aggregaten.....	69
Abbildung 33: dSTORM-Messung an synthetischen A β -Aggregaten (100 pM) bei einer Anregungswellenlänge von 647 nm.....	71
Abbildung 34: dSTORM-Messung einer Kontrolle ohne A β -Aggregate bei einer Anregungswellenlänge von 647 nm.....	72
Abbildung 35: Kriterium für Aggregate bei Rekonstruktion mit RapidSTORM.....	74

Abbildung 36: dSTORM-Messung von gemischt aggregiertem A β 1-40/1-42.....	76
Abbildung 37: dSTORM-Analyse von immobilisierten A β - Aggregaten (100 pM).....	77
Abbildung 38: dSTORM-Messung von getrennt aggregierten A β 1-40 und A β 1-42- Aggregaten	78
Abbildung 39: dSTORM-Analyse von menschlichen Proben mit C-terminalen Antikörpern	80
Abbildung 40: dSTORM-Analyse von menschlichen Proben mit N-terminalen Antikörpern	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prävalenz und Neuerkrankungen an Demenz in Abhängigkeit des Lebensalters in Deutschland.....	1
Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien.....	20
Tabelle 3: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.....	21
Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper.....	21
Tabelle 5: Liste der verwendeten Peptide.....	22
Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits.....	22
Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte und Materialien.....	22
Tabelle 8: Liste der verwendeten Software.....	23
Tabelle 9: Korrekturfaktor und molarer Extinktionskoeffizient der verwendeten Fluorophore.	33
Tabelle 10: Komponenten der experimentellen Anordnung für PAINT-Messungen.....	38
Tabelle 11: Komponenten des dSTORM Aufbaus.....	40
Tabelle 12: Leistungsreihe: Anzahl der gefundenen Aggregate nach Gaussfit bei variabler Laserleistung.	58
Tabelle 13: Kombinationen von verschiedenen Belichtungszeiten und Dunkelzeiten. Anzahl der gefundenen A β -Aggregate nach Gaussfit.	61
Tabelle 14: Eingesetzte Verdünnung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zur Detektion von immobilisierten A β -Oligomeren.	67
Tabelle 15: Anzahl der gefundenen Aggregate bei variierendem Kriterium, ab wann ein Objekt als Aggregat gewertet wurde.....	74
Tabelle 16: Ergebnisse verschiedener dSTORM-Messungen an A β -Aggregaten.	79

1 Einleitung

1.1 Alzheimersche Demenz

1.1.1 Überblick über die Alzheimersche Demenz

Alois Alzheimer (1864-1915) hat 1906 als erster die Symptome der Krankheit bei seiner Patientin Auguste D. beschrieben (Alzheimer, 1907). Mittlerweile ist die Alzheimersche Demenz die häufigste degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems. In Deutschland leiden derzeit etwa 650.000 Menschen an der AD und jährlich kommen circa 250.000 Neuerkrankungen hinzu (www.deutschealzheimer.de). Weltweit sind heute schätzungsweise 36 Millionen Menschen erkrankt (World Alzheimer Report 2011). Ein wesentlicher Risikofaktor für die AD ist das Lebensalter. In Tabelle 1 ist die Prävalenzrate, sowie der Anteil der jährlichen Neuerkrankungen in Abhängigkeit des Lebensalters dargestellt. Es ist zu entnehmen, dass der Anteil der Erkrankten und der Neuerkrankungen ab einem Alter von etwa 80 Jahren stark zunimmt. Bei den über 90-jährigen ist bereits mehr als jeder Dritte erkrankt und jährlich kommen 10 % hinzu.

Altersgruppe	mittl. Prävalenzrate in %	jährl. Neuerkrankungen in %
65 – 69	1,2	0,4
70 – 74	2,8	0,9
75 – 79	6,0	1,9
80 – 84	13,3	4,1
85 – 89	23,9	6,5
90 und älter	34,6	10,1

Tabelle 1: Prävalenz und Neuerkrankungen an Demenz in Abhängigkeit des Lebensalters in Deutschland. (www.deutschealzheimer.de)

Aufgrund des demographischen Wandels ist mit einem deutlichen Anstieg der AD-Erkrankungen in den nächsten Jahren zu rechnen. Laut statistischem Bundesamt werden bereits im Jahr 2050 in Deutschland mehr als 2,6 Millionen Menschen an AD erkrankt sein und mehr als 100 Millionen weltweit (Brookmeyer et al., 2007).

Der Verlauf der AD ist unaufhaltsam und bewirkt irreversible Schädigungen im Nervengewebe der Erkrankten. Obwohl die Krankheit bereits vor mehr als 100 Jahren zum ersten Mal untersucht wurde, gibt es bis heute kein Heilmittel und keine eindeutige Diagnose

pre mortem (Mucke et al., 2009). Bisherige Behandlungsmethoden und Medikamente konzentrieren sich in erster Linie auf die Reduktion der Krankheitssymptome. Auf diese Weise kann der Verlauf der Krankheit verlangsamt werden. Hierbei ist entscheidend, dass die Krankheit früh genug diagnostiziert wird. Im Durchschnitt stirbt ein Patient etwa drei bis neun Jahre nach der Diagnose (Querfurth et al., 2010).

1.1.2 Neurobiologie der Alzheimerschen Demenz

Die Neurobiologie der AD ist gekennzeichnet durch neurodegenerative Effekte wie Degeneration und Verlust von Nervenzellen, Abnahme der Synapsendichte oder chronisch-entzündliche Prozesse. Das Gehirn von AD-Patienten weist eine deutlich geringere Allgemeinmasse (Atrophie) mit tiefen Furchen auf (Abb. 1).



Abbildung 1: links gesundes menschliches Gehirn, rechts Gehirn eines Menschen mit Alzheimer (www.alz.org).

Der Verlust von Neuronen und die Abnahme der Hirnmasse insbesondere der Frontal- und Parietalregion erklären die typischen klinischen Symptome der AD-Patienten. Diese äußern sich in einer fortschreitenden Abnahme der intellektuellen Leistungsfähigkeit, sowie der motorischen Kontrolle. Außerdem treten Gedächtnis- Sprach- und Orientierungsschwächen auf und das Urteilsvermögen der Patienten ist stark beeinträchtigt. Bei histopathologischen Untersuchungen der Hirnmasse von AD-Patienten konnten zwei Charakteristika herausgestellt werden. Zum einen wurden intrazelluläre dichte Fibrillenbündel (Tangles) und zum anderen extrazelluläre Amyloid-Ablagerungen (Plaques) gefunden. Genauere Analysen ergaben, dass die intrazellulären neurofibrillären Tangles (NFT) aus einer

hyperphosphorylierten Form des tau-Proteins bestehen. Das tau-Protein ist ein axonales Protein, das an Mikrotubuli bindet und diese stabilisiert. Eine Hyperphosphorylierung des tau-Proteins hat zur Folge, dass sich das tau-Protein ablöst und die Mikrotubuli abbauen. Es formen sich unlösliche Fibrillen, welche sich dann zu NFT zusammensetzen. Durch den Abbau der Mikrotubuli ist der axonale Transportweg gestört und eine axonale Degeneration des Gehirns ist die Folge. Bisher ist jedoch nicht eindeutig belegt, ob die Hyperphosphorylierung des tau-Proteins und die anschließende Aggregation Ursache oder Folge der Alzheimerschen Demenz sind. Das zweite Charakteristikum, das bei histopathologischen Untersuchungen der Hirnmasse von AD-Patienten herausgestellt werden konnte, sind die extrazellulären Amyloid-Plaques, welche hauptsächlich aus Amyloid-beta (A β)- Fibrillen bestehen. Diese werden in der frühen Phase der Plaquebildung als diffuse Plaques bezeichnet. Außerdem formen sich neuritische Plaques. In der unmittelbaren Umgebung der neuritischen Plaques befinden sich aktivierte Mikrogliazellen und Astrozyten sowie dystrophische Dendriten. In der Folge kommt es zu neuronalen Fehlfunktionen und schließlich zum Absterben der betroffenen Zellen.

Bisher wurde noch nicht eindeutig geklärt, welche der beiden Charakteristika – die Bildung von NFT oder die amyloiden Plaques- zum krankheitsauslösenden Schritt der AD führen. Da jedoch das Amyloid-beta –Peptid eine wichtige Rolle im Verlauf der Krankheit spielt, werden das A β - Peptid, sowie dessen aggregierte Formen im Verlauf dieser Arbeit detaillierter betrachtet.

1.1.3 Amyloid-beta (A β) und APP

Das Amyloid-beta (A β)- Peptid wurde bereits vor mehr als 25 Jahren erfolgreich aus Amyloid-Plaques gelöst und weiter analysiert (Masters et al., 1985). A β ist ein etwa 4,5 kDa großes Peptid, das aus 38 bis 43 Aminosäuren besteht. Das Peptid tritt im menschlichen Organismus als Stoffwechselprodukt in der Rückenmarksflüssigkeit oder im Plasma auf (Haass et al., 1992). Bisher ist jedoch noch keine klare physiologische Funktion des Peptids bekannt. Die Entstehung von A β wurde hingegen erfolgreich untersucht. Monomeres A β entsteht durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (amyloid precursor protein, APP). APP ist ein integrales Typ 1 Transmembran-Glycoprotein. Die Struktur des APP weist eine größere Transmembrandomäne und eine kleine zytoplasmatische Domäne auf. Die Spaltung des APP erfolgt mittels drei verschiedener Proteasen: α -, β -, und γ - Sekretasen. Abhängig davon, welche Sekretasen zum Einsatz kommen, wird zwischen einem amyloiden

und nicht amyloiden Prozessierungsweg unterschieden. In Abbildung 2 sind die verschiedenen Prozessierungswege des APP schematisch dargestellt.

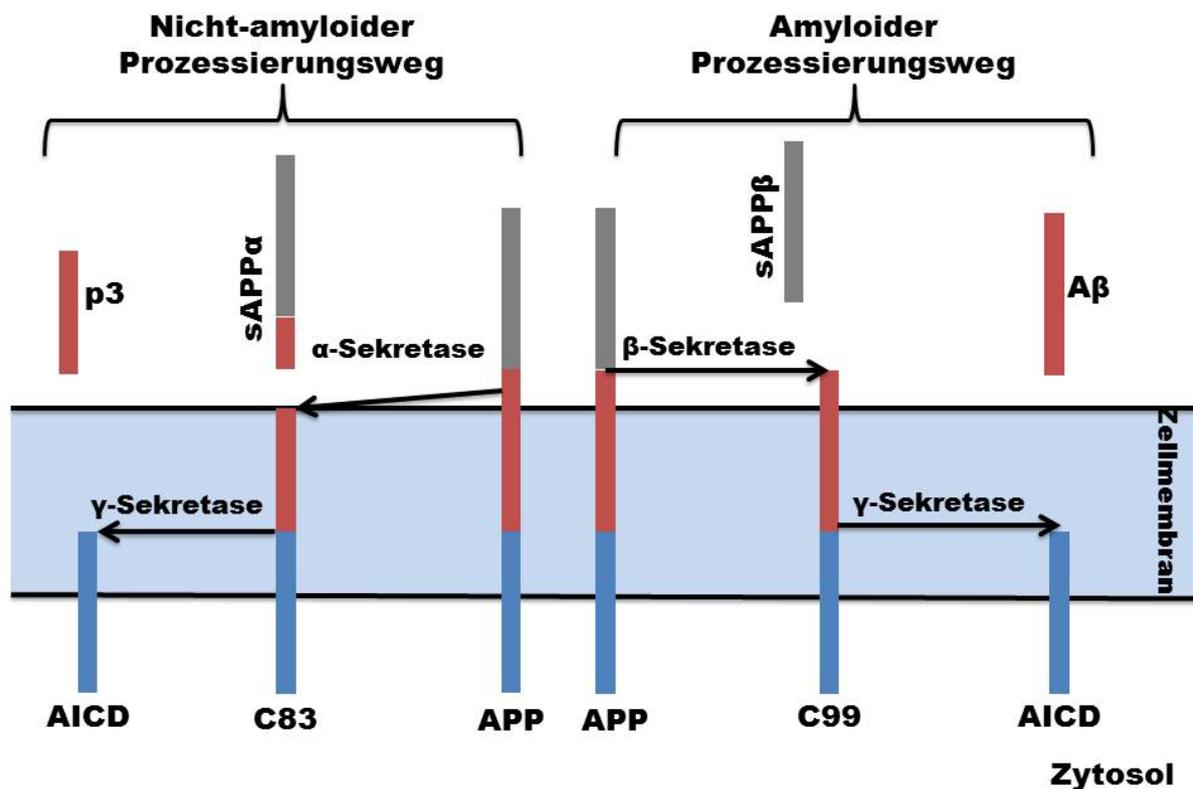


Abbildung 2: Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (amyloid precursor protein, APP) kann auf einem amyloiden und einem nicht-amyloiden Weg erfolgen. Während des amyloiden Prozessierungswegs wird APP zunächst proteolytisch durch die β - und danach durch die γ -Sekretase gespalten, wodurch A β entsteht. Beim nicht-amyloiden Prozessierungsweg wird APP zuerst durch die α - und danach ebenfalls durch die γ -Sekretase gespalten. Es entsteht dabei p3 (nach LaFerla et al., 2007).

Mit Hinblick auf eine Erkrankung an AD ist jedoch nur der amyloide Prozessierungsweg von Interesse. Hierbei wird APP durch die β -Sekretase N-terminal gespalten. Es entsteht ein in der Membran verbleibendes C99-Fragment und ein abgesondertes sAPP β -Fragment. Das C-terminale C99-Fragment ist 99 Aminosäuren lang und beginnt bereits mit der ersten Aminosäure des A β -Peptids (Selkoe, 2001). Mittels γ -Sekretase wird das C99-Fragment zu A β prozessiert. Das A β -Peptid wird in den extrazellulären Raum sezerniert, während der übrig gebliebene Teil des C99-Fragments (AICD) in das Zytoplasma abgegeben wird. Die unterschiedliche Länge des A β -Peptids von 38 bis 43 Aminosäuren wird durch verschiedene Schnittstellen für die γ -Sekretase verursacht. Am häufigsten entstehen A β -Peptide mit einer

Länge von 40 Aminosäuren (bis etwa 90%). Mit einer 5 bis 10 % igen Wahrscheinlichkeit entstehen A β -Peptide, die aus 42 Aminosäuren bestehen (Jakob-Roetne et al., 2009).

1.1.4 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

In den letzten zwanzig Jahren wurden verschiedene Ansatzpunkte gefunden, das A β -Peptid mit einer Erkrankung an AD in Verbindung zu bringen. Die Gemeinsamkeit aller Erklärungsversuche ist ein Ungleichgewicht zwischen A β -Produktion und -Abbau. Dieses Ungleichgewicht führt zu einem erhöhten A β -Spiegel und setzt eine kaskadenartige Selbstaggregation von A β zu unterschiedlichen Formen in Gang und gilt als krankheitsauslösender Schritt (Hardy, 1997). Die sogenannte Amyloid-Kaskaden-Hypothese wurde 1992 erstmals von Hardy und Higgins vorgestellt (Hardy, Higgins, 1992) und später unter anderem durch Ergänzungen von Selkoe (Hardy, Selkoe, 2002) erweitert. Abbildung 3 zeigt die wesentlichen Aspekte der Theorie. Basis dieser Hypothese ist eine Anhäufung von A β (1-42) infolge einer erhöhten Produktion oder eines gestörten Abbaumechanismus des A β -Peptids. Im weiteren Verlauf formen sich entweder lösliche Oligomere (Wang et al., 1999, Haass, Selkoe, 2007) oder unlösliche A β -Formen. Frühere galten die Plaques als Hauptpathogen. Mittlerweile gelten die Oligomere als wahrscheinlicher krankheitsauslösender Schritt. Diese haben eine neurotoxische Wirkung und lösen eine Immunantwort durch Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten aus (Tsai et al., 2004). Außerdem kann eine erhöhte Anzahl von A β -Oligomeren zu einer Erhöhung der tau-Phosphorylierung und somit zur Bildung von NTFs führen (De Felice et al., 2008). Folgt man der Kaskade, besteht der nächste Schritt in der Bildung von mikroskopisch sichtbaren Plaques und neuritischen Plaques, welche neuronale Schäden und Defizite der Neurotransmitterausschüttung auslösen (Selkoe, 2007). In der Folge kommt es schließlich zum neuronalen Zelltod und somit zu den klinischen Symptomen der Demenz.

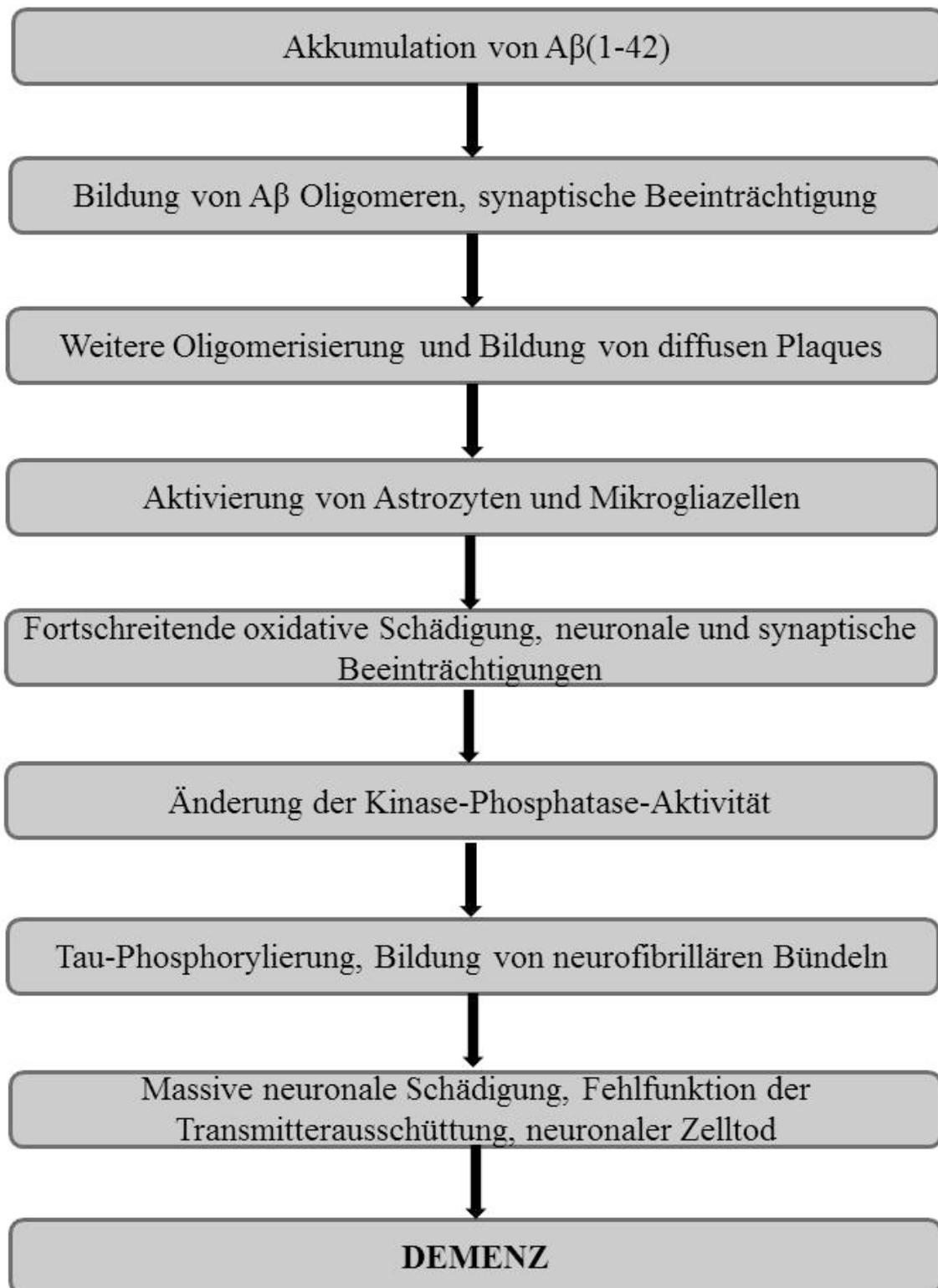


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Ein Ungleichgewicht zwischen A β Produktion und Abbau führt zu einem erhöhten A β Spiegel. A β aggregiert zu Oligomeren und diffusen Plaques. Durch neurotoxische Effekte wird eine Immunantwort in Form von aktivierten Astrozyten und Mikrogliazellen hervorgerufen. Eine gestörte Kinase-Phosphataseaktivität führt zur Phosphorylierung des Tau-Proteins und zur Bildung von neurofibrillären Bündeln. Es kommt zu massiven neuronalen Schädigungen zum Zelltod. Dies führt zu den klinischen Symptomen der Demenz (nach Selkoe, 2007).

1.1.5 Aggregationsformen von A β

Bisher konnten verschiedene Formen von A β -Aggregaten identifiziert, analysiert und charakterisiert werden (Abb. 4). Die kleinste Form bilden A β -Monomere. Sie bestehen in den allermeisten Fällen entweder aus 40 Aminosäuren und bilden A β (1-40)-Monomere. Oder es kommen C-terminal zwei weitere hydrophobe Aminosäuren hinzu (Isoleuzin und Alanin), dann spricht man von A β (1-42)-Monomeren. Das A β (1-42)-Monomer hat einen amphipatischen Charakter. N-terminal ist es hydrophil, wohingegen die 12-14 C-terminalen Aminosäuren stark hydrophob sind (Finder, Glockshuber, 2007). Die Anlagerung von zwei A β -Monomeren bildet ein Dimer. Die nächst größeren Spezies bilden die Oligomere. Sie bestehen aus 3-50 A β -Untereinheiten und weisen einen hohen Anteil an β -Faltblättern auf. Diese bilden sich durch β -Turns an den Aminosäureresten 24-28 (Lazo et al., 2005). A β -Oligomere sind instabil und neurotoxisch. Es gibt viele verschiedene Formen von A β -Oligomeren. Es gibt beispielsweise kleine A β -abgeleiteten-löslichen-Liganden (A β -derived diffusile ligands, ADDLs) mit einer Größe von 17-42 kDa. Außerdem gibt es die *in vitro* vorkommenden Protofibrillen. Die ADDLs sind nichtfibrillär und neurotoxisch und konnten bereits in menschlichen Hirnextrakten nachgewiesen werden (Lambert et al., 1998). Die ebenfalls neurotoxischen Protofibrillen bestehen hauptsächlich aus β -Faltblättern und haben eine flexible, stäbchenförmige Struktur mit einer Größe zwischen 8-200 nm. A β -Fibrillen sind geordnete Ansammlungen von sich wiederholenden A β Einheiten, die senkrecht zur Fibrillenachse angeordnet sind (Ross, Poirier, 2005). Die sind sehr stabil und unlöslich und konnten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bei AD-Patienten und Mäusen nachgewiesen werden (Klunk et al., 1999, 2004). A β -Fibrillen sind in der Lage, Mikrogliazellen und Astrozyten in Folge einer Immunabwehrreaktion zu aktivieren. Durch weitere Aggregation kommt es zur Bildung von unlöslichen extrazellulären Plaques.

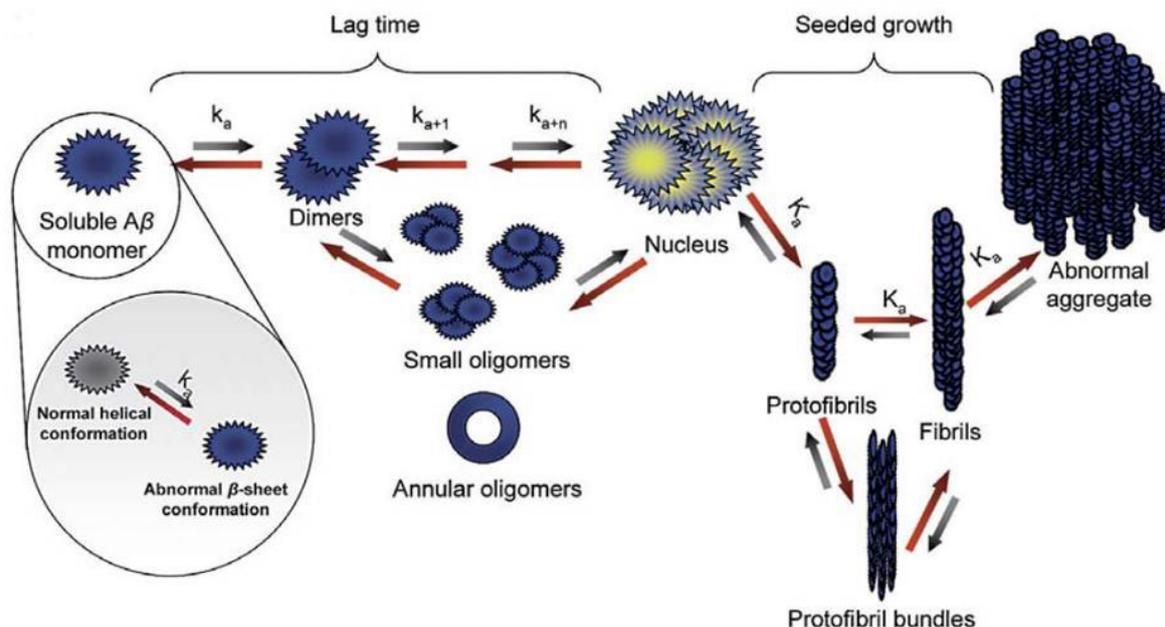


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aβ-Aggregation. Monomeres lösliches Aβ unterliegt einer Konformationsänderung zu einem hohen Anteil an β-Faltblättern. Es entstehen Dimere und kleine lösliche Oligomere, die zueinander in einem komplexen dynamischen Gleichgewicht stehen. Während der Lag-Phase kommt es zu Aggregationskeimen und einer beschleunigten Aggregation. Es entstehen Protofibrillen, Fibrillen und Plaques. *Abnormal β-sheet conformation:* β-faltblattreiche Konformation; *normal helical conformation:* normale helikale Konformation; *Soluble Aβ monomer:* lösliches Aβ Monomer; *Lag time:* Lag-Phase; *Dimers:* Dimere; *Small oligomers:* kleine Oligomere; *Annular oligomers:* ringförmige Oligomere; *Nucleus:* Aggregationskeim; *Seeded growth:* Aggregationskeimförderndes Wachstum; *abnormal aggregate:* unlösliche Aggregate; *Protofibrils:* Protofibrillen; *Fibrils:* Fibrillen; *Protofibril bundles:* Bündel von Protofibrillen. Abbildung aus FINDER, GLOCKSHUBER, 2007.

1.1.6 Diagnose der AD

Die Erforschung geeigneter Diagnoseverfahren für AD hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung und Intensität gewonnen. Dennoch ist es bisher nicht möglich, eine Erkrankung an AD zuverlässig zu diagnostizieren. Das einzig sichere Verfahren ist eine Analyse des Hirnmaterials auf senile Plaques oder NFTs *post mortem* (Ballard et al., 2011). Bisherige Diagnoseverfahren können lediglich einen Hinweis auf eine wahrscheinliche Erkrankung an AD liefern. Derzeit gängige Untersuchungsmethoden basieren auf kognitiven sowie psychologischen Tests und werden mit bildgebenden Verfahren wie Computer Tomografie (CT), Magnet Resonanz Tomografie (MRT) oder Positronen-Emissions-Tomografie (PET)

unterstützt. Bei den kognitiven Test wird in den meisten Fällen der Mini-Mental-Status-Test (mini-mental-state-examination, MMSE) angewendet (Folstein et al., 1975). Hierbei handelt es sich um ein Interview mit dem Patienten, worin mit Hilfe von 9 Aufgabengebieten zentrale kognitive Fähigkeiten eingeschätzt werden können. Der Patient kann zwischen 0 und 30 Punkte erreichen, wobei weniger als 20 Punkte auf eine leichte bis mittlere Demenz hinweisen und bei weniger als 10 Punkte von einer schweren Form der Demenz ausgegangen werden kann. Durch moderne bildgebende Verfahren kann außerdem nicht-invasiv Auskunft über Stoffwechselaktivität, Volumenverlust oder Gewebedichte gewonnen werden. Beim PET beispielsweise wird die lokale Glukose-Stoffwechsel-Aktivität im Gehirn gemessen, welche auf neuronale Aktivität schließen lässt. Ist diese verringert, besteht ein Hinweis auf eine neuronale Schädigung. Außerdem wird erforscht, ob mittels PET A β -Plaques sichtbar gemacht werden können. Hierzu wird dem Patienten ein A β -Plaque spezifischer Indikator (Pittsburgh compound B, PIB) verabreicht. Da jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Dichte und Verteilung von A β -Plaques und der Schwere der AD-Erkrankung besteht (Rowe, Villemagne, 2011), sind eindeutigere und genauere Diagnoseverfahren äußerst wünschenswert. Auch eine deutlich frühere Diagnosemöglichkeit wäre sinnvoll, da die meisten bisherigen Diagnoseverfahren erst dann greifen, wenn bereits Schädigungen der Gehirnzellen aufgetreten und irreparabel geschädigt sind. Der Patient ist jedoch schon mehrere Jahre zuvor erkrankt. Ein möglicher Ansatz zur frühzeitigen Diagnose liefern Verfahren, die Biomarker aus Körperflüssigkeiten wie Rückenmarksflüssigkeit oder Plasma verwenden. Vielversprechende Biomarker sind beispielsweise A β -Oligomere in Rückenmarksflüssigkeit, da diese in direktem Kontakt mit den extrazellulären Flüssigkeiten des Zentralen Nervensystems steht und A β Oligomere ein direkter Indikator der AD sein können (Blennow et al., 2010). Als geeignete Detektionstechnik für A β -Oligomere kommt beispielsweise das Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in Frage. Hierbei werden verschiedene A β spezifische Antikörper als Capture- und Detektionssonde für A β -Oligomere oder auch andere A β -Aggregationsformen verwendet. Ein wesentlicher Nachteil dieser und ähnlicher Methoden ist der geringe Informationsgehalt des Messergebnisses. Man erhält lediglich eine Information über ein positives Signal; über Größe, Zusammensetzung oder Form der Probe wird bei diesen Methoden keine Aussage gemacht. Durch Einzelmolekültechniken wie Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) oder Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) werden detailliertere Informationen gewonnen. Eine weitere vielversprechende diagnostische Methode ist die Oberflächen-Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse (*surface-fluorescence intensity distribution analysis*, Surface-FIDA).

Bereits vor etwa 15 Jahren wurde FCS verwendet, um einzelne A β -Aggregate in Rückenmarksflüssigkeit zu detektieren (Pitschke et al., 1998). Bei dieser Methode wurde Rückenmarksflüssigkeit von AD-Patienten mit zusätzlichem fluoreszenzmarkiertem A β versehen und in ein konfokales Volumen zur Detektion gegeben. Es konnte ein deutlicher Intensitätsunterschied zwischen A β -Aggregaten und Monomeren nachgewiesen werden. Einige Jahre später wurde diese Technik erweitert und als Detektionssonde für einzelne Prion-Proteine verwendet (Birkmann et al., 2006). Zunächst wurden zwei unterschiedlich markierte Antikörper zur Detektion von sich in Lösung befindenden Proben verwendet. Durch die Verwendung von zweifarbiger FCS konnten nach einer Auswertung mittels Kreuzkorrelationsanalyse die Spezifität zur Detektion von Aggregaten deutlich erhöht werden. Eine weitere Verbesserung der Methode bestand in der Immobilisierung der Prion-Aggregate auf einer Glasoberfläche mit Hilfe von Capture-Antikörpern. In Abbildung 5 sind die einzelnen Schritte der Methode schematisch dargestellt.

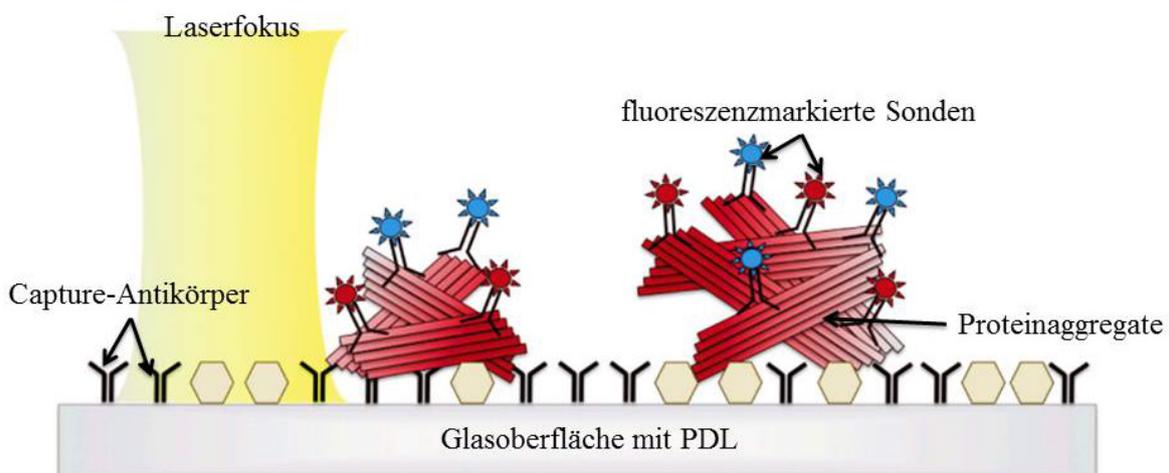


Abbildung 5: Schematische Darstellung von surface-FIDA zur Detektion von Proteinaggregaten. Mit poly-D-Lysin (PDL) bedeckte Oberfläche zur adhäsiven Bindung von Capture Antikörpern. Nach einem Blockschritt mit BSA werden die Proteinaggregate sowie die fluoreszierenden Sonden auf die Oberfläche gebracht. Ein konfokaler Laserstrahl scannt die Oberfläche und detektiert einzelne Proteinaggregate.

Zunächst wird die gereinigte Glasoberfläche mittels Adhäsion mit poly-D-Lysin (PDL) bedeckt. Danach wird der Capture-Antikörper auf der Oberfläche immobilisiert und nach einem Blockierungsschritt mit BSA werden die Prion-Aggregate hinzugegeben. Zur Detektion werden zwei verschiedene und mit unterschiedlichen Fluorophoren markierte Antikörper verwendet und die Probe wird systematisch mit Hilfe von zwei Laser-Foki abgescannt. Eine weitere Verbesserung der Methode besteht in der kovalenten Bindung des

Capture-Antikörpers an die Oberfläche. Dadurch kann die Probe häufiger und intensiver gewaschen werden, was den unspezifischen Hintergrund deutlich reduziert und das Probensignal verbessert. Diese Methode wurde in unserem Institut modifiziert und zur Detektion von A β -Aggregaten eingesetzt (Funke et al., 2007; 2008). Zunächst wurde die Methode mit synthetischen A β -Aggregaten auf einer PDL bedeckten Oberfläche und einem Capture-Antikörper durchgeführt. Die dabei erreichte Detektionsgrenze lag bei etwa 0,1 ng. Es wurden mindestens zwei verschiedene Antikörper zur Detektion verwendet, um eine hohe Spezifität für A β -Aggregate zu erreichen. Danach wurden CSF Proben von AD-Patienten untersucht und es konnte mittels Surface-FIDA ein deutlicher Unterschied zwischen AD-Patienten und gesunden Kontrollen festgestellt werden. Erst kürzlich konnte die Methode nochmals verbessert werden. Die Bindung des Capture-Antikörpers erfolgt nun kovalent mittels eines Dextran-Spacers, was stärkere und häufigere Waschschrte erlaubt und den Hintergrund deutlich reduziert.

Ein eindeutiger Nachteil aller aufgelisteter Methoden und allgemein aller Methoden, bei denen die Detektion mit Hilfe von Licht erfolgt, ist die eingeschränkte Auflösung aufgrund der Beugungsbegrenzung. Insbesondere bei Proben, die kleiner sind als 200 nm kann mit herkömmlichen auf Licht basierenden Detektionsmethoden keine Aussage über die genaue Größe, Struktur oder Zusammensetzung getroffen werden.

1.2 Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopie ist eines der wichtigsten Abbildungsverfahren in den Naturwissenschaften. Aufgrund der vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten durch unterschiedliche Färbetechniken und eine Vielzahl von (Fluoreszenz)-Farbstoffen spielt die Lichtmikroskopie seit ihrer Entwicklung gegen Ende des 16ten Jahrhunderts eine wichtige Rolle bei der Klärung zahlreicher wissenschaftlicher Fragestellungen. Die ersten optischen Lichtmikroskope bestanden aus einem System von nur zwei Linsen und wurden zur Jahrhundertwende vom 16ten ins 17te Jahrhundert von Galileo Galilei und Zacharias und Hans Janssen entwickelt. Durch die lichtmikroskopischen Untersuchungen von Antoni van Leeuwenhoek (1632- 1723) wurden erstmals Mikroorganismen entdeckt und beschrieben. Durch Verbesserung des Linsensystems wurde die Vergrößerung in den folgenden Jahrhunderten immer besser. Somit konnte die Lichtmikroskopie in den letzten Jahrhunderten maßgeblich zum Verständnis von Zusammenhängen auf einer für das menschliche Auge nicht sichtbaren Skala beitragen.

1.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Eine wichtige Weiterentwicklung der Lichtmikroskopie ist die Fluoreszenzmikroskopie. Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts kam A.H. Coons (1912-1978) auf die Idee, Antigene mit fluoreszierenden Molekülen zu versehen und auf diese Weise die zugehörigen Antikörper nachzuweisen. Die daraus entstandene Immunfluoreszenztechnik ist bis heute eine wichtige Methode in Immunologie, Biologie und Medizin. Gegen Ende des zwanzigsten Jahrhunderts wurden durch die Arbeiten von O. Shimomura, R.Y. Tsien, M. Chalfie und anderen dynamische Prozesse in lebenden Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Für seine Arbeiten über die Anwendung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) erhielten Chalfie, Shimomura und Tsien 2008 den Nobelpreis, was die Wichtigkeit der Fluoreszenzmikroskopie für die aktuelle Forschung unterstreicht. Fluoreszenz ist daher besonders geeignet, weil sie so vielfältig und leicht veränderbar ist wie kaum eine andere Detektionsmethode. Die Fluoreszenzeigenschaften vieler fluoreszierender Farbstoffe sind abhängig von der direkten chemischen Umgebung. Auf diese Weise kann durch kleine Veränderung der lokalen Nachbarschaft eine Änderung der Fluoreszenzintensität, -lebenszeit, Polarisation oder des Emissionsspektrums hervorgerufen werden. Dies macht eine klare Unterscheidung der zu untersuchenden Proben von unerwünscht autofluoreszenten Artefakten möglich. Die Möglichkeit der Manipulation von fluoreszierenden Parametern erlaubt eine Vielzahl von erweiterten Anwendungsmöglichkeiten der Fluoreszenzmikroskopie. Eine dieser Anwendungen ist die Entwicklung der superaufgelösten Mikroskopie.

1.2.2 Beugungsbegrenzung

Seit der Entwicklung der ersten optischen Mikroskope gegen Ende des siebzehnten Jahrhunderts dachte man, dass die erreichbare Auflösung ausschließlich von der Qualität der Linsen bezüglich chromatischer und sphärischer Aberration abhängt. Dies änderte sich mit der Entdeckung der Beugungsbegrenzung von Ernst Abbé (1840-1905). Abbé beschrieb die theoretische Begrenzung für die Auflösung bei Bildern, die mit Lichtmikroskopie aufgenommen werden. Die Beugungsbegrenzung besagt, dass es nicht möglich ist, einen unbegrenzt kleinen Bereich allein mit Hilfe von Licht und optischen Linsensystemen scharf abzubilden. Das Licht wird beim Durchgang durch die Linsen gebrochen. Dadurch erscheint Licht, das von einer Punktlichtquelle ausgeht, als verschmierter räumlich ausgedehnter Fleck. Die zugehörige Intensitätsverteilung des Lichtes wird Punktspreizfunktion (PSF) genannt, welche durch die laterale Ausdehnung Δx charakterisiert werden kann:

$$\Delta x \approx \frac{\lambda}{NA}$$

Hierbei ist λ die Wellenlänge des zur Detektion verwendeten Lichts und NA ist die Numerische Apertur des Objektivs. Es gilt: $NA = n \sin\alpha$. n ist der Brechungsindex des Mediums zwischen dem Gegenstand und dem Objektiv, α ist der Öffnungswinkel des Objektivs. Somit ist die numerische Apertur ein Maß für die Lichtsammelfähigkeit eines Objektivs. Licht im sichtbaren Bereich liegt im Wellenlängenbereich zwischen 400 nm und 700 nm. Auf diese Weise ergibt sich eine laterale Ausdehnung der PSF von etwa 250 nm. Nach dem Rayleigh-Kriterium sind zwei Objekte genau dann noch getrennt voneinander erkennbar, wenn ihr Abstand mindestens so groß ist wie die laterale Ausdehnung der PSF. Viele biologische Objekte sind deutlich kleiner als 200 nm. Möchte man diese mit Hilfe der Lichtmikroskopie abbilden, sieht man einen verschmierten Punkt ohne detaillierte strukturelle Informationen. Seit Abbés Entdeckung gab es zahlreiche Versuche, die Beugungsbegrenzung zu umgehen und Bilder mit einer lateralen Auflösung zu erzeugen, die deutlich besser als 200 nm ist. Alle Methoden, bei denen die Beugungsbegrenzung umgangen wird und die somit eine laterale Auflösung deutlich unterhalb von 200 nm erreichen, werden supraauflösende Methoden genannt.

1.2.3 Superauflöste Fluoreszenzmikroskopie

Bereits 1928 wurden Versuche unternommen, die Beugungsbegrenzung mit Hilfe von optischer Nahfeldmikroskopie zu umgehen (Synge, 1928). Bei der optischen Rasternahfeldmikroskopie (nearfield scanning optical microscopy, NSOM) wird eine nanometergroße Messspitze in direkte Nähe der Probe gebracht (typischer Abstand 1-10 nm). Auf diese Weise ist die Auflösung nicht mehr durch die Wellenlänge des Lichts, sondern nur noch von der Apertur der Messspitze bestimmt. Durch zahlreiche Weiterentwicklungen der Methode von Synge werden mit NSOM mittlerweile Auflösungen von 30 nm erreicht (Betzig et al., 1991). Auch andere Methoden wie Elektronenmikroskopie (EM) oder Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) erreichen Auflösungen deutlich unterhalb der Beugungsbegrenzung. Ein wesentlicher Nachteil aller Nahfeldmikroskopiemethoden ist jedoch, dass meistens nur die Struktur der Oberfläche wiedergegeben wird. Außerdem können viele Techniken nicht an lebenden oder biologischen Proben angewendet werden. Aus diesen Gründen wurden in den letzten Jahren zahlreiche Weitfeldmethoden entwickelt, bei denen die Beugungsbegrenzung umgangen werden kann.

Eine Gemeinsamkeit aller Methoden ist eine zeitliche Trennung der Fluoreszenz einzelner Fluorophore. Ein grundlegender Unterschied der einzelnen Methoden besteht in der Strategie zur zeitlichen Trennung. Zum einen kann die Trennung durch geeignete Blenden oder Anregungsmuster erfolgen. Techniken wie „structured illumination microscopy“ (SIM) oder „stimulated emission depletion“ (STED) machen sich diese Strategie zu Nutze. Bei SIM (Gustafsson, 2000) wird ein Gitter mit einem definierten periodischen Muster in einer zur Bildebene konjugierten Ebene in den Anregungsstrahlengang gebracht. Die emittierte Fluoreszenz wird durch die von der Gitterstruktur modulierte Anregungsintensität ebenfalls beeinflusst. STED (Klar et al., 2000) basiert auf konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Durch einen gleichzeitig zum Anregungsstrahl eingestrahltten Ausschaltstrahl mit ringförmigem Profil werden Fluorophore im Außenbereich des Anregungsfokus mittels stimulierter Emission ausgeschaltet. Es werden also nur Fluorophore abgebildet, die sich direkt im Fokus befinden. Die Auflösung ist durch die Größe des Rings begrenzt. Eine andere Strategie, die Fluoreszenz räumlich zu trennen, basiert auf stochastischen Prozessen. Bei Methoden wie „photoactivated localization microscopy“ (PALM, Betzig et al., 2006), „Stochastic Optical Reconstruction Microscopy“ (STORM, Rust et al., 2006) oder „Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography“ (PAINT, Hochstrasser, 2006) wird ein kleiner Teil der Fluorophore gleichzeitig aktiviert. Auf diese Weise kann jedes Fluoreszenzsignal als Signal einer Punktlichtquelle interpretiert werden. Durch Fitten einer Punktspreizfunktion an das Emissionsbild kann die ursprüngliche Position des Fluorophors nanometergenau rekonstruiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei auf stochastischen Prozessen basierende Methoden verwendet. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.2.3.1 Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography (PAINT)

Eine mögliche supraauflösende optische Mikroskopiemethode ist Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography (PAINT). Diese Methode wurde 2006 das erste Mal von A. Sharonov und R. Hochstrasser beschrieben (Sharonov, Hochstrasser, 2006). Ein Objekt, das mit hoher Auflösung abgebildet werden soll, wird kontinuierlich von fluoreszierenden Teilchen aus der umgebenden Lösung getroffen. Sobald ein Fluoreszenzfarbstoff an die Oberfläche der Probe bindet, erscheint ein Fluoreszenzsignal als beugungsbegrenzter Spot. Die Kollisionsrate der Farbstoffe mit der Oberfläche hängt von der Konzentration ab. Befinden sich zeitgleich nur wenige Fluoreszenzfarbstoffe auf der Oberfläche, kann davon ausgegangen werden, dass jedes Fluoreszenzsignal von einem einzelnen Fluorophor stammt.

Auf diese Weise kann durch einen zweidimensionalen Gaussfit die exakte ursprüngliche Position des Fluorophors berechnet werden. Das nächste Bild wird nach einer kurzen Wartezeit aufgenommen. In dieser Zeit haben die Fluorophore die Gelegenheit, eine neue Position auf der Objektoberfläche zu finden. Durch Akkumulation aller auf diese Weise berechneten Fluorophorpositionen aus mehreren Hundert Bildern kann das Objekt Punkt für Punkt rekonstruiert werden. Die erreichte Auflösung liegt bei dieser Technik bei etwa 20 nm. Sharonov und Hochstrasser demonstrierten die Technik an großen unilamellaren Vesikeln (large unilamellar vesicles, LUVs). Als Detektionsfluorophor wurde Nile Red verwendet. Dieser Farbstoff emittiert nur Fluoreszenz, wenn er sich in hydrophober Umgebung befindet. Die LUVs wurden auf einer Glasoberfläche befestigt. Die Nile Red Konzentration bestimmt nun die Kollisionsrate. Sobald Nile red mit den Vesikeln zusammenstößt, werden Photonen emittiert. Wird während dieser Zeit ein Bild aufgenommen, kann die ursprüngliche Position des Farbstoffs nanometergenau rekonstruiert werden. Durch die Aufnahme mehrerer Hundert Bilder können die Vesikel mit einer lateralen Auflösung von bis zu 25 nm abgebildet werden (Abb. 6).

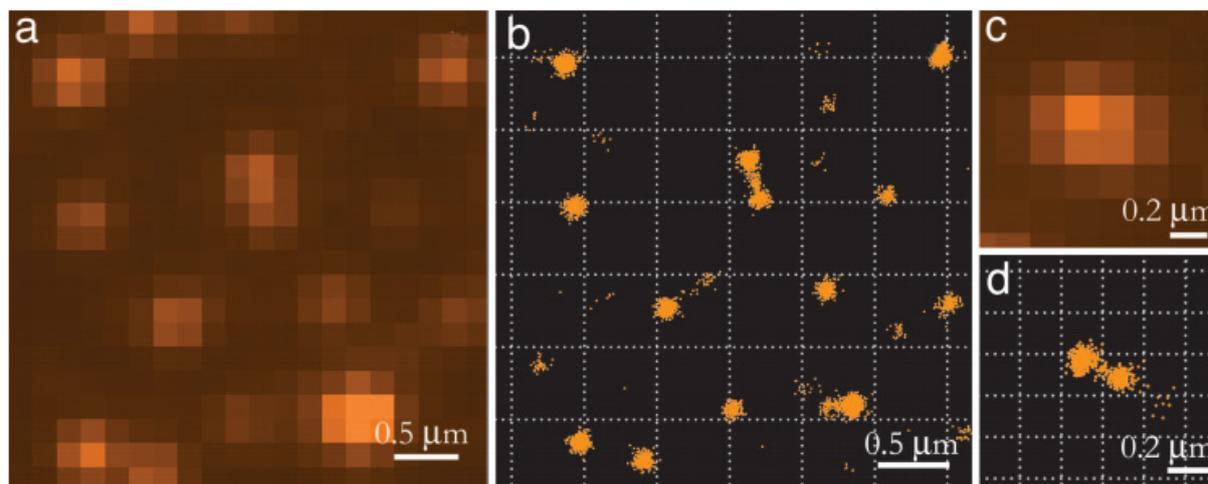


Abbildung 6: PAINT-Bilder von Vesikeln. (a) Weitfeld-Fluoreszenzbild von LUVs (b) rekonstruiertes superaufgelöstes Bild der LUVs, (c) Weitfeld-Fluoreszenzbild und superaufgelöstes Bild (d) eines Doppelvesikels. Erst durch die Rekonstruktion ist erkennbar, dass es sich um ein Doppelvesikel handelt (Abbildung aus Sharonov und Hochstrasser, 2006).

1.2.3.2 Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)

Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM, Rust et al., 2006) bzw. direct-STORM (dSTORM, Heilemann et al., 2008) sind Techniken, mit denen es möglich ist die

Beugungsbegrenzung zu umgehen. Die Grundlage dieser Methode bilden Fluorophore, die durch Einstrahlung von Laserlicht an- und ausgeschaltet werden können. Die eingestrahlte Laserleistung wird so eingestellt, dass in jedem Bild eine geringe Anzahl statistisch verteilter Fluorophore auf der Objektoberfläche eingeschaltet sind. Jedes Fluoreszenzsignal kann als Emission eines einzelnen Moleküls aufgefasst und mit einem zweidimensionalen Gaussfit die exakte Position ermittelt werden. Durch die Aufnahme mehrerer Hundert Bilder, in der unterschiedlich statistisch verteilte Fluorophore eingeschaltet sind, kann das ursprüngliche Objekt rekonstruiert werden. Die erreichte laterale Auflösung liegt bei weniger als 30 nm. STORM wurde 2006 von Michael Rust, Mark Bates und Xiaowei Zhuang entwickelt. Abbildung 7 zeigt das Prinzip.

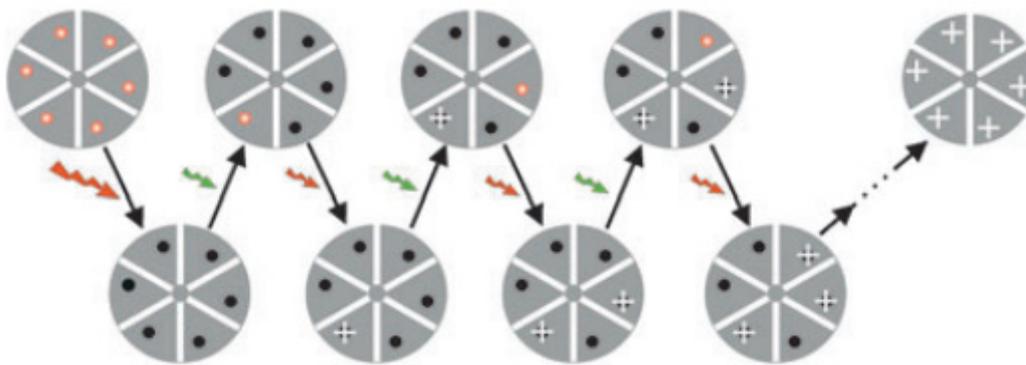


Abbildung 7: Schematisches Funktionsprinzip von STORM-Abbildungen am Beispiel einer hexameren Struktur. Das Objekt ist mit einem roten Fluorophor markiert, der durch rotes und grünes Laserlicht an- und ausgeschaltet werden kann. Zu Beginn sind alle Fluorophore durch einen starken Laserimpuls im ausgeschalteten Zustand. In jedem weiteren Abbildungszyklus wird ein grüner Laserstrahl dazu verwendet, einen Teil der Fluorophore wieder zu aktivieren. Durch einen weiteren roten Laserstrahl fluoreszieren die Farbstoffe wieder, bis sie ausgehen. Dieser Prozess wird so lang wiederholt, bis statistisch alle Fluorophore mehrfach eingeschaltet waren. Das ursprüngliche Bild kann schließlich mit hoher Präzision rekonstruiert werden. (Abbildung aus Rust et al., 2006)

Der Abbildungsprozess bei STORM besteht aus mehreren Abbildungszyklen. In jedem Zyklus ist ein kleiner Teil der Fluorophore im betreffenden Beobachtungsfeld eingeschaltet. Dabei muss gewährleistet sein, dass sich die Ausbreitungsfunktionen der einzelnen Fluorophore nicht überlappen. Durch die Verwendung geeigneter Fluorophore und Anregungswellenlängen sind in jedem Abbildungszyklus unterschiedliche statistisch verteilte Fluorophore eingeschaltet. Auf diese Weise entsteht nach Übereinanderlegen aller Abbildungszyklen ein supraaufgelöstes Bild mit einer lateralen Auflösung von etwa 20 nm. Zhuang et al. verwendeten DNA, die mit einem Cy3-Cy5-Schalter versehen wurde. Bereits 2005 konnte gezeigt werden, dass sich insbesondere der Cyaninfarbstoff Cy5 durch Einstrahlung verschiedener Wellenlängen an- und ausschalten lässt (Bates et al., 2005). Ein

roter Laserstrahl (633 nm) wird verwendet, um Cy5 anzuregen und in einen ausgeschalteten Zustand zu versetzen. Mit Hilfe eines grünen Laserstrahls (532 nm) und in unmittelbarer Nähe von Cy3 kann Cy5 wieder zurück in den eingeschalteten Zustand geholt werden. Dieser Prozess lässt sich mehrere Hundert Mal wiederholen, bevor der Schalter durch Photobleichen unbrauchbar wird. Die Auflösung hängt nur noch von der Anzahl der gesammelten Photonen ab. Eine Weiterentwicklung von STORM erfolgte 2008 durch Heilemann et al. Beim sogenannten *direct*STORM (dSTORM) werden Fluorophore mit nur einer Wellenlänge ein- und ausgeschaltet. Auf diese Weise entfallen das Anbringen eines Schalters und die Verwendung mehrerer Laser. Die Methode basiert darauf, dass die meisten Fluorophore in der Gegenwart von reduzierenden Thiolverbindungen (z. Bsp. Mercaptoethylamin) nach optischer Anregung reduziert werden. Dabei entstehen stabile Aus-Zustände, die eine Lebensdauer von bis zu einigen Sekunden aufweisen (Heilemann et al., 2009, van Linde et al., 2009, 2010). Durch Oxidation mit molekularem Sauerstoff kann der fluoreszierende An-Zustand wieder hergestellt werden. Der Schaltprozess kann je nach Farbstoff mehrere Tausendmal wiederholt werden. Abbildung 8 zeigt dSTORM-Bilder von Mikrotubuli, die mit Alexa-647 markierten Antikörpern versehen sind. Die erreichte laterale Auflösung liegt bei etwa 20 nm nach Gaussfit.

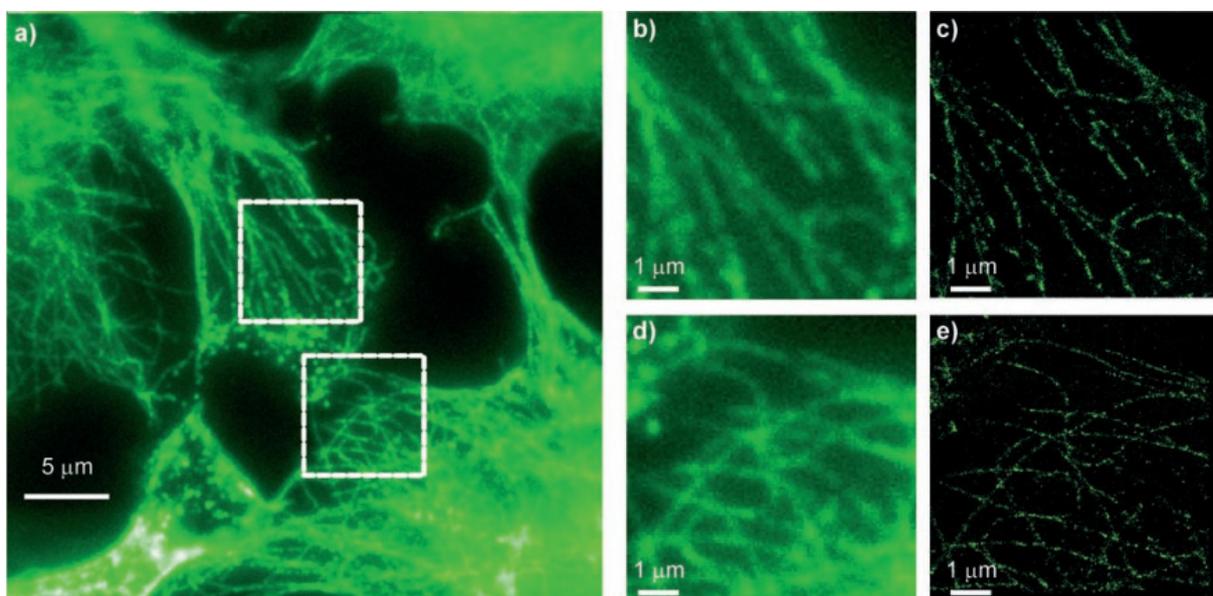


Abbildung 8: a) Weitfeldaufnahme von Mikrotubuli. Als Detektionssonde wurden Alexa-647 markierte Antikörper verwendet. b) bzw. d) vergrößerte Weitfeldaufnahme eines Probenbereichs, c) bzw. e) zugehöriges supraaufgelöstes dSTORM Bild. Die berechnete laterale Auflösung liegt bei etwa 20 nm. Abbildung aus Heilemann et al., 2009)

1.3 Fragestellung

Die Alzheimersche Demenz (AD) ist die mittlerweile häufigste Form von neurodegenerativer Demenz. Ein Hauptrisikofaktor für die Erkrankung an AD ist das Lebensalter. In Deutschland sind derzeit etwa 650.000 Menschen betroffen und durch den demographischen Wandel wird die Zahl der Erkrankten in den nächsten Jahren ansteigen. Klinische Symptome der Krankheit sind Gedächtnisverlust, Nachlassen von motorischen und sensorischen Fähigkeiten, Sprachstörungen und Wesensveränderungen, welche durch fortschreitende Degeneration von Synapsen und Neuronen ausgelöst werden. Bisher kann AD mit absoluter Sicherheit nur *post mortem* durch Identifizierung von amyloiden Plaques (A β) oder neurofibrillären Bündeln in Gehirn der Patienten diagnostiziert werden.

Nach der Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist ein Ungleichgewicht zwischen A β -Produktion und –Abbau der auslösende Schritt der Krankheit. Schon lange Zeit bevor die Patienten über typische Symptome der AD klagen, können sich verschiedene A β -Spezies in Körperflüssigkeiten wie Rückenmarksflüssigkeit oder Plasma befinden. Detaillierte Kenntnisse über amyloide Plaques in Körperflüssigkeiten wurden bisher nicht dokumentiert. Zunächst wäre eine grundlegende Untersuchung der Pathologie aufgrund von Art, Form oder Zusammensetzung der amyloiden Plaques erforderlich. Daraus könnten sich eventuell Ansatzpunkte für die Entwicklung diagnostischer Verfahren ableiten lassen.

Ziel dieser Arbeit ist die Detektion und Analyse von verschiedenen A β -Spezies mit Hilfe von supraauflösenden optischen Mikroskopiemethoden. Mittels eines optimierten Surface-FIDA-Protokolls werden A β -Aggregate von Capture-Antikörpern, die kovalent auf einer Glasoberfläche gebunden sind, immobilisiert. Durch geeignete Detektionssonden können die Proben für supraauflösende Techniken verwendet werden. Es werden zwei verschiedene supraauflösende optische Mikroskopieverfahren getestet. Zum einen wurde PAINT (point accumulation for imaging in nanoscale topography) und zum anderen dSTORM (direct stochastic optical reconstruction microscopy) verwendet. Zunächst werden geeignete Detektionssonden ausprobiert. Für PAINT-Messung besteht die Herausforderung darin, eine Detektionssonde mit passender Affinität zur Probe zu finden, da die zugrunde liegende Kinetik maßgeblichen Einfluss auf die Möglichkeit einer supraauflösenden Rekonstruktion der

Bilder ausübt. Bei dSTORM-Messungen müssen Detektionssonden gefunden werden, die sich durch Laserlicht reversibel von einem dunklen in einen aktivierten Zustand schalten lassen. Im nächsten Schritt sollten die Messparameter so eingestellt werden, dass eine supraaufgelöste Bildrekonstruktion möglich ist. Besonders wichtig ist hierbei die Einstellung der passenden Laserleistung und Belichtungszeit der Probe. Danach könnten supraaufgelöste Bilder der verschiedenen A β -Spezies angefertigt und auf Größe und Zusammensetzung analysiert werden. Auf diese Weise sollen im Verlauf dieser Arbeit supraaufgelöste Bilder von A β Aggregaten entstehen, die einen tieferen Einblick in die Zusammensetzung der Aggregate und den Verlauf des Aggregationsprozesses liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprechen, wenn nicht anders angegeben, dem Reinheitsgrad „pro analysi“ (p.a.) oder „reinst“. Zum Ansetzen aller Lösungen und zum Waschen der Proben wurde ausschließlich hochreines, deionisiertes MilliQ Wasser (dH₂O) verwendet, das mit einer Aufreinigungsanlage und einem Wasseraufbereitungssystem (EPA Est. 41277-MA-1, Millipore GmbH, Neu Isenburg) gefiltert wurde.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1,1,1,3,3,3,-Hexafluoro-2-propanol (HFIP), > 99%	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol Uvasol	Merck, Darmstadt
Bovine serum albumin (BSA), Fraktion V	Roche, Mannheim
B-Mercaptoethylamin (MEA)	Sigma- Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO), ≥ 99,5%	Sigma-Aldrich, München
Molekularsieb, 3 Å	Roth, Karlsruhe
Glukoseoxidase	Sigma- Aldrich, München
Katalase	Sigma- Aldrich, München
Ethanolamin Hydrochlorid	Sigma- Aldrich, München
CM5-Dextran Sodium Salt	Sigma-Aldrich, München
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich, München
N-hydroxysuccinimidine (NHS)	Sigma-Aldrich, München
Tween 20 Ultra	Sigma- Aldrich, München
Triton X 100	Fluka, Neu-Ulm
Urea	Applichem, Darmstadt

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
PBS	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
TBS	25 mM Tris/HCl; 0,9% NaCl, pH 7,4
TBS-T	TBS; 0,1% Tween 20
SEC-Puffer	50 mM Natriumphosphat; 150 mM NaCl; 0,6% Tween 20; pH 7,4
MEA-Lösung	1 M MEA-HCl
Glukose-Lösung (1 ml)	0,1 g Glukose; 0,1 ml Glycerin; 0,9 ml PBS
Sauerstoffreinigungslösung (1 ml)	1 mg Glukoseoxidase; 1,2 µl Katalase (18mg/ml); 4 µl 1 M TCEP; 25 µl 1 M KCl; 20 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5); 0,5 ml Glycerin; 0,45 ml dH ₂ O

2.1.3 Antikörper und Peptide

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller
Monoclonal anti-A β , Nab228	Sigma-Aldrich, München
Monoclonal anti-A β , 6E10	Covance, Emeryville, California, USA
Alexa Fluor 488 monoclonal anti A β , 6E10	Covance, Emeryville, California, USA
Monoclonal anti A β 1-42, 12F4	Covance, Emeryville, California, USA
Monoclonal anti A β 1-40, 11A50-B10	Covance, Emeryville, California, USA

Tabelle 5: Liste der verwendeten Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	Enantiomer
A β 1-42	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	L
A β 1-40	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	L
D1	QSHYRHISPAQV	D
D3	RPRTRLHTHRNR	D
D1V1	SHYRHISPAQVKC	D
D1V2	HYRHISPAQVKC	D
D1V3	YRHISPAQVKC	D
D1V4	RHISPAQVKC	D
D1V5	HISPAQVKC	D

2.1.4 Kits

Tabelle 6: Liste der verwendeten Kits

Kits	Hersteller
Alexa Fluor 488 monoclonal antibody labeling kit	Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor 647 monoclonal antibody labeling kit	Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor 633 protein labeling kit	Invitrogen, Darmstadt
Cy5 monoclonal antibody labeling kit	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Micro BCA Protein Assay kit	Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA

2.1.5 Geräte und Materialien

Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte und Materialien

Material	Hersteller
8 Kammerplatte, Borosilikat	Nunc, Thermo Fisher, NY, USA
Microtiter Plattenleser	Optima Polarstar/ BMG Labtech, Offenburg
Zentrifuge 5415 D, 5702 R	Eppendorf AG, Hamburg
Äkta purifier	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Spektrometer: Cary 300 Bio	Varian, Stuttgart

Laser Scanning Fluoreszenzmikroskop (LSM 710)	Carl Zeiss, Jena
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
dSTORM: Inverses Fluoreszenzmikroskop (IX-71)	Olympus, Hamburg
PAINT: Inverses Fluoreszenzmikroskop (IX-70)	Olympus, Hamburg
Plasmacleaner	Diener electronics

Tabelle 8: Liste der verwendeten Software

Software	Hersteller
ImageJ	National Institute of Mental Health, Bethesda, USA
Microsoft Office 2010 (Excel, Word)	Microsoft, Redmond, USA
Origin Pro 8G	OriginLab, Northampton, USA
ZEN 2008	Carl Zeiss, Jena

2.2 Methoden

2.2.1 Fluoreszenz

Erstmals wurde der Begriff der Fluoreszenz im 19ten Jahrhundert von Sir George Gabriel Stokes (1819-1903) zur Beschreibung seiner Beobachtungen an Calciumfluorit verwendet. Weiterhin formulierte er das Stokes'sche Gesetz, welches besagt, dass die Wellenlänge des fluoreszierenden Lichts immer größer als die Wellenlänge des Anregungslichtes ist. Anwendung in der optischen Mikroskopie fand die Fluoreszenz erst einige Jahre später durch die Konstruktion von Fluoreszenzmikroskopen durch die Physiker H. Lehmann und O. Heimstädt. Zunächst wurden Fluoreszenzmikroskope zur Untersuchung autofluoreszenter Pflanzen oder Bakterien verwendet. Erst in den 1950er Jahren konnte durch die Entwicklung der Immunfluoreszenztechnik durch A.H. Coons eine Grundlage für eine breite Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie geschaffen werden.

2.2.1.1 Prinzip der Fluoreszenz

Das erste Modell zur Erklärung der Fluoreszenz wurde 1935 von Alexander Jablonski vorgestellt. In Jablonskis Modell werden die Energieniveaus der Elektronen schematisch dargestellt sowie mögliche Übergänge zwischen den Energieniveaus, bei denen Energie unter anderem in Form von Fluoreszenz abgegeben werden kann.

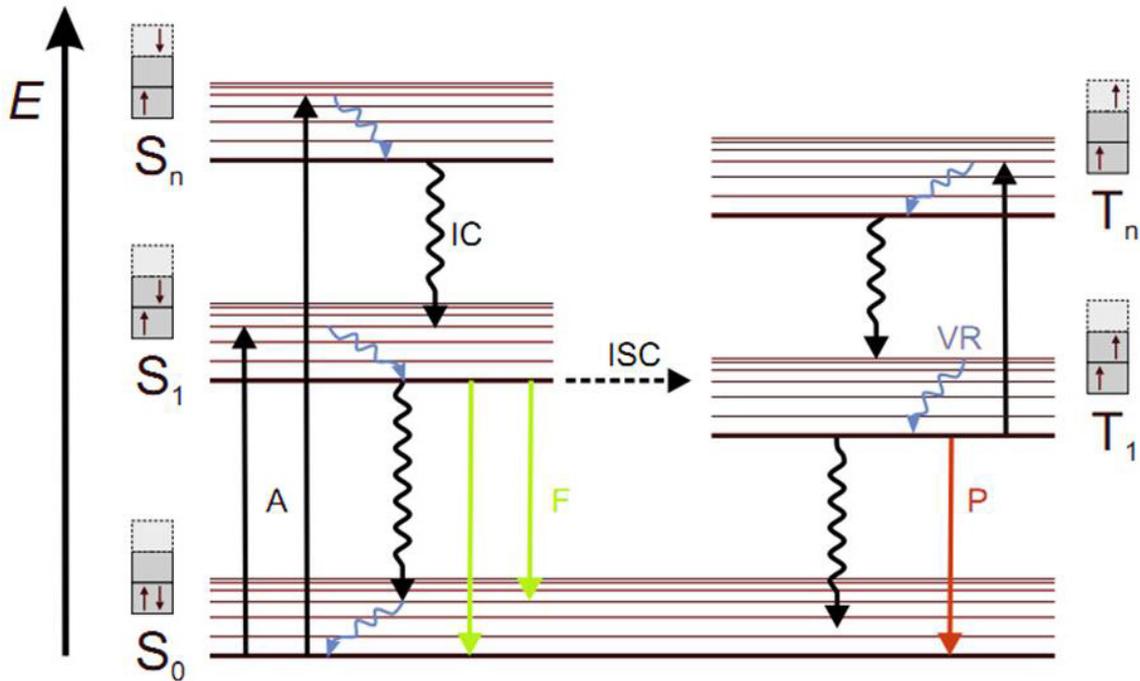


Abbildung 9: Jablonski-Diagramm. Schematische Darstellung der möglichen Übergänge zwischen den Energieniveaus. S_0 : Grundzustand; S_1 : erster angeregter Zustand; IC: interne Konversion; ISC: inter system crossing; F: Fluoreszenz; P: Phosphoreszenz; T: Triplettzustand

Grundlegend für das Verständnis des Prinzips der Fluoreszenz ist die Absorption und Emission von Licht. Durch die Interaktion von Licht mit Materie kann es dazu kommen, dass die Energie der elektromagnetischen Welle beim Auftreffen auf Materie durch Absorption zu einer Anregung der Atome oder Moleküle führt. Bei einzelnen Atomen hängt die zur Anregung benötigte Energie lediglich vom jeweiligen Elektronenzustand ab und ergibt ein diskretes Linienspektrum. Bei komplexeren Molekülen wie beispielsweise den in dieser Arbeit verwendeten Fluorophoren, hängt die benötigte Energie zusätzlich noch von eventuellen Rotations- oder Vibrationszuständen des gesamten Moleküls bzw. der einzelnen Atome ab. Die notwendige Energie, um ein Elektron vom Grundzustand S_0 in den ersten angeregten Zustand S_1 zu heben, wird mit der Planck'schen Gleichung und der Bohr-Bedingung beschrieben:

$$\Delta E = E_{S1} - E_{S0} = \frac{hc}{\lambda}$$

Hierbei ist h die Planckkonstante, c die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und λ die Wellenlänge des absorbierten Photons. Durch die Absorption der Photonenenergie kommt es zu einem Elektronenübergang von einem Vibrationszustand in den nächsten. Die Wahrscheinlichkeit für die Übergänge wird durch das Franck-Condon-Prinzip abgeschätzt. Das Franck-Condon-Prinzip basiert im Wesentlichen auf der Annahme, dass der Übergang eines Elektrons von einem in den anderen Schwingungszustand so schnell stattfindet, dass sich der Kern währenddessen nicht bewegt. Das kommt daher, dass die Masse eines Elektrons deutlich kleiner als die Kernmasse ist. Auf diese Weise können elektronische Übergänge in 10^{-15} Sekunden stattfinden, wohingegen der Kern für eine Vibrationsperiode etwa 10^{-13} Sekunden benötigt. Anschaulich bedeutet das, dass die Potentialkurve des angeregten Zustands verschoben ist. Die Anregung vom Grundzustand in den angeregten Zustand erfolgt somit in einen höheren Vibrationszustand des angeregten Zustands, da sich der Vibrationszustand des angeregten Zustands bei einem anderen Kernabstand befindet (Abb. 10). Durch Stöße mit anderen sich in der Umgebung befindlichen Atomen oder Molekülen gibt das Molekül innerhalb von Picosekunden einen Teil seiner Energie ab und relaxiert in den Vibrationsgrundzustand des angeregten Zustands. Danach folgt der Übergang in einen höheren Vibrationszustand des Grundzustandes, womöglich unter Emission von Fluoreszenz.

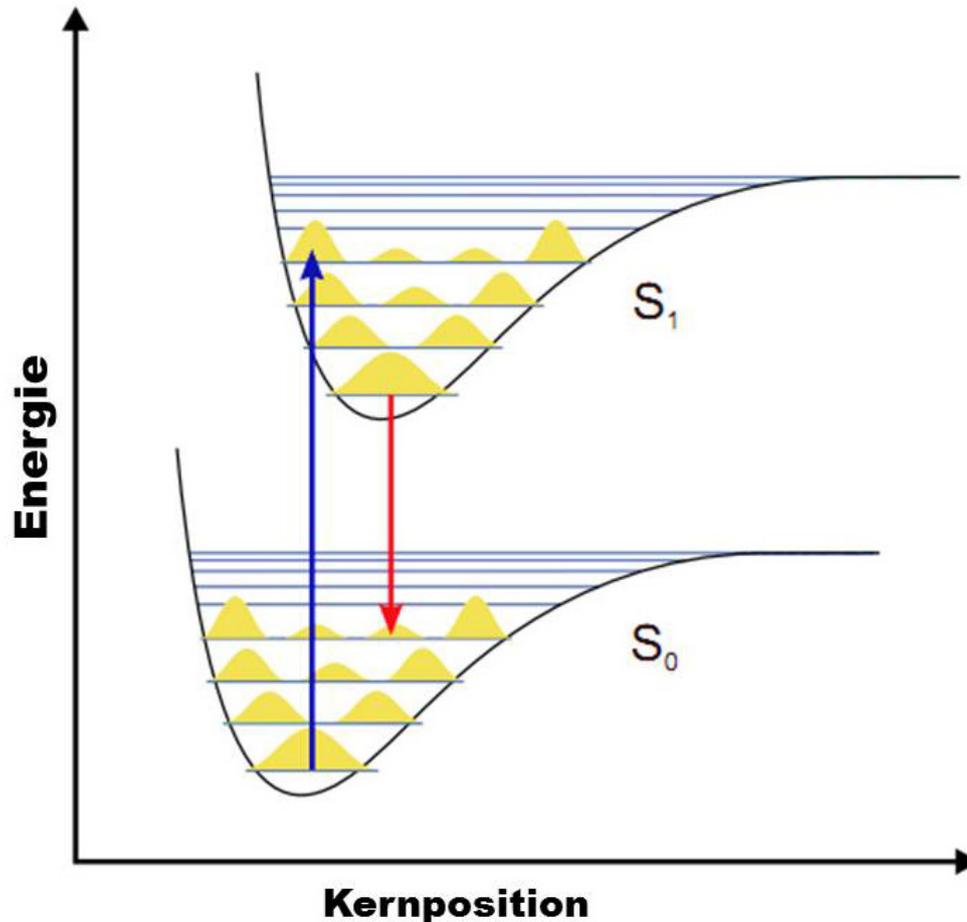


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Franck-Condon-Prinzips für elektronische Übergänge. Durch die geringe Masse des Elektrons bewegt sich der im Vergleich schwere Kern nicht. Somit findet der Elektronenübergang vertikal in einen höheren Schwingungszustand des angeregten S_1 Zustands statt. Danach relaxiert das Elektron in den niedrigsten Schwingungszustand von S_1 . Unter Emission von Fluoreszenz findet eine Relaxation in den höchsten Schwingungszustand des Grundzustands S_0 statt.

Wie in Abbildung 9 schematisch dargestellt, kann ein Fluorophor auf verschiedenen Wegen seine Energie abgeben und wieder in den Grundzustand relaxieren. Man unterscheidet zwischen strahlenden und nicht strahlenden Übergängen. Befindet sich das Fluorophor durch Absorption eines Photons im angeregten Zustand, wird es sich gemäß dem Franck-Condon-Prinzip zunächst in einem höheren Schwingungszustand befinden. Die Relaxation in niedrigere Vibrationszustände des angeregten Zustands wird als interne Konversion (internal conversion, IC) bezeichnet. Als Schwingungsrelaxation (vibrational conversion, VC) wird schließlich der Übergang in den Vibrationsgrundzustand des angeregten Zustands beschrieben. Die restliche Energie kann nun in Form von spontaner Emission eines Fluoreszenzphotons innerhalb einiger Nanosekunden abgegeben werden. Hierbei kann das Fluorophor vom niedrigsten Schwingungszustand aus S_1 in jeden Schwingungszustand von S_0 gelangen. Durch erneute VC gelangt das Fluorophor schließlich in den niedrigsten

Schwingungszustand von S_0 . Ein Beispiel für einen strahlungsfreien Übergang ist das intersystem crossing (ISC). Hierbei handelt es sich um einen Übergang, der mit einer Spinumkehr verbunden ist. Da es sich um einen spinverbotenen Prozess handelt, ist der Übergang in den Tripletzustand T_1 relativ unwahrscheinlich. Die Übergänge innerhalb des Tripletzustands sind so ähnlich wie im angeregten Zustand. Es können sowohl VC als auch IC auftreten. Der Übergang vom niedrigsten Schwingungszustand von T_1 in den Grundzustand wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Da es sich wiederum um einen spinverbotenen Übergang handelt, ist die Phosphoreszenzlebensdauer mit mehr als 10^{-6} Sekunden deutlich länger als die Fluoreszenz.

2.2.1.2 Fluoreszenzlöschung

Als Fluoreszenzlöschung werden alle Prozesse bezeichnet, die den angeregten Zustand strahlungsfrei entvölkern und somit zu einer geringeren Fluoreszenzquantenausbeute führen. Zu solchen Prozessen zählt beispielsweise der Energietransfer. Hierbei wird die Energie des angeregten Fluorophors auf ein zweites Akzeptorfluorophor übertragen und führt entweder zum Försterresonanz-Energietransfer (FRET; Förster, 1948) oder zum Elektronenaustausch-Energietransfer (EEET). Außerdem kann die Energie mittels Elektronentransfer- wie beispielsweise beim lichtinduzierten Elektronentransfer (photoinduced electron transfer, PET; Markus und Sutin, 1985)- durch Reaktion mit einem reduzierenden oder oxidierenden Agens abgegeben werden. Weitere Möglichkeiten, den angeregten Zustand strahlungsfrei zu entvölkern sind reversible Protonierung und Deprotonierung sowie Exciplex-Bildung.

Die für diese Arbeit wichtigste Art der Fluoreszenzlöschung ist der lichtinduzierte Elektronentransfer (PET). Basis für einen Elektronentransfer ist die photochemische Anregung von Elektronendonatoren und Akzeptormolekülen. In polaren Lösungsmitteln führt der Elektronentransfer zur Bildung von Radikationenpaaren. Durch elektronische Anregung wird die Elektronenaffinität des Akzeptors verändert. Dies macht einen Elektronentransfer möglich. In Abb. 11 ist schematisch dargestellt, wie es zu einem Elektronentransfer kommen kann. Ausgangspunkt ist die Anhebung eines Elektrons vom Grundzustand in den angeregten Zustand. Während des Übergangs vom höchsten besetzten Molekülorbital (highest occupied molecular orbital, HOMO) in das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (lowest unoccupied molecular orbital) entstehen zwei halbbesetzte Molekülorbitale (semi occupied molecular orbital, SOMO). Befindet sich in der Nähe des angeregten Fluorophors ein weiteres Molekül, kann das Fluorophor entweder durch Oxidation oder Reduktion mit diesem reagieren. Bei

Oxidation gelangt das Elektron vom höheren SOMO des Fluorophors in das LUMO des Löschermoleküls und bildet ein Radikalkation. Kommt es zur Reduktion, geschieht das indem ein Elektron vom HOMO des Löschermoleküls in das niedrigere SOMO des Fluorophors übertragen wird.

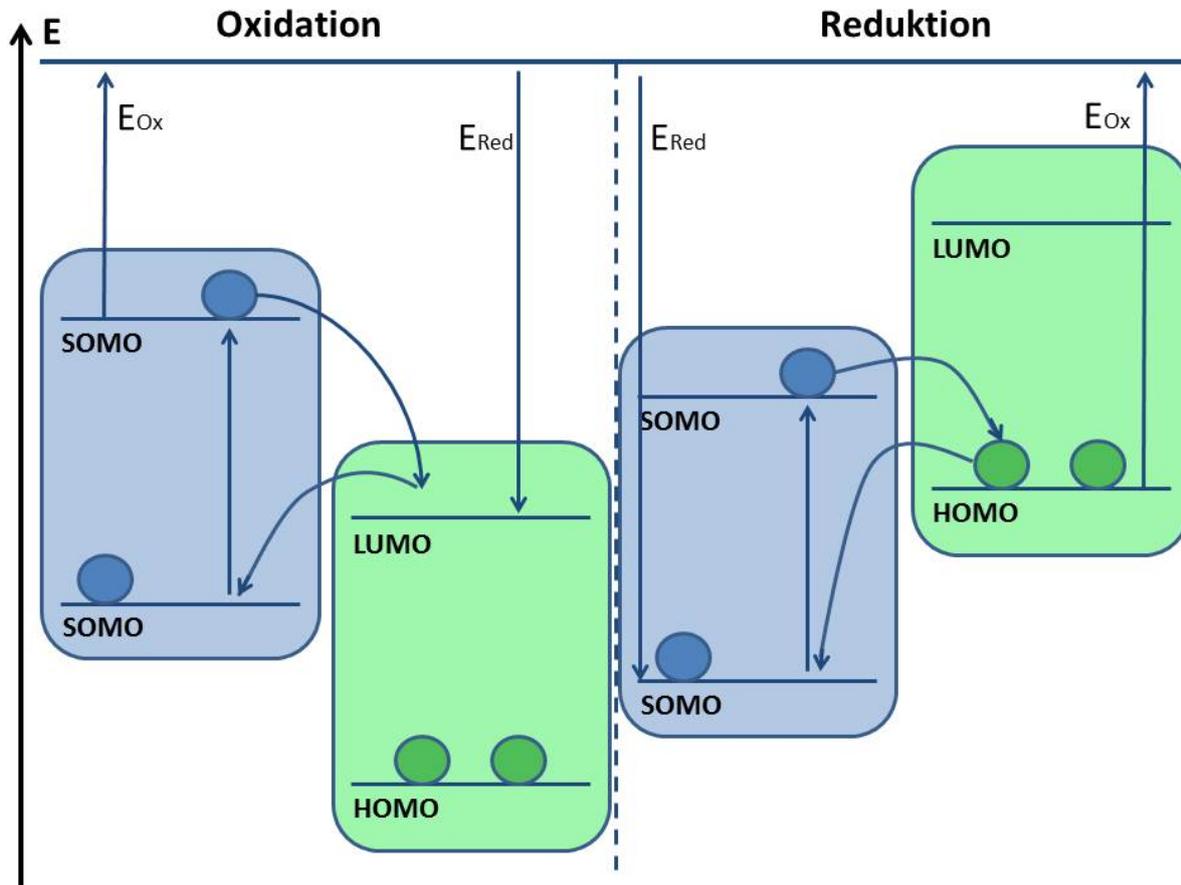


Abbildung 11: Energieschema des photoinduzierten Elektronentransfers eines angeregten Fluorophors. Im angeregten Zustand kann das Fluorophor von benachbarten Löschermolekülen entweder oxidiert oder reduziert werden. Hierfür erfolgt zunächst eine Ladungstrennung gefolgt von einer Ladungsrekombination. SOMO: semi occupied molecular orbital; HOMO: highest occupied molecular orbital; LUMO: lowest occupied molecular orbital.

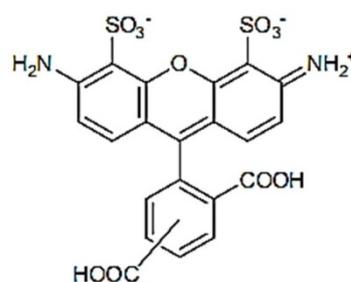
Von besonderer Bedeutung im Zusammenhang mit Fluoreszenzlöschung ist die Rolle von Sauerstoff. Sauerstoff ist in der Lage, den Triplettzustand- insbesondere von organischen Fluorophoren- strahlungsfrei zu entvölkern. Sauerstoff ist in beinahe allen wässrigen Lösungen enthalten. Die Konzentration bei Raumtemperatur beträgt etwa 200 μM (Holleman und Wilberg, 1995). Molekularer Sauerstoff (O_2) hat im Grundzustand zwei ungepaarte Elektronen in entarteten Molekülorbitalen. Dies entspricht einem Triplettzustand ($^3\text{O}_2$). Ein Fluorophor im angeregten Zustand kann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit durch ISC in den Triplettzustand gelangen. Das Fluorophor im Triplettzustand kann durch Zusammenstoß

mit dem Triplett-Sauerstoff reagieren und dabei einen EET ausführen. Als Resultat erhält man einen Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und das Fluorophor im Grundzustand. Singulett-Sauerstoff ist ein starker Oxidator und kann zu Epoxidbildung führen (durch Anlagerung an organische Doppelbindungen). Insbesondere im Zusammenhang mit Photobleichen spielt die Oxidation durch Singulett-Sauerstoff eine entscheidende Rolle, weshalb bei vielen Fluoreszenzexperimenten der Sauerstoffgehalt reduziert wird. Dies geschieht in den meisten Fällen entweder durch Anwendung von Stickstoff oder spezieller Sauerstoff-Reinigungs-Systeme (beispielsweise durch enzymatische Reaktionen).

2.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Als Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) werden funktionelle Gruppen eines Moleküls bezeichnet, die die Energie einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und mit einer anderen bestimmten Wellenlänge wieder emittieren können. Prinzipiell sind für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen alle Arten von Fluorophoren geeignet. Je nachdem, welche Art von Probe man zu welchem Zweck analysieren möchte, eignen sich bestimmte Fluorophore besser als andere. Organische Farbstoffe wurden speziell für Einzelmolekülmessungen optimiert und weisen demnach eine hohe Quantenausbeute, hohe Photostabilität und gute photochemische Eigenschaften auf. Fluoreszierende Proteine hingegen haben den Vorteil, dass sie durch genetische Modifikationen an fast alle Proteine in Zellen gebracht werden können. In dieser Arbeit wurden ausschließlich synthetische organische Farbstoffe verwendet. Zwei der wichtigsten Farbstoffklassen der organischen Fluorophore sind die Cyanine und die Rhodamine. In Abbildung 12 sind exemplarische Vertreter dieser Klassen abgebildet.

Alexa 488



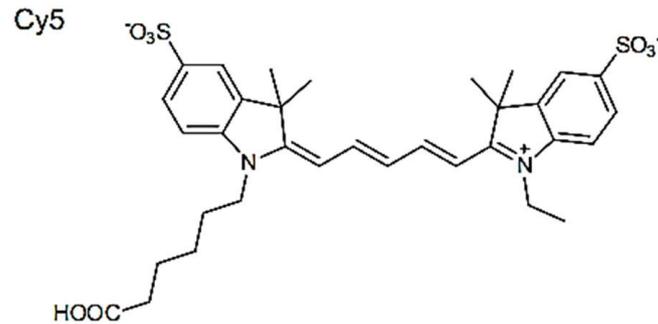


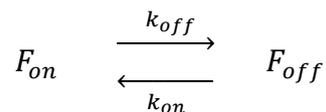
Abbildung 12: Beispiele für verschiedene Farbstoffklassen. Alexa 488 als Vertreter der Rhodaminfarbstoffe und Cy5 als Repräsentant der Cyaninfarbstoffe.

Eine wichtige Gemeinsamkeit dieser Farbstoffe ist eine konjugierte Doppelbindung. Die Länge dieser Doppelbindung bestimmt die spektralen Eigenschaften. Zu den Cyaninfarbstoffen zählen beispielsweise Cy3, Cy5, Cy7 und einige Alexa-Farbstoffe wie Alexa 647. Sie zeichnen sich durch eine ähnliche Struktur mit gleichen spektralen Eigenschaften aus. Der molare Extinktionskoeffizient ist mit $1,2 - 2,5 \times 10^5 \text{ L M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ sehr hoch, wohingegen die Fluoreszenzquantenausbeute mit $0,04 - 0,4$ eher gering einzuschätzen ist (Sauer et al., 2011). Bei den Rhodaminfarbstoffen, zu denen viele ATTO-Farbstoffe und einige Alexa-Derivate wie Alexa 488 zählen, ist der molare Extinktionskoeffizient mit $\sim 10^5 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in einem ähnlichen Bereich anzusetzen.

2.2.3 Photoschaltbare Fluoreszenzfarbstoffe

Die Nutzbarkeit von photoschaltbaren Fluorophoren wurde 2005 von Mc Ananey und Sinnecker dokumentiert (Mc.Ananey et al., 2005; Sinnecker et al., 2005). Sie beobachteten, dass Moleküle, die unter Lasereinstrahlung Fluoreszenz emittieren, zunächst in einen nicht fluoreszierenden Zustand übergangen und danach wieder in den fluoreszierenden Zustand zurückkehrten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzintensität mit andauernder Lasereinstrahlung abnimmt und dass sich die Fluorophore nach einer Bestrahlungspause wieder regenerieren. Etwa zur gleichen Zeit begann Sauer mit der systematischen Untersuchung photoschaltbarer Fluorophore und deren Nutzen für optische Mikroskopiertechnik (Sauer et al., 2005). Mittlerweile sind photoschaltbare Fluorophore ein grundlegendes Hilfsmittel in der Superauflösenden Mikroskopie. Allgemein können drei Arten von photoschaltbaren Fluorophoren unterschieden werden. Es gibt irreversibel

photoaktivierbare Fluorophore, die von einem dunklen in einen hellen Zustand geschaltet werden können. Weiterhin gibt es die irreversibel photokonvertierbaren Fluorophore. Diese befinden sich bereits in einem eingeschalteten Zustand, können aber durch weitere Bestrahlung in einen rotverschobenen eingeschalteten Zustand versetzt werden. Die dritte Gruppe bildet die für diese Arbeit interessante Art von Fluorophoren. Es handelt sich um reversibel photoschaltbare Fluorophore, die von einem eingeschalteten Zustand in einen dunklen Zustand versetzt werden können. Die Anzahl der Fluorophore, die sich im dunklen Zustand befinden, kann mittels statistischer Abschätzung unter Berücksichtigung der zugrunde liegenden Kinetik beschrieben werden. Eine Kontrolle der Anzahl von ein- bzw. ausgeschalteten Fluorophoren ist für supraauflösende Mikroskopiemethoden von grundlegender Bedeutung. Zur Beschreibung der Umwandlung von ausgeschalteten Fluorophoren (F_{off}) in eingeschaltete Fluorophore (F_{on}) kann folgendes Reaktionsschema verwendet werden:



Durch die Raten k_{off} und k_{on} kann die Anzahl der eingeschalteten Fluorophore (NF_{on}) kontrolliert werden. Die zugehörige Kinetik für die zum Zeitpunkt t eingeschalteten Fluorophore ergibt sich somit zu:

$$\frac{dNF_{on}}{dt} = -k_{off} NF_{on} + k_{on} NF_{off}$$

Mit der Nebenbedingung, dass alle die Anzahl der aktiven Fluorophore zum Zeitpunkt $t = 0$ der Gesamtzahl aller Fluorophore entspricht ($NF_{on,0} = NF_{on} + NF_{off}$), kann die Gleichung gelöst werden:

$$NF_{on}(t) = NF_{on,0} \left(\frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}} + \frac{k_{off}}{k_{on} + k_{off}} e^{-(k_{on} + k_{off})t} \right)$$

Für einen langen Beobachtungszeitraum ergibt sich ein Gleichgewichtszustand:

$$NF_{on,\infty} = \lim_{t \rightarrow \infty} NF_{on} = NF_{on,0} \left(\frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}} \right)$$

Anhand dieser Gleichung wird deutlich, dass die Anzahl der eingeschalteten Fluorophore über den Messzeitraum hinweg allein durch die Raten k_{on} und k_{off} bestimmt werden kann. Durch eine analoge Rechnung ergibt sich für die Anzahl der dunklen Fluorophore für lange Beobachtungszeiträume:

$$NF_{off,\infty} = \lim_{t \rightarrow \infty} NF_{off} = NF_{on,0} \left(\frac{k_{off}}{k_{on} + k_{off}} \right)$$

Somit kann auch die Anzahl der ausgeschalteten Fluorophore während der Messung durch die Raten k_{on} und k_{off} reguliert werden. Wichtig für Messungen, bei denen durch eine Gaussfit die exakte Position des Fluorophors bestimmt wird, ist die Sicherstellung dass nur ein Fluorophor gleichzeitig in einer bestimmten Beobachtungsregion (region of interest, ROI) pro Beobachtungszeitraum (acquisition time, t_a) eingeschaltet ist. Befinden sich also mehrere Fluorophore in einem ROI, muss dafür gesorgt werden dass nur ein Fluorophor gleichzeitig eingeschaltet ist. Alle anderen Fluorophore müssen in den dunklen Zustand versetzt werden. Wichtig für die spätere Auflösung ist also das Verhältnis von eingeschalteten zu ausgeschalteten Fluorophoren während des Messzeitraums:

$$\frac{NF_{off,\infty}}{NF_{on,\infty}} = \frac{NF_{on,0} \left(\frac{k_{off}}{k_{on} + k_{off}} \right)}{NF_{on,0} \left(\frac{k_{on}}{k_{on} + k_{off}} \right)} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Dieses Verhältnis wird mit v bezeichnet und zeigt den direkten Zusammenhang zwischen dem mittleren Anteil an eingeschalteten Fluorophoren und den Raten k_{on} und k_{off} . Je größer der Wert von v wird, desto geringer ist der Anteil an eingeschalteten Fluorophoren. Insbesondere bei hohen Fluorophordichten ist dieses Verhältnis von großem Interesse. Vor jeder Messung muss ausprobiert werden, für welches Verhältnis die optimale Anzahl an Fluorophoren einschaltet ist. Gegebenenfalls muss während der Messung eine der Raten angepasst werden, weil Bleicheffekte auftreten, die Laserleistung variiert, sich die Redoxbedingungen ändern, oder einzelne Fluorophore am Ende ihrer Schaltzyklen angekommen sind.

2.2.4 Markieren von Antikörpern und Peptiden

Zum Markieren der Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden die in Tab. 6 aufgelisteten Kits genau nach Anweisung verwendet. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und des Labelinggrads (degree of labeling, DOL) wurde zunächst ein Absorptionsspektrum der markierten und gereinigten Probe aufgenommen. Durch Einsetzen der gemessenen Absorptionspeaks bei 280 nm und 632 nm (Alexa Fluor 633) bzw. 650 nm (Alexa Fluor 647) in das Lambert-Beersche Gesetz, kann die Proteinkonzentration c (in Mol Farbstoff pro Mol Protein) bestimmt werden.

$$c = \frac{[A_{280nm} - (A_{632nm/650nm} \times f_c)] \times f}{203.000}$$

Hierbei ist $203.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ der molare Extinktionskoeffizient eines typischen IgG bei 280 nm. f ist der Verdünnungsfaktor und f_c der Korrekturfaktor für den Beitrag des Fluorophors zur Absorption bei 280 nm. Der Korrekturfaktor f_c sowie der molare Extinktionskoeffizient ϵ der verwendeten Fluorophore sind in Tab. 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Korrekturfaktor und molarer Extinktionskoeffizient der verwendeten Fluorophore.

Farbstoff	f_c bei 280 nm	ϵ in $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$
Alexa Fluor 488	0,11	71.000
Alexa Fluor 633	0,55	100.000
Alexa Fluor 647	0,03	239.000

Der DOL kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$DOL = \frac{A_{632nm/650nm} \times f}{\epsilon \times c}$$

Je nach berechneter Konzentration werden die markierten Antikörperlösungen mit PBS verdünnt und bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie

2.2.5.1 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Konfokale Fluoreszenzmessungen (Minsky, 1957; Pawley, 2006) wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) durchgeführt (LSM 710, Carl Zeiss). Die Ausstattung mit einem Argonlaser und drei Helium-Neon-Lasern erlaubt Messungen bei verschiedenen Anregungswellenlängen. Zur Abbildung wurde ein 40x Öl-Immersions-Objektiv (1,3 NA, Carl Zeiss) verwendet. In Abb. 13 ist der Strahlengang eines konfokalen LSM schematisch dargestellt. Der Laserstrahl wird nur auf einen kleinen Objektbereich fokussiert. In einem Strahlteiler wird das von der Probe zurückkommende Streulicht separiert. Eine kleine Lochblende (pinhole) in konfokaler Anordnung bewirkt, dass Probenbereiche, die sich entlang der optischen Achse vor oder hinter der Fokalebene befinden, nicht zum Detektionssignal beitragen. Ein zusätzlicher Emissionsfilter ermöglicht eine weitere Selektion der von der Probe kommenden Wellenlängen. Durch ein Piezoelement kann die Probe dreidimensional bewegt werden, was zu einem dreidimensional abgerasterten Bild der Probe führt. Die Detektion der Probensignale erfolgt mit einem Photoelektronenverstärker (*photomultiplier tube* PMT).

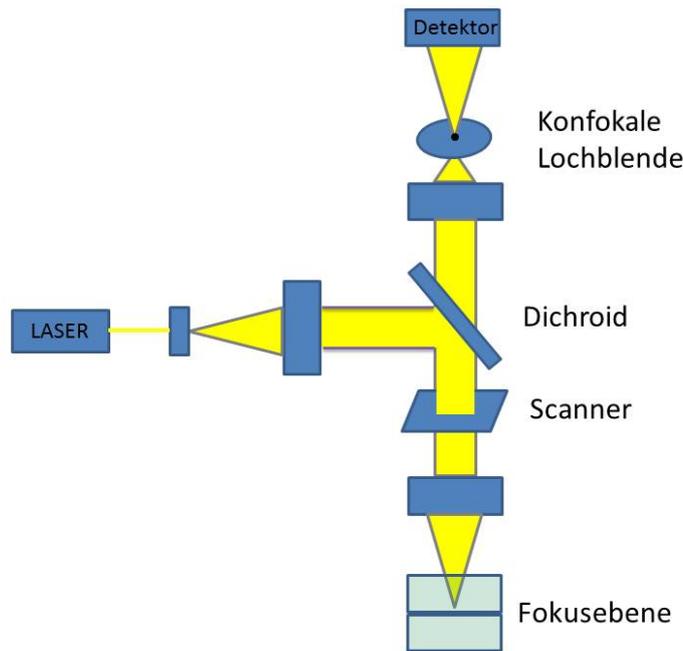


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Das von einem Laser ausgehende Licht wird mit einer Blende aufgeweitet und von einem Dichroiden in die Probe reflektiert. Das Anregungslicht wird mit Hilfe eines Objektivs in die Probe fokussiert. Die emittierte Fluoreszenz wird mit demselben Objektiv gesammelt und auf eine Lochblende fokussiert. Nur das Licht, das aus der Fokusebene der Probe stammt, kann die Lochblende passieren. Durch ein bewegliches Piezoelement kann die Probe abgerastert werden.

2.2.5.2 Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie

Einzelmolekülmessungen wurden an einem inversen Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop durchgeführt (IX-70/71 Olympus). Bei Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie wird eine fluoreszierende Probe mit monochromatischem Licht (beispielsweise Laserlicht) angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht der Probe wird vom Anregungslicht durch einen dichroitischen Spiegel getrennt. Da durch den Weitfeldaufbau Probenteile entlang der z-Achse angeregt werden, gelangen auch Fluoreszenzsignale außerhalb der Fokalebene auf den Detektor. Auf diese Weise gelangt diffuses Streulicht in den Beobachtungsbereich, was ein hohes Hintergrundsignal verursacht.

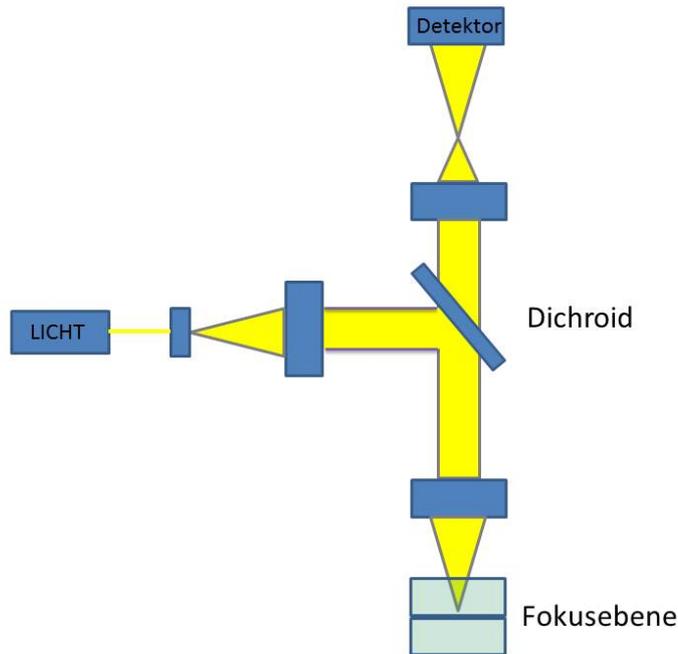


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Strahlengangs bei einem Weitfeldmikroskop. Der Lichtstrahl wird mit einer Blende aufgeweitet und von einem Dichroiden auf die Probe reflektiert. Das Anregungslicht wird mit einem Objektiv auf die Probe fokussiert und das emittierte Fluoreszenzlicht gelangt zurück durch dasselbe Objektiv auf den Dichroiden. Von dort gelangt das Fluoreszenzlicht auf den Detektor.

2.2.5.3 Totale interne Reflexion (TIR)

Mit Hilfe der Totalen internen Reflexion (TIR) kann das Beobachtungsvolumen bei Weitfeldmikroskopen deutlich begrenzt werden. Auf diese Weise ist es möglich, einen Großteil der bei Weitfeldmikroskopie auftretenden Hintergrundsignale außer Acht zu lassen. Die Intensität des eindringenden Lichtstrahls nimmt so stark ab, dass eine Anregung von Fluorophoren in Schichten die mehr als 100 nm von der Oberfläche entfernt sind, sehr unwahrscheinlich ist (Axelrod et al., 2001). Das Prinzip von TIR basiert auf dem Snellius'schen Gesetz:

$$\alpha_1 \sin n_1 = \alpha_2 \sin n_2$$

Nach diesem Gesetz wird ein Lichtstrahl, der eine Grenzfläche von einem Medium mit höherem Brechungsindex n_1 zu einem Medium mit niedrigerem Brechungsindex n_2 im Winkel α_1 trifft, in einem Winkel α_2 gebrochen. Totale interne Reflexion tritt ab einem kritischen Winkel α_c auf. Bei diesem Winkel verläuft der gebrochene Strahl tangential zur Oberfläche. Der kritische Winkel ist nur von den Brechungsindices der Grenzflächen abhängig:

$$\alpha_c = \sin^{-1} \frac{n_2}{n_1}$$

wobei $n_1 > n_2$. Alle Winkel, die größer als α_c sind, haben eine komplette Reflexion des gebrochenen Lichtstrahls zur Folge. Es entsteht ein evaneszentes Feld, das sich parallel zur Einfallsebene ausbreitet. Entlang der z-Achse fällt die Intensität exponentiell ab:

$$I(z) = I_0 e^{-\frac{z}{d}}$$

I_0 ist die Intensität an der Grenzfläche und d gibt die Eindringtiefe an, bei der die Eingangintensität auf $1/e$ abgefallen ist. Diese Eindringtiefe kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \alpha_1 - n_2^2}}$$

λ_0 ist die Wellenlänge des eingestrahlt Lichts. Normalerweise ist die Eindringtiefe d geringer als die zur Detektion verwendete Wellenlänge. Nimmt man beispielsweise Licht mit einer Wellenlänge von 647 nm und strahlt es in einem Winkel von 80° in eine Glas-Wasser Grenzfläche, beträgt $d \approx 73,4$ nm. Das bedeutet anschaulich, dass ab einer Eindringtiefe von etwa 73 nm nur noch ein Bruchteil ($1/e \approx 37\%$) der Eingangintensität auf die Probe trifft. Dies hat zur Folge, dass in größerem Abstand zur Probenoberfläche aufgrund der geringen Intensität nur noch wenig Fluorophore angeregt werden können. Auf diese Weise kann das Beobachtungsvolumen im Vergleich zur Weitfeldmikroskopie drastisch verkleinert und das Signal zu Hintergrundverhältnis deutlich verbessert werden.

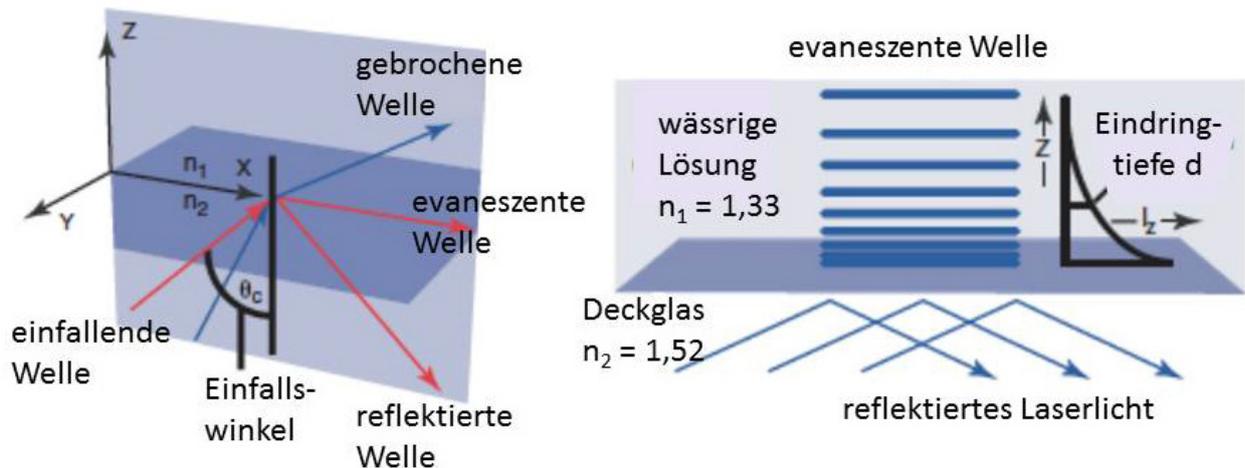


Abbildung 15: Prinzip der totalen internen Reflexion. Ab einem kritischen Winkel wird die einfallende Welle nicht mehr gebrochen (blauer Pfeil), sondern nur noch an der Grenzfläche reflektiert (roter Pfeil). Die Intensität der zugehörigen evaneszenten Welle nimmt mit steigender Eindringtiefe d exponentiell ab. Abbildung aus Fish, 2009.

2.2.5.4 Experimentelle Anordnung für PAINT-Messungen

PAINT-Messungen wurden am Institut für Molekulare Physikalische Chemie an der Heinrich-Heine Universität an einem selbstkonstruierten Aufbau durchgeführt. Als Basis für den Aufbau dient ein kommerzielles inverses Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX-70). Alle weiteren wichtigen Komponenten sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Komponenten der experimentellen Anordnung für PAINT-Messungen

Komponente	Hersteller
EMCCD Kamera, iXon ^{EM} , X-1510DV887ECS-BV	Andor Technology, Belfast, Irland
Inverses Mikroskop, IX-70	Olympus
Akustisch optischer Modulator, AOM-80	APE
Dichroid, 2mm, zt 491 RDCXT	AHF Analysetechnik
Ar-Ion-Laser, 543-AP-A02	Melles Griot
Bandpassfilter, EM HQ 535/50	AHF Analysetechnik
Plan Apo 60x NA 1,45	Olympus

Als Lichtquelle wurde ein Argon-Ionen Laser verwendet (Abb. 16). Das Laserlicht wird durch eine Faseroptik in ein Teleskop geleitet, womit die Größe des Laserstrahls reguliert werden

kann. Danach gelangt der Laserstrahl in einen akustisch-optischen Modulator (acousto optical modulator, AOM). Innerhalb des AOM befinden sich ein Kristall und ein optisches Gitter, an dem der Strahl gebeugt wird. In eine zweite Faseroptik wird nur noch das Beugungsmaximum erster Ordnung gekoppelt. Außerdem kann der AOM als schneller Schalter dienen, wenn er über ein externes Signal getriggert wird. Durch ein zweites Teleskop wird der Laserstrahl wieder aufgeweitet, um das Beobachtungsfeld zu vergrößern. Mit Hilfe einer Linse wird das Licht auf die Rückapertur des TIRF-Objektivs fokussiert. Ein Dichroid reflektiert einerseits das Laserlicht in das Objektiv und transmittiert andererseits das Fluoreszenzlicht der Probe. Danach gelangt das transmittierte Licht durch einen Bandpassfilter auf den Detektor. Um die Gesamtvergrößerung zu erhöhen, kann eine zusätzliche Linse in den Strahlengang gebracht werden.

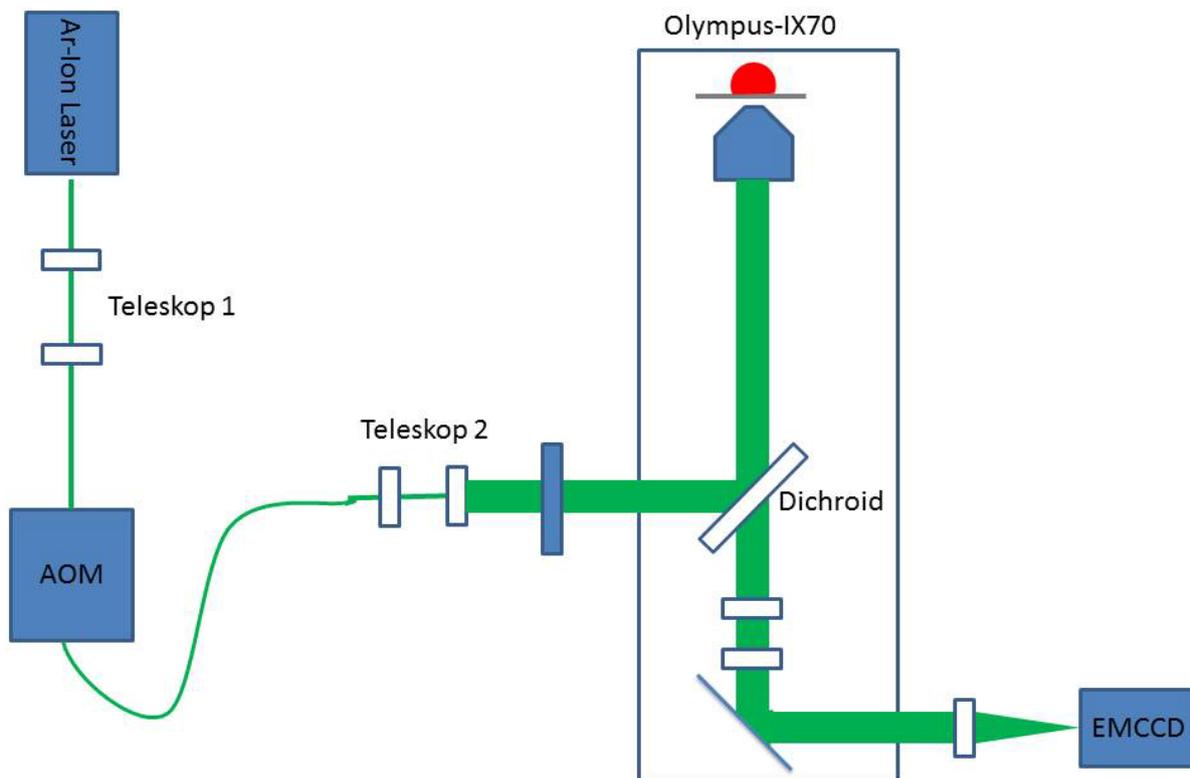


Abbildung 16: Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung für PAINT-Messungen. Laserlicht wird über eine optische Faser und ein Teleskop in einen akustisch-optischen Modulator (AOM) geleitet. Von dort wird nur das erste Beugungsmaximum über die optische Faser in ein zweites Teleskop zur Aufweitung gelenkt. Eine zusätzliche Linse leitet den Strahl in das TIRF-Objektiv und von dort auf die Probe. Das Fluoreszenzlicht wird über einen Dichroiden vom Anregungslicht getrennt. Über weitere Linsen und Filter gelangt das Fluoreszenzlicht auf den Detektor.

2.2.5.5 Experimentelle Anordnung für dSTORM-Messungen

Als Basis für STORM-Messungen dient ein kommerzielles inverses Olympus IX-71 Mikroskop, das durch den Anbau weiterer Komponenten (Tab.11) für supraauflösende Mikroskopiemessungen optimiert wurde.

Tabelle 11: Komponenten des dSTORM Aufbaus

Komponente	Hersteller
AOTF nC-VIS-TN 1001	AA Opto-Electronic, Orsay, Frankreich
EMCCD Kamera, iXon ^{EM} +DU-897E-COO-#BV	Andor Technology, Belfast, Irland
Inverses Mikroskop, IX-71	Olympus
Nano-stage, PI nanoxyz	PI L.P., Auburn, MA, USA
Öl-Immersionsobjektiv, 60x ApoN TIRF NA 1,45	Olympus
PI nano TM Stage controller	PI L.P., Auburn, MA, USA

Zur Anregung der fluoreszierenden Proben dienen ein Argonlaser (488/514 nm, Innova 70C) und ein Diodenlaser (642 nm, Oxxius, LBX-642-130 CIR-PP). Über einen akusto-optischen Modulator (acusto-optical tunable filter, AOTF) kann zwischen den beiden Lasern hin- und her- geschaltet werden, sowie die Intensität der Laser gesteuert werden. In Abb. 17 ist der experimentelle Aufbau mit Strahlengang schematisch dargestellt. Das Laserlicht wird durch Breitbandfilter (450-700 nm, Thorlabs, Dachau) und verschiedene dichroitische Spiegel auf die hintere Fokalebene des Mikroskops gelenkt. Zur Aufweitung des Laserstrahls dienen zwei achromatische Linsen mit unterschiedlichen Fokusslängen von 20 mm und 200 mm. Zur Fokussierung des Laserstrahls auf die hintere Apertur des Objektivs wird eine weitere Linse benötigt. Diese Linse und ein weiterer Spiegel werden an einem beweglichen Arm angebracht, um den Laserstrahl entweder in die Mitte des Objektivs (für Weitfeldmessungen) oder verkippt zur Objektivachse (für TIRF-Messungen) zu leiten. Mit Hilfe eines weiteren dichroitischen Spiegels gelangt das Anregungslicht auf die Probe und wird vom Fluoreszenzlicht der Probe getrennt. Das Fluoreszenzlicht wird vor der Detektion durch die CCD-Kamera durch geeignete Emissionsfilter geleitet. Die Kamera befindet sich zusammen mit einer achromatischen Linse auf einer beweglichen Schiene, um einen zusätzlichen Zoom

hinter dem Objektiv zu erzeugen. Auf diese Weise entsteht eine extra Vergrößerung von 2.05 – 4,2, was sich in der effektiven Pixelgröße auf der Kamera bemerkbar macht. Insgesamt (mit 60x Objektiv) kann die Pixelgröße der aufgenommenen Bilder zwischen 63,49 nm und 130 nm eingestellt werden.

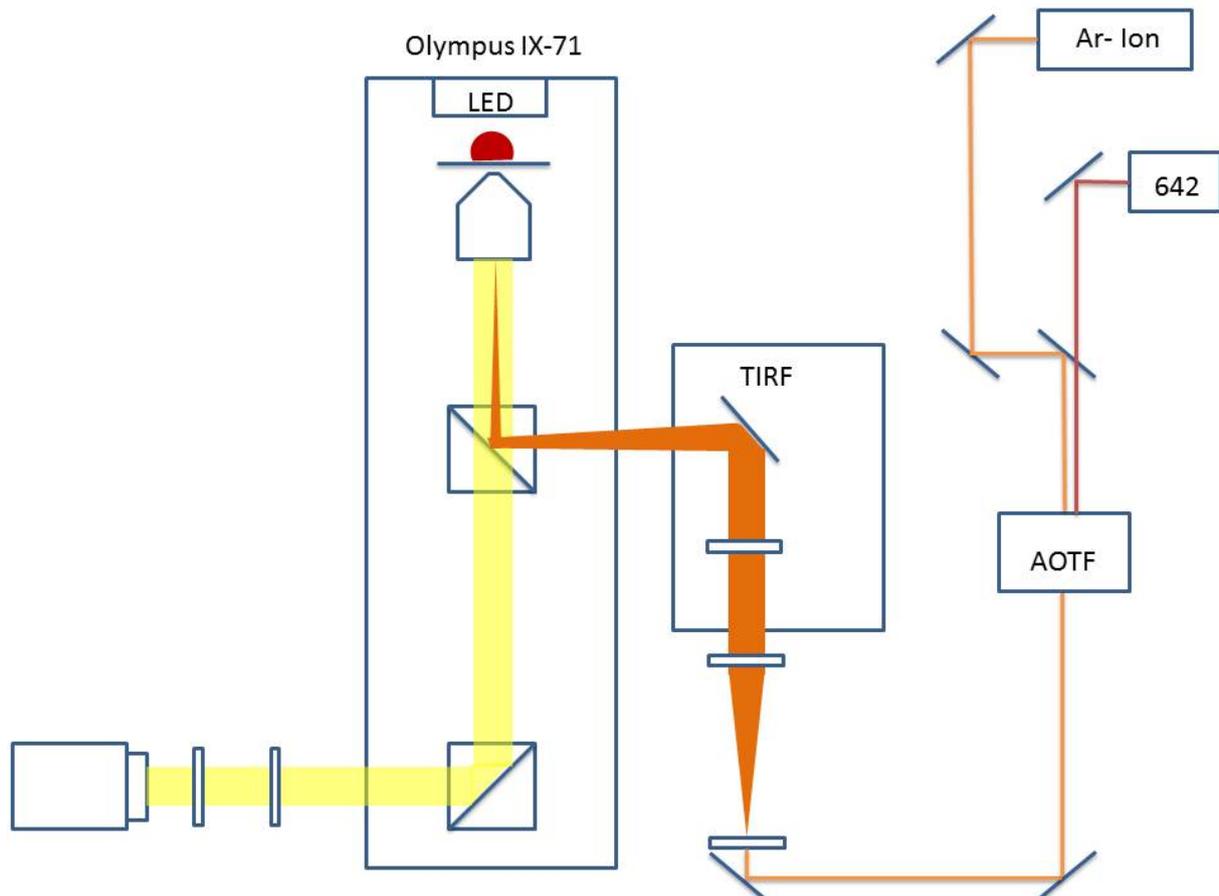


Abbildung 17: Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung für dSTORM-Messungen. Das Laserlicht kann mit einem akusto-optischen Modulator (AOTF) gesteuert werden. Eine TIRF-Anordnung fokussiert das Laserlicht auf die Rückapertur des Objektivs. In einem Strahlteiler wird das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht getrennt. Das Fluoreszenzlicht gelangt schließlich auf den Detektor.

2.2.6 Software zur Bildrekonstruktion

2.2.6.1 RapidSTORM

RapidSTORM wurde 2009 in der Gruppe von Prof. Sauer (Bielefeld/Würzburg) von Steve Wolter zur Rekonstruktion von Bildern mit einer Auflösung unterhalb der Beugungsbegrenzung entwickelt (Wolter et al., 2009). Mit Hilfe des Programms werden Messungen, die typischerweise aus mehreren Tausend Bildern bestehen, zu einem einzigen super-aufgelösten Bild verarbeitet. Dies geschieht vereinfacht dargestellt in drei Schritten. Zunächst wird das aufgenommene Bild geglättet, um das Rauschen zu reduzieren. Nun kann in jedem Bild die Anzahl der fluoreszierenden Ereignisse (Spots) bestimmt werden. Im nächsten Schritt wird durch eine präzise Fitprozedur die wahrscheinlichste Position des jeweiligen Fluorophors berechnet und als nanometergenaue Koordinaten gespeichert. Im letzten Schritt wird aus allen Koordinaten ein zweidimensionales Bild erstellt. Der vereinfachte Ablauf der Bildrekonstruktion ist in Abbildung 18 dargestellt.

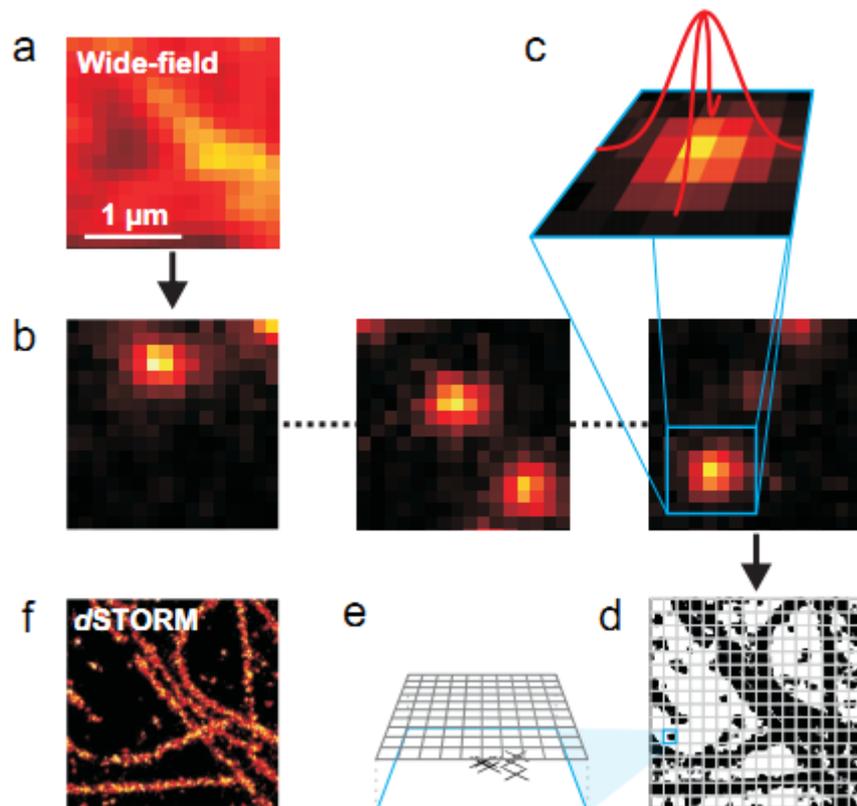


Abbildung 18: Prinzip der Einzelmolekül-Lokalisations-Mikroskopie. a) Ein Objekt wird mit photoschaltbaren Fluorophoren markiert und mit Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie abgebildet. b) Durch Aktivierung einzelner Teilgruppen der Fluorophore zur gleichen Zeit kann die Position eines einzelnen Fluorophors mit einer Fitprozedur c) mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. d) Lokalisation aller verwerteten Lokalisationen. e,f)

Ein künstliches Gitter aus unter-Pixeln wird über die Struktur gelegt und in ein Farbmuster übersetzt, um die Bilder besser darzustellen. Abbildung aus van Linde et al., 2011.

2.2.6.2 Analecta

Analecta wurde am Lehrstuhl für Molekulare Physikalische Chemie der Heinrich-Heine-Universität entwickelt. Das Programm basiert auf Labview. Die Daten, die von der CCD-Kamera kommen, bestehen aus (512x512) Pixeln. Bevor mit der Analyse begonnen werden kann, muss ein Grenzwert (Threshold) und eine Interessensregion (region of interest, ROI) festgelegt werden. Durch den Threshold wird vermieden, dass zu viele (Hintergrund)-Fluoreszenzsignale ausgewertet werden. Mit der ROI gibt man vor, in welcher Umgebung (in x- und y- Richtung) ein weiterer Treffer gefunden werden darf, um noch zum selben Objekt zu gehören. Innerhalb von jedem Bild sucht ein Algorithmus nach Fluoreszenzpunkten, die einen höheren Intensitätswert als der zuvor festgelegte Threshold aufweisen. Diese werden als Treffer bezeichnet. Innerhalb jeder ROI werden dann die Koordinaten des Pixels mit der höchsten Intensität als Zentrum der ROI gespeichert. Außerdem ist die maximale Anzahl an Treffern pro Bild limitiert, um Speicherplatz zu sparen. Werden in einem Bild mehr Treffer gefunden, wird dieses übersprungen und der Algorithmus macht beim nächsten Bild weiter. Für jeden Treffer wird ein lokaler Hintergrund aus der direkten Umgebung berechnet und sofort vom Signalwert subtrahiert. Außerdem werden Treffer nicht gewertet, bei denen die Breite der Fitfunktion größer als ein Pixel ist (dies entspricht 178 nm) und bei denen die Exzentrizität einen Wert von 0,3 überschreitet. Alle gewerteten Treffer werden akkumuliert und ergeben das rekonstruierte Bild der Probe mit hoher Auflösung.

2.2.7 Präparation von synthetischem A β

2.2.7.1 A β -Aggregate

Das lyophilisierte A β wurde in HFIP zu einer Konzentration von 400 μ M gelöst und in silikonisierte Reaktionsgefäße gefüllt. Um eventuelle Aggregationskeime zu lösen, wurde die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung aliquotiert und das HFIP abgedampft. Die Aliquots konnten bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden. Zur weiteren Bearbeitung wurde der A β -Film in 5,3 mM NaOH für 10 Minuten bei Raumtemperatur gelöst und danach mit PBS auf eine Konzentration von 40 μ M verdünnt. Die Zugabe von 4,7 mM HCl startete die Aggregation. Der Aggregationsprozess dauerte

mindestens zwölf Stunden bei einer Temperatur von 37°C. Nach der Aggregation war eine weitere Verdünnung mit PBS möglich.

2.2.7.2 A β -Oligomere mit Größenausschlusschromatographie (SEC)

A β -Oligomere wurden mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC) von kleineren Monomeren oder größeren unlöslichen Aggregaten getrennt. Ähnlich zur Vorbereitung von A β -Aggregaten wurden die lyophilisierten A β Peptide in HFIP gelöst und das HFIP wird anschließend verdampft. Danach wurde das A β in SEC-Puffer auf eine Konzentration von mindestens 500 μ M verdünnt. Nach einer Zentrifugationszeit von fünf Minuten bei 16.100 g wurde der Überstand sofort auf eine Superdex 75 10/300 GL Säule gegeben. Die Trennung erfolgte nach dem Protokoll von Johansson et al., 2006. Anhand der Absorption bei 214 nm und 280 nm konnte bestimmt werden, wann die gewünschten Oligomere eluiert wurden. Die betreffenden Fraktionen wurden für die Konzentrationsbestimmung vereinigt.

2.2.7.3 Konzentrationsbestimmung mit BCA

Zur Konzentrationsbestimmung der mittels SEC erhaltenen A β -Oligomere wurde ein Micro BCA Protein Assay Kit verwendet. Zunächst wurden die Oligomere bei 60 °C für 30 Minuten in 6 M Urea denaturiert. Als Referenz wurde eine BSA Verdünnungsreihe mit vier verschiedenen Konzentrationen zwischen 0 μ g/ml und 40 μ g/ml hergestellt. Sowohl die BSA Verdünnungen als auch die denaturierte A β Probe wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit den Reagenzien des Micro BCA Protein Assay Kits für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Danach wurden 300 μ l der Proben jeweils in doppelter Ausführung in eine 96-Kammer-Platte gegeben und die Absorption bei 570 nm in einem Plattenleser (POLARstar OPTIMA) gemessen. Anhand der BSA Verdünnungsreihe konnte eine Kalibrierungskurve erstellt werden. Aus der Geradengleichung konnte die Konzentration der A β -Probe abgeleitet werden.

2.2.8 Immobilisierungsprotokoll

Zur Immobilisierung für die spätere Detektion der A β Aggregate wurde ein kovalentes Immobilisierungsprotokoll verwendet. Die Nunc-Platten wurden für 30 Minuten mit 1% Küvettol im Ultraschallbad gereinigt. Danach folgten mindestens fünf Waschschr

fließendem Wasser und eine weitere Reinigung mit Wasser für 30 Minuten im Ultraschallbad. Der nächste Schritt war eine Inkubation mit 5 M NaOH entweder über Nacht oder für mindestens drei Stunden. Zum Schluss der Reinigung wurde die Platte mit Wasser und Ethanol abgespült und mit Stickstoff getrocknet. Zur kovalenten Bindung eines Captures an die Oberfläche wurde zunächst ein Dextran-Spacer an die Oberfläche gebunden. Dies erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde die Glasoberfläche mit Aminogruppen aktiviert. Hierzu wurde die Oberfläche über Nacht mit einer 5 M Ethanolamin Hydrochloridlösung in DMSO inkubiert. Danach folgten jeweils drei Waschschrte mit DMSO und Wasser. Zur kovalenten Bindung des Dextran-Spacers wurde Dextran (10 mg/ml) in Wasser gelöst und mit einem 0,2 µm Filter gefiltert. EDC (200 mM) und NHS (50 mM) wurden miteinander gemischt und für 10 Minuten zur Dextranlösung gegeben, bevor das Gemisch auf die Oberfläche gegeben wurde. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur. Währenddessen reagierte das NHS unter Abspaltung von Wasser mit der Aminogruppe der aktivierten Glasoberfläche und es kam zu einer kovalenten Bindung. Im zweiten Schritt wurde der Capture ebenfalls kovalent an den Dextran-Spacer gebunden. Hierzu wurde die Oberfläche zunächst fünfmal mit Wasser gereinigt und dann wiederum für 10 Minuten mit einem EDC/NHS Gemisch (200/50 mM) aktiviert. Danach wurde der Capture Antikörper (0,02 – 0,05 µg/µl) hinzugegeben und bei 4 °C mindestens zwei Stunden inkubiert. Eine Inkubation für zehn Minuten mit 1 M Ethanolamin in DMSO deaktivierte die restlichen Carboxylgruppen des Dextran-Spacers. Nach weiteren drei Waschschrten mit PBS konnten die Proben auf die Oberfläche gegeben werden. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur oder konnte über Nacht bei 4 °C erfolgen. Danach wurden die immobilisierten Proben mindestens zweimal mit TBST gewaschen, bevor der Detektionsantikörper hinzukam. Für C-terminale fluoreszenzmarkierte Antikörper erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C, N-terminale Antikörper inkubierten etwa eine Stunde bei Raumtemperatur. Zum Schluss wurden die Proben fünfmal mit TBST gewaschen und danach nochmals eine Stunde bei Raumtemperatur und erneut fünfmal mit TBST. Nach weiteren drei Waschschrten mit Wasser waren die Proben fertig für die Messung.

2.2.8.1 Sauerstoffreinigungssystem

Für Messungen mit photoschaltbaren Fluorophoren wurde ein Sauerstoffreinigungssystem (Englander, 1987; Benesch und Benesch, 1953) verwendet. Dieses System bestand aus Glukoseoxidase und Katalase. Die Glukoseoxidase katalysierte die Oxidation von β-D-Glukose zu D-Glucono-δ-Lactone und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in wässriger Umgebung

und bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff. Die Katalase wandelte Wasserstoffperoxid wieder in Wasser und molekularem Sauerstoff um. Für die in dieser Arbeit angefertigten Messungen wurden 500 μ l PBS mit 500 μ l Glukose gemischt. Dazu wurde β -Mercaptoethylamin (MEA, 20 – 100 mM) gegeben. Das Gemisch wurde in die Probenkammern gefüllt, bis die Kammer fast voll war. Unmittelbar vor der Messung wurden 20 μ l der Enzymlösung hinzugegeben (1 mg/ml Glukoseoxidase, 20 μ g/ml Katalase). Die Kammer musste soweit gefüllt sein, dass sich ein Meniskus bildete. Mit einem Deckglas wurde die Kammer luftdicht verschlossen.

2.2.8.2 Peptide als Detektionssonde

Bei einigen PAINT Messungen wurden verschiedene D-Peptide als Detektionssonde ausprobiert. Diese haben eine geringere Affinität zu den A β Proben als die A β - spezifischen Antikörper. Aus diesem Grund wurden die fluoreszenzmarkierten Peptide erst unmittelbar vor der Messung in der gewünschten Konzentration auf die immobilisierte Probe gegeben. Die finalen Waschschrte mit TBST und Wasser entfielen.

2.2.9 Datenaufnahme

2.2.9.1 Datenaufnahme bei PAINT-Messungen

Bei PAINT-Messungen waren die Fluorophorkonzentrationen so gering, dass auch bei hohen Laserintensitäten und langen Belichtungszeiten kein fokussierbares Objekt auf der Oberfläche erkennbar war. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Testprobe auf den Objektisch gebracht, um das System zu justieren. Der Laserstrahl wurde solange justiert, bis die Testprobe aus Quantum-Dots im Weitfeldmodus gleichmäßig ausgeleuchtet war. Danach wurde der richtige TIRF-Winkel eingestellt. Dann konnten die immobilisierten A β -Proben auf den Objektisch gebracht werden. Die meisten Messungen wurden bei einer Laserleistung von 30 % - 60 % angefertigt. Die Belichtungszeit betrug zwischen 30 ms und 200 ms. Die Dauer eines Messzyklus (cycle time, t_c) wurde meistens doppelt so lang gewählt. Je nach Konzentration der Detektionssonden wurde eine EM-Verstärkung zwischen 200 und 300 gewählt. Eine Messung bestand aus 100 bis 2000 Bildern. Durch Akkumulation aller Bilder und die Rekonstruktion durch die Software konnte im Nachhinein festgestellt werden, ob die Messung auf der Oberfläche der Probe erfolgte. Die Daten wurden als sif-Dateien gespeichert.

2.2.9.2 Datenaufnahme bei dSTORM-Messungen

Die immobilisierten A β Proben wurden mit dem geeigneten Puffer versehen. Nachdem die Kammern mit einem Deckglas luftdicht verschlossen wurden, wurden die 8-Kammerplatten auf dem Nanopositionierungssystem des Mikroskops platziert. Im Weitfeldmodus des Mikroskops (TIRF-Winkel = 0) wurde die Oberfläche der Probe fokussiert. Die Vorverstärkung der CCD-Kamera betrug bei allen Messungen 5x. Für Weitfeldmessungen konnte die Verstärkung des Elektronenvervielfachers (electron mutiplier, EM) je nach Fluoreszenzintensität der Probe zwischen 9 und 300 betragen. Für Einzelmolekülmessungen mussten Werte ab 250 gewählt werden. Für ein Weitfeldbild der Probe wurden 1-10 Bilder mit einer Belichtungszeit (exposure time, t_e) zwischen 30 ms und 100 ms bei etwa 2% - 10% der maximalen Laserintensität gemacht. Die Dauer eines einzelnen Messzyklus wurde gleich lang wie die Belichtungszeit gewählt. Es musste lediglich eine zusätzliche Datenauslesezeit von 35,6 ms hinzuaddiert werden. Zu Beginn einer Messung wurde zunächst der richtige TIRF-Winkel ausgewählt. Hierzu wurde der Strahl so lange verkippt, bis die fluoreszenzmarkierten Proben auf der Oberfläche den stärksten Reflex zeigten. Dann wurde die Probe so lang mit 100 % Laserleistung bestrahlt, bis sich die meisten Fluorophore im ausgeschalteten Zustand befanden und das gewünschte Blinkverhalten zeigten. Dieser Prozess konnte je nach Konzentration und Markierungsgrad der Probe zwischen wenigen Sekunden und mehreren Minuten dauern. Um störende Streufluoreszenz aus anderen Probenschichten zu vermeiden, wurde der Bleichvorgang für verschiedene TIRF-Winkel durchgeführt. Danach wurden zwischen 2000 und 16000 Bilder von jeder Probe aufgenommen. Bei zweifarbigen Messungen war der Vorgang ähnlich. Es wurde für jede Wellenlänge zunächst ein Weitfeldbild aufgenommen. Danach wurde zuerst die Messung mit der höheren Anregungswellenlänge durchgeführt und direkt im Anschluss die Messung mit der niedrigeren Wellenlänge. Die Daten wurden als tif-Dateien gespeichert.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war, supraaufgelöste Bilder von A β -Aggregaten zu erstellen. Durch ein im unserem Institut optimiertes Surface-FIDA-Protokoll können verschiedene A β -Spezies mit hoher Spezifität und Sensitivität detektiert werden. Bisherige Messungen von A β -Aggregaten wurden mit Laser-Scanning-Mikroskopie angefertigt und unterliegen der Beugungsbegrenzung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Surface-FIDA-Protokoll an Einzelmolekülmessungen angepasst. Mit Hilfe von zwei verschiedenen auf stochastischen Prozessen beruhenden supraauflösenden optischen Mikroskopiemethoden wurden Bedingungen zur Anfertigung von supraaufgelösten Bildern von A β -Aggregaten gesucht.

3.1 PAINT

PAINT-Messungen basieren darauf, dass in jedem Messzyklus eine stochastisch verteilte Teilgruppe von sich in der umgebenden Lösung befindenden Fluorophoren an die Oberfläche der Probe bindet und dort ein Fluoreszenzsignal emittiert. Während der Bindungszeit können Photonen gesammelt werden, die die spätere Auflösung des rekonstruierten Bildes bestimmen. Im nächsten Messzyklus muss sich das Fluorophor wieder in der Umgebungslösung befinden oder eine andere statistisch ausgewählte Stelle der Probenoberfläche belegen. Wichtig für die spätere Rekonstruktion ist, dass in jedem Messzyklus nur wenige Fluorophore gleichzeitig an die Oberfläche binden, damit sich die Lichtausbreitungsfunktionen nicht überlappen. Bei PAINT-Messungen spielt somit die Kinetik zwischen der Detektionssonde und der immobilisierten Probe eine wesentliche Rolle. Die Kinetik kann durch eine geeignete Einstellung der Detektionssonden-Konzentration oder durch die Detektionssonde an sich beeinflusst werden. Außerdem ist die Einstellung der Belichtungsdauer und der Dauer eines einzelnen Messzyklus von Bedeutung. Wird die Belichtungszeit zu lang gewählt, diffundiert das Fluorophor während dieser Zeit an eine andere Stelle auf der Probe und das mittlere Intensitätssignal und somit die spätere Auflösung verschlechtert sich. Oder ein zweites Fluorophor hat während dieser Zeit die Gelegenheit, an dieselbe Stelle zu binden. Die Informationen können bei der späteren Rekonstruktion nicht mehr voneinander getrennt werden. Wird diese Zeit zu kurz gewählt, verschlechtert sich ebenfalls die spätere Auflösung, da nicht alle Photonen detektiert werden. Auch die Dauer, in der die Probe nicht belichtet wird, ist entscheidend für die Qualität der späteren Bilder. Ist diese Zeit zu kurz, können die Sonden während der Zeit nicht von der Probe abdiffundieren und im nächsten Messzyklus werden die gleichen Informationen gesammelt wie im Zyklus

davor. Ist diese Zeit zu lang, werden Bindungsstellen, die währenddessen besetzt wurden, nicht registriert und die Information geht verloren. Auch die eingestrahelte Laserintensität spielt eine wichtige Rolle. Bei einer zu hohen Intensität kommt es schnell zu Bleicheffekten und die Probe ist unbrauchbar. Ist die Laserintensität zu gering, werden nur sehr wenig Fluorophore angeregt, was zu einer geringeren Anzahl an gesammelten Photonen und einer schlechteren Auflösung führt. Außerdem sind für die Qualität der späteren supraaufgelösten Bilder Aspekte wie ein geringes Hintergrundsignal und Driftvermeidung von entscheidender Bedeutung.

3.1.1 Messbedingungen

Im Folgenden werden die Bedingungen aufgelistet, bei denen die optimalen Resultate in Bezug auf ein verwertbares Messsignal unter PAIN-T-Bedingungen entstanden sind. In den meisten Fällen kennzeichnen sich geeignete Messbedingungen durch eine Intensitätsverteilung, die über den Messzeitraum zwischen hoher und niedriger Intensität variiert. Betrachtet man einen Ausschnitt der Probe, auf dem man ein A β -Aggregat vermutet, sollten während der Belichtungszeit Photonen von verschiedenen Stellen auf der Probenoberfläche gesammelt werden. Danach folgt eine Dunkelphase und im nächsten Messzyklus werden Photonen von anderen Bereichen auf der Probenoberfläche gesammelt. Auf diese Weise sollte sich idealerweise ein ähnlicher Verlauf wie in Abb. 19 ergeben.

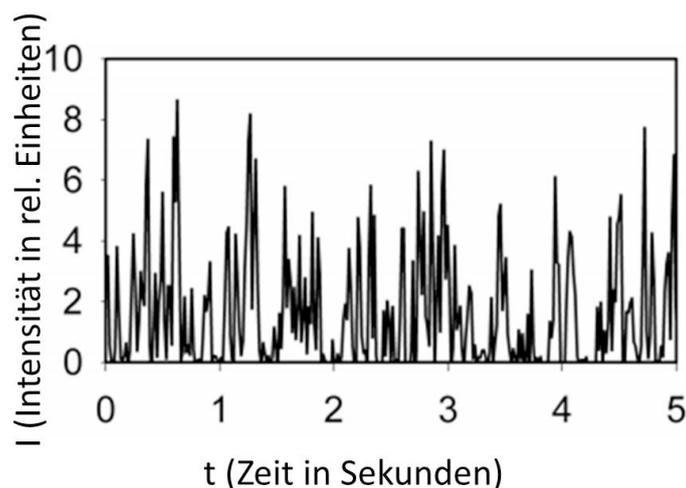


Abbildung 19: Idealer Verlauf der Fluoreszenzintensität (I) innerhalb eines Interessensbereichs über die gesamte Messzeit (t). Abbildung aus Scharonov und Hochstrasser, 2006.

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität I eines Beobachtungsbereichs über einen Zeitraum t . Im Folgenden werden diese Kurven als Zeitspuren bezeichnet.

3.1.1.1 Hintergrundfluoreszenz

Bei PAINT-Messungen handelt es sich um Einzelmolekülmessungen. Bei der späteren nanometergenauen Rekonstruktion des ursprünglichen Bildes wird jedes Fluoreszenzsignal verwendet, das über einem bestimmten Intensitätswert liegt und gewisse Symmetrieeigenschaften aufweist. Durch unspezifische Hintergrundfluoreszenz kann das Messergebnis verfälscht werden. Aus diesem Grund ist es für PAINT-Messungen von hoher Wichtigkeit, dass der unspezifisch fluoreszierende Hintergrund soweit wie möglich reduziert wird. Durch die folgenden Messungen wurde das Fluoreszenzsignal einzelner Chemikalien und Materialien überprüft. Von Interesse war, ob eine Substanz nach den für das Immobilisierungsprotokoll üblichen Waschschritten und in Kombination mit anderen Substanzen ein Fluoreszenzsignal hinterlässt. Für diese Messreihe wurde die Substanz oder die kombinierten Substanzen auf den gereinigten Glasobjektträger aufgebracht und nach der für das Protokoll üblichen Inkubationszeit zwischen dreimal und zehnmal mit Wasser oder Puffer abgewaschen. Für den Vergleich der getesteten Substanzen, wurden alle Kameraeinstellungen (EM-Verstärkung, Vorverstärkung) und die Laserleistung bei allen Messungen beibehalten. Es wurde eine Region (region of interest, ROI) von 100×100 Pixeln in jeder Probe ausgewählt. Von jeder ROI wurde ein Fluoreszenzbild (200 ms Belichtungszeit) aufgenommen und die Gesamtintensität über die komplette Fläche mittels Integration bestimmt. Für jede Probe wurde der Vorgang an zehn verschiedenen Stellen wiederholt und dann ein Mittelwert bestimmt.

3.1.1.2 A β und D-Peptide

Abbildung 20 zeigt die auf gereinigtes Glas normierten Fluoreszenzintensitäten für A β sowie das D1- und D3- Peptid für eine Anregung bei 488 nm und 635 nm. Die Peptide sind nicht fluoreszenzmarkiert. Für beide Wellenlängen nimmt die Fluoreszenzintensität durch die Zugabe von A β Aggregaten ($4 \mu\text{M}$) zu. Das Gleiche gilt für D1 (80 pM) und D3 (80 pM). Der stärkste Anstieg der Fluoreszenzintensität ist bei der kombinierten Zugabe von A β Aggregaten und D-Peptiden zu beobachten. Allgemein ist die Fluoreszenzintensität bei 635 nm etwas höher als bei 488 nm. Im Vergleich zu gereinigtem Glas steigt die Fluoreszenzintensität durch Zugabe von A β und D-Peptiden etwas an (zwischen 10% und

60%). Da das D1-Peptid im Vergleich zum D3-Peptid etwas weniger unspezifisches Fluoreszenzsignal für beide Wellenlängen liefert, ist das D1-Peptid dem D3-Peptid bei späteren PAINT-Messungen vorzuziehen.

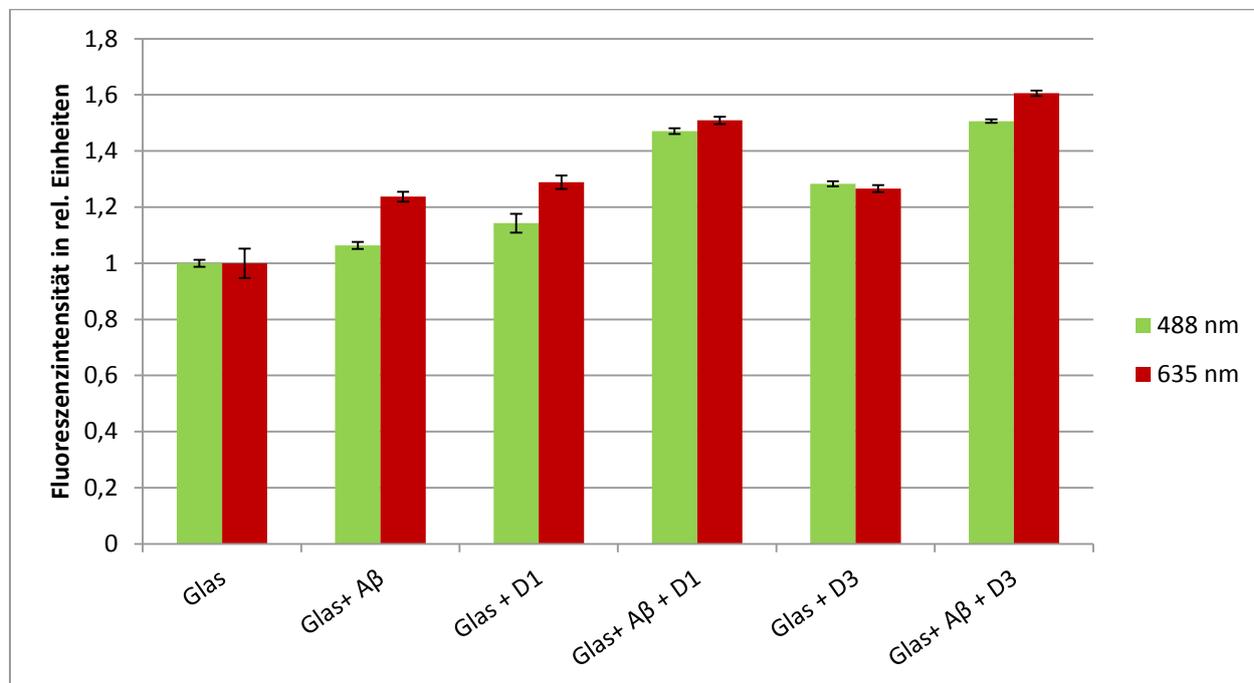


Abbildung 20: Fluoreszenz von A β und D-Peptiden normiert auf die Fluoreszenz von gereinigtem Glas für 488 nm und 635 nm. Konzentrationen: $c_{A\beta} = 4 \mu\text{M}$, $c_{D1} = 80 \text{ pM}$, $c_{D3} = 80 \text{ pM}$. Inkubationszeit jeweils 1 h bei Raumtemperatur. 10 Waschstschritte mit PBS. Mittelwert von jeweils 10 Messungen.

3.1.1.3 Dextran und PEG

Als Spacer für die kovalente Bindung des Capture Antikörpers kann sowohl Dextran als auch Polyethylenglykol (PEG) verwendet werden. Um zu testen, welche dieser beiden Substanzen in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Detektionssonden weniger Hintergrundfluoreszenz verursacht, wurden diese auf eine gereinigte Glasoberfläche gegeben. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde fluoreszenzmarkiertes D3 (D3-Cy5, 80 pM) für eine Stunde auf die Oberfläche gegeben. Vor der Messung wurden die Proben zehnmal mit Wasser gewaschen.

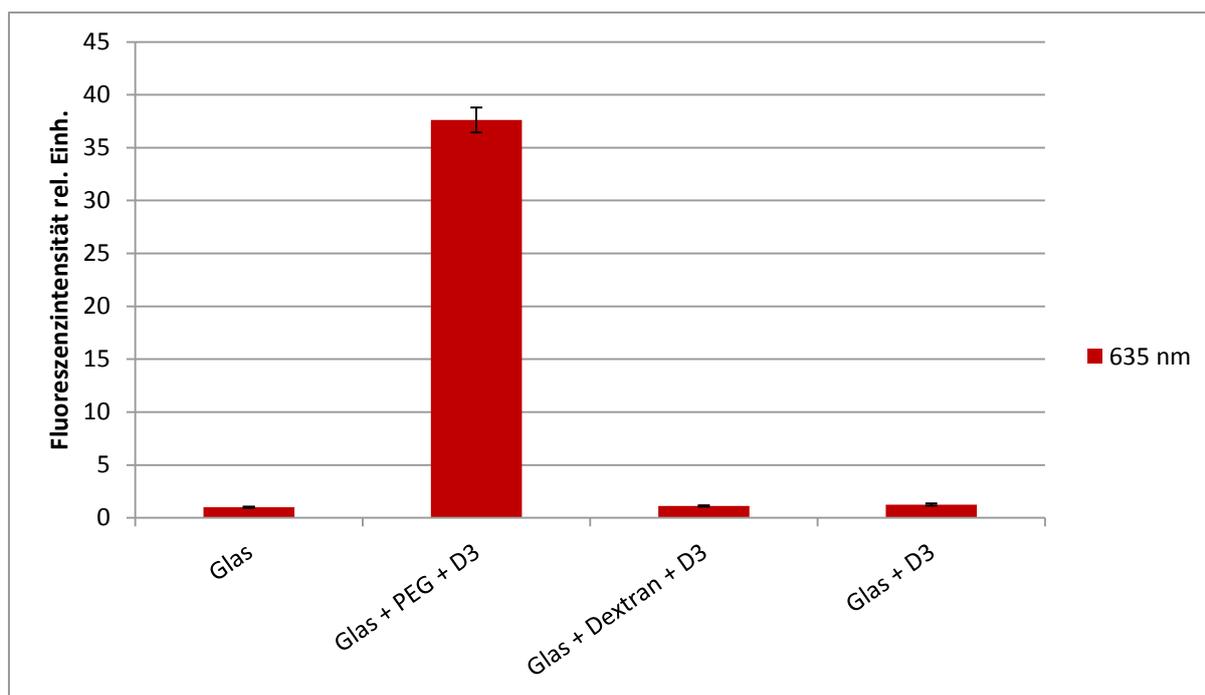


Abbildung 21: Fluoreszenzintensität von PEG und Dextran in Kombination mit fluoreszenzmarkiertem D3 (D3-Cy5, 80 nM)

Abbildung 21 zeigt sehr deutlich, dass PEG als Spacer weniger geeignet ist als Dextran. Das Fluoreszenzsignal ist bei PEG in Kombination mit fluoreszenzmarkiertem D3 um mehr als das 35 - fache erhöht im Vergleich zu gereinigtem Glas. Bei Dextran und fluoreszenzmarkiertem D3 lag der Anstieg des Fluoreszenzsignals nur bei dem 1,1- fachen. Aus diesem Grund wurde bei späteren PAINT-Messungen für die kovalente Bindung des Captures an die Glasoberfläche Dextran als Spacer verwendet.

3.1.1.4 BSA und Ethanolamin

Zur Deaktivierung der restlichen Carboxylgruppen des Spacers kann BSA oder Ethanolamin (EA) verwendet werden. Abbildung 22 zeigt, dass die Verwendung von EA effizienter ist. Im Vergleich zu einer Oberfläche, auf der sich Dextran, BSA und fluoreszenzmarkiertes D3 befindet, kann der Einsatz von EA auf einer Dextranoberfläche das Fluoreszenzsignal um weitere 30% für 635 nm und um 20% für 488 nm senken. Aus diesem Grund wurde bei den folgenden PAINT-Messungen Ethanolamin zur Deaktivierung der Carboxylgruppen verwendet.

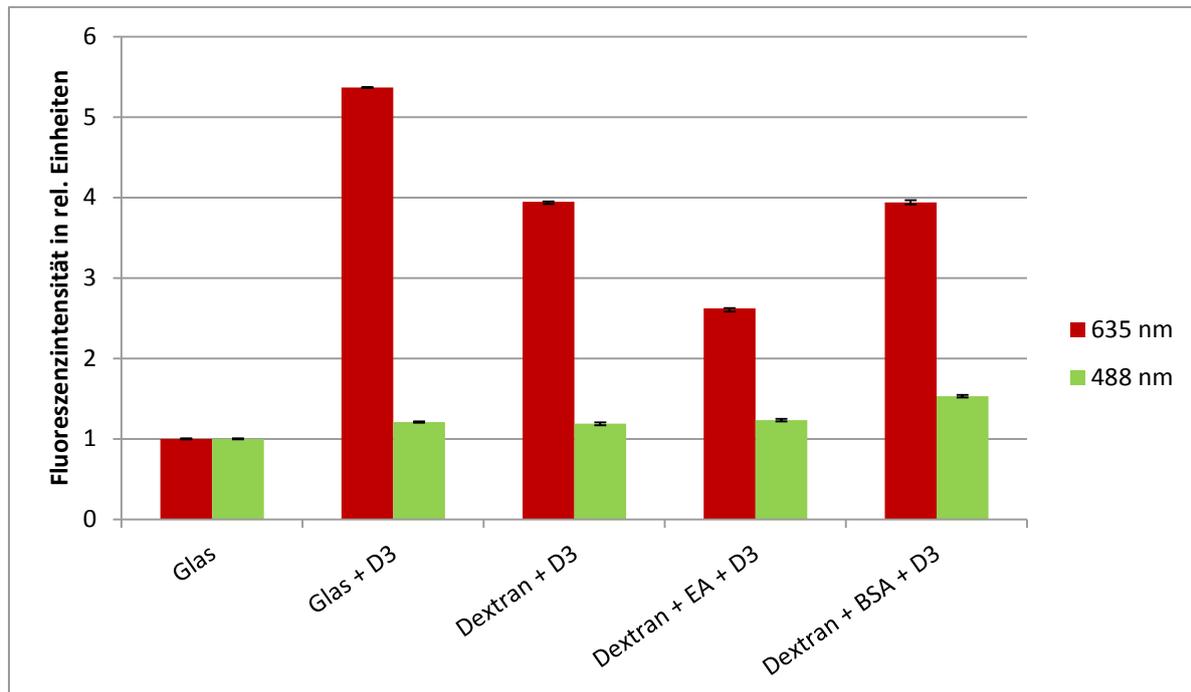


Abbildung 22: Fluoreszenzintensität von Ethanolamin (EA) und BSA auf Dextran und PEG in Kombination mit fluoreszenzmarkiertem D3.

3.1.1.5 Peptidvarianten

Im ursprünglichen Immobilisierungsprotokoll (Birkmann et al., 2006; Funke et al., 2007) werden spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper als Detektionssonden verwendet. Für PAINT-Messungen ist die Affinität der Antikörper zur jeweiligen Probe zu hoch. Aus diesem Grund werden fluoreszenzmarkierte Varianten des D1-Peptids verwendet. Das D1-Peptid (Sequenz: QSHYRHISPAQV) wurde in einer Spiegelbild-Phagendisplay-Selektion gegen A β -Fibrillen identifiziert und weist eine spezifische Bindung an Plaques in Hirngewebe auf. Aufgrund des Glutamats besteht bei D1 in wässriger Umgebung die Gefahr des Zyklisierens. Damit das D1-Peptid als Detektionssonde verwendet werden kann, wurden verschiedene Varianten ohne Glutamat synthetisiert. Insgesamt wurden fünf D1-Varianten getestet, bei denen jeweils sukzessive eine Aminosäure entfernt wurde. Die Varianten wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Um die Interaktion der fluoreszenzmarkierten D1-Peptidvarianten mit A β -Aggregaten zu testen, wurden A β -Aggregate (1 μ M) nach dem kovalenten Immobilisierungsprotokoll auf einen Objektträger gebracht. Danach wurden die in

PBS verdünnten fluoreszenzmarkierten Peptidvarianten (8 nM) hinzugegeben. Die Messung erfolgte am PAINT-Aufbau. Es wurden für jede Peptidvariante Serien von 100 Bildern mit einer Zykluszeit von 115 ms aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug jeweils 50 ms.

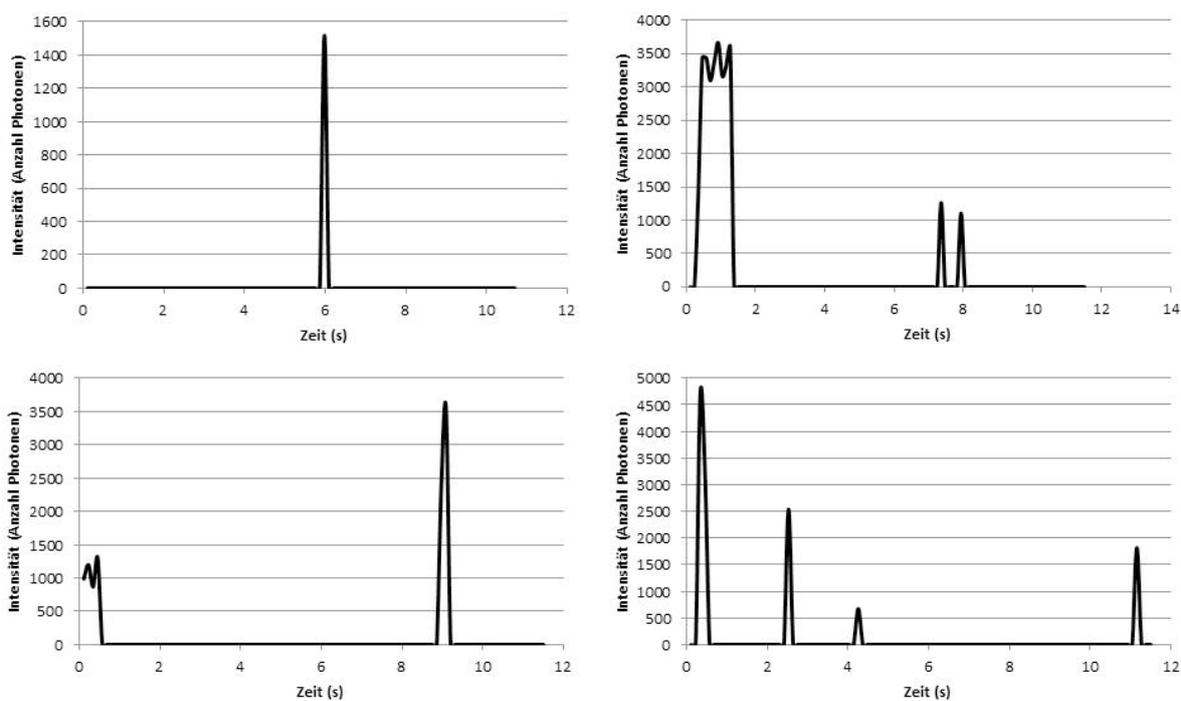


Abbildung 23: Exemplarische Zeitspuren der Variante 1 des D1-Peptids (Sequenz: SHYRHISPAQVKC) an A β -Aggregate.

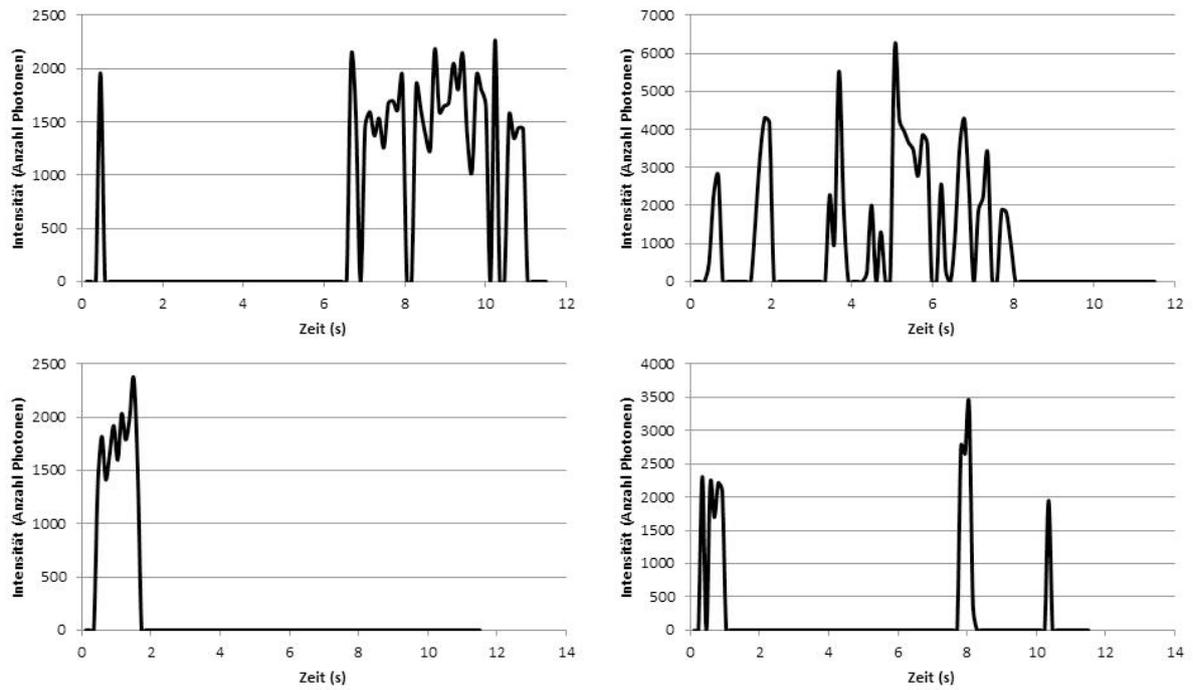


Abbildung 24: Exemplarische Zeitspuren der Variante 2 des D1-Peptids (Sequenz: HYRHISPAQVKC) an A β -Aggregate.

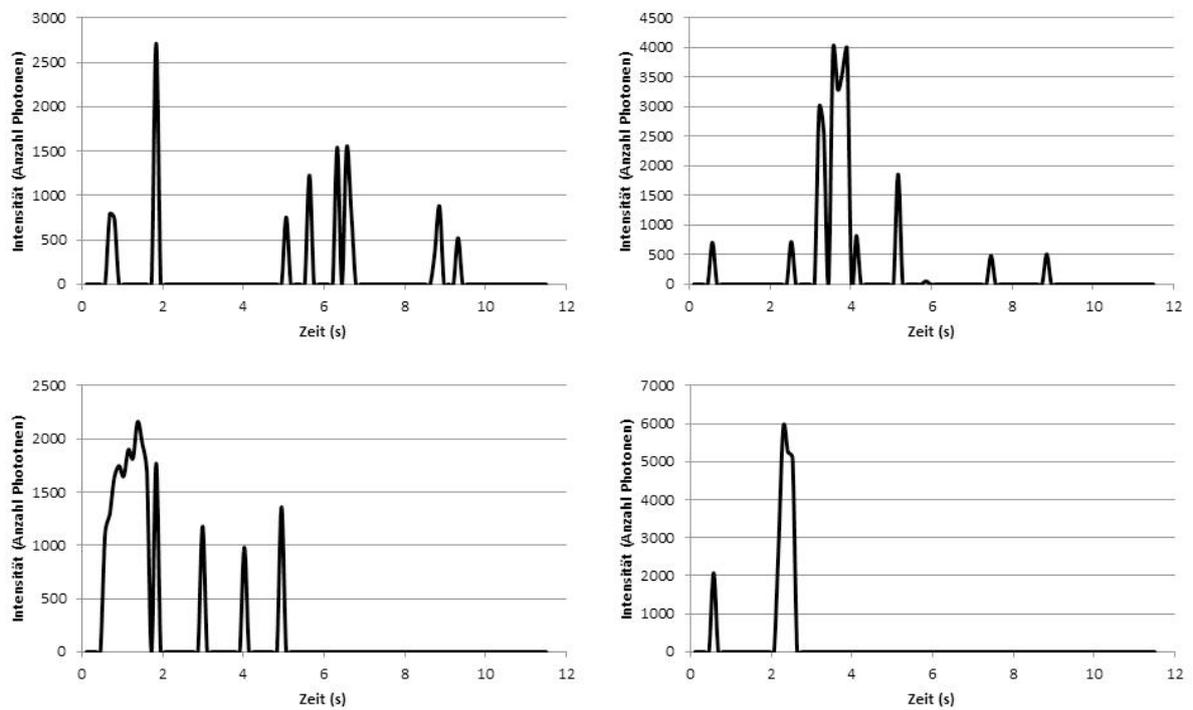


Abbildung 25: Exemplarische Zeitspuren der Variante 3 des D1-Peptids (Sequenz: YRHISPAQVKC) an A β -Aggregate.

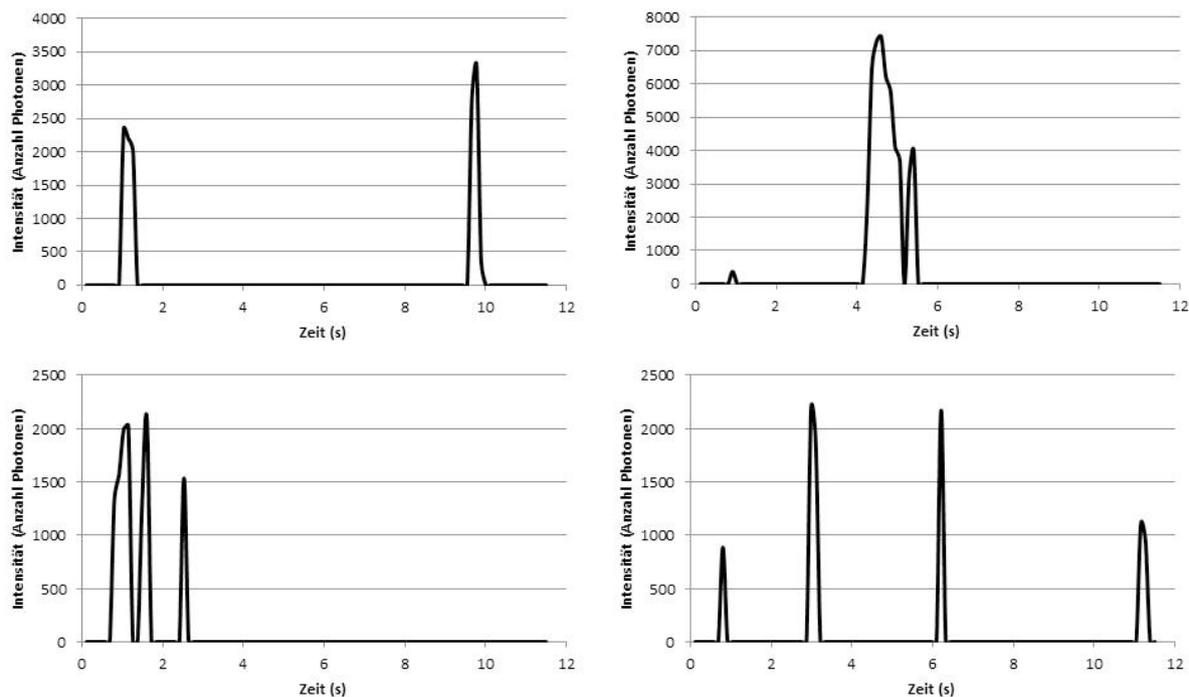


Abbildung 26: Exemplarische Zeitspuren der Variante 4 des D1-Peptids (Sequenz: RHISPAQVKC) an A β -Aggregate.

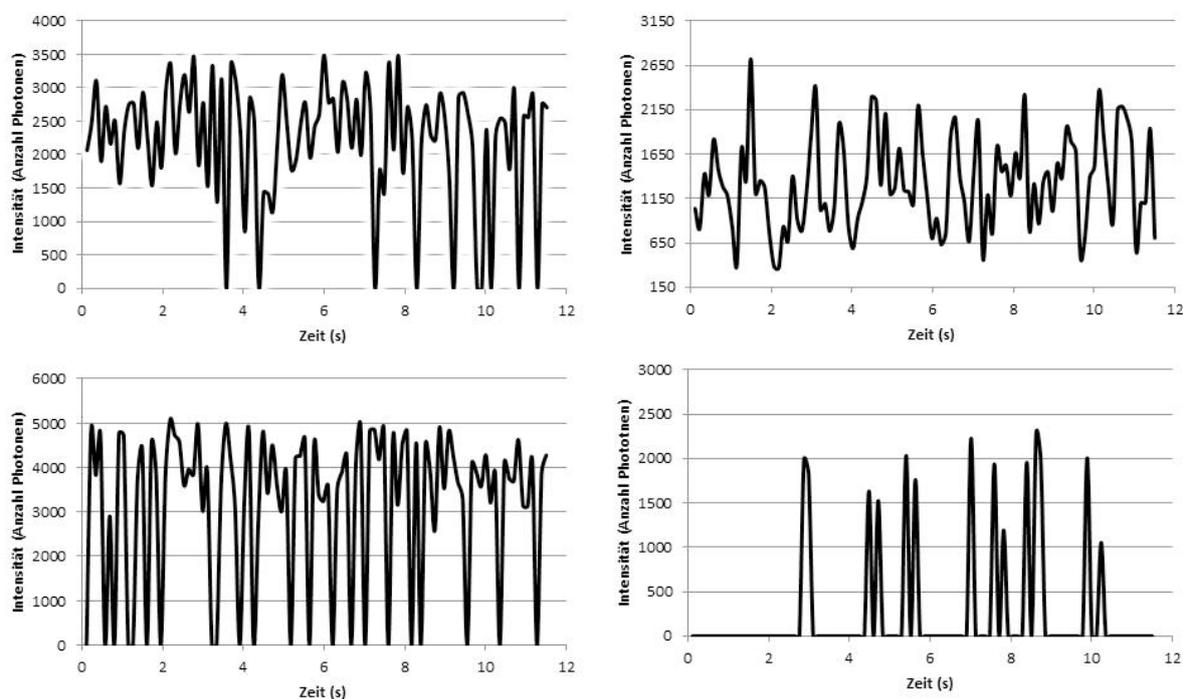


Abbildung 27: Exemplarische Zeitspuren der Variante 5 des D1-Peptids (Sequenz: HISPAQVKC) an A β -Aggregate.

Die Abbildungen 23-27 zeigen typische Zeitspuren der Messungen. Für die Varianten 1-4 wird deutlich, dass diese als Detektionssonden ungeeignet sind. Während der gesamten Messzeit gibt es nur in wenigen Bildern ein Fluoreszenzsignal. Für eine nanometergenaue

Rekonstruktion der Probe müssen deutlich mehr Photonen gesammelt werden. Variante 5 zeigt im direkten Vergleich ein besseres Verhalten. Innerhalb des Beobachtungsfeldes kommt es während der Messzeit zu deutlich mehr Fluoreszenzereignissen als bei den Varianten 1-4. Für PAINT-Messungen an A β -Aggregaten wurde daher die fluoreszenzmarkierte Variante 5 des D1-Peptids verwendet.

3.1.2 Driftmessung

Für eine exakte Lokalisation der einzelnen Fluorophore in x-y-Richtung ist von entscheidender Bedeutung, dass die Probe bzw. der Messaufbau während der Messzeit keine Driftbewegung ausführt. Eine Messreihe dauerte in der Regel mehrere Minuten. Durch eine Langzeitmessung über 45 Minuten von immobilisierten A β -Aggregaten wurde ein mittlerer Drift der Messapparatur von etwa 0,6 Pixeln in x-y-Richtung festgestellt. Bei der verwendeten Auflösung bedeutete das eine Driftgeschwindigkeit von circa 2,37 nm pro Minute. Durch spezielle Halterungskammern, die die Probe fest mit dem Objektisch verbinden, konnte der Drift reduziert werden. Alle folgenden Messreihen haben Messzeiten von circa zwei Minuten. Für diese Messungen konnte der Drift vernachlässigt werden.

3.1.3 Laserleistung

Um geeignete Messbedingungen für supraauflösende Mikroskopiemessungen zu finden, wurden verschiedene Laserleistungen getestet. Die Laserleistung wurde am Objektiv gemessen, während das Anregungslicht direkt und gerade durch das Objektiv geleitet wurde. Die maximale Laserleistung am Objektiv betrug circa 2000 μ W. Mit steigender Laserleistung ändert sich die Wahrscheinlichkeit für die Anregung eines Fluorophors. Ist die Laserleistung zu gering, werden statistisch nicht genug Fluorophore angeregt und es können nicht genug Photonen für eine exakte Rekonstruktion des Objekts gesammelt werden. Bei einer zu hoch gewählten Laserleistung kommt es entweder zu Photobleicheffekten oder es sind gleichzeitig zu viele Fluorophore angeregt, sodass ein sinnvoller Gaussfit nicht mehr möglich ist. Für diese Messreihe wurden A β -Aggregate (1 μ M) auf einer Dextranoberfläche durch einen Capture immobilisiert. Als Detektionssonde wurde die mit Cy5 fluoreszenzmarkierte Variante

5 des D1-Peptids verwendet (800 pM). Es wurden 1000 Bilder für jede Laserleistung mit einer Zykluszeit von 100 ms aufgenommen. Um Photobleicheffekte zu minimieren, wurde mit der niedrigsten Laserleistung (1 %, dies entspricht etwa 20 μW am Objektiv) begonnen. Dieselbe Stelle der Probe wurde danach mit steigender Laserleistung unter ansonsten gleichen Messeinstellungen analysiert. Tabelle 12 zeigt eine Zusammenfassung der Messergebnisse.

Tabelle 12: Leistungsreihe: Anzahl der gefundenen Aggregate nach Gaussfit bei variabler Laserleistung. Anzahl der mittleren Photonen und Hintergrundphotonen. Berechnete Lokalisationsgenauigkeit. Geeignete Messbedingungen für supraaufgelöste Bilder wurden bei Laserleistungen zwischen 30% und 70 % erreicht. Dies entspricht einer Laserleistung von circa 600 μW – 1400 μW am Objektiv.

Laserleistung in %	Anzahl der gefundenen Aggregate	Mittlere Anzahl Photonen	Mittlere Anzahl Hintergrund- photonen	Berechnete Lokalisations- genauigkeit in nm
1	5	221	11	18,4
2	13	283	15	17,3
5	15	367	18	15,0
10	17	470	27	13,8
30	38	801	47	11,2
50	59	921	79	11,5
70	30	1113	104	12,1
100	23	1630	223	13,8

Für die Analyse der Messungen wurden die gefundenen Aggregate nach Gaussfit gezählt. Außerdem wurden die mittlere Anzahl an gesammelten Photonen, sowie die zugehörige Anzahl an Hintergrundphotonen bestimmt. Aus den gesammelten Daten konnte die mittlere Lokalisationsgenauigkeit in x-y-Richtung berechnet werden. Aus Tabelle 12 geht hervor, dass bei einer Laserleistung zwischen 30% und 70% die meisten Aggregate auf der Probe rekonstruiert werden konnten. Die Lokalisationsgenauigkeit war zwischen 30% und 50% Laserleistung sehr präzise. Eine höhere Laserleistung liefert zwar durchschnittlich mehr Photonen, führt aber zu einer geringeren Lokalisationsgenauigkeit. Zusätzlich zu den in Tabelle 12 aufgelisteten Daten wurden die Zeitspuren der einzelnen Messreihen analysiert. Exemplarische Zeitspuren für alle Laserleistungen, sowie die zugehörigen rekonstruierten Bilder sind in Abbildung 28 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass bei unterschiedlichen Laserleistungen verschiedene Aggregate rekonstruiert wurden. Die Zeitspuren zeigen unterschiedliche Fluoreszenzsignale bei variierender Laserleistung. Die in Abbildung 28 ausgewählten Zeitspuren zeigen das optimale

Verhalten der Fluorophore während der Messung. Etwa 20% bis 30% der erstellten Zeitspuren innerhalb einer Messreihe zeigten diesen Verlauf. Alle restlichen Spuren konnten für eine Auswertung der Bilder unter PAINT-Bedingungen nicht verwendet werden. Bei niedrigen Laserleistungen bis etwa 10% sind statistisch nur wenig Fluorophore eingeschaltet und es gibt viele Bilder, bei denen keine Photonen gesammelt werden können. Bei einer Laserleistung ab 70% sind zu viele Fluorophore eingeschaltet. Die zugehörigen Zeitspuren zeigten ein konstant hohes Intensitätssignal über zahlreiche Bilder hinweg. Somit ergab die Analyse der Zeitspuren, dass geeignete Messbedingungen bei einer Laserleistung zwischen 30% bis 70% herrschten.

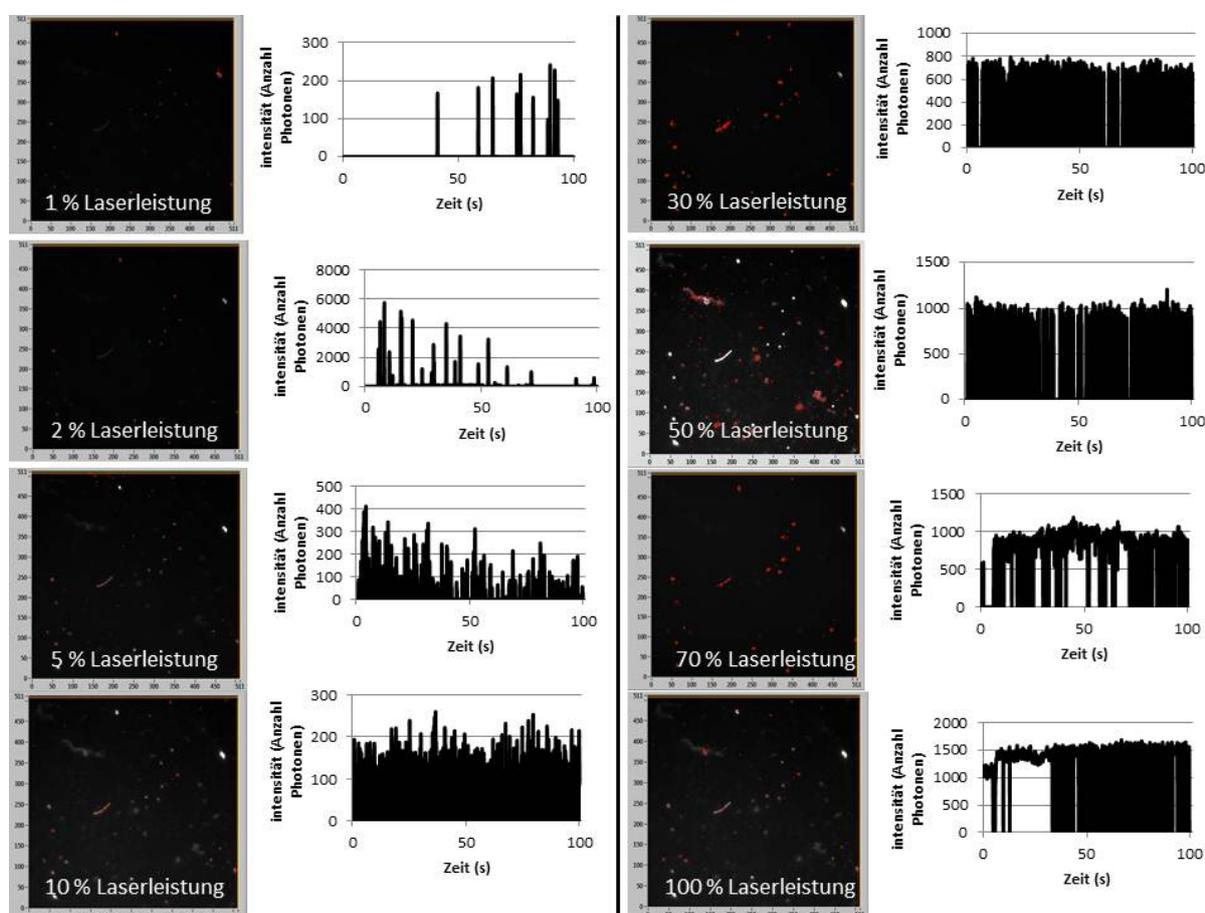


Abbildung 28: Jeweils linkes Bild: Überlagerung von Weitfeldbildern und rekonstruierten Bildern. β -Aggregate ($1 \mu\text{M}$) wurden immobilisiert, als Detektionssonde wurde die mit Cy5 markierte Variante 5 des D1-Peptids (80 pM) verwendet. Zur Rekonstruktion wurden jeweils 1000 Bilder analysiert. Die Zykluszeit war bei allen Messungen gleich lang (100 ms). Rechtes Bild: Zeitspuren für einzelne Aggregate für verschiedene Laserleistungen.

3.1.4 Konzentrationsreihen

Die Konzentration der A β -Aggregate und der Detektionssonde ist ebenfalls ein wichtiges Kriterium für die Erstellung supraaufgelöster Bilder. Die Konzentration der A β -Aggregate musste so gewählt werden, dass die Oberfläche gleichmäßig bedeckt ist. Wurden zu viele Aggregate immobilisiert, konnte es zu einer Überlagerung der Aggregate kommen und die Rekonstruktion wurde ungenau. Waren zu wenig Aggregate auf der Oberfläche, sank die Wahrscheinlichkeit, dass bei der späteren Analyse genügend Treffer zur Rekonstruktion gefunden wurden. Eine optimale A β -Konzentration lag bei etwa 0,1 μ M bis 1 μ M.

Zur Bestimmung der geeigneten Konzentration für die Detektionssonde wurde eine Verdünnungsreihe des fluoreszenzmarkierten Detektionspeptids (D1-Variante 5) hergestellt. Eine Konzentration im pM-Bereich lieferte die im Vergleich besten Ergebnisse. Bei höheren Konzentrationen konnten viele Treffer nicht gewertet werden, da sich die Lichtausbreitungsfunktionen überlappten und somit kein eindeutiger Gaussfit mehr möglich war. Bei niedrigeren Konzentrationen konnte kein Fluoreszenzsignal während der Messzeit detektiert werden.

3.1.5 Zeitserien

Abgesehen von der eingestrahnten Laserleistung spielten auch die Belichtungszeit und die unbeleuchtete Zeit, in der die Fluorophore abdiffundieren können, eine wichtige Rolle für die exakte Rekonstruktion der Bilder. Bindet ein Fluorophor während der Belichtungszeit an die Probe, werden die emittierten Photonen vom Detektor registriert. Bei der späteren Rekonstruktion kann aufgrund der Lichtausbreitungsfunktion die exakte Position des Fluorophors berechnet werden. Je mehr Photonen während der Belichtungszeit gesammelt wurden, desto genauer wird die Berechnung. Im nächsten Belichtungszeitraum werden idealerweise Photonen von einer anderen Stelle auf der Probe gesammelt. Die Belichtungszeit (acquisition time, t_a) und die Dunkelzeit mussten demnach genau auf die mittlere Bindungszeit des Fluorophors an die Probe abgestimmt werden. Es wurden erneut A β -Aggregate (1 μ M) auf einer Dextranoberfläche mit Hilfe eines Captures immobilisiert. Als Detektionssonde wurde die mit Cy5 markierte Variante 5 des D1-Peptids verwendet (800 pM). Eine Messung bestand aus 500 Bildern. Die Belichtungszeit wurde zwischen 30 ms und

150 ms gewählt. Die Dunkelzeit wurde in den meisten Fällen genauso lang wie die Belichtungszeit eingestellt. In Tabelle 13 sind die verschiedenen Zeiteinstellungen und die Anzahl der gefundenen Aggregate nach Gaussfit dargestellt. Die Zykluszeit ergibt sich aus der Belichtungszeit und der Dunkelzeit für jedes Bild. Abbildung 29 zeigt exemplarisch eine Zeitspur zu jeder gewählten Einstellung. Außerdem sind die jeweiligen Weitfeldbilder und die zugehörigen gefitteten Bilder dargestellt.

Tabelle 13: Kombinationen von verschiedenen Belichtungszeiten und Dunkelzeiten. Anzahl der gefundenen $\text{A}\beta$ -Aggregate nach Gaussfit.

Belichtungszeit in ms	Zykluszeit in ms	Aggregate nach Gaussfit
30	60	12
50	115	21
70	150	27
100	200	48
120	250	44
150	300	59

Aus Tabelle 13 geht hervor, dass die Anzahl der gefundenen Aggregate nach dem Gaussfit mit zunehmender Belichtungszeit steigt. In Abbildung 29 ist zu sehen, dass bei variierender Belichtungszeit unterschiedliche Aggregate gefittet wurden. Anhand der zugehörigen Zeitspuren ist zu entnehmen, dass die im Vergleich geeigneten Messbedingungen bei einer Belichtungszeit von etwa 50 ms bis 100 ms herrschten. Etwa 5 % der Zeitspuren dieser Zeiteinstellungen zeigten den für PAINT-Messungen erforderlichen Verlauf.

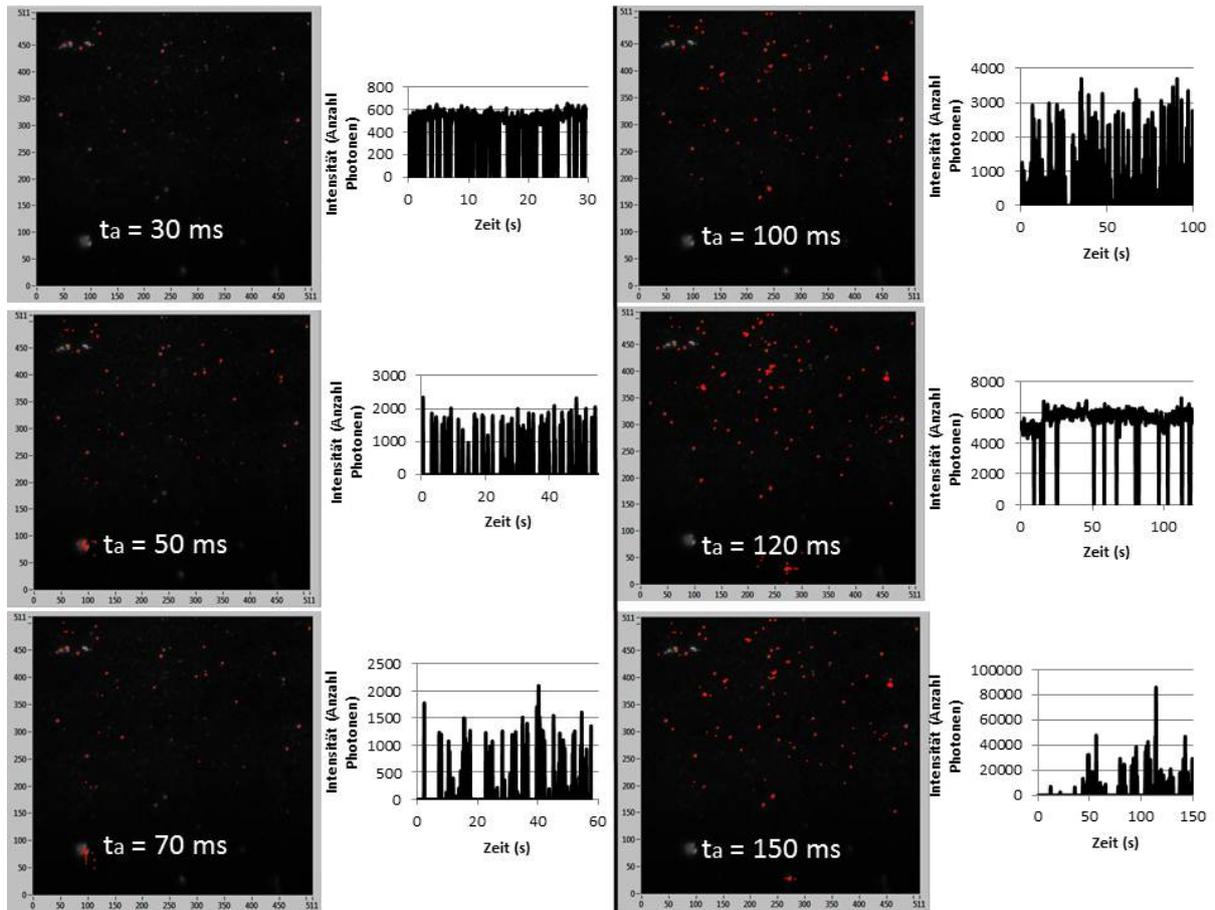


Abbildung 29: Weitfeldbilder und rekonstruierte Bilder von immobilisierten A β -Aggregaten für verschiedene Belichtungszeiten. Die exemplarisch ausgewählten Zeitspuren für einzelne rekonstruierte Aggregate zeigen, dass die im Vergleich optimalen Messbedingungen bei Belichtungszeiten zwischen 50 ms und 100 ms erreicht wurden.

3.2 dSTORM

dSTORM basiert darauf, dass gleichzeitig eine kleine Untergruppe aller Fluorophore eingeschaltet ist. Dann kann angenommen werden, dass das emittierte Licht von einem einzelnen Fluorophor stammt. Durch Fitten einer zweidimensionalen Gaussverteilung an die Lichtausbreitungsfunktion kann die Position des Fluorophors sehr präzise bestimmt werden. Werden mehrere Tausend Bilder aufgenommen, kann auf diese Weise ein supraaufgelöstes Bild der Probe rekonstruiert werden.

Von entscheidender Bedeutung für eine Rekonstruktion sind bei dSTORM-Messungen die Blinkeigenschaften der verwendeten Fluorophore. Für die hier gezeigten Messungen wurden die Farbstoffe Alexa 488 und Alexa 647 verwendet. Erfolgreiche dSTORM-Messungen mit Alexa 647 wurden bereits durchgeführt (Heilemann et al., 2008). Für ein geeignetes Blinkverhalten der Fluorophore über den gesamten Messzeitraum hinweg müssen die Komponenten des verwendeten Messpuffers auf die jeweilige Probe abgestimmt werden. Hierbei ist insbesondere für Alexa 647 die Anwesenheit eines Sauerstoffreinigungssystems von großer Wichtigkeit. Außerdem müssen die gewählten Belichtungszeiten während der Messung auf die mittlere Dauer, die sich ein Fluorophor im eingeschalteten Zustand befindet, abgestimmt werden. Über die eingestrahlte Laserleistung kann die Wahrscheinlichkeit, mit der sich Fluorophore gleichzeitig im eingeschalteten Zustand befinden, beeinflusst werden. Auch die Konzentration der eingesetzten Fluorophore nimmt Einfluss auf das Blinkverhalten der gesamten Probe. Ist die Konzentration zu gering, besteht die Gefahr dass während der Messung nur sehr wenige Fluoreszenzsignale gesammelt werden, was zu einer ungenauen Rekonstruktion der Probe führt. Bei einer zu hoch gewählten Konzentration ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass gleichzeitig zu viele Fluorophore eingeschaltet sind. Ein Gaussfit ist dann nicht mehr sinnvoll. Erst wenn alle genannten Messbedingungen auf die Eigenschaften der Probe abgestimmt wurden, kann eine Messung unter dSTORM-Bedingungen erfolgen. Bei zweifarbigem Messungen muss darauf geachtet werden, dass die Messbedingungen für beide Fluoreszenzfarbstoffe zum gewünschten Blinkverhalten führen.

3.2.1 Messbedingungen

Die Anfertigung einer Messung unter dSTORM-Bedingungen erforderte eine Analyse des Blinkverhaltens der eingesetzten Fluorophore. Anhand der folgenden Messungen wurden verschiedene Einflussgrößen auf die Gegebenheiten der verwendeten Probe abgestimmt.

3.2.1.1 Breite und Symmetrie der Lichtausbreitungsfunktion

Die Breite der Gaussfunktion kann durch die Standardabweichung σ der Normalverteilung ausgedrückt werden. Für einen guten Gaussfit mit RapidSTORM an die Lichtausbreitung eines einzelnen Fluorophors musste darauf geachtet werden, dass die Breite möglichst schmal war. Eine breite Verteilung könnte bedeuten, dass mehrere Fluorophore nebeneinander gleichzeitig eingeschaltet waren. Würde man versuchen, an diese Lichtausbreitung ein Gaussprofil zu fitten, erhielte man die Lokalisation für ein einzelnes Fluorophor, das es an dieser Stelle nie gegeben hat.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Fluorophore verwendet. Um die Breite der Lichtausbreitung dieser Fluorophore zu bestimmen, wurden A β -Aggregate (100 pM) auf einer mit Dextran beschichteten Glasoberfläche mittels Capture immobilisiert. Die fluoreszenzmarkierten Detektionssonden wurden nach den Angaben im Immobilisierungsprotokoll hinzugegeben. Der mit Alexa 488 markierte Antikörper 6E10 wurde in 4000-facher Verdünnung (etwa 75 nM) eingesetzt. Der Antikörper Nab228 wurde mit Alexa 647 markiert und in 1000-facher Verdünnung verwendet (etwa 50 nM). Die Probe wurde jeweils mehrere Minuten gebleicht, bis das gewünschte Blinkverhalten zu sehen war. Es wurden Messungen mit 100 Bildern und einer Belichtungszeit von 50 ms an fünf verschiedenen Stellen der Probe aufgenommen. Die so entstandenen Bilder wurden einzeln betrachtet. Es wurde eine Stelle im Bild ausgewählt, bei der die Lichtausbreitung von einem einzelnen Fluorophor zu kommen schien. Eine Fläche von 3 x 14 Pixeln wurde ausgewählt (Abbildung 30). Es wurde jeweils ein Intensitätsmittelwert über drei Pixel berechnet und danach das Intensitätsprofil der Lichtausbreitung erzeugt (Abbildung 31). Die Größe eines Pixels bei dieser Messung betrug 63,49 nm.

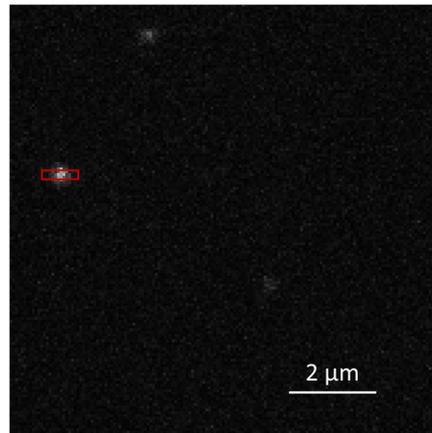


Abbildung 30: Immobilisierte A β - Aggregate auf einer mit Dextran beschichteten Glasoberfläche. Als Detektionssonde wurde ein mit Alexa 488 markierter Antikörper (6E10, 1:4000) verwendet. Einzelbildaufnahme einer Messung mit 100 Bildern und 50 ms Belichtungszeit. Markiert wurde die Emission eines einzelnen Fluorophors (3 x 14 Pixel, 1 px = 63,49 nm).

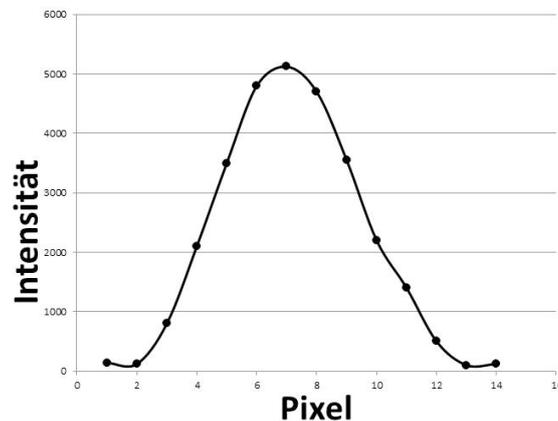


Abbildung 31: Intensitätsprofil eines einzelnen Fluorophors. Zur Berechnung wurde in einer Einzelbildaufnahme ein Teilbereich von 3 x 14 Pixeln ausgewählt (Abbildung 30). Der Mittelwert von jeweils drei Pixeln führte zum abgebildeten Intensitätsprofil.

Zur Berechnung der Breite w wurde folgende Formel verwendet:

$$I = I_0 * e^{-\frac{(x-x_c)^2}{2w^2}} + H$$

I ist die Intensität und I_0 die Amplitude des Intensitätsprofils. x ist die Nummer des jeweiligen Pixels und x_c die Pixelnummer des Pixel in der Kurvenmitte. H ist der Intensitätswert des lokalen Hintergrunds. Durch Umformen der Gleichung kann die Breite der Gaussfunktion bestimmt werden:

$$w^2 = \frac{(x - x_c)^2}{-2 \ln\left(\frac{I - H}{I_0}\right)}$$

Zur Bestimmung der Breite für die gefittete Gausskurve der verwendeten Fluorophore wurden jeweils 30 einzelne Fluorophore ausgewählt und deren Breite berechnet. Die gemittelte Gaussbreite für Alexa 488 betrug 1,64 Pixel und für Alexa 647 2,03 Pixel. Bei der verwendeten Auflösung von 63,49 nm/Pixel ergab sich folglich eine mittlere Gaussbreite von 104 nm für Alexa 488 und 129 nm für Alexa 647. Es ist bekannt, dass Gaussbreiten in dieser Größenordnung eine geeignete Grundlage zur Berechnung von präzisen Lokalisationen mit RapidSTORM darstellen.

Die Symmetrie der Lichtausbreitungsfunktion eines einzelnen Fluorophors ist ein entscheidender Parameter für die Qualität des zweidimensionalen Gaussfits. Normalerweise zeigt das Profil einer Gaussfunktion einen symmetrischen Verlauf. Wäre das Profil unsymmetrisch, würde das auf eine Emission mehrerer Fluorophore gleichzeitig hindeuten. Ein Maß zur Beurteilung der Symmetrie eines Gaussprofils ist die Exzentrizität ε .

$$\varepsilon = \left| \frac{w_x - w_y}{w_x + w_y} \right|$$

w_x und w_y sind die Gaussbreiten in x- und y-Richtung. Die Exzentrizität kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Eine Exzentrizität von 0 bedeutet eine perfekte Symmetrie und ein Wert von 1 zeigt eine deutliche Abweichung in eine Richtung an. Für die hier verwendeten Fluorophore wurde die Exzentrizität für jeweils drei Fluorophore berechnet. Für Alexa 488 ergab sich ein Mittelwert von $\varepsilon = 0,023$ und für Alexa 647 betrug der Mittelwert $\varepsilon = 0,016$. Es ist bekannt, dass eine Exzentrizität kleiner als 0,1 ausreichend ist. Somit eignen sich die von Alexa 488 und Alexa 647 ausgehenden Intensitätsverteilungen sehr gut für eine Fitprozedur mit RapidSTORM zur Erzeugung superaufgelöster Bilder.

3.2.1.2 Konzentration

Die optimale Konzentration der eingesetzten Fluorophore wurde durch Verdünnungsreihen bestimmt. Es wurden A β -Oligomere (100 pM) nach dem Immobilisierungsprotokoll auf einer Dextranoberfläche mittels Capture immobilisiert. Die Oligomere wurden mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) hergestellt und die A β -Konzentration wurde durch einen BCA-Test ermittelt. Danach wurden unterschiedliche Konzentrationen der fluoreszenzmarkierten Antikörper zur Detektion hinzugegeben. Es wurden jeweils 1000 Bilder mit einer Belichtungszeit von 50 ms aufgenommen. Vorher wurde die Probe so lange gebleicht, bis genügend Fluorophore im ausgeschalteten Zustand waren und das gewünschte Blinkverhalten zeigten. Es wurde immer bei drei verschiedenen TIRF-Winkeln gebleicht. Ein Maß zur Entscheidung über die geeignete Konzentration waren die nach der Rekonstruktion mit RapidSTORM übriggebliebenen Aggregate. Für jede analysierte Fluorophorkonzentration wurde eine neue Probe mit immobilisierten A β -Oligomeren verwendet. Die Konzentration der eingesetzten A β -Oligomere betrug jeweils 100 pM. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass sich in jeder Probe etwa gleich viele Oligomere befanden. In Tabelle 14 ist das Ergebnis der Messung dargestellt.

Tabelle 14: Eingesetzte Verdünnung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zur Detektion von immobilisierten A β -Oligomeren. Bleichzeit vor der Messung in drei verschiedenen TIRF-Winkeln. Es wurde so lange gebleicht, bis nur ein kleiner Teil der Fluorophore gleichzeitig eingeschaltet war und Blinkverhalten sichtbar wurde. Anzahl der mit RapidSTORM rekonstruierten Oligomere. Als Oligomer wurden alle Probenbereiche gewertet, die bei 1000 Bildern mindestens 200 Treffer über einem Grenzwert zeigten. Alle Messungen wurden bei gleicher Belichtungszeit (50 ms) und gleicher Verstärkung (250) durchgeführt.

Fluorophorverdünnungen	Bleichzeit pro TIRF-Winkel	Anzahl der rekonstruierten Oligomere nach Gaussfit
6E10-Alexa 488 1:100	5 Minuten	0
6E10-Alexa 488 1:1000	2 Minuten	53
6E10-Alexa 488 1:2000	1 Minute	68
6E10-Alexa 488 1:4000	1 Minute	92
Nab228-Alexa 647 1:100	5 Minuten	26
Nab228-Alexa 647 1:1000	2 Minuten	77
Nab228-Alexa 647 1:2000	1 Minute	69
Nab228-Alexa 647 1:4000	30 Sekunden	51

Die Bedingung, ab wann ein Probenbereich als Oligomer gewertet wurde, war bei allen Analysen gleich und lag bei 200 Treffern (von insgesamt 1000 Bildern). Bei der Messung mit einer 1:100 Verdünnung von 6E10-Alexa 488 konnten keine Oligomere rekonstruiert werden. Der Grund dafür war wahrscheinlich die lange Bleichzeit. Eine kürzere Bleichzeit war jedoch nicht möglich, da die Fluorophore vorher kein Blinkverhalten zeigten und immer noch zu viele Fluorophore gleichzeitig eingeschaltet waren. Aus Tabelle 14 geht hervor, dass eine Verdünnung von 1:4000 für 6E10-Alexa 488 zum besten Ergebnis geführt hat. Für Nab228-Alexa 647 lag das beste Ergebnis bei einer Verdünnung von 1:1000. Die entsprechenden Konzentrationen lagen für 6E10-Alexa 488 bei etwa 75 nM und für Nab228-Alexa 647 bei etwa 50 nM. Für alle folgenden dSTORM-Messungen wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper in einer Verdünnung eingesetzt, die einer Konzentration im niedrigen nM-Bereich entsprechen.

3.2.1.3 Belichtungszeit

Bei dSTORM-Messungen spielt die Belichtungszeit eine wichtige Rolle. Sie muss so gewählt werden, dass in dieser Zeit genügend Photonen gesammelt werden können. Die mittlere Zeit, die sich ein Fluorophor im eingeschalteten Zustand befindet, sollte in etwa mit der Belichtungszeit der Probe übereinstimmen. Als Maß für eine gute Belichtungszeit wurde das Blinkverhalten einzelner ausgewählter Fluorophore über den gesamten Messzeitraum betrachtet. Bei einer Belichtungszeit von 30 ms wurde bereits Blinken einzelner Fluorophore beobachtet. Exemplarisch ist in Abbildung 32 eine Zeitspur einer Probe mit 30 ms und 50 ms Belichtungszeit dargestellt.

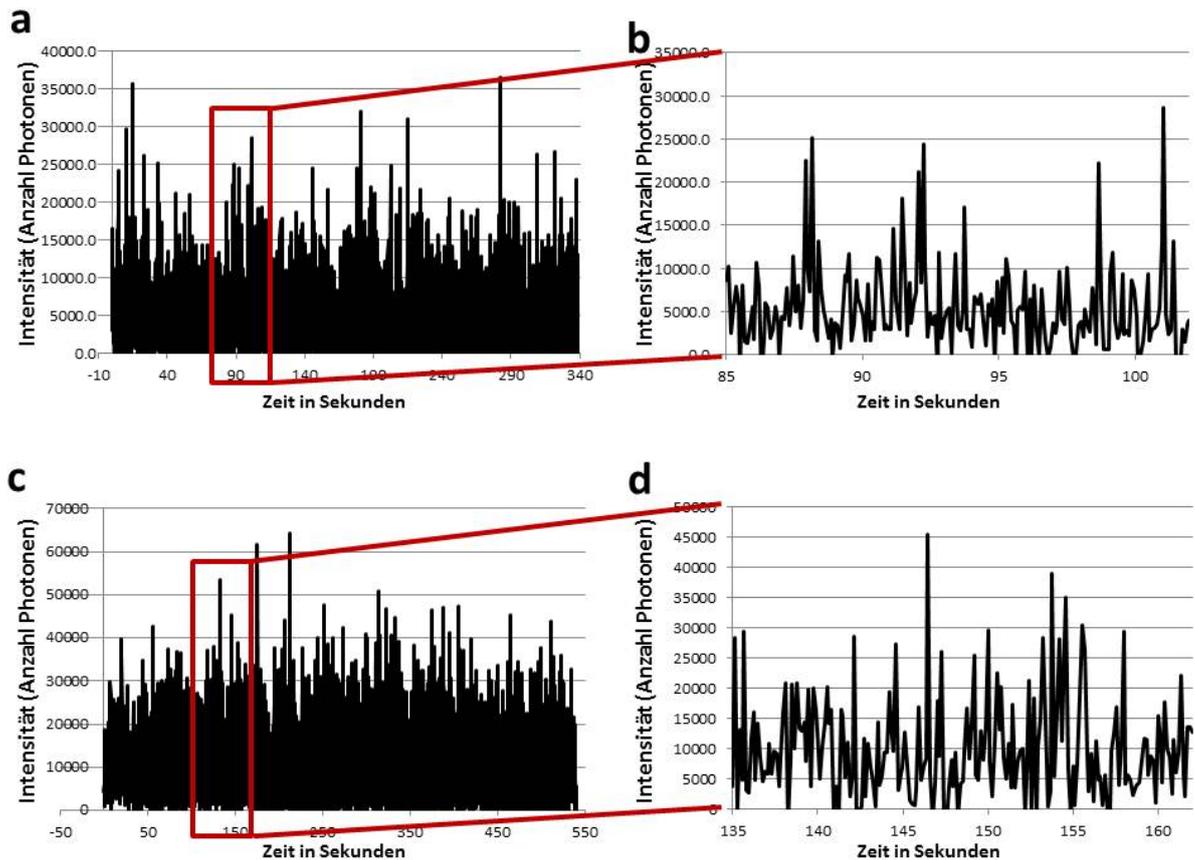


Abbildung 32: Zeitspuren zur Bestimmung der Belichtungszeit für dSTORM-Messungen an A β -Aggregaten. a) Zeitspur eines A β -Aggregats mit 30 ms Belichtungszeit für 4000 Bilder. b) Ausschnitt der Zeitspur über 200 Bilder. c) Zeitspur eines A β -Aggregats mit 50 ms Belichtungszeit über 4000 Bilder. d) Ausschnitt der Zeitspur über 200 Bilder.

Anhand der Zeitspuren in Abbildung 32 konnte man deutlich ein Blinken der Fluorophore über den gesamten Messzeitraum hinweg erkennen. Das Blinkverhalten bei einer Belichtungszeit von 30 ms und 50 ms unterschied sich nicht grundlegend. Der einzige Unterschied war die konstant höhere Intensität der Zeitspur bei einer Belichtungszeit von 50 ms. Die Anzahl der gesammelten Photonen während der Belichtungszeit wirkt sich positiv auf die Auflösung des späteren rekonstruierten Bildes aus. Aus diesem Grund wurde eine Belichtungszeit von 50 ms für dSTORM-Messungen gewählt.

3.2.1.4 Laserleistung

Die Laserleistung ist ein entscheidender Faktor für die Anzahl der gleichzeitig eingeschalteten Fluorophore. Zur Bestimmung der optimalen Laserleistung für dSTORM-Messungen wurden A β -Oligomere (100 pM) auf einer mit Dextran beschichteten Glasoberfläche mittels Capture immobilisiert. Zur Regulierung der Laserleistung des Argon-Lasers wurden mit Alexa 488

markierte Antikörper (6E10, 1:4000) auf die Probe gegeben. Zur Ermittlung der notwendigen Laserleistung zum Bleichen der Fluorophore vor der Messung wurde die Laserleistung in 20 %-Schritten erhöht. Die maximale Leistung des Argonlasers betrug etwa 1 W. Bis etwa 40 % der maximalen Laserleistung dauerte es mehrere Minuten, bis nur noch ein Teil der Fluorophore gleichzeitig im eingeschalteten Zustand waren. Zwischen 40 % und 60 % der Laserleistung war eine Minute Bleichzeit ausreichend. Ab 60 % der maximalen Laserleistung wurde die Bleichzeit kürzer, aber die Regeneration der Fluorophore wurde geringer. Dies könnte auf eine dauerhafte Zerstörung der Fluorophore aufgrund zu hoher Energieeinstrahlung hinweisen. Aus diesem Grund wurde zum Bleichen der Proben für den Argonlaser eine Leistung zwischen 40 % und 60 % der maximalen Laserleistung verwendet. Die optimale Laserleistung während der Messung wurde anhand des Blinkverhaltens der Fluorophore über den gesamten Messzeitraum hinweg ermittelt. Einzelne Fluorophore wurden während einer Messung von 1000 Bildern beobachtet. Optimale Resultate wurden bei Laserleistungen zwischen 10 % und 30 % der maximalen Laserleistung erzielt. Bei höheren Laserleistungen bestand die Gefahr des vorzeitigen Bleichens einzelner Fluorophore. Bei niedrigeren Laserleistungen waren zu wenig Fluorophore gleichzeitig eingeschaltet, was zu einer lückenhaften Rekonstruktion der Probe führte.

Auf die gleiche Weise wurden die optimalen Leistungen für den 642-Diodenlaser gefunden. Als Detektionssonde diente bei diesen Messungen ein mit Alexa 647 markierter Antikörper (Nab228, 1:1000). Die maximale Laserleistung (100 %) betrug 146 mW. Ein optimales Bleichergebnis erhielt man unter Bestrahlung der Probe mit 100 % Laserleistung für 1 bis 2 Minuten. Die Messungen zeigten für Laserleistungen zwischen 50 % und 100 % die besten Blinkeigenschaften über den gesamten Messzeitraum hinweg.

3.2.2 Messungen mit synthetischem A β

Nachdem die optimalen Messbedingungen zur Anfertigung supraaufgelöster dSTORM-Bilder gefunden wurden, wurden verschiedene Proben mit synthetischen A β -Aggregaten untersucht. Zunächst wurden einfarbige Messungen mit einer Anregungswellenlänge angefertigt. Danach wurde eine zweite Anregungswellenlänge hinzugefügt, um die Spezifität zur Erkennung von A β -Aggregaten zu erhöhen. Es wurden sowohl A β 1-40-, A β 1-42- Aggregate sowie gemischt aggregierte Formen untersucht. Als Kontrolle diente eine Probe ohne A β -Aggregate, die unter sonst identischen Bedingungen vorbereitet wurde.

3.2.2.1 Einfarbige Messungen

Für dSTORM-Messungen von synthetischen A β -Aggregaten wurden A β -Aggregate (100 pM) auf einer mit Dextran beschichteten Glasoberfläche mittels Capture immobilisiert. Als Detektionssonde diente bei Messungen bei einer Anregungswellenlänge ein mit Alexa 647 markierter N-terminaler Antikörper (Nab228, 1:1000). Als Kontrolle wurde eine Probe ohne immobilisierte A β -Aggregate verwendet, die in allen anderen Präparationsschritten demselben Immobilisierungsprotokoll unterzogen wurde wie die Proben mit A β -Aggregaten. Die Probe wurde unmittelbar vor der Messung bei maximaler Laserleistung in drei TIRF-Winkeleinstellungen für eine Minute gebleicht. Eine Messung bestand aus 4000 Bildern mit einer Belichtungszeit von 50 ms und einer Verstärkung von 250. Die Pixelgröße betrug 63,49 nm. Abbildung 33 zeigt ein Resultat der Messreihe.

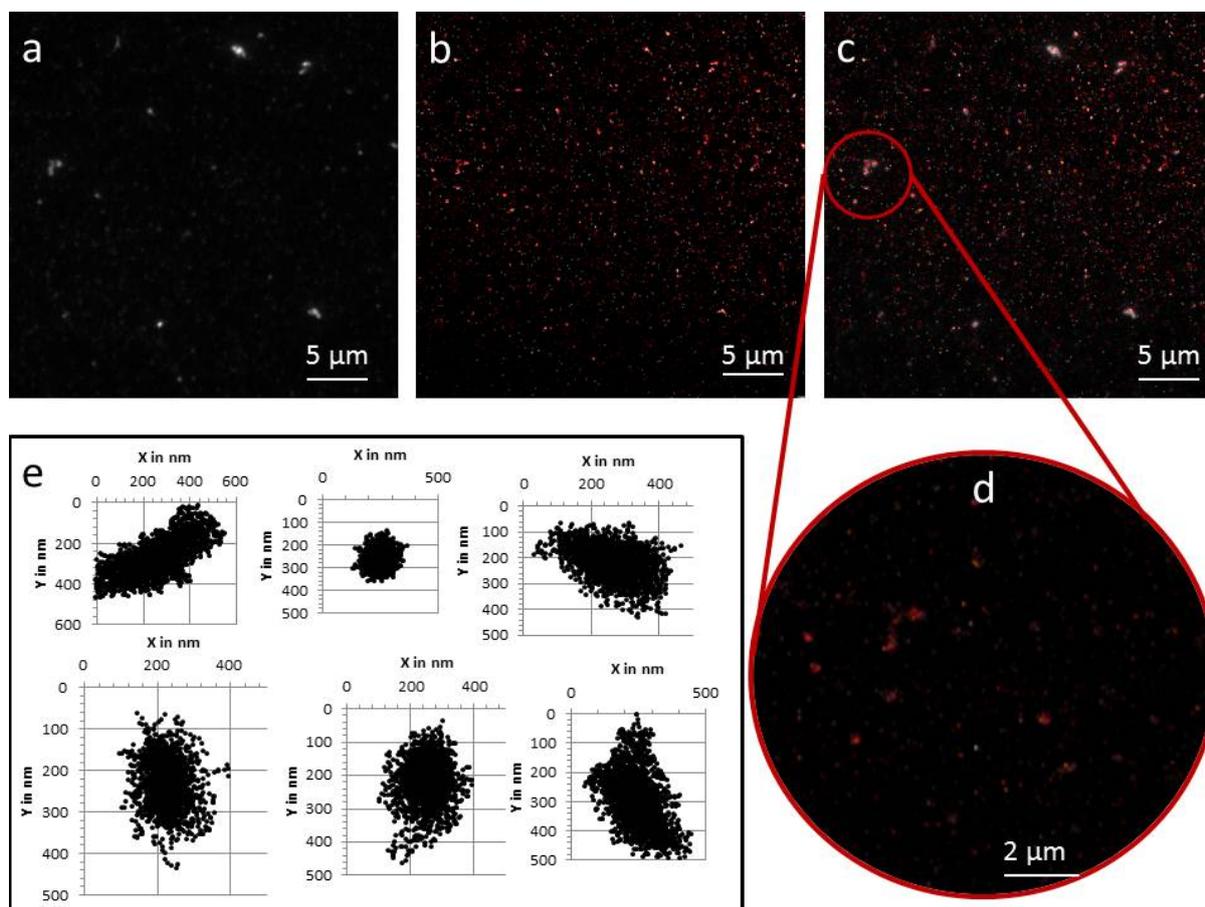


Abbildung 33: dSTORM-Messung an synthetischen A β Aggregaten (100 pM) bei einer Anregungswellenlänge von 647 nm. Eine Messung bestand aus 4000 Bildern mit einer Belichtungszeit von 50 ms. a) Weitfeldaufnahme der Probe, b) rekonstruiertes Bild mit RapidSTORM, c) Überlagerung von Weitfeldbild und rekonstruiertem superaufgelöstem Bild, d) vergrößerter Teilbereich der Probe, e) exemplarische Darstellung einiger rekonstruierter Aggregate.

Zu sehen ist eine Weitfeldaufnahme der Probe mit erkennbaren A β -Aggregaten (Abbildung 33a). Rechts daneben ist das mittels RapidSTORM rekonstruierte und superaufgelöste Bild der gesamten Messung abgebildet. Eine Überlagerung beider Bilder (Abbildung 33c) zeigt eine Übereinstimmung einiger im Weitfeldbild sichtbarer Aggregate mit den rekonstruierten Aggregaten. Ein vergrößertes Bild eines kleinen Teilbereichs der Probe zeigt, dass nach der Rekonstruktion deutlich mehr Aggregate im Beobachtungsfeld erschienen sind, als das Weitfeldbild vermuten ließ. In Abbildung 33e sind einige der rekonstruierten Aggregate zu sehen. Größe und Form der Aggregate variieren. Es wurden zahlreiche kleine, eher runde Aggregate mit einer Größe von etwa 150 nm- 200 nm in x- und y-Richtung gefunden. Außerdem gab es einige ellipsenförmige Strukturen mit einer Größe zwischen 200 nm x 400 nm und 200 nm x 700 nm. Insgesamt wurden nach der Rekonstruktion in der gesamten Probe 633 Aggregate gefunden. Das Kriterium, ab wann ein Bereich der Probe als Aggregat gewertet wurde, waren 100 Treffer verteilt auf 4000 Bilder. Abbildung 34 zeigt eine Analyse der zugehörigen Kontrolle.

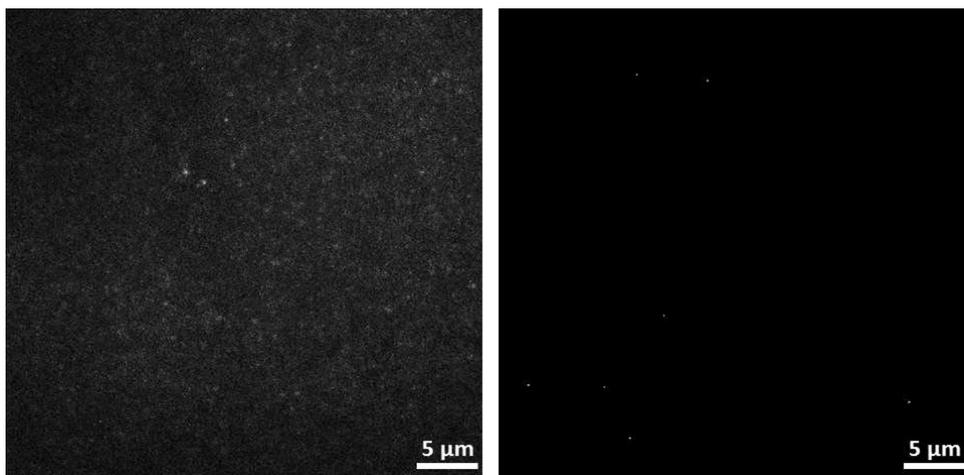


Abbildung 34: dSTORM-Messung einer Kontrolle ohne A β - Aggregate bei einer Anregungswellenlänge von 647 nm. Eine Messung bestand aus 4000 Bildern mit einer Belichtungszeit von 50 ms. links: Weitfeldaufnahme der Probe, rechts: rekonstruiertes Bild mit RapidSTORM. Es wurden keine Aggregate rekonstruiert.

Die dSTORM-Analyse der Kontrolle erfolgte auf gleiche Weise wie bei der Probe mit A β -Aggregaten. Es wurden 4000 Bilder mit einer Belichtungszeit von 50 ms und einer Verstärkung von 250 aufgenommen. Die Weitfeldaufnahme in Abbildung 34 (linkes Bild) zeigt einen deutlichen Unterschied im Vergleich zur Weitfeldaufnahme der Probe mit A β -Aggregaten. Nach der Rekonstruktion mit RapidSTORM wurden keine Aggregate berechnet (Abbildung 34 rechtes Bild). Das Kriterium zur Identifizierung eines Aggregats lag wiederum bei 100 Treffern aus 4000 Bildern.

3.2.2.2 Zweifarbige Messungen

Zur Erhöhung der Spezifität für A β -Aggregate wurden zweifarbige dSTORM-Messungen durchgeführt. Es wurden A β -Aggregate (100 pM) auf einer mit Dextran beschichteten Glasoberfläche mittels Capture immobilisiert. Als Detektionssonden wurden nun zwei verschiedene Antikörper, die mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert wurden, eingesetzt. Es handelte sich um A β -spezifische N-terminale oder C-terminale Antikörper. Es wurde bei jeder zweifarbigen Messung jeweils ein Antikörper verwendet, der mit Alexa 488 markiert wurde und einer, der mit Alexa 647 versehen wurde. Die Messung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde eine Messreihe von 4000 Bildern mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm aufgenommen. Wie bei der einfarbigen Messung wurde die Probe unmittelbar vorher so lange gebleicht, bis das gewünschte Blinkverhalten zu beobachten war. Danach wurde die Messung durchgeführt. Im zweiten Schritt wurde an derselben Stelle der Probe eine weitere Messung mit einer Anregungswellenlänge von 647 nm durchgeführt. Die Probe wurde wieder gebleicht und danach wurde eine Messung von 4000 Bildern aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit RapidSTORM. Bei der Auswertung wurden Aggregate gesucht, die bei beiden Anregungswellenlängen ein Fluoreszenzsignal emittieren. Auf diese Weise konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um A β -Aggregate handelte. Die Anzahl der rekonstruierten supraaufgelösten Aggregate hängt von den vorgegebenen Kriterien ab. Abbildung 35 zeigt ein Weitfeldbild von immobilisierten A β -Aggregaten bei einer Anregung von 488 nm und die zugehörigen rekonstruierten supraaufgelösten Aggregate in Abhängigkeit der Trefferzahl pro Aggregat. Die Messung bestand aus 4000 Bildern. In Abbildung 35b ist ein rekonstruiertes Bild zu sehen, bei dem bereits 20 Treffer als Kriterium für ein Aggregat ausreichend waren. Die Bilder c – i zeigen die Aggregate bei denen 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 und 2000 Treffer als Kriterium für ein Aggregat gewählt wurden. Die Anzahl der rekonstruierten Aggregate nimmt mit steigender Trefferzahl ab. In Tabelle 15 ist diese Messreihe in Zahlen dargestellt. Außerdem ist die zugehörige Trefferzahl für eine Messung an derselben Stelle mit

einer Anregungswellenlänge von 647 nm und die zugehörigen Kontrollen ohne immobilisierte A β -Aggregate dargestellt.

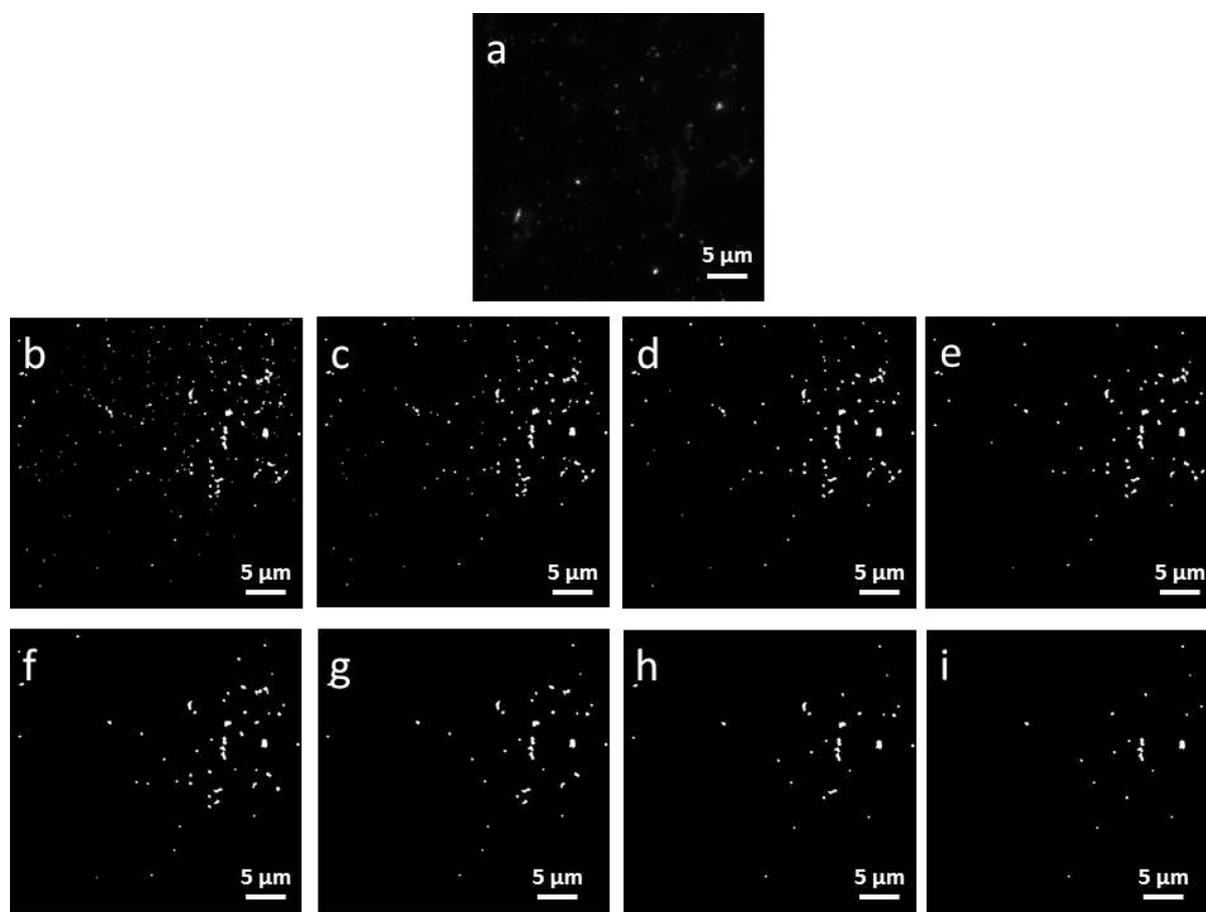


Abbildung 35: Kriterium für Aggregate bei Rekonstruktion mit RapidSTORM. a) Weitfeldaufnahme von A β -Aggregaten bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. b)-i) rekonstruierte Bilder nach Analyse mit RapidSTORM. Das Kriterium, ab wann ein Objekt als Aggregat gewertet wurde variiert: (von b-c) 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 und 2000 Treffer mussten bei 4000 Bildern gefunden werden, um als Aggregat angezeigt zu werden. Alle anderen Treffer wurden verworfen.

Tabelle 15: Anzahl der gefundenen Aggregate bei variierendem Kriterium, ab wann ein Objekt als Aggregat gewertet wurde.

Probe	20	50	100	200	500	1000	1500	2000
A β , 6E10-488	712	648	278	130	92	36	28	21
A β , Nab228-647	1013	629	256	159	77	51	41	35
Kontrolle, 6E10-488	8	1	0	0	0	0	0	0
Kontrolle, Nab228-647	6	2	0	0	0	0	0	0

Anhand der Zahlen aus Tabelle 15 wird deutlich, dass die Anzahl der gefundenen Aggregate sehr stark davon abhängt, welches Kriterium für das Vorhandensein eines Aggregats gesetzt wurde. Aggregate, bei denen durchschnittlich jedes zweite Bild einen Treffer aufweist (2000 Treffer aus 4000 Bildern), zeichnen sich durch eine besonders passende und flächendeckende Rekonstruktion aus. Aufgrund der geringen Anzahl von Aggregaten, die bei einer Messung so viele Treffer zeigen, ist es sehr unwahrscheinlich, dass in einer Probe Aggregate gefunden werden, die für beide Anregungswellenlängen diese Anforderung erfüllen. Bei den folgenden zweifarbigen Messungen wurde daher zunächst bei einer Anregungswellenlänge nach Aggregaten mit hoher Trefferzahl (über 50 %) gesucht. Danach wurde in der anderen Wellenlänge überprüft, ob es an derselben Stelle ein Aggregat mit weniger Treffern gab. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Anzahl der Treffer höher war als die höchste Trefferquote für ein Aggregat der zugehörigen Kontrolle.

3.2.2.2.1 dSTORM-Messungen mit A β 1-40 und A β 1-42

Zur Analyse der Zusammensetzung von A β -Aggregaten wurden verschiedene A β -Spezies und die Spezifität der jeweiligen C-terminalen Antikörper getestet. Die A β -Aggregate (10 pM) wurden wiederum auf einer mit Dextran beschichteten Glasoberfläche durch einen Capture immobilisiert. Es wurden zweifarbige dSTORM-Messungen mit 4000 Bildern pro Anregungswellenlänge angefertigt. Abbildung 36 zeigt exemplarisch eine Analyse von immobilisierten und co-aggregierten A β 1-40/1-42-Aggregaten. Als Detektionssonde wurde mit Alexa 488 markiertes 11A50-B10 zur Detektion der A β 1-40-Aggregate verwendet. Außerdem wurde 12F4 markiert mit Alexa 647 zur Detektion der A β 1-42 Aggregate eingesetzt. In der obersten Reihe in Abbildung 36 sind die Messungen bei einer Anregungswelle von 488 nm abgebildet. Man sieht zuerst die Weitfeldaufnahme, daneben das rekonstruierte superaufgelöste Bild der Probe und links davon die Überlagerung beider Bilder. Außerdem wurde ein Teilbereich der Probe vergrößert dargestellt. In der zweiten Reihe sieht man dieselbe Stelle der Probe bei einer Anregungswellenlänge von 647 nm. Auch hier wurde ein Teilbereich der Probe vergrößert dargestellt. In Abbildungsteil C wurde ein Aggregat, das zuvor für beide Wellenlängen rekonstruiert werden konnte, herausgegriffen. Zu sehen ist die Überlagerung der Treffer beider Wellenlängen, sowie das Einzelbild des Aggregats für eine Wellenlänge. Bei diesem Aggregat wurden von 4000 Bildern bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm insgesamt 3367 Treffer gefunden und für 647 nm waren es 3238 Treffer. Durch die fast identische Zahl an Treffern in beiden Wellenlängen zeigt die Rekonstruktion des Aggregats eine realistische Verteilung von A β 1-40 und A β 1-42 innerhalb des Aggregats.

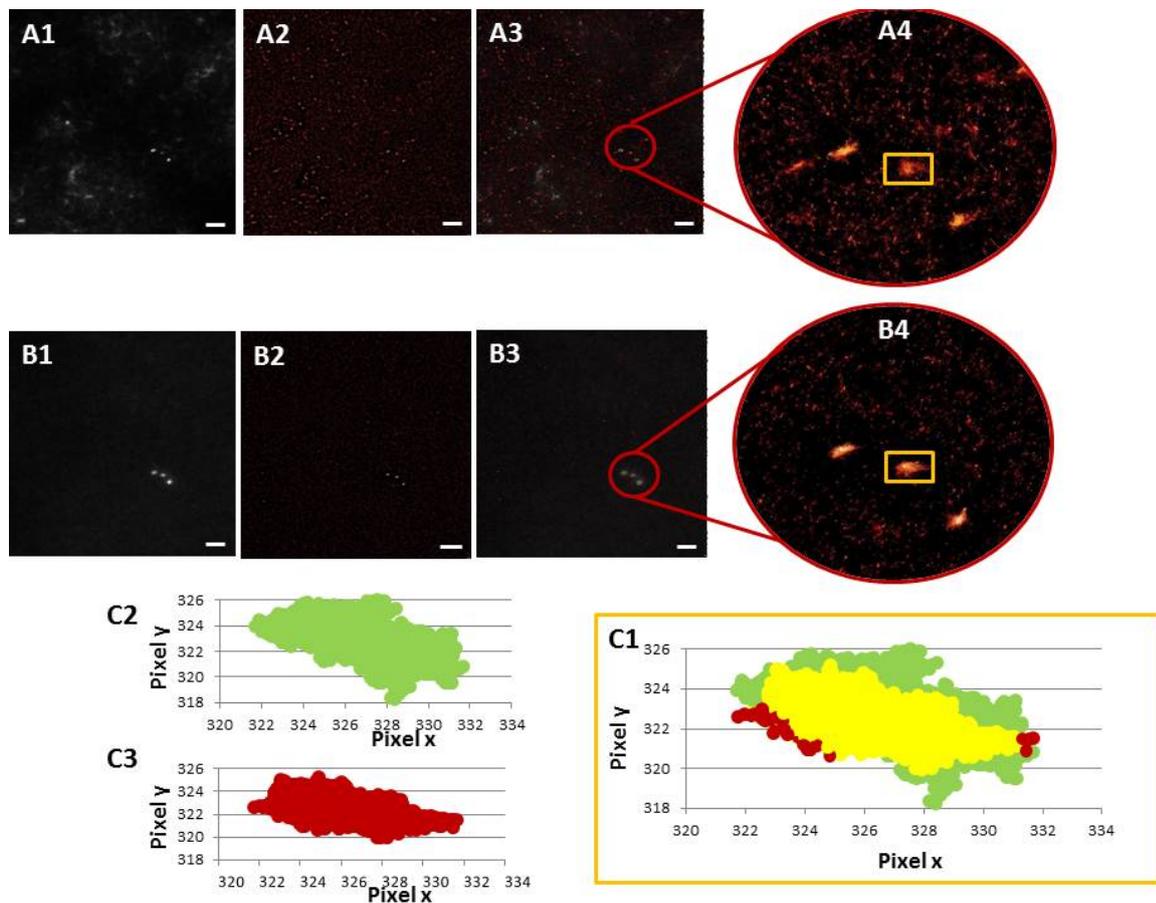


Abbildung 36: dSTORM-Messung von gemischt aggregiertem A 1-40/1-42. A1) Weitfeldaufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. A2) rekonstruiertes superaufgelöstes Bild nach Analyse mit RapidSTORM, A3) Überlagerung beider Bilder, A4) Vergrößerter Ausschnitt der Probe mit drei deutlich sichtbaren Aggregaten. B1) Weitfeldaufnahme derselben Stelle mit einer Anregungswellenlänge von 647 nm, B2) rekonstruiertes Bild der Probe, B3) Überlagerung beider Bilder, B4) Vergrößerter Teilbereich der Probe mit drei deutlich sichtbaren Aggregaten. C1) Abbildung eines rekonstruierten Aggregats. Gelb gefärbt wurden alle Bereiche, die in beiden Wellenlängen detektiert wurden C2) Rekonstruktion des Aggregats durch Treffer, die bei 488 nm entstanden sind (insgesamt 3367 Treffer/ 4000 Bilder), C3) Rekonstruktion des Aggregats durch Treffer, die bei 647 nm entstanden sind (insgesamt 3235 Treffer/ 4000 Bilder).

In Abbildung 37 ist eine weitere dSTORM-Messung von co-aggregiertem A β 1-40/1-42 abgebildet. Zur Detektion wurde mit Alexa 488 markiertes 6E10 (1:4000) und mit Alexa 647 markiertes Nab228 (1:1000) verwendet. Zu sehen sind die Weitfeldaufnahmen und die rekonstruierten superaufgelösten Bilder für beide Anregungswellenlängen. Es wurden rekonstruierte Aggregate herausgegriffen, bei denen die Trefferzahl in den jeweiligen Wellenlängen deutlich unterschiedlich ausfiel. Es entsteht der Eindruck, dass der Kern der Aggregate eine andere Zusammensetzung aufweist als der Randbereich.

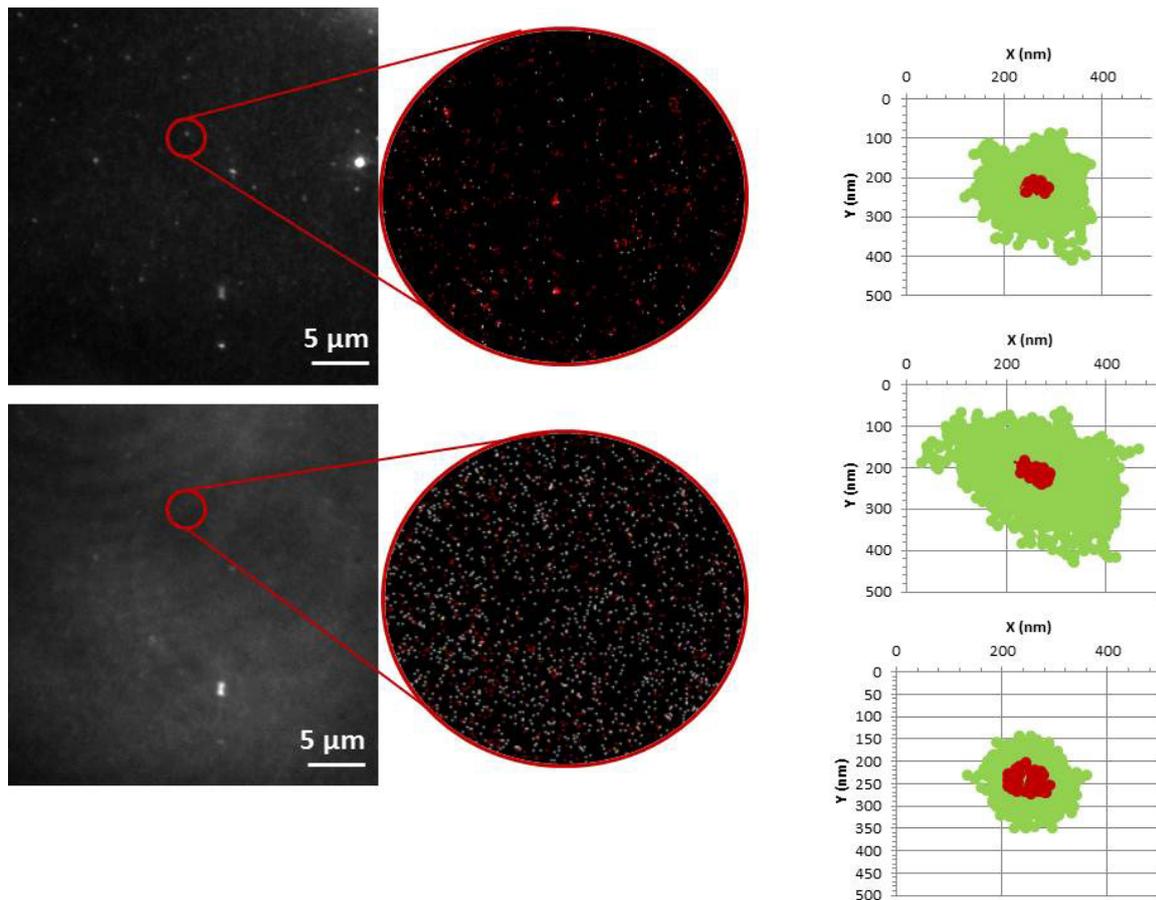


Abbildung 37: dSTORM-Analyse von immobilisierten A β -Aggregaten (100 pM). Zur Detektion wurde mit Alexa 488 markiertes 6E10 und mit Alexa 647 markiertes Nab228 verwendet. Oben links ist eine Weitfeldaufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm der Probe abgebildet. Daneben ist ein vergrößerter rekonstruierter Teilbereich der Probe zu sehen. Im unteren Bild ist dieselbe Stelle bei einer Anregungswellenlänge von 647 nm zu sehen (Weitfeldbild und rekonstruiertes vergrößertes Bild). Die rechten Bilder zeigen jeweils einzelne rekonstruierte Aggregate. In grün wurden Treffer aus der Rekonstruktion der bei 488 nm aufgenommenen Bilder dargestellt und mit rot wurden die Treffer aus der 647 nm Messung markiert.

Außerdem wurden dSTORM-Messungen von getrennt aggregierten A β 1-40- und A β 1-42-Aggregaten angefertigt, die erst bei der Immobilisierung zusammen auf eine Dextranoberfläche gegeben wurden. Als Detektionssonden wurden wieder mit Alexa 488 markiertes 11A50-B10 und mit Alexa 647 markiertes 12F4 verwendet. In Abbildung 38 ist zu erkennen, dass bei der supraaufgelösten Rekonstruktion ausschließlich Aggregate zu sehen sind, die aus einer einzigen A β -Spezies bestehen.

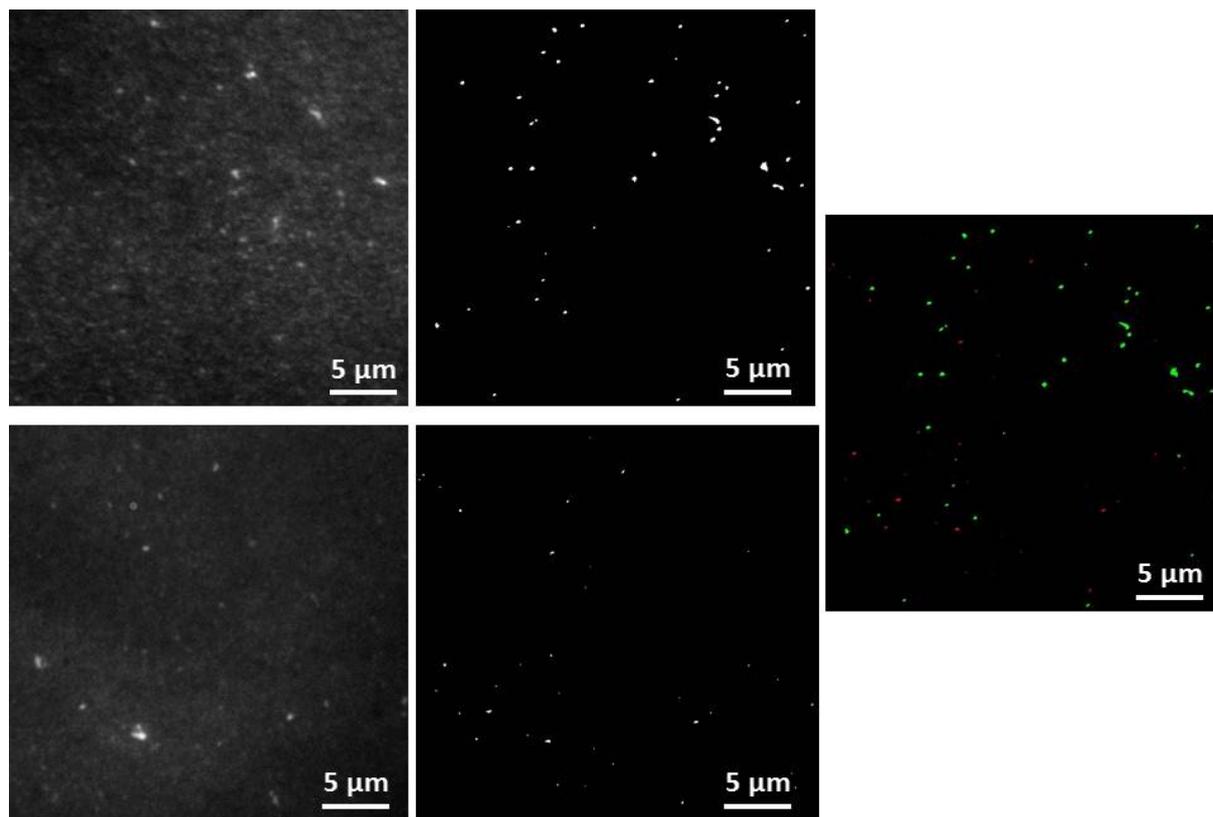


Abbildung 38: dSTORM-Messung von getrennt aggregierten A 1-40 und A 1-42-Aggregaten. obere Reihe: Weitfeldbild bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm, daneben: rekonstruiertes Bild der Probe mit RapidSTORM. Untere Reihe: Weitfeldbild und rekonstruiertes Bild derselben Probe bei einer Anregungswellenlänge von 647 nm. Das Bild links zeigt eine Überlagerung der supraaufgelösten Bilder beider Anregungswellenlängen. Es ist keine Co-Lokalisation erkennbar. Alle rekonstruierten Aggregate bestehen nur aus einer A β -Spezies.

Eine Zusammenfassung der dSTORM-Analyse von verschiedenen A β -Spezies ist in Tabelle 16 dargestellt. Das Kriterium für das Vorliegen eines Aggregats wurde mit 2000 Treffern ausgewählt. Es wurden beide Wellenlängen analysiert. Wurden in der jeweils anderen Wellenlänge genügend viele Treffer innerhalb des Aggregats gefunden, konnte von Co-Lokalisation ausgegangen werden.

Tabelle 16: Ergebnisse verschiedener dSTORM-Messungen an A β -Aggregaten. A β 40/42: co-aggregierte Aggregate, die aus A β 1-40 und A β 1-42 bestehen. C42-647: C-terminaler Antikörper für A β 1-42 (12F4) markiert mit Alexa 647, C40-488: C-terminaler Antikörper für A β 1-40 (11A50-B10) markiert mit Alexa 488, A β 40+A β 42: getrennt voneinander aggregierte A β -Spezies, die erst bei der Immobilisierung gemischt wurden. Das Kriterium für ein Aggregat lag bei 2000 Treffern in 4000 Bildern. Co-Lokalisation lag vor, wenn in der anderen Wellenlänge mindestens 100 Treffer gefunden wurden. Nahezu alle co-aggregierten Aggregate zeigen Co-Lokalisation. Die getrennt aggregierten Aggregate zeigen niemals Co-Lokalisation.

Probe	Anzahl Aggregate 488 nm	Co-Lokalisation 488 nm/647 nm	Anzahl Aggregate 647 nm	Co-Lokalisation 647 nm/488 nm
Aβ40/42, C42-647, C40-488	12	11	15	15
Aβ40/42, N-647, N-488	31	30	22	22
Aβ40 +Aβ42, C42-647, C40-488	9	0	7	0

In nahezu allen Fällen konnte bei den co-aggregierten Aggregaten eine Co-Lokalisation festgestellt werden. Bei getrennt voneinander aggregierten A β -Spezies kam es nie zu einer Co-Lokalisation.

3.2.3 Messungen mit menschlichen Proben

Die Präparation und Analyse der menschlichen Proben erfolgte nach demselben Immobilisierungsprotokoll wie für synthetische A β -Aggregate. Zur Detektion wurden die gleichen Sonden verwendet. Als Kontrolle diente Rückenmarksflüssigkeit von verschiedenen gesunden Patienten. In Abbildung 39 ist eine dSTORM-Analyse von menschlichen Proben abgebildet. Zur Detektion wurden zwei C-terminale Antikörper verwendet. Im Weitfeldbild beider Anregungswellenlängen sind Aggregate erkennbar. Daneben ist ein vergrößerter supraaufgelöster Teilbereich der Probe abgebildet. Im rechten Bild sind jeweils die rekonstruierten Einzelaggregate für jede Anregungswellenlänge abgebildet.

Abbildung 40 zeigt ebenfalls eine dSTORM-Analyse von menschlichen Proben. Als Detektionssonde wurden diesmal zwei fluoreszenzmarkierte N-terminale Antikörper verwendet. Im Weitfeldbild (jeweils linkes Bild) sind mehrere Aggregate erkennbar. Daneben wurde wiederum ein rekonstruierter Teilbereich der Probe vergrößert dargestellt. Im rechten Bild wurde ein einzelnes supraaufgelöstes Aggregat für jede Wellenlänge gezeigt.

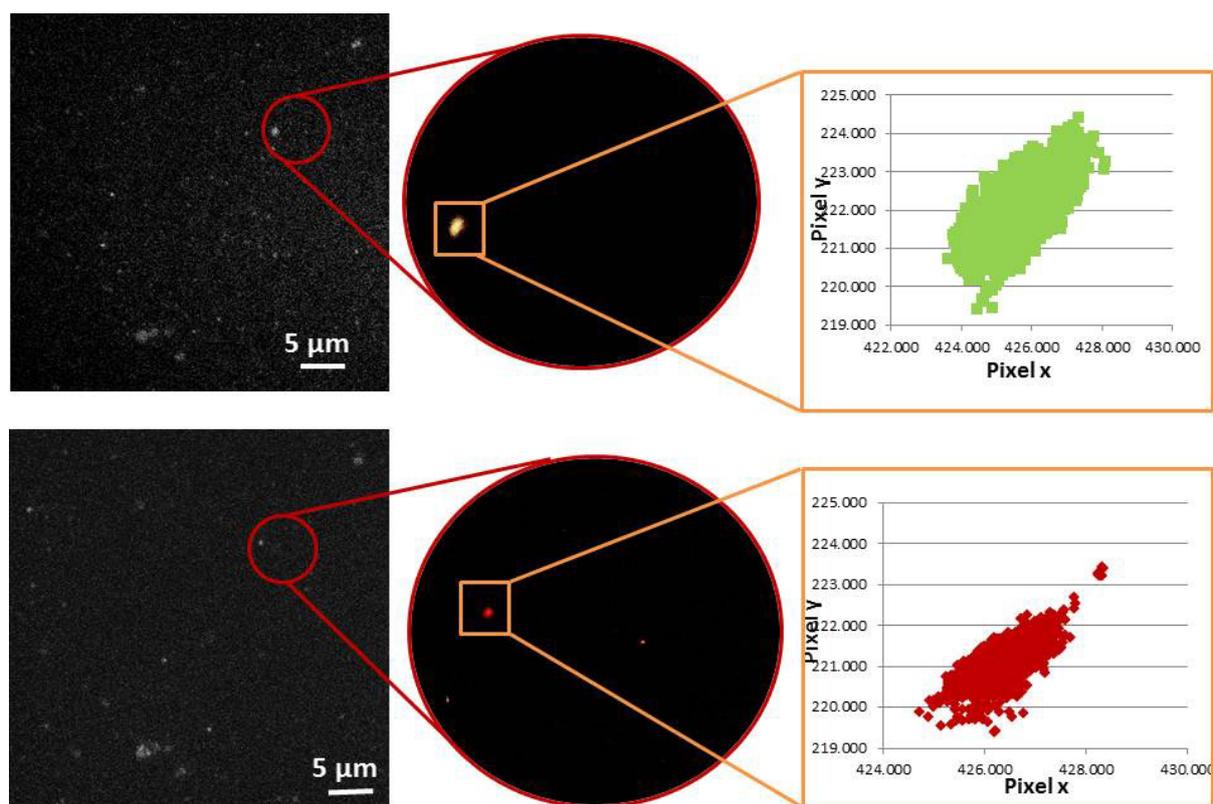


Abbildung 39: dSTORM-Analyse von menschlichen Proben. Obere Reihe: Anregungswellenlänge 488 nm, untere Reihe: Anregungswellenlänge 647 nm. Linkes Bild: Weitfeldbild der Probe, mittleres Bild: supraaufgelöster Teilbereich der Probe nach Rekonstruktion mit RapidSTORM, rechtes Bild: rekonstruiertes Einzelaggregat. Zur Detektion wurden zwei C-terminale Antikörper verwendet: 11A50-B10-Alexa 488 (C40) und 12F4-Alexa 647 (C42).

Die Rekonstruktion der dSTORM-Messungen an den zugehörigen Kontrollen ergab keine Objekte in beiden Anregungswellenlängen. Bereits die aufgenommenen Weitfeldbilder zeigten keine erkennbaren Strukturen. Nach der Rekonstruktion wurden keine Objekte im supraaufgelösten Bild gezeigt, wenn das Kriterium für ein Aggregat bei 50 Treffern aus 4000 Bildern lag.

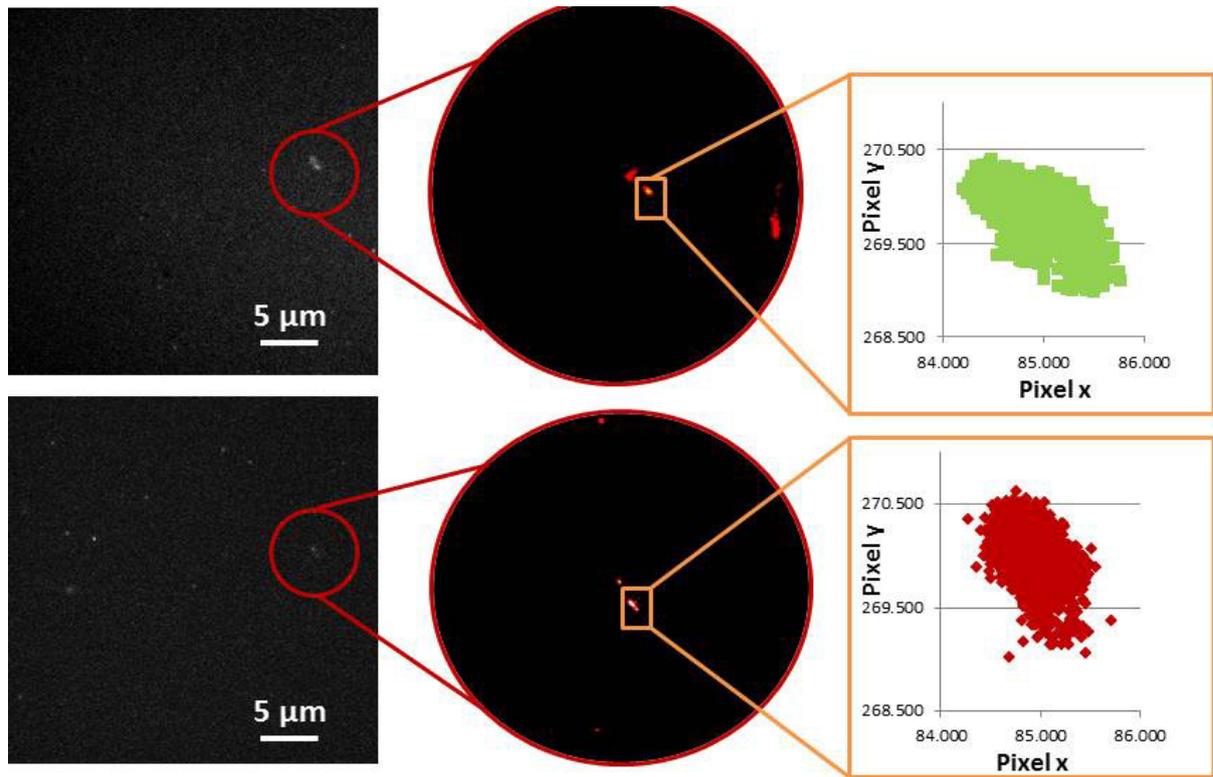


Abbildung 40: dSTORM-Analyse von menschlichen Proben. Obere Reihe: Anregungswellenlänge 488 nm, untere Reihe: Anregungswellenlänge 647 nm. Linkes Bild: Weitfeldbild der Probe, mittleres Bild: supraaufgelöster Teilbereich der Probe nach Rekonstruktion mit RapidSTORM, rechtes Bild: rekonstruiertes Einzelaggregat. Zur Detektion wurden zwei N-terminale Antikörper verwendet: 6E10-Alexa 488 und Nab228-Alexa 647.

4 Diskussion

Die Alzheimersche Demenz ist eine bisher unheilbare neurodegenerative Erkrankung. Sie führt zu Gedächtnisverlust, Störungen der motorischen Fähigkeiten, Wesensveränderungen und schließlich zum Tod des Patienten. Im Verlauf der Krankheit reichern sich im Gehirn der Patienten schädliche Stoffwechselprodukte an, die das Nervengewebe irreversibel schädigen. Das Amyloid- β -Peptid ($A\beta$) ist hierbei von zentraler Bedeutung. Durch Aggregation kann es verschiedene lösliche und unlösliche Formen wie Oligomere, Fibrillen oder Plaques bilden. Es wird angenommen, dass die löslichen $A\beta$ -Oligomere die bedeutendste neurotoxische Wirkung zeigen und somit zum krankheitsauslösenden Schritt führen. Eine eindeutige Diagnose der AD ist nur *post mortem* möglich. Eine Diagnose *pre mortem* basiert neben neurologischen und kognitiven Tests auf bildgebenden Verfahren. Ein wesentlicher Nachteil aller bildgebenden Verfahren, bei denen Licht zur Detektion eingesetzt wird, ist die Beugungsbegrenzung. Aufgrund der Beugungsbegrenzung erscheinen alle Objekte, die lateral kleiner als etwa 200 nm sind, als verschmiertes Objekt. Sowohl Größe als auch Form können nicht mehr eindeutig bestimmt werden. Die für AD als krankheitsauslösend angenommenen $A\beta$ -Oligomere können deutlich kleiner als 200 nm sein. Zur detaillierten Untersuchung der $A\beta$ -Oligomere wurden zwei supraauflösende optische Mikroskopiemethoden getestet. Ein schon existierendes Protokoll zur Immobilisierung und Detektion von $A\beta$ -Aggregaten wurde an die Anforderungen der supraauflösenden Mikroskopie angepasst. Außerdem wurden weitere experimentelle Bedingungen etabliert, die es ermöglichen supraaufgelöste Bilder von $A\beta$ -Aggregaten bzw. $A\beta$ -Oligomeren zu erzeugen.

4.1 PAINT

Zur Erstellung von supraaufgelösten Bildern, die auf dem PAINT-Prinzip beruhen, musste das Immobilisierungsprotokoll optimiert werden. Unspezifische Fluoreszenz des Hintergrunds sowie einzelner Chemikalien mussten soweit wie möglich reduziert werden. Außerdem mussten Messbedingungen etabliert werden, unter denen die Probe das gewünschte und für PAINT-Messungen notwendige Verhalten zeigten. Grundlegend waren das Finden geeigneter Detektionssonden und die Einstellung passender Belichtungszeiten und Laserleistungen.

4.1.1 Reduktion der Hintergrundfluoreszenz

Bei der Rekonstruktion des ursprünglichen Bildes wurde beim PAINT-Prinzip jedes Fluoreszenzsignal verwendet, das über einem vorher definierten Intensitätswert lag. Durch unspezifische Hintergrundfluoreszenz kann das Messergebnis verfälscht werden.

4.1.1.1 A β -Aggregate und D-Peptide erhöhen die Hintergrundfluoreszenz wenig

Der Beitrag zur Hintergrundfluoreszenz von A β -Aggregaten und der Peptide D1 und D3 wurde durch mehrmaliges Messen der Fluoreszenzintensität bei Anregungswellenlängen von 488 nm und 635 nm bestimmt. A β -Aggregate und D-Peptide führen für beide Anregungswellenlängen zu einem Anstieg der Hintergrundfluoreszenz im Vergleich zu gereinigtem Glas. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm lag der Anstieg bei circa 5 % - 15 % und bei 635 nm bei etwa 25 %. Gab man sowohl A β -Aggregate als auch D-Peptide zusammen auf eine gereinigte Glasoberfläche, stieg die Intensität für A β -Aggregate und D1 um 50 % bei 635 nm und um 45 % für 488 nm. Bei A β -Aggregaten und D3 gab es einen Anstieg um 60 % für 635 nm und ebenfalls um 45 % für 488 nm. Es war zu erwarten, dass sich die Hintergrundfluoreszenz mit zunehmender Anzahl an zugefügten Substanzen erhöhte. Eine Zunahme der Hintergrundfluoreszenz in der beschriebenen Größenordnung stellte kein Problem für spätere PAINT-Messungen dar. Um jedoch die Hintergrundfluoreszenz so gering wie möglich zu halten, wurde für PAINT-Messungen Varianten des D1-Peptids verwendet, da dies einen geringeren Beitrag zur Hintergrundfluoreszenz leistete als das D3-Peptid.

4.1.1.2 Dextran verursacht signifikant weniger Hintergrundfluoreszenz als PEG

Bei der Fluoreszenzanalyse zum Finden geeigneter Spacer wurden Dextran und PEG in Kombination mit fluoreszenzmarkiertem D3-Peptid verglichen. Es zeigte sich, dass PEG in

Verbindung mit fluoreszenzmarkiertem D3-Peptid zu einem 35-mal höheren Fluoreszenzsignal führte als gereinigtes Glas. Bei Dextran und fluoreszenzmarkiertem D3-Peptid kam es lediglich zu einem Anstieg um etwa 10 %. Ein möglicher Grund für den starken Anstieg der Fluoreszenz bei Verwendung von PEG könnte die unterschiedliche Struktur der beiden Spacer sein. Es wäre möglich, dass sich das fluoreszenzmarkierte D3-Peptid zwischen den einzelnen PEG-Molekülen verfängt und auch durch mehrmaliges Waschen nicht entfernt werden konnte. Bei der Verwendung von Dextran waren die Verstrickungen wahrscheinlich weniger stark, sodass das fluoreszenzmarkierte D3-Peptid fast vollständig abgewaschen werden konnte. Für PAINT-Messungen wurde Dextran als Spacer verwendet, weil es wichtig war, dass die Detektionssonden ausschließlich Fluoreszenzsignale der zu untersuchenden Probe lieferten.

4.1.1.3 Ethanolamin reduziert die Hintergrundfluoreszenz mehr als BSA

Zur Deaktivierung von Carboxylgruppen des Spacers wurde Ethanolamin ausgewählt. Im Vergleich zu BSA konnte Ethanolamin den Hintergrund, den fluoreszenzmarkiertes D3 auf einer Dextranoberfläche bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm verursachte, um etwa 30 % senken. Die Verwendung von BSA hingegen zeigte im Vergleich zu einer Probe ohne Deaktivierungskomponente keine signifikante Senkung der Hintergrundfluoreszenz. Bei 488 nm Anregungswellenlänge erhöhte die Zugabe von BSA sogar die Hintergrundfluoreszenz. Die Eigenschaft, dass BSA insbesondere unter Anregungswellenlängen im grünen oder blauen Spektralbereich ein erhöhtes Fluoreszenzsignal verursacht, ist bekannt. In Kombination mit einer im Vergleich zu Ethanolamin schwächeren Reduktion der Hintergrundfluoreszenz bei 635 nm wurde BSA nicht zur Deaktivierung der Carboxylgruppen bei PAINT-Messungen verwendet.

4.1.2 Variante 5 des D1-Peptids zeigt Eignung als Detektionssonde

Es wurden fünf verschiedene fluoreszenzmarkierte Varianten des D1-Peptids auf ihre Eignung als Detektionssonde für PAINT-Messungen an immobilisierten A β -Aggregaten getestet. Da das D1-Peptid aufgrund des Glutamats zu Zyklisierung neigt, war es als Detektionssonde ungeeignet. Durch sukzessives Entfernen jeweils einer Aminosäure entstanden fünf Varianten des D1-Peptids. Anhand des Intensitätsprofils eines interessanten Probenbereichs über die gesamte Messzeit (Zeitspur) wurde Variante 5 als vergleichsweise beste Alternative ausgewählt. Die meisten Zeitspuren der Variante zeigten einen stabilen

Wechsel von hohen und schwachen Intensitäten über den gesamten Messzeitraum hinweg. Dies lässt auf eine Affinität zu A β -Aggregaten schließen, die im gewünschten Bereich für PAINT-Messungen liegt. Bei einer höheren Affinität (wie beispielsweise bei A β -spezifischen Antikörpern) würde das Intensitätssignal dauerhaft hoch sein und gegen Ende der Messzeit aufgrund von Bleicheffekten stufenweise abnehmen. Eine zu geringe Affinität würde weniger oder gar keine hohen Intensitätswerte zeigen. Eine zu geringe Affinität zu A β -Aggregaten war wahrscheinlich die Ursache dafür, dass bei den Varianten 1 bis 4 des D1-Peptids nur sehr wenige Fluoreszenzereignisse während der Messung registriert wurden. Für PAINT-Messungen waren diese Varianten ungeeignet, da die Wahrscheinlichkeit der Kollision und somit der Emission von Fluoreszenz zu gering waren. Die Möglichkeit einer nanometergenauen Rekonstruktion der Probe war somit durch die Verwendung der Variante 5 des D1-Peptids vergleichsweise am wahrscheinlichsten.

4.1.3 Eine Driftkorrektur in der x-y-Ebene ist nicht notwendig

Driftmessungen in x-y-Richtung ergaben eine Driftgeschwindigkeit von 2,37 nm pro Minute. Für kurze Messzeiten von etwa 1 bis 2 Minuten war eine Driftkorrektur nicht erforderlich. Die erwartete Messgenauigkeit lag bei etwa 10 nm in x-y-Richtung. Bei einer Messzeit von maximal zwei Minuten ergäbe sich ein Drift von weniger als 5 nm und läge unterhalb der Auflösungsgrenze. Für längere Messreihen, die eine Messzeit von fünf Minuten überschreiten, muss über eine Driftkorrektur nachgedacht werden, da der Drift dann zu sichtbaren lateralen Verschiebungen führen könnte. Auf diese Weise würde sich für die berechnete laterale Ausdehnung der Probe ein verfälschtes Profil ergeben.

4.1.4 Mittlere Laserleistungen erzielen optimale Messergebnisse

Die eingestrahlte Laserleistung beeinflusste die Wahrscheinlichkeit der Anregung eines Fluorophors zur Emission von Fluoreszenz. Die Laserleistung betrug zwischen 0 und 2000 μ W am Objektiv. Bei einer Laserleistung zwischen 600 μ W und 1400 μ W wurden die meisten Aggregate auf derselben Probe rekonstruiert und die Lokalisationsgenauigkeit war am besten. Bei zu niedrigen Laserleistungen waren statistisch zu wenig Fluorophore angeregt und es konnten während des Messzeitraums nicht genügend Photonen gesammelt werden. Auf diese Weise wurden vergleichsweise wenige Treffer während der Messung über einem Grenzwert gefunden und dies führte zu einer geringen Anzahl an rekonstruierten Aggregaten. Bei sehr hohen Laserleistungen wurden ebenfalls wenige Aggregate rekonstruiert. Dies lag an

einer zu hohen Anzahl von angeregten Fluorophoren. Innerhalb eines Beobachtungsfeldes waren trafen gleichzeitig zu viele angeregte Fluorophore auf die Probenoberfläche. Ein Gaussfit war nicht mehr möglich, da sich die Lichtausbreitungsfunktionen der benachbarten Fluorophore überlappten. Somit entstanden wiederum nur wenig Treffer, die der späteren Rekonstruktion zugeführt werden konnten. Die Lokalisationsgenauigkeit wurde ebenfalls schlechter, obwohl während der Messung mehr Photonen gesammelt wurden. Die Anzahl der Hintergrundphotonen stieg jedoch verhältnismäßig stärker an und somit wurde die Lokalisationsgenauigkeit unpräziser. Die zugehörigen Zeitspuren konnten dies bestätigen. Die Zeitspuren zeigten eine konstant hohe Fluoreszenzintensität über mehrere Bilder hinweg. Bei einer mittleren Laserintensität waren gerade genug Fluorophore angeregt und es wurden ausreichend viele Treffer für eine Rekonstruktion von Aggregaten gefunden. Die zugehörigen Zeitspuren zeigten einen konstanten Wechsel zwischen hohen und niedrigen Intensitäten. Insgesamt zeigten nur etwa 20 % bis 30 % der Zeitspuren innerhalb einer Messreihe den gewünschten Verlauf. Für eine umfassende Analyse der Probe wäre ein höherer Anteil dieser Zeitspuren erstrebenswert.

4.1.5 Eine Belichtungszeit zwischen 50 ms und 100 ms zeigt optimale Zeitspuren

Es wurden verschiedene Kombinationen von Belichtungszeiten und Dunkelzeiten getestet. Bei Belichtungszeiten zwischen 50 ms und 100 ms zeigten die gemessenen Zeitspuren das beste Verhalten. Die Fluoreszenzintensität innerhalb eines interessanten Probenbereichs wechselte kontinuierlich zwischen hohen und niedrigen Werten über den gesamten Messzeitraum hinweg. Je länger die Belichtungszeit, desto höher war die durchschnittliche detektierte Intensität und somit auch die Anzahl der gesammelten Photonen. Dies lässt darauf schließen, dass die mittlere Verweildauer der Fluoreszenzmarkierten Sonde bei etwa 50 ms - 100 ms lag. Bei Belichtungszeiten unterhalb von 50 ms zeigten die Zeitspuren eine konstant hohe Intensität über mehrere Bilder hinweg. Dies bedeutet, dass ein Fluorophor, das in einem Bild an einer bestimmten Position der Oberfläche detektiert wurde, auch im nächsten Bild noch an derselben Stelle verweilte. Für die spätere Rekonstruktion konnte also in diesem Bild keine zusätzliche Information generiert werden. Bei längeren Belichtungszeiten war die mittlere Fluoreszenzintensität pro Bild teilweise sehr gering. Dies lag daran, dass ein Fluorophor nur einen Bruchteil der gesamten Belichtungszeit auf der Probenoberfläche verweilte und Photonen emittierte. Danach diffundierte die Sonde aus dem Fokus und für die restliche Belichtungszeit wurden keine Photonen mehr detektiert. Die mittlere Anzahl der gesammelten Photonen pro Bild verringerte sich dadurch. Bei einer Belichtungszeit zwischen

50 ms und 100 ms stimmten Belichtungszeit und mittlere Verweildauer der Sonden an der Probe am besten überein. Allerdings wurde bei nur etwa 5 % der gefundenen Zeitspuren dieses Verhalten beobachtet. Für eine umfassende Analyse der Probe unter Verwendung des PAINT-Prinzips ist eine so geringe Ausbeute viel zu gering. Da es sich bei PAINT um eine statistische Methode handelt, müssen für eine fundierte Analyse deutlich mehr Zeitspuren das gewünschte Verhalten zeigen.

4.2 dSTORM

Zur Anfertigung superaufgelöster Bilder von A β -Aggregaten nach dem dSTORM-Prinzip mussten geeignete Detektionssonden und Messbedingungen gefunden werden. Grundlegend für eine nanometergenaue Rekonstruktion der Bilder nach dSTORM war die Verwendung von reversibel photoschaltbaren Fluorophoren. Es wurden zunächst zwei photoschaltbare Farbstoffe auf ihre Eignung für dSTORM-Messungen getestet. Danach wurden die Messbedingungen angepasst, um nanometergenaue Rekonstruktionen der Proben anzufertigen. Es wurden verschiedene A β -Spezies unter Anwendung des dSTORM-Prinzips analysiert.

4.2.1 Alexa 488 und Alexa 647 eignen sich für Messungen nach dem dSTORM-Prinzip

Zur Verwendbarkeit der Fluorophore für eine Analyse nach dem dSTORM-Prinzip wurden die Eigenschaften der Lichtausbreitungsfunktion einzelner Fluorophore bestimmt. Die Breite der gefitteten Gaussfunktion wurde für beide Fluorophore bestimmt. Für Alexa 488 ergab sich eine mittlere Gaussbreite von 1,64 Pixeln, was bei der gegebenen Auflösung 104 nm entsprach. Somit betrug die Gesamtausdehnung der Lichtausbreitungsfunktion für Alexa 488 durchschnittlich etwa 208 nm. Dieser Wert ist durch die Beugungsbegrenzung zu erklären. Nach der Beugungsbegrenzung erscheint Licht, das von einer Punktlichtquelle ausging, als verschmierter ausgedehnter Punkt. Die räumliche Ausdehnung des Punktes ist abhängig von der eingestrahlten Wellenlänge und beträgt bei guten experimentellen Bedingungen etwa 200 nm. Je kleiner die eingestrahlte Wellenlänge, desto geringer erscheint die räumliche Ausdehnung eines Lichtpunktes. Eine Anregungswellenlänge von 488 nm sollte somit bei sonst guten experimentellen Gegebenheiten eine Gaussbreite im Bereich von etwa 200 nm liefern. Die berechnete Gaussbreite für Alexa 488 lag bei 208 nm und somit kann davon ausgegangen werden, dass ein sehr präziser Fit stattgefunden hat. Für Alexa 647 ergab sich eine mittlere Gaussbreite von 2,03 Pixeln bzw. 129 nm. Die Gesamtausdehnung der

Lichtausbreitungsfunktion betrug bei Alexa 647 folglich 258 nm. Dieser Wert deckt sich ebenfalls mit den Erwartungen aus der Beugungsbegrenzung. Obwohl die Gaussbreite für Alexa 647 im Durchschnitt größer war als die für Alexa 488 berechneten Werte, kann auch bei Alexa 647 von einem sehr guten Fitergebnis ausgegangen werden. Der höhere Wert ist allein durch die Beugungsbegrenzung zu erklären.

Das Blinkverhalten der Farbstoffe wurde durch die Zusammensetzung des Messpuffers sowie durch die eingestrahlte Laserleistung und die gewählte Belichtungszeit beeinflusst. Es wurden für beide Fluorophore Messbedingungen gefunden, bei denen über den gesamten Messzeitraum hinweg (bis zu 16 000 Bilder) ein gutes Blinkverhalten erkennbar war. Zum einen konnte das Blinkverhalten durch Beobachtung eingeschätzt werden. Eine zuverlässige Methode war das Betrachten der Zeitspuren. Nahezu alle getesteten Zeitspuren zeigten das gewünschte Blinkverhalten mit dem typischen Wechsel zwischen hohen und niedrigen Intensitätswerten.

4.2.2 Co-Lokalisation als Entscheidungskriterium für A β -Aggregate

Bei zweifarbigen dSTORM-Messungen wurde die Probe an derselben Stelle einmal mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und im Anschluss daran mit einer Anregungswellenlänge von 647 nm beobachtet. Bei der Probe handelte es sich meistens um immobilisierte A β -Aggregate und als Detektionssonden wurden zwei unterschiedliche A β -spezifische Antikörper verwendet, die mit Alexa 488 bzw. Alexa 647 markiert wurden. Um die Spezifität zur Detektion von A β -Aggregaten zu erhöhen, wurden nur solche Treffer als Signal zur Rekonstruktion eines A β -Aggregats verwendet, die innerhalb der ROI bei beiden Anregungswellenlängen detektiert wurden. ROIs, bei denen nur Treffer einer Anregungswellenlänge verzeichnet wurden, wurden aussortiert.

Die Anzahl und Verteilung der rekonstruierten Aggregate war jedoch sehr stark davon abhängig, ab welcher Trefferzahl ein Probenbereich als Aggregat definiert wurde. Bei einer typischen Messung von 4000 Bildern wurden mehrere Hundert Aggregate für jede Wellenlänge gefunden, wenn 100 Treffer als Kriterium für das Vorliegen eines Aggregats ausreichten. Wurde das Kriterium auf 2000 Treffer pro Aggregat erhöht, blieben bei einer identischen Probe nur noch etwa 20 Aggregate übrig. Eine aussagekräftige Rekonstruktion der Form eines Aggregats kann jedoch nur erfolgen, wenn möglichst viele Treffer detektiert wurden. Somit würden für eine detaillierte Analyse der Aggregatstruktur nur solche

Aggregate ausgewählt werden, die eine sehr hohe Trefferquote aufweisen. Wendet man dieses Kriterium nun für beide Anregungswellenlängen an, ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass es zu einer Co-Lokalisation kommt. Gründe, weshalb bei Aggregaten in beiden Wellenlängen unterschiedlich viele Treffer erzielt wurden, gibt es viele. Es könnte beispielsweise an einer unterschiedlichen Affinität der Antikörper zu den Aggregaten liegen. Wäre die Affinität eines Antikörpers beispielsweise halb so hoch wie die des anderen Antikörpers, würden statistisch gesehen auch nur halb so viele Treffer während der Messzeit erwartet werden. Unter nicht idealen Umständen wäre das Aggregat bei einer Anregungswellenlänge nach der Rekonstruktion sichtbar und in der anderen nicht. Da es keine Co-Lokalisation gäbe, würde das Aggregat aussortiert werden. Ein weiterer Grund für eine ungleiche Trefferzahl wäre die Bindestelle der Antikörper. Würde ein Antikörper an das C-terminale Ende und der andere an das N-terminale Ende der Aggregate binden, könnte es je nach Beschaffenheit der Aggregate zu Platzproblemen durch eventuell innen liegende N-terminale Bindestellen kommen. Ein ähnliches Szenario bietet sich, wenn die Aggregate aus unterschiedlichen A β -Spezies aufgebaut sind und mit spezifischen Antikörpern detektiert werden sollen. Es wäre denkbar, dass sich eine A β -Spezies beispielsweise eher im Inneren der Aggregate anlagert, was die Trefferquote der spezifischen Antikörper stark einschränken würde. Neben diesen genannten Gründen könnten weitere Argumente gefunden werden, weshalb das Co-Lokalisationskriterium anders gewählt werden sollte, als eine möglichst große Trefferzahl für beide Anregungswellenlängen.

Ein möglicher Lösungsansatz wurde bei der Analyse der A β -Aggregate nach dem dSTORM-Prinzip vorgestellt. Zunächst wurde in einer der Anregungswellenlängen nach einem Aggregat mit ausreichend hoher Trefferzahl gesucht. Danach wurde in der Messung bei der zweiten Anregungswellenlänge das gleiche Aggregat gesucht, wobei die Anzahl der Treffer deutlich niedriger sein konnte. Wichtig war lediglich, dass die Trefferzahl höher war als die höchste Trefferzahl für ein Objekt in der zugehörigen Kontrolle. Wurde beispielsweise in einer Kontrolle bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ein Probenbereich mit 73 Treffern über den gesamten Messzeitraum detektiert, durfte bei der Probe alles als Aggregat gewertet werden, was beispielweise mehr als 100 Treffer innerhalb der Messung zeigte.

4.2.2.1 Co-aggregierte unterschiedliche A β -Spezies zeigen immer eine Co-Lokalisation

In Messungen, bei denen A β 1-40 und A β 1-42 co-aggregiert und immobilisiert wurden, kam es in nahezu allen Fällen zu einer Co-Lokalisation. Die Detektion erfolgte über spezifische C-terminale Antikörper für die jeweilige A β -Spezies, die mit Alexa 488 bzw. Alexa 647

markiert wurden. Zur Analyse der Aggregate wurde mit der Wellenlänge begonnen, bei der ein Aggregat viele Treffer zeigte. Auf diese Weise konnte die Struktur des Aggregats supraaufgelöst abgebildet werden. Danach wurde in der Messung bei der zweiten Anregungswellenlänge nach Treffern gesucht, die über der Trefferzahl der Kontrolle lagen. In den meisten Fällen wurden vereinzelt Treffergruppen in der Mitte des schon abgebildeten Aggregats gefunden. Man könnte dies so deuten, dass der Kern des Aggregats aus einer anderen Spezies besteht als die Außenbereiche. Dagegen spricht jedoch, dass Aggregate, bei denen die Trefferzahl für beide Wellenlängen etwa gleich hoch war, fast deckungsgleich abgebildet wurden. Wahrscheinlich ist die höhere Trefferzahl in der Mitte des Aggregats auf eine kugelförmige Struktur zurückzuführen. Betrachtet man die Kugel von oben, ist die Dichte in der Mitte am höchsten und somit befinden sich dort auch die meisten potentiellen Bindungsstellen. Die Wahrscheinlichkeit für einen Treffer erhöht sich. Statistisch gesehen wird somit in der dichteren Mitte der Aggregate häufiger ein Fluoreszenzsignal erwartet. Selbst wenn die Gesamtzahl der Treffer eher niedrig angesetzt wurde, um als Aggregat detektiert zu werden, werden wahrscheinlich die meisten Treffer aus der Aggregatmitte stammen.

4.2.2.2 Bei getrennt aggregierten A β -Spezies gibt es keine Co-Lokalisation

Keine Co-Lokalisation wurde detektiert für Aggregate, bei denen A β 1-40 und A β 1-42 getrennt voneinander zur Aggregation gebracht wurden und erst bei der Immobilisierung gemischt wurden. Zur Detektion wurde jeweils ein spezifischer Antikörper gegen A β 1-42 und A β 1-40 verwendet. In diesem Fall kam es zu keiner Co-Lokalisation, auch wenn das Kriterium für die zu einem Aggregat gehörende Trefferzahl sehr niedrig gewählt wurde. Dies bedeutet, dass A β -Aggregate aus verschiedenen A β -Spezies bei getrennter Aggregation auch durch nachträgliches Mischen keine A β -Monomere der jeweils anderen Spezies einbauen.

4.2.2.3 Menschliche AD-Proben bestehen aus A β 1-40 und A β 1-42

dSTORM-Messungen von menschlichen AD-Proben haben ergeben, dass die darin enthaltenen A β -Aggregate aus A β 1-40 und A β 1-42 bestehen. Als Detektionssonden wurde ein spezifischer C-terminaler Antikörper für jede A β -Spezies verwendet. Der Antikörper zur Detektion von A β 1-40-Aggregaten (11A50-B10) wurde mit Alexa 488 markiert. Zur Detektion von A β 1-42-Aggregaten wurde der Antikörper (12F4) mit Alexa 647 markiert. Superaufgelöste Bilder einzelner Aggregate zeigten sowohl bei einer Anregungswellenlänge

von 488 nm als auch bei 647 nm zahlreiche Treffer im selben Probenbereich. Die zugehörigen Kontrollen ergaben keine rekonstruierbaren Strukturen für beide Wellenlängen. Somit scheinen die A β -Aggregate aus menschlichen AD-Proben verschiedene A β -Spezies zu enthalten.

4.3 PAINT und dSTORM im Vergleich

In dieser Arbeit wurden zwei supraauflösende Methoden getestet, mit dem Ziel supraaufgelöste Bilder von immobilisierten A β -Aggregaten anzufertigen. Bei Verwendung der PAINT-Technik konnten keine geeigneten Messbedingungen gefunden werden, um ausreichend viele Daten für eine statistische Analyse der Proben zu sammeln. Unter Anwendung des dSTORM-Prinzips konnten geeignete Messbedingungen gefunden werden und es wurden supraaufgelöste Bilder verschiedener A β -Aggregate bzw. A β -Oligomere angefertigt.

Ein direkter Vergleich beider Methoden ergibt also, dass die PAINT-Technik schwieriger auf ein System anzupassen ist. Der wichtigste Aspekt für eine gelungene Messung ist immer das Finden einer geeigneten Sonde, die eine zur Probe genau passende Affinität aufweist. Würde man die zu analysierende Probe geringfügig ändern, wäre die Wahrscheinlichkeit hoch, dass erneut nach einer geeigneten Detektionssonde gesucht werden muss. Außerdem muss bei PAINT-Messungen immer darauf geachtet werden, dass alle verwendeten Substanzen keine nennenswerte Hintergrundfluoreszenz verursachen. Messungen, die unter Anwendung des dSTORM-Prinzips angefertigt werden, führen schneller zum gewünschten Ergebnis. Dies liegt daran, dass das Blinkverhalten der Detektionssonden über Pufferzusammensetzung, Belichtungszeiten und Laserintensitäten geregelt werden kann. Es handelt sich also um Einflussgrößen, die die Beschaffenheit der Probe entweder gar nicht oder geringfügig beeinflussen und umgekehrt auch nicht von der verwendeten Probe abhängig sind. Außerdem muss bei der Probenvorbereitung nicht so stark auf die Vermeidung von Hintergrundfluoreszenz geachtet werden. Durch den vor jeder Messung stattfindenden Bleichprozess können fast alle störenden Hintergrundsignale beseitigt werden.

Allgemein bieten PAINT-Messungen den Vorteil, dass theoretisch alle Bindungsstellen der Probe während einer Messung von der Detektionssonde erfasst werden können. Die Voraussetzung ist allerdings, dass vorher eine wirklich geeignete Detektionssonde

identifiziert wurde. Durch eine lange Messzeit ist es dann möglich durch statistische Prozesse theoretisch jede Bindungsstelle der Probe zu detektieren. Bei dSTORM-Messungen hingegen besteht eine größere Wahrscheinlichkeit, dass nicht alle Bindungsstellen wiedergegeben werden können. Das liegt daran, dass die Detektionssonden fest an die Probe gebunden werden. Durch räumliche Hinderung der teilweise großen Antikörper und der daran gebundenen Fluorophore kann es passieren, dass einige Bindungsstellen unbesetzt bleiben. Auch durch lange Messzeiten kann dieses Defizit nicht nachgeholt werden, da die Detektionssonden ihre Position über die gesamte Messung beibehalten.

4.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Messungen haben ergeben, dass durch supraauflösende optische Mikroskopiemethoden (insbesondere dSTORM) zusätzliche Informationen über A β -Aggregate erhalten werden können. Es konnte gezeigt werden, dass durch supraaufgelöste Bilder zusätzliche kleine Aggregate sichtbar werden, die vorher im Weitfeldbild nicht zu erkennen waren. Außerdem wurde gezeigt, dass A β -Aggregate aus menschlichen AD-Proben aus A β 1-40 und A β 1-42 bestehen.

Weitere dSTORM-Analysen von immobilisierten A β -Aggregaten sollten eine detaillierte Verteilung von Größe und Form insbesondere der kleinen Aggregate oder Oligomere liefern. Außerdem sollten verschiedene Mischverhältnisse von A β 1-40- und A β 1-42- Peptiden co-aggregiert und analysiert werden.

Weiterhin sollen dSTORM-Messungen bei drei verschiedenen Anregungswellenlängen durchgeführt werden. Hierzu muss zunächst ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff auf seine Eignung für dSTORM-Messungen überprüft werden.

Außerdem sollten verschiedene menschliche AD-Proben mit dSTORM analysiert werden. Dadurch, dass auch schon sehr kleine A β -Aggregate bzw. A β -Oligomere sichtbar werden, sollten vor allem Proben mit einer erwarteten niedrigen A β -Konzentration detailliert analysiert werden. Insbesondere Proben, bei denen im Weitfeldbild keine A β -Aggregate erkannt werden, sollten besonders berücksichtigt werden.

Zusammenfassung

Die Alzheimersche Demenz ist eine bisher unheilbare neurodegenerative Erkrankung. Sie führt zu Gedächtnisverlust, Störungen der motorischen Fähigkeiten, Wesensveränderungen und schließlich zum Tod des Patienten. Im Verlauf der Krankheit reichern sich im Gehirn der Patienten schädliche Stoffwechselprodukte an, die das Nervengewebe irreversibel schädigen. Das Amyloid- β -Peptid ($A\beta$) ist hierbei von zentraler Bedeutung. Durch Aggregation kann es verschiedene lösliche und unlösliche Formen wie Oligomere, Fibrillen oder Plaques bilden. Es wird angenommen, dass die löslichen $A\beta$ -Oligomere die bedeutendste neurotoxische Wirkung zeigen und somit zum krankheitsauslösenden Schritt führen. Eine eindeutige Diagnose der AD ist nur *post mortem* möglich. Eine Diagnose *pre mortem* basiert neben neurologischen und kognitiven Tests auf bildgebenden Verfahren. Ein wesentlicher Nachteil aller bildgebenden Verfahren, bei denen Licht zur Detektion eingesetzt wird, ist die Beugungsbegrenzung. Aufgrund der Beugungsbegrenzung erscheinen alle Objekte, die lateral kleiner als etwa 200 nm sind, als verschmiertes Objekt. Sowohl Größe als auch Form können nicht mehr eindeutig bestimmt werden. Die für AD als krankheitsauslösend angenommenen $A\beta$ -Oligomere können deutlich kleiner als 200 nm sein. Zur detaillierten Untersuchung der $A\beta$ -Oligomere wurden zwei supraauflösende optische Mikroskopiemethoden (PAINT und dSTORM) getestet.

Ein schon existierendes Protokoll zur Immobilisierung und Detektion von $A\beta$ -Aggregaten wurde an die Anforderungen der supraauflösenden Mikroskopie angepasst. Außerdem wurden weitere experimentelle Bedingungen etabliert, die es ermöglichen supraaufgelöste Bilder von $A\beta$ -Aggregaten bzw. $A\beta$ -Oligomeren zu erzeugen.

Es konnten supraaufgelöste Bilder von immobilisierten $A\beta$ -Aggregaten und $A\beta$ -Oligomeren unter Anwendung der dSTORM-Technik hergestellt werden. Im Vergleich zu beugungsbegrenzten Weitfeldbildern konnten nach der supraaufgelösten Rekonstruktion der Bilder deutlich mehr – insbesondere kleine- $A\beta$ -Aggregate bzw. $A\beta$ -Oligomere sichtbar gemacht werden.

Durch zweifarbige dSTORM-Analysen von $A\beta$ -Aggregaten, die mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Antikörpern versehen wurden, konnte eine hohe Spezifität zur Selektion von $A\beta$ -Aggregaten erreicht werden. Es wurde gezeigt, dass co-aggregierte $A\beta$ -Aggregate aus zwei $A\beta$ -Spezies ($A\beta$ 1-40 und $A\beta$ 1-42) immer in beiden Farben detektiert werden können, wenn jede Spezies mit einem unterschiedlich markierten spezifischen Antikörper versehen wurde.

dSTORM-Messungen von menschlichen AD-Proben haben ergeben, dass die darin enthaltenen $A\beta$ -Aggregate aus $A\beta$ 1-40 und $A\beta$ 1-42 aufgebaut sind. Zukünftig sollen Studien zum Mengenverhältnis der verschiedenen $A\beta$ -Spezies in $A\beta$ -Aggregaten angefertigt werden.

Summary

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder which is still incurable. AD leads to memory loss, impairment of motoric ability, change of character and death of the patient. During the course of the disease an enrichment of harmful metabolic products occurs in the brain which leads to irreversible damage of nerve tissue. The amyloid- β -peptide ($A\beta$) plays a crucial role. Aggregation of $A\beta$ leads to the formation of soluble and insoluble forms such as oligomers, fibrils or plaques. Soluble $A\beta$ -oligomers are considered to be the major toxic species and responsible for diseases development. AD can be diagnosed with certainty only *post mortem*. Diagnosis *pre mortem* is based on neurologic and cognitive test and imaging techniques. One major disadvantage of imaging techniques that use light for detection is the diffraction limit. Because of the diffraction limit, objects with a lateral size smaller than 200 nm occur as blurred objects. Size and form of the object can't be determined with certainty. The size of assumed disease-causing $A\beta$ -oligomeres can be smaller than 200 nm. For detailed analysis of $A\beta$ -oligomeres two different super-resolution-optical microscopy-methods (PAINT and dSTORM) were used.

An already existing protocol for immobilization and detection of $A\beta$ -aggregates was adapted to requirements of super-resolution-optical microscopy. Further experimental conditions were established to enable generation of super-resolution images of $A\beta$ -aggregates and $A\beta$ -oligomeres.

It was possible to generate super-resolution images of immobilized $A\beta$ -aggregates and $A\beta$ -oligomeres with dSTORM-technique. In comparison to diffraction-limited widefield-images much more and smaller $A\beta$ -aggregates and $A\beta$ -oligomeres were detected after super-resolved reconstruction of the images.

Two-colour dSTORM-analysis of $A\beta$ -aggregates labeled with different fluorescent antibodies led to a high specificity for selection of $A\beta$ -aggregates. It could be shown that co-aggregated $A\beta$ -aggregates of two $A\beta$ -species ($A\beta$ 1-40 and $A\beta$ 1-42) were always detected in both color-channels if each species was labeled with a specific antibody.

dSTORM-measurements of human AD-samples showed that the contained $A\beta$ -aggregates were constructed of $A\beta$ 1-40 and $A\beta$ 1-42. Future plans are proportion-studies of different $A\beta$ -species in $A\beta$ -aggregates.

Literaturverzeichnis

Abbe, E., (1873). „Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung.“ Arch Mikr Anat., 9:413-418.

Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde," Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-Gerichtliche Medizin 64, 146-148.

Axelrod, D. (2001). "Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology". Traffic, 2(11):764–774.

Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., and Jones, E. (2011). "Alzheimer's disease," Lancet 377, 1019-1031.

Bates, M., Blosser, T. R., and Zhuang, X. (2005). “Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch”. Phys Rev Lett, 94(10):108101.

Benesch, R. E. and Benesch, R. (1953). "Enzymatic removal of oxygen for polarography and related methods". Science, 118(3068):447–448.

Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H. F. (2006). “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution”. Science, 313(5793):1642–1645.

Betzig, E., Trautman, J. K., Harris, T. D., Weiner, J. S., and Kostelak, R. L.(1991). „Breaking the diffraction barrier: optical microscopy on a nanometric scale”. Science, 251(5000):1468–1470.

Betzig, E., Trautman, J. K., Harris, T. D., Weiner, J. S., Kostelak, R. L. (1991). “Breaking the diffraction barrier: optical microscopy on a nanometric scale.” Science, 251(5000):1468-1470.

Birkmann, E., Schafer, O., Weinmann, N., Dumpitak, C., Beekes, M., Jackman, R., Thorne, L., and Riesner, D. (2006). "Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by

fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion," *Biological chemistry* 387, 95-102.

Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., and Zetterberg, H. (2010). "Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease," *Nature reviews. Neurology* 6, 131-144.

Brookmeyer, R., E. Johnson, K. Ziegler-Graham, H.M. Arrighi (2007). "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* 3 (3): 186-91.

De Felice, F. G., D. Wu, M. P. Lambert, S. J. Fernandez, P. T. Velasco, P. N. Lacor, E. H. Bigio, J. Jerecic, P. J. Acton, P. J. Shughrue, E. Chen-Dodson, G. G. Kinney, W. L. Klein (2008). "Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers." *Neurobiol Aging* 29 (9): 1334-47.

Englander, S. W., Calhoun, D. B., and Englander, J. J. (1987). "Biochemistry without oxygen". *Anal Biochem*, 161(2):300–306.

Finder, V. H., and Glockshuber, R. (2007). "Amyloid-beta aggregation," *Neuro-degenerative diseases* 4, 13-27.

Fish, K. N., (2009). " Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy". *Curr. Protoc. Cytom.* 50:12.18.1-12.18.13

Folstein, M. F., Folstein, S. E., and McHugh, P. R. (1975). "'Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician," *Journal of psychiatric research* 12, 189-198.

Förster, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz". *Ann. Phys.*, 2:55–75.

Funke, S. A., Birkmann, E., Henke, F., Gortz, P., Lange-Asschenfeldt, C., Riesner, D., and Willbold, D. (2007). "Single particle detection of A beta aggregates associated with Alzheimer's disease," *Biochemical and biophysical research communications* 364, 902-907.

Funke, S. A., Birkmann, E., Henke, F., Gortz, P., Lange-Asschenfeldt, C., Riesner, D., and Willbold, D. (2008). "An ultrasensitive assay for diagnosis of Alzheimer's disease," *Rejuvenation Res* 11, 315-318.

Gustafsson, M. G. (2000). "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy". *J Microsc*, 198(Pt 2):82–87.

Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide," *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 101-112.

Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B., and et al. (1992). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism," *Nature* 359, 322-325.

Hardy, J. A. (1997). "Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease." *Trends Neurosci.* 20(4):154-9.

Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics," *Science* 297, 353-356.

Heilemann, M., van de Linde, S., Mukherjee, A., and Sauer, M. (2009). „Super-resolution imaging with small organic fluorophores". *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(37):6903–6908.

Heilemann, M., van de Linde, S., Schuttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., and Sauer, M. (2008). "Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes". *Angew Chem Int Ed Engl*, 47(33):6172–6176.

Holleman, A. F. and Wiberg, N. (1995). *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. deGruyter, 101. Auflage.

Jakob-Roetne, R. und H. Jacobson (2009). "Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches." *Angew Chem Int Ed Engl* 48 (17): 3030-59

Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A., and Hell, S. W. (2000). „Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission”. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(15):8206–8210.

Klunk, W. E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D. P., Bergstrom, M., Savitcheva, I., Huang, G. F., Estrada, S., Ausen, B., Debnath, M. L., Barletta, J., Price, J. C., Sandell, J., Lopresti, B. J., Wall, A., Koivisto, P., Antoni, G., Mathis, C. A., and Langstrom, B. (2004). "Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B," *Annals of neurology* 55, 306-319.

Klunk, W. E., Jacob, R. F., and Mason, R. P. (1999). "Quantifying amyloid beta-peptide (A β) aggregation using the Congo red-A β (CR-a β) spectrophotometric assay," *Analytical biochemistry* 266, 66-76.

LaFerla, F. M., K. N. Green, S. Oddo (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* 8 (7): 499-509.

Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Ross, C. A., and Poirier, M. A. (2005). "Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration?," *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 891-898.

Lazo, N. D., Grant, M. A., Condron, M. C., Rigby, A. C., and Teplov, D. B. (2005). "On the nucleation of amyloid beta-protein monomer folding," *Protein science : a publication of the Protein Society* 14, 1581-1596.

Marcus, R. A. und Sutin, N. (1985). "Electron transfers in chemistry and biology". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 811:285–322

Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 4245-4249.

McAnaney, T. B. ; Wei Zeng; Camille F. E. Doe; Nina Bhanji; Stuart Wakelin; David S. Pearson; Paul Abbyad; Xinghua Shi; Steven G. Boxer und Clive R. Bagshaw (2005)."Protonation, Photobleaching, and Photoactivation of Yellow Fluorescent Protein (YFP 10C): A Unifying Mechanism". *Biochemistry*. 44:5510-5524.

Minsky, M. (1957)."Microscopy apparatus". US Patent 3013467.

Mucke L., (2009) "Neuroscience: Alzheimer's disease." *Nature*. 2009 Oct 15;461(7266):895-7

Pawley, J. B. (2006). "Handbook of Biological Confocal Microscopy". Springer, Heidelberg, 3. Auflage

Pitschke, M., Prior, R., Haupt, M., and Riesner, D. (1998). "Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy," *Nature medicine* 4, 832-834.

Querfurth HW, La Ferla FM. (2010). "Alzheimer's disease." *N Engl J Med*. 2010 Jan 28; 362(4):329-44.

Rowe, C. C., and Villemagne, V. L. (2011). "Brain Amyloid Imaging," *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*.

Rust, M. J., Bates, M., and Zhuang, X. (2006). "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm)". *Nat Methods*, 3(10):793–795.

Sauer, M. (2005). "Reversible molecular photoswitches: a key technology for nanoscience and fluorescence imaging". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(27):9433–9434.

Sauer, M., Hofkens, J., and Enderlein, J. (2011). *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: "From Single Molecules to Ensembles: From Ensemble to Single Molecules"*. Wiley.

Selkoe DJ. "Presenilin, β -amyloid precursor protein and the molecular basis of Alzheimer's disease." *Clin Neurosci Res* 2001; 1: 91-103.

Selkoe, D. J. (2007). "Developing preventive therapies for chronic diseases: lessons learned from Alzheimer's disease," *Nutrition reviews* 65, S239-243.

Shannon, C. E. (1949). "Communication in the presence of noise". *Proc Inst Radio Eng*, 37:10–21.

Sharonov A. and R. M. Hochstrasser (2006). "Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes." *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(50): 18911-18916

Sinnecker D., P. Voigt, N. Hellwig und M. Schaefer (2005). "Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins". *Biochemistry*. 44:7085–7094.

Synge, E. H. (1928). "A suggested method for extending the microscopic resolution into the ultramicroscopic region." *Philos Mag J Sci*, 6:356-362.

Synge, E. H. (1928). "A suggested method for extending the microscopic resolution into the ultramicroscopic region". *Philos Mag J Sci*, 6:356–362.

Thompson, R. E., Larson, D. R., and Webb, W. W. (2002). "Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes". *Biophys J*, 82(5):2775–2783.

Tsai, J., J. Grutzendler, K. Duff, W. B. Gan (2004). „Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches.“ *Nat Neurosci* 7 (11): 1181-3.

van de Linde, S., Endesfelder, U., Mukherjee, A., Schuttpelz, M., Wiebusch, G., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2009). „Multicolor photoswitching microscopy for subdiffraction-resolution fluorescence imaging". *Photochem Photobiol Sci*, 8(4):465–469.

van de Linde, S., Wolter, S., and Sauer, M. (2011). "Single-molecule photoswitching and localization". *Aust. J. Chem.* , 64, 503–511

van de Linde, S., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2010). „The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging”. *J Biotechnol*, 149(4):260–266.

Wang, J., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1999). "The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging," *Experimental neurology* 158, 328-337.

Wolter, S., Schuttpelz, M., Tscherepanow, M., van de Linde, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2010). "Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images". *J Microsc*, 237(1):12–22.

Danksagung

Bei Prof. Dr. Dieter Willbold möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit anzufertigen. Ich danke ihm für die motivierenden Gespräche und die Möglichkeit des wissenschaftlichen Austausches auf Konferenzen und bei Weiterbildungen.

Prof. Dr. Kurt Gottmann danke ich für die schnelle und bereitwillige Übernahme zur Erstellung des Zweitgutachtens.

Dr. Susanne Aileen Funke möchte ich für die Unterstützung und die stets guten Ratschläge danken.

Bei Prof. Dr. Claus Seidel, Dr. Stefan Marawske und Stephanie Grabowski bedanke ich mich für die Zusammenarbeit bei den PAINT-Messungen.

Dr. Thomas Gensch und Dr. Johnny Hendriks danke ich für die konstruktive und hilfsbereite Unterstützung.

Ich danke der „Düsseldorfer Gruppe“ und insbesondere Clara Grüning und Prof. Dr. Wolfgang Hoyer für die angenehme und schöne Zeit in Düsseldorf.

Dr. Lei Wang und der gesamten Alzheimer-Gruppe danke ich für die hilfsbereite und konstruktive Zusammenarbeit.

Bei meinen Eltern, Schwiegereltern und Geschwistern bedanke ich mich für die Unterstützung und die aufmunternden Worte. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mir das Gefühl gebt, gemeinsam alles zu schaffen.

Meinem Mann Sebastian gilt ein ganz besonderer Dank. Danke, dass du mich immer wieder motiviert hast und immer ein offenes Ohr für mich hattest. Ohne deine Hilfe hätte ich das nicht geschafft.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und Zitate kenntlich gemacht habe.

Ferner erkläre ich, dass ich in keinem anderen Dissertationsverfahren mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Düsseldorf, den

(Pia Kempis)