Quantifizierung von Strukturen, Kinetik und Dynamik nekrobiologischer Prozesse mit Hilfe bildverarbeitender konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

---

Dissertation

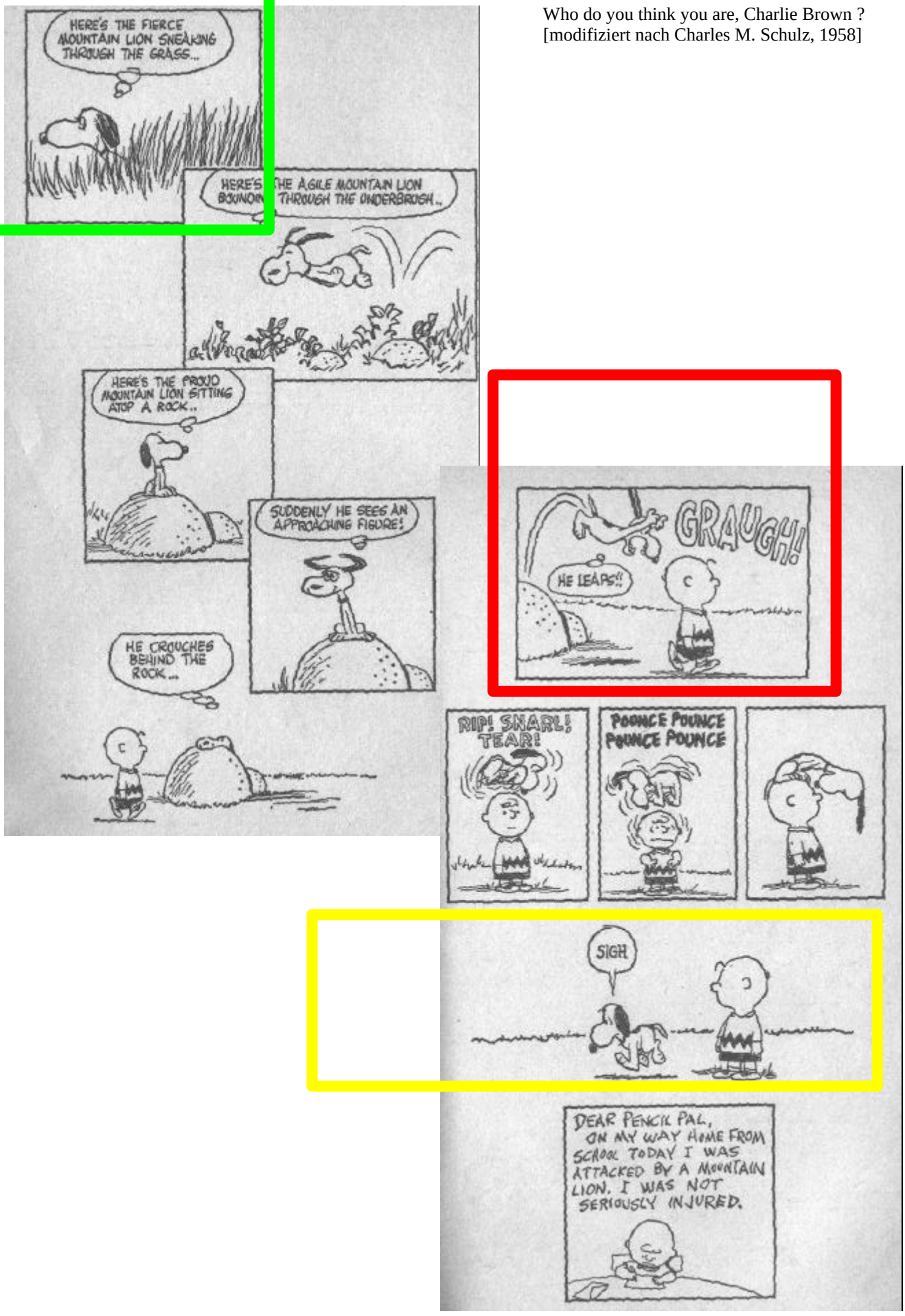
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

dem Fachbereich Physik / Elektrotechnik
der Universität Bremen

vorgelegt
von
Steffen Härtel

im Februar 2000

Who do you think you are, Charlie Brown ?
[modifiziert nach Charles M. Schulz, 1958]



Quantifizierung von Strukturen, Kinetik und Dynamik nekrobiologischer Prozesse mit Hilfe bildverarbeitender konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

---

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

dem Fachbereich Physik / Elektrotechnik
der Universität Bremen

vorgelegt
von
Steffen Härtel

im Februar 2000

ABKÜRZUNGEN

Acinus	*Apoptotic chromatin condesation inducer in the nucleus*
AIF	Apoptosis induzierende Faktoren
AK	Acylketten
AO	*Acridine Orange*
APAF-1	*Apoptosis Activation factor-1*
ATP	Adenosin 5-triphosphat
ATR	Atractylosid
AV	Annexin V
bp	Basenpaare
Cad	Caspase aktivierte Desoxiribonuclease
Caspasen	*Cysteine aspartate-specific proteases*
CCD-Kamera	*Charge Coupled Device*-Kamara
Ced	*Cell death*
CERP	*Cholesterol-Efflux Regulatory Protein*
Ch.	Cholesterin
CHO	*Chinese Hamster Ovary*
CT_x	Cholera-Toxin-B-Untereinheit
C-Werte	Gütekriterium des minimales Abstandes
Cyt c	Cytochrom c
DAPI	*4',6-diamidino-2-phenylindol*
DCVJ	*4- (dicyanovinyl) julolidine*
$DiIC_N$	*1,1´-dioctadecyl-3,3,3´,3´-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate*
DLPC	*1, 2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPH	*1-6-diphenyl-1,3,5,-hexatrien*
DPPC	*1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*
DSC	*Differential Scanning Calorimetry*
EL-4	Lymphoma Lymphoblast, Maus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESR	*Electron Spin Resonance-Spectroscopy*
FC	*Flowcytometry*
FCS	*Fluorescence-Correlations-Spectroscopy*
FITC	Fluorescein
FM 1-43	*N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino)styryl)pyridinium-dibromide*
FR-GPI	GPI verankerter Folat Rezeptor
FR	Folat Rezeptor
FRAP	*Fluorescence Recovery After Photobleaching*
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FR-GPI	GPI verankerter Folat Rezeptor
FTIR	*Fourier Trasform Infrared Spectroscopy*
G-Faktor	Grating-Faktor
GC	Glycokorticoid
GL	Glycolipide
GP	Generalisierte Polarisationen
GPI	Glycophosphatidylinositol
GS	Glycosphingolipiden
H1	DNA-Histon-Komplexe
HA	Haemaglutinin
HCE	*Human Cornea Epithelial*
HDL	*High Density Lipoprotein*
HSP	Hitzeschock Protein
ICE	*Interleukin-1b-Converting Enzyme*
I_{MAX}	Maximalen Fluoreszenzintensität
IPC-81-Zellen	Promyelotische Rattenleukemiezellen
Kb	Kilobasen
KG	Kopfgruppe

L_α	Flüssig-Kristalline-Phase
L_β	Gel-Phase
Laurdan	*6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene*
LEI	Leukozyten-Elastase-Inhibitor
LSC	Laser-Scanning-Cytometer
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LUT	*Look Up Table*
LUV	*Large Unilamellar Vesicles*
MLV	*Multi-Lamellar Vesicles*
NMR	*Nuclear Magnetic Resonance-Spectroscopy*
PC	Phosphatidylcholin
PCA	*Principal Component Analysis*
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	*Propidium Iodide*
PK	Partitionskoeffizienten
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipide
PLF	*N^a-pteroyl-$N^{\hat{I}}$-(4'-fluorescein-thiocarbamoyl)-L-lysin*
PM	Pyrenmethanol
PMA	*Phorbol-12-myristate-13-acetate*
PPCK	Peripheren, Partiellen, Chromatinkondensationen
Prodan	*6-propionyl-2-dimethylamino-naphthalene*
PS	Phosphatidylserin
PT-Pore	*Permeability Transition-Pore*
QFM	*Quantitative Fluorescence Microscopy*
QMM	*Quantitative Morphological Microscopy*
R1F	Ratten-1-Fibroblast
SLM	Schweinelebermikrosomen
SM	Sphingomyelin
SR	*Sensitivity Ratio*
SUV	*Small Unilamellar Vesicles*
SX46	*Saccharomyces cervisiae*
TMA-DPH	*1-(4-Trimethylammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5,-hexatrien*
TMR	*Tetra-Methyl-Rhodamine*
T-Zellen	Thymozyten
(V)LDL	*(Very) Low density lipoprotein*
WGA	*Wheatgerm Agglutinin*
WW	Wechselwirkung
XP	*Xeroderma pigmentosum*
YED	*Yeast-Extract Dextrose Medium*
$\Delta\Psi_M$	Mitochondriales Membranpotentials
λ_{MAX}	Wellenlängen der maximalen Fluoreszenzintensität

DEFINITIONEN

Minkowski Addition: $A \{+\} B = \cup_{\beta \in B} (A + \beta)$
Minkowski Substraktion: $A \{-\} B = \cap_{\beta \in B} (A + \beta)$

ABSTRACT

The discovery of new basic molecular principles regulating cell and tissue homeostasis has changed our comprehension and attitude towards cell death. Especially *apoptosis*, an active and genetically determined form of cell death, has fascinated researchers from distinct disciplines. Disregulation of apoptotic processes is involved in many contemporary diseases for instance cancer, HIV-infection, and Parkinson. The common interest is focused on how *apoptosis*, *mitosis*, *meiosis* and cellular differentiation together regulate *onto*- and *phylogenesis*. New methodological concepts are needed for a better detection and tracing of cellular events on the levels of molecular kinetics, structural morphology, and population dynamics. For this reason, an image and data processing software together with a temperature controlled and gas equilibrated multi-cell-chamber was developed. Special attention was paid to complex, stable, automated segmentation algorithms for the microscopic bright field mode because they are essential for a reliable, successive extraction of morphological and texture dependent parameters. In order to exploit the entire set of information provided by the system, a multi-parameter statistical classification method based on principal axis transformation was applied. It was proven that for statistical classification, fluorescence (laser scanning) microscopes present an alternative to the established method of flow cytometry (FC). The main disadvantages of FC is a very limited access to morphological parameters of cells. When quantitative fluorescence microscopy (QFM) is performed on cells growing under culture conditions, it is possible to trace single cellular events in time and simultaneously monitor the parameter distribution of the entire population. Direct comparison of QFM and FC on nuclear apoptosis revealed FC to be very insensitive in respect to early apoptotic events. FC even mis-quantified the statistical situation of late apoptosis. With QFM instead, the apoptotic situation is judged reliably. Furthermore, OFM opens an approach to apoptotic parameters in adherent celllines, shown for human cornea epithelial (HCE) cells.

Translocation of phosphatidylserine (PS) from the inner to the outer plasma membrane leaflet is presently discussed as a hallmark of apoptosis. The signalling which initialises the process and the translocation mechanism itself are still under investigation. Diffusion or enzymatic transport is suspected. Staurosporine induced PS-translocation was monitored in HCE-cells and in mouse lymphocytes (EL-4) by Annexin V-FITC (AV) fluorescence. QFM could not only reveal the percentage of AV positive and AV negative cells in both cultures, it could also derive that once initiated, PS-translocation in single HCE-cells is completed within less than ½h. This and other observations support non-diffusive PS-translocation.

For toxicological investigations, early apoptotic parameters are essential. QFM detected two very early staurosporine induced effects in HCE- and EL-4-cells. In HCE-cells, a morphologic form of *Karyorrhexis* was discovered as early as 10min after induction. This form of chromatin condensation is probably initiated by the mitochondrial apoptotic inducing factor (AIF), which was recently discovered. Activated caspase-3, which is also discussed to initialise PS-translocation and chromatin condensation could be excluded for both events in HCE-cells. In EL-4-cells, perturbation of cellular migration and the exclusion of small cellular vesicles were detected within minutes after staurosporine induction.

The results presented in this and other scientific publications validate the OFM method as a promising tool for future investigations. The method should work on many cellular events, in which fluorescent or non fluorescent texture or morphological features must be connected with statistical information.

INTHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

1.1 HINTERGRÜNDE UND ZIELE DER ARBEIT 1
1.1.1 ZELLMEMBRANEN UND FLUORESZENZSONDEN 2
1.1.2 DIE BESCHREIBUNG VON ZELLKULTUREN ALS KOMPLEXE SYSTEME 3
1.1.3 DIE KINETIK APOPTOTISCHER PROZESSE 5
1.2 SPRACHE UND GLIEDERUNG DER ARBEIT 6

2. DER ZELLTOD: *APOPTOSIS, NECROSIS, ONCOSIS* 9

2.1 NEKROBIOLOGIE: DIE BIOLOGIE DES TODES 9
2.2 *APOPTOSIS, ONCOSIS* ODER *NECROSIS* ? 10
2.3 *HOMEOSTASIS* 12
2.4 MITOCHONDRIEN 14
2.5 ZELLKERN 16
2.6 PLASMAMEMBRAN 18
2.7 DIE RELEVANZ APOPTOTISCHER PROZESSE IN DER PATHOLOGIE 19

3. WAHRNEHMUNG & BILDVERARBEITUNG IN DER MIKROSKOPIE 21

3.1 DIGITALE MULTIPARAMETER-ANALYSE IN DER BILDGEBENDEN MIKROSKOPIE 21
3.1.1 WAHRNEHMUNG 21
3.1.2 DER ZEITGEMÄSSE MIKROSKOPISCHE BETRACHTER 22
3.1.3 KONSEQUENZEN FÜR DIE BILDGEBENDE UND BILDVERARBEITENDE MIKROSKOPIE 25
3.2 OPTIMALE OBJEKT-SEGMENTIERUNG 31
3.2.1 DAS KONZEPT DER BILD-TRANSFORMATIONEN 31
3.2.2 GÜTEKRITERIEN FÜR EINE AUTOMATISIERTE OPTIMALE SEGMENTIERUNG 32
3.2.3 KONVENTIONELLE METHODEN DER SEGMENTIERUNG UND DIE SKALIERUNGS-INDEX-METHODE 34
3.2.4 INFORMATIONEN AUS DEM PHASENRAUM ? 35
3.2.5 MARKOFFSCHE PROZESSE UND GIBBS-POTENTIALE 36
3.2.6 MODIFIKATION 1: FREIE INTENSITÄTSSKALIERUNG DER SIM 38
3.2.7 MODIFIKATION 2: GEWICHTETE SKALIERUNGS-INDEX-METHODE 39
3.2.8 MODIFIKATION 3: ANISOTROPE SKALIERUNGS-INDEX-METHODE 39

3.3 BEISPIELE OPTIMALER SEGMENTIERUNG 42
3.3.1 AUTOMATISIERTE SUCHE NACH OPTIMALEN TRANSFORMATIONSPARAMETERN 42
3.3.2 VERGLEICHENDE BESTIMMUNGEN ZUR GÜTE OPLTIMALER SEGMENTIERUNG AN DURCHLICHTBILDERN VON ZELLEN: A: LYMPHOZYTEN
B: MELANOMZELLEN
C: EL-4 ZELLEN 44
3.4 PROBLEME BEI DER MIKROSKOPISCHEN BESTIMMUNG LOKALER FLUORESZENZINTENSITÄTEN 47
3.4.1 MÖGLICHE ANWENDUNG EINER OPTIMALEN, AUTOMATISIERTEN SEGMENTIERUNG FÜR *IN SITU* '*FLAT FIELD*'-KORREKTUREN 48
3.5 PARAMETER ZUR CHARAKTERISIERUNG SEGMENTIERTER OBJEKTE 49
3.5.1 DEFINITION DER ZELLRÄNDER UND DIE FREEMAN-KETTENCODIERUNG 49
3.5.2 LÄNGENMESSUNG DER ZELLRÄNDER 49
3.5.3 ZIRKULARITÄT UND GRENZENERGIE 50
3.5.4 INVARIANTE MOMENTE UND EXZENTRIZITÄT 50
3.5.5 INVARIANTE MOMENTE ALS TEXTURPARAMETER 52
3.5.6 DIE HARALICKSCHEN TEXTURMAßE 53
3.6 MULTI-PARAMETER-DATEN-ANALYSE MIT HILFE EINER MODIFIZIERTEN FORM DER HAUPTACHSENTRANSFORMATION 54

4. MEMBRANDYNAMIK & FLUORESZENZ 55

4.1 FLUORESZENZMETHODEN IN DER SPEKTROSKOPIE UND DER MIKROSKOPIE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DYNAMIKRELEVANTER MEMBRANPARAMETER 55
4.1.1 MOTIVATION 55
4.1.2 FLUIDITÄT UND FLUORESZENZ 57
4.1.3 ZEITSKALEN BEI FLUORESZENZERSCHEINUNGEN 58
4.1.4 FUNKTIONALITÄT DER MEMBRANDYNAMIK: *STATUS QUO ?* 59
4.1.4.1 Membrandynamik lebender Objekte: *Was leisten Fluoreszenzmethoden ?* 61
4.1.5 DAS EICHSYSTEM: EIGELB-PC, CHOLESTERIN UND TEMPERATUR 62
4.1.6 SONDEN ZUR BESTIMMUNG DES MEMBRANPARAMETERS 'FLUIDITÄT' 65
4.1.6.1 Rotationsdiffusionssensitive Sonden: DPH, TMA-DPH, Carboxyl-DPH 65
4.1.6.2 Membransonden mit:
a: Umgebungsabhängigem Spektralshift
b: Umgebungsabhängiger Änderung der Quantenausbeute 66
4.1.6.2.1 *Laurdan und Prodan* 66
4.1.6.2.2 *Nile Red* 68
4.1.6.2.3 *DiIC$_N$* 69
4.1.6.2.4 *DCVJ* 71
4.1.6.2.5 *FM 4-64*$^{\hat{O}}$ 72
4.2 EICHUNG FLUIDITÄTSSENSITIVER MEMBRANSONDEN 73
4.2.1 DPH, TMA-DPH, CARBOXYL-DPH 73
4.2.2 LAURDAN 77
4.2.3 NILE RED 77
4.2.4 DIIC$_{18,}$ DIIC$_{16,}$ DIIC$_{12}$ UND FAST-DII 79
4.2.4.1 DiIC$_{18}$ 79

4.2.4.2 $DiIC_{16,}$ $DiIC_{12}$ und FAST-DiI 85
4.2.5 DCVJ 85
4.2.6 FM 4-64® 87
4.2.7 CHOLESTERIN- UND TEMPERATURSENSITIVITÄT DER VERWENDETEN MEMBRANFLUOROPHORE 89
4.3 EIGNUNG DER MEMBRANSONDEN FÜR FLUIDITÄTSMESSUNGEN AN ZELLEN UNTER KULTURBEDINGUNGEN 91
4.3.1 AMPHIPHILE FLUIDITÄTSSONDEN 92
4.3.2 LIPOPHILE FLUIDITÄTSSONDEN 96

5. ANWENDUNGEN AUS DER BILD - VERARBEITENDEN MIKROSKOPIE 99

5.1 VERGLEICHENDE MESSUNGEN RELATIVER FLUORESZENZINTENSITÄTEN DURCH QUANTITATIVE FLUORESZENZMIKROSKOPIE UND FLOWZYTOMETRIE 99
5.1.1 FLOWZYTOMETRIE UND MIKROSKOPIE 99
5.1.2 QUANTIFIZIERUNG APOPTOTISCHER IPC-81-ZELLEN NACH INDUZIERTEM OXIDATIVEN STRESS 101
5.1.3 MESSUNGEN DES RELATIVEN DNA-GEHALTS VON DI- UND TRIPLOIDEN LACHSERYTHROZYTEN 102
5.1.4 SCHLUSSFOLGERUNGEN AUS DEN VERGLEICHENDEN QUANTITATIVEN MESSUNGEN 103
5.2 MÖGLICHKEITEN QUANTITATIVER MORPHOLOGISCHER MIKROSKOPIE IN VERBINDUNG MIT MULTI-PARAMETER-ANALYSEN 104
5.2.1 IDENTIFIZIERUNG UND KLASSIFIZIERUNG DI- UND TRIPLOIDER LACHS-ERYTHROZYTEN DURCH LICHTMIKROSKOPISCHE MULTI-PARAMETER BILDVERARBEITUNG: EINE NEUE METHODE ZUR QUANTIFIZIERUNG VON TRIPLOIDISATIONSRATEN IN *ONCORHYNCHUS MYKISS* **105**
5.3 VON STATISCHEN ZU DYNAMISCHEN ZELLULÄREN PROZESSEN 107
5.4 APOPTOTISCHE PROZESSE IN DER DIGITALEN MIKROSKOPIE 111
5.4.1 DIE EXPOSITION VON PHOSPHATIDYLSERIN AUF DER ÄUßEREN ZELLMEMBRAN ZUR QUANTIFIZIERUNG APOPTOTISCHER PROZESSE 111
5.4.2 KINETIK DER EXPOSITION VON PHOSPHATIDYLSERIN AUF DER ÄUßEREN ZELLMEMBRAN BEI EL-4- UND HCE-ZELLEN 115
5.4.3 CHROMATINKONDENSATION UND NUCLEOSOMALE FRAGMENTIERUNG 120
5.4.3.1 Veränderungen der Chromatinstrukturen in apoptotischen Mäuse T-Zellen 120
5.4.3.2 Veränderungen der Chromatinstrukturen in apoptotischen IPC-81-Zellen 122
5.4.3.3 Veränderungen der Chromatinstrukturen in apoptotischen HCE-Zellen 124
5.4.3.4 Quantifizierung der Chromatinkondensation in apoptotischen HCE-Zellen 127
5.4.4 VERGLEICH DER KINETIK DER APOPTOTISCHEN PROZESSE IN HCE-UND EL-4-ZELLEN 128
5.4.4.1 Chromatinkondensation, Aktivierung der Caspasen und Initiierung der Phosphatidylserin-Translokation 129
5.4.4.2 Frühe Kennzeichen der *Apoptosis*: Migrationsfähigkeit und Abspaltung von Zellvesikeln 130

6. ZUSAMMENFASSUNG 133

7. ANHANG 137

A4. ANHANG ZU KAPITEL 4: MEMBRANDYNAMIK & FLUORESZENZ 137

A4.1 ALLGEMEINE PRÄPARATIONEN 137
A4.1.1 LIPOSOMENPRÄPARATION 137
A4.1.2 LIPIDBESTIMMUNG MIT DEM STEWART-ESSAY 138
A4.1.3 BESTIMMUNG DES LIPOSOMALEN CHOLESTERINANTEILS 139
A4.1.4 PRÄPARATION DER LIPOSOMEN MIT MEMBRANFLUOROPHOREN FÜR SPEKTROMETRISCHE MESSUNGEN 139
A4.1.5 PRÄPARATION VON EL-4 ZELLEN MIT MEMBRANFLUOROPHOREN FÜR MIKROSKOPISCHE MESSUNGEN UNTER KULTURBEDINGUNGEN 140
A4.2 SPEKTREN DER MEMBRANFLUOROPHORE 141

A5. ANHANG ZU KAPITEL 5: BILDVERARBEITENDE MIKROSKOPIE 161

A5.1 MESSUNGEN MIT IPC-81-ZELLEN 161
A5.1.1 ZELLKULTUR UND ZELLZUCHT: IPC-81 161
A5.1.2 APPLIKATION VON H_2O_2 -STRESS 161
A5.1.3 QUANTIFIZIERUNG APOPTOTISCHER ZELLEN MITTELS FLOWZYTOMETRIE UND MITTELS QUANTITATIVER LASER-SCANNING-FLUORESZENZMIKROSKOPIE 162
A5.2 AUSZÜGE AUS HÄRTEL *ET AL.* (1999) 163
A5.2.1 MATERIAL UND METHODEN 163
A5.2.2 EIGENVEKTOREN DER DIPLOIDEN ERYTHROZYTENPOPULATION AUS QUANTITATIVEN MORPHOLOGISCH-MIKROSKOPISCHEN DATEN 165
A5.2.3 KORRELATIONSTABELLE DER FLOWZYTOMETRISCHEN, QUANTITATIVEN FLUORESZENZ-MIKROSKOPISCHEN UND QUANTITATIVEN MORPHOLOGISCH-MIKROSKOPISCHEN DATEN 166
A5.3 VERSUCHE MIT FRISCHEN MÄUSE-T-ZELLEN 167
A5.3.1 PRÄPARATION FRISCHER MÄUSE-T-ZELLEN *EX VIVO* 167
A5.3.2 PRÄPARATION DER MÄUSE - ZELLEN FÜR FLOWZYTOMETRISCHE MESSUNGEN 167
A5.4 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG NEKROBIOLOGISCHER PROZESSE IN HCE-ZELLEN 168

8. LITERATUR 171

1. KAPITEL:

EINLEITUNG

1.1 HINTERGRÜNDE UND ZIELE DER ARBEIT

In den letzten Jahren hat sich in den Naturwissenschaften eine neue Disziplin herausgebildet. Die Nekrobiologie. Sie entstand, da immer mehr Forscher aus den Bereichen der Physik bis hin zur Medizin ihre Aufmerksamkeit auf Formen des physiologischen Zelltods lenkten. Auf die *Apoptosis*, die *Necrosis* und die *Oncosis*.

Das derzeit große Interesse an diesen Prozessen basiert auf der Erkenntnis, daß bestimmte Formen des Zelltods, insbesondere bei der *Apoptosis*, genetisch determiniert sind. Damit kommt dem regulierenden Zelltod der gleiche Stellenwert zu, wie den etablierten, grundlegenden Phänomenen der Zellbiologie: Der *Mitosis*, der *Meiosis* und der Differenzierung. Der Begriff Nekrobiologie symbolisiert gewissermaßen diese Erkenntnis, indem er *Necros* (Tod) und *Bios* (Leben) untrennbar miteinander verknüpft.

Außer dem philosophischen Interesse an der wohl berühmtesten aller Fragen, '*To be or not to be?*', haben nekrobiologische Prozesse vor allem eine aktuelle Relevanz bei der Entwicklung von zukünftigen Strategien in Bereichen der Pathologie. Darunter insbesondere in der Krebsforschung, aber auch in der Immunologie, der Neurologie und der Virologie.

Es ist das gemeinsame Ziel, die komplexen molekulargenetischen Mechanismen so weit zu verstehen, daß pathologisch relevante Fehlfunktionen auf dieser Ebene erkannt und behoben werden

können. Ursachenbehebung und nicht Wirkungsbekämpfung wird das Bestreben zukünftiger Behandlungsmethoden sein.

Physiker sind in diesem Forschungsgebiet meist an der Entwicklung von Meßmethoden beteiligt. Da aber eine Vielzahl zellulärer Prozesse auf physikalischen Gesetzmäßigkeiten beruht, sind Methoden mathematisch-physikalischer Natur, insbesondere bei der Analyse von zellulären Strukturen sowie von kinetischen oder dynamischen Vorgängen, seit langem gefragt. Zum Repertoire der etablierten Biophysik und der Medizinphysik gehören ebenfalls Beschreibungen der Wechselwirkungen zwischen der biologischen Materie und physikalischen Phänomenen wie Schall, elektromagnetische Felder oder Strahlung.

1.1.1 Zellmembranen und Fluoreszenzsonden

Zellmembranen sind ein faszinierendes Paradebeispiel für biophysikalische Prozesse. Sie vereinigen strukturelle, kinetische und dynamische Eigenschaften und sind an allen Austauschvorgängen zwischen ‘toter‘ und ‘lebendiger‘ Materie beteiligt. Sie intermediieren einerseits zwischen den Materieformen, grenzen sie aber gleichzeitig selektiv voneinander ab. Desweiteren senden, empfangen und übersetzen sie biologische Botschaften. Über diese Signale wird die *Homeostasis* von Zellverbänden, von Geweben, Organen und letztlich des gesamten Organismus gesteuert. Sie induzieren entweder die *Mitosis*, die *Meiosis* oder Zell-Differenzierungen, aber auch den Zelltod.

Der Einfluß von Struktur, Kinetik und Dynamik von Zellmembranen auf Austauschprozesse und wichtige Protein gekoppelte Funktionen sind bislang nicht in befriedigendem Maße geklärt. Das gegenwärtig diskutierte Membranmodell versteht die Membran als heterogenen Komplex. Lateral wie transversal zur Membranoberfläche werden Mikrostrukturen mit hochspezialisierten Funktionen eine immer größere Bedeutung zugesprochen. Die derzeit aktuellen Fragen um diese Mikrostrukturen sind grundlegend: Aus welchen molekularen Komponenten bestehen sie ? Welche Kinetik beschreibt die Wechselwirkung zwischen einzelnen Komponenten ? Wieviel Komponenten bilden eine höhere Struktur aus und wie ist die dynamische Beschaffenheit dieser höheren Grundstrukturen gekoppelt mit funktionalen Eigenschaften ?

Eine Methode, die in der Vergangenheit viel zum Verständnis des gegenwärtigen Membranmodells beigetragen hat, ist die Fluoreszenzspektroskopie. Neuerdings werden verstärkt lokal aufgelöste fluoreszenzmikroskopische Ansätze beschrieben. Diese werden den erwähnten Lipidheterogenitäten eher gerecht als der spektrometrische Ansatz. Beide Methoden beruht darauf, daß Photonen absorbierende und emittierende Moleküle, sogenannte Fluorophore, in Membranen eingeschleust werden. Dort treten sie in Wechselwirkung (WW) mit einzelnen Membrankomponenten und verändern, je nach Art der Wechselwirkungen, ihre Frequenzspektren. Die grundlegenden WW-Mechanismen, welche die Elektronenorbitale dieser molekularen Spione beeinflussen, müssen entweder theoretisch aufgeklärt sein, oder mit Hilfe definierter Eichsysteme soweit kalibriert werden, daß eine Interpretation der Signale aus einer unbekannten Umgebung erfolgen kann.

Jeder Membranfluorophor liefert nur Teilinformationen aus dem System. Um das Gesamtsystem angemessen charakterisieren zu können, sind Informationen von verschiedenen Sonden nötig, die auf unterschiedlichen molekularen WW-Mechanismen basierenden. Desweiteren induziert jede Sonde

charakteristische Störungen in ihrer Umgebung. Auch aus diesem Grund ist der parallele Einsatz von verschiedenen Sonden wünschenswert.

Der eher klassische Teil dieser Arbeit beschäftigt sich genau mit diesem Problem. Die Fluoreszenzeigenschaften von ausgewählten Molekülen werden an einem definierten Eichsystem kalibriert und miteinander verglichen. Die charakteristischen Veränderungen der Spektren werden herausgearbeitet und daraus Hypothesen über die zugrunde liegenden dynamischen, molekularen Mechanismen abgeleitet.

Bei der Auswahl der Moleküle stehen neben den allgemeinen Forderungen an einen Membranfluorophor hinsichtlich Photostabilität, Quantenausbeute und Lipophilie, folgende Aspekte im Vordergrund:

1. Die definierte laterale und transversale Komposition von Mikrodomänen bestimmt die Funktion der eingelagerten Proteingruppen. Künstliche Membranen mit diesen Eigenschaften können bislang nicht hergestellt werden. Deshalb sind Messungen direkt am biologischen System durchzuführen und Fluorophore müssen untoxisch sein, um Sekundäreffekte in Zellen zu vermeiden.
2. Es ist das langfristige Ziel, *in vitro* Untersuchungen von Zellen unter optimalen Kulturbedingungen durchzuführen und dabei über den Zeitraum eines Zellzyklus hinweg (~ 24h) dynamikrelevante Fluoreszenzparameter abzufragen. Das Absorptionsspektrum der Fluorophore sollte deshalb nicht im UV-Bereich liegen, da wiederholte UV-Bestrahlung Zellschäden bewirken kann.

Bislang ist kein Fluorophor beschrieben, der sich durch die genannten Eigenschaften ausweist und sensitiv dynamische Informationen aus Lipidmembranen detektiert. Der Suche nach einem idealen Kandidaten bleibt deshalb spannend.

Für die Interpretation fluorimetrischer Messungen an ganzen Zellen unter Kulturbedingungen muß die Verteilung der Sonden zwischen einzelnen Zellen und in den Zellkompartimenten in Betracht gezogen werden. Dieser Aspekt erscheint grundlegend, er wird aber nicht immer in wissenschaftlichen Arbeiten berücksichtigt. Dieser Frage soll für die untersuchten Fluorophore daher ebenfalls nachgegangen werden.

1.1.2 Die Beschreibung von Zellkulturen als Komplexe Systeme

Ein großer Teil dieser Arbeit ist nicht einem klassischen Themengebiet der Biophysik gewidmet. In ihm wird ein experimentell-methodischer Zugang zu einer neueren Disziplin der Biophysik beschrieben. Dieses Gebiet existiert, seitdem auf dem Gebiet der Chaosforschung, der Informationstheorie und der Theorie der Selbstorganisation versucht wird, Methoden zur Beschreibung komplexer Systeme zu entwickeln. Es geht um die allgemeine Frage, wie ein System zu behandeln und zu beschreiben ist, das zu komplex ist, als das man ihm allein durch die Beschreibung einzelner Komponenten gerecht wird. Dessen statistisches Verhalten aber andererseits durch die Eigenschaften der einzelnen Komponenten determiniert ist, und dessen innerer Charakter allein durch die Beschreibung statistischer Größen ebenfalls nicht beleuchtet werden kann. Es handelt sich im weiteren Sinne um Bioinformatik.

Zellkulturen genügen dem hinreichenden Kriterium eines hochkomplexen Systems nach Ebeling *et al.* (1998). Die haben eine *Ontogenese* (Individualgeschichte) und eine *Phylogenese* (Stammesgeschichte). Bislang existiert kein etabliertes experimentelles System, mit dem sich in einer Zellpopulation sowohl individuelle Charakteristiken von Zellen, als auch das statistische Verhalten der Gesamtpopulation gleichzeitig bestimmen und somit miteinander in Bezug bringen ließen.

Eine weit verbreitete Methode zur Untersuchung des statistischen Zustands einer Zellkultur ist die Flowzytometrie. Sie erfaßt zwei rudimentäre morphologische Charakteristiken und biochemische Parameter von bis zu 10^7 einzelnen Zellen. Beliebige biochemische Parameter werden detektiert, sobald sie durch Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar gemacht werden können. Wegen Überschneidungen von Exzitations- und Emissionsspektren von Fluorophoren werden bislang maximal 11 Parameter gleichzeitig bestimmt. Der gravierende Nachteil diese Methode ist, daß sie Zellen einem lethalen Stress aussetzt.

Der Zustand einzelner Zellen wird meist mit der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Sie besitzt den Vorteil der detailgetreuen Abbildung jeder Zelle. Wird erreicht, daß Zellen unter Kulturbedingungen unter dem Mikroskop gehalten werden, so lassen sich Entwicklungstrajektorien von Zellen, Migrationsbewegungen und die Ausbildung von Zellstrukturen auf höheren Ebenen verfolgen. Ein solches mikroskopisches System wird im Verlauf der Arbeit entwickelt und vorgestellt.

Die Fluoreszenzmikroskopie besitzt prinzipiell die gleichen Möglichkeiten fluoreszenzmarkierte zelluläre Parameter zu detektieren, wie die Flowzytometrie. Allerdings muß diese Information erst mit Hilfe bildverarbeitender Routinen aus digitalisierten Bildern gewonnen werden und stammt nicht aus einem einzigen Signalimpuls.

Mehrere Kapitel behandeln die Optimierung bildverarbeitender und statistischer Konzepte die nötig sind, um Zellen automatisiert aus digitalen Durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu segmentieren. Da die Güte einer automatisierten Segmentierung entscheidet, ob ein Zugang zu einer statistisch relevanten Anzahl von Zellen eröffnet werden kann, wird ein allgemein anwendbares Gütekriterium für unterschiedliche Konzepte der Segmentierungen entwickelt. Damit wird die Möglichkeit geschaffen, einen ‘flowzytometrischen Datensatz‘ mit der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie zu emulgieren.

Zwei Konzepte der Segmentierung werden eingehend untersucht und miteinander verglichen:

1. Zum einen ein Konzept, das als Maß für die Komplexität der Umgebung eines (Bild-)Punktes in einem Phasenraum aufgefaßt werden kann. Es wird als Skalierungs Index Methode (SIM) oder als ‘*Crowding Index*’ bezeichnet und ist von recht universellem Charakter.
2. Nicht weniger universell ist ein verwandter Ansatz, der ein Bild zunächst als stochastischen Prozeß auffaßt und nach kausalen Zusammenhängen zwischen den Grauwerten eines jeden einzelnen Pixels und denen seiner Umgebung sucht. Durch die freie Formulierung von Cliquen-Potentialen lassen sich hier mit Hilfe der Gibbs-Verteilung jedem Pixel einer Region eine Wahrscheinlichkeitsdichte zuordnen.

Die Güte einer Segmentierung entscheidet weiter, ob Konzepte aus der mathematischen Morphologie und aus der Texturanalyse verwendet werden können, um alle relevanten Parameter einer Zelle zu erfassen. Die große Zahl der Parameter, die mit Hilfe der mathematischen Morphologie und der Texturanalyse abgeleitet werden können, macht die Verwendung von Redundanzkriterien nötig. Diese müssen repräsentative Parameter aus dem gesamten Parameterraum herausfiltern können.

In Zusammenhang mit diesem Problem wird das Konzept einer gewichteten Karhunen-Loeve-Transformation vorgestellt.

Ein statistisch-individuelles bildverarbeitendes mikroskopisches System läßt sich erfolgreich etablieren. Damit ist der Grundstein für eine verbesserte Erforschung zellulärer Phänomene allgemeiner Natur gelegt. Das Interesse an den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zell-Experimenten ist zweigeteilt:

1. Zum einen interessiert der exemplarische Charakter für die Entwicklung der neuen Methode. Es geht hierbei um die Vergleichbarkeit zwischen dem neuen System und der Flowzytometrie. Es wird insbesondere auf ‘blinden Flecken‘ im methodisch reduzierten flowzytometrischen Parameter-Raum eingegangen. Dabei wird die Flowzytometrie in Einzelfällen nicht nur als unsensitive, sondern sogar als falsifizierende Meßmethode entlarvt.
2. Zum anderen wird der jeweils behandelte zellbiologische Hintergrund in einer Tiefe beleuchtet, daß eine Auseinandersetzung auf dieser Ebene ebenfalls nicht vernachlässigt werden soll. Die meisten Untersuchungen fokussierten sich dabei auf apoptotische Prozesse (s. Kap. 1.1.3.).

Ein weiteres interessantes Thema soll zu Beginn des theoretischen Abschnitts über die Bildverarbeitung am Rande gestreift werden. Es geht um wahrnehmungstheoretische Konzepte. Die Wahrnehmung selbst ist zum Gegenstand von Wissenschaft im besten Sinne geworden. Es ist hilfreich, einen Blick auf das biologische, rezeptive und perzeptive System des Menschen und die bekannten wahrnehmungstheoretischen Ansätze zu werfen. Der Mensch ist einerseits ein ‘Segmentierungs-Ass‘, sein visuelles System ist jedoch auch mit den mannigfaltigsten Tücken behaftet. Diese Eigenschaften müssen bei der Darstellung von Bild- und graphischen Informationen berücksichtigt und wenn möglich korrigiert werden. Von den erkannten Vorteilen des Systems lassen sich unter anderem Lehren für die entwickelten Segmentierungsalgorithmen ziehen.

1.1.3 Die Kinetik apoptotischer Prozesse

Es geht um Mord !! Auftragsmord, oder zumindest um herbeigeführten Selbstmord ! Die Fragen sind, auch auf Zellebene, kriminalistischer Natur: WAS tritt WANN, WO, WIE und WODURCH ein ? Erst im Anschluß daran läßt sich die Frage nach dem Motiv erörtern: WARUM, ... ?

Eine aktuelle Frage der Nekrobiologie, der auch in dieser Arbeit nachgegangen wird, betrifft die Sukzessionen von biochemischen apoptotischen Charakteristiken. Den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, die Aktivierung von latenten Todesproteinen, den Caspasen, die Exposition des Membranlipids Phosphatidylserin (PS) auf die äußere Zellmembran, Chromatinkondensationen, die Abspaltung apoptotischer Körperchen und zellmotorische Bewegungen.

Das entwickelte bildverarbeitende mikroskopische System emulgiert nicht nur flowzytometrische Daten in einfachen, nicht adhärenten Zellsystemen, sondern eröffnet darüber hinaus den Zugang zu statistischen Phänomenen in adhärenten Zellkulturen, die bislang verschlossen waren. Eine solche Zelllinie stammt aus dem menschlichen Auge und soll in Zukunft dafür verwendet werden, toxische Wirkungen von Medikamenten und anderen Substanzen zu testen, um schmerzhafte Tierversuche so weit wie möglich überflüssig zu machen.

Das große Problem dieser Zellinie ist: Sie läßt markante apoptotische Charakteristiken vermissen. Mit Hilfe der bildverarbeitenden Mikroskopie lassen sich jedoch zwei Parameter

zeitaufgelöst verfolgen, die eindeutig einen apoptotischen Zustand anzeigen. PS-Translokationen und eine frühe Chromatinkondensation. Die schnellen Chromatinkondensationen warfen zunächst mehr Fragen als Antworten auf.

Sie entpuppten sich dann aber anhand eines mehrfachen Indizienbeweises recht eindeutig als ein Phänomen, das erst seit kurzem eingehend diskutiert wird.

Ein Hauptinteresse dieser Arbeit gilt der zeitaufgelösten Dynamik einzelner apoptotischer Prozesse. Die Dynamik soll hierbei Hinweise auf mögliche grundlegende Mechanismen liefern. Besonders die frühen apoptotischen Merkmale sind für diagnostische Zwecke höchst interessant. Die noch immer als ‘frühes‘ Ereignis beschriebene PS-Exposition wird nach den Ergebnissen dieser Arbeit in Zukunft als späteres Ereignis bezeichnet werden müssen.

1.2 Sprache und Gliederung der Arbeit

Grundlegende Aspekte dieser Arbeit betreffen die Biophysik, die Bioinformatik, die Zellbiochemie und am Rande die Wahrnehmungspsychologie. Die experimentellen Arbeiten sind am Institut für Biophysik und für Biologie in Bremen, am Institut für Physik und am Institut für Embryologie an der Universität von Valdivia (Chile) sowie an der medizinischen Fakultät von Montevideo (Uruguay) durchgeführt worden. Theoretische, bildverarbeitende und statistische Konzepte sind zum Teil durch eine Kooperation mit dem Max Planck Institut für extraterrestrische Physik im Garching entstanden, sowie in Zusammenarbeit mit drei chilenischen Studenten der Informatik aus Valdivia.

Die Arbeit ist interdisziplinär angelegt. Ein interdisziplinärer Ansatz bietet große Vorteile, verlangt aber auch Kompromisse. Verständigung und Sprache stehen dabei im Zentrum der Schwierigkeiten, die es zu überwinden gilt. Jeder Physiker, der schon einmal versucht hat, einem Biologen oder gar einem Mediziner einen für ihn trivialen Sachverhalt anhand eines Förmelchens zu skizzieren weiß, worum es geht. Andersherum kennt auch jeder Gespräche unter Medizinern. Die Sprache in dieser Arbeit ist daher so gewählt, daß sie nicht zu tief in einen Fachjargon verfällt. Es wurde der Versuch unternommen, Fachbegriffe bildhaft zu beschreiben und immer nur dann zu verwenden, wenn sie von prinzipieller Bedeutung sind. Nötiger mathematischer Formalismus wurde so wenig wie möglich abstrahiert.

Graphische Abbildungen wie bivariate Cytogramme, Fluoreszenzspektren mit mehreren Freiheitsgraden und enzymatische Signalketten sind für fachfremde Betrachter oft verwirrend. Darstellungen und Graphiken wurden deshalb so ausführlich wie möglich beschrieben. Sie enthalten aus der Sicht der jeweiligen Disziplin unter Umständen Grundlagenwissen oder Teile von Interpretationen. Dieses soll aber gerade dem untrainierten Betrachter helfen, die Graphik zu verstehen und das Prinzip der Aussagen nachvollziehen zu können.

Beschreibungen von experimentellen Methoden wurden in den Anhang der Arbeit verbannt. Diese Formen der Darstellung orientieren sich vor allem an denen des Wissenschaftsmagazins *Nature*. Es stellt meist ein Verständnis von Prinzipien in den Vordergrund seiner Artikel und verzichtet auf allzu detaillierte Beschreibungen experimenteller Methoden.

Die Gliederung der Arbeit folgt bewußt nicht der strengen Einteilung in Theorie, Material und Methoden, Ergebnisse, Diskussion und Ausblick. Da auf drei unterschiedliche Themengebiete tiefer, auf eines am Rande eingegangen wird, erschien es zu holperig, 5 mal 3½ Einteilungen vorzunehmen. Gerade in den Schnittmengen der Themengebiete liegen zum Teil die interessantesten Ergebnisse.

Folgende Einteilung wurde vorgenommen:

- In Kapitel 2. werden die *Apoptosis*, die *Oncosis* und die *Necrosis*, gegenübergestellt. Der gegenwärtig publizierte Wissensstand über die molekularen Mechanismen der *Apoptosis* wird zusammengefaßt. Einige Abschnitte konzentrieren sich besonders auf die jüngsten Entdeckungen in Mitochondrien, bei den Caspasen, den Membranveränderungen und den Chromatinkondensationen. Diese Zusammenstellung bildet die Diskussiongrundlage für die durchgeführten apoptotischen Experimente.

- Kapitel 3. behandelt eine wahrnehmungstheoretische Einführung, die Entwicklung des mathematischen Formalismus und erste grundlegende Ergebnisse bildverarbeitender Routinen für das mikroskopische Meßsystem (s. Kap. 1.1.2.).

- Kapitel 4.1. beschreibt das aktuelle Modell zellulärer Membranen und ihrer Mikrostrukturen. Es stellt die derzeitig verwendeten Methoden zur Messung des Parameters Membranfluidität vor und diskutiert die Frage, was etablierte Membransonden leisten. 8 Fluorophore werden in diesem Zusammenhang eingehend vorgestellt. Sie bilden die Basis der weiterführenden Experimente.

  Kapitel 4.2. zeigt die Ergebnisse von ‘Fluiditätseichungen’ der 8 Membransonden an einem definiert fluiden Modellsystem. Es werden die Ergebnisse in Hinsicht auf eine zukünftige Relevanz der jeweiligen Methode für die Messung der Membrandynamik an ungestörten biologischen Systemen diskutiert.

  Kapitel 4.3. stellt erste grundlegende Ergebnisse mit den Fluorophoren aus mikroskopischen Messungen an einem Zellsystem unter Kulturbedingungen vor und diskutiert deren Verhalten unter besonderer Berücksichtigung heterogener Fluorophorverteilungen.

- In Kapitel 5. wird zunächst ein Vergleich des in Kapitel 3. und Kapitel 4. beschriebenen bildverarbeitenden mikroskopischen Meßsystem mit flowzytometrischen Methoden präsentiert. Die Fähigkeit, relative zelluläre Fluoreszenzintensitäten mit dem mikroskopischen System zu quantifizieren wird so überprüft.

  Nach dieser methodischen Absicherung werden u.a. apoptotische Fragestellungen aus Kapitel 2. an Zellkulturen unterschiedlicher Herkunft untersucht. Die abgestimmte apoptotische Kinetik der Prozesse steht dabei ebenso im Vordergrund wie die Suche nach verläßlichen, schnellen Merkmalen für sichere Quantifizierungen von *Apoptosis*.

2. KAPITEL:

DER ZELLTOD:

APOPTOSIS

NECROSIS

ONCOSIS

2.1 NEKROBIOLOGIE: DIE BIOLOGIE DES TODES

In den Naturwissenschaften hat sich erstaunlich spät die Einsicht durchgesetzt, daß eine zufriedenstellende Beschreibung ‘lebendiger’ Prozesse nur dann erfolgen kann, wenn ein annäherndes Verständnis auch jener Prozesse erreicht ist, welche gerade zur Beendigung dessen führen, was wir unter lebendig subsummieren.

Bereits im 19. Jahrhundert wurden charakteristische Veränderungen im zellulären Kernmaterial entdeckt, welche das Absterben von Zellen begleiten [Zamzami & Kroemer 1999]. Die Beobachtungen betrafen primär Kondensationen des Erbmaterials, des Chromatins, und wurden als ‘*Pyknosis*’ bezeichnet.

Lange Zeit ging man davon aus, daß die ‘*Necrosis*‘, ein passiver, degenerativ katabolischer Prozeß als Reaktion auf grobe Stressfaktoren [Kap. 2.2.] die einzige Form des Zelltods sei.

Im Jahre 1971 wurden von Kerr morphologisch auffällige Zellen beschrieben, die aktiv zahlreiche kleine Vesikel abschnürten, stark schrumpften und schließlich desintegrierten. Die daraus abgeleitete Bezeichnung ‘*shrinkage Necrosis*’ wurde ein Jahr später von der Bezeichnung ‘*Apoptosis*‘ abgelöst [Kerr *et al.* 1972].

Die morphologisch charakterisierte Chromatinkondensation fand für lange Zeit wenig Beachtung in der Diskussion um diesen aktiven Prozeß. Erst in den letzten Jahren ziehen pyknotische Erscheinungen wieder verstärkt Aufmerksamkeit auf sich. Die *Pyknosis* dient heute wieder als eine hinreichende Charakterisierung der aktiv gesteuerten, zellulären *Apoptosis*. Meist tritt sie mit einer Fragmentierung des Chromatins, der biochemischen '*Karyorrhexis*', auf.

Abb.2.1.: Nekrobiologie: 'Leben heißt [L/l]eben lernen'. Abbildung aus *Nouveau Recueil D'Ostéologie et de Myologie'*, Jaques Gamelin 1779.

1997 wurde der Begriff Nekrobiologie von Zbigniew Darzynkiewicz *et al.* unter dem Hinweis eingeführt, daß sich dieser Terminus sowohl aus '*Necros*' (Tod) als auch aus '*Bios*' (Leben), also scheinbar Gegensätzlichem, zusammensetzt.

Verwunderung sollte eigentlich nicht darüber entstehen, daß *Bios* und *Necros* in einem Atemzug genannt werden müssen, um jedem für sich annähernd gerecht zu werden. Viel eher ist bemerkenswert, daß sich diese Erkenntnis nicht schon viel früher durchgesetzt hat.

Selbst religiös unmotivierte Menschen sollten schon aus Intuition heraus eben diesem trivial anmutenden Ansatz folgen. Nun ist das mit der Intuition so eine Sache; der Knochenmann aus Abb. 2.1. hat sie, so scheint es.

Unzweifelhaft hat der neue Sammelbegriff seine Berechtigung. In den letzten Jahren lenken immer mehr Forscher aus verschiedensten Disziplinen ihre Aufmerksamkeit verstärkt auf die vielfältigen Prozesse, welche gerade das Ableben von einzelnen Zellen, Geweben, Organen und Organismen bestimmen und steuern.

Es sind dies vor allem biologische und medizinische Fachrichtungen, wie Molekularbiologie, Onkologie, Immunologie, Embryologie und Neurologie, um nur einige zu nennen. Aber auch Biochemiker, Mathematiker, Informatiker und nicht zuletzt Physiker lassen sich vermehrt in den Bannkreis der Nekrobiowissenschaften ziehen.

2.2 *Apoptosis, Oncosis* oder *Necrosis*?

Bevor in den folgenden Kapiteln der gegenwärtig publizierte Wissensstand über wichtige molekulare Mechanismen der *Apoptosis* zusammengefaßt wird, sollen zunächst die drei am häufigsten diskutierten Formen des zellulären Absterbens, die *Apoptosis*, die *Oncosis* und die *Necrosis*, gegenübergestellt werden.

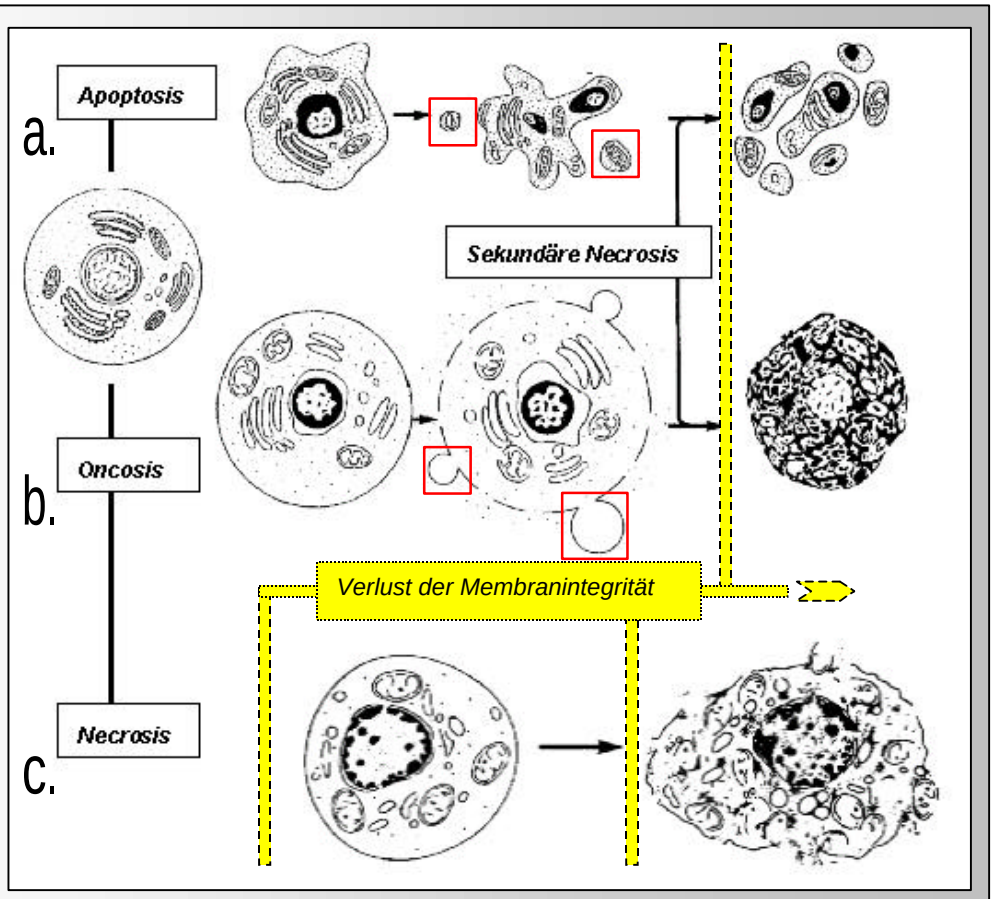


Abb.2.2.: Taxonomie des Zelltodes:

[a]: *Apoptosis*, der zelluläre Selbstmord.

[b]: *Oncosis.*

[c]: *Necrosis,* der Unfalltod.

Modizifiert und zusammengestellt aus Darzynkiewicz *et al.* (1997).

Die modellhafte ***Apoptosis*** unterscheidet sich von der *Oncosis* und der *Necrosis* primär durch anfängliches Schrumpfen der Zelle (*Pyknosis*); oft gefolgt von Desintegrationen in apoptotische Fragmente (*apoptotic bodies*, [a.] rote Quadrate).

Das wohl auffälligste morphologische Merkmal der ***Oncosis*** sind hingegen deutliche Ausstülpungen der Membranen [b.] (rote Quadrate).

Necrosis ist ein passiver, degenerativ katabolischer Prozeß als Reaktion auf grobe Stressfaktoren, die zum generellen '*knock out*' aller steuernden oder umsetzenden Prozesse führen. Daraus resultiert entweder sofort oder sehr bald ein Verlust an Membranintegrität. Ist die Membranintegrität anfänglich noch gewährt, so wird leichtes Anschwellen der Mitochondrien und der gesamten Zelle beobachtet. Intrazelluläre Organellen desintegrieren unkontrolliert.

Sind die anfänglich geregelten zellulären Mechanismen der *Apoptosis* oder der *Oncosis* abgeschlossen oder außer Kontrolle geraten, wird dieser zelluläre Zustand als sekundäre *Necrosis* bezeichnet. Die nachfolgenden Veränderungen sind dann ebenfalls passiver, degenerativ katabolischer Natur.

Viele Argumente wurden in den letzten Jahren ausgetauscht, um die Begriffe *Apoptosis*, *Oncosis*, *Necrosis*, sekundäre *Necrosis*, apoptotische und onkotische *Necrosis*, Schrumpf-*Necrosis*, zellulärer Selbstmord, aktiver oder physiologischer Zelltod, programmierter oder auch präprogrammierter Zelltod voneinander abzugrenzen oder zusammenzufassen [z.B. Darzynkiewicz *et al.* 1997, Godar 1999].

Interessanterweise ist in den letzten Jahren eine Art '*Revival*' der ursprünglich morphologisch erfolgten Charakterisierung der Prozesse in der Nekrobiologie zu beobachten [Bedner *et al.* 1999, Darzynkiewicz *et al.* 1997]. Dieser Trend beruht darauf, daß sich einmal gewonnen geglaubte biochemische Erkenntnisse zum Teil falsifizieren (z.B. *Karyorrhexis*) oder sich diese mehr und mehr diversifizieren [Kap. 2.3. bis Kap. 2.5.].

Eine allgemein anerkannte Taxonomie nekrobiologischer Prozesse, die alle vom Zelltyp und vom Induktor abhängigen Besonderheiten einschließt, existiert bislang nicht. Es kristallisiert sich jedoch immer mehr die in Abb. 2.2. skizzierte Phänomenologie heraus, die sich nach den auffälligsten morphologischen Merkmalen richtet:

- Die ***Apoptosis*** unterscheidet sich von der *Oncosis* und der *Necrosis* primär durch anfängliches Schrumpfen der Zelle (zelluläre *Pyknosis*). Daneben finden verschiedene, definierte Umstrukturierungen auf der Ebene des Chromatins im *Nucleus* statt (vergl. Kap. 2.5.). Oft, aber nicht immer, gefolgt von einer Desintegration der Zelle in apoptotische Fragmente. In Gewebe lösen apoptotische Zellen keine Entzündungen in ihrer Umgebung aus [Abb. 2.2.a., Abb. 4.4., Abb. 4.32.d.].

- Das wohl auffälligste morphologische Merkmal der ***Oncosis*** sind deutliche Ausstülpungen der Membranen und anschwellende Mitochondrien. Bei der *Oncosis* ist das osmotische Gleichgewicht zwischen intrazellulären, extrazellulären und mitochondrialen Kompartimenten gestört. Andere vitale Zellfunktionen bleiben zum Teil erhalten. In Gewebe lösen onkotische Zellen Entzündungen aus, nachdem die Membranen platzen [Darzynkiewicz *et al.* 1997, Abb. 2.2.b., Abb. 4.32.e. & Abb. 4.34.d.].

- ***Necrosis*** ist ein passiver, degenerativ katabolischer Prozeß als Reaktion auf grobe Stressfaktoren, die zum generellen Verlust aller steuernden oder umsetzenden Prozesse führen. Daraus resultiert entweder sofort oder sehr bald ein Verlust an Membranintegrität. Ist die Membranintegrität anfänglich noch gewährt, so wird leichtes Anschwellen der Mitochondrien und der gesamten Zelle beobachtet. Intrazelluläre Organellen desintegrieren unkontrolliert. In Gewebe lösen nekrotische Zellen Entzündungen in ihrer Umgebung aus [Abb. 2.2.c., Abb. 5.8. & Abb. 5.9.].

Wegen der Diversität und dem unzureichenden Verständnis der Prozesse kommt es immer wieder zu (auch veröffentlichten) Miß- oder Fehlinterpretationen. Diese sind meist das Resultat eines zu sorglosen Umgangs mit flowzytometrischen Daten [Darzynkiewicz *et al.* 1997]. Ein Beispiel dafür ist die Klassifizierung apoptotischer Fragmente (*apoptotic bodies*) als ganze Zelle [Abb. 2.2.a.].

Auch die Morphologie liefert sicherlich nicht den goldenen Leitfaden für alle zellulären Eventualitäten. Die in Abb. 2.2. skizzierten Fälle haben ebenfalls nur Modellcharakter und bedürfen im einzelnen der Interpretation. Eine Kombination biochemischer UND morphologischer Ansätze ist nötig, um möglichst verläßliche Aussagen treffen zu können. Ein solcher Ansatz wird in Kapitel 3. beschrieben.

2.3 *HOMEOSTASIS*

Die *Homeostasis* in Zellverbänden ist gewährleistet durch abgestimmtes zelluläres Wachstum, durch gezielte Differenzierung und durch gesteuerte Tötung. Es liegt dabei auf der Hand, daß die zugrunde liegenden Mechanismen von äußert komplexer Natur sein müssen.

Nicht nur die Vielzahl der Ereignisse, die sie kontrollieren, sondern gerade deren unterschiedliche Natur (darunter elektromagnetische Strahlung, Temperatur, reaktive Atome und Moleküle sowie die Bibliothek der Bio-Signalstoffe) kann letztendlich nur von einem vielschichtigen System überwacht werden. Ein großer Durchbruch kann in der Apoptosisforschung aus diesem Grunde nicht erwartet werden. Viel Kleinstarbeit wird hingegen nötig sein, um den gordischen Knoten der *Apoptosis* nicht zu zerschlagen, sondern zu entwirren.

In diesem Zusammenhang wurden in jüngster Zeit ganze Gen-Familien neu entdeckt. Bis 1999 waren etwa 15 sogenannte *Apoptosis*-Promoter-Gene (z.B. Bax, Bad, Bid und Bcl-X_S) sowie *Apoptosis*-Supressor-Gene (z.B. Bcl-2 und Bcl-X_L) beschrieben, die allesamt der Bcl-2-Familie zugeordnet werden [Raff 1998, Bedner *et al.* 1999].

Ein typisches Strukturmerkmal von Mitgliedern der Bcl-2-Familie ist ein ausgeprägter hydrophober Bereich. Durch dieses hydrophobe Wechselwirkungspotential stehen alle zellulären Membransysteme im Verdacht, involviert zu sein. Es gibt es viele Hinweise, daß das doppelte Membransystem der Mitochondrien eine Schlüsselfunktion in apoptotischen Signalkaskaden einnimmt [Bedner *et al.* 1999, Green & Reed 1998].

Eine zweite funktionale Gruppe von Proteinen, deren Mitglieder sich durch hohe Homologien in ihren Aminosäuresequenzen, ihrer Struktur und ihrer Substratspezfität auszeichnen, sind die sogenannten Cystein Proteasen, Aspartasen oder Caspasen (für *cysteine aspartate-specific proteases*).

Seit Anfang der 90er Jahre wurden etwa 40 Caspasen identifiziert. Von einigen Vertretern sind die Strukturformeln aufgeklärt und funktionale Eigenschaften bekannt. Caspasen werden als reaktionsträge Proenzyme exprimiert. Sie sind in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert und zeichnen sich in 3 Bereichen durch Sequenzhomologien aus (s. Abb. 2.3.a. & Thornberry & Lazebnik 1998):

- Eine **Prodomäne** mit geringer Sequenzhomologie am NH_2-Ende der Procaspase.
- Eine **lange** und eine **kurze Untereinheit** mit hoher Sequenzhomologie am COOH-Ende.

Die kurze Prodomäne dient der Identifizierung durch Aktivierungsenzyme und bestimmt wahrscheinlich auch die Lokalisation.

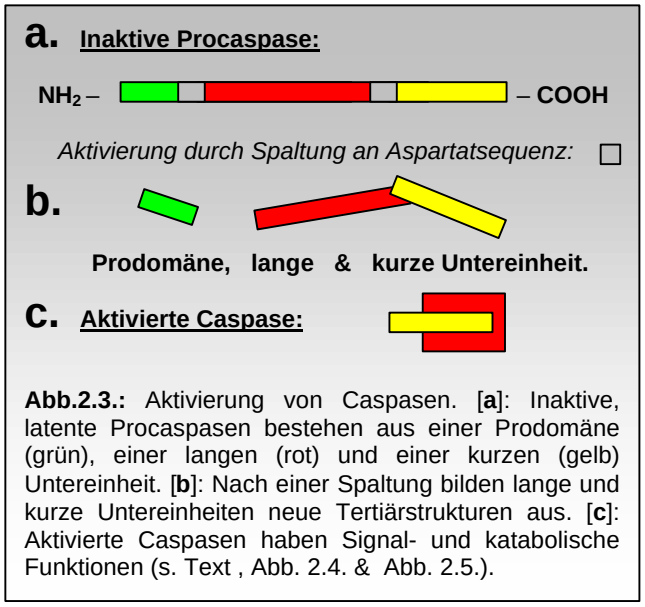


Abb.2.3.: Aktivierung von Caspasen. [**a**]: Inaktive, latente Procaspasen bestehen aus einer Prodomäne (grün), einer langen (rot) und einer kurzen (gelb) Untereinheit. [**b**]: Nach einer Spaltung bilden lange und kurze Untereinheiten neue Tertiärstrukturen aus. [**c**]: Aktivierte Caspasen haben Signal- und katabolische Funktionen (s. Text , Abb. 2.4. & Abb. 2.5.).

Caspasen werden aktiviert durch Spaltungen an zwei Aspartatsequenzen [Abb. 2.3.b.]. Nach der Spaltung bilden die große und die kleine Untereinheit eine neue Tertiärstruktur [Abb. 2.3.c.] mit 2 katalytisch aktiven Regionen (nicht abgebildet). Sie katalysieren effizient und hochspezifisch.

Caspasen lassen sich grob in Effektoren (Caspase-2*, -3, -6, -7, -10*) und Initiatoren (Caspase-2*, -9, -8, -10*) einteilen. Initiierende Spaltungen erfolgen meist durch andere Proteine, teilweise sind multiple Cofaktoren nötig [Li *et al.* 1997]. Sie können aber auch autokatalytisch, durch Agglomerationen von Caspasen zu hohen Dichten, herbeigeführt werden [Ashkenazi & Dixit 1998].

Die Entdeckungen wichtiger regulativer Proteine wie der Bcl-2-Familie und den Caspasen geben Anlaß zur Hoffnung, endlich primär steuernde Elemente in der Krebstherapie entwickeln zu können. Bislang werden (mehr oder weniger elegant) Primärschäden in betroffenen Geweben induziert (z.B.

durch Strahlung, Hyperthermie oder Chemotherapie). Mit den bekannten Nebeneffekten lösen diese erst sekundär und recht unspezifisch *Apoptosis* aus.

Defekte der apoptotischen Regulationsmechanismen sind bereits in der Mehrzahl von Krebsarten nachgewiesen. Allein die Mutation des Gens p53 ist bei über 50% aller Krebsarten vertreten (siehe unten & Kap. 5.3.).

Im Verlauf der Evolution haben sich die wichtigen Steuerungsmechanismen der zellulären Homeostasis gut konserviert:

- Das 1000 Zellen große 'Hauswürmchen' der Genforscher mit dem schönen Namen *Caenorhabditis elegans* besitzt unter anderem das dem Bcl-2 sequenzhomologe Gen Ced-9 (Ced für '*abnormal cell death*'). Zusätzlich exprimiert es Ced-3, ein Analogon zu dem in Säugerzellen exprimierten Enzym Caspase 1 (früher 'ICE' für '*Interleukin-1b-converting enzyme*'), welches entzündungregulierende Funktionen erfüllt. Wird das menschliche Bcl-2-Gen in *C. elegans* eingebracht, kann es dort die Wirkung von Ced-9 sogar substituieren [Adams & Cory 1998].
- Auch Hefezellen dienen als gutes Modellsystem, um menschliche Zellzyklusmechanismen besser zu verstehen. So besitzen Zellen des Stammes *Saccharomyces cervisiae* (SX46) beispielsweise das den Zellzyklus steuernde Gen Rad-9 [Nunes & Gelós 1995]. Dieses ist verwandt mit dem wichtigen menschlichen Zellzyklus-Gen p53 (s. Kap. 5.3.). Versuche mit Rad-9-mutierten Hefezellen können helfen, p53-regulierte Reparaturmechanismen nach induzierten DNA-Schäden besser zu verstehen.

2.4 MITOCHONDRIEN

Mitochondrien bilden, nachdem sie vor etwa $2 \cdot 10^9$ Jahren eine symbiotische Lebensgemeinschaft mit einem Vorfahren der Lila-Bakterien eingegangen sind, auch heute noch ein in vieler Hinsicht unverstandenes, faszinierendes zelluläres Organell. Sie stellen die Versorgung von Zellen mit Energie in Form von Adenosin-Triphosphat (ATP) sicher. Das dazu nötige komplexe Enzymsystem ist strukturiert in den inneren Membranen der Mitochondrien eingebettet. Die Mechanismen der oxidativen Phosphorilierung gehörten zu einen der ersten, die in der molekularen Zellbiologie aufgeklärt wurden.

Nun ist gerade ein wichtiger Bestandteil der Atmungskette, das Cytochrom c (Cyt c), an der Aktivierung von *Apoptosis* auslösenden Mechanismen beteiligt [García-Ruiz *et al.* 1997, Green & Reed 1998]. Empfängt ein Mitochondrion Todessignale, oder wird es beschädigt, so kommt es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_M$), zum Erliegen der ATP-Produktion und zur Freisetzung von Cyt c (s. unten & Abb. 2.4.].

Im Cytosol formt Cyt c mit dem cytoplasmatischen Gerüst ('*scaffold*')-Protein Apaf-1 einen aktiven Komplex, welcher Procaspase-9 spaltet und damit aktiviert. Caspase-9 aktiviert ihrerseits Caspase-3 und diese den Enzymfaktor Cad (Caspase Aktivierte Desoxiribonuclease, Abb. 2.5.).

Als Endonuclease bewirkt Cad eine Spaltung der DNA in oligonucleosomale Fragmente (s. Kap. 2.5., Earnshaw 1999, Susin *et al.* 1999, Zamzami & Kroemer 1999). Die oligonucleosomale DNA-Fragmentierung ist ein häufig zu beobachtendes und spätes Ereignis in apoptotischen Kaskaden. Dabei wird Chromatin an den Verbindungen zwischen den Nucleosomen (den Histon-DNA-Komplexen) gespalten und in Fragmente mit einer Basislänge von 180-200bp (Basenpaare) zerlegt.

Im Zwischenraum der mitochondrialen Doppelmembranen wurden bereits viele steuernde Proteine der apoptotischen Kaskade lokalisiert (Promoter wie Suppressoren):

Unter ihnen sind Vertreter der Bcl-2-Familie, die Procaspasen -2, -3 und -9 und der *Apoptosis* induzierende Faktor AIF (Susin *et al.* 1999, Abb. 2.4.). William Earnshaw (1999) charakterisiert die Mitochondrien in diesem Zusammenhang passend als zellulären Giftschrank.

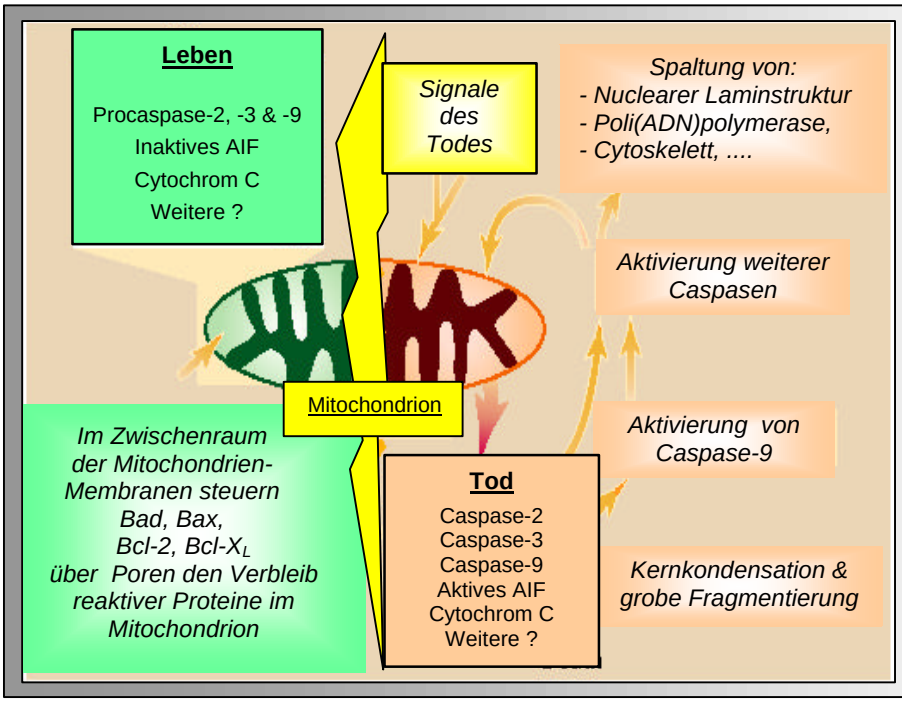


Abb.2.4.: Die zentrale Rolle der Mitochondrien bei der *Apoptosis* (nach Earnshaw 1999).

Im Zwischenraum der beiden Membransysteme regulieren Vertreter der Bcl-2-Familie (pro-apoptotische Proteine, z.B. Bax und Bad, sowie antiapoptotische, z.B. Bcl-2 und Bcl-X_L,) den Verbleib apoptotischer Agitatoren (den *Apoptosis* induzierende Faktor AIF, Cyt c & Procaspasen). Diese werden freigesetzt, wenn Todessignale empfangen werden und lösen verschiedene apoptotische Prozesse aus, welche sich auch rückverstärken [Susin *et al.* 1999]. AIF translokiert nach Freisetzung direkt in den *Nucl*eus. Dort bewirkt AIF Chromatinkondensationen und grobe DNA - Fragmentierung.

AIF, Cyt c, Procaspasen und weitere Proteine werden durch PT-Membranporen (‘*Permeability Transition Pore*’ oder ‘*Megachannel*’) aus den Mitochondrien freigesetzt. PT-Poren reichen vom Cytosol bis in den Innenraum der Mitochondrien.

Sie dienen der Regulierung von Ca^{2+}-, pH- und Potentialgradienten sowie dem osmotischen Gleichgewicht. Neben dieser Multifunktionalität kommt es im Verlauf der apoptotischen Kaskaden zu einer irreversiblen Öffnung der PT-Pore.

Die Regulierung der PT-Poren erfolgt vermutlich durch das Gleichgewicht zwischen dem proapoptotischen Bax und den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-X_L [Bedner *et al.* 1999]. Die Öffnung induziert den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_M$) und setzt Cyt c, AIF und Procaspasen aus dem Intermembranraum ins Cytosol frei.

Das Flavoprotein AIF scheint wie Cyt c primär Elektronen-Akzeptor/-Donator Funktionen zu besitzen. Im Gegensatz zu Cyt c translokiert AIF jedoch direkt in den Zellkern. Dort bewirkt es Kondensationen des Chromatins und induziert darüber hinaus DNA-Fragmentierungen. Diese Fragmente sind weit größer (≥ 50kb), als die von Cad produzierten Oligonucleosome (s. Kap. 2.5.).

AIF induziert in einem Rückkopplungs-Effekt außerdem Zusammenbrüche des Membranpotentials in noch intakten Mitochondrien und verstärkt so die beschriebenen Folgen (s. Abb. 2.5.).

2.5 ZELLKERN

'...DNA is dangerous stuff' [Wyllie 1998]

Nachdem bereits im 19. Jahrhundert charakteristische Veränderungen in zellulärem Kernmaterial beobachtet und beschrieben wurden, die das Absterben von Zellen begleiten, wurde erst im Jahre 1976 internucleosomale DNA-Fragmentierungen von Miroslav Skalka entdeckt [Skalka *et al.* 1976]. Diese olegonucleosomale Fraktionierung der DNA diente ab 1980 für lange Zeit als hinreichendes und nötiges Kennzeichen von *Apoptotis* [Wyllie 1980].

Seit etwa zwei Jahren differenziert sich das Wissen über die Prozesse, die zu Chromatinkondensation und -fragmentierung führen, immer weiter (s. Abb. 2.5., Zamzami & Kroemer 1999, Sahara *et al.* 1999, Bedner *et al.* 1999). Der morphologische Charakter der Kernkondensationen und die Art der Fragmentierungen hängen von dem jeweiligen Zelltyp und dem Induktor ab. Sie laufen abhängig oder unabhängig voneinander, hintereinander oder nebeneinander ab. Ein geschlossenes Bild der Ereignisse existiert bislang nicht.

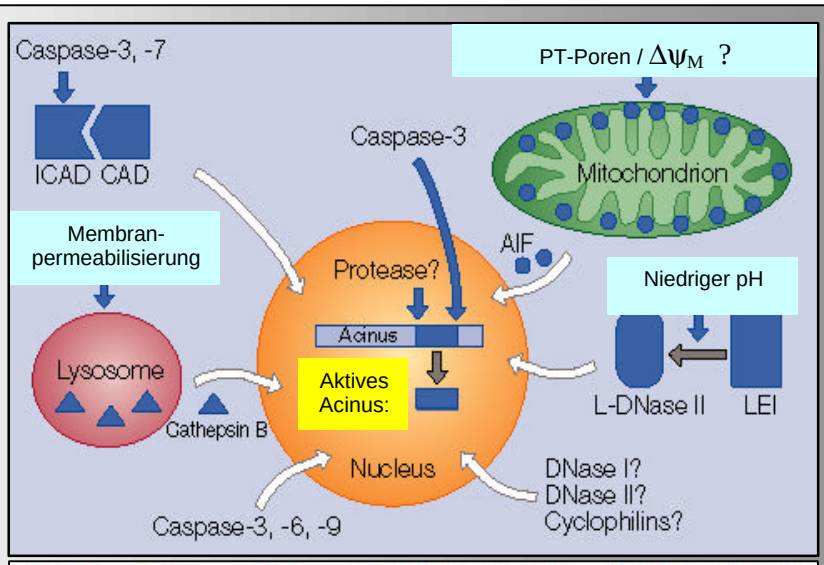
Die wichtigsten bekannten Mechanismen der DNA - Fragmentierung sind (vergl. Abb. 2.5.):

A. **Caspase-3** und **-7** aktivieren einen cytosolischen DNase-Komplex [Icad/Cad] durch Spaltung. **Cad** translokiert dann in den Nucleus und spaltet mit dem Cofaktor '*high-mobility-group2*'-Proteinen die DNA-Histon-Komplexe (H1) in Fragmente der Länge von ~200bp. Die Expression von Cad ist zelltypspezifisch [Mukae *et al.* 1998, Zamzami & Kroemer 1999, Enari *et al.* 1998].

B. **Acinus** ('*apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus*') wird durch Caspase-3 aktiviert und induziert Chromatinkondensationen. Der morphologische Charakter dieser

Abb.2.5.: Apoptotische Effektoren und ihre Wirkung auf den Zellkern, modifiziert aus Zamzami & Kroemer (1999).

In den letzten beiden Jahren sind eine Vielzahl apoptotischer Effektoren entdeckt worden, welche durch unterschiedliche Signale gesteuert werden. Induzierte Chromatinkondensation ist dabei von Chromatinfragmentierung zu unterscheiden. So zeigt Acinus alle morphologischen Merkmale einer Fragmentierung (*Karyorrhexis*), ohne Spaltungen auszulösen. Cathepsin B bewirkt lediglich periphere Chromatinkondensationen, obwohl Oligonucleotide gemessen werden.



	Acinus	CAD	AIF	L-DNase II	Cath B	DNase I	DNase II
Charakter der Chromatinkondensation: →	Karyorrhexis	Karyorrhexis	Peripheral	Pyknosis	Peripheral	Pyknosis	Pyknosis
Charakter der Chromatinfragmentierung: →	None	Oligos	≥60 kb	Oligos	Oligos	Oligos	≥60 kb

Kondensationen kann bislang nicht von Kondensationen unterschieden werden, wie sie bislang immer in Zusammenhang mit biochemischer *Karyorrhexis* beobachtet wurden. DNA-Fragmentierungen werden von Acinus jedoch nicht ausgelöst [Sahara *et al.* 1999, Abb. 2.5. & Abb. 2.6.].

C. Caspase 6 spaltet Laminstrukturen und zerstört so die inneren Proteinfilamente des Nucleus [Thornberry & Lazebnik 1998, Liu *et al.* 1998b].

D. AIF induziert eine periphere Chromatinkondensation in Verbindung mit grober DNA-Fragmentierung (~50kb, Susin *et al.* 1999). Die durch AIF induzierte Kondensation und Fragmentierung ist nicht von Caspasen abhängig. Das Protein wird direkt aus den Mitochondrien freigesetzt und schädigt rückkoppelnd weitere Mitochondrien. Die Morphologie AIF-induzierter peripherer Chromatinkondensationen ist in Abb. 5.19. dargestellt.

E. L-DNase II ensteht bei niedrigen pH-Werten aus dem Leukozyten-Elastase-Inhibitor (LEI) - Protein. Es bewirkt Kern-*Pyknosis* (Schrumpfung und homogene Kondensation des Kerns) und oligonucleosomale DNA-Fragmentierung [Torrigila *et al.* 1998].

F. Cathepsin B wird vermutlich aus Lysosomen apoptotischer Zellen freigesetzt. Es bewirkt periphere Chromatinkondensation und Oligonucleotide [Vankompernolle *et al.* 1998].

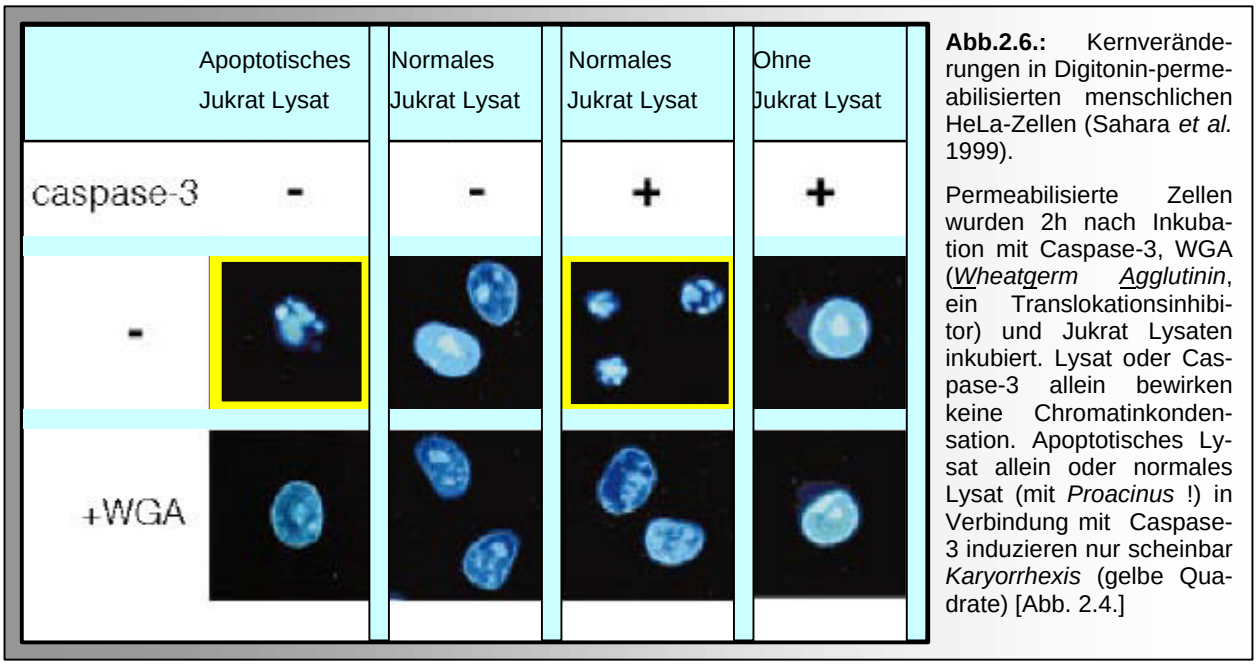


Abb.2.6.: Kernveränderungen in Digitonin-permeabilisierten menschlichen HeLa-Zellen (Sahara *et al.* 1999).

Permeabilisierte Zellen wurden 2h nach Inkubation mit Caspase-3, WGA (*Wheatgerm Agglutinin*, ein Translokationsinhibitor) und Jukrat Lysaten inkubiert. Lysat oder Caspase-3 allein bewirken keine Chromatinkondensation. Apoptotisches Lysat allein oder normales Lysat (mit *Proacinus* !) in Verbindung mit Caspase-3 induzieren nur scheinbar *Karyorrhexis* (gelbe Quadrate) [Abb. 2.4.]

Die Frage, die sich anhand der vielfältigen, neu gewonnenen Erkenntnisse aufdrängt, ist:

Warum existieren so viele unterschiedliche Mechanismen der Chromatinkondensation und der Fragmentierung? Wyllie (1998) versucht eine Erklärung mit dem Argument: '*...DNA is dangerous stuff*'. Es existiert von diesem 'gefährlichen Zeug' (evolutionsbedingt) in jeder Zelle eine ganze Menge.

Würde man das Erbmaterial nur einer Zelle isolieren, die DNA-Wicklungen entwirren und aneinanderfügen, so wäre die Schnur immerhin so lang, daß sie sich fast jeder von uns 2 mal um den (eingezogenen) Bauch wickeln könnte (ca. 1.5m).

Vermutlich ist es gerade die große Menge an DNA-Material in eukariontischen Zellen, die eine sequenzspezifische Erkennung eindringender viraler DNA-Sequenzen unmöglich macht. Wird das gesamte Genmaterial vernichtet, so verhindert dies recht sicher virale Verbreitung. Multiple Mechanismen sind dabei besser als ein einziger.

Auch das 'Verpackungsargument' wird immer wieder angeführt: Zerhexeltes DNA-Material läßt sich einfach besser in die sogenannten apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*) verpacken, und es ist außerdem für umliegende Zellen gefahrlos zu entsorgen.

Die Argumente lassen erkennen: Im Kern, so hat es den Anschein, bleibt noch einiges aufzuarbeiten.

2.6 PLASMAMEMBRAN

Die apoptotische Welt wird nun wieder etwas einfacher, wenn auch nicht ganz einfach. Plasmamembranen lebender Zellen zeichnen sich durch eine stark ausgeprägte asymmetrische Verteilung der verschiedenen Phospholipide auf der cytoplasmatischen und der extrazellulären Membranhälfte aus (siehe auch Kap. 4., Kap. 5.4.2. und Bretscher 1972).

Cholinhaltige Phospholipide, wie Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM), sind dabei auf der äußeren Membranhälfte zu finden. Aminophospholipide, wie Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS), befinden sich hingegen auf der cytoplasmatischen Hälfte. (Diese Lipidverteilung wurde zuerst in Membranen von Erythrozyten festgestellt [Op den Kamp 1979] und stellte sich später als universelles Prinzip heraus [Devaux 1991].)

Die Lipidasymmetrie wird vermutlich durch lipidselektive Flippasen oder Translokasen aufrecht gehalten [Diaz & Schroit 1996]. Für Aminophospholipide konnte ein solcher Mechanismus auch bereits nachgewiesen werden. Zuerst in Erythrozyten [Seigneuret & Devaux 1984] und später in einer Reihe weiterer Zelltypen [Zachowski *et al.* 1987, Martin & Pagano 1987]. Zachowski *et al.* (1989) und Connor *et al.* (1992) vermuten, daß ein Mg^{2+}/ATP-abhängiges Protein, das '*Chromaffin Granulus'*, an der Translokation der Aminophospholipide beteiligt ist. Vollständig ist die Wirkungsweise dieser Proteine jedoch noch nicht aufgeklärt [Van Engeland *et al.* 1998].

Auch für Phospholipide wurden Translokasen nachgewiesen ['*Review*' in Van Engeland *et al.* 1998, Gottesman & Pastan 1993].

Für die Charakterisierung apoptotischer Vorgänge ist besonders PS von Interesse. Denn: Der Verlust der Membranasymmetrie wird als frühes und, was noch viel wichtiger ist, nahezu ubiquitäres Merkmal apoptotischer Prozesse gehandelt [Van Engeland *et al.* 1998, Martin *et al.* 1995].

Seit langem ist bekannt, daß die Exposition von PS von der inneren auf die äußere Membranhälfte Koagulationsprozesse steuert, indem es Thrombozytenaggregationen bewirkt [Bevers *et al.* 1993]. PS-Exposition tritt auch [Connor *et al.* 1992] bei der Entsorgung seneszenter Erythrozyten auf [Chancerelle *et al.* 1994]. 1992 publizierten Fadok *et al.* die PS-Exposition apoptotischer Lymphozyten als Erkennungsmerkmal für makrophagische Prozesse [Abb. 4.2.].

Gegenwärtig existieren zwei Hypothesen, welche die molekularen Mechanismen der noch weitgehend ungeklärten, schnellen PS-Exposition betreffen:

1. Es existieren sogenannte enzymatische ‘Scramblasen’. Diese wurden für Trombozyten und Erythrozyten bereits nachgewiesen [Diaz & Schroit 1996, Zwaal & Schroit 1997]. Scramblasen exponieren aktiv PS von der inneren auf die äußere Membranhälfte und symmetrisieren die gesamte Membran. 1995 wurde von Verhoven *et al.* die Aktivierung einer Scramblase in Lymphozyten gezeigt.
2. Eine Caspasen-gesteuerte Spaltung von Fodrin (ein dem erythrozytischen Spektrin verwandtes Strukturelement) löst PS-Verankerung. Diese fixieren PS normalerweise auf der inneren Membranseite [Vanags *et al.* 1996]. Nach dieser Hypothese wären Prozesse, durch die PS auf die äußere Membranhälfte translokiert, rein diffusiver Natur.

Hypothese 2 scheint sehr unwahrscheinlich, da Diffusionsprozesse für Lipide zwischen Membranhälften im allgemeinen sehr langsam sind (Größenordnung: Stunden bis Tage). Allein der Membranbestandteil Cholesterin bildet hier eine Ausnahme. Unter Umständen ist die Spaltung eines PS-verankernden cytoplasmatischen Strukturelements jedoch für die Aktivierung von Scramblasen von Bedeutung.

Außerdem: Zellen besitzen bereits Lipid- (sogar PS -) spezifische Membrantransportproteine (s.o.). Auch für Cholesterin wurde das Transmembrantransportprotein CERP (*cholesterol-efflux regulatory protein*,) entdeckt, welches die Entsorgung von freien Cholesterinen und Phospholipiden aus Zellen über HDL (*high density lipoprotein*) in die Leber regelt [Scott 1999]. Es ist demnach nur ein kleiner Schritt hin zur Entwicklung von (durch Caspase?) aktivierbaren PS-Translokatoren. Der evolutionäre Vorteil hingegen scheint gewaltig, da die Erkennung und Entsorgung von durch Viren, durch Bakterien, oder durch Mutationen geschädigte Zellen möglichst schnell erfolgen muß.

Van Engeland *et al.* (1998) geben den Zeitpunkt beginnender PS-Exposition nach erfolgtem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_M$) (vergl. Kap. 2.4.) an. Eine PS-Exposition tritt jedoch auf, bevor erste Anzeichen von Umstrukturierungen von Laminastrukturen in Zellkernen oder Chromatinkondensationen sichtbar werden. Auch Cytoskelettveränderungen (vergl. Kap. 2.5.) sind zeitlich später angesiedelt.

PS-Exposition wäre demnach das erste sichtbare Zeichen aktivierter Caspasen oder anderer mitochondrialer Effektoren. Die Frage ist noch abschließend zu klären.

2.7 Die Relevanz apoptotischer Prozesse in der Pathologie

Die Apoptosisforschung ‘boomt’. Bei jeder aufkommenden Welle allgemeiner Begeisterung drängen sich unweigerlich Gedanken auf, die prüfend hinterfragen, ob die zugrunde liegenden Erscheinungen von nachhaltiger Bedeutung sind oder es sich lediglich um Modephänomene handelt.

Eine ‘Kurzlebigkeit’ der Todesforschung ist nicht zu erwarten. Denn frei nach dem Motto ‘*You name it, it’s got it*’ wächst kontinuierlich die Liste der Pathologien, in welche apoptotische Mechanismen zumindest sekundär involviert sind [Raff 1998]:

- Bei Herzinfarkt oder Gehirnschlag sterben Zellen auf verschiedenen Zeitskalen. Dies deutet auf unterschiedliche Mechanismen hin [Barinaga 1998].
- Bei Virus-Infektionen können spezialisierte virale Proteine die befallene Wirtszellen ‘künstlich’ am Leben halten. Dabei verhindern Virusproteine den Zelltod durch Bindung an zelluläre ‘Selbstmord- oder Todesproteine’, den Caspasen [Kap. 2.3.], um die eigene Replikation zu gewährleisten. Bei HIV-1-Infektionen wird hingegen der Tod von T-Lymphozyten gezielt induziert [Meyaard *et al.* 1992].
- Bei neurodegenerativen Krankheiten, wie Parkinson oder Alzheimer, scheint das diffizile Gleichgewicht zwischen Wachstums- und Todessignalen in den betroffenen Nervenzellen gestört. Die Zellen sterben ab, obwohl sie noch gebraucht werden.
- Bei *Drosophila melanogaster* (die Hausfliege der Genwissenschaften) konnten Davidson & Steller (1998) an retinal degenerativen Mutanten bereits genprogrammierte Erblindungen verhindern. Sie schleusten den bacuviralen Überlebensfaktor p35 (*Cell Survival Factor*) gezielt in Mutanten ein. p35 inhibiert ein breites Spektrum von Caspasen und verhinderten auf diese Weise das Absterben der ansonst todgeweihten Retinazellen.
- Bei vielen Tumorzellen ist das regulative Gleichgewicht gerade andersherum gestört. Wichtige Überlebensfaktoren (z.B. Bcl-2) werden überexprimiert [Adams & Cory 1998] und Gene, über welche der Zelltod initiiert wird (z.B. p53) sind inaktiv [Polyak *et al.* 1997].

Doch nicht nur in der Pathologie sind apoptotische Prozesse von wesentlicher Bedeutung:

- Die lymphozytische Immunabwehr verläuft über 2 verschiedene Prozesse:

1. Lymphozyten sektretieren Perforine und Granzym B. Dabei lagern sich Perforine in Transmembrankanäle betroffener Zellen ein und ermöglichen so dem Granzym B, die schützende Zellmembran zu passieren. Im Cytoplasma spaltet Granzym B dann Procaspasen, wodurch diese aktiviert werden und apoptotische Signalkaskaden auslösen [Atkinson & Bleackley 1995].
2. Lymphozyten exprimieren Fas-Liganden. Diese binden an Fas-Rezeptoren betroffener Zellen und induzieren deren Aggregation zu Rezeptor-Klustern [Nagata & Goldstein, 1995] (siehe in diesem Zusammenhang auch Abb. 4.3.). Über ein Adaptorprotein binden diese ihrerseits Procaspase-8. Procaspase-8 spaltet und aktiviert sich in agglomerierter Form gegenseitig und initiiert eine apoptotische Kaskade [Ashkenazi & Dixit 1998].

   Nach Raff (1998) können gestreßte Zellen durch zeitgleiche Fas- und Fas-Liganden-Expression auf ihren Plasmamembranen auch selbst ihre Inaktivierung initiieren.

- Innerhalb unseres (normal funktionierenden) Immunsystems werden ständig Lymphozyten und Neutrophile durch gezielte interzelluläre Induktion von *Apoptosis* selektiert und differenziert.
- Während der Embryogenese spielt die gezielte Tötung einzelner Zellen oder ganzer Zellverbände eine wesentliche Rolle [Ellis *et al.* 1991].

Die erwähnten Beispiele lassen erahnen, wie wichtig ein genaues Verständnis der stattfindenden nekrobiologischen Prozesse ist. Die genaue Kenntnis der involvierten Gene und Mechanismen würde endlich einen Ansatz für die Entwicklung regulativer Therapien und Behandlungsstrategien bieten.

Die allgemein geweckte Neugier hat demnach ihre volle Berechtigung.

3. KAPITEL:

WAHRNEHMUNG & BILDVERARBEITUNG IN DER MIKROSKOPIE

3.1 DIGITALE MULTIPARAMETER - ANALYSE IN DER BILDGEBENDEN MIKROSKOPIE

Es ist gar nicht selbstverständlich, daß wir die Welt so sehen, wie wir sie sehen.
[Irvin Rock, 1985]

3.1.1 WAHRNEHMUNG

'*Die Wahrnehmung steht zwar am Anfang jeder Naturwissenschaft und bildet die Grundlage jedweder Beobachtung, aber als Forschungsobjekt hat sie weit weniger Neugier und Interesse geweckt als die traditionellen Wissenschaftszweige*'. So beginnt der bekannte Wahrnehmungspsychologe Prof. Irvin Rock sein Buch 'Wahrnehmung: Vom visuellen Reiz zum Sehen' [Rock 1985].

Lange Zeit hielt die Menschheit ihre Sinneswahrnehmungen und Empfindungen für die unmittelbare Wiedergabe der physikalischen Wirklichkeit (sprich Realität). Am Ende des zweiten Jahrtausends christlicher Zeitrechnung fühlen sich 'aufgeklärte' Menschen dieser als '*naiven Realismus*' bezeichneten Betrachtungsweise enthoben. Sie zwinkern sich lächelnd zu, wenn da noch jemand unken sollte, er habe soeben Realität 'geschmeckt' und legen ihm nahe, er habe da wohl im besten Falle einem 'wirklichkeitsgetreuen Eindruck' gehabt.

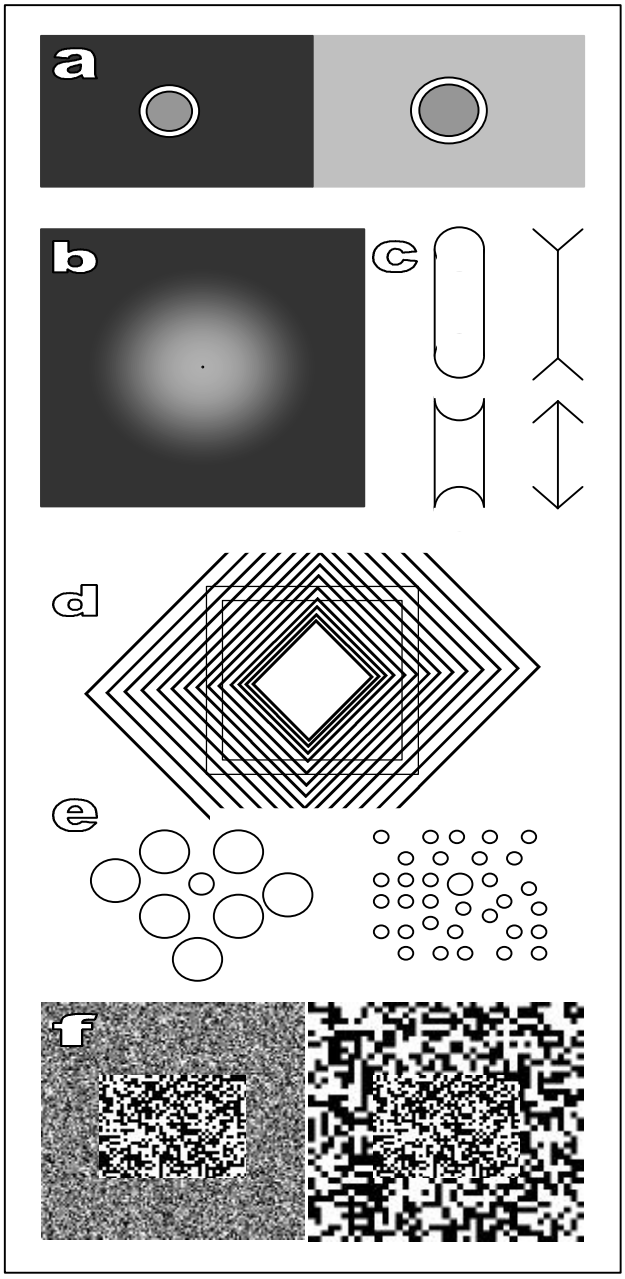


Abb.3.1.: Beispiele optischer Täuschungen: [**a**]: *Helligkeitskonstanz* (beide inneren Kreise haben gleiche Grauwerte) , *Größenkonstanz* (der äußere linke und der innere rechte Kreis sind gleich groß), und *blinder Fleck* (in ca. 10cm Entfernung interpoliert das rechte Auge den rechten Kreis vollständig, wenn man sich auf den linken Kreis konzentriert). [**b**]: *Sakkadische Augenbewegungen* (Fokussiert man mit einem Auge den Punkt in der Mitte des Kreises, so verschwindet der Helligkeitskontrast vollständig). [**c**]: *Müller-Lyer-Täuschung* (die oberen senkrechten Geraden erscheinen länger als die unteren). [**d**]: *Winkeltäuschung* (das Quadrat ist ein Quadrat). [**e**]: *Größenwahrnehmung im Kontext* (der große Kreis rechts erscheint größer, als der 'kleine' Kreis links). [**f**]: *Texturwahrnehmung im Kontext* (die linke innere Textur erscheint im Vergleich zur rechten gröber strukturiert).

Der wahrnehmungstheoretisch Geleuterte kann dies auch bald einsehen. Er sollte seine frisch geweckte Neugierde jedoch im Zaum halten und keine allzu präzise Frage nach dem WARUM stellen.

Er würde unter Umständen eine wilde Diskussion unter Physiologen, Psychologen, Psychophysikern, Systemtheoretikern, den 'Fuzzianern' und sonstigen Berufenen in Sachen Wahrnehmung vom Zaun brechen, welcher er mit Sicherheit nicht auf Anhieb würde folgen können.

Die Wahrnehmung selbst ist zum Gegenstand von Wissenschaft im besten Sinne geworden [Rock 1985, Lehmann *et al.* 1997, Hauske 1994, Tizhoosh 1998, Gonzales & Woods 1990].

3.1.2 Der zeitgemässe mikroskopische Betrachter:

Einen wirklichkeitsgetreuen Eindruck zu erlangen, ist also das zeitgemäße Ziel des mikroskopischen Betrachters.

Jedoch: selbst wenn ein ideales Mikroskop zur Verfügung stände, so ist unser eigenes rezeptives (Information aufnehmendes und vorverarbeitendes) und unser perzeptives (Information im Sinne der Psychologie verarbeitendes) System mit den mannigfaltigsten Tücken behaftet. Die Nomenklatur folgt Lehmann *et al.* 1997.

Wir sind uns heute einer Fülle alters-, erfahrungs-, befindlichkeits- sowie soziokulturell- bedingter optischer Täuschungen bewußt [Abb. 3.1. & 3.2.].

Es kursieren unterschiedlich erfolgreiche wahrnehmungstheoretische Konzepte, deren Hauptströmungen die Gestaltstheorie, die Reiz- und Systemtheorie sowie der von Rock (1985) propagierte kognitive Ansatz bilden [Lehmann *et al.* 1997, Hauske 1994].

Um die Frage zu klären, welche Konsequenzen oder welchen praktischen Nutzen wir für die Bildverarbeitung mikroskopischer Aufnahmen aus den Erkenntnissen ziehen können, erscheint es zunächst sinnvoll, die bekannten Täuschungen in Problemklassen einzuteilen.

Die einzelnen wahrnehmungstheoretischen Konzepte eignen sich dabei nicht unbedingt als Schlüsselkriterium, da zuweil mehrere Ansätze das gleiche Täuschungsphänomen schlüssig beschreiben können. So führt Hauske in seinem Buch exemplarisch auf, daß zur Erklärung der bekannten Müller-Lyer-Täuschung [Abb. 3.1.c.] nicht nur orientierungsselektive Zellen im Cortex [Coren & Girguss 1978] oder örtliche Tiefpassfilterungen [Deubel & Hauske 1998] angeführt werden können (beides sind Kanaleigenschaften und somit Bestandteil systemtheoretischer Interpretationen).

Es können ebensogut kognitive Modelle, wie räumlich perspektivische Interpretationen [Gregory 1970] oder die Verwendung von Hopfield-Netzen [Ventouras *et al.* 1992], zum Erfolg führen.

Sinnvoller für die gezielte Entwicklung bildverarbeitungs- und darstellungstechnischer Lösungsstrategien ist es, den vermutlichen Ort der Entstehung einer optischen Täuschung als Klassifikationsmerkmal heranzuziehen.

Mit Hilfe der angesammelten Kenntnisse über die lokalen Funktionsweisen des visuellen Komplexes [Abb. 3.3.] können so mögliche Lösungswege strukturell eingegrenzt werden:

- Die ersten Inkohärenzen entstehen bereits im retinalen, rein rezeptiven Teil unseres visuellen Systems [Abb. 3.3.a.&b.].:

  Zu nennen sind chromatische Aberrationen, der blinde Fleck, der exponentielle Abfall der Sehschärfe radialsymmetrisch zur *Fovea* oder inhomogene dynamisch-lokale Eigenschaften der photonensensiblen Zapfen und Stäbchen. Diese Phänomene entziehen sich prinzipiell unserem bewußten Einflußbereich.

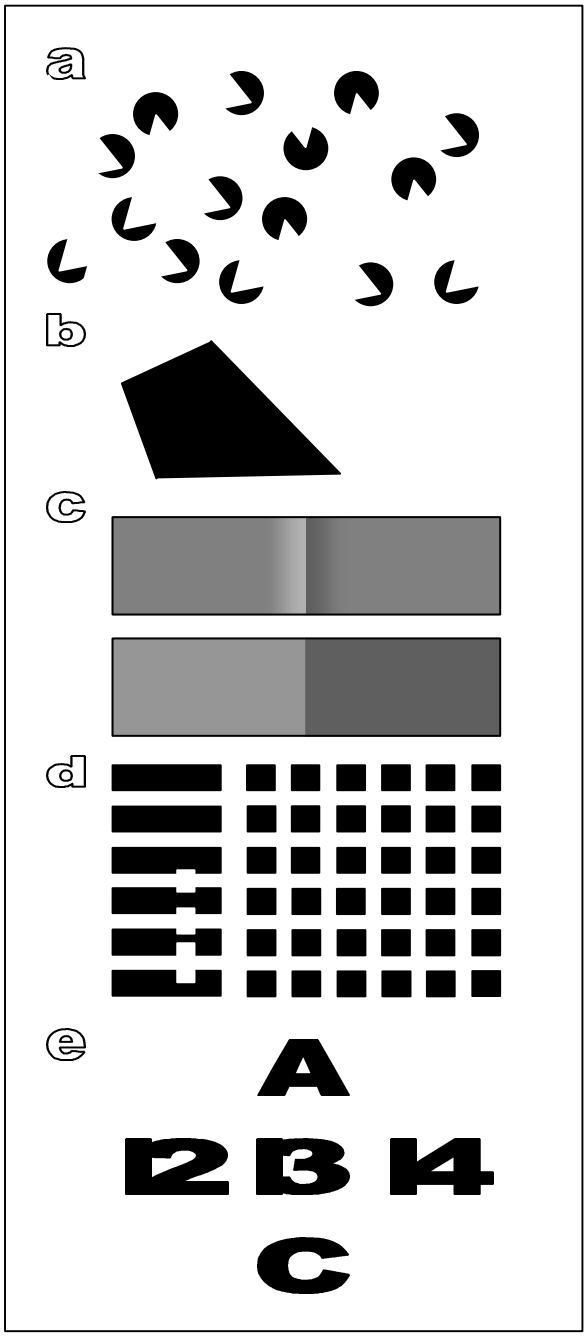


Abb.3.2.: [**a**]: Das *Kaniza Dreieck.* Hat man durch imaginative Ergänzung das Dreieck einmal gefunden, so kann man es nur schwer wieder ‘wegdenken’. [**b**]: Das scheinbar unregelmäßige Viereck ist ein Drachen. Form und Organisation werden von der Orientierung des Bildes auf der Netzhaut beeinflußt. [**c**]: *Mach*- und *Craik-O’Brien*-Effekt. ‘Überschwinger’ an der Helligkeitsstufe im unteren Rechteck verstärken den Kanteneffekt. Simulierte Überschwinger (oberes Rechteck) lassen Regionen unterschiedlich hell erscheinen. [**d**]: *Herrmanngitter.* Die scheinbaren Verdunkelungen an den Kreuzpunkten lassen sich ebenfalls mit Mach- verwandten Bandpaßeinschwingungsvorgängen erklären. Aber auch ein einfaches rezeptives Feld simuliert das Phänomen zufriedenstellend. [**e**]: Ein ‘B’ oder eine ‘13’ werden kontextbezogen wahrgenommen, nie aber eine ‘**B**reizehn’.

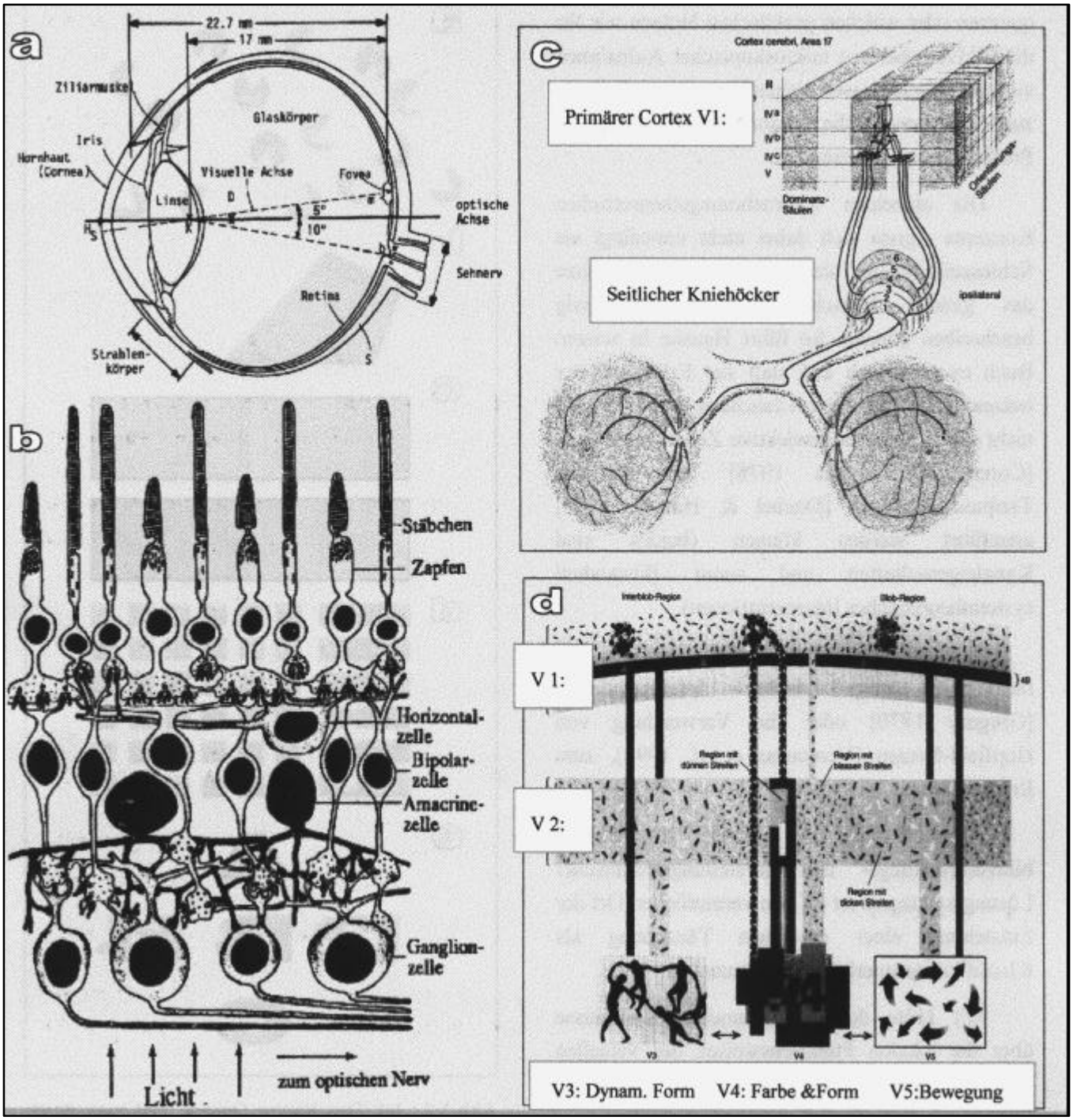


Abb.3.3.: Schematische Darstellung des menschlichen Sehapparates. [**a**]: Horizontalquerschnitt des menschlichen Auges. [**b**]: Retina: Vom Reiz zum optischen Nerv. Es existieren helligkeitssensitive Stäbchen und 3 Typen von farbsensitiven Zapfen: Absorption von Rot/Gelborange bei 580nm, Grün/Grüngelb bei 545nm und Blau bei 420nm. Das Häufigkeitsverhältnis ist 10:10:1, die relative Empfindlichkeit 10:10:1. Das Verhältnis Zapfen zu Stäbchen beträgt 1:20. Zapfen und Stäbchen wandeln einfallende Photonen über die photochemische Spaltung von Rhodopsin in Retinol und Opsin in einen chemoelektrischen Reiz um. Horizontal- und Bipolarzellen vernetzen und verschalten die photosensitiven Zellen zu ersten rezeptiven Feldern. Nach weiterer Vernetzung in den Amacrinzellen und Ganglionzellen werden die Signale nahe der *Fovea centralis* oder *Macula* (dem Punkt schärfsten Sehens) in den *nervus opticus* (Sehnerv) weitergeleitet. [**c**]: Der Weg des *nervus opticus* zum primären *Cortex* (Sehrinde / V1). Die Signale werden über die seitlichen Kniehöcker geleitet. Der seitliche Kniehöcker besteht aus vernetzten Schichten farb-, kontrast- und bewegungsempfindlicher rezeptiver Felder. Von ihm aus werden u.a. die Akkomodation (Scharfstellen des Bildes mit Hilfe von Änderungen der Linsenkrümmung durch die Ziliarmuskulatur), die sakkadischen Augenbewegungen (siehe Text) und weitere blickmotorische Bewegungen gesteuert. [**d**]: Kopplungen zwischen dem primären und dem sekundären *Cortex* (V1 und V2) sowie den untereinander gekoppelten bewegungs-, farb- und formsensitiven Komplexen V3, V4 und V5. Nach heutigem Wissen existiert kein übergeordnetes Zentrum, in welchem die Teilaspekte zu einem Gesamtbild integriert würden. [Abbildungen zusammengestellt aus Lehmann *et al.* 1997].

- Eine weitere Klasse von Täuschungen kann nach der photochemischen Umwandlung einfallender Photonen in Nervenimpulse bis zum Eintreffen der Reize im primären visuellen *Cortex* (*Area striata* oder V1) entstehen. Retinale Horizontal-, Bipolar- und Ganglionzellen vernetzen bereits primäre Impulse zu ersten rezeptiven Feldern.

  Ebenfalls weitgehend unserem bewußten Zugriff entzogen sind die sakkadischen Augenbewegungen [Abb. 3.1.b. & 3.2.c./d.] sowie Querverschaltungen der Sehimpulse in den seitlichen Kniehöckern (*corpora geniculata laterale*) [Abb. 3.3.c.].

- Sinnestäuschungen rein perzeptiver Natur entstehen im primären und sekundären visuellen *Cortex* (den Sortierarealen V1 und V2, Abb. 3.3.c./d.), in den parallel geschalteten Verarbeitungsregionen V3 -V5 (zuständig für Bewegung, Farbe und dynamischen Formen, Abb. 3.3.d.) und wahrscheinlich darüber hinaus.

  Als wichtige perzeptive Phänomene seien zunächst die imaginären Ergänzungen aufgeführt: Hat man in Abb. 3.2.a. das Dreieck einmal entdeckt, so kann man es später nur schwer wieder ‘wegdenken’. Das Wahrnehmungssystem ‘erfindet’ Konturen und läßt das Dreieck insgesamt sogar heller erscheinen als den Hintergrund.

  Des weiteren seien genannt die Figur-, Grund- oder Binnengliederungen sowie kontextbezogene Verknüpfungen [Abb. 3.1.e./f. & 3.2.e.]. Bei den rein perzeptiven Täuschungen scheint eine Einflußnahme auf gefälschte Wahrnehmung durch Nachdenken, Training oder Konzentration am ehesten möglich.

Es soll an dieser Stelle noch einmal betont werden, daß durch die in diesem Kapitel aufgeführte exemplarische Auswahl an optischen Täuschungen und den schematischen Darstellungen des menschlichen Sehapparates auf keinen Fall beabsichtigt war, eine Einführung in auch nur eines der beiden Themengebiete zu geben.

Wichtige Aspekte der Wahrnehmung, wie Farb- und Tiefenphänomene, wurden völlig unberücksichtigt gelassen, und die Darstellungen beschränkten sich auf zweidimensionale Phänomene mit variierenden Grauwerten.

Vermittelt werden sollte lediglich ein Eindruck für die hohe Komplexität des reduzierten zweidimensionalen, helligkeitsempfindlichen visuellen Systems, da die in dieser Arbeit zur Sprache kommenden Bildmatritzen ebenfalls durch (diskrete) Grauwerte an den Orten (x,y) ($I(x,y) \in \mathbb{R}$) charakterisiert sind.

Die Konsequenzen für die bildgebende und bildverarbeitende Mikroskopie an zellulären Systemen sollen im folgenden zusammengefaßt werden.

3.1.3 Konsequenzen für die bildgebende und bildverarbeitende Fluoreszenzmikroskopie

Durch Berücksichtigung allgemeiner Rahmenprinzipien der Gestalttheorie, wie dem Prägnanz- oder dem Konstanzkonzept und den ihm untergeordneten Gestaltungsgesetzen, lassen sich viele mehrdeutige Situationen vermeiden und Unsicherheiten eingrenzen.

Durch geeignete Darstellungen der zu betrachtenden Objekte können dem Forscher oder Diagnostiker konzentrationsintensive Arbeitsschritte abgenommen werden, welche teils bewußt, teils unbewußt in seinem visuellen System ablaufen. Das so gewonnene Potential beugt entweder

Ermüdungserscheinungen und Fehlurteilen vor, oder aber es kann für weitergehende Beobachtungen genutzt werden.

1. Konsequenz: *Die Schwierigkeit, perzeptive Merkmale zu definieren.*

Für die wissenschaftliche Beschreibung zellulärer Prozesse ist es notwendig, sich auf standardisierte Merkmale zu einigen. Gerade wenn es um visuelle Parameter geht, ist der menschliche Beobachter ein nur schlecht zu standardisierender Perzipient.

Werden **morphologische**, **chromatische** oder **texturbezogene** Merkmale von Objekten diskutiert, greifen Diskussionsteilnehmer nur allzu schnell zu Beschreibungen wie ‘irgendwie heller, grüner, kondensierter, ausgestülpter,...’.

Fast kapriolenartige Beschreibungen [Lehmann *et al.* 1997] finden sich selbst in modernen Pathologiebüchern [Riede & Schäfer 1993]: Die Rede ist von kopfsteinpflasterartigem Schleimhautrelief, zwiebelschalenartigen Schichtungen der Subintima, von Bauernwurstmilzen, Sägeblattaspekt des Darmepithels oder von Honigwabenlungen.

Bei der ‘naiven’ Beschreibung optischer Eindrücke kommt es demzufolge nicht selten zu sehr unterschiedlichen Auffassungen über ein und dasselbe Objekt oder einen dynamischen Vorgang. Widerspruch liegt in der Luft, und jeder für sich hat das sichere Gefühl, er schaue richtig.

Die Tatsache, daß sich ansonsten als integer einzuschätzende Personen über bestimmte visuelle Eindrücke heftig zu streiten wissen,, legt es nahe, sich auf einheitliche, mathematisch definierte und somit reproduzierbare Textur- und Morphologiemerkmale zu einigen.

Es existieren verschiedenen Konzepte, sich diesem Problem zu nähern:

- **Strukturelle Texturkonzepte**. Hierbei können mit sogenannten Textonen (Texturprimitive oder auch Texel) und anordnenden Funktionen gewünschte Texturen exakt beschrieben und synthetisiert werden.
- Das **statistische Texturkonzept** nährt sich hingegen aus einem Satz statistischer Parameter, welche aus den lokalen Bildeigenschaften extrahiert werden. Die ‘Rücksynthese’ ist demzufolge nicht exakt, sondern beschreibend, aber generell anwendbar. Dieses Konzept wurde in dieser Arbeit verfolgt (s. Haralicksche Texturmaße [Haralick 1979] & intensitätsabhängige Momente in Tab. 3.1.). Da die untersuchten Objekte (meist einzelne Zellen) eine eingeschränkte Anzahl von Pixeln abdecken, war die Definition von Texturprimitiven schwierig bis unmöglich. Trotzdem könnten in Zukunft auch strukturelle Ansätze in einigen Fällen interessante Merkmale liefern.
- **Semantische Texturkonzepte**. Diese spannen einen Merkmalsraum anhand perzeptiver Maße, wie Gerichtetheit, Periodizität oder Komplexität, auf. Sie lassen sich kaum standardisieren [Rao & Lohse 1993].
- **Morphologische Konzepte** können als reduzierter Spezialfall der Texturkonzepte mit der Intensität $\mathbf{I}(x,y) = 1$ (konstant) betrachtet werden. Für sie gelten ebenfalls die oben angestellten Überlegungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tab. 3.1. zusammengestellten Parameter programmiert und verwendet. Sie spannen den zur Charakterisierung zellulärer Prozesse und Phänomene eingesetzten Merkmalsraum auf.

Besitzt ein Betrachter ein wenig Verständnis für den mathematischen Formalismus hinter Textur- und morphologischen Parametern, so kann er seine Aufmerksamkeit auf die von ihnen hervorgehobenen Charakteristiken lenken und seine Wahrnehmung daran schulen.

Andersherum kann der forschende Betrachter mit ein wenig Geschick neue, griffige Parameter erzeugen, die auf bestimmte Situationen 'zugeschnitten' sind.

Morphologische Parameter: (Aus der Binären Objektmaske)	**Intensitätsabhängige Parameter:** (Aus den Intensitätswerten des Objekts)
Objektgröße: **A**. (Anzahl der Objektpixel) Objektumfang: **P**. [3-23.] **Zirkularitäten & höhere Formparameter:** - Vergrößerungsinvariantes Verhältnis Umfang² zu Fläche: $\mathbf{P^2/A}$. [3-24.] - Exzentrizität: **Exc**. [3-30.] - Randenergie / Randenergiedichte: $\mathbf{E_C}$ / $\mathbf{\bar{E}_C}$. [3-25.] - Randdistanz / Mittlere Randdistanz: **D** / $\mathbf{\bar{D}}$. [3-26.] - Zweite Ableitung der Randtrajektorie: $\mathbf{2^{nd}_d}$ / $\mathbf{2^{nd}_đ}$.] - Invariante Momente / Normalisierte Invariante Momente: $\boldsymbol{\mu}_{ik}$ / $\boldsymbol{\mu'}_{ik}$. [3-29.]	Integrale Intensität: **I.** (Summe der Pixelintensitäten) Intensitätsdichte: **I'= I/A**. Intensitätsabhängige Exzentrizität: **I-Exc**. [Kap. 3.5.5.] Invariante intensitätsabhängige Momente und normalisierte intensitätsabhängige invariante Momente: $\mathbf{I\text{-}\mu}_{ij}/\mathbf{I\text{-}\mu'}_{ij}$. [Kap. 3.5.5.] **Haralicksche Texturmaße:** - Entropie: **S**. [Kap. 3.5.6.] - Kontrast: **K**. - Chiquadrat: $\mathbf{ch^2}$. - Kappastatistik: **k**. - Inverse Momenten Differenz: $\mathbf{d\mu}$. - 2nd Angular Moment: $\mathbf{AM^2}$.

Tab.3.1.: Zusammenfassende Liste der Texturparameter, der morphologischen und der fluoreszenzabhängigen Parameter. Diese können für segmentierte Objekte automatisiert abgefragt werden.

Es soll an dieser Stelle hervorgehoben werden, daß die normalisierte, invariante Schar der Momente $\boldsymbol{\mu}_{jk}$ $\{j,k \in [0, 1,...,\infty]\}$ jede beliebige Form eindeutig charakterisiert [Tab. 3.1.].

Bei den sonst aufgeführten Formparametern handelt es sich lediglich um prägnantere Darstellungsformen von $\boldsymbol{\mu}_{jk}$ (mit evtl. hoher separativer Kapazität), die im Prinzip aus $\boldsymbol{\mu}_{jk}$ abgeleitet werden könnten und sich als $F(\boldsymbol{\mu}_{jk})$ darstellen ließen (triviales Beispiel: $\mathbf{A} = \boldsymbol{\mu}_{00}$).

Es existieren noch weitere interessante Algorithmen, welche durch Transformationen die Reduktion eines komplizierten Objektes in einen niederdimensionalen Darstellungsraum bewirken (Bsp. Hough-Transformation, Punktabbildung einer Struktur im *'Accumulator Array'*, Hough 1962).

Diese Algorithmen für die Charakterisierung zellulärer Systeme zu implementieren, bleibt noch eine Aufgabe für die Zukunft.

2. Konsequenz: *Die Schwierigkeit, Merkmale zu vergleichen und Ähnlichkeiten in Abhängigkeit der Orientierung wahrzunehmen (Ableitung aus dem Konstanzkonzept).*

Wahrnehmungsbedingte Täuschungen, wie sie in Abb. 3.1.e./f. & 3.2.b. angedeutet sind, können durch geeignete Bilddarstellung vermieden werden. Automatisiert segmentierte Zellen können aus ihrer Umgebung herausgeschnitten und in einem klar definierten 'Referenzkontext' dargestellt werden.

Dieser klare Referenzbezug ermöglicht es dem Betrachter, Objektgrößen [Abb. 3.1.e.], Objekttexturen [Abb. 3.1.f.] und deren Morphologien besser einzuschätzen. Zellklumpen, zufällige Agglomerationen oder Verunreinigungen können so aus einem möglicherweise verfälschenden Bezugskontext entfernt werden.

Ebenfalls wichtig für das Erkennen von Ähnlichkeiten der Morphologie und Textur ist die Ausrichtung eines Objektes relativ zu den Sehachsen [Abb. 3.2.b.].

Der deutsche Physiker Ernst Mach, Namensgeber der 'Machbänder', beschäftigte sich im 19. Jahrhundert ausgiebig mit der Frage, warum die Formwahrnehmung nicht ausschließlich durch die innere Geometrie der Objekte festgelegt ist [Hauske 1994]. Siehe dazu auch die hellen und dunklen Überschwinger an Helligkeitsgrenzen an den Beispielen des dem Macheffekt verwandten Herrmanngitters [Abb. 3.2.d.] und des Craik O'Brien Effekts [Abb. 3.2.c.].

Rock (1985) widmet diesem Phänomen, dessen grundlegende Erklärung auch heute noch umstritten ist, eine breite Diskussion und viele illustrative Beispiele. Er schlägt als Erklärung einen (wie ich es zusammenfassen möchte) 'Sehachsen erhaltenden' Konstanzmechanismus vor, welcher unser visuelles System dazu veranlaßt, ein Objekt unbewußt in eine bekannte rotationsinvariante Darstellung zu überführen. Bei dieser symmetrieabhängigen Operation können innere Geometrien und Kantenlängen je nach Orientierung deutlich verändert erscheinen.

Interessanterweise führt die translations-, rotations- und vergrößerungsinvariante Darstellung eines Objektes als Reihe von Momenten μ_{jk} [Kap. 3.5.4.] zu einer ähnlichen Herangehensweise.

Die Momente μ_{jk} $\{j,k \in [0,1,2,3]\}$ stellen gerade die genannten Invarianzen sicher, so daß ein direkter Vergleich der Momente höherer Ordnung erst ermöglicht wird: (**0. Ordnung:** Größe, **1. Ordnung:** Schwerpunkt, **2. Ordnung:** Hautachsendarstellung**, 3. Ordnung:** 'Birnenform'-abhängige Ausrichtung eines Objektes).

Jedes Objekt wird unabhängig von der Bildorientierung zunächst als 'Birne' behandelt. Es wird an seinem virtuellen Birnenstiel aufgehängt und so dargestellt, wie jedes Kind sie malen würde [Abb. 3.15.]. Warum bloß?

Auch hier ließe sich wieder der Gedanke von der Notwendigkeit aufgreifen, die komplexe (weil sehr speicherplatzintensive) Originaldarstellung auf einen geringer dimensionierten Merkmalsraum zu reduzieren. Diese Reduktion ist notwendig, um mit Hilfe unserer eingeschränkten Kapazität überhaupt in annehmbarer Zeit zu visuellen Lern- und Wiedererkennungseffekten gelangen zu können.

Dergestalt von nicht geringer Transformationslast befreite, ausgerichtete Zellbilder können vom Betrachter viel besser auf Merkmale höherer Ordnung hin überprüft, erkannt und somit präziseren Untersuchungen unterzogen werden.

3. Konsequenz: *Die Schwierigkeit, mehrdimensionale Kriterien zur Cha - rakterisierung eines Zustandes oder eines Prozesses heranzuziehen (Ableitung aus dem Prägnanzkonzept).*

Das Prägnanzkriterium beinhaltet als allgemeines Rahmenprinzip der Gestalttheorie einen Ansatz zur Klärung der Frage: ‘Warum weicht die Summe von Einzelwahrnehmungen vom Gesamteindruck stark ab?’. Es läßt uns immer die ‘beste’ und ‘einfachste’ Darstellung im Sinne von einheitlich, dicht geschlossen, symmetrisch und konzentrisch wahrnehmen [Lehmann 1997].

Probleme dabei sind:

1. ‘Dinge’ sind gewohnheitsbedingt einfach.
2. Die Wahrnehmung wird zunächst von jenem der möglichen Kriterien dominiert, welches am schnellsten eine einfache Lösung bietet.
3. Selbst wenn eine Figur mehrdeutig ist, können wir zu einem Zeitpunkt immer nur eine Interpretation der Figur wahrnehmen. Der Literat wird in Abb. 3.2.e. eher ein ‘B’, der Mathematiker eher eine ‘13’ erkennen. Mehrfach Begabte sehen entweder die ‘13’ oder das ‘B’. Nie aber gleichzeitig eine ‘Breizehn’.

In der Konsequenz neigen wir dazu, nach erfahrungsbedingt geläufigen Kriterien zu suchen, um Objekte in Klassen einteilen zu können. Gerade wenn es um das Auffinden neuer Merkmale geht, beschränkt dieses Verhalten unsere objektive Wahrnehmung in einem nicht zu unterschätzenden Ausmaß.

Wie später in Beispielen noch aufgezeigt werden wird [Kap. 5.2. & Kap. 5.4.], sind es häufig Kombinationen von nicht korrelierenden, morphologischen Parametern, welche erst eine befriedigende Klassifizierung ermöglichen. Solche Kombinationen sind aber unserem rezeptiv und perzeptiv beschränkten Bewußtsein nicht immer zugänglich.

Es bietet sich folglich an, dem in 1. Konsequenz vorgestellten Ansatz zu folgen und immer möglichst viele Parameter abzufragen. Doch stoßen wir, außer auf verlängerte Rechenzeiten und vergrößerten Speicherbedarf, schnell auf das Problem der Darstellung multidimensionaler Datensätze.

Mit Flowzytometern lassen sich durch den Einsatz mehrerer Laser und mehrfacher Fluoreszenzmarkierungen bislang bestenfalls bis zu 11 Parameter gleichzeitig abfragen (5 Fluoreszenzintensitäten, Vorwärts- und Seitwärtsstreuung: Davey *et al.* 1999, 9+2 Parameter: Bigos *et al.* 1999). Graphisch-interpretatorisch, so wie es bei flowzytometrischen Messungen anhand bivariater Histogramme üblich ist, läßt sich dieses Problem gerade noch bewältigen.

Prinzipiell sind wir bei der Darstellung auf dem Computerbildschirm auf 3, nehmen wir noch eine Farbcodierung hinzu, 4 Dimensionen beschränkt [Abb. 3.16.]. Merkmalsräume von n-ter Dimension, wie sie durch die in Tab. 3.1. dargestellten Parameter aufgespannt werden, auf direktem Wege graphisch zu interpretieren, würde $n \cdot (n-1)/2$ Abbildungen bivariater Histogramme auf den Bildschirm rufen. Der Hilferuf nach einer geeigneten Merkmalsreduktion wird hier schnell laut.

Einen schlüssigen Ansatz zur Lösung dieses Problems bietet die Karhunen-Loeve-Transformation, auch Hauptachsentransformation genannt, die auf das Eigenwert- / Eigenvektorenproblem zurückzuführen ist. Redundante Informationen (korrelierende Parameter) werden nach der Lösung des Eigenwertproblems in orthogonale Eigenvektoren zusammengefaßt [Abb. 3.16., Härtel *et al.* 1999].

4. Konsequenz: *Die Schwierigkeit, einfache segmentierende Merkmale zu finden.*

Der Begriff Segmentierung wird in der Literatur zuweilen recht uneinheitlich verwendet. Unter ihm werden teilweise bereits Aspekte der Objekt-, Szenen- oder Bildinterpretationen mitabgedeckt.

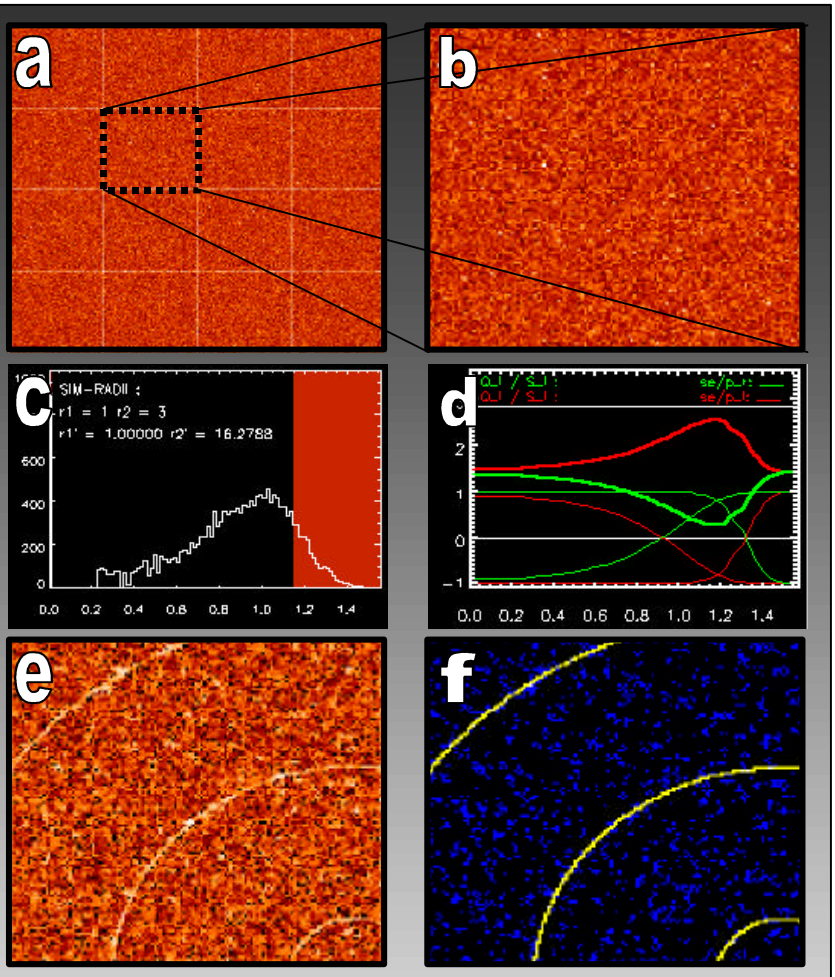


Abb.3.4.: Darstellung der automatisierten optimalen Segmentierung einer Spiralstruktur (s. Abb.3.10.a). [**a**]: Verrauschtes Originalbild: Die Größe der Quelle in der Bildmatrix (512 x 512, I(x,y) ∈ [0,255]) beträgt 1%. Die mittlere Intensität I von Hintergrund und Quelle beträgt Ī=144.1. Das Rauschen des Quellsignals (sd(I)=2.6) beträgt 10% des Hintergrundrauschens. [**b/e/f**]: Ausschnitte (4X) aus a. [**b**]: Original. [**e**]: Transformierter Ausschnitt $\alpha(x,y) \in [0,1.56]$ einer gewählten Bildtransformation $T(\bar{P}, I(x,y)) \rightarrow \alpha(x,y)$ bei festem Parametervektor $\bar{P}$. [**f**]: Automatisiert detektierte Spiralstruktur. [**c**]: Histogramm von $\alpha(x,y) \in [0,1.56]$ und den aus Graph **d** ermittelten optimalen Schwellwert α_{OPT} = 1.15 (orange Schwelle). [**d**]: Bildgütefunktionen $\bar{C}_{l/r}(\alpha)$ [s. 3.1.2.2.]. Für jeden möglichen Schwellwert α existieren zwei mögliche Segmentierungen. Entweder alle rechts vom Schwellwert liegenden transformierten Pixel werden dem Objekt zugeordnet ($\|\bar{C}_r(\alpha)\|$, dicke grüne Linie), oder aber alle links vom Schwellwert liegenden Pixel ($\|\bar{C}_l(\alpha)\|$, dicke rote Linie). Das optimale α_{OPT} = 1.15 erfüllt gerade $\|\bar{C}_{l/r}(\alpha_{OPT})\| = MIN(\|\bar{C}_{l/r}(\alpha)\|)$.

Bild f zeigt das Resultat für α_{OPT}. Der Hintergrund ist durch das Intervall $\alpha_H \in [\alpha_{MIN}, \alpha_{OPT}]$ und das Objekt durch $\alpha_O \in [\alpha_{OPT}, \alpha_{MAX}]$ definiert. α_O sind entweder korrekt positiv kp (gelb) oder falsch positiv fp (blau), α_H sind entweder korrekt negativ kn (schwarz) oder falsch negativ fn (weiß).

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Begriff Segmentierung jedoch in Anlehnung an die Definition von Harwood *et al.* (1985) wie folgt verstanden werden:

Eine Segmentierung leitet inhaltlich zusammengehörige Regionen (Segmente) in einem Bild ausschließlich aus den im Bild vorhandenen Informationen ab.

Demnach scheint die Anforderung an einen automatisierten Algorithmus zur Segmentierung von Objekten einfach. Sie lautet:

Teile die Pixel eines Bildes in zwei Klassen! Eine Klasse definiert so die zu segmentierenden Objekte. Die andere Klasse definiert lediglich den Hintergrund [Abb. 3.4.].

Jedoch: die automatisierte Segmentierung von definierten Objekten gilt als eines der schwierigsten Probleme in der Bildverarbeitung.

Mit der Güte der angewendeten Algorithmen zur Segmentierung stehen oder fallen Methoden, die darauf aufbauen, segmentierte Objekte einer späteren Analyse zu unterziehen [Gonzales & Woods 1990].

Gerade wenn morphologische und von der Textur abhängige Parameter eines segmentierten Objektes eine große Rolle spielen, wie bei zellulären Prozessen, ist eine verläßlich reproduzierbare Segmentierung der Schlüssel zum Erfolg.

Ganz allgemein lassen sich die Prozesse der Segmentierung in punkt-, kontour- und regionenorientierte Verfahren einteilen, deren Übergänge in der Anwendung jedoch fließend sind. Sie müssen fließend sein, denn auch unser visuelles System beschränkt sich bei der Segmentierung von Objekten nicht allein auf primäre und sekundäre rezeptive Felder, sondern berücksichtigt ebenfalls die verschiedenen Konstanzmechanismen bei der Entscheidungsfindung [Rock 1985].

Das visuelle System entdeckt oder erfindet durch imaginäre Ergänzung unter Umständen versteckte Figuren [Abb. 3.2.a.], indem es Gedächtnisinterpretationen den ‘reellen‘ Reizpräsentationen nicht nur vergleichend gegenüber-, sondern voranstellt. Die Konsequenz daraus ist: Nur in Spezialfällen kann ein einziger Segmentierungsansatz eine befriedigende Lösung liefern.

Als Lösungsansatz wird deshalb folgendes Konzept verfolgt:

1. Für die jeweilige mikroskopische Fragestellung können repräsentative Bilder ausgewählt werden, und ein qualifizierter Betrachter definiert manuell ‘Eichmasken’ der zu segmentierenden Objekte [Abb. 3.12.].
2. Jeder Segmentierungsansatz liefert (unter automatisierter Berechnung der besten Parameterkombination) mit einer gewissen Güte [Kap. 3.2.2.] einen Beitrag zu einer optimalen Segmentierung.
3. Aus der Serie der zur Verfügung stehenden Segmentierungsansätze werden nun mit Hilfe von Korrelationsanalysen und Hauptachsentransformationen redundante Ansätze herausgefiltert und jene linear gewichtete Kombination an Transformationen zusammengestellt, welche das Gütekriterium optimiert.

3.2 Optimale Objekt-Segmentierung

3.2.1 Das Konzept der Bild-Transformationen

Es sei α der durch die Transformation **T** erzeugte Wert an der Position $(x_i,y_j|\ i \in [1,\text{Dimension}(x)],\ j \in [1,\text{Dimension}(y)])$. Die Transformation **T** wird auf die ursprüngliche digitale Bildmatrix $\mathbf{I}(x,y) \in [0, 255]$ angewendet.

Je nach erforderlicher Komplexität kann **T** von mehreren Transformationsparametern $\mathbf{T} = \mathbf{T}(\overline{P})$ abhängen, welche im Parametervektor $\overline{P} = [p_1, p_2, ..., p_n]$ zusammengefaßt sind [3-1.]. Nach der Transformation der gesamten Bildmatrix $\mathbf{I}(x,y) \rightarrow \alpha(x,y)$ muß ein Schwellwert für $\alpha = \alpha_{OPT}$ gesucht und definiert werden, welcher ein verwendetes Gütekriterium **G** optimiert [s. Kap. 3.2.2 & Abb. 3.5.]. Hierbei definieren $\alpha_{O/H} \in [\alpha_{MIN}, \alpha_{OPT}]$ und $\alpha_{H/O} \in [\alpha_{OPT}, \alpha_{MAX}]$ die Bildpunkte des Objektes α_O und des Hintergrundes α_H [Abb. 3.4. & Abb. 3.12.].

$$\alpha(x_i, y_i) = T\left[I(x,y), \overline{P}\right] \qquad [3\text{-}1.]$$

Es ist leicht einzusehen, daß es sehr zeitaufwendig werden kann, aus der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Transformationen [Kap. 3.2.3 bis 3.2.8.] die beste auszuwählen. Insbesondere, wenn die Transformationen jeweils noch sensitiv von der Einstellung des Parametervektors $\overline{P}$ abhängen.

Bei nicht trivialen (nicht linearen) Transformationen **T** existiert, von Spezialfällen einmal abgesehen, keine analytische Lösungsfunktion $\Im$ des Problems: $\Im(\mathbf{T}, I(x,y), \mathbf{G}) \rightarrow [\overline{P}_{OPT}, \alpha_{OPT}]$.

Es ist demnach schon für jede einzelne Transformation sinnvoll, die optimale Segmentierung mit Hilfe eines geeigneten Gütekriteriums automatisiert zu finden. Der eingeschlagene Weg dorthin soll im folgenden beschrieben werden.

3.2.2 Gütekriterien für eine automatisierte optimale Segmentierung

Die Wahl eines sensitiven Gütekriteriums **G** beeinflußt entscheidend den Erfolg einer automatisierten Segmentierung. Die Kriterien beruhen auf einer Analyse der nach einer Transformation durch $\alpha_{O/H}$ klassifizierten Punkte des Objektes und des Hintergrundes.

$$Se = \frac{kp}{kp + fn} \qquad [3\text{-}2.]$$

$$Sp = \frac{kn}{kn + fp} \qquad [3\text{-}3.]$$

$$Q = \frac{kp - fp}{kp + fn} \qquad [3\text{-}4.]$$

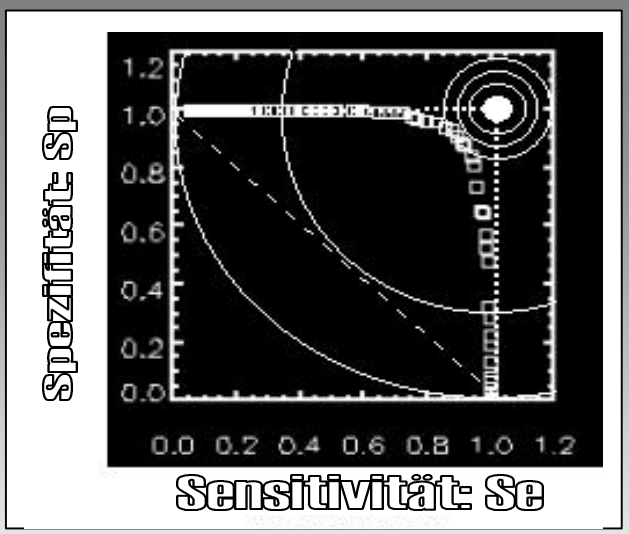


Abb.3.5.: Spezifität **Sp** in Abhängigkeit der Sensitivität **Se** als Funktion einer Punkttransformation T bei festem Parametervektor $\overline{P}$ zu den verschiedenen $\alpha_{O/H}$ aus Abb. 3.4.c./d. (weiße Quadrate). Der Punkt optimaler Segmentierung liegt bei (Se = 1, Sp = 1). Die konzentrischen Kreise markieren Äquidistanzlinien zu (1,1). Jenes Parameterpaar, welches $\| (1 - Se(\alpha_{O/H}), 1 - Sp(\alpha_{O/H})) \|_{eukl.}$ minimiert, optimiert die Segmentierung des Objektes nach diesem Kriterium. Die gestrichelte weiße Linie von (1,0) nach (0,1) markiert jene Werte für (Se,Sp) welche aus der apriori-Annahme entstehen, daß jeder Bildpunkt mit einer festen Wahrscheinlichkeit $p \in [0,1]$ zu dem Objekt bzw. nicht zum Objekt (1-p) zugeordnet werden kann.

Ein dem Objekt zugeordneter transformierter Punkt ist entweder wirklich ein Objektpunkt (positiv) oder aber in Wirklichkeit ein Hintergrundpunkt (negativ). Er ist somit entweder korrekt positiv **kp** oder falsch positiv **fp** [gelb und blau markierte Punkte in Abb. 3.4.f.].

Ebenso lassen sich dem Hintergrund zugeordnete Punkte in **kn** und **fn** einteilen [schwarz und weiß markierte Punkte in Abb. 3.4.f.]. Mit diesen Größen können die Sensitivität **Se** (‚*Sensitivity*‘,

Bruchteil der erkannten Objektpunkte, [3-2.]) und die Spezifität **Sp** (‚*Specifity*', Bruchteil der erkannten Hintergrundpunkte, [3-3.]) errechnet werden.

Als bestmögliche Segmentierung eines Objektes mit Hilfe einer Transformation **T** kann nun jener Parametervektor [$\alpha_{O/H}$, $\overline{P}$] gelten, dessen euklidischer Abstand vom Punkt optimaler Segmentierung (**Se** = 1, **Sp** = 1) minimal wird [Abb. 3.5.], oder dessen Abstand zum Punkt schlecht möglichster Segmentierung (0,0) maximiert wird [Abb. 3.4.d.].

Dieses aus der Biometrie (Anwendung der Mathematik in der Medizin) stammende statistische Bewertungsverfahren ist eine weitverbreitete Methode zur quantitativen Bewertung neuer diagnostischer Verfahren, für welche referenzielle Ergebnisse, sogenannte 'goldene Standards', vorliegen (im Falle der Bildsegmentierung sind dies benutzerdefinierte, manuell erstellte Eichmasken).

$$Qse = \frac{kp - fn}{kp + fn} \quad [3\text{-}5.]$$

$$Qsp = \frac{kn - fp}{kn + fp} \quad [3\text{-}6.]$$

$$\cos(\alpha) = \frac{\|\overline{B}\|}{\|\overline{A}\|}, \quad \overline{A} = (Qse, Qsp)$$

$$\|\overline{C}\| = \|(1,1)\| - \|\overline{B}\| = \sqrt{2} - \frac{(Qse + Qsp)}{\sqrt{2}} \quad [3\text{-}7.]$$

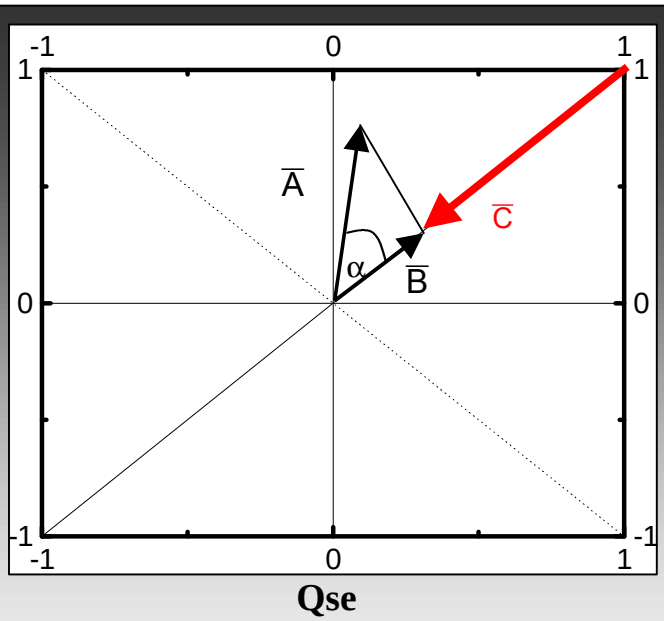


Abb.3.6.: Aus der modifizierten Spezifität Qsp und der modifizierten Sensitivität Qse leitet sich das Gütekriterium MIN(‖$\overline{C}$‖) ab. Die punktierte Linie von (1,-1) nach (-1,1) markiert Wertepaare (Qse,Qsp) die aus der apriori-Annahme entstehen, daß jeder Bildpunkt mit einer festen Wahrscheinlichkeit p ∈ [0,1] dem Objekt bzw. dem Hintergrund zugeordnet wird (vergl. Abb. 3.5.). Diesen Wertepaaren wird nach der Projektion auf die Diagonale von (-1,-1) nach (1,1) der Wert ‖$\overline{C}$‖ = √2 zugeordnet. Jeder Wert von ‖$\overline{C}$‖ ∈ [√2, 2·√2] bedeutet eine gerichtete Fehlinterpretation, jeder Wert ‖$\overline{C}$‖ ∈ [0,√2] bedeutet ein Vorteil gegenüber jeder willkürlichen Entscheidung (‖$\overline{C}$‖ = √2).

Se und **Sp** werden in der Medizin als Kriterien nicht immer gleich gewichtet. Entscheidend ist hier, die Risiken eines Eingriffs und die eines unterlassenen Eingriffs als Gewichtungsgrundlage heranzuziehen.

Diese Kriterien besitzen jedoch für die optimale Segmentierung einen gravierenden Nachteil. Legt man willkürlich und apriori eine Annahme fest, beispielsweise sei jeder Bildpunkt mit einer festen Wahrscheinlichkeit p ∈ [0,1] dem Objekt (p) bzw. nicht dem Objekt (1-p) zugeordnet, so bewerten diese Kriterien die Annahme p = 0.5 mit (Se(p),Sp(p)) = (0.5, 0.5) und ‖(0.5,0.5)‖ = 0.71 anders als die Annahmen p = 1 oder 0 mit (Se(p),Sp(p)) = (1,0) / (0,1) und ‖(0,1) / (1,0)‖ = 1.

Jede beliebige, apriori getroffene Annahme für p sollte jedoch qualitativ gleich bewertet werden.

Auch das Verwendung findende Gütekriterium MAX(**Q**) [3-4.] ist nicht immer optimal, da es sehr stark vom Größenverhältnis des Objektes zum Hintergrund abhängt. Bei kleinem Hintergrund wird **Q** ≈ **Se**, bei kleinem Objekt dagegen dominiert allein **fp** dieses Kriterium.

Als modifizierte Parameter wurden deshalb **Qse** ∈ [-1,1] und **Qsp** ∈ [-1,1] verwendet und das Kriterium modifiziert [3-5. & 3-6.]. Die Wertepaare (**Qse**(p), **Qsp**(p)) werden dazu zunächst orthogonal auf die Gerade projektiert, welche von (-1,-1) und (1,1) definiert wird. Erst dann wird die Distanz des projektierten Punktes zum Punkt optimaler Segmentierung (1,1) berechnet und das Kriterium des minimales Abstandes MIN($\|\overline{C}\|$) verwendet [3-7.].

Für jede beliebige Annahme mit einer festen Wahrscheinlichkeit p ∈ [0,1] liegen die Wertepaare (**Qse**(p), **Qsp**(p)) auf der Geraden von (-1,1) nach (1,-1). Ihr projektierter Wert liegt demnach auf (0,0) [Abb. 3.6.].

3.2.3 Konventionelle Methoden der Segmentierung und die Skalierungs-Index-Methode (SIM)

Bei mikroskopischen Aufnahmen, welche nicht im Fluoreszenzmodus aufgenommen werden, kann es unter Umständen schwierig sein, ein befriedigendes Ergebnis einer automatisierten Segmentierung zu erhalten [Abb. 3.7.].

Einfache, globale Segmentierungsalgorithmen führen nur in Ausnahmefällen zum Erfolg. Inhomogenitäten durch Bildausleuchtung [Abb. 3.13.] und Absorptionen sowie Phänomene, wie sie durch Brechungen und Interferenzen hervorgerufen werden, lassen es oft nicht zu, eindeutige Kriterien für Objekte, Hintergrund und deren Grenzen zu formulieren.

Einfacher ist es hingegen, mit Fluorophoren markierte Zellen zu segmentieren, die mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes aufgenommen werden können. Hier können entweder direkt Schwellwerte aus Grauwerthistogrammen abgeleitet oder im Falle auftretender Inhomogenitäten in der Ausleuchtung [Kap. 3.4.] lokal definierte erste oder zweite Ableitungen der Intensitäten nach dem Ort verwendet werden.

Fluoreszenzmarkierungen sind allgemein mit Vorsicht anzuwenden, denn:

1. Außer den Kostenfaktoren für Fluorophore, für Fluoreszenzmikroskope und für zusätzlichen Arbeitsaufwand muß sichergestellt sein, daß der Fluorophor keine unerwünschten Nebeneffekte induziert. Nebeneffekte können sich auf die Morphologie, auf die Textur oder auf den Stoffwechsel der Zellen auswirken. Diese Nebeneffekte können in einer störungsfrei wachsenden Zellkultur relativ einfach mit Hilfe einer Kontrollpopulation ausgeschlossen werden. Induziert man aber zusätzlich ein Ereignis, so sind hemmende oder synergistische Effekte kaum noch eindeutig auszuschließen.
2. Ein Fluorophor, der die Segmentierung erleichtern soll, muß alle Zellen gleichmäßig und vollständig markieren. Er darf nicht mit weiteren Fluorophoren interferieren, welche definiert Ereignisse des zellulären Stoffwechsels markieren sollen. Hier sind sowohl direkte Wechselwirkungen als auch Überlappungen der Fluoreszenzeigenschaften zu kontrollieren.

Es ist demnach vorteilhaft, soweit wie möglich auf die Anwendung eines Fluorophors zu verzichten.

Eine weitere Möglichkeit, bestimmte Zellsegmente künstlich hervorzuheben und damit einen guten Ansatz einer Segmentierung zu erhalten, bietet der Einsatz von Chromophoren, weil sie Licht auf definierte Weise absorbieren oder streuen. Hier gelten jedoch ebenfalls die unter 1. geäußerten Bedenken.

Im Rahmen des hier beschriebenen Programmes sind neben den erwähnten relativ einfachen direkten Algorithmen zur Segmentierung teilweise modifizierte isotrope und anisotrope Formen der weit verbreiteten Sobel- und Robertsalgorithmen verwendet worden.

Die Schwierigkeit der Segmentierung von Zellen mit so heterogenen Intensitätscharakteristiken, wie sie in Abb. 3.7. andeutungsweise dargestellt sind, kann über die Formulierung des inversen Problems eher gelöst werden: ‘Gesucht sei nun ein Kriterium für den sich vergleichsweise homogen gestaltenden Hintergrund.‘ Hierbei erwies sich eine texturbezogene, nichtlineare Methode als äußerst erfolgreich, die im Ansatz von Räth und Morfill (1997) beschrieben wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie auf verschiedene Weise modifiziert und den jeweiligen Problemstellungen angepaßt.

Auf folgendem, letztlich recht einfachen Formalismus baut die α-Transformation oder Skalierungs-Index-Methode (SIM) auf:

Es sei ein Bild I(x,y) $\in$ {0,255} der Größe D1 × D2 gegeben und ein Vektor $\overline{p}$ = [x, y, I’(x,y)] definiert. I’(x,y) ist dabei eine geeignete transformierte Skalierung des Ursprungsbildes. Räth und Morfill (1997) schlagen beispielsweise vor, I’(x,y) = I(x,y) · D1 / 255 zu wählen.

Nach der Wahl zweier freier Parameter, den Radien r'_1 und r'_2 ($r'_1 < r'_2$), lassen sich aus [3-8.] und [3-9.] die α-Indizes an der Stelle (x,y) ableiten. || symbolisiert in [3-9.] die euklidische Norm und Θ die binarisierende Heavy-sidesche Funktion, welche für r’ > $|\overline{p}_i - \overline{p}|$ eine 1 und sonst 0 annimmt.

$$\alpha(x_i, y_i \mid r'_1, r'_2) = \frac{\log[N(r'_2)] - \log[N(r'_1)]}{\log[r'_2] - \log[r'_1]} \qquad [3\text{-}8.]$$

$$N(x_i, y_i \mid r'_{1,2}) = \sum_{x,y} \Theta\left(r'_{1,2} - \left|\overline{p}_i - \overline{p}\right|\right) \qquad [3\text{-}9.]$$

3.2.4 Informationen aus dem Phasenraum ?

Im Abstrakten ereignet sich heute das Wesentliche
[Robert Musil]

Die in 3-8. und 3-9. vorgestellte Form der α-Indizes (auch bezeichnet als ‘*Scaling Index*’ oder ursprünglich als ‘*Crowding Index*’, Grassberger *et al.* 1988), kann auch als Maß für die Komplexität der Umgebung r ($r'_1 < r < r'_2$) eines jeden Punktes im Phasenraum aufgefaßt werden. Dieser wird in zweidimensionalen Bildern aufgespannt durch [x, y, I(x,y)].

Signale rein stochastischer Natur, welche in einem d-dimensionalen Raum eingebettet sind (sogenanntes ‘weißes Rauschen’, Nordmeier & Schlichting 1996) lassen N proportional zur Dimension des Phasenraums wachsen: $N \sim r^d$. Jedes Verhalten dieses Systems, das sich in beliebiger Weise auf einen ordnungserzwingenden Faktor zurückführen läßt, äußert sich in einer von d abweichenden Charakteristik.

So ist eine Punktquelle im Bild charakterisiert durch $N \sim r^0 = const.$, eine Linie durch $N \sim r^1$ und eine planare Fläche durch $N \sim r^2$. Durch Berechnung einer 'Korrelationsdimension' **D** ([3-10.], 'Dimensionalität eines Attraktors', [Nordmeier & Schlichting 1996]) lassen sich gekrümmte Linien, gekrümmte Flächen sowie geometrische Gebilde durch die fraktale Dimension ihrer Phasenräume charakterisieren.

$$D(x_i, y_i \mid r) = \lim_{r \to 0} \frac{\ln[N(r)]}{\ln[r]} \qquad [3\text{-}10.]$$

Benoit Mandelbrot, einer der Begründer der fraktalen Mathematik, äußerte bereits 1983 die Erwartung: '*Tatsächlich können viele Teile der fraktalen Geometrie als eine implizite Untersuchung der Textur gelten*'. Allein aus den Abbildungen im Phasenraum leiten sich auf diese Weise Informationen über den stochastischen, chaotischen oder streng deterministischen Charakter der ihnen zugrunde liegenden Gesetzmäßigkeiten ab [Theiler 1990].

Dieser Ansatz wurde bereits in verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen genutzt. Erwähnt seien hier die Kardiologie [Morfill & Schmidt 1994], die Astronomie (Quelldetektion in '*X-ray*' ROSAT Daten), die Nuclearmedizin (Tomographischen Signale [Poppe, unveröffentlichte Daten]) und allgemeine Texturerkennung [Räth & Morfill 1997].

Angewendet auf den Bereich der segmentierenden Bildverarbeitung bedeutet dies, daß wir mit $\alpha(x,y)$ ein Maß für die Komplexität des Signals an der Stelle (x,y) bekommen. Intensitätssignale eines zu verarbeitenden Bildes sind stets Mischungen aus stochastischen Ereignissen sowie einer Reihe teilweiser nichtlinearer determinisierender Parameter.

Die Hoffnung ist nun, daß ein wie auch immer geartetes Objekt an der Stelle (x,y) einen dieser Parameter dergestalt beeinflußt, daß sich der Wert der Projektion auf $\alpha(x,y)$ signifikant verändert. Es bietet somit einen vielversprechenden Lösungsansatz für das in Kap. 3.2.3. formulierte inverse Problem der Zellsegmentierung. In Abb. 3.7.b./d./e./f. ist zu sehen, wie Faktoren, die 'Hintergrund' erzeugen, auf etwa ¼ des gesamten α-Intervalls projiziert werden.

Die verschieden gearteten, ordnungserzwingenden Kräfte (oder Attraktoren), welche Zellkanten und innere Zellstrukturen erzeugen, finden sich hingegen im relativ breiten unteren Bereich des α-Spektrums wieder (vergl. Abb. 3.7.d. & 3.9.d.).

3.2.5 Markoffsche Prozesse und Gibbs-Potentiale

Ein weiterer plausibler und allgemeiner Ansatz, den Informationsgehalt eines jeden Pixels zu bewerten, geht ebenfalls auf den Gedanken zurück, ein Bild als stochastischen Prozeß aufzufassen und nach kausalen Zusammenhängen zwischen den Grauwerten eines jeden einzelnen Pixels und jenen seiner Umgebung zu suchen.

Ist die bedingte Grauwertverteilung von Pixeln dabei ausschließlich von den Grauwerten ihrer Nachbarpixel abhängig, so wird dies ein 'Markoffscher Prozeß' genannt.

Markoff-Prozesse können deshalb auch als stochastisches Äquivalent zu Differentialgleichungen aufgefaßt werden, bei denen nicht ein streng definierter Zustand eines Punktes aus dem Zustand seiner Umgebung abgeleitet wird, sondern lediglich eine Wahrscheinlichkeit.

Unter Verwendung des Nachbarschaftskonzeptes und aus dem daraus abgeleiteten Konzept einer Clique lassen sich mit Hilfe der Gibbs-Verteilung jedem Pixel [x,y] einer Region eine Wahrscheinlichkeitsdichte **p** zuordnen [3-11.].

$$p([x,y]) = c \cdot e^{-\beta U([x,y])} \qquad [3\text{-}11.]$$

Eine Menge von Pixeln bildet dabei eine Clique zur Nachbarschaft $\mathbf{N_r}$ (**r** definiert im Radius um ein Pixel [x,y]), wenn je zwei Elemente einer Clique Nachbarn sind.

Dabei ist **c** die reziproke Zustandssumme Z, welche $\Sigma p([x,y]) = 1$ garantiert. **c** und b sind jedoch für Zwecke der Segmentierung ohne Bedeutung, da sie ohne Auswirkung auf das Spektrum von **p** sind.

Für jeden Cliquentyp ($\mathbf{C}_{1,2,....c_max}$) einer Nachbarschaft lassen sich nach Belieben lokale Cliquenpotentiale ($\mathbf{V}_{1,2,....v_max}$) definieren und daraus schließlich das Gesamtpotential **U** und die Dichte **p** berechnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Segmentierungsalgorithmen ausschließlich einelementige Cliquen verwendet und die Potentiale nach [3-12 bis 3-14.] gewählt.

Hierbei ist **μ** die mittlere Intensität, s deren Standardabweichung, g errechnet sich aus **μ**/($\mathbf{I}_{max}$-$\mathbf{I}_{min}$) und **d** ist ein einfaches Toleranzkriterium einer Distanz.

$$V_1(x,y) = \phi\left[\varphi\left(I(x,y) - \mu\right)/\sigma\right] \qquad [3\text{-}12.]$$

$$V_1(x,y) = \phi\left[\varphi\left(I(x,y)\right) \cdot \log\left(\left(1-\gamma\right)/\gamma\right)\right] \qquad [3\text{-}13.]$$

$$V_1(x,y) = \begin{cases} 1, & \left|I(x,y) - I(x_0,y_0)\right| < d \\ 0, & sonst \end{cases} \qquad [3\text{-}14.]$$

Diese Größen können entweder für die gesamte Bildmatrix bestimmt werden, oder aber sie werden jeweils lokal in den gewählten Nachbarschaften $\mathbf{N_r}$ abgeleitet.

Für F und j wurden im Rahmen dieser Arbeit Potenzfunktionen, Betragsfunktionen oder logarithmische Funktionen gewählt. $\mathbf{U}(x_0,y_0)$ berechnet sich dann für jedes Pixel $[x_0,y_0]$ aus der Summe über alle Potentiale $\mathbf{V}_1(x_i,y_j)$ $\{x_i$ & $y_j \in \mathbf{N_r}\}$ in seiner Nachbarschaft $\mathbf{N_r}$.

Es können natürlich ebenfalls Quotienten **q** aus den natürlichen Logarithmen der Wahrscheinlichkeitsdichten zweier Nachbarschaften $\ln(\mathbf{p_{r1}})/\ln(\mathbf{p_{r2}})$ um $[x_0,y_0]$ gebildet werden.

$$\log(q(x_0,y_0)) = \log\left(\frac{\ln(p_{r1})}{\ln(p_{r2})}\right) = \log(U_{r1}) - \log(U_{r2}) \qquad [3\text{-}15.]$$

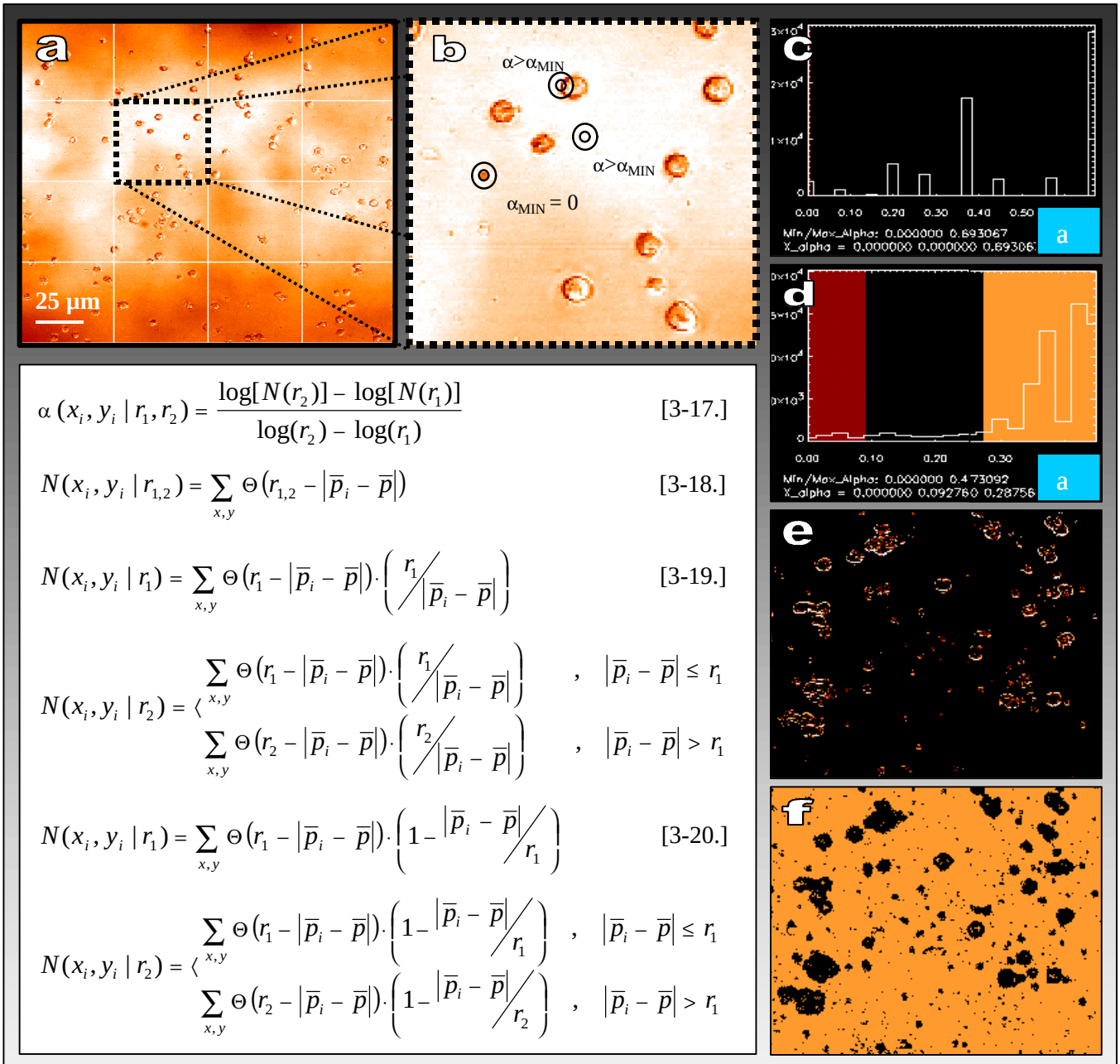
$$\alpha(x_0,y_0) = \frac{\log(q(x_0,y_0))}{\log(r1/r2)} \qquad [3\text{-}16.]$$

Wählt man, diesem Gedanken folgend, die ‘Einser-Cliquen-Potentiale‘ nach 3-14., so wird die Verwandtschaft dieser Methode zu den α-Indizes direkt deutlich (vergleiche 3-8. & 3-9. mit 3-15. & 3-16.).

Die SIM kann für den Fall der Segmentierung als Spezialfall der Gibbschen-Wahrscheinlichkeiten für Cliquen-Potentiale zweier Nachbarschaften aufgefaßt werden.

3.2.6 Modifikation 1: Freie Intensitätsskalierung der SIM

Resultate aus der Formel [3-8.] sind sehr stark von der gewählten Intensitätsskalierung abhängig. Es ist deshalb vorteilhaft, zu den freien Parametern r'$_1$ und r'$_2$ noch weitere freie, den Intensitätsraum



$$\alpha(x_i, y_i \mid r_1, r_2) = \frac{\log[N(r_2)] - \log[N(r_1)]}{\log(r_2) - \log(r_1)} \qquad [3\text{-}17.]$$

$$N(x_i, y_i \mid r_{1,2}) = \sum_{x,y} \Theta\left(r_{1,2} - \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right|\right) \qquad [3\text{-}18.]$$

$$N(x_i, y_i \mid r_1) = \sum_{x,y} \Theta\left(r_1 - \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right|\right) \cdot \left(r_1 \Big/ \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right| \right) \qquad [3\text{-}19.]$$

$$N(x_i, y_i \mid r_2) = \begin{cases} \sum_{x,y} \Theta\left(r_1 - \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right|\right) \cdot \left(r_1 \Big/ \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right| \right) & , \quad \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right| \le r_1 \\ \sum_{x,y} \Theta\left(r_2 - \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right|\right) \cdot \left(r_2 \Big/ \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right| \right) & , \quad \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right| > r_1 \end{cases}$$

$$N(x_i, y_i \mid r_1) = \sum_{x,y} \Theta\left(r_1 - \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right|\right) \cdot \left(1 - \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right| \Big/ r_1 \right) \qquad [3\text{-}20.]$$

$$N(x_i, y_i \mid r_2) = \begin{cases} \sum_{x,y} \Theta\left(r_1 - \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right|\right) \cdot \left(1 - \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right| \Big/ r_1 \right) & , \quad \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right| \le r_1 \\ \sum_{x,y} \Theta\left(r_2 - \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right|\right) \cdot \left(1 - \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right| \Big/ r_2 \right) & , \quad \left|\bar{p}_i - \bar{p}\right| > r_1 \end{cases}$$

Abb.3.7.: Zusammenfassende Darstellung der intensitätsskalierten isotrop ungewichteten [3-17. & 3-18.] und isotrop gewichteten [3-19. & 3-20.] Skalierungs-Index-Methode (SIM) und deren Auswirkungen auf das α-Spektrum [**a**-**f**]. [**a**&**b**]: EL-4 Zellen, aufgenommen im Durchlichtmodus (LSM-410, 20X, 512×512 Pixel). Inhomogenitäten durch Bildausleuchtung, Absorptionen, Brechungen und Interferenzen lassen es oft nicht zu, eindeutige Kriterien für Objekt und Hintergrund festzulegen. [**c**]: α-Histogramm nach [3-17. & 3-18.]. Bei der Wahl kleiner Radien $r_{1/2}$. ist die Zahl der möglichen Werte für α sehr beschränkt. [**d**]: Repräsentatives α-Histogramm nach [3-19. & 3-20.]. Die gewichteten Indizes hingegen 'weichen' die binarisierende Heavyside Funktion θ auf. Es erhöht sich die Anzahl der möglichen α-Werte im Spektrum. [**d**,**e**,**f**]: Die Auswahl eines optimalen Schwellwertes (α_{OPT}) für die Segmentierung von Zellen und Hintergrund (schwarze/dunkelbraune und hellbraune Region in d) kann durch die gewichtete SIM sensitiver erfolgen. Bild e zeigt die in d dunkelbraun markierten α-Indizes mit den Grauwerten des Originalausschnittes (Zellgrenzen und Zellzentren). Bild f zeigt farbcodiert alle in Histogramm d ausgewählten α-Regionen.

skalierende Parameter hinzuzufügen, wenn die α-Indizes bezüglich des in Kap. 3.2.2. beschriebenen Gütekriteriums optimal zur Segmentierung eingesetzt werden sollen.

In diesem Zusammenhang wurden insgesamt 4 freie Parameter [r'_1, r'_2, f_1, f_2 | $r'_1 < r'_2$, $f_1 \leq f_2$] definiert und daraus $r_{1/2} = SQRT[(r'_{1/2})^2+(f_{1/2})^2]$ als neue Parameter abgeleitet. Die Summe $\sum$ in [3-9.] ist nunmehr definiert für alle $(x_i - x)^2 + (y_i - y)^2 \leq r'^2$. Hiermit ist die Freiheit gegeben, den Orts- und Intensitätsraum qualitativ unterschiedlich bewerten zu können. Dies trägt der Einsicht Rechnung, daß Orts- und Intensitätsinformation in Bildern naturgemäß unterschiedlichen Charakter haben.

3.2.7 Modifikation 2: Gewichtete Skalierungs-Index-Methode

Außer der Güte einer Segmentierung ist die benötigte Rechenzeit ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl eines geeigneten Algorithmus. Die Anzahl der Rechenschritte bei der α-Transformation wächst proportional zu r^2 für jeden Bildpunkt (x,y). Wählt man aus diesem Grund eher kleine Radien $r_{1/2}$, so ist nach 3-8. & 3-9. die Zahl der möglichen Werte, welche α überhaupt annehmen kann, sehr beschränkt [α-Histogramm Abb. 3.7.c.].

Aus diesem Grund wurden gewichtete Formen der SIM eingeführt, um die binarisierende Heavyside-Funktion θ 'aufzuweichen'. Die Faktoren $r_{1/2}/|\Delta p|$ in [3-19.] und 1- $(|\Delta p|/r_{1/2})$ in [3-20.] erhöhen die Summe N in Abhängigkeit davon, wie gut dieses Kriterium erfüllt wurde (vorausgesetzt $\theta(r-|\Delta p|) = 1$ ist gegeben).

Hiermit erhöht sich auch die Anzahl der möglichen α-Werte im Spektrum [α-Histogramm Abb. 3.7.d.]. Die Auswahl eines optimalen Schwellwertes (α_{OPT}) für die Segmentierung von Objekt und Hintergrund kann durch die gewichtete SIM folglich sensitiver erfolgen [Abb. 3.7.e.&f.].

3.2.8 Modifikation 3: Anisotrope Skalierungs-Index-Methode

Auf eine mögliche Quelle von Information, die für eine Segmentierung genutzt werden kann, wurde bislang noch nicht weiter eingegangen: Alle beschriebenen Transformationen lieferten einen skalaren Wert an jeder Stelle (x,y) einer Bildmatrix.

Doch können auch vektorielle Größen für jeden Pixel (x,y) definiert abgefragt werden. Die horizontal/vertikale Geometrie der Pixelanordnungen (wie sie in den im Rahmen dieser Arbeit besprochenen Bildern ausschließlich vorkommen) legt es nahe, entweder 4 × 90°- oder 8 × 45°-Winkel als Vorzugsrichtungen zu definieren (siehe auch Kettencodierung, Abb. 3.14). Im Rahmen des Programms Cell_Calc_2000 fiel die Wahl auf die 8er Nachbarschaft [Abb. 3.8.].

In diesem Sinne wurden im Falle der SIM, von jedem Pixel (x,y) ausgehend, 8 vektorielle α-Indizes (α_{0-7}) entlang der in Abb. 3.8. gezeigten Richtungen berechnet [Abb. 3.8.].

Von Bedeutung ist es nun, entweder die Verteilung der maximalen oder der minimalen α-Vektoren zu betrachten (siehe in Abb. 3.9. als Beispiel aufgetragen die minimalen α-Vektoren).

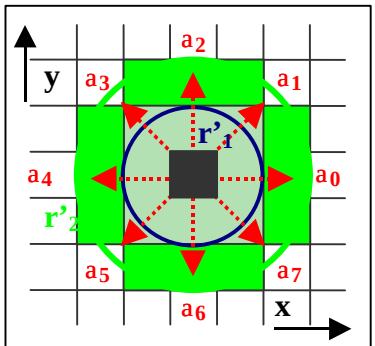


Abb.3.8.: Darstellung der anisotropen Skalierungs-Index-Methode. 8 α-Vektoren (α_{0-7}) werden an Stelle nur eines skalaren α-Wertes für jedes Pixel (■) innerhalb (r'_1,r'_2) berechnet.

Denn: Nach der isotropen Methode berücksichtigt der α-Wert eines Pixels nahe dem Rand einer Zelle bereits einen Teil des Informationsgehaltes einer sich ändernden Intensitätsverteilung am Zellrand.

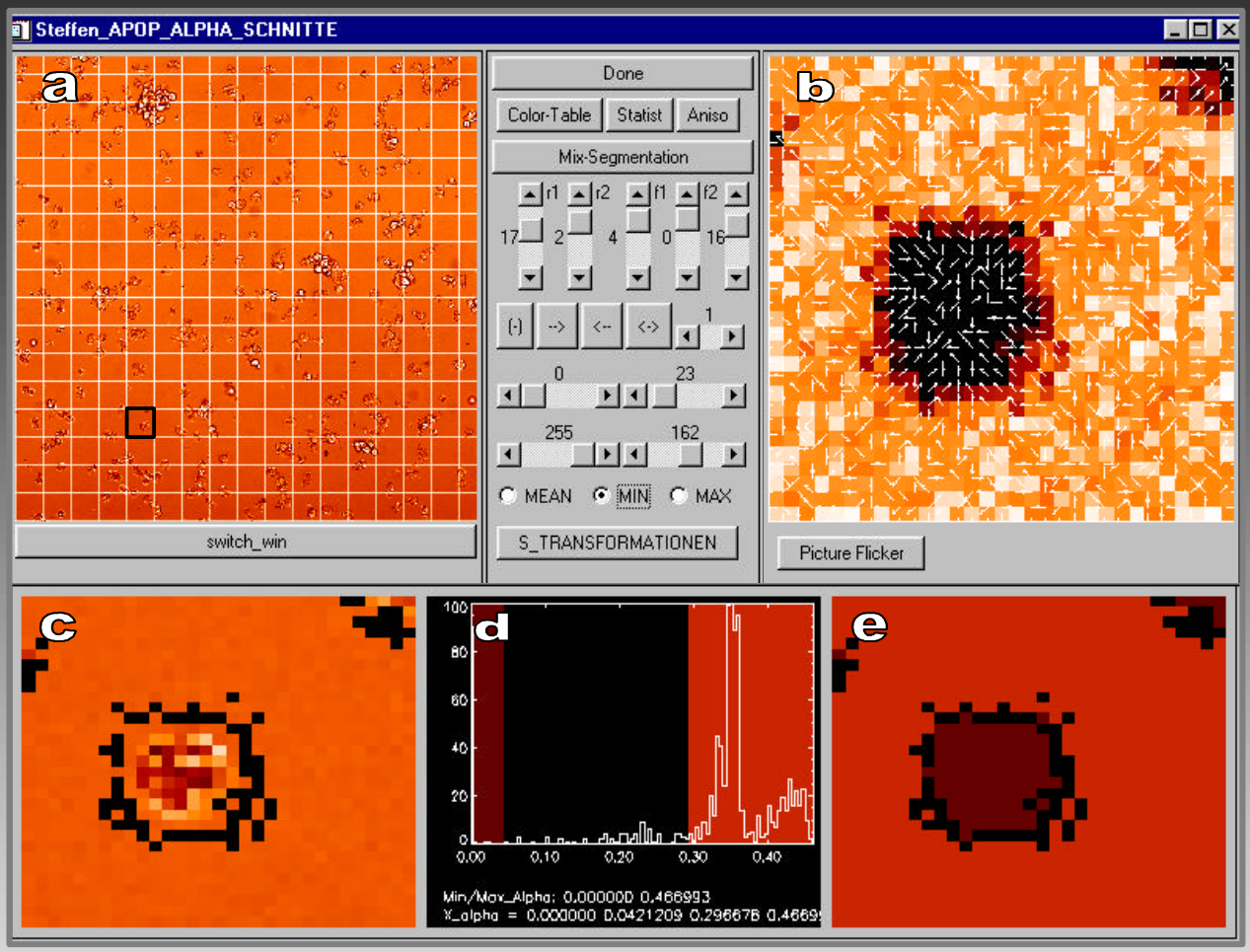


Abb.3.9.: Die interaktive Segmentierungsoberfläche des Programms 'Cell_Calc_2000'. Repräsentative Darstellung der frei intensitätsskalierten, gewichteten und anisotropen Skalierungs-Index-Methode (SIM) [s. Abb.3.8.].

[**a**]: Nach der Wahl der freien Parameter [r1,r2,f1,f2] = [2,4,0,16] (siehe Schaltfläche Mitte) wird der gewählte Ausschnitt des Durchlichtbildes (512×512 Pixel, 20x, Zeiss LSM 510) einer EL-4-Zelle transformiert. [**b**]: Durch die Wahl von MIN (alternativ MAX oder MEAN siehe Schaltfläche unten) wird für jedes Pixel jeweils der Betrag des kleinsten der 8 errechneten anisotropen α-Vektoren helligkeitscodiert dargestellt. Den minimalen α-Beträgen sind in b die normierten Richtungen der minimalen α-Vektoren überlagert. Die Richtungen sind sowohl innerhalb der Zelle als auch außerhalb stochastisch verteilt. In den Randbereichen der Zelle läßt sich hingegen klar eine vorzugsweise Ausrichtung der minimalen α-Vektoren in die Zelle hinein erkennen. [**d**]: Histogramm der in b abgebildeten α-Werte. Braun, schwarz und hellbraun codieren ausgewählte Intervalle. [**c**]: Abbildung der braun und hellbraun gekennzeichnete α-Intervalle des Originalausschnitts. [**e**]: Farbcodierte Abbildung der ausgewählten Intervalle.

In b, d und e ist klar zu erkennen, daß allein die Beträge der minimalen α-Vektoren das Durchlichtbild in Hintergrund, Randbereich und Zellinneres unterteilen. Allein die Randbereiche werden zusätzlich durch die Richtungen ausgezeichnet.

Des weiteren läßt sich anhand der deutlich ausgeprägten Trennung zweier α-Populationen im hellbraunen Hintergrundsintervall d erkennen, daß für die Generierung der Hintergrundstruktur mindestens 2 unterschiedliche Faktoren verantwortlich sein müssen.

Mit der anisotropen Methode ‘spüren’ jedoch nur jene α-Vektoren etwas vom Rand, welche ihn berühren. Das MIN($\alpha_{0\text{-}7}$)-Kriterium ordnet demzufolge jedes Pixel, in dessen Wirkungsbereich r'_2 noch ein Stück Zelle enthalten ist, auch der Zelle zu. Das MAX($\alpha_{0\text{-}7}$)-Kriterium ordnet solche Pixel hingegen dem Hintergrund zu.

Die Hintergrundintensitätsverteilung in mikroskopischen Bildern wird eher von stochastischen Ereignissen bestimmt. Die Intensitätssignale von zellulären Kompartimenten enthalten hingegen Strukturen [Kap. 3.2.4.]. Folglich sind die α-Werte des Hintergrundes durch hohe α-Werte charakterisiert [Abb. 3.7. & 2.9.].

Auch bei Untersuchungen zum diskriminativen Potential der SIM bei allgemeinen Texturs-egmentierungen hat ein zweidimensionaler anisotroper Ansatz von Räth & Morfill (1997) schon zu guten Ergebnissen geführt, auch wenn die α-Vektoren lediglich horizontal und vertikal zu jedem Pixel ausgerichtet waren.

Eine weitere Informationquelle liegt in der Struktur des Vektorfeldes, welches durch die MIN / MAX($\alpha_{0\text{-}7}$)-Vektoren erzeugt wird.

Am Beispiel des transformierten Durchlichtbildes von EL-4-Zellen läßt sich sehr schön erkennen, wie die Richtungen der MIN($\alpha_{0\text{-}7}$)-Vektoren sowohl innerhalb der Zelle als auch außerhalb stochastisch verteilt sind [Abb. 3.9.b.]. In den Randbereichen der Zelle (einem Informationsgradienten) läßt sich hingegen klar eine vorzugsweise Ausrichtung der MIN($\alpha_{0\text{-}7}$)-Vektoren radial in die Zelle hinein erkennen.

Mit diesen Vektorfeldern können lokal gemittelte Feldstärken berechnet werden, indem man über kleine Bereiche integriert. Im Inneren der Zellen und im Hintergrund mitteln sich diese weg. Kanten werden auf diese Weise stärker ausgezeichnet.

3.3 Beispiele Optimaler Segmentierung

3.3.1 Automatisierte Suche nach optimalen Transformationsparametern

Hängt ein Algorithmus zur Objektsegmentierung von mehreren Parametern ab, so muß die optimale Lösung für den Fall automatisiert gefunden werden, daß keine analytische Lösungsfunktion $\Im$ des Problems: $\Im(\mathbf{T}, I(x,y), \mathbf{G}) \rightarrow [\overline{P}_{OPT}, \alpha_{OPT}]$ existiert. Ein manuelles 'Ausprobieren' wird bei mehr als 2 freien Parametern schnell zu einer zeitlich nicht mehr zu bewältigenden Aufgabe.

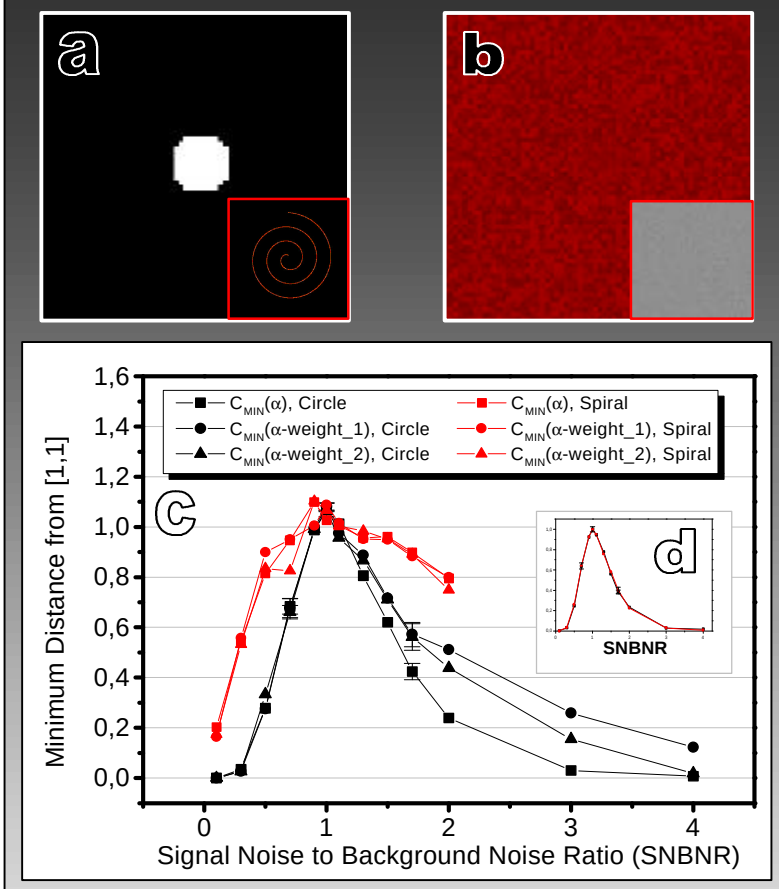


Abb.3.10.: Automatisierte optimale Segmentierung zweier Quellen in definiert verrauschten Bildern. [**a**]: Für die Kreisquelle ist $I \in [0,255]$; $\bar{I}$= 100; Standardabweichung des Hintergrundrauschens ist 9,97; [64 x 64] Pixel. Für die Spiralquelle: $I \in [0,255]$, $\bar{I}$= 144, Standardabweichung des Hintergrundrauschens ist 26, [512 x 512] Pixel. [**b**]: Beispiel für verrauschte Kreisquelle: '*Signal Noise to Background Noise Ratio' (SNBNR)* = 0,7 und für Spiralquelle: *SNBNR*= 2. [**c**]: Bildgütekriterien MIN($\|\overline{C}\|$) für Kreisquellen [-■-,-●-,-▲-] und Spiralquellen [-■-,-●-,-▲-] in Abhängigkeit des *SNBNR* für die isotrope ungewichtete α-Transformation (-■-,-■-) nach [3-18.] sowie die isotrop gewichteten (-●-,-●-) [3-19.] / (-▲-,-▲-) [3-20.] α-Transformationen. Die Transformationen hängen von 4 Parametern α (r1, r2, f1, f2) ab. Das optimale Gütekriterium ergibt sich aus $\|\overline{C}_{l/r}(\alpha_{OPT}(r1, r2, f1, f2))\|$, $r1 \in [1,3,...,13]$, $r2 \in [2, 4...,14]$, $f1 \in [0,4,..,16]$, $f2 \in [0,10,...,40]$) [3-7.]. Die eingetragenen Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen, ermittelt aus drei unterschiedlichen, gleich stark verrauschten Bildern. [**d**] Vergleichende normierte Darstellung der Gütekriterien S [3-2./3.] und Qse/sp aus [3-5./6.] sind für die Kreisquelle identisch.

Im Falle der hier genauer untersuchten α-Transformationen [$\Im$(α(r1, r2, f1, f2), I(x,y), $\mathbf{G}(\overline{C})$)] ist bislang keine solche Lösungsfunktion bekannt.

Es kann demzufolge lediglich versucht werden, aus einer Reihe automatisiert optimierter Segmentierungen Häufungspunkte der optimalen Parameter ($\overline{P}_{OPT}$) im Parameterraum ausfindig zu machen, um daraus bestimmte Regeln für die Wahl von $\overline{P}$ für zukünftige Problemstellungen abzuleiten.

Die im folgenden präsentierten Untersuchungen beschränken sich auf die isotropen Formen der α-Transformationen [3-18., 3-19. & 3-20.].

Es wurden zwei relativ einfache Quellen ausgewählt [Abb. 3.10.a.] und definiert 'verrauscht' [Abb. 3.10.b.].

Für beide Quellen ist das Bildgütekriterium MIN($\|\overline{C}\|$) in Abhängigkeit des '*Signal Noise to Background Noise Ratio' (SNBNR)* in Abb. 3.10. aufgetragen.

Die zweidimensionale Kreisquelle wird mit Hilfe der isotropen SIM allgemein mit höherer Güte erkannt als die Spiralquelle.

Im Falle der Spiralquelle erbringt die gewichtete Form [3-19.] der SIM bessere Ergebnisse als die ungewichtete Form [3-18.]. Im Fall der Kreisquelle bietet für *SNBNR* ≤ 1,1 keine der Transformationen eine signifikant bessere Segmentierungsgüte. Für *SNBNR* > 1,1 hingegen erzielt erstaunlicher Weise die ungewichtete SIM die besten Ergebnisse.

Betrachtet man die Verteilung der optimalen Radien r1 und r2 für beide Quellen in Abhängigkeit des *SNBNR* [Abb. 3.11.], so erkennt man für beide Quellen eine Häufung bei kleinen Radien r1.

Der Radius r2 ist im Falle der Kreisquelle meist nahe bei r1. Für die 'Häufungspunkte' r1 = 5, 7 und 11 gilt gar r2 = r1+2 und r2 = r1+1. Für die Spiralquelle findet man ebenfalls, daß r2 = r1 +1 für r1 > 3 annimmt.

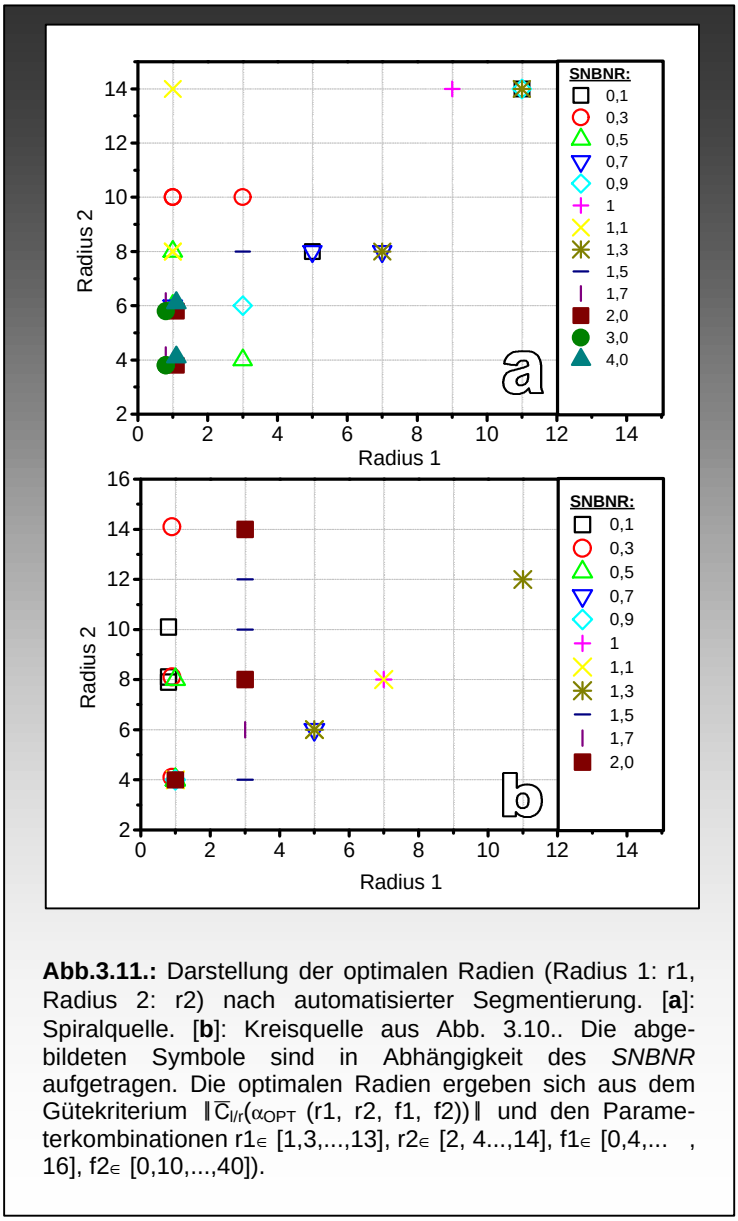


Abb.3.11.: Darstellung der optimalen Radien (Radius 1: r1, Radius 2: r2) nach automatisierter Segmentierung. [**a**]: Spiralquelle. [**b**]: Kreisquelle aus Abb. 3.10.. Die abgebildeten Symbole sind in Abhängigkeit des *SNBNR* aufgetragen. Die optimalen Radien ergeben sich aus dem Gütekriterium $\|\overline{C}_{l/r}(\alpha_{OPT}\ (r1, r2, f1, f2))\|$ und den Parameterkombinationen r1∈ [1,3,...,13], r2∈ [2, 4...,14], f1∈ [0,4,... , 16], f2∈ [0,10,...,40]).

Eine allgemeine Regel läßt sich jedoch selbst für den Fall der relativ einfachen Quellobjekte nicht ableiten. Optimierte Lösungen müssen daher für die jeweiligen Problemklassen automatisiert gefunden werden.

Die Kreisquelle wird parallel zu dieser Arbeit von Herrn Björn Poppe [Physik, Universität Bremen] in Zusammenhang mit weiteren modifizierten Formen der SIM untersucht. Die Spiralquelle von Herrn René Pompl [MPI, Extraterrestrische Physik] mit Hilfe von 'Fuzzi' modifizierten SIM-Algorithmen getestet.

3.3.2 Vergleichende Bestimmungen zur Güte optimaler Segmentierung an Durchlichtbildern von Zellen: A: Lymphozyten
B: Melanomzellen
C: EL-4-Zellen

In diesem Abschnitt sollen die in den Kapiteln 3.2.3. bis 3.2.5. vorgestellten Pixeltransformationen an drei verschiedenen Zelltypen unter Verwendung verschiedener Mikroskope und unterschiedlicher Techniken der Zellbeobachtung verglichen werden.

Bei den Zelltypen handelt es sich um Lymphozyten, Melanomzellen und EL-4-Zellen [Abb. 3.12.a./b./c.]. Die abgebildeten Lymphozyten und Melanomzellen wachsen in Kulturen nicht adherent. Durch eine Matrix aus dünn gezogenen Kollagenfäden werden sie jedoch nahe der Fokalebene eines mit Licht beheizten Objektträgers gehalten und können auf diese Weise mikroskopisch untersucht werden. Probleme hierbei sind, daß sich zum einen störende Inhomogenitäten auf dem Hintergrund durch Kollagenfäden ergeben. Zum anderen können sich die Zellen in der Z-Achse etwas bewegen. Brechungs- und Beugungsphänomene führen hier zu äußerst variablen Intensitätsverteilungen, welche jeweils die Zellen identifizieren [Abb. 3.12.a.&b.].

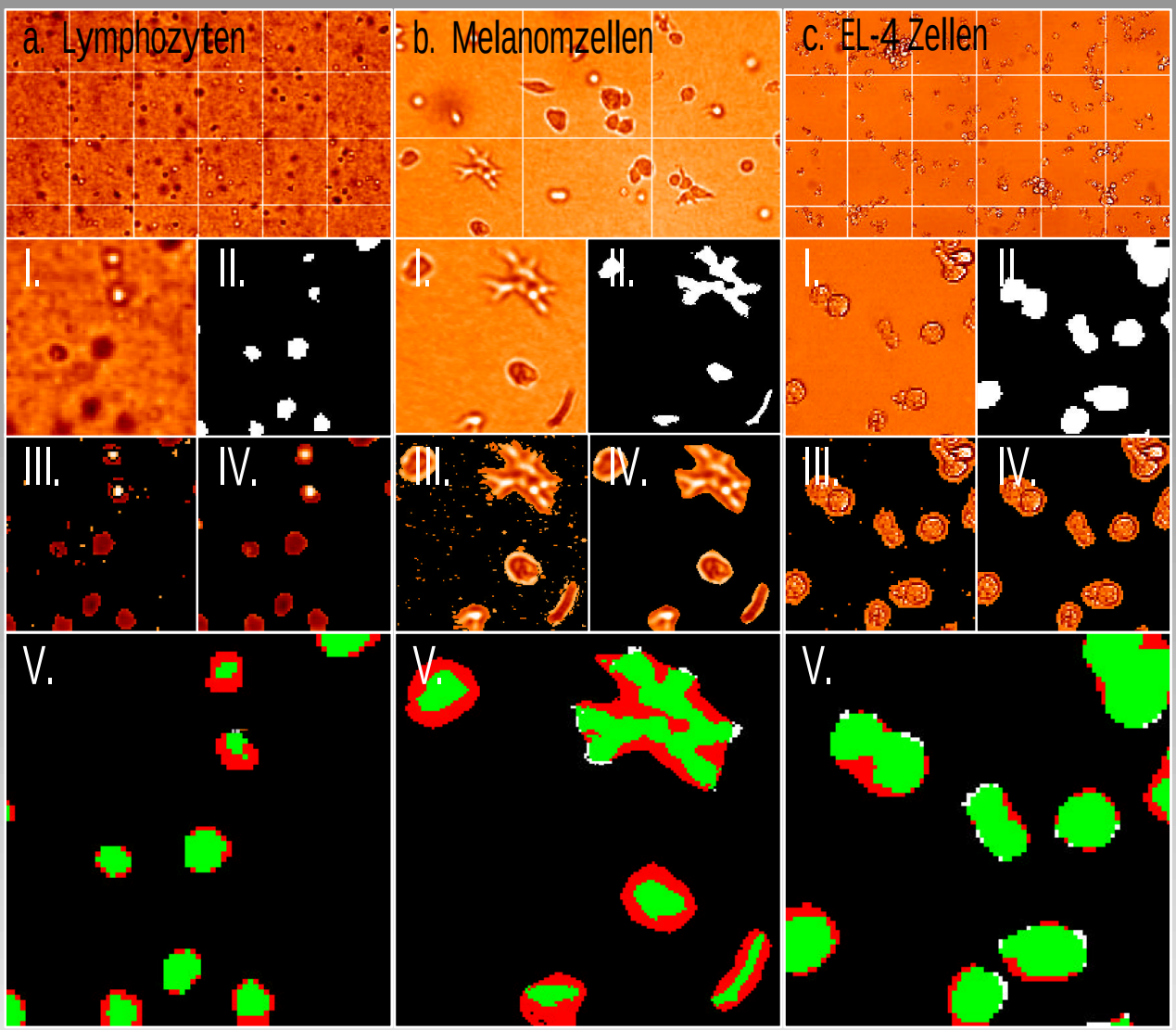
Der visuelle Eindruck, selbst von Zellen gleicher Morphologie, ist deshalb auch von Grund auf verschieden (siehe dies besonders am Beispiel der Lymphozyten in Abb. 3.12.a.). Kommen dazu noch starke Heterogenitäten in der Morphologie der Zellen, steigert dies den Schwierigkeitsgrad für Segmentierungen (s. Melanomzellen in Abb. 3.12.b.I.).

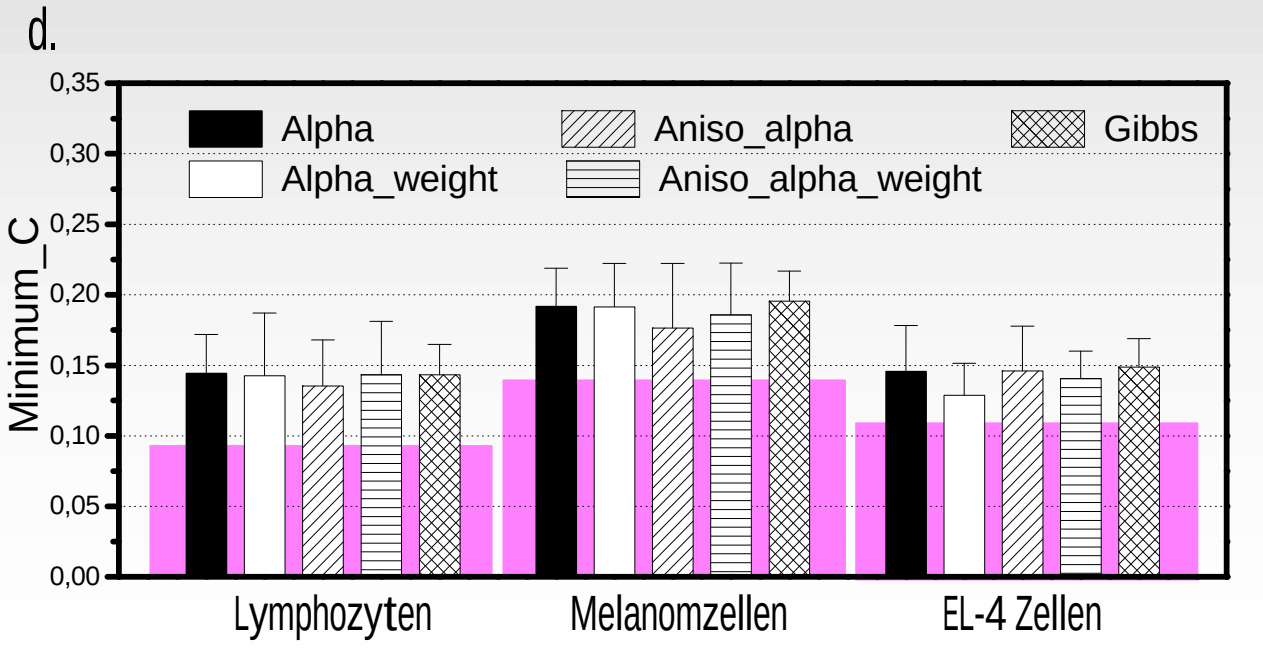
EL-4-Zellen wachsen hingegen '*quasiadherent*'. Sie heften sich, ohne daß dies zu ihrem Überleben notwendig wäre, an den Boden ihrer Kulturflächen fest und wandern in dieser zweidimensionalen Ebene recht flott umher. Dies ermöglicht es, den Fokus hinreichend genau einzustellen, so daß texturielle Eigenschaften der Zellen erkennbar werden [Abb. 3.12.c.I.].

Die Güte der Segmentierung folgender Pixeltransformationen wurde verglichen: 1. Die SIM-Methoden [3-18. bis 3-20.] und ihre Modifikationen. 2. Cliquenpotentiale / Gibbsche Energien und deren Ableitungen [3-12. bis 3-15.].

Zusätzlich wurde noch der Einfluß nachbearbeitender, variabler Erosions- und Dilatationsfunktionen mit variablen Nachbarschaftsdefinitionen auf die Güte der Segmentierungen untersucht.

Abb.3.12.: Optimale automatisierte Segmentierung von Lymphozyten [**a**], Melanomzellen [**b**] und EL-4-Zellen [**c**] mit Hilfe der modifizierten Skalierung-Index-Methoden und dem Gibbschen Potential. [**d**]: Zusammenfassende Darstellung der optimalen Segmentierungen anhand des Minimum_C-Kriteriums [Kap. 3.2.2.3]. In a/b/c I.-V. sind jeweils Ausschnitte aus den oben abgebildeten Gesamtbildern gezeigt. [a/b/c **I**.]: Originalausschnitt, [a/b/c **II**]: Benutzerdefinierte Masken als Maß für eine optimale Segmentierung. [a/b/c **III**.]: Visuelles Ergebnis der jeweils besten automatisierten Segmentierung ohne Nachbehandlung. [a/b/c **IV**.]: Visuelles Ergebnis der jeweils besten automatisierten Segmentierung mit Nachbehandlung durch Erosions- und Dilatationsfunktionen mit variabler Nachbarschaftdefinition. [a/b/c. **V**.]: Vergleichende Darstellung der manuell gefertigten Bildmaske [grün/weiß] mit dem Ergebnis der nachbehandelten automatisierten Segmentierung [grün/rot]. Rote Pixel charakterisieren die falsch positiv [fp] zugeordneten Bildpixel, grüne Pixel markieren richtig positive [rp], weiße Pixel falsch negative [fp] und schwarze Pixel die richtig negativen [rn] Bildpixel. Für die automatisierte Suche nach der besten Segmentierung wird aus [fp, rp, fn, rn] das Gütekriterium Min(C) für einen sinnvollen Bereich der möglichen Parameterkombination der einzelnen Segmentierungsfunktionen errechnet. Für die α-Transformationen wurden die Parameter im Bereich [r1 $\in$ {0-12}, r2 $\in$ {1-16}, f1 $\in$ {0-20}, f2$\in$ {0-40}] variiert, für die Gibbschen Funktionen: r1 $\in$ {0-12} und r2 $\in$ {1-16}). Abb. [**d**] zeigt die erreichbaren minimalen C-Werte für die vorgestellten Transformationen ohne Nachbehandlung (strukturmarkierte Säulen, entspricht C-Werten aus a/b/c.III.). Als breite farbunterlegte Säulen sind die durch Erosions- und Dilatationsfunktionen erreichbaren C-Werte dargestellt. Sie führen (in Abhängigkeit der Struktur des Bildes) zu Verbesserungen des Minimum_C-Kriteriums von 10% bei den EL-4 Zellen, 15% bei den Melanomzellen und bis zu 30 % bei den Thymozyten.


a. Lymphozyten
b. Melanomzellen
c. EL-4 Zellen
I.
II.
III.
IV.
V.


d.
Alpha
Aniso_alpha
Gibbs
Alpha_weight
Aniso_alpha_weight
Minimum_C
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Lymphozyten
Melanomzellen
EL-4 Zellen

Die optimale Güte (Minium_C) der verglichenen Segmentierungsalgorithmen ist in Abb. 3.12.d. dargestellt:

- Für die abgebildeten α-Transformationen wurden die Parameter im Bereich [r1 ∈ {0-12}, r2 ∈ {1-16}, f1 ∈ {0-20}, f2∈ {0-40}] automatisiert optimiert. Abgebildet sind die Gütekriterien (Minimum_C) der intensitätsskalierten α-Transformation (Alpha, [3-18.]), der ‚gewichts-modifizierten' α-Transformationen (Alpha_weight, [3-19.]), die beste der drei Lösungen (Min(α), Max(α) oder Mean(α)) der anisotropen, ungewichteten α-Transformationen (Aniso_alpha) und die beste der drei Lösungen der anisotropen, gewichteten α-Transformationen (Aniso_alpha_weight, s. Abb. 3.8.).
- Als Repräsentant der drei vorgestellten Gibbschen Transformationen [3-12., 3-13. & 3-14.] wird nur die jeweils beste Lösung aufgetragen.

Es bestätigt sich, was in [Kap. 3.2.5.] bereits vermutet wurde. Alle umgebungsabhängigen Pixeltransformationen liefern Segmentierungsergebnisse von vergleichbarer Güte. Die gewichtete Form der α-Transformationen kann ihren Vorteil allem Anschein nach nur bei kleinen Radien ausspielen (vergleiche Abb. 3.7.). Nur bei den EL-4-Zellen scheinen die gewichteten Transformationen eine, wenn schon nicht im Sinne der Statistik signifikante, so doch eine wahrnehmbar bessere Segmentierung zu liefern.

Der Einfluß nachbereitender Dilatations- und Erosionsoperationen hinsichtlich der erreichbaren Güte der Segmentierung für die verschiedenen Zellklassen wurde ebenfalls untersucht.

Zu diesem Zweck wurde die von der automatisierten Segmentierung gelieferte optimale ‘rohe‘ Bildmaske [Abb. 3.12.a./b./c.III.] bis zu drei sukzessiven Dilatations- oder Erosionsoperationen unterzogen. Die Definition der Nachbarschaft von 0 bis zu 8 Pixeln konnte dabei jeweils frei eingestellt werden. Durch diese Operationen werden Lücken geschlossen, Rauschpixel entfernt und Objektgrenzen im allgemeinen geglättet.

Bei den EL-4-Zellen brachten diese Operationen eine Verbesserung des Minimum_C-Wertes von Durchschnittlich 10%, bei den Melanomzellen um 15% und bei den Lymphozyten um ganze 30% (siehe dazu auch Abb. 3.12.d., rosa Felder) !

Verbesserungen in dieser Größenordnung rechtfertigen den Einsatz von Dilatations- und Erosionsoperationen für Nachbehandlungen.

Die derart ‘aufbereinigten‘ Bildmasken sind in Abb. 3.12.a./b./c. IV.&V. dargestellt, um einen Eindruck von der erreichten Güte der Segmentierungen zu vermitteln. Die Zellen werden fast perfekt lokalisiert, d.h. die Schwerpunkte der Masken und der Zellen stimmen allgemein sehr gut überein.

Die Randstrukturen werden jedoch im Falle der Melanomzellen nicht immer der Feinheit ihrer Strukturen gerecht. Besonders komplizierte Strukturen (Abb. 3.12.b.V.: Zelle rechts oben) werden geglättet. Die grobe Struktur der Zellen wird jedoch durchaus erkannt.

3.4 Probleme bei der mikroskopischen Bestimmung lokaler Fluoreszenzintensitäten

Nachdem im vorangestellten Kapitel die Güte der entwickelten Segmentierungsalgorithmen an verschiedenen Beispielen aufgezeigt wurde, soll hier noch eine mögliche Anwendung allgemeiner Natur besprochen werden.

Eines der hohen Ziele der mikroskopischen Messung von Fluoreszenzintensitäten $I(\Delta x, \Delta y, \Delta z, \Delta t, \Delta\lambda)$ in einem definierten Volumen $(\Delta x, \Delta y, \Delta z)$ im Zeitintervall (Δt) und dem Wellenlängenbereich $(\Delta\lambda)$ ist es, möglichst genau die Anzahl der fluoreszierenden Moleküle N in diesem Raumbereich bestimmen zu können.

Im Idealfall ist $I(\Delta x, \Delta y, \Delta z, \Delta t, \Delta\lambda)$ direkt proportional zu $N(\Delta x, \Delta y, \Delta z) \cdot t$. In der Realität müssen eine Reihe von Prozessen und Eventualitäten unbedingt Beachtung finden. Es lassen sich grob zwei Problemgruppen unterscheiden:

1. Intrinsische Prozesse der Fluoreszenzsonden in der Probe auf molekularer Ebene:

- Statisches oder dynamisches Quenching.
- Reabsorbtion emittierter Photonen oder strahlungsloser Energietransfer.
- Reversibles oder irreversibles Ausbleichen des Fluorophors (*Photobleaching*).

2. Räumliche und zeitliche Inhomogenitäten der gesamten Meßapparatur (exemplarisch):

- Geometrie der Probe.
- Inhomogene Beleuchtung von Objekten.
- Chromatische Aberrationen der Optik.
- '*Pin Hole*'-Justierung und Verstärkereigenschaften.

Erstgenannte Gruppe betrifft allgemeine Probleme der quantitativen Fluoreszenzanalytik [Lakowicz 1983] und soll an dieser Stelle keine weitere Beachtung finden.

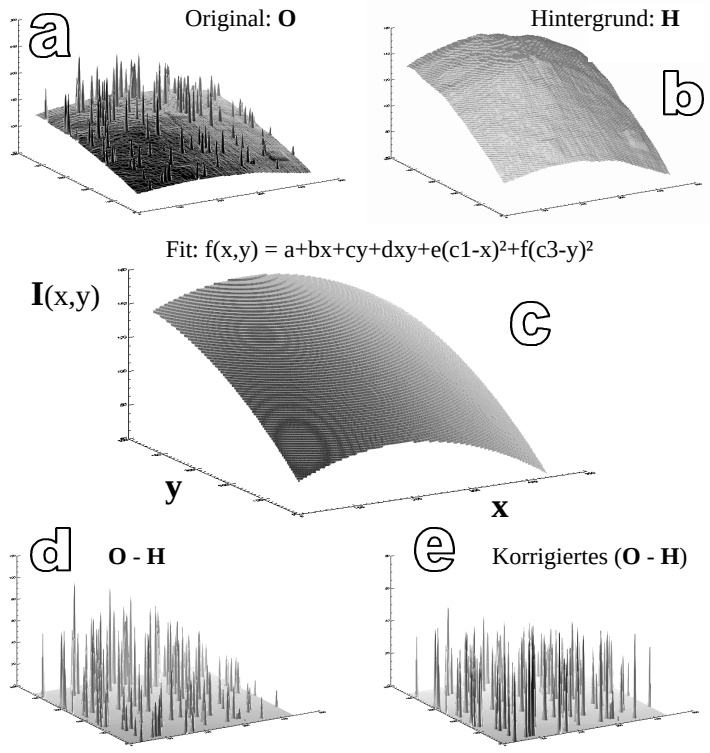


Abb.3.13.: Automatisierte *in situ* '*Flat-Flied*'-Korrektur mit Hilfe einer automatisierten Segmentierung. Es sind jeweils die Intensitäten I(x,y) in Abhängigkeit der Koordinaten x und y aufgetragen. Als Beispiel dient ein Fluoreszenzbild von mit Acridine Orange markierten EL-4-Zellen (512×512 Pixel, 20x, Zeiss LSM 410). [**a**] Originalaufnahme. [**b**] Von Zellen gesäuberter, interpolierter Hintergrund. [**c**] Resultat eines '*Least Square Fittings*' der angegebenen Funktion 2ter Ordnung in x und y. [**d**] die aus a direkt segmentierten Zellen. [**e**] Mit der in c abgebildeten Hintergrundfunktion korrigierte Fluoreszenzintensitäten der Zellen.

Für eine Korrektur der gemessenen Fluoreszenzwerte können in erster Nährung die in Gruppe 2 aufgeführten Probleme zu einem linearen Modell reduziert werden [Netten 1997].

3.4.1 Mögliche Anwendung einer optimalen, automatisierten Segmentierung für *in situ* *Flat field*-Korrekturen

Das Prinzip der interaktiven, automatisierten *in situ Flat-Field*-Korrektur mit Hilfe einer automatisierten Segmentierung ist in Abb. 3.13. dargestellt.

Für einige mikroskopische Anwendungen lassen sich inhomogene Ausleuchtungen in der Bildebene nicht immer vermeiden. Diese haben naturgemäß einen direkten Einfluß auf die an der Stelle (x,y) gemessene Fluoreszenzintensität [Abb. 3.13.a./d.].

Um diese sehr unwillkommenen Erscheinungen in erster Nährung zu korrigieren, wird oft die sogenannte *Flat-Field*-Korrektur verwendet [3-21. & 3-22., Netten 1997]:

F(x,y) ist hier die Fluorophordichte bei (x,y). D(x,y,t) ist die integrale Dunkelsignalverteilung des Systems und C(x,y) eine Korrekturfunktion.

Für den von Netten beschriebenen Ansatz ist die Aufnahme zweier Kalibrierungsbilder vor der Messung einer Bildserie erforderlich. Ein ‘Dunkelstrombild’ D(x,y,t) und ein ‘weißes’ Bild W(x,y,t) mit einem homogenen Hintergrund [F(x,y) = ***c***]. Daraus errechnet sich dann die korrigierte Intensität I’(x,y,t) [3-22.].

$$I(x,y,t) = D(x,y,t) + C(x,y) \cdot F(x,y) \cdot t \quad \text{[3-21.]}$$

$$I'(x,y,t) = c \cdot \frac{I(x,y,t) \cdot D(x,y,t)}{W(x,y,t) - D(x,y,t)} \quad \text{[3-22.]}$$

Das Problem bei dieser Herangehensweise ist, daß von zeitlich und räumlich konstanten Ausleuchtungsinhomogenitäten ausgegangen wird. Diese sind aber meist gerade nicht zeitlich konstant.

Besonders wenn von verschiedenen Bereichen eines Objektträgers Aufnahmen gemacht werden müssen, können sich auch hier jedesmal die Bedingungen ändern.

Es ist möglich, mit Hilfe der in [Kap. 3.3.] beschriebenen automatisierten Segmentierungsalgorithmen in jedem Bild Zellen und Verunreinigungen direkt vom Hintergrund zu trennen. Angenommen wird nun, daß die Hintergrundsignale durch eine Kombination eines räumlich konstanten Offsets und den in [Kap. 3.2.] besprochenen Inhomogenitäten bei konstanter Verteilung der Fluorophore im extrazellulären Medium zustande kommen.

Es lassen sich einfache Funktionen zweiter Ordnung finden (s. f(x,y) in Abb. 3.13.c.), welche die Hintergrundverteilung hinreichend gut beschreiben. Mit Hilfe der ermittelten Fit-Parameter, einem additiven und einem multiplikativen Faktor, kann dann die Korrektur der Fluoreszenzverteilung in der Bildebene erfolgen [Abb. 3.13.d. ➡ Abb. 3.13.e.]. Auf diese Weise kann eine zu jedem Zeitpunkt und an jedem Ort aktuelle, automatisierte Korrektur vorgenommen werden.

3.5 PARAMETER ZUR CHARAKTERISIERUNG SEGMENTIERTER OBJEKTE

3.5.1 DEFINITION DER ZELLRÄNDER UND DIE FREEMAN-KETTENCODIERUNG

Bei der Freeman-Kettencodierung [Freeman 1970] werden die Objektränder nach der eindeutigen Festlegung eines Anfangspunktes (z.B. [$x_{min} \in \{y_{min}\}$, $y_{min} \in \{Rand\}$]) im mathematisch positiven Sinn einmal ganz umlaufen und die Richtung der aufeinanderfolgenden Punkte nach Freeman mit einem Nummerncode belegt [Abb. 3.14.].

Außer der speichergünstigen, vollständigen Beschreibung der Lokalisierung von Objekten bietet der Codevektor Möglichkeiten zur Ableitung von Objektflächen, von Randumfang [Kap. 3.5.2.] und einiger Formparameter [3-23. & 3-25.], da er bereits grob die Richtung der Tangentialvektoren an der Randtrajektorie beschreibt.

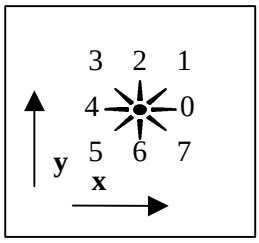


Abb.3.14.: Numerierter Kettencode nach Freeman (1970).

3.5.2 LÄNGENMESSUNG DER ZELLRÄNDER

Sind die Randpixel der Zellen definiert [Kap. 3.5.1.], können die Längen der Ränder nach Dorst & Smeulders (1986) durch einfaches Abzählen der Randpixel grob abgeschätzt werden. Dieser einfache Algorithmus führt jedoch zu einer Überbewertung der tatsächlichen Randlängen von mehr als 10% [Young *et al.* 1997].

Eine bessere Bewertung der tatsächlichen Randlänge wird durch eine Einteilung der Randpixel in gerade, Diagonal- und Eck-Pixel erreicht:

1. *Gerade Pixel* **(P_g)** definieren die Randtrajektorie entlang der x- oder der y-Richtung der Bildmatrix.
2. *Diagonal-Pixel* **(P_d)** definieren die Randtrajektorie entlang einer xy-Diagonalen der Bildmatrix.
3. *Eck-Pixel* **(P_e)** definieren die Richtungswechsel der Randtrajektorie um 180°.

Nach dieser Klassifikation werden die Randpixel separat abgezählt und die Länge ***P*** der Trajektorie durch unterschiedliche Gewichtung der Pixelklassen mit den Gewichtungsfaktoren α, β und γ nach [3-23.] abgeschätzt:

$$P = \alpha \cdot N_g + \beta \cdot N_d + \gamma \cdot N_e \qquad , N_{g,d,e} = \sum P_{g,d,e} \qquad \text{[3-23.]}$$

Die von Freeman (1970) eingeführten Gewichtungsindizes (α=1, β=1.414 & γ=0) überbewerten die Randlängen um immerhin 9%. Die von Kulpa (1977) verwendeten Indizes (α=0.9481, β=1.3481, γ=0) verfälschen die tatsächlichen Randlängen noch um 5%.

Erst die Miteinbeziehung der Eckpunkte nach Vossepoel & Smeulders (1982) (α=0.98, β=1.406, γ=-0.091) ermöglicht eine zuverlässige Bestimmung der Randlänge, wobei der Fehler 1% unterschreitet.

3.5.3 Zirkularität und Grenzenergie

Eine Vielzahl von Formparametern ist in der Vergangenheit entwickelt worden, um die **Zirkularität** von Objekten zu klassifizieren, beispielsweise der vergrößerungsinvariante Zirkularitätsparameter **Z** [3-24.]. **A** ist die Fläche des Objektes (Anzahl der Pixel).

$$Z = \frac{P^2}{4 \cdot \pi \cdot A} \qquad [3\text{-}24.]$$

Anwachsende Abweichungen von Kreisformen (**Z** = 1) werden mit ansteigenden **Z**-Werten verbucht.

Als weiteres Maß für Zirkularität wird die **Randenergie** von Objekten verwendet. Dieses von Young *et al.* (1974) eingeführte Konzept quantifiziert die aufzuwendende 'Energie', welche nötig ist, einer geschlossenen Randtrajektorie der Länge ***P*** ihre jeweils spezifische Form zu geben.

Die zu leistende Verformungsarbeit $\mathbf{E_G}$ oder die Verformungsarbeit pro Einheitslänge $\bar{E}_G = \mathbf{E_G} / \boldsymbol{P}$ ergibt sich aus dem Integral der Biegungen K(p) des Randes. K(p) wird mit Hilfe der inversen Biegungsradien r(p) der Randtrajektorie bestimmt [3-25.].

$$\bar{E}_C = \frac{1}{P} \cdot \oint_P |K(p)|^2 dp \qquad , K(p) = \frac{1}{r(p)} \qquad [3\text{-}25.]$$

Die Tangenten an der Randtrajektorie um den Punkt p definieren dabei ebenfalls die Tangenten am Biegungskreis mit Radius r. Der Kreis zeichnet sich durch minimale Grenzenergie aus.

Ebenfalls Verwendung findet der Abstandsparameter $\bar{D}$ [3-26., Danielson 1978]. Die **Randdistanz** $\bar{D}$ ist definiert als der mittlere minimale Abstand D_{min} der Objektpunkte zu den Randpunkten des Objektes der Fläche A = N.

$$\bar{D} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^{N} (D_{\min})_i \qquad [3\text{-}26.]$$

Die dazu nötige Distanztransformation wird durch sukzessive Anwendung des auf der Minkowski-Subtraktion basierenden Erosionsoperators $E(A,B) = A \{-\} -B = \cap_{\beta \in B} (A - \beta)$ erreicht, bis alle Objektpunkte verschwunden sind.

A ist in diesem Fall das Originalbild und B das um den 8-Rand verkleinerte Strukturelement [Young *et al.* 1997].

3.5.4 Invariante Momente und Exzentrizität

Flächennormierte Schwerpunktsmomente höherer Ordnung werden erfolgreich bei der Formklassifikation von Objekten angewendet [Castleman 1996]. Sie separieren Buchstaben [Alt 1962], Chromosomen [Butler *et al.* 1964], aber auch Zellklassen [Netten 1997].

Die Momentenschar $\{M_{jk}: j,k \in \mathbb{N}_+\}$ einer Funktion f(x,y) ist nach [3-27.] definiert. $\{M_{jk}\}$ und f(x,y) definieren sich gegenseitig eindeutig. Bei der Klassifizierung der Form zweidimensionaler binärer Objekte ist f(x,y) innerhalb des Objektes gleich 1 und 0 außerhalb.

M_{00} ergibt, wie leicht ersichtlich, direkt das Flächenintegral (M_{00}= **A**), M_{10} und M_{01} ergeben die Flächenverteilung des Objektes relativ zum ursprünglichen Koordinatensystem {X,Y}.

$$M_{jk} = \int_{-\infty}^{\infty}\int_{-\infty}^{\infty} x^j \cdot y^k \cdot f(x,y)dxdy \qquad [3\text{-}27.]$$

$$\bar{x} = \frac{M_{10}}{M_{01}} \qquad \bar{y} = \frac{M_{01}}{M_{00}} \qquad [3\text{-}28.]$$

$$\mu_{jk} = \int_{-\infty}^{\infty}\int_{-\infty}^{\infty} (x-\bar{x})^j \cdot (y-\bar{y})^k \cdot f(x,y)\,dxdy \qquad [3\text{-}29.]$$

$$Exc. = \sqrt{\mu'_{20}/\mu'_{02}} \qquad [3\text{-}30.]$$

Nach Transformation auf die Schwerpunktskoordinaten [3-28.] der Objekte kann die translationsinvariante (zentrale) Momentenschar $\{\mu_{jk}\}$ bestimmt werden [3-29.].

Nun besitzt jedes scheibenförmige Objekt mindestens 2 Hauptrotationsachsen {X‘,Y‘}, um die es entweder stabil oder labil gleichförmig rotieren kann.

Der Winkel θ zu einer der zueinander rechtwinkligen Hauptrotationsachsen ist durch die zentralen Momente zweiter Ordnung definiert: $\tan(2\cdot\theta) = 2\cdot\mu_{11}/(\mu_{20}-\mu_{02})$.

Durch Festlegung der resultierenden rotationsinvarianten Momente ($\mu'_{20} < \mu'_{02}$ und $\gamma'_{03} > 0$), können Zweideutigkeiten um 90°- und 180°-Drehungen vermieden werden.

Nach abschließenden Flächennormierungen ergeben sich schließlich die so bezeichneten **Invarianten Momente** (invariant gegen Translation, Rotation oder Vergrößerung eines Objektes). Lediglich die Form der Objekte ist nun noch als Information in dieser Momentenschar enthalten.

Die **Exzentrizität (Exc.)** als Formparameter eines Objektes kann nach Gonzales & Woods (1990) definiert werden [3-30.].

Kreisförmige Objekte mit ggf. zentralsymmetrischer Intensitätsverteilung erhalten danach die maximal mögliche Exzentrizität von 1.

In Abb. 3.15. sind verschiedene Objekte relativ zu den Beobachtungsachsen {X,Y} in grau und relativ zu den ihnen eigenen Hauptrotationsachsen {X‘,Y‘} in schwarz dargestellt. In Tab. 3.2. sind die berechneten Momente dieser Objekte aufgeführt.

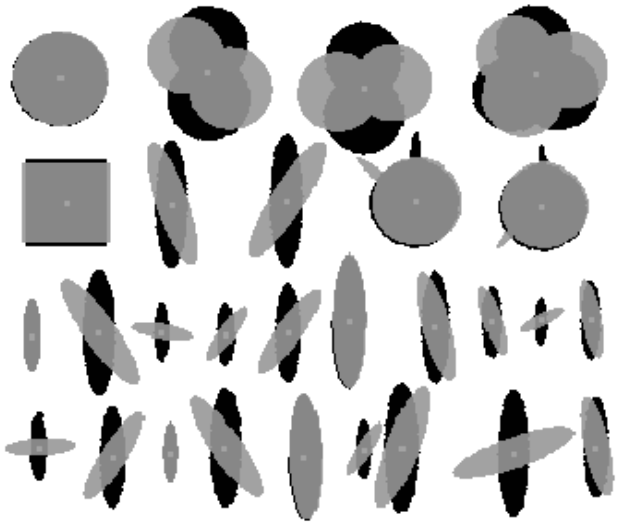


Abb.3.15.: Zweidimensionale Objekte vor (grau) und nach (schwarz) der Ausrichtung hinsichtlich ihrer Hauptrotationsachsen. X‘ und Y‘ sind eindeutig bestimmt. Die Objekte werden durch ($\mu'_{20} < \mu'_{02}$ und $\gamma'_{03} > 0$) nach ihrer ‘Birnenform‘ ausgerichtet (siehe Text & Tab. 3.2.).

M_{00} = A, Fläche	2026	2525	2618	3269	2021	1849	1745	-
μ_{11}	1209	105458	-316490	18507	0	-31482	14277	-
μ_{20} μ_{02}	326778 326621	892266 316080	740444 558638	995860 809373	371864 311234	295273 273010	248234 245289	-
θ [°]	43.1	-37.0	10.1	5.6	0.0	-35.3	42.1	-
μ'_{20} μ'_{02}	0.08 0.08	0.047 0.143	0.047 0.143	0.076 0.093	0.076 0.091	0.073 0.093	0.077 0.086	$0.0198 \pm 1.1 \cdot 10^{-7}$ $0.319 \pm 2.8 \cdot 10^{-5}$
Exc. $(\mu'_{02}/\mu'_{02})^{-2}$	1.0	0.57	0.57	0.9	0.91	0.89	0.94	$0.25 \pm 1.7 \cdot 10^{-5}$

Tab.3.2.: Momente der in Abb.3.15. abgebildeten binären zweidimensionalen Objekte. Die zentralen Momente erster Ordnung verschwinden erwartungsgemäß. Die Invarianten Momente μ'_{20} und μ'_{02} repräsentieren die Momente um die Hauptrotationsachsen {X',Y'} der Objekte. Die Exzentrizität der 21 abgebildeten Ellypsen gleicher geometrischer Exzentrizität lassen sich mit hoher Genauigkeit bestimmen (Fehler < 10^{-5} %). Einzelne Zellen lassen sich von Doppelzellen anhand ihrer Exzentrizität gut trennen.

Um die Güte des Parameters Exzentrizität zu testen, wurden 21 Ellipsen mit gleicher geometrischer Exzentrizität (a/b) in unterschiedlicher Orientierung und in verschiedener Vergrößerung abgebildet [Abb. 3.15.].

Die Standardabweichung der resultierenden Exzentrizitäten wurden mit < 10^{-5} % berechnet [Tab. 3.2.]. Einzelne Zellen lassen sich anhand der Exzentrizität ebenfalls gut von Doppelzellen trennen.

Größere Zellklumpen, welche wieder eher kreisförmig sind, müssen anhand ihrer Fläche aussortiert werden.

3.5.5 Invariante Momente als Texturparameter

Will man die Grauwertverteilung eines Objektes I(x,y) bei einer bestimmten Wellenlänge λ als zusätzliche Information berücksichtigen, bieten sich ebenfalls eine Reihe von Parametern an. Diese können Rückschlüsse auf Stoff-, Massen- oder Fluiditätsverteilungen ermöglichen.

Gleich eine ganze Parameterschar erhält man, wenn in [3-29.] $f(x,y) = I_\lambda(x,y)$ gesetzt wird und die invarianten Momente auf diese Art für ein intensitätsgewichtetes Objekt bestimmt werden. Auch hier können entweder die integralen Momente ($\mathbf{I\text{-}\mu}_{ij}$) oder die intensitätsnormierten Momente ($\mathbf{I\text{-}\mu'}_{ij}$) verwendet werden.

Interessant wird die Momentenschar besonders, wenn bei fluoreszenzmarkierten Objekten $I_\lambda(x,y)$ proportional zur Dichte der Fluorophore N(x,y) angenommen werden kann.

3.5.6 Die Haralickschen Texturmaße

Die Haralickschen Texturmaße Entropie **S** [3-34.]**,** Kontrast **K** [3-33.]**,** Chiquadrat: **Ch²**, Kappastatistik: **k**., Inverse-Momenten-Differenz: **dμ** [3-32.] und das *2nd Angular-Moment*: **AM²** [3-31.] werden als skalare Maße zur Charakterisierung der rotationsunabhängigen *Cooccurrance* Matritzen **P** dim[**k** × **l**] verwendet [Haralick 1979].

Diese beinhalten nach Lehmann (1997) die volle Information über die statistische Struktur eines betrachteten homogenen Feldes.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die aufgeführten Parameter zur Charakterisierung der Textur segmentierter Objekte verwendet.

Für jedes Pixel eines segmentierten Objektes **I**(x,y) ∈ [0,255] wurden ebenfalls drei Intensitätsdichten $\mathbf{D_{4/10/25}}(x,y)$ bestimmt. Dafür wurde die Intensitätsskala [0,255] in 4, 10 und 25 Intervalle unterteilt und auf das Intervall [0,1] projiziert.

$$AM^2 = \sum_{xy} P^2(x,y) \qquad [3\text{-}31.]$$

$$d\mu = \sum_{xy} \frac{1}{1+(x+y)^2} P(x,y) \qquad [3\text{-}32.]$$

$$K = \sum_{xy} (x+y)^2 P(x,y) \qquad [3\text{-}33.]$$

$$S = \sum_{xy} P(x,y)\log(P(x,y)) \qquad [3\text{-}34.]$$

Aus diesen Größen berechnen sich die Gesamt-Intensitäts-Entropie **S(I)**, die Gesamt-Dichte-Entropien $\mathbf{S(D_{4/10/25})}$ der Objekte sowie deren flächennormierte Ableitungen **S(I)'** und $\mathbf{S(D_{4/10/25})'}$. Dafür wird in 3-31. bis 3-34. **P**(x,y) = **I**(x,y), bzw. $\mathbf{D_{4/10/25}}(x,y)$ gesetzt und über alle xy des Objektes summiert.

Des weiteren können für jedes Pixel innerhalb eines Objektes Intensitäts- und Dichtedifferenzen bestimmt werden. Dafür werden innerhalb eines Verschiebungsradius **r** ∈ [1,2,4] die Größen 3-33. und 3-34. für jedes Pixel berechnet.

Für jede Größe $\mathbf{X}(x_0,y_0|\mathbf{r})$ in 3-33. und 3-34. wird dabei über alle $x_i,y_i \in$ mit $([x_0-x_i]^2+[y_0-y_i]^2) < \mathbf{r}^2$ summiert. $(x+y)^2$ wird durch $([x_0-x_i]^2+[y_0-y_i]^2)$ ersetzt und $\mathbf{P}(x_i,y_i)$ entweder durch $\|\mathbf{I}(x_0,y_0) - \mathbf{I}(x_i,y_i)\|$ oder durch $\|\mathbf{D_{4/10/25}}(x_0,y_0) - \mathbf{D_{4/10/25}}(x_i,y_i)\|$.

Der Logarithmus in 3-34. wird dann über $(1 + \mathbf{P}(x_i,y_i))$ gebildet, um auf jeden Fall im Definitionsbereich der Funktion zu liegen. Letztendlich werden wieder Integrale oder deren flächennormierte Ableitungen für jedes Objekt bestimmt, um einen einzigen skalaren Parameter zu erzeugen.

Diese Maße wurden hauptsächlich zur Charakterisierung der Umstrukturierung der *Nucleoli* im Kern von HCE-Zellen während apoptotischer Prozesse entwickelt [Kap. 5.4.3.4.].

Hier sind es gerade Textureigenschaften, die aus Umverteilungen des Erbmaterials im Kern hervorgehen (sog. Chromatinkondensationsprozesse, beobachtet in sehr frühen Phasen der *Apoptosis*), die zur Quantifizierung der *Apoptosis* mittels Bildverarbeitung verwendet werden können.

3.6 Multi - Parameter - Daten - Analyse mit Hilfe einer modifizierten Form der Hauptachsentransformation

Unter zwei Aspekten ist die Durchführung von Hauptachsentransformationen für die Analyse der anfallenden Daten für jede gemessene Zelle besonders interessant:

1. Redundante Informationen (korrelierende Parameter) werden nach der Lösung des Eigenwertproblems in orthogonale Eigenvektoren zusammengefaßt. Für spätere Auswertungen braucht man nur noch einen Repräsentanten einer Gruppe zu berücksichtigen [Härtel *et al.* 1999].

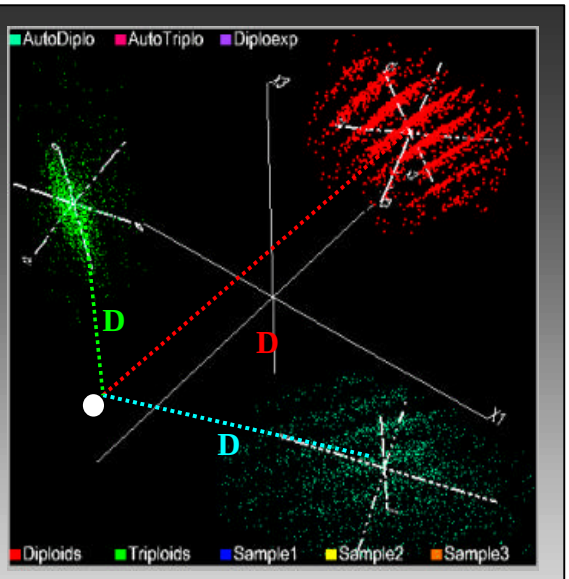


Abb.3.16.: Schematische dreidimensionale Darstellung unabhängiger Hauptachsentransformationen dreier Zellpopulationen relativ zum ursprünglichen Parametersystem [X1,X2,X3]. Für ein zu klassifizierendes Objekt (weißer Punkt), werden die Distanzen D relativ zu jedem Hauptachsensystem berechnet. Dabei werden die Eigenwerte der jeweiligen Hauptachsen als Gewichte mit in die Distanzberechnung einbezogen, um der besonderen Charakteristik jeder Punktwolkenverteilung Rechnung zu tragen [3-35.]. Die minimale Distanz D entscheidet, zu welcher Population das Objekt zugeordnet wird.

2. Durch die graphische Darstellung der Daten in ihrem Hauptachsensystem kann ein Maximum an Information in einer möglichst gering dimensionierten Graphik erfolgen.

3. Eine schnelle und sinnvolle Klassifikation von zu klassifizierenden Objekten läßt sich mit Hilfe des modifizierten minimalen Distanzkriteriums **D** durchführen:

$$D = \sqrt{\sum_i \left(x_i / \sqrt{\lambda_i}\right)^2} \qquad [3\text{-}35.]$$

Zur Berechnung von D werden zuerst die Hauptachsendarstellungen zu jeder Referenzpopulation berechnet, wobei auch die Eigenwertschar (λ_i) zu jeder der Hauptachsentransformationen abfällt.

Die Eigenwerte repräsentieren dabei gerade die Varianzen der Datenwolkenverteilungen bezüglich jeder Hauptachse (zur Durchführung der Matrixoperationen für Hauptachsentransformationen sei auf Standardwerke multivariater statistischer Analysen verwiesen (Anderson 1984 oder speziellere Werke wie Fine 1996).

Für die Klassifizierung einer Zelle werden dann die Distanzen der Zellparameter relativ zu jedem der Hauptachsenzentren berechnet [3-35.]. Der Summenindex i beschreibt jeweils alle Hauptachsen eines Systems. X_i sind demnach die Koordinaten der zu klassifizierenden Zelle im jeweiligen Hauptachsensystem.

Als Maß, wie gut zwei Populationen im Parameterraum voneinander getrennt werden können, wurde die diskriminative Kapazität ***C*** definiert [3-36.]. 1-, 2- und 3-dimensionale normalisierte Dichteverteilungen $(d_{a/b})_x$ der Gruppen a und b wurden dazu berechnet. ***C*** ist sodann die Wahrscheinlichkeit, daß jeder Repräsentant einer Gruppe korrekt in seine Gruppe zugeordnet werden kann (x = {i / i,j / i,j,k /...} für 1- / 2- / 3- /... Dimensionen). C_x ist 1 für vollständig getrennte Gruppen und 0,5 für vollständig überlagernde Verteilungen.

$$C_x = \sum_x (d_a)_x \cdot \left(\frac{(d_a)_x}{(d_a)_x + (d_b)_x} \right) \qquad [3\text{-}36.]$$

4. KAPITEL:

MEMBRANDYNAMIK & FLUORESZENZ

4.1 FLUORESZENZMETHODEN IN DER SPEKTROSKOPIE UND DER MIKROSKOPIE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DYNAMIKRELEVANTER MEMBRANPARAMETER

4.1.1 MOTIVATION

Lipidmembranen in biologischen Systemen weisen sich vor allem durch zwei wichtige Eigenschaften aus. Zum einen bilden sie die grundlegenden Strukturelemente von Zellen, indem sie abgeschlossene Kompartimente ausbilden und funktionale Einheiten, die Proteine, ein- oder anlagern. Zum anderen greifen sie direkt in biochemische Prozesse ein, indem einzelne Lipid-Komponenten an Rezeptoren binden (vergl. Kap. 2.6.).

Im weiteren können Membranen über ihre dynamische Struktur mit assoziierten Proteinen wechselwirken und deren Funktion entscheidend beeinflussen. Die dynamische Struktur bestimmt außerdem die Permeabilität der Membranen für Ionen und kleinere Biomoleküle und nimmt somit Einfluß auf den gesamten zellulären Stoffwechsel (vergl. Tab. 4.1.).

Bislang sind selbst an einfachen Lipidsystemen nicht alle grundlegenden dynamisch-strukturellen Eigenschaften hinreichend geklärt. Dazu gehört, obwohl die Wechselwirkungen im einzelnen bekannt sind, das nach wie vor lückenhafte Verständnis des Phasenverhaltens eines Vielteilchen-Systems.

Zu einfachen Lipidsystemen werden synthetische Lipid-Monoschichten, Mycellen, Lipid-Doppelschichten und Liposomen gezählt. Ein komplexeres Modellsystem für Untersuchungen stellen Mikrosomen dar. Diese sind bezüglich ihrer Lipidkomposition eher von biologischer Relevanz, da sie aus heterogen Membransystemen isoliert werden. An ihnen werden unter anderem die komplexen Wechselwirkungen zwischen Lipidphasen und den assoziierten Proteinkomplexen untersucht [Zanello *et al.* 1996].

Wichtige Untersuchungsmethoden zur Erforschung dynamischer Eigenschaften und Lipid-Phasenverteilungen sind zum einen Methoden auf Fluoreszenzbasis. Darunter vor allem die herkömmliche Fluoreszenzspektroskopie [z.B. Parasassi *et al.* 1994a & b] und in den letzten Jahren verstärkt die Fluoreszenzmikroskopie [z.B. Bagatolli & Gratton 2000] sowie die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) [z.B. Schwille *et al.* 1999].

Weitere Methoden sind die '*Nuclear Magnetic Resonance*' (NMR)-Spektroskopie, die '*Spin Label Electron Resonance*' (ESR)-Spektroskopie, die differenzielle '*Scanning Calorimetry*' (DSC), die Filmwaagentechnik und elektronenmikroskopische Untersuchungen an gefriergebrochenen zellulären Membranen [Simons & Ikonen 1997].

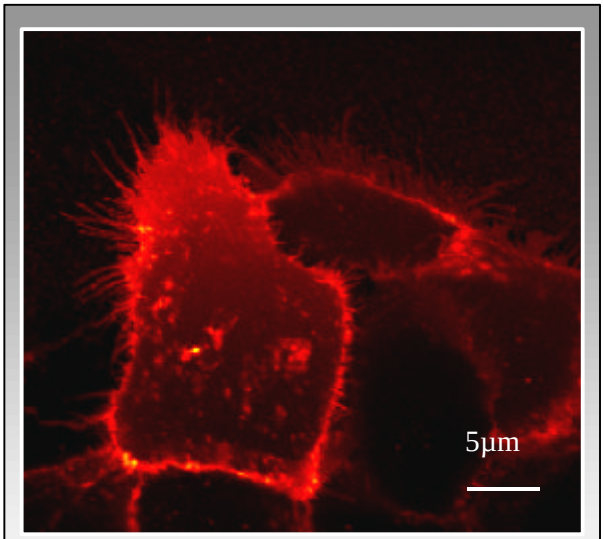


Abb.4.1: Die komplexe Struktur zellulärer Membranen.

Der Membranfluorophor $DiIC_{18}$ markiert die äußeren Membranstrukturen von *Human Cornea Epithelial* - Zellen (63x Öl, ZEISS LSM 410).

In den letzten Jahren gestaltet sich das Modell zellulärer Membranen hinsichtlich der lateralen [Abb. 4.1./2./3.] sowie der transversalen Heterogenitäten [Abb. 4.2. & Abb. 4.4.] immer differenzierter. Folglich können Erkenntnisse, die an lateral wie transversal homogenisierten Mikrosomen-systemen gewonnen wurden, nur mit größter Vorsicht auf zelluläre Membranen übertragen werden.

Es muß in Zukunft noch verstärkt das Ziel sein, direkt Einsicht in das biologische, lebende, gekoppelte Lipid-Protein-Aktin-Membransystem zu gewinnen.

Ein Gebiet der Biowissenschaften beschäftigt sich daher mit der Aufklärung lebender Membransysteme. [Abb. 4.1. & Abb. 4.2.].

Das Problem liegt hierbei weniger in der geschilderten Einsicht, wo ein experimenteller Hebel anzusetzen ist, sondern eher an den recht limitierenden Möglichkeiten der bislang entwickelten Methoden.

Im Verlauf des Kapitels 4.1. werden Fluoreszenztechniken zur Bestimmung des Membranparameters Fluidität zusammengefaßt [Kap. 4.1.2./3.]. Das aktuelle Membranmodell wird skizziert sowie der Frage nachgegangen, was fluoreszenzmikroskopisch basierte Techniken derzeit leisten [Kap. 4.1.4.].

Kapitel 4.1.5. beschreibt die Eigenschaften eines als ‘Fluiditätsstandard’ gewählten Membransystems und in Kap. 4.1.6. werden Membransonden vorgestellt, die für die Fluoreszenzmikroskopie vielversprechende Eigenschaften aufweisen.

Kap. 4.2. zeigt die Ergebnisse und diskutiert die Fluiditäts-Kalibrierung der Fluoreszenzeigenschaften der Membransonden. Grundlegende Versuche mit ausgewählten Sonden an lebenden Zellen unter dem Konfokalen-Fluoreszenz-Mikroskop werden in Kap. 4.3. präsentiert.

4.1.2 FLUIDITÄT UND FLUORESZENZ

Bei der Fluoreszenzspektroskopie werden mit Hilfe von Membransonden Informationen über den Packungszustand von Lipidgruppen oder über die zonal (transversal, lateral wie rotational) heterogenen dynamischen Zustände einzelner Lipide gewonnen (s. dazu auch Tab. 4.1.).

Die komplexen dynamischen Zustände und Eigenschaften der Membrankomponenten werden unter den Begriffen Fluidität **F** oder Viscosität $\eta = 1/\mathbf{F}$ zusammengefaßt, welche makroskopisch für isotrope Flüssigkeiten definiert sind (s. Härtel 1996 für detaillierte Beschreibung).

Eine Reihe von fluoreszenzspektroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Techniken basiert auf den grundlegenden Gesetzen der molekularen Wechselwirkungen und deren Einfluß auf die Fluoreszenzeigenschaften von Membransonden. Sie finden eingehende Erläuterung in Standardwerken der Fluoreszenzspektroskopie (z.B. Lakowicz 1983).

Folgende Parameter von Fluoreszenzeigenschaften werden an dieser Stelle erwähnt, da die für die Interpretation der Ergebnisse sowie deren Diskussion im Verlauf des Kapitels von Bedeutung sind:

1. **Veränderungen der Intensität** und **spektrale Veränderungen** des **Exzitations-** beziehungsweise des **Emissionsspektrums** (siehe auch Kap. 4.1.6.2.).
2. Veränderungen der **Polarisation** oder der **Anisotropie** von Fluorophoren [s. Kap. 4.1.6.1.].
3. Veränderungen der **Fluoreszenzlebensdauer**.
4. Veränderungen der **Fluoreszenz-Fluktuations-Autokorrelationsfunktion** im Rahmen der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie.

Prozesse die primär zu Veränderungen der erwähnten Parameter führen sind **Diffusionsprozesse**, **intramolekulare Wechselwirkungen** und **intermolekulare Wechselwirkungen**.

Letztere treten auf in Form von Excimerbildung oder als irreversible chemisch oder enzymatisch gekoppelte Veränderungen des Fluorophors. Desweiteren sind statische oder dynamische Aggregation möglich, die im Falle abnehmender Floureszenzintensitäten als statisches oder dynamisches Fluoreszenzquenching bezeichnet werden.

Eine alternative, einfache Form der Einteilung kann erfolgen in ...

1. ***Statische Prozesse***. Diese erfassen einmalige und dauerhafte Veränderungen der Fluorophorstruktur.
2. ***Dynamische Prozesse***. Dabei handelt es sich um Wechselwirkungen, die nur in dem Zeitraum stattfinden, in welchem sich ein Fluorophor in einem angeregten elektronischen Zustand befindet.

Wesentlich für die Interpretation von Fluoreszenzspektren ist demnach das Verständnis der Zeitskalen, auf denen Fluoreszenzerscheinungen und mögliche Wechselwirkungen stattfinden.

4.1.3 Zeitskalen bei Fluoreszenzerscheinungen

Fluoreszenzerscheinungen sind Emissionsvorgänge von Photonen, die dadurch zustande kommen, daß Elektronen in Molekülen von energetisch höher gelegenen (sog. angeregten Singlett-Zuständen) auf energetisch niedrigere elektronische Zustände wechseln. Im Gegensatz zu **Phosphoreszenzerscheinungen** (sog. angeregten Triplett-Zuständen) ist hier keine Umkehr der Spinorientierung der Elektronen während des Aufenthaltes im angeregten Zustand notwendig.

Stark fluoreszierende Moleküle zeichnen sich generell durch delokalisierte Elektronen konjugierter Doppelbindungen aus [Lakowicz 1983].

- Photonenabsorption oder Photonenemission sind im Zeitfenster der Fluoreszenzerscheinungen die schnellsten Prozesse. Sie finden in einem Zeitraum von nahe 10^{-15}s statt.

Elektronenübergänge sind demnach so schnell, daß kaum Veränderungen des Radialabstandes zwischen den Kernen und den Aufenthaltsmaxima der Elektronenorbitale möglich sind. Elektronenniveauübergänge folgen somit dem **Franck-Condon-Prinzip**, bei dem Übergangswahrscheinlichkeiten aus den radial überlappenden Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Elektronenwellenfunktionen hergeleitet werden können.

Jeder elektronische Zustand fächert sich bei Molekülen in kondensierten Phasen in unterschiedliche **vibronische** und in noch enger beieinander liegende **rotationale** Unterzustände auf. Die Wahrscheinlichkeit, Moleküle in den einzelnen vibronischen Zuständen vorzufinden, ist im Gleichgewicht durch die Boltzmannverteilung gegeben.

- Induzierte Umverteilungen relaxieren im allgemeinen nach ~10^{-12}s durch strahlungslose **interne Konversion** in das Verteilungsgleichgewicht.

- Die **mittlere Lebensdauer** τ eines angeregten **elektronischen Molekülzustandes** bis zum Übergang in den Grundzustand beträgt in fluoreszierenden Molekülen etwa 10^{-8}s.

Dynamische Wechselwirkungen, welche Fluoreszenzspektren beeinflussen, müssen demnach in der Zeitskala τ eines angeregten elektronischen Molekülzustandes stattfinden.

4.1.4 FUNKTIONALITÄT DER MEMBRANDYNAMIK: *STATUS QUO*?

Das klassische ‘Fluiden Mosaik Modell’ der Zellmembran von Singer & Nicolson (1972) war das erste komplexe Membranmodell, welches zur Erklärung vieler bekannter Eigenschaften der Zellmembran eingesetzt werden konnte. Darauf aufbauend setzte sich in den letzten Jahren verstärkt die Einsicht durch, daß einer Reihe definierter Heterogenitäten innerhalb der Lipidmatrix definierte, funktionale

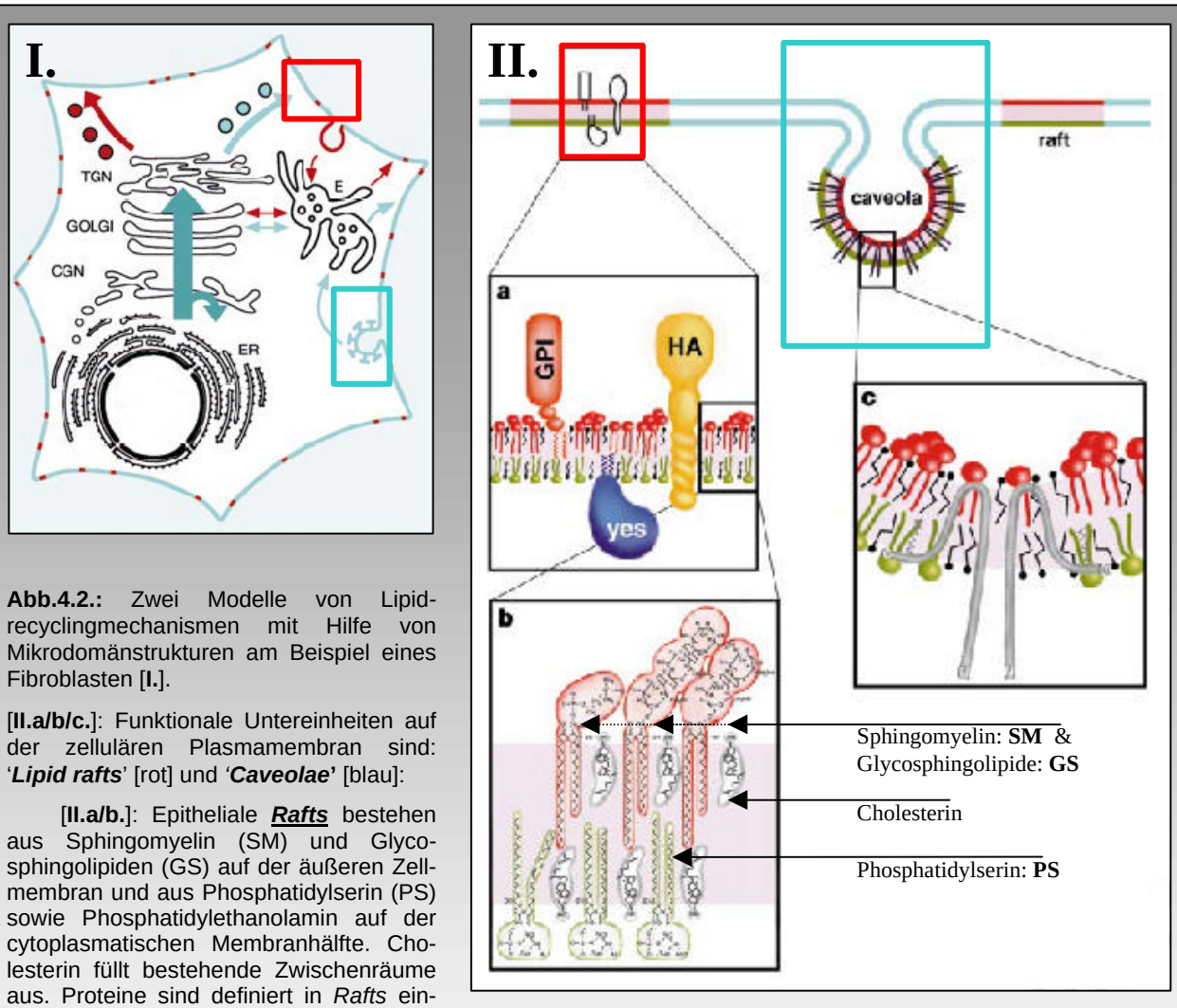


Abb.4.2.: Zwei Modelle von Lipidrecyclingmechanismen mit Hilfe von Mikrodomänstrukturen am Beispiel eines Fibroblasten [**I.**].

[**II.a/b/c.**]: Funktionale Untereinheiten auf der zellulären Plasmamembran sind: ‘***Lipid rafts***’ [rot] und ‘***Caveolae***’ [blau]:

[**II.a/b.**]: Epitheliale ***Rafts*** bestehen aus Sphingomyelin (SM) und Glycosphingolipiden (GS) auf der äußeren Zellmembran und aus Phosphatidylserin (PS) sowie Phosphatidylethanolamin auf der cytoplasmatischen Membranhälfte. Cholesterin füllt bestehende Zwischenräume aus. Proteine sind definiert in *Rafts* ein- oder angelagert [II.a.]: Darunter Transmembranproteine, wie Haemaglutitinin (HA), an Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Proteine auf der äußeren Membranhälfte und mit Acylketten verankerte Proteine, wie Tyrosin-Kinasen der Src-Familie (YES), auf der Innenseite der Membran. Lipidflöße mit definierten funktionalen Gruppen sind über die gesamte Zellmembran verteilt [I. & Abb. 4.3.].

[**II.c.**]: ***Cavaeolae*** wurden bereits in vielen Zelltypen gefunden. Auch sie enthalten GS-Kluster auf der extrazellulären Membranseite, PS auf der inneren Hälfte und stabilisierendes Cholesterin. Selbstassoziierende Ceveolin-Moleküle wirken wie klammerartige Federn und induzieren die charakteristische Caveolenform [II.c.]. Caveolen werden endozytotische Funktionen, potozytotische Funktionen (reversibles, kurzzeitiges Öffnen und Schließen) und transzytotische Funktionen zugeschrieben.

Cholesterin ist sowohl für *Rafts* als auch für *Caveolae* ein für ihre Funktionen nötiger Bestandteil. Viele Funktionen liegen jedoch für beide Mikrodomänen noch im Bereich der Vermutungen und Spekulationen [Abbildungen zusammengestellt und modifiziert aus Simons & Ikonen 1997].

Bedeutung zukommt. Diese Heterogenitäten betreffen nicht nur Asymmetrien hinsichtlich der Verteilung von Lipidklassen auf der extrazellulären und der cytoplasmatischen Membranseite [Bretscher 1972, Van Meer 1989]. Auch die Entdeckung lateraler Lipidzonen (*lipid-rafts* und *caveolae*, s. Abb. 4.2.), welche sich durch definierte räumliche Lipid-Protein-Strukturen ausweisen, haben zu einem differenzierten Modell der zellulären Membransysteme geführt [Abb. 4.2.II.a./c., Jacobsen *et al.* 1995, Simons & Ikonen 1997].

Die lateralen Lipidzonen bestehen aus Anreicherungen bestimmter struktureller Membranbestandteile, darunter Cholesterine, Glycolipide und Sphingolipide [Abb. 4.2.II.b.].

Diese bilden energetisch günstige Bereiche für die Assoziation bestimmter Proteine, welche so zu funktionalen Mikro-Einheiten auf der Membran zusammengefaßt werden [Abb. 4.2.a. & Abb: 4.3.].

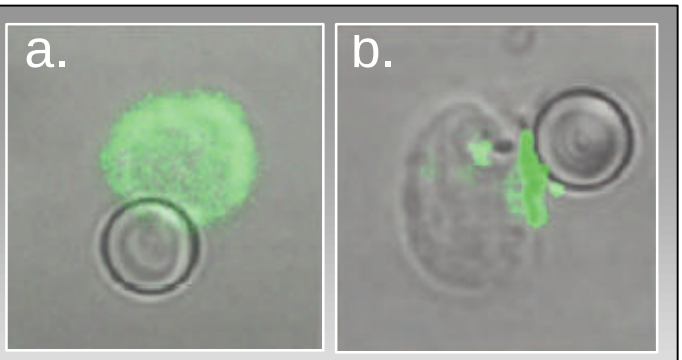


Abb.4.3.: CD28-Rezeptoren auf Mikrodomänen der T-Lymphozytenmembran. Angefärbt mit FITC-CTx (grün).

Anti-CD3 [**a**] führt im Gegensatz zu Anti-CD28 markierten Beads [**b**] nicht zu Umstrukturierungen in der Mikrodomänenstruktur der CD28-Rezeptoren (20min). Durch Agglomerationen kinasenreicher '*rafts*' an den Bindungszonen werden Signalwirkungen verstärkt (Abb. aus Viola *et al.* 1999, vergleiche mit Abb. 4.4.).

Die Lipidbereiche sind so klein (~ 70nm), daß sie sich nicht immer mit konventionellen fluoreszenzmikroskopischen Techniken untersuchen lassen [Abb. 4.33., Varma & Mayor 1998].

Es existieren jedoch methodische Ansätze, die zumindest einen partiellen Einblick in diese Bereiche ermöglichen. Z.B. werden die FCS [Schwille *et al.* 1999], die Elektronenmikroskopie [Sandhoff & Klein 1994] oder Fluoreszenzmethoden verwendet, bei denen man sich ein definiertes Ausbleichen von Fluorophoren in kleinen Volumina zunutze macht ['*Fluoreszenz Recovery after Photobleaching*' (FRAP), Gordon *et al.* 1995].

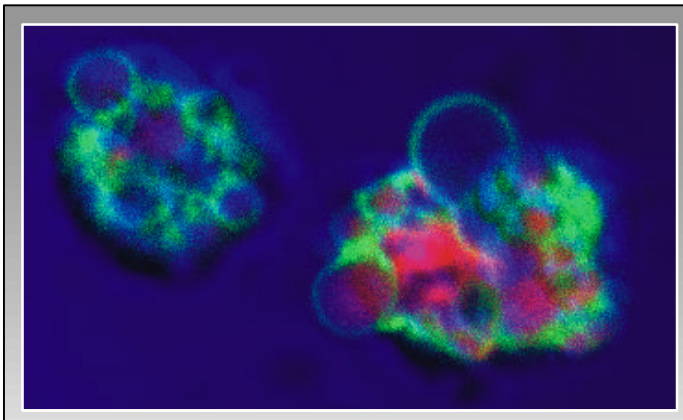


Abb.4.4.: Phosphatidylserin (PS, markiert mit Annexin V-FITC, grün) und Chromatin (markiert mit Propidium Iodid, rot) in apoptotischen EL-4-Zellen (Durchlichtbild blau). Links eine 'apoptotische' und rechts eine 'spät apoptotische' Zelle, 63x Öl, Zeiss LSM 410).

Die PS-Exposition von der inneren auf die äußere Zellmembran betrifft die gesamte Plasmamembran (s. Kap. 2.6.). Heterorgenitäten in der PS-Verteilung entstehen durch Membranfalten, die durch Abspaltungen von Membranvesikeln gebildet werden.

Obwohl einzelne funktionale MikroEinheiten sehr klein sind, können sie integral bedeutende Anteile der gesamten Membranoberfläche einnehmen:

- Prozesse der endozytotischen Lipidsortierung und deren Wiederverwertung im '*Endocytotic Recycling Compartment*' betreffen zwischen 1% und 27% der gesamten zellulären Membranoberfläche [Mukherjee *et al.* 1999, Abb. 4.2.].

- Viola *et al.* (1999) konnten aufzeigen, daß Aktivierung des CD28-Rezeptors in T-Lymphozyten Umstrukturierungen in der Mikrodomänenstruktur induzieren. Dadurch werden Signalwirkungen verstärkt. GM1-Glycosphingolipiddomänen wurden hierzu mit der FITC-Cholera-Toxin-B-Untereinheit (CTx) sichtbar gemacht [Abb. 4.3., Abb. 4.2.II.b., Schon & Freire 1989].
- Die Exposition von Phosphatidylserin von der cytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran betrifft die gesamte Membran apoptotischer Zellen [Abb. 4.2.II.c. & Abb. 4.4.]. Auf diese Weise signalisieren apoptotische Zellen makrophagischen Rezeptorsystemen ihren lethalen Zustand, worauf sie phagozytotisch entsorgt werden [Fadok *et al.* 1992, Kap. 2.6.].

Die Funktionalität von Membranproteinen hängt stark von definiert strukturierten Membranumgebungen ab [Tab. 4.1.]. Daher sind Mikrosomen, deren Lipidstruktur während des Präparationsprozesses homogenisiert wird, kein gutes Modellsystem für die Erforschung von Protein-Lipidwechselwirkungen.

Es ist notwendig, sich dem Lipid-Protein-System verstärkt auf zellulärer Ebene zu nähern, da hierbei die originären Membranstrukturen gewährleistet sind. Im folgenden Kapitel werden aktuelle, auf Fluoreszenz basierende Methoden beschrieben, mit deren Hilfe komplexe Membranstrukturen mikroskopisch visualisiert und mit bildverarbeitenden Routinen quantifiziert werden können.

4.1.4.1 Membrandynamik lebender Objekte: *Was leisten Fluoreszenzmethoden?*

Das grundlegende Problem fluoreszenzmikroskopischer Methoden ist: Noch immer gibt es keinen Membranfarbstoff, mit dem sich auf überzeugende Weise Einsicht in die diffizile Membrandynamik lebender Zellen gewinnen ließe.

Ein in den letzten Jahren Verwendung findender Membranfluorophor ist Laurdan [Kap. 4.1.6.2.1.]. Er wurde zu mikroskopischen Untersuchungen von Phasendomänen in Zellmembranen ganzer Zellen verwendet (siehe dazu Abb. 4.5., Zwei-Photonen Mikroskopie aus Yu *et al.* 1996).

Allerdings ist Laurdan aufgrund seines Absorptionsspektrums im UV-Bereich nur bedingt für Messungen an lebenden Zellen geeignet. Zusätzlich erschwert starkes Photobleaching den Einsatz in Ein-Photonen-Exzitationssystemen [Abb. 4.35.]. Selbst in Zwei-Photonen-Exzitationssystemen ist die Qualität von GP-Bildern wegen des hohen Rauschanteils wenig geeignet, Membran-Substrukturen in adequater Güte sichtbar zu machen [Abb. 4.5.].

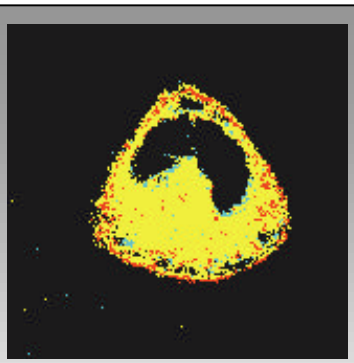


Abb.4.5.: Laurdan GP-Bild eines Maus-Fibroblasten aus Yu *et al.* 1996. Hohe GP-Werte [~0,4 rot] markieren die rigide Plasmamembran. Niedrigere GP-Werte [~0,2 grün/ blau] die Kernmembran der Zelle (vergl. Kap. 4.1.5.2.1.).

Amphiphile Membranfluorophore der $DiIC_N$-Familie (N: Anzahl der C-Atome der Acylketten, Kap. 4.1.6.2.3.] partitionieren bevorzugt in Lipidbereiche, die ähnliche Kettenlängen aufweisen [Spink *et al.* 1990]. Sie werden für quantitative mikroskopische Bestimmungen von Phasendomänstrukturen in lebenden Zellen eingesetzt (N = 12, 16 & 18, Mukherjee *et al.* 1999).

$DiIC_N$ wird außerdem für mikroskopische FCS-Messungen an lebenden Zellen verwendet (N = 20, Schwille *et al.* 1999). Allerdings liefert diese Methode nur bedingt Informationen über den dynamischen Zustand von Modell- oder Zellmembranen, da das Meßvolumen für FCS-Messungen methodenbedingt sehr klein sein muß (~0.25µm^3).

Der Fluorophor PLF (N^{α}-pteroyl-N^{ϵ}-(4'-fluorescein-thiocarbamoyl)-L-lysin) markiert GPI-verankerte Rezeptoren. Varma & Mayor (1998) nutzten ein Anisotropiekonzept in Verbindung, mit Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Mikroskopie [Matko & Eddin 1997] um Glycosphingolipid-Cholesterin-Domänen direkt nachzuweisen. Die Methode erlaubt es, Größen von Mikrodomänen abzuschätzen, die deutlich unter dem Auflösungsvermögen von Fluoreszenz-mikroskopen (~$\lambda/2$) liegen (s. Kap. 4.3.1. & Abb. 4.33.). Diese Technik ist durchaus interessant. Mikroskopische Messungen der Anisotropieverteilung sind allerdings an entspechende Geräte gekoppelt, was den Einsatz dieser Methode sehr limitiert.

Der noch gesuchte ideale Membranfluorophor für mikroskopische Untersuchungen an lebenden Zellen zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus: Er ist untoxisch, bleicht nicht aus, absorbiert und emittiert im sichtbaren Frequenzbereich. Er reagiert auf veränderte Membrandynamik lediglich mit definierten Veränderungen seiner Spektraleigenschaften, die mit geeigneten Filtern gut getrennt werden können.

Um einen potentiellen Aspiranten zu finden sind zunächst Messungen der Fluoreszenzeigenschaften an einem variablen, fluiden Lipidsystem nötig. Es wird im folgenden Kapitel beschrieben.

4.1.5 Das Eichsystem: Eigelb-Phosphatidylcholin, Cholesterin und Temperatur

Ein Eichsystem für fluiditätssensitive Membranfluorophore soll einerseits gut definierte dynamische Eigenschaften besitzen, andererseits muß es den Membranen lebender Zellen möglichst nahe kommen. Die dynamischen Zustände einer Lipidmembran können experimentell durch externe Paramter, wie die Temperatur und den Druck sowie durch interne Parameter, wie den Cholesteringehalt, beeinflußt werden.

Messungen mit den Membranfluorophoren DPH, TMA-DPH, Pyren oder Bis-Pyren zeigen übereinstimmend, daß sich die jeweiligen fluiditätssensitiven Parameter der Membranfluorophore in Abhängigkeit des Drucks, der Temperatur und des Cholesteringehalts weitgehend linear verändern [MacDonald *et al.* 1987, Härtel *et al.* 1998a]. Dabei zeigen Temperaturänderungen von ΔT= 5°C und Änderungen des Cholesteringehaltes von Δ[Ch]= 5mol% bei Pyrenmessungen quantitativ die gleiche Veränderung der Lipiddynamik wie Veränderungen des Druckes von etwa 160 Atmosphären [MacDonald *et al.* 1987].

Der Einfluß von Cholesterin auf Lipidphasen ist von großer Bedeutung. Die zahlreichen Wechselwirkungen zwischen Cholesterin und der Dynamik von Lipiddoppelschichten sind zu vielfältig, um sie an dieser Stelle im einzelnen diskutieren zu können. Aus diesem Grund sind in Tabelle 4.1. die wichtigsten Wechselwirkungen zwischen Cholesterin und Lipiden exemplarisch zusammengefaßt.

In den letzten Jahren bewährte sich der lipophile Membranfluorophor Laurdan [Kap. 4.1.6.2.1.] bei der Erforschung einer Reihe sehr komplexer, cholesterininduzierter Phasenphänomene in einfachen

Membranparameter	Wirkung des Cholesterins auf Lipidmembranen
Longitudinale Freiheit der Kohlenwasserstoffketten und der Dicke von Lipiddoppelschichten und Monoschichten [McIntosh 1978]	Die Auswirkung ist von der Länge der Lipidketten abhängig. Bis C_{16} zeigt Cholesterineinbau einen verdickenden Effekt, ab C_{18} wird jedoch eine Abnahme der Dicke der Membrandoppelschicht festgestellt. Das Cholesterinmolekül vermindert die Ausbildung von Trans-Gauche-Isomerien der Lipidketten nahe seiner starren Rumpfstruktur. Die Lipidketten werden gestreckt, die Membran wird ‘dicker‘. Ab C_{18} jedoch überwiegt der Faktor, daß durch den Einbau von Cholesterin geschaffenes freies Volumen nahe dem Membranzentrum von Lipidketten eingenommen wird. Die Membrandicke nimmt ab.
Rotation von Lipiden	Cholesterin rotiert um seine Längsachse mit einer Korrelationszeit von 0.1 ns; dies ist schneller als die Rotation benachbarter Phospholipide [Yeagle 1981]. Ob die Rotation der Membranlipide bei Einbau von Cholesterin abnimmt, ist nicht beschrieben. Wegen der unterschiedlichen Rotationszeiten werden Komplexbildungen zwischen Cholesterin und Lipiden ausgeschlossen.
Wechselwirkungen zwischen den Lipidkopfgruppen [Shepherd & Buldt 1979]	Die Kopfgruppen der wichtigen Lipidmoleküle PC, PE und PS wechselwirken in der Membran untereinander: Z.B. durch elektrostatische Wechselwirkungen (zwischen den PC), oder durch Ausbildung von H-Brücken (wie bei PE). Cholesterin stört und hemmt diese Wechselwirkungen (WW). In diesem Ansatz ist auch eine thermodynamische Erklärung für den beobachteten unterschiedlichen Einbau von Cholesterin in PC-und PE-Membranen enthalten. (Trennung von H-Brücken ist in diesem System energieaufwendiger als Verhinderung elektrostatischer WW).
Phasenübergänge [McMullen & McElhaney 1994]	Der Einfluß von Cholesterin auf Phasenausbildungen / -übergänge von Lipiden ist hochkomplex und hier nicht ausreichend wiederzugeben. Nur der Einfluß auf die relativ scharfen Phasenübergänge, welche zwischen der Gel (L_β)-und der flüssigkristallinen-Phase(L_α) in Doppelmembranen beobachtet werden können, sollen deshalb hier erwähnt werden. Sie werden unter anderem durch das Entstehen neuer Misch- und Zwischenphasen ($L_{o\beta}$+$L_{o\alpha}$), zurückgedrängt, verwischt und einander angeglichen.
Laterale Diffusion der Lipide	Der Einfluß von Cholesterin auf die laterale Diffusion von Membranlipiden und Membranproteinen ist unterhalb der Phasenübergangstemperatur von (L_β -L_α) der Lipide wesentlich größer (diffusionspropagierend) als oberhalb (diffusionshemmend) [Rubenstein *et al.* 1979].
Intramolekulare rotationale und laterale Dynamik der Kohlenwasserstoffketten [Cheng *et al.* 1994]	Der Einfluß auf die intramolekulare Dynamik von Lipidketten ist kettentiefenabhängig fluoreszenzspektrometrisch untersucht worden. Nahe des Doppelmembranzentrums (ab C_{10}) nehmen sowohl die rotationale als auch die laterale Dynamik in den L_β und L_α -Phasen mit Cholesterin zu. Nahe der Kopfgruppen (C_4-C_8) nahm in der L_β -Phase die rotationale Dynamik zu, die laterale Dynamik mit Cholesterin ab. In der L_α-Phase änderte sich demgegenüber nichts.

Membranparameter	Wirkung des Cholesterins auf Lipidmembranen
Permeabilität und Leitfähigkeit der Membran	Die Permeabilität von Membranen wird sowohl für hydrophobe Moleküle, wie Glucose, als auch für Ionen herabgesetzt. Auch die Wasserpermeabilität wird durch den Cholesterineinbau vermindert. Die Leitfähigkeit sollte demzufolge herabgesetzt werden [Kutchai *et al.* 1980].
Mit Pyren und DPH fluoreszenz-spektrometrisch ermittelte Fluidität. [MacDonald *et al.* 1987]	Messungen, bei denen der Einfluß von Temperatur, Druck und Cholesteringehalt in Liposomen und Mikrosomenmembranen einmal mit DPH und zum anderen mit Pyren verglichen wurden, zeigten übereinstimmend, daß mit steigendem Druck, fallender Temperatur und steigendem Cholesteringehalt die Fluidität der Membranen approximativ linear abnimmt. Dabei verursachten bei den Pyrenmessungen $\Delta T = 5°$, $\Delta p = 160$ atm und $\Delta[Ch] = 5$mol%. die gleiche relative Fluiditätsänderung von 10%. DPH-Messungen verliefen qualitativ ähnlich, zeigten aber bei Cholesterin geringere Sensitivität.

Tab.4.1.: Der Einfluß von Cholesterin auf die physikalisch-dynamischen Parameter von Lipidmembranen.

DLPC-DPPC-Vesikeln [Parasassi *et al.* 1994a & b, 1995]. Untersuchungen mit hoch sensitiver differentieller Kalorimetrie in DPPC-Vesikeln deuten ebenfalls darauf hin, daß diskrete Phasen oder Mikrodomänen durch Cholesterin induziert werden [McMullen & McElhaney 1994].

In heterogenen Lipidsystemen, wie sie Eigelb-Liposomen darstellen, kann von weniger kritischem (Cholesterin induzierten) Phasenverhalten ausgegangen werden (Eigelb-Lipide setzen sich hauptsächlich aus Phosphatidylcholinen (PC) unterschiedlicher Acylkettenlänge und Sättigungsgrad zusammen. Anteil PC > 99%). Mischungen verschiedener Lipidsorten, sind aufgrund der Vielfalt der Wechselwirkungen im allgemeinen weniger prädestiniert, heterogene Lipidphasen auszuprägen, welche vergleichende Fluorophormessungen stören könnten.

Aus diesem Grund wurde Eigelb-PC-Vesikel als definiertes Eichsystem verwendet. Die Parameter Temperatur und Cholesteringehalt sind hervorragend geeignet, definiert-fluide Vesikel-systeme zu erzeugen. Im folgenden Kapitel 4.1.6. werden nun Membransonden vorgestellt, die für die Fluoreszenzmikroskopie vielversprechende Eigenschaften aufweisen. Die gezeigten grundlegenden Spektraleigenschaften der beschriebenen Fluorophore stellen bereits Messungen an dem Eichsystem Eigelb-PC dar.

Die Präparation der Vesikel erfolgte nach der in den Kapiteln A4.1.1.-3. beschriebenen Methode. Die Markierung der Lipidvesikel mit den ausgewählten Membranfluorophoren folgt Kap. A4.1.2..

4.1.6 SONDEN ZUR BESTIMMUNG DES MEMBRANPARAMETERS 'FLUIDITÄT'

4.1.6.1 ROTATIONSDIFFUSIONSSENSITIVE SONDEN: DPH, TMA-DPH , CARBOXYL-DPH (COO$^-$-DPH)

Zur Gruppe der **rotationsdiffusionssensitiven Sonden** gehört das seit langem für Untersuchungen von Membranfluiditäten eingesetzte 1-6-diphenyl-1,3,5,-hexatrien (**DPH**) sowie dessen Derivate, das **TMA-DPH** und das **Carboxyl-DPH** [Abb. 4.6.a-c.].

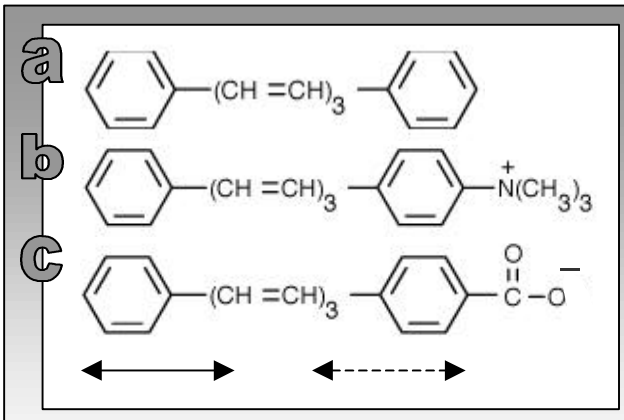


Abb.4.6.: DPH [**a**], TMA-DPH [**b**] und Carboxyl - DPH [**c**] mit ihren relativen Absorptions- (——) und Emissionsdipolmomenten (-----) [Lenz 1989].

TMA-DPH und Carboxyl-DPH unterscheiden sich vom DPH durch eine hydrophile Trimethyl-Amino (TMA) -Kopfgruppe mit einer am Stickstoffatom lokalisierten positiven Ladung und durch eine pH-Wert abhängige negativ geladene Carboxyl (COO$^-$)-Gruppe [Abb. 4.6.].

Durch die polaren Kopfgruppen werden TMA-DPH und Carboxyl-DPH nahe dem polaren Kopfgruppenbereich von Lipidmembranen verankert. Die fluoreszenzsensitive Region des Moleküls wird so im oberen Acylkettenbereich parallel zu den Acylketten ausgerichtet.

Durch diese Verankerung ist die rotationale Bewegungsfreiheit der DPH-Derivate im Vergleich zum DPH eingeschränkt. Sie reagieren dadurch weniger sensitiv auf dynamische Veränderungen der Lipidmatrix als das DPH, welches aufgrund seines apolaren Charakters weit weniger streng lokalisiert und ausgerichtet im zentralen Acylkettenbereich zu finden ist [Härtel *et al.* 1998a].

Eine Meßgröße, welche die Dynamik der Fluorophorumgebung charakterisiert, ist die '*steady-state*' Anisotropie **r** [4-1.]. Die Anregungsintensität wird bei *steady-state*-Messungen zeitlich nicht moduliert. Demnach befindet sich eine gleichbleibende Anzahl von Molekülen im angeregten Zustand, und die Emissionsintensität ist konstant.

Die Übergangsdipolmomente des DPHs sind annähernd colinear zur Längsachse des Moleküls ausgerichtet [Abb. 4.6.]. Der in einer starren Matrix erreichbare Maximalwert der Anisotropie beträgt r_{max}= 0.39. Zur Berechnung der Anisotropie benötigt man den Geräte-Korrektur-Faktor **G** ('*Grating factor*'), die zum Absorptionsdipolmoment des Moleküls kolineare Emissionsintensität $\mathbf{I}_{çç}$ und die zu $\mathbf{I}_{çç}$ senkrecht emittierende Photonenintensität $\mathbf{I}_{\perp}$ [4-1.].

$$r = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + 2 \cdot I_{\perp}}, \text{ mit } \frac{I_{II}}{I_{\perp}} = \frac{I_{VV} \cdot I_{HH}}{I_{VH} \cdot I_{HV}} \text{ und } G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \text{ ergibt: } \quad r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}} \qquad [4\text{-}1.]$$

Die Intensitätsindizes V und H repräsentieren die Polarisator- bzw. Analysatorstellungen 'Vertikal' und 'Horizontal' der Intensitätsmessungen. Den G-Faktor (I_{HV}/I_{HH} = G) benötigt man als

Korrekturfaktor, da Fluoreszenzspektrometer die Intensität der Fluoreszenzstrahlung in Abhängigkeit von der Stellung der Polarisatoren meist mit unterschiedlicher Empfindlichkeit messen.

4.1.6.2 MEMBRANSONDEN MIT:

A: UMGEBUNGSABHÄNGIGEM SPEKTRALSHIFT
B: UMGEBUNGSABHÄNGIGER ÄNDERUNG DER QUANTENAUSBEUTE

Eine Reihe von Membransonden weist in der Literatur dokumentierte umgebungsabhängige Veränderungen ihrer Exzitations- und/oder ihrer Emissionsspektren auf. Unter ihnen sind 6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene (**Laurdan**, eingeführt von Weber & Farris, 1979), **Nile Red**, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (**DilC$_N$**) , N-(4-triethyl-ammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino)styryl) pyridinium dibromide (**FM 4-64**^{Ò}) und 4-(dicyanovinyl)julolidine (**DCVJ**).

4.1.6.2.1 Laurdan und Prodan

Die lipophilen Fluorophore Prodan und Laurdan werden seit einigen Jahren erfolgreich als umgebungssensitive Membransonden eingesetzt. Sie basieren auf Naphtalin-Ringstrukturen [Abb. 4.7.]

Prodan dringt aufgrund seiner kurzen Kohlenwasserstoffkette (N = 1, s. Abb. 4.7.) nicht so tief in die Lipiddoppelschicht ein wie Laurdan (N = 10). Die aus 11 C-Atomen bestehende Kohlenwasserstoffkette des Laurdans wechselwirkt durch Van der Waals-und hydrophobe Kräfte stark mit den Kohlen-wasserstoffketten der Lipidmembran.

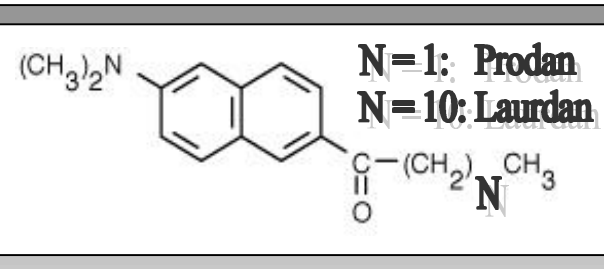


Abb.4.7.: Modifizierte Strukturformeln von Prodan und Laurdan. In Abhängigkeit vom pH-Wert protoniert die Aminogruppe von Prodan und Laurdan ($pK_a \approx 1.7$, Chong & Wong 1993) und richtet den fluoreszierenden Naphtalinring zur Kopfgruppe der Lipidmatrix aus. Der ausgeprägte Längenunterschied der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten wirkt sich stark auf den Partitionskoeffizienten (PK) des Moleküls aus. Mit jedem Methylglied der Kette nimmt der PK zwischen Membran / Wasser stark zu und wird von Zeng & Chong (1995) mit $1.8 \cdot 10^4$ (Prodan) bzw. $4.7 \cdot 10^6$ (Laurdan) angegeben.

Selbst wenn bei pH 3 die Kopfgruppe des Laurdans eine positive Ladung trägt, bleibt es vollständig in der Lipidmembran verankert. Anders als bei Prodan, ist das Spektralverhalten von Laurdan unabhängig von den Lipidkopfgruppen der Matrix. Dies konnten Chong & Wong 1993 mit FTIR (‘*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*’) -Studien zeigen.

Deshalb wird Prodan eingesetzt, um Oberflächenwechselwirkungen von Lipiddoppelschichten, Lipoproteinen und biologischer Membranen zu charakterisieren [Chong & Wong 1993].

Das Spektralverhalten von Laurdan wird hingegen eher von den inneren Membranbereichen definiert. Laurdan kann recht komplexe Phasenübergänge detektieren, wie sie durch Temperaturänderung, durch Anaestetika oder durch Änderungen der Lipidzusammensetzung hervorgerufen werden [Merlo & Yager 1990, Parasassi *et al.* 1994a &b]. Auch die Quantifizierung einzelner Lipidphasen wurde mit Hilfe von Laurdanspektren in Phospholipidvesikeln durchgeführt [Parasassi *et al.* 1991].

Mit Hilfe der Zwei-Photonen-Exzitationsmikroskopie wurden koexistierende Phasen nicht nur in Phospholipidvesikeln, sondern auch in roten Blutkörperchen und verschiedenen Zelllinien nachgewiesen und quantifiziert [Yu *et al.* 1996, Parasassi *et al.* 1997].

Das Emissionsspektrum von **Laurdan** verschiebt sich aufgrund von Dipolrelaxationsprozessen in der unmittelbaren Fluorophorumgebung (‘*Sovent Relaxation’*, MacGregor & Weber 1981).

Wie die meisten Fluorophore besitzt Laurdan in seinem angeregten Zustand ein stärkeres Dipolmoment als in seinem Grundzustand. Dieses Wechselwirkungspotential entsteht innerhalb von ~10^{-15}s (Photonenabsorption) und beeinflußt die Dipole in seiner Umgebung während der gesamten Lebensdauer des angeregten Zustandes (10^{-8}s).

Der Ordnungszustand der Umgebungsmoleküle im Wirkungsbereich des Membranfluorophors kann stark erhöht werden, wenn sich die Kinetik der dipolaren Moleküle in der Fluorophorumgebung auf geringeren bis gleichen Zeitskalen bewegt, wie die Lebensdauer des angeregten Zustandes des Fluorophors.

Die dazu nötige Energie wird nach Parasassi *et al.* (1990) vom Fluorophor geliefert, was sich in einer Verschiebung des Emissionsspektrum zu höheren Wellenlängen ausdrückt [Abb. 4.8.b.].

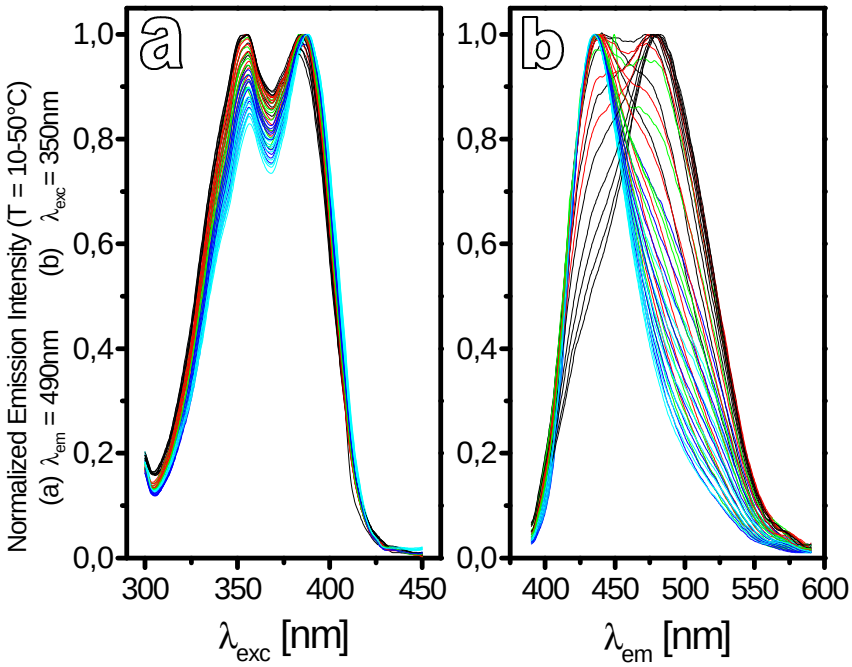


Abb.4.8.: Exzitationsspektrum [**a**] und Emissionsspektrum [**b**] des lipophilen Fluorophors Laurdan [Abb.4.7.] in Liposomen (0,01mg Lipid/ml) mit verschiedenem Cholesteringehalt [ansteigende Cholesterin-Konzentrationen farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau] gemessen im Temperaturbereich von 10-50°C. Sowohl das Emissions- als auch das Exzitationsspektrum verändern ihre Maxima in Abhängigkeit von der Lipiddynamik.

In Lipidmembranen bestimmen eindringende Wassermoleküle den Dipolrelaxationsprozess des Laurdans [Parasassi *et al.* 1990, 1991 & 1994a & b].

Je rigider die Lipidmenbran eines Vesikels ist, desto weniger Wassermoleküle dringen in den hydrophoben Kettenbereich der Lipidmatrix vor, und desto geringer sind demzufolge die Wechselwirkungen mit dem Dipolmoment des angeregten Laurdans. Der Umkehrschluß liegt auf der Hand.

Auch das Exzitationsspektrum erfährt, in Abhängigkeit von der Polarität der Fluorophorumgebung, eine Verschiebung des Exzitationsmaximums. Allerdings sind hier die Exzitationsmaxima des Fluorophors in flüssig-kristallinen Lipidphasen (aufgrund einer verstärkten Dipolarität der Umgebung) gegenüber der Gel-Phase abgesenkt [Abb. 4.8.a.].

Eine Größe, welche die spektralen Eigenschaften von Laurdan beschreibt, ist die von Parasassi *et al.* (1990) definierte Generalisierte Polarisation **GP** = ($\mathbf{I}_g$ - $\mathbf{I}_{fk}$) / ($\mathbf{I}_g$ + $\mathbf{I}_{fk}$). $\mathbf{I}_g$ und $\mathbf{I}_{fk}$ sind dabei die

Emissionsintensitäten der Maxima der Exzitations- oder Emissionsspektren in der Gel-Phase, beziehungsweise der flüssig-kristallinen-Phase.

Aus den Spektren mit Eigelb-Liposomen aus Abb. 4.8.a. & b. leiten sich die Formeln für die sogenannte Exzitations-$\mathbf{GP}_{ex=350nm} = (\mathbf{I}_{em=436} - \mathbf{I}_{em=478}) / (\mathbf{I}_{em=436} + \mathbf{I}_{em=478})$ und die Emissions-$\mathbf{GP}_{em=490nm} = (\mathbf{I}_{ex=386}-\mathbf{I}_{ex=356}) / (\mathbf{I}_{ex=386} + \mathbf{I}_{ex=356})$ als Maß für die integrale Fluidität dieser Membran ab. Aufgrund der Verschiebung der Exzitationsmaxima von Laurdan in der Gel-Phase und der flüssig-kristallinen-Phase lassen sich Laurdan-Moleküle durch geeignete Wahl der Exzitationswellenlänge preferentiell in einer der beiden Phasen anregen. Parasassi *et al.* (1991) nutzten dieses interessante Fluorophorverhalten, um die Anteile koexistierender Gel-Phase (χ) und flüssig-kristalliner-Phase (1-χ) mit Hilfe einer einzigen **GP**-Messung quantitativ abzuschätzen [4-2. & 4-3.].

$$GP = \frac{\chi \cdot GP_g \cdot S_g + (1-\chi) \cdot GP_{fk} \cdot S_{fk}}{\chi \cdot S_g + (1-\chi) \cdot S_{fk}} \qquad [4\text{-}2.]$$

$$GP = \chi \cdot GP_g + (1-\chi) \cdot GP_{fk} \qquad [4\text{-}3.]$$

Nach einer Liposomeneichung der **GP**-Werte in der reinen flüssig-kristallinen-Phase ($\mathbf{GP}_{fk}$ = -0.2) und der reinen Gel-Phase ($\mathbf{GP}_g$ = 0.6) lässt sich χ bestimmen. S_g ist die Summe. ($\mathbf{I}_g + \mathbf{I}_{fk}$) bei Anregung der Laurdan-Moleküle in der Gel-Phase, S_{fk} dementsprechend ($\mathbf{I}_g + \mathbf{I}_{fk}$) bei dessen Anregung in der flüssig-kristallinen-Phase.Wählt man die Emissionswellenlängen dergestalt, daß $S_g = S_{fk}$, so vereinfacht sich die Formel 4-2. zu Formel 4-3..

In den letzten Jahren bewährte sich Laurdan bei der Erforschung einer Reihe sehr komplexer Phasenphänomene in einfachen DLPC-DPPC-Cholesterin-Vesikeln [Parasassi *et al.* 1994a & b, 1995] und diente bei Zellen zur Aufklärung von Phasendomänstrukturen [Yu *et al.* 1996, Parasassi *et al.* 1997].

4.1.6.2.2 Nile Red

Der ungeladene Phenoxazin-Fluorophor Nile Red ist in polarer Umgebung nahezu nicht fluoreszent.

In unpolarer Umgebung oder in einer Lipidmatrix erfährt er jedoch nicht nur eine Verstärkung seiner Fluoreszenzintensität, sondern auch einen ausgeprägten Shift in seinem Emissions- und in seinem Absorptionsspektrum [Deye *et al.* 1990, Sackett & Wolff 1987].

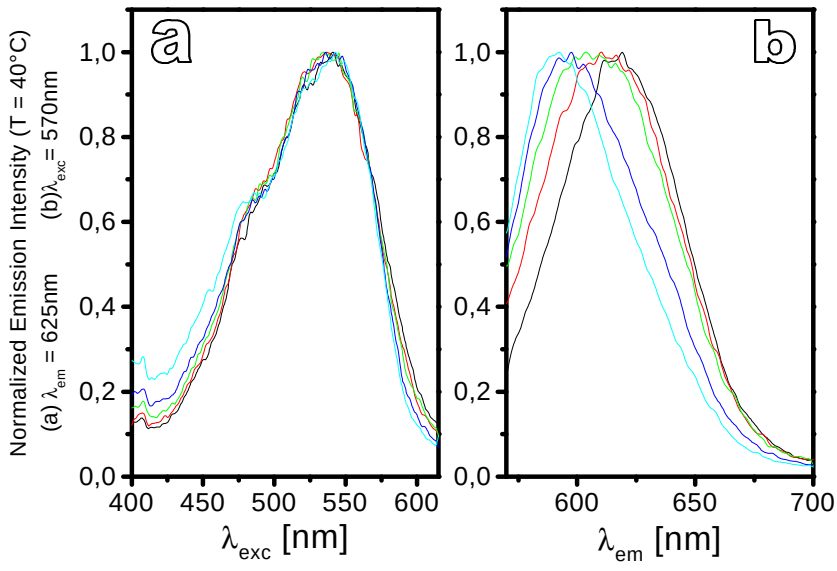


Abb.4.9.: Exzitationsspektrum **(a)** und Emissionsspektrum **(b)** des lipophilen Fluorophors Nile Red in Liposomen (0,01mg Lipid/ml) mit verschiedenem Cholesteringehalt (ansteigende Cholesterinkonzentrationen farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau) gemessen bei einer Temperatur von 40°C.

Nile Red wurde bislang zur Lokalisierung und Quantifizierung von Lipiden, insbesondere Cholesterin-Estern, lysosomalen Phospholipid-Einschlüssen und Neutral-Lipid-Agglomerationen [Gocze & Freeman 1994] in Zellen eingesetzt. Auch bei der Detektion von Sphingolipiden fand er Verwendung [Muthing & Heitmann 1993].

Abb. 4.9. zeigt das Absorptions- und das Emissionsspektrum von Nile Red in '*small unilamellar vesicles*' (SUV)-Liposomen bei einer Temperatur von 40°C.

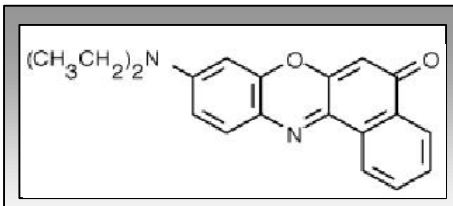


Abb.4.10.: Strukturformel von Nile Red.

Das Emissionsspektrum verändert deutlich sein Maximum in Abhängigkeit des Cholesterinanteils in der Lipidmatrix. Das Absorptionsspektrum zeigt hingegen nur kleinere Variationen im Spektralbereich zwischen 400 und 475nm.

Die Strukturformel von Nile Red ist in Abb. 4.10. dargestellt.

4.1.6.2.3 DiIC$_N$

Die nicht toxischen, langkettigen Dialkylcarbocyanin-Derivate **DiIC$_N$** (N: Länge der Acylketten, AK) zeigen in wässriger Umgebung vernachlässigbare Fluoreszenzen. Sie zeichnen sich hingegen durch stabile Fluoreszenzeigenschaften aus, sobald sie an eine Lipidmembran binden [Abb. 4.11.].

Ist der Fluorophor durch seine lipophilen Acylketten erst einmal an eine hydrophobe Lipid-Matrix gebunden, verankert er sich fest.

Im Gegensatz zu vielen anderen Membransonden, finden keine diffusiven Austauschprozesse zwischen Vesikeln oder räumlich getrennten Zellmembranen statt.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten **DiIC$_N$**-Derivate **DiIC$_{18}$**, **DiIC$_{16}$**, **DiIC$_{12}$**, und **FAST-DiIC$_{12}$** werden bereits als lipophile Sonden bei der Erforschung von Zellfusionsprozessen [Blumenthal *et al.* 1996, Li *et al.* 1996, Spotl *et al.* 1995] oder bei Adhäsionsprozessen [Ramanathan *et al.* 1996] eingesetzt.

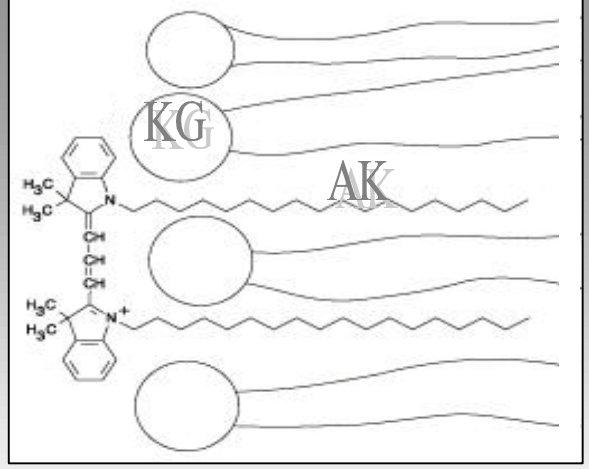


Abb.4.11.: Struktur und Lokalisation von DiI$_{C18}$ in einer stilisierten Lipidmembran (modifizierte Abb. aus Molecular Probes). Durch die langen Acylketten (AK) wird DiI im hydrophoben Bereich der Membran verankert. Der fluoreszenzsensitive Teil des Moleküls befindet sich im oberen Bereich der polaren Kopfgruppen (KG) der Lipide.

Des weiteren wurden mit diesen Fluorophoren Zellmigrationen während der Entwicklungsphase und nach Transplantationen verfolgt [Ragnarson *et al.* 1992], Lipoproteine kenntlich gemacht [Lohne *et al.* 1995] und Cytotoxizitätsmessungen durchgeführt [Johann *et al.* 1995].

Zur Messung dynamischer Membranparameter sind $DiIC_N$-Derivate bislang in Zusammenhang mit FRAP - Techniken erfolgreich eingesetzt worden [Gordon *et al.* 1995, Wolf *et al.* 1986].

Außerdem kann der Fluorophor für die mikroskopische Fluoreszenz-Correlations-Spektroskopie an lebenden Zellen verwendet werden [Schwille *et al.* 1999].

$DiIC_N$-Derivate zeigen in Abhängigkeit ihrer Kettenlänge N Preferenzen bei der Anlagerung in Phospholipidmatritzen mit Molekülen ähnlicher Kettenlänge [Klausner & Wolf 1980]. Außerdem gibt es teilweise starke Präferenzen hinsichtlich der fluiden oder der rigiden Phase von Lipidvesikeln [Spink *et al.* 1990]. Nach Spink partitioniert $DiIC_{20}$ im Verhältnis 4:1 zwischen der Gel-und der fluiden Lipidphase von DPPC.

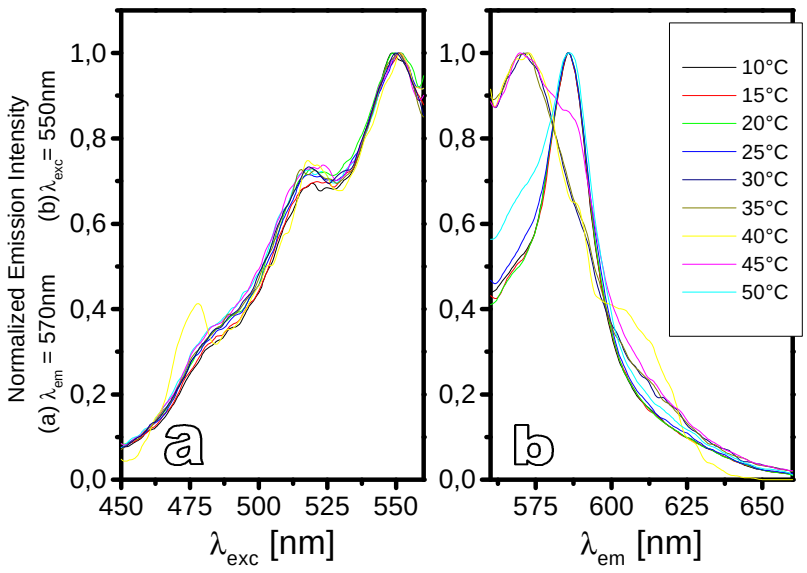


Abb.4.12.: Normalisiertes Exzitationsspektrum **(a)** und Emissionsspektrum **(b)** des untoxischen Membranfluorophors DiI (0,01mg Lipid/ml) in cholesterinhaltigen SUV-Liposomen. Die Spektren wurden in einem Temperaturbereich zwischen 10° und 50°C aufgenommen. Das Emissionsspektrum zeigt mit steigender Temperatur eine Spektralverschiebung zu kleineren Wellenlängen. Das Exzitationsspektrum ist hingegen temperaturunabhängig.

Diese Eigenschaft kann auf elegante Weise genutzt werden, um mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie die Struktur von Fluiditätszonen in Lipidvesikeln sichtbar zu machen [Korlach *et al.* 1999].

Mit Hilfe geeigneter Bildverarbeitungsroutinen könnten hier in Zukunft die dynamischen Zustände innerhalb und zwischen verschiedenen Lipidzonen modelliert, berechnet und sichtbar gemacht werden.

In Abb. 4.12.a. & b. sind die Absorptions- und Emissionsspektren von **$DiIC_{18}$** in cholesterinhaltigen SUV-Liposomen zu sehen.

Das maximumnormierte Exzitationsspektrum zeigt in diesem Liposomentyp keine temperaturabhängigen Veränderungen. Das Emissionsspektrum des Fluorophors erfährt mit steigender Temperatur (höherer Lipiddynamik) jedoch einen deutlichen Spektralshift zu kürzeren Wellenlängen.

4.1.6.2.4 DCVJ

DCVJ ist eine Fluoreszenzsonde, welche der Gruppe der fluoreszierenden molekularen Rotoren zugeordnet wird [Abb. 4.13.]. Die Quantenausbeute Φ_F fluoreszierender molekularer Rotoren ist stark abhängig von dem rotationalen Freiheitsgrad der atomaren Bindung, welche zwei intramolekulare Chromophore miteinander verbindet [Sawada *et al.* 1992].

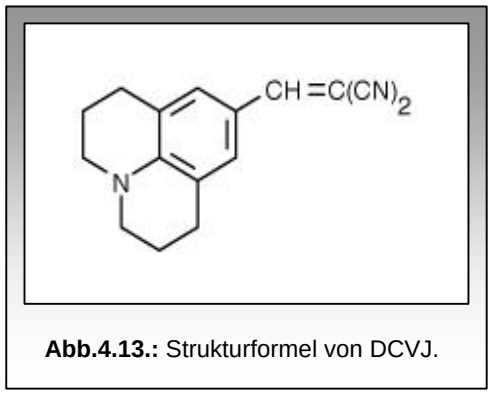


Abb.4.13.: Strukturformel von DCVJ.

Der niedrigste angeregte Singlet-Zustand des Moleküls wird einem intramolekularen Ladungstransfer der Form $(Donor)^+$-$(Akzeptor)^-$ zugeordnet.

Sowohl die photonen-emittierenden Übergänge als auch die strahlungslosen Übergänge liegen bei DCVJ im Bereich 10^{-11} s^{-1}.

Zum strahlungslosen Übergang kommt es durch intramolekulare geometrische Relaxation über Rotationen um die (Donor)-(Akzeptor) Achse oder durch Photoisomerisation der Ethylen-Doppelbindung [Sawada *et al.* 1992].

Wird die geometrische Relaxation durch ein eingeschränktes freies Volumen verhindert, so werden dadurch Photonen-emittierende Übergänge induziert. Folglich steigt die Quantenausbeute Φ_F von DCVJ mit abnehmendem freien Volumen (höherer Viskosität einer Lipidmatrix) an.

DCVJ wurde bislang zur Untersuchung von synthetischen Polymerreaktionen, G-F-Transformationen von Aktin [Sawada *et al.* 1992], Tubulinstrukturen [Kung & Reed 1989] und Mikroviskositätsänderungen in DPPC Phospholipidmembranen [Kung & Reed 1986] eingesetzt.

Der Fluorophor ist nach Kung & Reed (1986) im Kernbereich der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten lokalisiert. Seine Quantenausbeute $\mathbf{F_F}$ folgt dem von Förster und Hoffmann abgeleiteten Gesetz für torsional relaxierende Fluorophore [Förster & Hoffmann 1971]:

$$\mathbf{\log F_F = C + c \times (\log h)} \quad [4\text{-}4.]$$

C ist hier eine Konstante, **h** die Viskosität (bzw. die inverse Fluidität), und **c** hängt von den

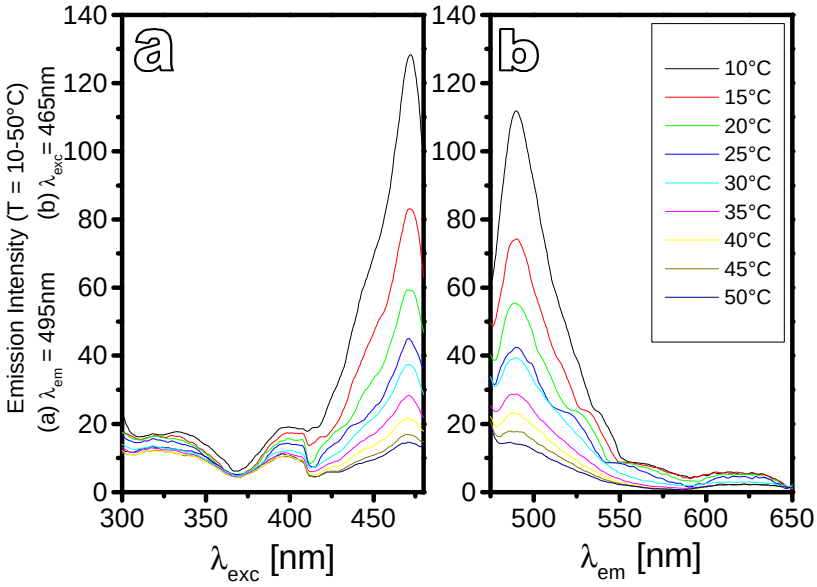


Abb.4.14.: Exzitationsspektrum [**a]** und Emissionsspektrum [**b]** des Membranfluorophors DCVJ (0,01mg Lipid/ml) in mit Cholesterin gesättigten SUV-Liposomen. Die Spektren wurden in einem Temperaturbereich zwischen 10° und 50°C aufgenommen. Das Emissionsspektrum zeigt mit steigender Temperatur eine sehr geringe Spektralverschiebung zu kleineren Wellenlängen. Das Exzitationsspektrum ist hingegen völlig temperaturunabhängig.

jeweiligen strukturellen Eigenschaften des Moleküls ab. Die Emissions- und Absorptionsspektren von DCVJ in cholesterinhaltigen Liposomen sind stark temperaturabhängig [Abb. 4.14.]. Daher steigen die Maxima des Emissions- und des Absorptionsspektrums mit sinkender Temperatur stark an. Im Emissionsspektrum kommt es zusätzlich zu einem geringfügigen Shift des Maximums hin zu höheren Wellenlängen.

4.1.6.2.5 FM 4-64®

FM 1-43® und FM 4-64® binden schnell, selektiv und reversibel an die äußere zelluläre Plasmamembranen, wodurch ihre Fluoreszenzintensität stark erhöht wird [Betz & Bewick 1992].

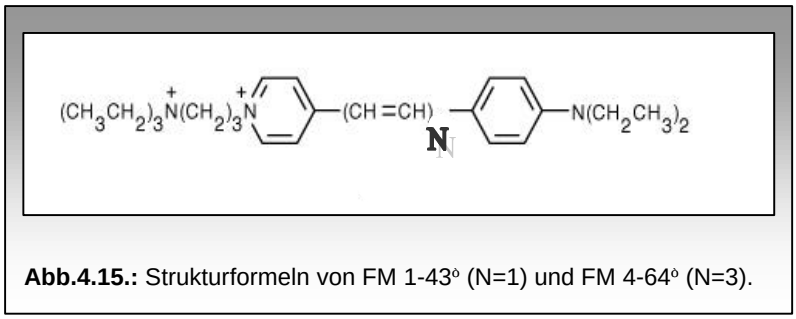


Abb.4.15.: Strukturformeln von FM 1-43® (N=1) und FM 4-64® (N=3).

Mit FM 1-43® und FM 4-64® wurden bisher Endo- und exozytotische Prozesse [z.B. Vida & Emr 1995, Shorte *et al.* 1995], gerichtete Vakuolenbewegungen [Hill *et al.* 1996] sowie andere zelluläre Prozesse, bei denen Membranen involviert sind, gemessen.

Da den wasserlöslichen Fluorophoren [Abb. 4.15.] bislang keine toxischen Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, eignen sie sich besonders zu *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen von zellulären Prozessen. In der Membranumgebung zeigen die Fluorophore der FM-Familie ausgeprägte Emissions- und Exzitations-spektralshifts [*Molecular Probes Handbook, Chapter 17.2.*].

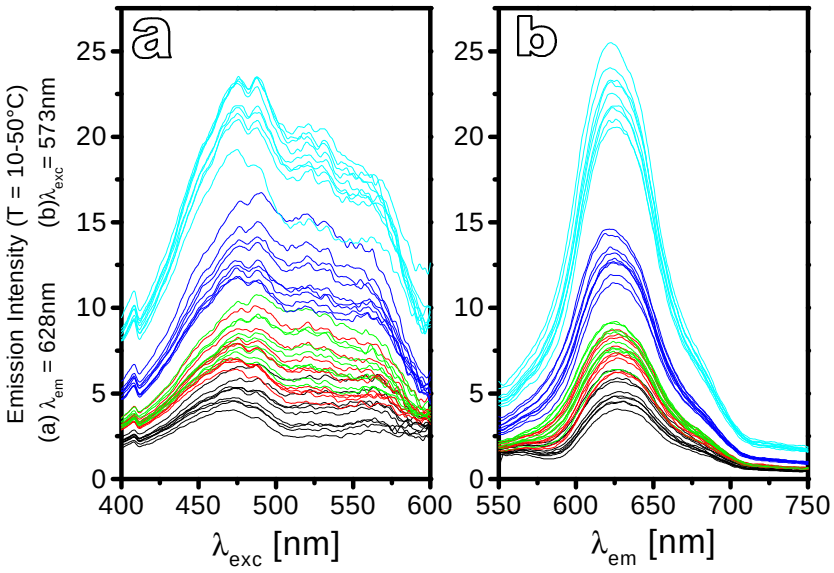


Abb.4.16.: Exzitationsspektrum [**a**] und Emissionsspektrum [**b**] des untoxischen Fluorophors FM 4-64 in Liposomen (0,01mg Lipid/ml) mit verschiedenem Cholesteringehalt [ansteigende Cholesterin-Konzentrationen farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau] gemessen im Temperaturbereich von 10 bis 50°C. Sowohl das Emissions- als auch das Exzitationsspektrum verändern die Intensität ihrer Maxima in Abhängigkeit des Cholesteringehalts und der Temperatur.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen ist jedoch zu sehen, daß weder Temperaturveränderungen noch Veränderungen in den Cholesterinkonzentrationen das Absorptionsspektrum oder das Emissionsspektrum von FM 4-64® in seinen Spektraleigenschaften beeinflussen [Abb. 4.16.].

Das Intensitätsmaximum steigt mit dem Cholesterinanteil in den Liposomen stark an (von schwarz, ohne Cholesterin, zu türkis, cholesteringesättigt).

4.2 EICHUNG FLUIDITÄTSSENSITIVER MEMBRANSONDEN

In den folgenden Abschnitten ist das Fluoreszenzverhalten der in Kap. 4.1.6. beschriebenen Membransonden in heterogenen Liposomen aus Eigelb-Lipiden unter dem Einfluß der dynamikrelevanten Parameter Temperatur (10 bis 50°C) und Cholesteringehalt dargestellt und diskutiert. Der Cholesterinanteil beträgt in den Liposomengruppen A-E: A: 0%, B: 29%, C: 49%, D: 65%, E: 100%, [mol[Chol.]/mol[PC] . 100]. Für Einzelheiten der Versuchsdurchführung und Präparationen siehe A4.1.1. bis A4.1.4..

Grundlegende Versuche mit den Fluorophoren an lebenden Zellen unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop werden in Kap. 4.3. diskutiert.

4.2.1 DPH, TMA-DPH, CARBOXYL -DPH (COO^--DPH)

Abb. 4.17.a.-f. zeigen die Anisotropie der Membranfluorophore DPH [a./b.], TMA-DPH [c./d.] und COO^--DPH [e./f.] als Funktion des Cholesteringehalts in PC-SUV-Liposomen [a./c./e.] und als Funktion der Inkubationstemperatur [b./d./f.].

Die Anisotropiewerte weisen im Temperaturbereich zwischen 10° und 50°C generell eine abfallende Tendenz auf. Als Ursache wird im allgemeinen eine Zunahme der rotationalen Freiheit der Fluorophore und dadurch eine ansteigende Fluidisierung der Lipidmatrix angegeben [Kap. 4.1.6.1.].

Die Tendenz ist bei dem präferenziell im Zentralbereich der Lipidmatrix lokalisierten DPH [Abb. 4.17.b.] deutlicher ausgeprägt als bei den eher im Glycerinbereich der Lipide verankerten DPH-Derivaten TMA-DPH und COO^--DPH [Abb. 4.17.d./f.].

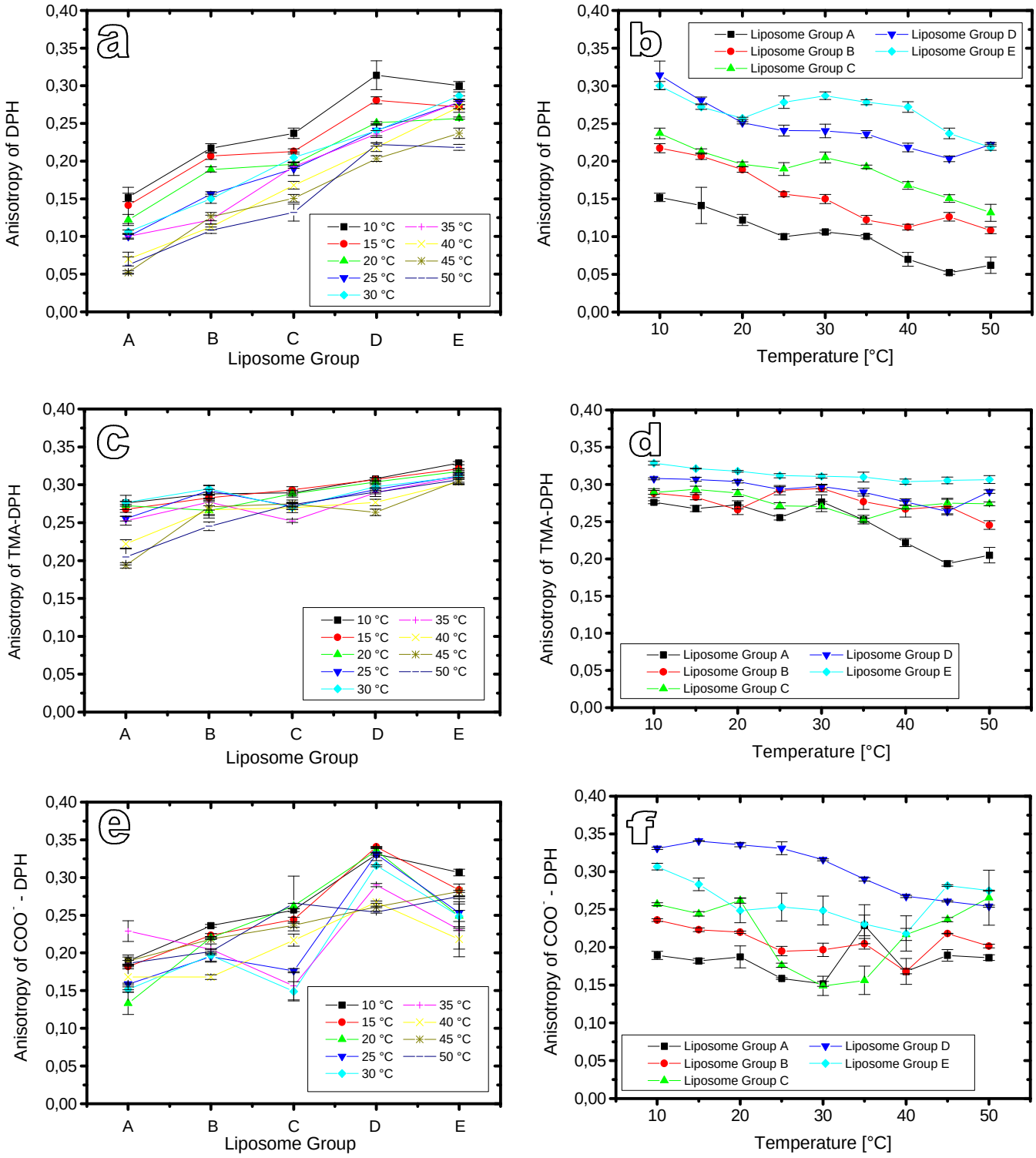


Abb.4.17.: Anisotropiewerte der Membranfluorophore DPH [a./b.], TMA-DPH [c./d.] und COO^--DPH [e./f.] als Funktion des Cholesteringehalts in PC-SUV-Liposomen [a./c./e.] und als Funktion der Inkubationstemperatur [b./d./f.]. Die Lipidkonzentration betrug in allen Fällen 0,01mg Lipid/ml (TRIS-Puffer, pH 7.4). Aufgetragen sind die Mittelwerte aus 3 Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Spektren wurden in einem Temperaturbereich zwischen 10° bis 50°C aufgenommen. Der Cholesteringehalt betrug in den Liposomengruppen A: 0%, B: 29%,C: 49%,D: 65% und E: 100% (mol[Ch.]/mol[PC]*100). Die Anisotropiewerte der Sonden zeigen mit steigender Temperatur eine fallende Tendenz [b./d./f.], was auf eine Zunahme der rotationalen Freiheit der Fluorophore und damit eine Fluidisierung der Lipidmatrix hindeutet. Bei dem eher im Zentralbereich der Lipidmatrix lokalisierten DPH [b.] ist diese Tendenz deutlicher ausgeprägt als bei den eher im Glycerinbereich der Lipide verankerten DPH-Derivaten TMA-DPH [d.] und COO^--DPH [f.]. Mit steigendem Cholesteringehalt [a./c./e.] zeigen alle Anisotropiewerte eine ansteigende Tendenz. Dies deutet auf eine Abnahme der rotationalen Freiheit der Membranfluorophore und damit auf eine Rigidisierung der Lipidmatrix hin. Das Verhalten von DPH ist deutlicher ausgeprägt als bei den Derivaten.

Mit steigendem Cholesteringehalt [Abb. 4.17.a./c./e.] erhöhen sich alle Anisotropiewerte. Dies deutet auf eine Abnahme der rotationalen Freiheit der Membranfluorophore und damit auf eine Rigidisierung der Lipidmatrix hin.

Auch dieses Verhalten ist bei DPH deutlicher ausgeprägt als bei seinen Derivaten.

In Abb. 4.18.a.-c. sind die Anisotropiewerte der Membranfluorophore DPH [a.], TMA-DPH [b.] und COO^--DPH [c.] farbcodiert als Funktion des Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur aufgetragen.

Es ist deutlich zu erkennen, daß die cholesterinreiche Lipidmatrix bei geringen Temperaturen die höchsten Anisotropiewerte aufweist. Dadurch wird ein maximal rigider Membranzustand angezeigt.

Dies verhält sich für die nahe der Membranoberflächen verankerten Fluorophore TMA-DPH und COO^--DPH ähnlich. Allerdings fallen die absoluten Veränderungen der Anisotropie erwartungsgemäß geringer aus als bei DPH.

Es wird deutlich, daß im inneren Membranbereich der cholesteringesättigten Liposomen bei einer Temperatur von 10°C annähernd die gleichen dynamischen Verhältnisse herrschen wie im oberen Acylkettenbereich (Anisotropiewerte zwischen 0,3 und 0,35).

Allerdings erhöht sich im Kernbereich der Membranen die rotationale Bewegungsfreiheit mit steigender Temperatur und sinkendem Cholesteringehalt weitaus deutlicher, als im Kopfgruppenbereich.

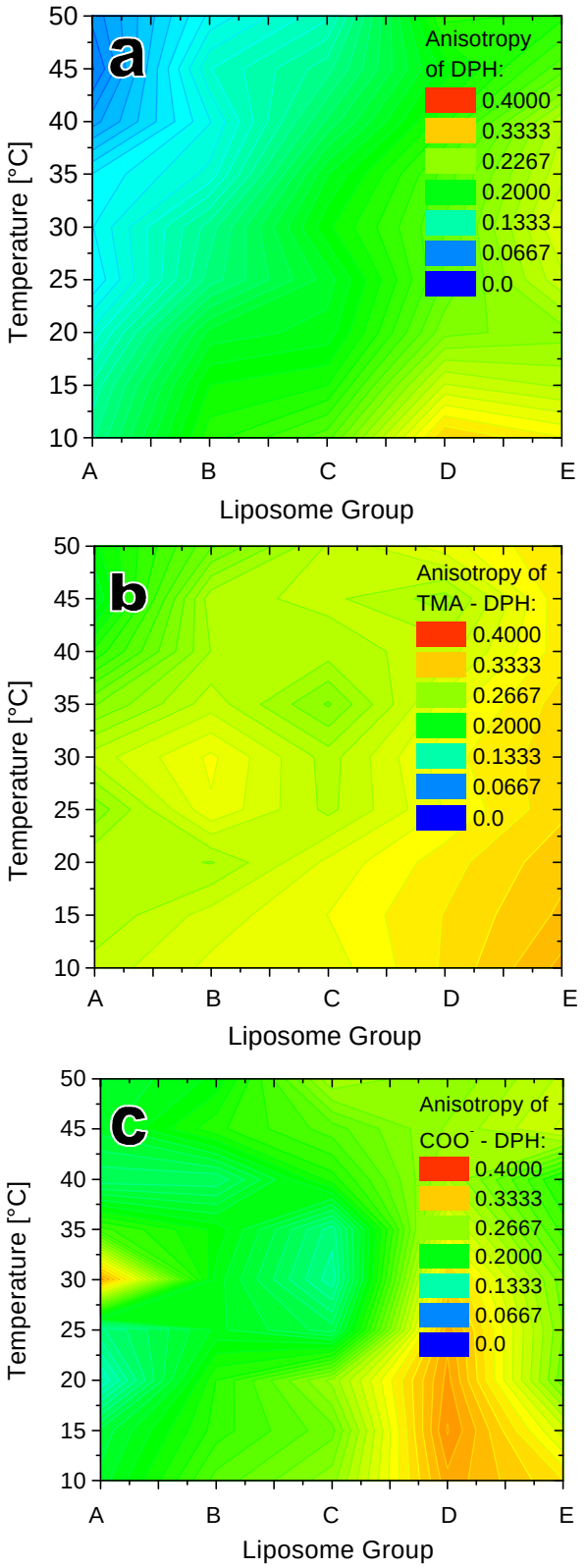


Abb.4.18.: Anisotropiewerte der Membranfluorophore DPH [a.], TMA-DPH [b.] und COO^--DPH [c.] als Funktion der Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur in PC-SUV-Liposomen (vergl. Abb. 4.17.). Die dargestellten Anisotropiewerte sind alle im Intervall zwischen 0 und 0,4 farbcodiert.

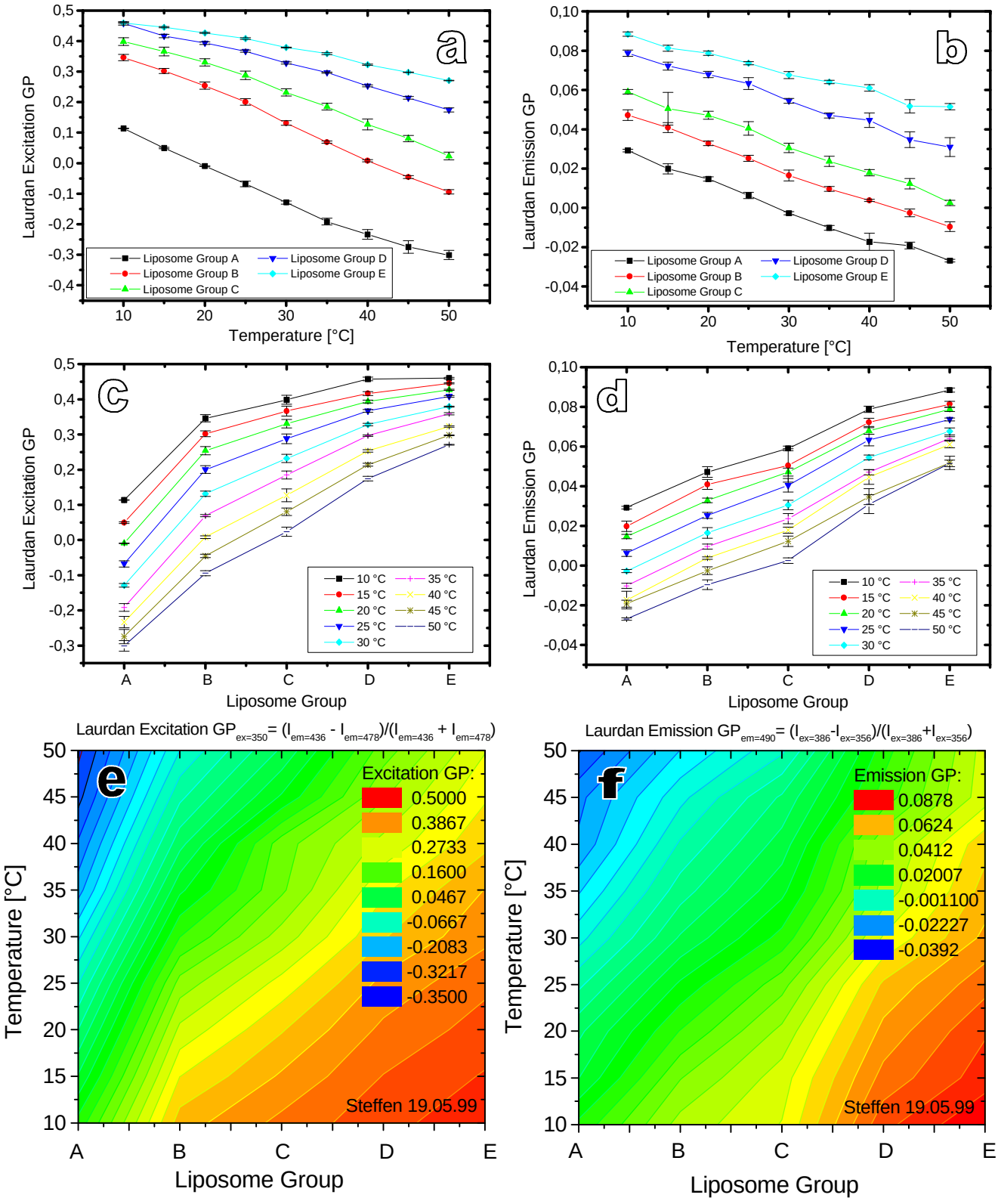


Abb. 4.19.: Generalisierte Polarisationen (**GP**) des Membranfluorophors Laurdan als Funktion des liposomalen Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur (Bedingungen siehe Abb. 4.18.). Die '***Exzitation GP***' (s. Definition Kap. 4.1.6.2.1.) des Emissionsspektrums von Laurdan [a./c./e.] deutet qualitativ gleiche Veränderungen der liposomalen Lipiddynamik an wie die '***Emission GP***' [b./d./f.]. Sowohl die *Exzitation GP* - als auch die *Emission GP* - Werte fallen mit steigender Temperatur [a/b/e/f] und steigen mit wachsendem Cholesterinanteil in den Liposomen [c./d./e./f.]. Quantitativ verlaufen die Veränderungen der *Exzitation GP* [-0.3, 0.5] jedoch über einen größeren Bereich ab als die der *Emission GP* [-0.03, 0.09].

4.2.2 LAURDAN

Die Generalisierte Polarisation (GP) des Membranfluorophors Laurdan ist als Funktion des liposomalen Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur in Abb. 4.19.a.-f. aufgetragen. Die '*Exzitation GP*' des Emissionsspektrums von Laurdan [a./c./e.] deutet qualitativ gleiche Veränderungen der Lipiddynamik an wie die '*Emission GP*' [b./d./f.]. Die Fluidität der Membran wird bei Laurdan indirekt über die Anzahl von polaren H_2O-Molekülen in der Fluorophorumgebung bestimmt (s. auch Kap. 4.1.6.2.1.).

Sowohl die *Exzitation GP*-als auch die *Emission GP*-Werte fallen mit steigender Temperatur [a./b.] und erhöhen sich mit wachsendem Cholesterinanteil in den Liposomen [c./d.]. Quantitativ decken die Veränderungen der *Exzitation GP* [-0.3, 0.5] jedoch einen größeren Wertebereich ab als die *Emission GP* [-0.03, 0.09]. Die Fehler der GP-Werte sind sowohl für die *Exzitation GP*-als auch für die *Emission GP*-Werte sehr gering. In Abb. 4.19.e./f. sind die Laurdan GP-Werte farbcodiert als Funktion des Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur aufgetragen. Es ist (in Analogie zu den DPH-Bestimmungen in Abb. 4.18.) deutlich zu erkennen, daß die cholesterinreiche Lipidmatrix bei geringen Temperaturen die höchsten GP-Werte aufweist und somit den rigidesten Membranzustand anzeigt.

4.2.3 NILE RED

In Abb. 4.20.a.-f. sind die Wellenlängen der maximalen Fluoreszenzintensität (λ_{MAX}) [a./c./e.] und die maximale Fluoreszenzintensität (I_{MAX}) [b./d./f.] des Membranfluorophors Nile Red [Kap. 4.1.6.2.2.] als Funktion des liposomalen Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur aufgetragen.

Die λ_{MAX}-Werte steigen mit zunehmender Inkubationstemperatur leicht an [a.]. Die Intensitätsmaxima [b.] hingegen fallen mit steigender Temperatur deutlich. Mit wachsendem Cholesterinanteil der Liposomen sinken die λ_{MAX}-Werte [c.], die I_{MAX}-Werte steigen jedoch an. Abbildungen e und f zeigen λ_{MAX} und I_{MAX} in Abhängigkeit der Temperatur und des Cholesteringehalts.

Die Messungen mit DPH haben gezeigt, daß die rotationale Freiheit mit zunehmender Temperatur oder abnehmendem Cholesteringehalt in der Lipidmatrix ansteigt [Abb. 4.18.]. Zusätzlich konnte aus den Laurdan-Messungen geschlossen werden, daß die Polarität in der Lipidmatrix mit zunehmender Temperatur oder abnehmendem Cholesteringehalt durch das verstärkte Eindringen von Wassermolekülen ansteigt [Abb. 4.19.].

Der Verlauf der Intensitätswerte von Nile Red [Abb. 4.20.b./d./f.] entspricht den Erwartungen, da der Fluorophor nach Deye *et al.* (1990) und Sackett & Wolff (1987) in unpolarer Umgebung eine Verstärkung seiner Fluoreszenzintensität erfährt. Es kann jedoch aus den beobachteten Intensitätsverläufen nicht eindeutig geschlossen werden, daß die veränderte Umgebungspolarität tatsächlich die Quantenausbeute des Fluorophors verändert. Alternativ ist möglich, daß der in Abhängigkeit von Temperatur und Cholesteringehalt stark variierende Partitionskoeffizient des Fluorophors die beobachteten Intensitätswerte bedingt.

Ein Vergleich der Wellenlängenshifts der Emissionsspektren [Abb. 4.20.a./c./e. und Abb. A4.4./5.] mit denen der Absorptionsspektren [Abb. A4.6./7.] zeigt deutlich, daß Wechselwirkungen während des angeregten Zustandes von Nile Red für die Verschiebungen der Wellenlängen in Abhängigkeit der Cholesterinkonzentration verantwortlich sind. Entsprechend zeigen die Exzitationsspektren nur sehr leichte Veränderungen.

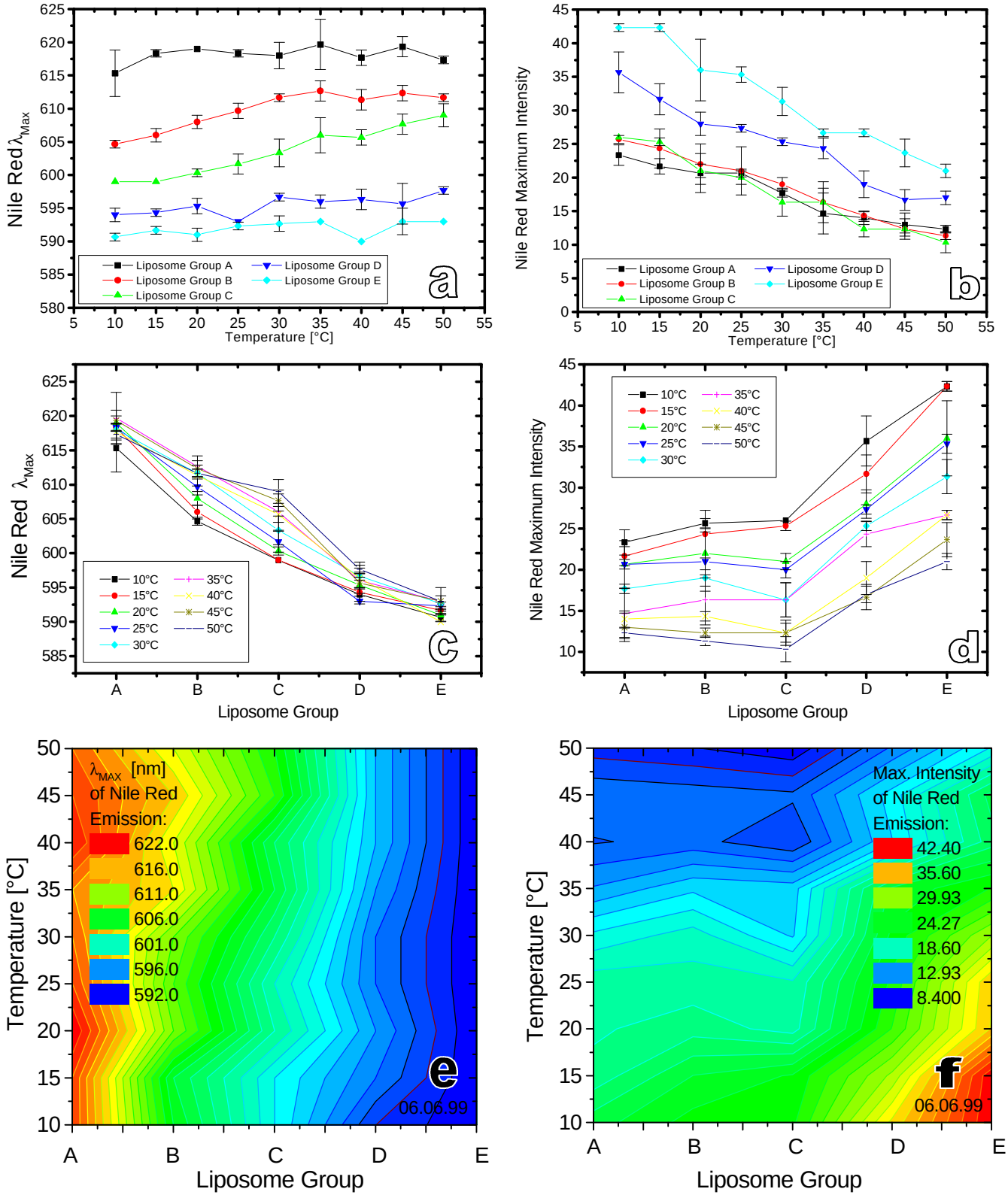


Abb.4.20.: Wellenlänge der maximalen Fluoreszenzintensität (λ_{MAX} [nm]) [a./c./e.] und maximale Fluoreszenzintensität (I_{MAX}) [b./d./f.] des Membranfluorophors Nile Red als Funktion des liposomalen Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur (Bedingungen siehe Abb. 4.18.). Die λ_{MAX}-Werte steigen mit zunehmender Inkubationstemperatur (höhere Lipiddynamik) leicht an [a.]. Die Intensitätsmaxima in b hingegen fallen mit steigender Temperatur deutlich. Mit wachsendem Cholesterinanteil der Liposomen sinken die λ_{MAX}-Werte [c.], die I_{MAX}-Werte steigen jedoch an. Abbildungen e und f zeigen farbcodiert λ_{MAX} und I_{MAX} in Abhängigkeit beider dynamikrelevanter Parameter aus a./c. bzw. b./d. .

Die nur sehr schwach vorhanden Verschiebungen in Abhängigkeit von der Temperatur, kann nicht allein durch temperaturbedingtes dynamisches '*Quenching*' erklärt werden. Der Intensitätsabfall aus Abb. 4.20.b. müßte im Vergleich zu Abb. 4.20.d. stärker ausfallen als beobachtet.

Entscheidend ist hier wohl eine temperaturbedingter Abfall der Fluorophorlebensdauer, der nicht die integrale Emissionsintensität, wohl aber mögliche Relexationszeiten des Fluorophors verkürzt und somit einer spektralen Verschiebung der emittierten Photonen entgegenwirkt. Zur Klärung dieser Vermutung wären spektralaufgelöste Messungen in Abhängigkeit der Lebensdauer der angeregten Zustände nötig, wie sie für Laurdan durchgeführt worden sind [Parasassi *et al.* 1993].

Das spektrale Verhalten der Nile Red Emission bei konstanter Temperatur ist vielversprechend. Es bietet die Möglichkeit, durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Emissionswellenlängen in den Wellenlängenbereichen [550 - 620nm] und [620 - 675nm] und anschließende Quotientenbildung Rückschlüsse auf die lokale Zusammensetzung der beobachteten Membranen bezüglich ihrer Hydrophobizität und Lipidkomposition abzuleiten (vergl. Laurdan [Kap. 4.2.2.] & $DiIC_N$ [Kap. 4.2.4.]).

4.2.4 $DiIC_{18}$, $DiIC_{16}$, $DiIC_{12}$ und FAST-DiI

4.2.4.1 $DiIC_{18}$

In den Abb. 4.21.a.-f. sind die Wellenlängen der maximalen Fluoreszenzintensität (λ_{MAX}) [a./c./e.] und die maximalen Fluoreszenzintensitäten I_{MAX} [b./d./f.] des Membranfluorophors $DiIC_{18}$ [Kap. 4.1.6.2.3.] als Funktion des liposomalen Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur aufgetragen.

Zwischen 30 und 40°C zeigen die λ_{MAX}-Werte der Liposomengruppen A, B und C einen ausgeprägten Shift zu kleineren Wellenlängen [Abb. 4.21.a.]. Sie erreichen dabei fast die λ_{MAX}-Werte der cholesterinreichen Liposomengruppen D und E. In Abhängigkeit der liposomalen Cholesterinkonzentration ist ebenfalls ein ausgeprägter Shift der Emissionsspektren innerhalb einer recht engen Variation der liposomalen Cholesterinkonzentration (Gruppen C und D) zu beobachten [Abb. 4.21.c.]. Für die farbcodierte Darstellung [Abb. 4.21.e.] ergibt sich daraus ein aus 2 Plateaus bestehendes Muster der λ_{MAX}-Verteilung, welche gegeneinander durch scharfe Übergänge abgegrenzt sind.

Das Verhalten der Intensitätsmaxima von $DiIC_{18}$ in Abhängigkeit der Temperatur Abb. 4.21.b. und der liposomalen Cholesterinkonzentration [Abb. 4.21.d.] gleicht tendenziell jenem von Nile Red [Kap. 4.2.3.]. Die Maxima sinken mit steigender Temperatur, und sie erhöhen sich ab Liposomengruppe C deutlich. Auch hier liegen die Werte der Liposomengruppen A, B und C relativ dicht beieinander. Gruppen D und E zeigen dagegen deutlich erhöhte Werte. Liposomengruppe E fällt bei $DiIC_{18}$ besonders auf (vergl. Abb. 4.20. & 3.21.b.). Die farbcodierte Intensitätsmatrix zeigt ein ähnliches Verhalten wie bei Nile Red.

Es ist aufschlußreich, die temperatur- und cholesterinabhängigen Emissionsspektren von $DiIC_{18}$ [Abb. A4.8/9.] und Laurdan [Abb. A4.1./2.] zu vergleichen. Die Exzitationsspektren von $DiIC_{18}$ [Abb. A4.10./11.] entbehren im Gegensatz zu jenen des Laurdans [Abb. A4.3.] jeder spektralen Verschiebung. Demzufolge wäre der klar ausgeprägte Spektralshift im $DiIC_{18}$-Emissionsspektrum, ebenso wie der von Laurdan, das Produkt von Wechselwirkungen mit der Fluorophorumgebung, welche während der Lebensdauer des angeregten Zustandes des Moleküls stattfinden.

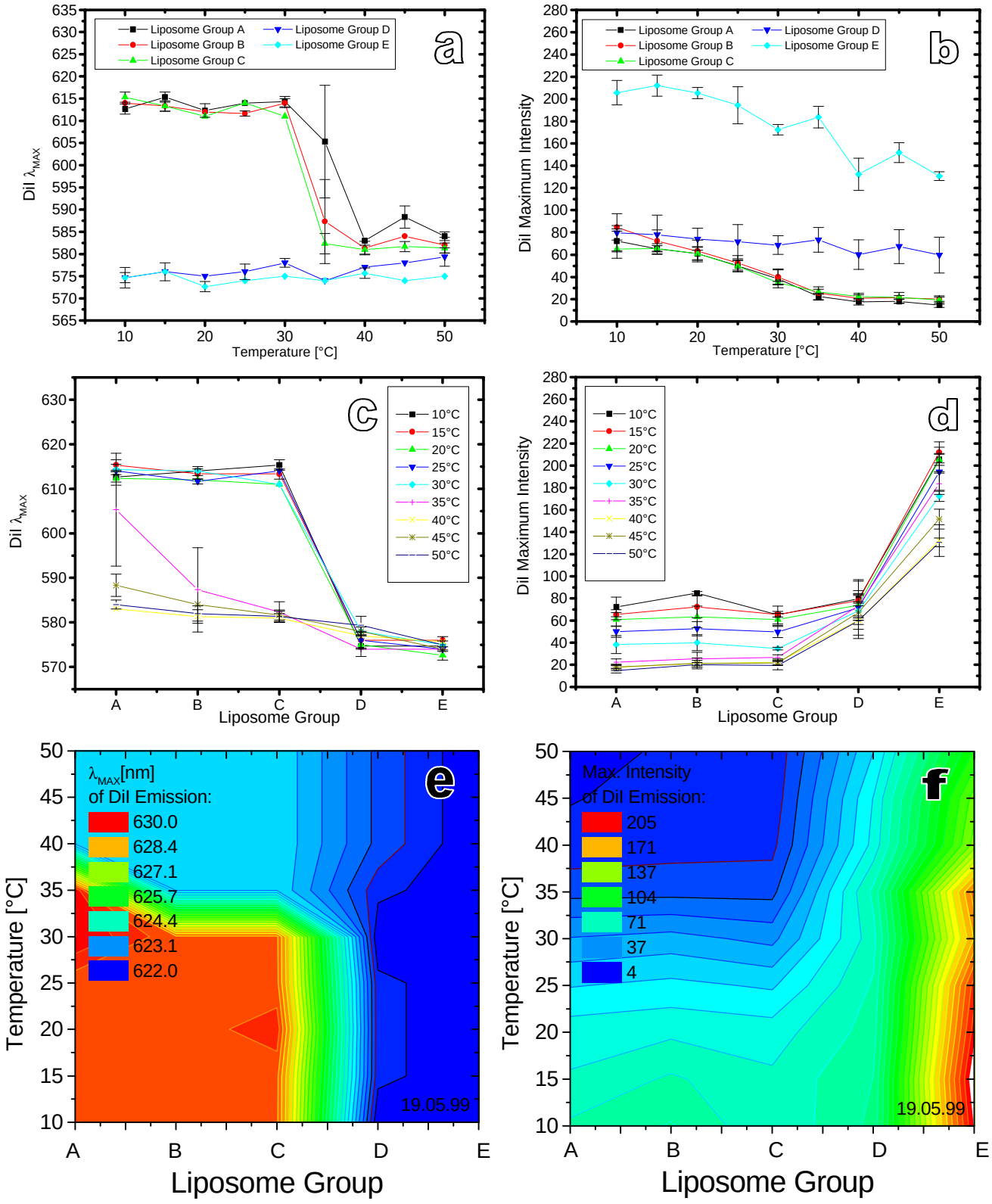


Abb.4.21.: Wellenlänge der maximalen Fluoreszenzintensität λ_{MAX} [nm] [a./c./e.] und maximale Fluoreszenzintensität I_{MAX} [b./d./f.] des Membranfluorophors $DiIC_{18}$ als Funktion des liposomalen Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur (Bedingungen siehe Abb. 4.18.). Zwischen 30 und 40°C zeigen die λ_{MAX}-Werte der Liposomengruppen A, B und C einen ausgeprägten Shift hin zu kleineren Wellenlängen [a.]. Auch in Abhängigkeit der liposomalen Cholesterinkonzentration (Liposomengruppen C und D) ist dieser ausgeprägte Shift zu beobachten [c.]. Mit steigender Temperatur fallen die Intensitätsmaxima von DiI [b.], mit wachsendem Cholesterinanteil der Liposomen steigen sie hingegen an [d.]. Abbildungen e und f zeigen farbcodiert λ_{MAX} und I_{MAX} in Abhängigkeit beider für die Lipiddynamik relevanten Parameter aus a./c. bzw. b./d. .

Der Vergleich der normalisierten, cholesterinabhängigen Emissionsspektren von Laurdan und $DiIC_{18}$ zeigt Übereinstimmungen dergestalt, daß der Emissionsshift bei konstanten Temperaturen von den Liposomen mit hohem Cholesteringehalt (rigide / hydrophobe Lipidmatrix) zu jenen mit sinkenden Cholesterinkonzentrationen (fluide / hydrophile Lipidmatrix) verläuft.

Konträr dazu verhalten sich die normalisierten Emissionsshifts in Abhängigkeit der Temperatur bei konstantem Cholesteringehalt (vergl. Abb. A4.2. mit Abb. A4.9.).

Aufgrund des ähnlichen Verhaltens der Verschiebungen der $DiIC_{18}$- und der Laurdan-Spektren kann für DiI ebenfalls ein Exzitations-GP-Wert definiert werden. Dieser läßt sich in Analogie zu Laurdan durch $\mathbf{GP} = (\mathbf{I}_\alpha - \mathbf{I}_\beta) / (\mathbf{I}_\alpha + \mathbf{I}_\beta)$ berechnen. Die Wellenlängen, bei denen $\mathbf{I}_\alpha$ und $\mathbf{I}_\beta$ gemessen werden, sind durch die Lage der Intensitätsmaxima der Emissionsspektren definiert, welche die beiden beobachtbaren Emissionszustände von $DiIC_{18}$ charakterisieren [Abb. 4.12.b., 10° & 50°C].

Da es sich bei der Lipidmatrix um Eigelb-PC handelt, welches im gemessenen Temperaturbereich keinen Phasenübergang aufweist, existiert hier keine Analogie zu den für Laurdan beobachteten Maxima in den Emissionswellenlängen der Gel -, respektive der flüssig-kristallinen-Phase. Die beiden klar ausgeprägten Emissionszustände von $DiIC_{18}$ in Eigelb-PC müssen auf andere Weise interpretiert werden.

Aus den Spektren in Abb. 4.12.b. leitet sich demzufolge die Formel für die $DiIC_{18}$-Exzitations-$GP_{ex=550nm} = (\mathbf{I}_{em=567} - \mathbf{I}_{em=586}) / (\mathbf{I}_{em=567} - \mathbf{I}_{em=586})$ als Maß für den Emissionszustand von $DiIC_{18}$ in der Membran ab.

In Abb. 4.22. sind die GP-Werte von $DiIC_{18}$ als Funktion des Cholesteringehalts und der Temperatur noch einmal aufgetragen. Die Exzitations-GP-Werte von $DiIC_{18}$ wachsen mit steigendem Cholesterinanteil [b./c.] und mit steigender Temperatur [a./c.]. Es kommt auch bei den GP-Werten zu diskreten, dem Verhalten von Phasenübergängen ähnelnden Veränderungen zwischen zwei Zuständen.

Der Verlauf der GP-Werte zwischen 25 und 40°C sowie innerhalb der Liposomengruppen C und E deutet darauf hin, daß zwei definierte Emissionszustände von $DiIC_{18}$ in/an der Lipidmatrix vorliegen.

Diese Emissionszustände könnten durch die folgenden Annahmen erklärt werden:

Hypothese 1 - Intramolekulare Erklärung: Es existieren diskrete Veränderungen in der Bindung des Fluorophors $DiIC_{18}$ an die Lipidmembran.

a) Erklärungsansatz in Analogie zu Laurdan. Steigende Anteile von Cholesterin verdrängen H_2O-Moleküle aus der Membran. Sie könnten ebenfalls die fluoreszenzsensitive Kopfgruppe von $DiIC_{18}$ von der Membran weg in das polare Milieu drängen. Bei steigenden Temperaturen dringen hingegen verstärkt H_2O-Moleküle in die oberen Regionen der Membranen ein und erhöhen die Polarität der Fluorophorumgebung. Es ist demnach möglich, daß Dipolrelaxationsprozesse durch Wechselwirkung mit den H_2O-Molekülen die Spektralverschiebung erklären.

Es sind Fluoreszenzmessungen des Fluorophors in Umgebungen mit definierten Polaritäten nötig, um diese Vermutung zu erhärten oder zu widerlegen.

b) Kohlenwasserstoffketten besitzen starke Ankerwirkung. Bereits geringe Veränderungen in der Acylkettenlänge haben großen Einfluß auf die Bindungsverhältnisse von Molekülen in oder an Lipidmembranen [Zeng & Chong 1995]. So haben Spink et al. (1990) die Partitionskoeffizienten von $DiIC_N$ ($12 \leq N \leq 22$) in verschiedenen Lipidphasen (flüssig-kristalline-und Gel-Phase) untersucht und in Abhängigkeit der Kettenlänge Partitions-koeffizienten K_p zwischen 0,02 und 8 in verschiedenen Lipidmembranen gemessen.

Durch die langen, hydrophoben Acylketten wird $DiIC_{18}$ bei niedrigen Cholesterin-konzentrationen und niedrigen Temperaturen verstärkt in den hydrophoben Bereich der Lipidmembran 'hineingezogen'. Eine definierte Einlagerung könnte auf $DiIC_{18}$ Kräfte ausüben die eine Konfigurationsänderung im fluoreszenten Kopfgruppenbereich induzieren.

In Abb. 4.11. ist zu sehen, daß die Kopfgruppen von DiI_{18} eine asymmetrische Ladungsverteilung an einem der beiden Stickstoffatome besitzen. Es wäre ein 'Abknicken' der ladungsfreien, hydrophoberen Hälfte der Kopfgruppe in die Lipidmembran denkbar. Dadurch könnten sich die Elekronenorbitale hinreichend stark verschieben. Derartige Verschiebung der Elekronenorbitale müßten sich allerdings auch auf das Exzitationsspektrum eines Fluorophors auswirken. Dieses bleibt bei $DiIC_{18}$ jedoch unverändert [Abb. A4.10. & Abb. A4.11.].

Um diese These weitergehend zu untersuchen, sind Messungen mit DiI-Derivaten unterschiedlicher Kettenlänge nötig (siehe auch Ergebnisse in Abb. 4.22.& 4.23.).

Hypothese 2 - Intermolekulare Erklärung: Es findet eine fluiditätsabhängige, laterale Umverteilung der Membranfluorophore statt.

Eine laterale Umverteilung der Membranfluorophore könnte entweder zu statischen oder dynamischen Bildungen von Di-, Tri- oder Polymeren von $DiIC_{18}$ führen oder es kommt zu abstandsabhängigen zwischenmolekularen Wechselwirkungen ohne eine direkte Bildung von Aggregaten.

Abstandsabhängige Wechselwirkungen sind für viele Fluorophore beschrieben [z.B. den fluoreszenten Sphingomyelinanalog 'C5-DMB-SM', Chen *et al.* 1997]. Temperatur und Cholesterin können laterale Inhomogenitäten in der Verteilung von $DiIC_{18}$ in der Membran induzieren.

Korlach *et al.* (1999) haben mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie an DLPC-DPPC-Cholesterin-Vesikeln phasendefinierte Anreicherungen von $DiIC_{20}$ bereits visualisiert. Die Verfasser beschränkten sich in ihrer Diskussion allerdings auf intensitäts-abhängige Variablen, da die in dieser Arbeit gezeigten Spektralverschiebungen von $DiIC_N$ bislang nicht beschrieben wurden.

Zur Klärung dieser These sind spektrometrische Messungen mit $DiIC_N$-Derivaten unterschiedlicher Kettenlänge N in Liposomen unterschiedlicher Acylkettenlänge und bei verschiedenen Fluorophorkonzentrationen nötig.

*Eine andere Möglichkeit, das beobachtete Fluorophorverhalten eindeutig zu charakterisieren, ist es, große Liposomen mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie temperaturabhängig zu untersuchen. Hierbei könnten pixelweise die Intensitäten bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen und daraus lokale GP-Werte bestimmt werden. Induzierte lokale Agglomerationen der Fluorophore **UND** deren Spektralverhalten könnten orts- und zeitgleich bestimmt und somit interpretiert werden.*

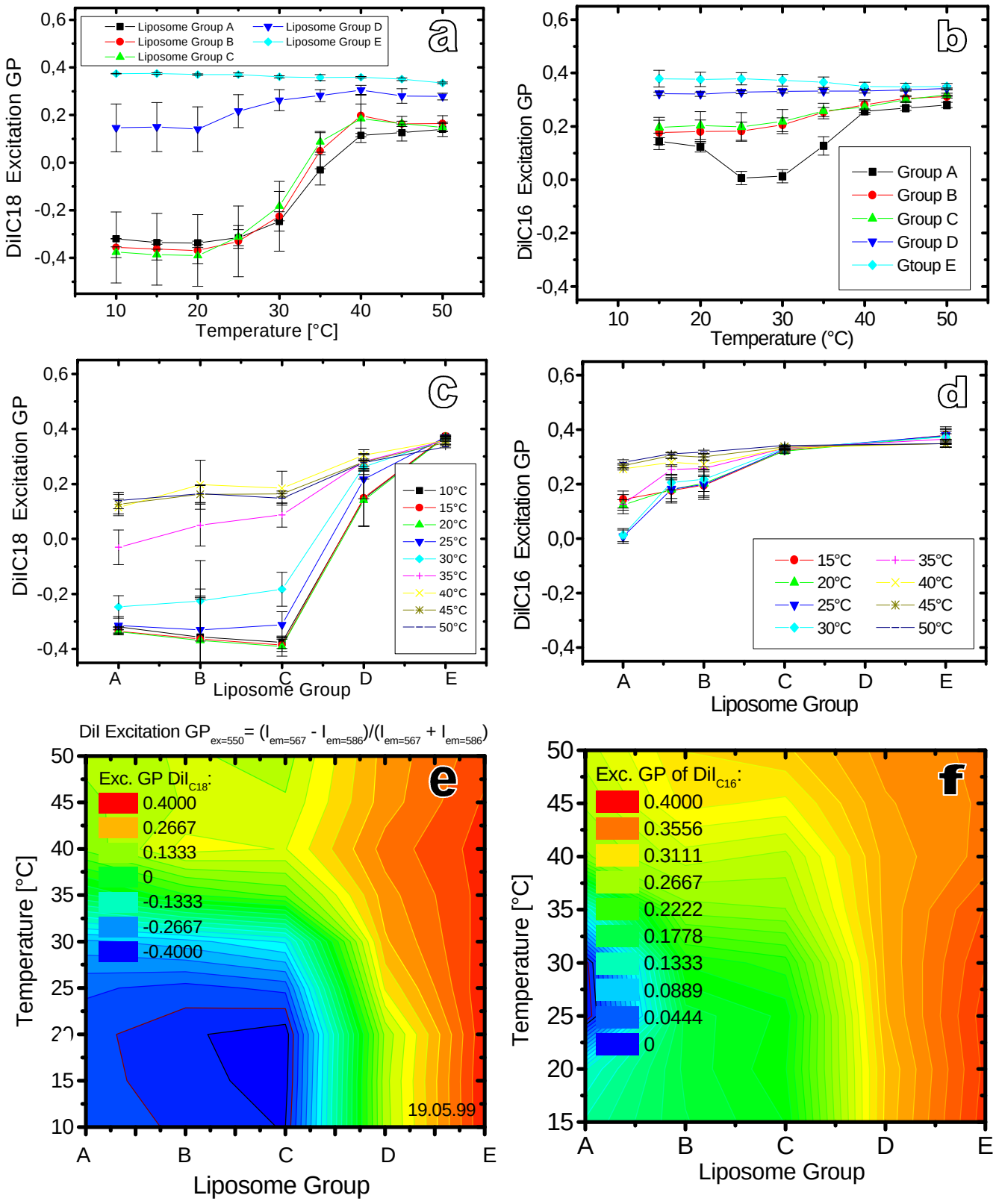


Abb.4.22.: Generalisierte Polarisationen (GP) des Membranfluorophors DiIC$_{18}$ [a./c./e.] und DiIC$_{16}$ [b./d./f.] als Funktion des liposomalen Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur (Meßbedingungen s. Abb. 4.18.). Die GP-Werte von DiIC$_{18}$ und DiIC$_{16}$ wachsen mit steigendem Cholesterinanteil [c./d.] und mit steigender Temperatur [a./c.]. Der Verlauf der GP-Werte von DiI$_{C18}$ zwischen 25 und 40°C sowie innerhalb der Liposomengruppen C und E deutet entweder auf eine diskrete Veränderung der Bindungsverhältnisse von DiIC$_{18}$ an die Membran oder auf eine definierte laterale Umverteilung der Membranfluorophore hin. Bei DiI$_{C16}$ ist dieses Verhalten ebenfalls zu beobachten, wenn auch in abgeschwächter Form und zu geringeren Temperaturen und geringeren Cholesterinkonzentrationen verschoben.

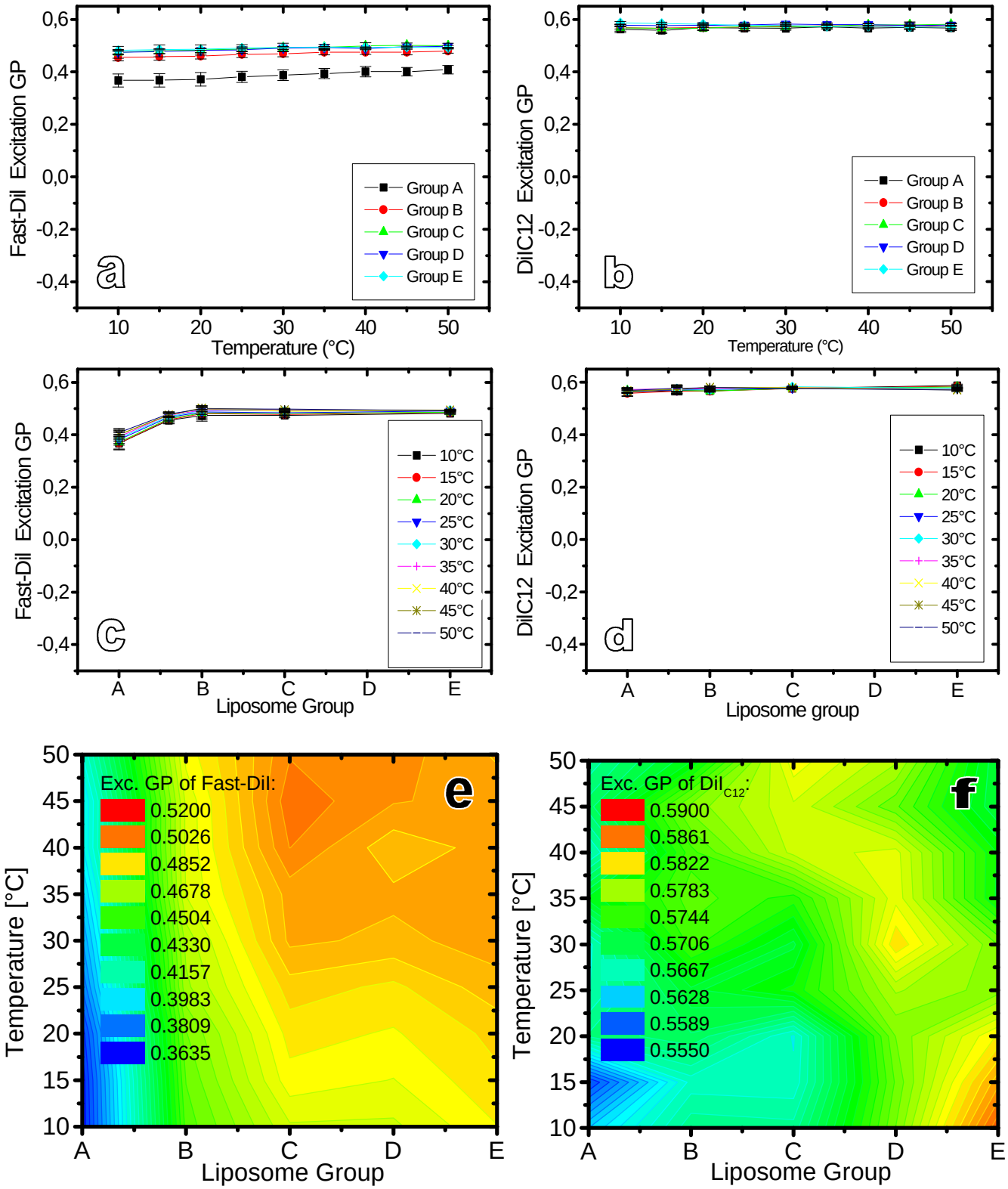


Abb.4.23.: Generalisierte Polarisationen (GP) des Membranfluorophors Fast-DiI [a./c./e.] und DiI$_{C12}$ [b./d./f.] als Funktion des liposomalen Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur (Meßbedingungen s. Abb. 4.18.). Die GP-Werte von Fast-DiI und DiIC$_{12}$ wachsen nur schwach mit steigendem Cholesterinanteil [c./d.] und mit steigender Temperatur [a./c.]. Bei Fast-DiI ist nur bei geringen Cholesterinkonzentrationen ein deutlicher Abfall der GP-Werte zu beobachten. Die GP-Werte von DiIC$_{12}$ bleiben von der Temperatur und vom Cholesteringehalt unbeeinträchtigt.

4.2.4.2 $DiIC_{16,}$ $DiIC_{12}$ UND FAST-DiI

Um den beobachteten ausgeprägten Spektralshifts von $DiIC_{18}$ näher zu untersuchen, wurden vergleichende Messungen mit $DiIC_{16,}$ $DiIC_{12}$ und FAST-DiI [Kap. 4.1.6.2.3.] durchgeführt. Die Acylkette von FAST-DiI (C_{18}) ist am dritten C-Atom (C3) einfach ungesättigt. Demnach ist das hydrophobe Wechselwirkungspotential hinsichtlich der Assoziation der Fluorophore mit der Lipidmembran erwartungsgemäß: $DiIC_{18} > DiIC_{16} > (DiIC_{12} \approx FAST\text{-}DiIC_{18(3)})$.

Die Ergebnisse der Messungen aus Abb. 4.22.c./d., Abb. 4.23.c./d. und aus Abb. A4.12.-17. zeigen eindeutig eine von der Bindungsaffinität abhängige, sukzessive zu Liposomen mit geringerem Cholesterinanteil. Hingegen können die Ergebnisse in Abhängigkeit der Temperatur nicht eindeutig auf eine Verschiebung des zurückgeführt werden. Hier könnte ebenfalls eine Auflösung des GP-Übergangs vorliegen [Abb. 4.23.a./b. & Abb. 24.a./b.].

Aus den beobachteten Spektralveränderungen kann die im ersten Abschnitt beschriebene Unsicherheit bezüglich der lipophilen Bindungsaffinität zwischen $FAST\text{-}DiIC_{18(3)}$ und $DiIC_{12}$ eindeutig zugunsten $FAST\text{-}DiIC_{18(3)} > DiIC_{12}$ entschieden werden. Die Lipophilie in Abhängigkeit der Länge der Acylketten und dem Grad ihrer Sättigung ist als determinierender Faktor für den beobachteten Spektralshift bestätigt.

Allein durch die Variation der Kettenlängen kann allerdings keine abschließende Beurteilung hinsichtlich der Hypothesen 1 und 2 aus Kap. 4.2.4.1. erfolgen. Sowohl intramolekulare als auch intermolekulare Wechselwirkungen können Funktionen der Lipophilie der Acylketten sein.

Die Messungen mit $DiIC_{16,}$ $DiIC_{12}$ und FAST-DiI wurden von Herrn cand. phys. Markus Haas durchgeführt, der die beobachteten Spekralverschiebungen der DiI-Derivate derzeit im Rahmen seiner Diplomarbeit genauer untersucht.

Zusammenfassend kann zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden, daß $DiIC_{18}$ und seine Derivate für angestrebte Messungen an lebenden Zellen aufgrund des beobachteten ausgeprägten Spektralshifts von höchstem Interesse sind. $DiIC_N$-Derivate eröffnen die Möglichkeit, nicht nur Anreicherungen der Fluorophore in Membranbereichen definierter Lipidkomposition zu detektieren (durch lokale Messungen der Intensität), sondern zusätzlich dynamische Veränderungen aus fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen abzuleiten (durch lokale Berechnung der GP-Werte).

Diese Kombination macht $DiIC_N$-Derivate nicht nur für eine Reihe zellbiologischer Fragestellungen interessant. Auch grundlegende Messungen der Phasen-Dynamik an Liposomvesikeln können in Zukunft fluoreszenzmikroskopisch durchgeführt werden und neue Antworten über die komplexen Strukturbildungen in Vielteichen-Lipidsystemen liefern (vergl. Kap. 4.1.).

4.2.5 DCVJ

In Abb. 4.24.a.-f. sind die Wellenlängen der maximalen Fluoreszenzintensität (λ_{MAX}) [a./c./e.] und die maximalen Fluoreszenzintensitäten I_{MAX} [b./d./f.] des ‘molekularen Rotors’ DCVJ [Kap. 4.1.6.2.4.] als Funktion des liposomalen Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur aufgetragen.

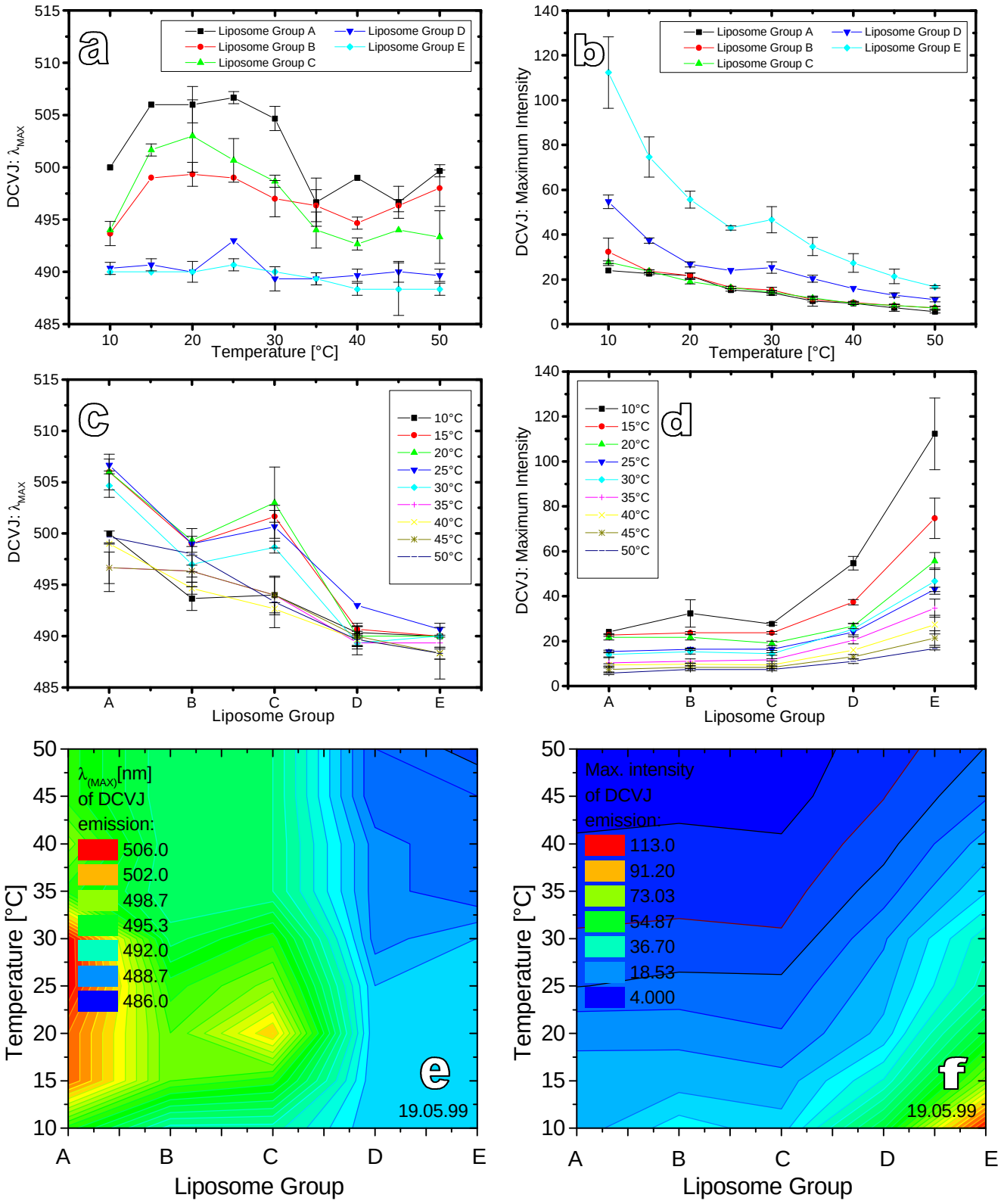


Abb.4.24.: Wellenlänge der maximalen Fluoreszenzintensität λ_{MAX} [nm] [a./c./e.] und maximale Fluoreszenzintensität I_{MAX} [b./d./f.] des Membranfluorophors DCVJ als Funktion des liposomalen Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur (Bedingungen siehe Abb. 4.18.). Die λ_{MAX}-Werte von DCVJ zeigen in Abhängigkeit der Temperatur ein uneinheitliches Verhalten [a.]. In Abhängigkeit der liposomalen Cholesterinkonzentration ist ein Shift zu kleineren Wellenlängen zu beobachten [c.]. Mit steigender Temperatur fallen die Intensitätsmaxima von DCVJ exponentiell [b.], mit wachsendem Cholesterinanteil der Liposomen hingegen ist ab Liposomengruppe C ein exponentieller Anstieg zu erkennen [d.]. Abbildungen e und f zeigen farbcodiert λ_{MAX} [e.] und I_{MAX} [f.] in Abhängigkeit beider für die Lipiddynamik relevanten Parameter aus a./c. bzw. b./d. .

Im Gegensatz zu Laurdan, Nile Red und DiI geben die Verteilungen der λ_{MAX}-Werte von DCVJ in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur oder des liposomalen Cholesteringehalts keinen Anlaß zur Hoffnung, mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen verläßlich dynamikrelevante Membranparameter ableiten zu können.

Die Quantenausbeute und damit die Emissionsintensität von DCVJ sind von der intramolekularen, rotationalen oder torsionalen Relaxationszeit abhängig [Kap. 4.1.6.2.4.]; sie steigt aufgrund von eingeschränkter Relaxation der intramolekularen Rotation durch abnehmendes freien Volumen stark an [Kung & Reed 1986]. Weder der temperaturabhängige [Abb. 4.24.a./b.] noch der cholesterinabhängige [Abb. 4.24.c./d.] Verlauf der Fluoreszenzintensitäten steht im Gegensatz zu dieser Interpretation. Höhere Cholesterinkonzentrationen und sinkende Temperaturen engen das freie Volumen von Membranfluorophoren ein (vergleiche Interpretation mit DPH aus Kap. 4.2.1.).

Die farbcodierte Intensitätsverteilung von DCVJ [Abb. 4.24.f.] läßt sinnvolle Aussagen über den dynamischen Zustand der Membranen zu (vergl. Laurdan, Kap. 4.2.2. & DPH, Kap. 4.2.1.). Allerdings würde auch ein alternativer Interpretationsansatz über temperatur- und cholesterinbedingte Änderungen der Partitionskoeffizienten von DCVJ nicht im Widerspruch zu der beobachteten Intensitätsverteilung stehen.

4.2.6 FM 4-64Ò

Die Wellenlängenmaxima der Fluoreszenzintensität (λ_{MAX}) [Abb. 4.25.a./c./e.] von FM 4-64® [Kap. 4.1.6.2.5.] zeigen geringe, kontinuierliche Veränderungen in Abhängigkeit des Cholesteringehalts [c.] oder der Temperatur [a.]. Die fluideren Lipidmatritzen bewirken einen schwachen Abfall der λ_{MAX}-Werte, der für die Cholesterinvariationen deutlicher ausfällt als für die Temperaturverteilung.

Somit konnten die von der Herstellerfirma angegebenen ausgeprägten Shifts im Emissions- und Exzitationsspektrum in Abhängigkeit der Membranumgebung nicht bestätigt werden [‘*Molecular Probes Handbook, Chapter 17.2.*’]. Tendenziell spiegelt die Darstellung der λ_{MAX}-Werte von FM 4-64® die Dynamik des Lipidsystems wider; jedoch fallen aufgrund der geringen absoluten Variationen von λ_{MAX} kleine Messschwankungen deutlich ins Gewicht. Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen ist der Parameter λ_{MAX} demzufolge ungeeignet.

Größe und Struktur der molekularen Lipidklammern FM 4-64® weisen Ähnlichkeiten mit dem Membranfluorophor $DiIC_N$ auf [Kap. 4.1.6.2.3.]. Aufgrund der kürzeren hydrophoben Bereiche an den beiden Enden des Moleküls [Abb. 4.15.] bindet es reversibel an die äußeren Lipidmembranen und ist demzufolge für Messungen dynamischer Membranparameter mit Hilfe von FRAP-Methoden hinlänglich ungeeignet ($DiIC_N$ ist hingegen fest an der Lipidmatrix gebunden Abb. 4.11.).

Dennoch weisen die Intensitätsspektren von FM 4-64® in Abhängigkeit der Temperatur und der Cholesterinkonzentration [Abb. 4.25.b./d.] starke Ähnlichkeiten mit jenen von $DiIC_{18}$ [Abb. 4.21.b./d.] auf. Die Intensitätswerte reagieren auf Veränderung der Temperatur schwächer als auf Veränderungen der liposomalen Cholesterinkonzentration. Bei konstanter Temperatur ist folglich die Emissionsintensität von FM 4-64® ein möglicher Indikator einer lokalen Lipidkomposition.

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Interpretationen von Fluiditätsmessungen an Zellen ist der Parameter I_{MAX} allein nicht ausreichend. Es kann nicht geklärt werden, ob beobachtbare lokale Intensitätsschwankungen durch dynamische Prozesse der Matrix oder durch lokal unterschiedliche Anreicherungen der FM 4-64®-Konzentration hervorgerufen werden.

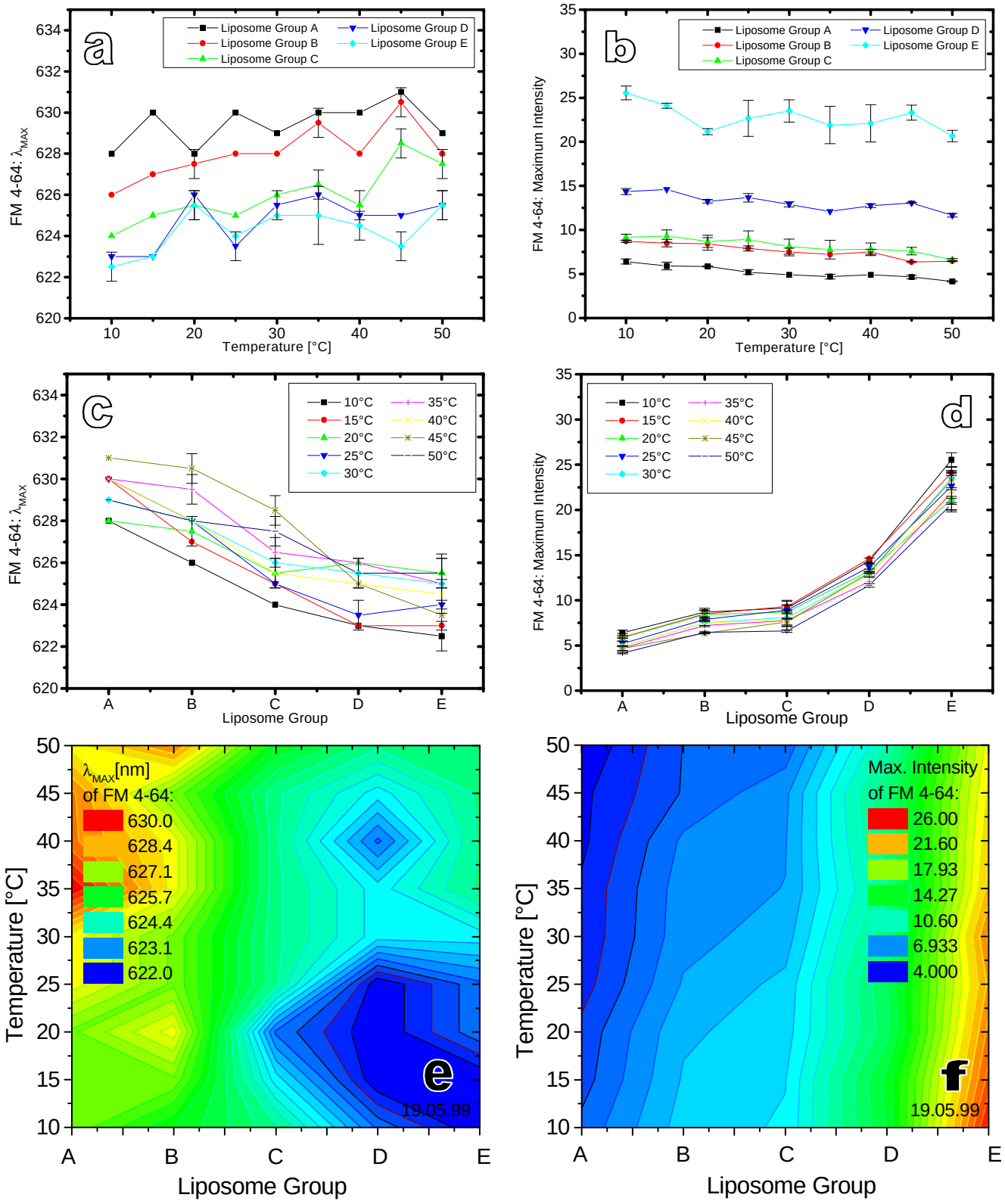


Abb.4.25. Wellenlänge der maximalen Fluoreszenzintensität λ_{MAX} [nm] [a./c./e.] und maximale Fluoreszenzintensität I_{MAX} [b./d./f.] des Membranfluorophors FM 4-64° als Funktion des liposomalen Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur (Bedingungen siehe Abb. 4.18.). Die λ_{MAX}-Werte von FM 4-64° steigen in Abhängigkeit der Temperatur geringfügig an [a.]. In Abhängigkeit der liposomalen Cholesterinkonzentration ist ein Shift zu kleineren Wellenlängen zu beobachten [c.]. Mit steigender Temperatur fallen die Intensitätsmaxima von FM 4-64°nur wenig [b.], mit wachsendem Cholesterinanteil der Liposomen hingegen ist ab Liposomengruppe C ein starker Anstieg zu erkennen [d.]. Abbildungen e und f zeigen farbcodiert λ_{MAX} [e.] und I_{MAX} [f.] in Abhängigkeit beider für die Lipiddynamik relevanten Parameter aus a./c. bzw. b./d. .

4.2.7 Cholesterin- und Temperatursensitivität der verwendeten Membranfluorophore.

Als Maß für die Sensitivität der in den vorangegangenen Kapiteln diskutierten Fluoreszenzparameter der Membransonden DPH, TMA-DPH, COO^--DPH, Laurdan, Nile Red, $DilC_N$, DCVJ und FM 4-64® bezüglich des Cholesteringehalts und der Inkubationstemperatur wurde der in Abb. 4.26. beschriebene '*Sensitivity Ratio*' (SR) verwendet (Quotient aus dem ***'Parameter Range'*** und des ***'Minimum Error'*** der 95% Grenzen).

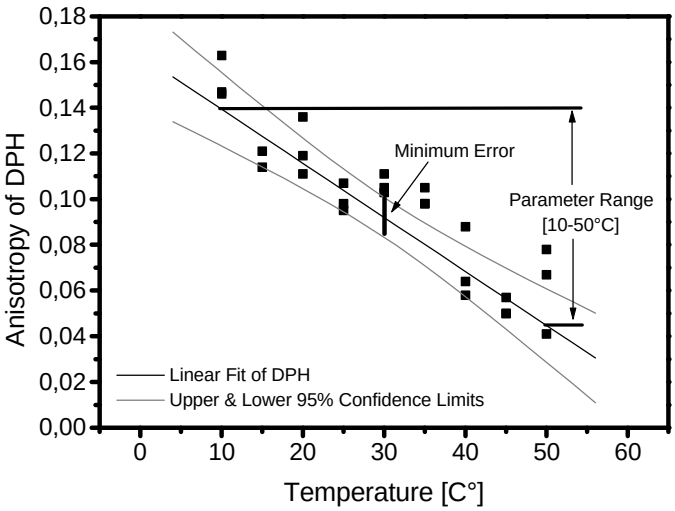


Abb.4.26.: Darstellung einer linearen Regression für die temperaturabhängigen Anisotropiewerte des Membranfluorophors DPH in cholesterinfreien Liposomen. Die für die Berechnung des '*Sensitivity Ratios*' [Abb. 4.27.] verwendeten Größen '*Parameter Range*' und '*Minimum Error* ' der 95% Vertrauensgrenzen sind in der Abbildung skizziert.

Mit steigendem SR(T) bzw. SR([Ch]) steigt die Güte der mit dem entsprechenden Fluorophor zu erlangenden Aussagen über temperatur- oder cholesterininduzierte dynamische Schwankungen einer Lipidmatrix.

Für die verschiedenen Fluorophore aus Abb. 4.27. wurde SR(T) mit den cholesterinfreien Liposomen bestimmt.

Die Anisotropie von DPH, die generalisierten Polarisationen (GP) von Laurdan und die Intensitätswerte von DCVJ übertreffen deutlich jene der übrigen Fluorophorparameter.

Eine zweite Klasse wird von den Intensitätswerten von Nile Red, $DiIC_{18}$ und FM 4-64®, sowie den λ_{MAX}-Werten von $DiIC_N$ gebildet.

Weniger temperaturabhängige Sensitivität weist dagegen die Anisotropie von TMA-DPH auf.

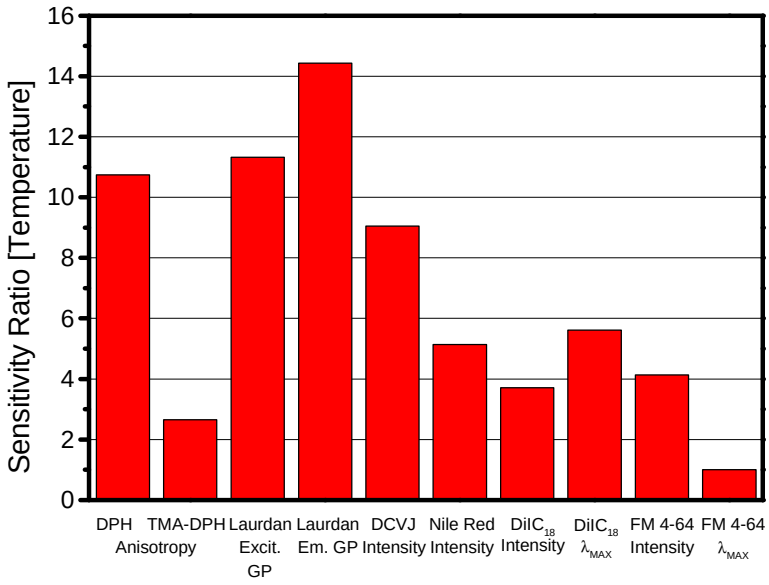


Abb.4.27.: Darstellung des temperaturabhängigen '*Sensitivity Ratios*' (dem Quotient des '*Parameter Range*' und des '*Minimum Error*', Definition s. Abb. 4.26.) für ausgewählte fluiditätssensitive Membranfluorophore.

Interessanterweise übertrifft Laurdans Emissions-GP, welche auf den nur schwach ausgeprägten absoluten Shifts der Exzitationsspektren beruht, das Exzitations-GP des Fluorophors aufgrund der geringen Meßschwankungen.

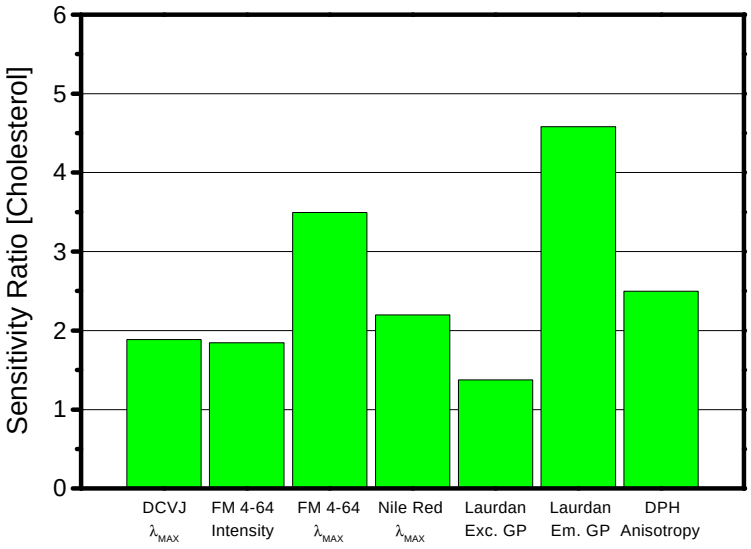


Abb.4.28.: Darstellung des cholesterinabhängigen '*Sensitivity Ratios*' (dem Quotienten des '*Parameter Range*' und des '*Minimum Error*', Definition s. Abb. 4.26.) für ausgewählte fluiditätssensitive Membranfluorophore.

SR([Ch]) für die verschiedenen Fluorophore aus Abb. 4.28. wurden mit den Liposomen der Gruppen A: 0%, B: 29%, C: 49%, D: 65% und E: 100% (mol[Ch]/ mol[PC]*100) bei 10°C berechnet.

Nur wenige Membranfluorophore zeigen in Abhängigkeit des Cholesteringehalts einen linearen Verlauf. Ein lineares Verhalten bildet jedoch die Voraussetzung für eine sinnvolle Berechnung des *Sensitivity Ratios*.

Nach diesem Kriterium ist der Laurdan-Emissions-GP am besten geeignet, cholesterininduzierte Änderungen der Membranfluidität in einer Lipidmatrix sensitiv zu bestimmen (vergl. Abb. 4.28. & Abb. 4.19.d.).

Die hohe Sensitivität von FM 4-64® ergibt sich aus der guten Reproduzierbarkeit der Messungen. Die Spektren weisen hingegen nur eine minimale Verlagerung des Fluoreszenzmaximums auf. Für mikroskopische Messungen ist diese Verschiebung unzureichend.

Das Spektralverhalten von DCVJ [Abb. A4.18.], Nile Red [Abb. A4.5.] und $DiIC_{18}$ [Abb. A4.9.] rechtfertigt den Einsatz dieser Fluorophore für fluoreszenzmikroskopische oder spektrometrische Untersuchungen von Membranfluiditäten und lokalen Lipidkompositionen.

4.3 Eignung der Membransonden für Fluiditätsmessungen an Zellen unter Kulturbedingungen

Die in Kapitel 4.2. vorgestellte Eichung der Membranfluorophore in Liposomen unter definierter Variation der fluiditätsregulierenden Parameter Temperatur und Cholesteringehalt brachten zum Teil überraschende Ergebnisse. In diesem Kapitel wird das Verhalten der in Kap. 4.1. und Kap. 4.2. besprochenen Fluorophore an EL-4-Zellen unter optimalen Kulturbedingungen diskutiert (s. Kap. A4.1.5.).

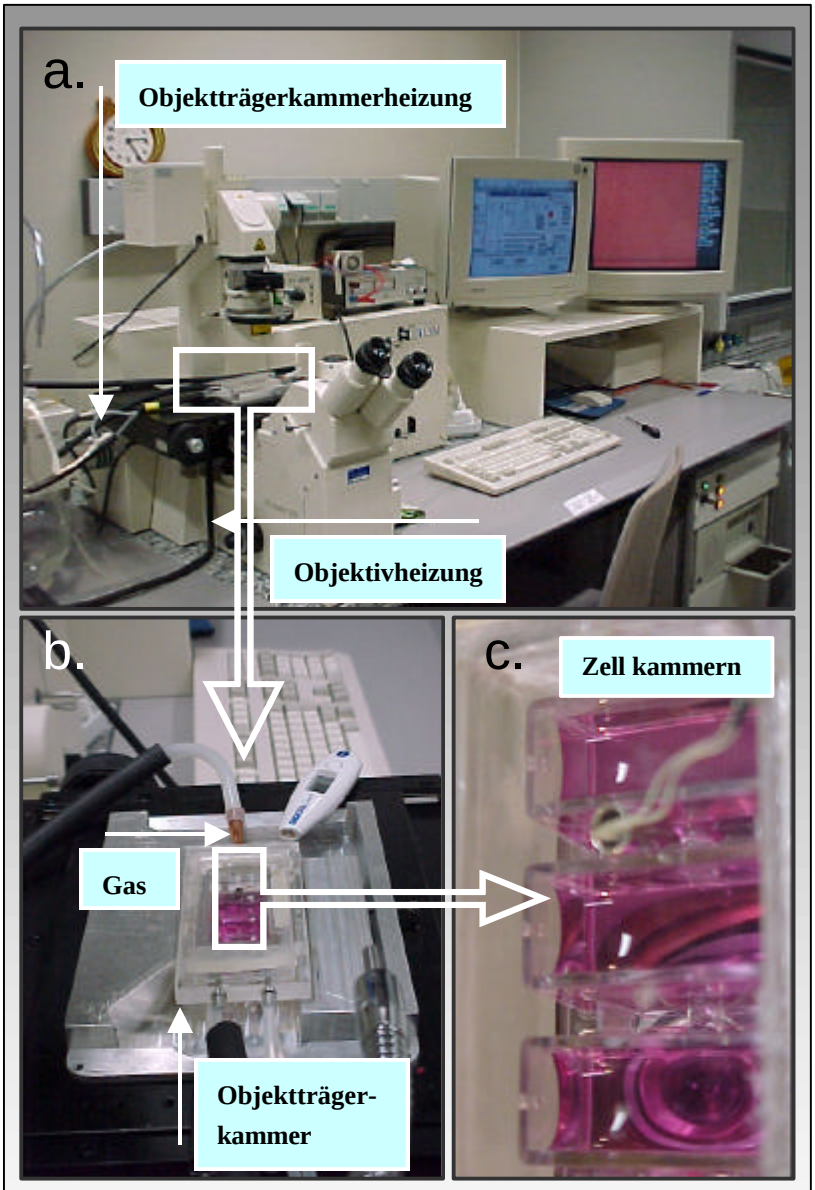


Abb.4.29.: Versuchsaufbau für Messungen an Zellkulturen unter optimalen Kulturbedingungen (Temperatur und Atmosphäre).
[a.]: Übersicht des Aufbaus an einem Zeiss LSM 410. Sowohl das Objektiv als auch die Objektträgerkammer werden durch Wasserkreisläufe auf konstanter Temperatur (37°C) gehalten.
[b.]: Objektträgerkammer (aus Plexiglas) und Halter. Vortemperiertes und feuchtigkeitsgesättigtes Gas wird in den inneren, wasserbeheizten Kammerraum geleitet.
[c.]: Detail der Zellkammern. Alternativ werden 1, 2, 4 oder 8 Zellkammern direkt aus dem Brutschrank in die Objektträgerkammer eingesetzt und automatisiert von temperierten Objektiven angefahren.

Dafür werden die Fluorophore in zwei Gruppen eingeteilt:

A. Die erste Gruppe enthält Fluorophore, welche aufgrund ihrer stark amphiphilen Eigenschaften primär zur Erforschung der dynamischen Eigenschaften der Plasmamembran eingesetzt werden (FM 4-64®, TMA-DPH, COO^--DPH und $DiIC_{18}$, Kap. 4.3.1.).

B. Die zweite Gruppe enthält Fluorophore, welche sich aufgrund ihrer überwiegend lipophilen Eigenschaften in allen lipophilen Kompartimenten von Zellen assozieren (Laurdan, DCVJ und Nile Red, Kap. 4.3.2.).

Der Versuchsaufbau für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mikroskopischen Messungen an Zellkulturen ist in Abb. 4.29. dargestellt.

Alle Versuche fanden, soweit nicht anders vermerkt, unter optimalen Brutschrankbedingungen statt.

4.3.1 Amphiphile Fluiditätssonden

Die Membranfluorophore FM 4-64®, $DiIC_{18}$, TMA-DPH und COO^{-}-DPH sind aufgrund ihrer ladungsbedingten, stark amphiphilen Eigenschaften primär in den zellulären Plasmamembranen eingelagert (s. molekulare Strukturen in Kap. 4.1.6.2.).

Eine bevorzugte Markierung der Plasmamembran konnte für alle amphiphilen Fluorophore in EL-4-Zellen bestätigt werden [Abb. 4.30. bis Abb. 4.32.].

Diffusiv bedingte Umverteilungen der Fluorophore wurden bis zu einer Stunde nach erfolgter Fluorophormarkierung nicht beobachtet. Die Fluorophorkonzentrationen wurden entsprechend den Messungen in Liposomen ausgewählt.

Alle Membransonden markierten deutlich laterale Heterogenitäten auf den zellulären Plasmamembranen:

Diese bläschenartigen Strukturen bedeckten die Membranoberflächen bis zu einem Drittel [Abb. 4.30.b., Abb. 4.31.b1.-b3. & Abb. 4.32.c./d./e.].

Nekrotische, spät apoptotische und spät onkotische Zellen, welche die Integrität ihrer Membranen nicht mehr aufrecht erhalten konnten, zeichneten sich durch besonders hohe integrale Fluoreszenzintensitäten aus.

Das Größenverhältnis von Plasmamembranen zu intrazellulären Membranen kann bis zu $1{:}10^5$ betragen. Die Fluorophorintensitäten beschädigter Zellen dominierten die von integren Zellen emittierten Intensitäten daher um ein Vielfaches (Faktor 2 bis 5, Abb. 4.30.b. & Abb. 4.32.a./b.).

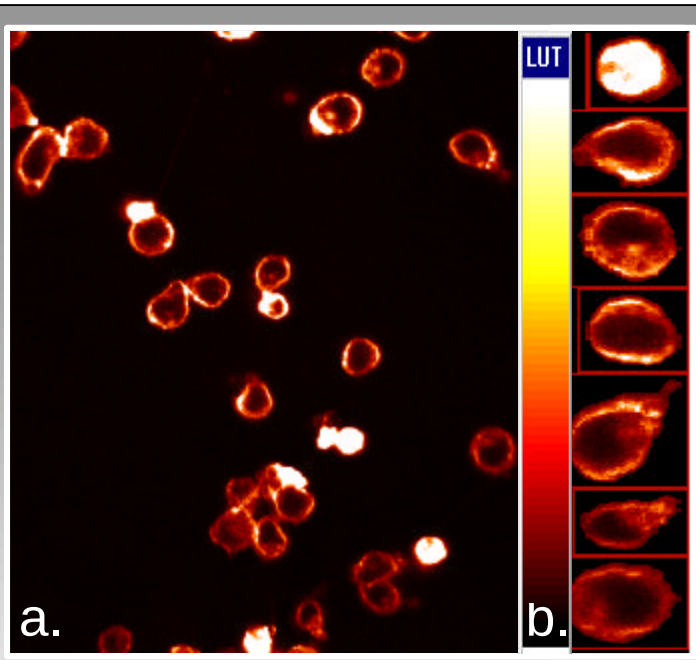


Abb.4.30.: TMA-DPH-markierte EL-4-Zellen unter Kulturbedingungen, 60 min nach Hinzugabe des Fluorophors.

[a.]: Ausschnitt aus einem 512 x 512 Pixel UV-*Scans* (63x Öl, Zeiss LSM-510). Zellen mit teilweise desintegrierter Plasmamembran (*Necrosis*, späte *Apoptosis* oder *Oncosis*) zeigen deutlich verstärkte integrale Fluoreszenzintensitäten.

[b.]: 2x vergrößerte Darstellung einzelner segmentierter Zellen aus a. Von oben nach unten sinken die integralen Fluoreszenzintensitäten.

Die Gesamtintensitäten desintegrierter Zellen übersteigen um ein Vielfaches die Intensitäten von Zellen mit integrer Pasmamembran (Faktor 2-5).

Zusätzlich wurden Zellaggregate beobachtet, die an ihren Berührungsflächen Zonen hoher Fluoreszenzintensitäten ausbildeten (weißes Quadrat in Abb. 4.31.a.). Solche Fluoreszenzaggregationen können die Gesamtintensität einer normalen Zelle um mehr als das Doppelte übersteigen.

Beide aufgeführten Effekte müssen insbesondere dann Beachtung finden, wenn zellintern gesteuerte oder exogen induzierte Fluiditätsänderungen an zellulären Membranen fluoreszenzspektrometrisch untersucht werden.

Bei dem Versuch, Änderungen der Dynamik von Membranen integral zu bestimmen, kann schon der normale Anteil an nekrotischen Zellen in einer Population (etwa 10%) den Erfolg einer Messung in Frage stellen.

Nekrotische Zellen und Zellagglomerationen müssen deshalb vor einer Messung von der Zellpopulation durch Filter oder Zentrifugation separiert werden.

Da solche Schritte immer einen Streß für die gesamte Zellpopulation bedeuten, müssen mögliche Nebenwirkungen im einzelnen kontrolliert werden.

Bei mikroskopischen Messungen können mit Hilfe bildverarbeitender Routinen geschädigte Zellen aussortiert werden, um ein ungestörtes Fluoreszenzsignal der übrigen Zellen zu erhalten.

Bei TMA-DPH [Abb. 4.30.] und COO^{-}- DPH [Abb. 4.31.] ist wegen des starken, UV-induzierten Ausbleichens der Fluorophore zunächst stets eine Fokussierung mit möglichst langwelligen Lasern erforderlich.

Dadurch gestaltet sich die Handhabung mikroskopischer Messungen sehr umständlich.

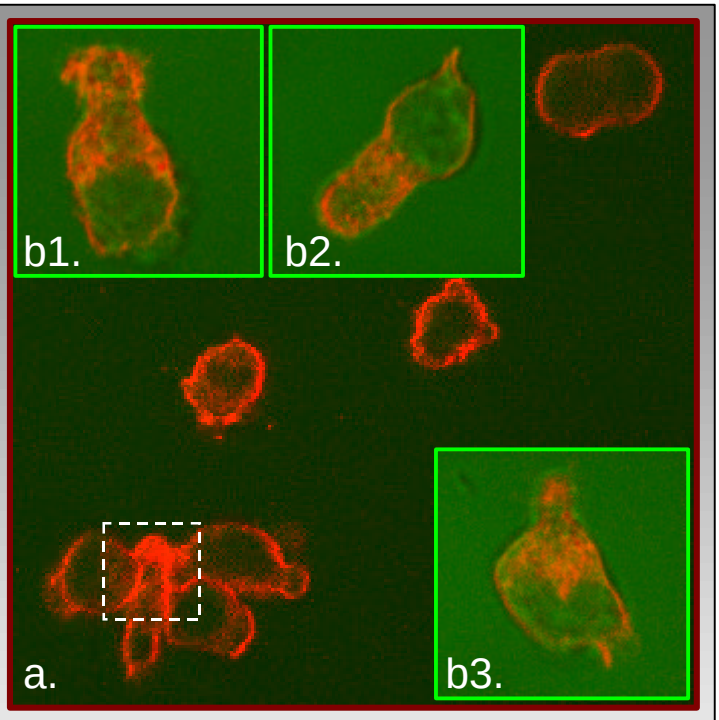


Abb.4.31.: COO^{-}-DPH-markierte EL-4-Zellen unter Kulturbedingungen, 60 min nach Hinzugabe des Fluorophors.

[a.]: Ausschnitt aus einem 512 x 512 Pixel UV-*Scans* (63x Öl, Zeiss LSM-510, Fluorophorintensität: rot, Durchlicht: grün). Auch kleinere Zellaggregate bilden an den Berührungsflächen Zonen hoher Fluorophorintensitäten aus (weißes Quadrat). Hier zeigen sich deutlich verstärkte Fluoreszenzintensitäten, deren Integral in diesem Fall mehr als das Doppelte einer normalen Zelle beträgt.

[b1.-3.]: Detailaufnahme der Fluorophorverteilung in einzelnen Zellen (100x Öl). Wegen des starken UV-induzierten Ausbleichens von DPH muß die optimale Fokussierung zunächst stets mit einem langwelligen Laser erfolgen.

Geringe Photostabilität eines Fluorophors stellt das Anisotropiekonzept für Bestimmungen der Membranfluidität in Frage, da mindestens zwei Messungen der Emissionsintensitäten an der gleichen Probe nötig sind: Einmal parallel und einmal horizontal zur Achse der Polarisatorenstellung im Anregungsstahl [4-1.].

DPH und dessen Derivate sind aus diesem Grund für den mikroskopischen Einsatz in der Ein-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie ungeeignet.

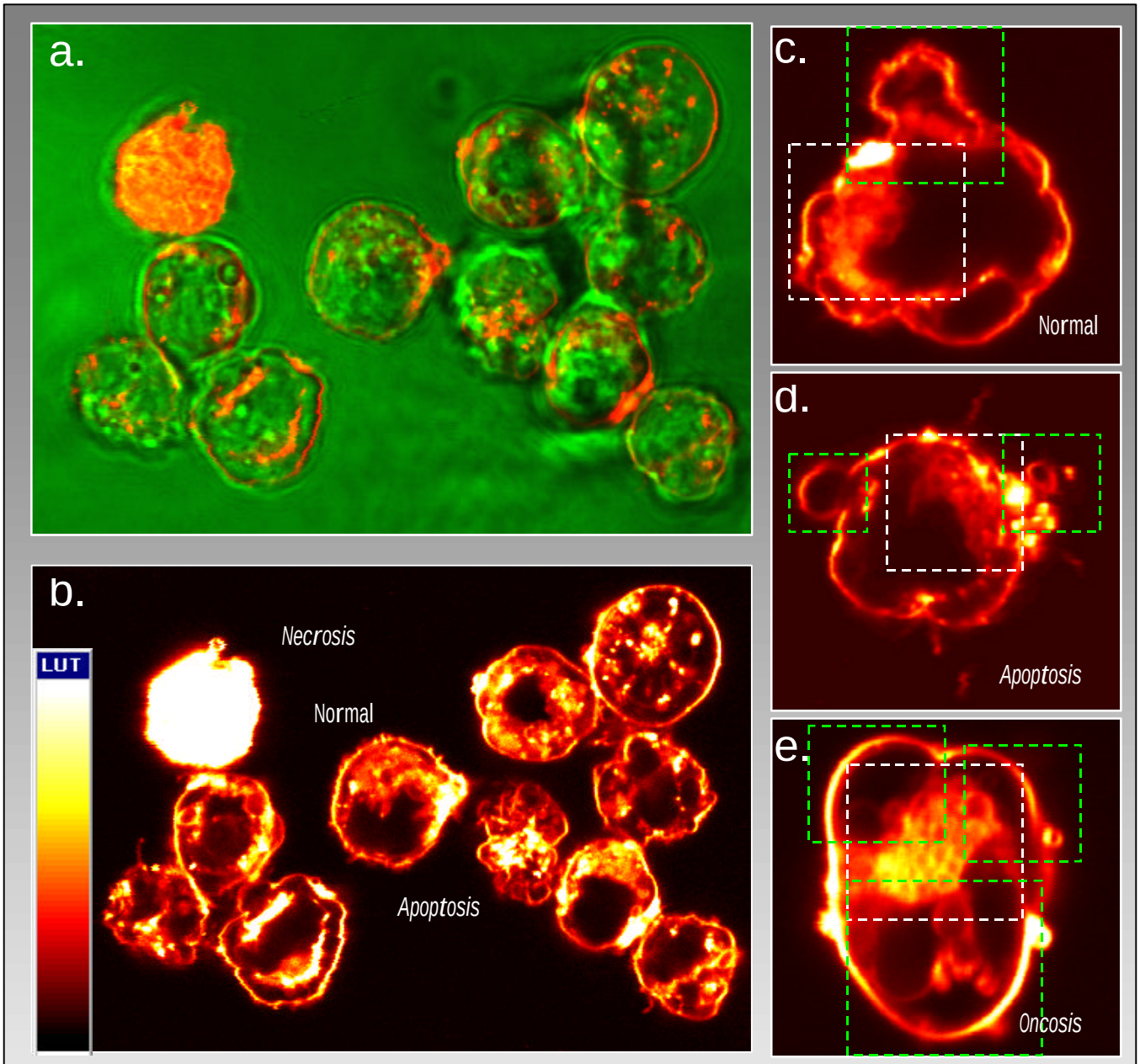


Abb.4.32.: FM 4-64®-markierte EL-4-Zellen unter Kulturbedingungen (100x Öl, Zeiss LSM-510).

[a.]: Durchlichtbild (grün) und überlagerte Emissionsintensitäten von FM 4-64®. [**b-e**]: Emissionsintensitäten von FM 4-64® (Intensitätsskalierung $I \in$ [0,255] nach LUT in b.
[b.]: Repräsentative Verteilung von FM 4-64® in einer nekrotischen, einer apoptotischen und in 'gesunden' Zellen.
[c.]: Detailaufnahme einer normalen Zelle. Charakteristisch sind zellmigratorische Bewegungen. Diese induzieren innerhalb von Minuten eine völlig verändernte Zellmorphologie. Das grüne Quadrat markiert charakteristische Zellfortsätze.
[d.]: Apoptotische Zelle mit den charakteristischen membranumschlossenen, apoptotischen Körperchen (grüne Quadrate).
[e.]: Detailaufnahme einer onkotischen Zelle. Die Zelle ist in diesem Fall durch die Einwirkung starker Laserbestrahlung derart geschädigt, daß regulierende Mechanismen des osmotischen Drucks nicht mehr funktionieren. Membranen stülpen sich ballonartig aus, die Zelle wächst bis auf ein Vielfaches ihres ursprünglichen Volumens an und platzt schließlich auf [grüne Quadrate, Zeitskala: wenige Minuten].

Auffallend und eindeutig zu erkennen sind Zonen agglomerierter Bläschenstrukturen auf den Zellmembranen [c-e, gestrichelte weiße Quadrate].

Nekrotische, spät apoptotische und spät onkotische Zellen, deren Membranintegrität nicht mehr besteht, zeichnen sich durch hohe integrale Fluoreszenzintensitäten aus (linke obere Zelle in a und b). Da das Größenverhältnis von Plasmamembranen zu intrazellulären Membranen bis zu $1:10^5$ betragen kann, 'überstrahlen' tote Zellen die Fluorophorintensitäten 'gesunder' Zellen um ein Mehrfaches. Mit Hilfe bildverarbeitender Routinen können derartige Zellen jedoch aussortiert werden, um so ein ungestörtes Fluoreszenzsignal der übrigen Zellen zu erhalten.

Aus diesem Grund ist es nötig, das Anisotropiekonzept auf Sonden mit stabilerem Fluoreszenzverhalten anzuwenden.

Varma & Mayor (1998) nutzten das Anisotropiekonzept in Verbindung mit GPI-verankerten Rezeptoren, welche mit dem Fluorophor N^{α}-pteroyl-N^{ϵ}-(4'-fluorescein-thiocarbamoyl)-L-lysin (PLF) markiert wurden.

Durch die Verwendung des Anisotropiekonzeptes in der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Mikroskopie (u.a. von Matko & Eddin 1997 beschrieben) ist es möglich, Glycosphingolipid-Cholesterin-Domänen direkt nachzuweisen (s. '*rafts*' in Abb. 4.2.).

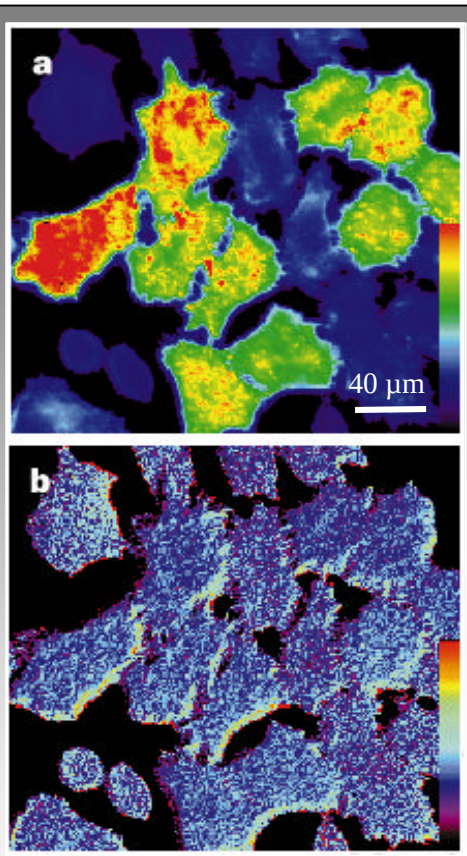


Abb.4.33.: Verteilung der Fluoreszenzintensitäten [a.] und der Anisotropiewerte [b.] des Fluorophors PLF (aus Varma & Mayor, 1998). PLF markiert den Rezeptor FR-GPI auf CHO-Zellen. Die Anisotropiewerte sind im Gegensatz zu den Intensitätswerten homogen über die Zellmembranen verteilt.

Zusätzlich kann die Größe dieser Mikrodomänen, in denen GPI-verankerte Rezeptoren eingelagert sind, abgeschätzt werden.

Nach Varma & Mayor (1998) beträgt der Durchmesser in CHO-Zellen weniger als 70nm. Dies liegt deutlich unter dem Auflösungsvermögen eines Fluoreszenzmikroskopes ($\sim\lambda/2$) [Abb. 4.33.].

Sie fanden weiter heraus, daß Cholesterin ein für die Bildung von Mikrodomänen notwendiger und bestimmender Faktor ist.

An dieser Stelle könnten die beobachteten Fluoreszenzeigenschaften von $DiIC_N$ in Abhängigkeit der Cholesterinkonzentration interessant werden [Kap. 4.2.4.]:

A. Der starke Spektralshift von $DiIC_N$ in Abhängigkeit von der Cholesterinkonzentration in Liposomen [Kap.4.2.4.] in Verbindung mit...

B. ...der erreichbaren Bildqualität $DiIC_N$ markierter Zellen [Abb. 4.1.], sowie...

C. ...dem von Spink *et al.* (1990) publizierten stark Lipidphasen- (und damit Cholesterin-) abhängigen Partitonskoeffizienten von $DiIC_N$....

... machen $DiIC_N$ zu einem vielversprechenden Kandidaten, die Eigenschaften von Mikrodomänen grundlegend zu untersuchen.

Vorher müssen allerdings die noch ungeklärten Mechanismen der Spektralverschiebungen von $DiIC_N$ mit den in Kap. 4.2.4.1. beschriebenen Meßreihen geklärt werden.

Des weiteren ist eine Bestimmung des Winkels zwischen der Orientierung des Absorptions- und des Emissionsdipols von $DiIC_N$ nützlich. Im Falle hinreichender Kolinearitäten wäre $DiIC_N$ ein für die FRET-Mikroskopie geeigneter Fluorophor.

FM 4-64® ist aufgrund seiner mit $DiIC_N$ vergleichbaren stabilen Fluoreszenzeigenschaften dazu geeignet, komplizierte Strukturen zellulärer Plasmamembranen zu visualisieren (vergleiche Abb. 4.1. & Abb. 4.32.). Doch lassen die beobachteten spektralen Fluoreszenzeigenschaften keine weiterreichenden Interpretationen zu [Kap. 4.2.6.].

4.3.2 Lipophile Fluiditätssonden

Laurdan [Abb. 4.7.], DCVJ [Abb. 4.13.] und Nile Red [Abb. 4.10.] tragen im Gegensatz zu den im vorangegangenen Kapitel besprochenen Membranfluorophoren keine Ladungen.

In Abhängigkeit vom pH-Wert der Fluorophorumgebung protoniert jedoch die neutrale Aminogruppe von Laurdan und richtet den fluoreszierenden Naphtalenring zu den Kopfgruppen einer Lipidmatrix aus [Chong & Wong 1993].

Nile Red und Laurdan unterscheiden sich in ihren Fluoreszenzeigenschaften grundlegend von denen des DCVJ (vergleiche Abbildungen 4.34. & 4.35.).

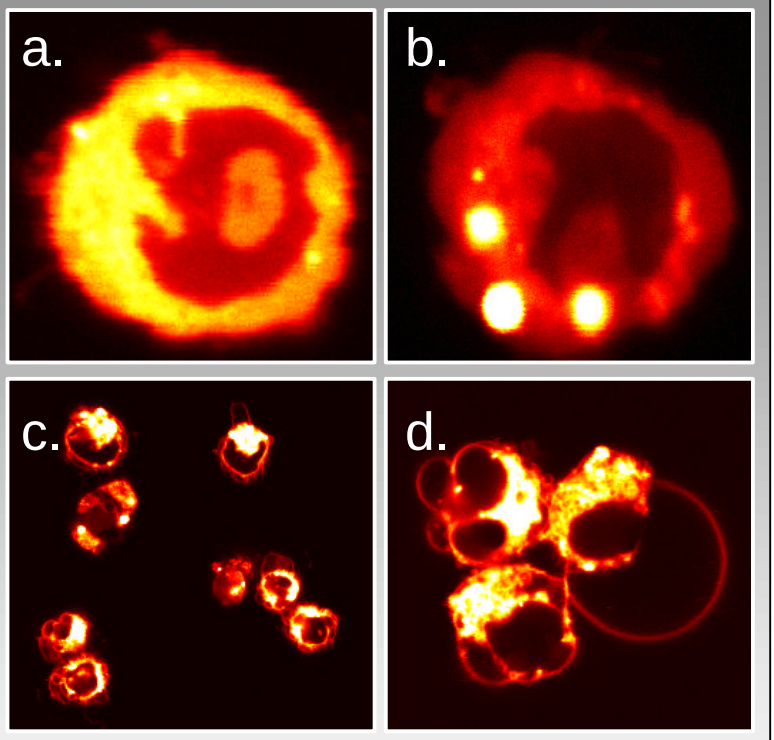


Abb.4.34.: Verteilung der Fluoreszenzintensitäten der Fluorophore DCVJ [**a**. & **b**.] und Nile Red [**c**. & **d**.] in EL-4-Zellen unter Kulturbedingungen (100x Öl, Zeiss LSM 510).

Der relativ kleine lipophile Membranfluorophor DCVJ [4.1.6.2.4.] verteilt sich schnell in alle zelluläre Membranen und hydrophoben Bereiche der Zellen.
Nile Red [4.1.6.2.2.] verteilt sich hingegen deutlich in den zellulären Membranen. EL-4-Zellen in verschiedenen Stadien der *Oncosis* sind in d zu sehen.

Nile Red und Laurdan ähneln in ihren zellulären Intensitätsverteilungen TMA-DPH und COO^--DPH (vergl. mit Abb. 4.30. & Abb. 4.31.).

Bei Nile Red scheint folglich ebenfalls eine induzierte Amphiphilie eine freie Diffusion des Fluorophor in alle lipophilen Bereiche der Zellen zu verhindern. Im Gegensatz dazu verteilt sich DCVJ in alle hydrophoben Bereiche der EL-4-Zellen [Abb. 4.34.a./b.].

Es konnte nicht geklärt werden, ob die beobachteten Intensitätsunterschiede aufgrund von Konzentrationsgradienten des Fluorophors oder durch lokal variierende freie Volumina für den molekularen Rotor DCVJ induziert werden. Die Verwendung von DCVJ in Zellkulturen ist deshalb auf illustrative Zwecke beschränkt.

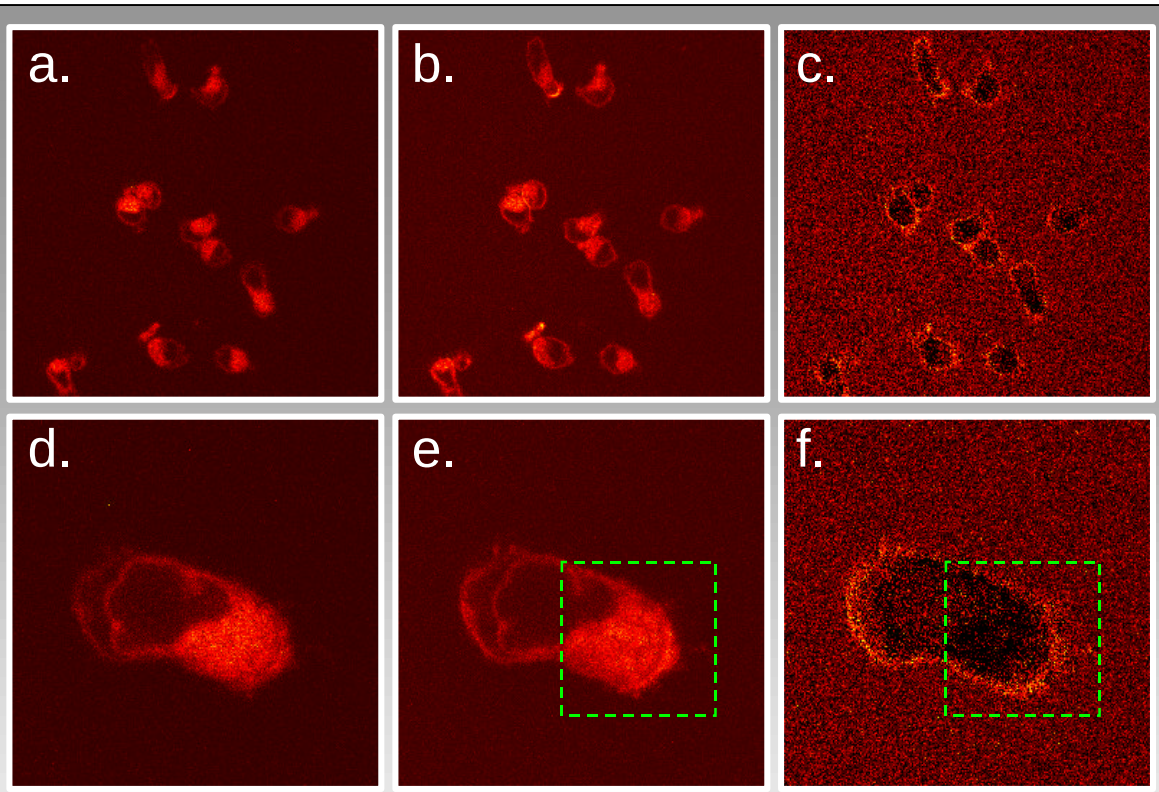


Abb.4.35.: Verteilung der Fluoreszenzintensitäten des Fluorophors Laurdan in EL-4-Zellen. Anregung bei 364 nm. [**a/b/c**.] (63x Öl, Zeiss LSM 510), [**d/e/f**.] (100x Öl). [**a**.& **d**.]: Fluoreszenzintensitäten im Bandpassfilter 1 (BP1 = 505-550 nm). [**b**.& **e**.]: Fluoreszenzintensitäten im Bandpassfilter 2 (BP2 = 380-475 nm). [**c**.& **f**.]: 'Generalisierte Polarisation' GP(x,y) = [I(BP2)-I(BP1)] / [I(BP2)+I(BP1)], skaliert auf das Intensitätsintervall [0,255].

Die Plasmamembranen der Zellen zeichnen sich durch hohe GP-Werte aus. Hohe GP-Werte lassen auf eine hohe Rigidität der Plasmamembran schließen (s. Kap. 4.1.6.2.1.). Hingegen sind die bei fast allen Membranfluorophoren zu erkennenden, in Abb. 4.32. gekennzeichneten Bläschenstrukturen auf der Plasmamembran gerade durch besonders niedrige GP-Werte charakterisiert (grüne Quadrate). Laurdan zeigt ähnlich starkes UV-induziertes Ausbleichen wie DPH [Abb. 4.31.]. Demzufolge muß bei der Ein-Photonen-Mikroskopie die optimale Fokussierung ebenfalls mit einem möglichst langwelligen Laser erfolgen. Im Gegensatz zu DPH ist aber letztendlich nur ein einziger UV-Scan nötig, da die zur Bildung des GP-Wertes benötigten Fluoreszenzintensitäten in den beiden Bandpassfiltern 1 & 2 gleichzeitig aufgenommen werden können.

.

Die in Liposomen beobachtete Verschiebung des Emissionsspektrums von Nile Red in Abhängigkeit der Cholesterinkonzentration (nicht aber der Temperatur [A4.4. & A4.5.]) ist groß genug, um sekundäre Aussagen über Ratiobildung aus primären, bandpassgefilterten Intensitätsbildern abzuleiten.

Diese Möglichkeit in Verbindung mit den photostabilen Eigenschaften des Fluorophors in Zellen und einer guten Detailwiedergabe [Abb. 4.34.c.&d.] machen Nile Red zu einer geeigneten Sonde, zelluläre Membranstrukturen und deren Komposition gleichzeitig zu beobachten.

Über die generalisierte Polarisation lassen sich für Laurdan lokale, dynamikrelevante Parameter aus Zellmembranen ableiten (vergl. Abb. 4.5. aus Yu *et al.* 1996 mit Abb. 4.35.). Mit der in Abb. 4.35. beschriebenen Methode lassen sich diese nicht nur im Rahmen der Zwei-Photonen-Anregung ableiten. Auch mit Hilfe der konventionellen Ein-Photonen-Mikroskopie sind verläßliche GP-Informationen zu gewinnen. Leider bleibt die Güte der Laurdan-Fluoreszenzbilder [Abb. 4.5. & 4.35.] deutlich hinter den relativ detaillierten Bildern der vorgestellten langwelligeren Sonden zurück.

5. KAPITEL:

ANWENDUNGEN DER BILDVERARBEITENDEN MIKROSKOPIE

5.1 VERGLEICHENDE MESSUNGEN RELATIVER FLUORESZENZ-INTENSITÄTEN DURCH QUANTITATIVE FLUORESZENZMIKROSKOPIE UND FLOWZYTOMETRIE

5.1.1 FLOWZYTOMETRIE UND MIKROSKOPIE

Noch im April 1998 unterstrich Prof. Paul Robinson (Direktor der Purdue University Cytometry Laboratories sowie der '*BioScope Initiative*') auf dem internationalen Symposium '*Biological Applications of Confocal Microscopy*' in Belo Horizonte (Brasilien) in seinem Vortrag '*Confocal Microscopy and Flow Cytometry: A Common Research Interface*' die unzweifelhaften Vorzüge der Flowzytometrie (FC) einerseits und jene der konfokalen Mikroskopie andererseits.

Die FC sicherte lange Zeit als einzige Methode den Zugang zu statistischen Informationen diverser zellbiologischer Systeme. Dagegen wurde die Mikroskopie bislang ausschließlich für detaillierte Betrachtungen an einzelnen Zellen oder Zellgewebe eingesetzt.

Die einzige Möglichkeit, mit Hilfe der FC detaillierteres Wissen über eine Zellpopulation zu erhalten, war bislang, Zellen nach einer erfolgten FC-Charakterisierung automatisch zu trennen ('*cell sorting*') und sie anschließend mikroskopischen Betrachtungen zu unterziehen.

Entscheidend für den Erfolg des in dieser Arbeit beschriebenen Versuchs, die Vorzüge beider Systeme zu kombinieren und mittels bildverarbeitender Routinen das FC mikroskopisch zu ersetzen, ist die folgende Frage:

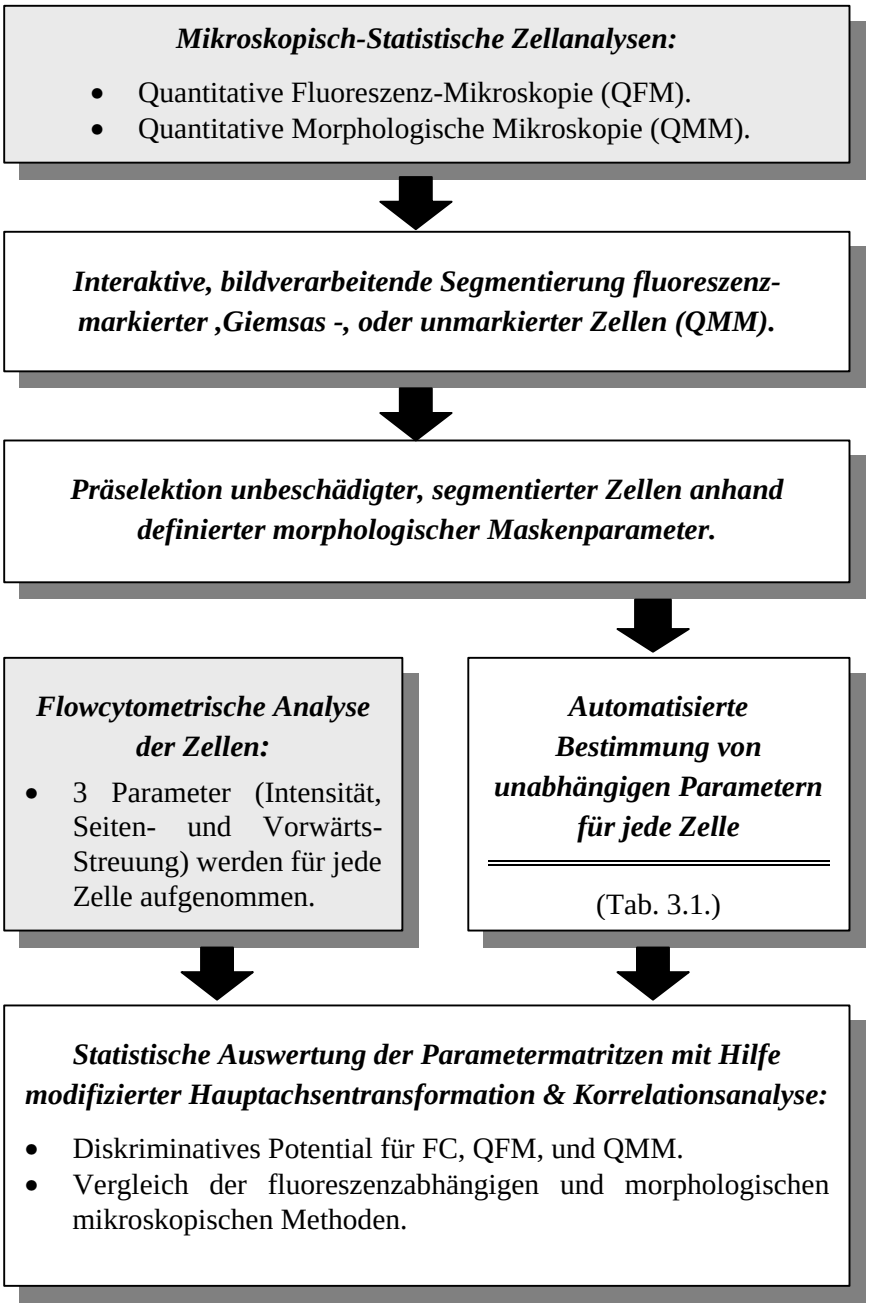


Abb.5.1.: Schematische Darstellung der auf zwei unterschiedlichen mikroskopischen Verfahren basierenden Bildverarbeitungsprotokolle, des flowcytometrischen Protokolls sowie der vergleichenden multivariaten Datenanalyse.

Können relative Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie in ähnlicher Qualität separiert werden, wie dies mittels der FC seit langem Standard ist?

Zur Klärung dieser grundlegenden Frage wurden nach dem in Abb. 5.1. dargestellten Versuchsprotokoll verschiedene mikroskopische und FC-Systeme mit identischen Zellproben vermessen und die Ergebnisse miteinander verglichen.

FC-Bestimmungen des relativen DNA-Gehalts von Zellen zur Klärung von Zellzyklusphasen [Suzuki *et al.* 1997], von apoptotischen Prozessen [Härtel *et al.* 1998b] oder einfach der Zellploidität (N) [Berczi *et al.* 1997] mit Hilfe verschiedener DNA - interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe sind seit langem Standard.

Als ‘kalibrierendes‘ Zellsystem wurde zum einen ein recht gut definiertes apoptotisches System ausgewählt: Die *Apoptosis* in IPC-81-Zellen mittels oxidativen Streß durch H_2O_2 [Kap. 5.1.2.]. Zum anderen Lachserythrozyten mit definiertem di- und triploiden Chromosomensatz [Kap. 5.1.3].

Die Bestimmungen des DNA-Gehalts der IPC-81-Zellen erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM-410, Zeiss) und einem Becton Dickinson FACScan-FC [Zeise 1999]. Lachserythrozyten sind an der Universität ‘Austral de Chile‘, Valdivia, mit einem eher einfachen

System, bestehend aus Fluoreszenzmikroskop, *Frame-Grabber*, CCD-Kamera [Härtel *et al.* 1999] und einem selbstgebauten Flowzytometer [Ojeda *et al.* 1992a], durchgeführt worden.

5.1.2 Quantifizierung apoptotischer IPC-81-Zellen nach induziertem oxidativen Stress

Die Entwicklung der *Apoptosis* in IPC-81-Zellen ist gut charakterisiert [Zeise 1999]. Das Zellsystem ist geeignet, die klassische Methode der DNA-Quantifizierung mittels Flowzytometrie mit der fluoreszenzmikroskopischen Methode zu vergleichen (s. Kap. A5.1.1./2./3. und Abb. 5.2.).

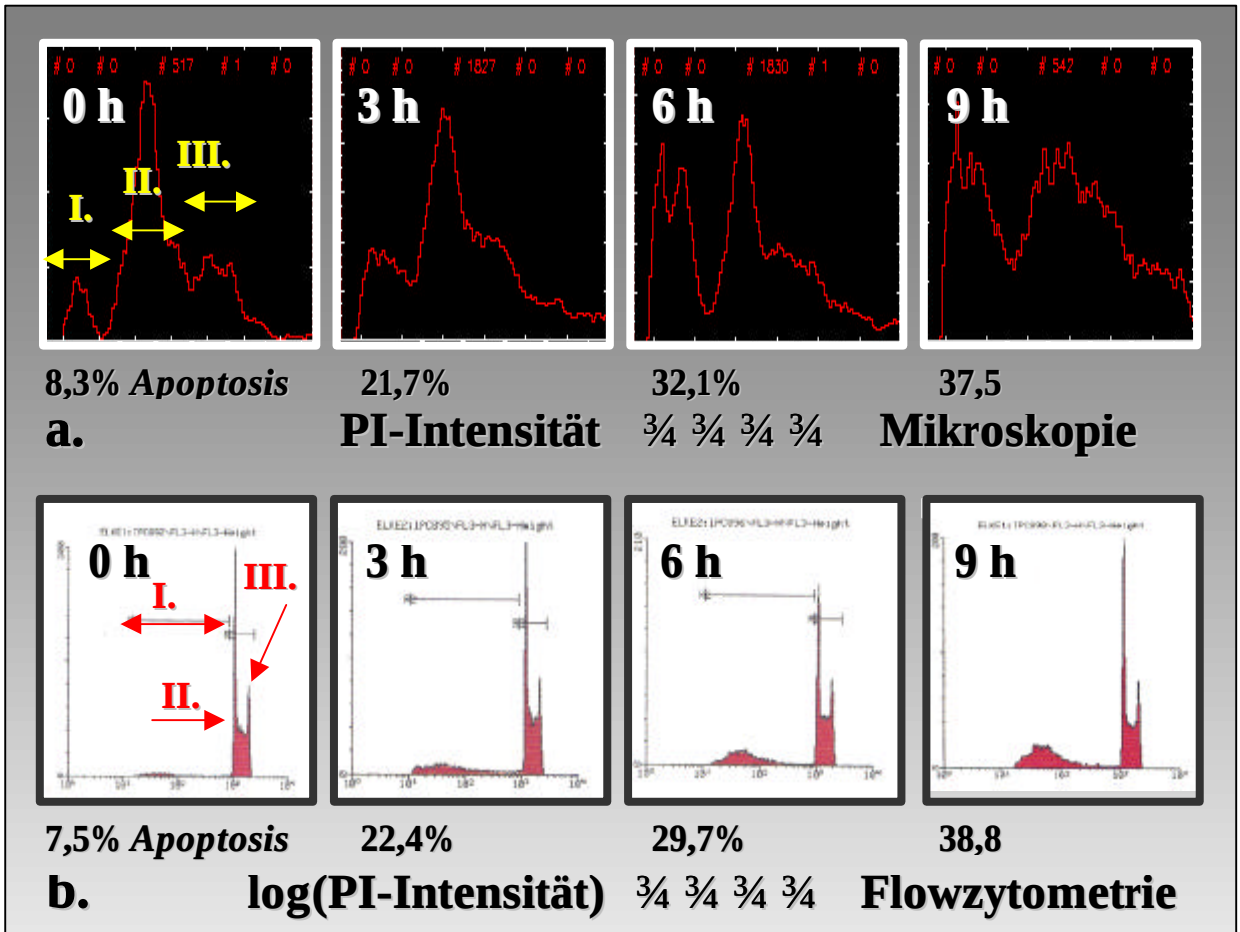


Abb.5.2.: Vergleichende mikroskopische und flowcytometrische Bestimmungen der *Apoptosis* in IPC-81-Zellen nach 0, 3, 6 und 9h. [**a**]: Messungen des relativen zellulären DNA-Gehalts durch quantitative Fluoreszenzmikroskopie (QFM). [**b**]: durch Flowzytometrie (FC).

IPC-81-Zellen wurden oxidativem Stress ausgesetzt (H_2O_2, 25µM). Die DNA-Fluoreszenzmarkierung der Zellen erfolgte durch eine Propidium Iodid (PI) - RNAse-Mischung [Kap. A5.1. & Zeise 1999].

Dargestellt sind Histogramme der relativen integralen PI-Fluoreszenzintensitäten segmentierter Zellen [a] sowie logarithmische PI-Fluoreszenzintensitäten aus FC-Messungen [b]. Gekennzeichnet sind die Bereiche im DNA-Histogramm, welche die Zellzyklusphasen G0/G1 in [a./b., 0h, II.] und S/G2/M in [a./b., 0h, III.] repräsentieren. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde jeweils durch die Anzahl der Signale im Sub-G0/G1-Peak [a./b., 0h, I.] im Verhältnis zu der Gesamtheit der Signale (N) berechnet.

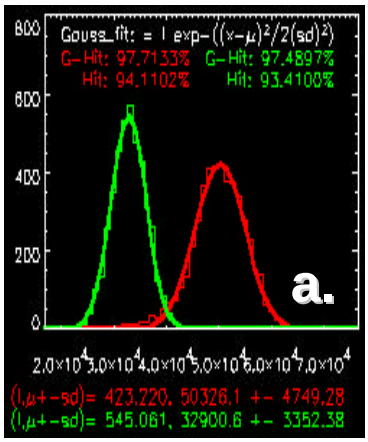
Die vergleichenden Berechnungen des apoptotischen Anteils an der Gesamtpopulation aus den FC- und den QFM-Daten können (unter Berücksichtigung des $\sqrt{N}$-Fehlers für Zählexperimente) als deckungsgleich angesehen werden. Für die mikroskopischen Experimente wurden bei jeder Bestimmung zwischen 500 und 1800 IPC-81-Zellen ausgewertet. Für die FC-Messungen wurde eine Statistik aus jeweils 10.000 Signalimpulsen erstellt.

Zur Interpretation der mit oxidativem Stress induzierten Apoptosisrate in IPC-81-Zellen verweise ich auf die von Dr. Elke Zeise abgefaßte Dissertationsschrift [Zeise 1999]. Frau Zeise führte auch die dargestellten FC-Messungen durch.

Die Verteilung des DNA-Histogramms einer gesunden IPC-81-Zellpopulation ist in Abb. 5.2.a./b.0h. zu sehen. Die Mehrzahl aller Zellen befindet sich in den aktiven Zellzyklusphasen G0/G1 [a./b., 0h, II.]. Sie enthalten den normalen Chromosomensatz. Zellen, die ihren DNA-Gehalt verdoppeln und sich schließlich teilen, befinden sich in den S/G2/M-Phasen [a./b., 0h, III.]. Ein weiterer Anteil der Signale stammt sus dem Sub-G0/G1-Peak [a./b., 0h, I.]. Diese werden bislang als Zellen interpretiert, die aufgrund von apoptotisch induzierten Chromatinfragmentierungen, Teile ihres DNA-Gehalts verloren haben [Darzynkiewicz *et al.* 1997, Härtel *et al.* 1998b]. In Kapitel 5.4.3. wird diese Interpretation kritisch beleuchtet und eingehend diskutiert werden.

An dieser Stelle ist lediglich folgender Punkt von Interesse: Die Anteile ‘apoptotischer‘ Signale an den Gesamtsignalen stimmen unter Berücksichtigung des $\sqrt{N}$-Fehlers für Zählexperimente für beide Methoden überein (s. Apoptosisraten nach 0h, 3h, 6h & 9h in Abb. 5.2.). Beide Methoden liefern fast identische Verteilungen der relativen DNA-Signale der IPC-81-Zellen.

5.1.3 Messungen des relativen DNA-Gehalts von di- und triploiden Lachserythrozyten



Relative AO Fluoreszenz - intensität (flowzytometrisch)

Relative PI Fluoreszenz - intensität (mikroskopisch)

Abb.5.3.: Vergleichende flowzytometrische (FC) [**a**] und mikroskopische Bestimmungen [**b**] des relativen DNA-Gehalts in Lachserythrozyten mit definiertem diploiden (grün) und triploiden (rot) Chromosomensatz.

Die Histogrammverteilungen wurden jeweils mit einem einfachen Gaussansatz ‘gefittet‘. ‘G-Hit‘ und ‘Hit‘ bezeichnen den in den Gausskurven (respektive Originaldaten) enthaltenen nicht überlappenden prozentualen Anteil der Verteilungen. Acridine Orange (AO) diente bei der FC-Bestimmung als DNA-Markierung. Die Verteilungen der mikroskopischen Analyse sind hier mit der DNA-Anfärbung mit Propidium Iodid (PI) dargestellt. Jedoch führen die beschriebenen mikroskopischen Messungen mit AO, PI oder auch DAPI zu qualitativ und quantitativ vergleichbaren Ergebnissen.

Di- und triploide Lachserythrozyten (mit dem Chromosomensatz 2N und 3N) stellen zwei ‘natürliche‘ Systeme dar, die sich aufgrund ihres eng definierten Anteils an DNA hervorragend für vergleichende Flowzytometrische und Fluoreszenzmikroskopische Messungen eignen.

In Abb.5.3. sind die FC-Daten [a] und mikroskopischen [b] Messungen des relativen DNA-Gehalts von di- (grün) und triploiden (rot) Lachserythrozyten zum dirkten Vergleich aufgetragen (s. auch Kap. A5.2.).

In beiden dargestellten Histogrammen sind die Populationen gut voneinander getrennt.

Die Bestimmung des relativen DNA-Gehalts der Erythrozytenkerne wurde im Falle der mikroskopischen Messungen mit Acridin Orange (AO), PI und dem im UV-sensitiven DNA-Farbstoff 4´6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) dargestellt. Alle Fluorophore ergaben vergleichbare Verteilungen.

Die Trennungsgüte der FC-Messungen ist mit 93% und 97% (‘Hit‘ / ‘G-Hit‘, s. Abb.5.3.) der diploiden Population nur wenig besser als jene der mikroskopischen Methode mit 88% und 95%.

5.1.4 SCHLUSSFOLGERUNGEN AUS DEN VERGLEICHENDEN QUANTITATIVEN MESSUNGEN

Die in den Abbildungen 5.2.a./b. und 5.3.a./b. dargestellten Ergebnisse belegen eindeutig, daß der mikroskopischen Bestimmung relativer zellulärer Fluoreszenzintensitäten der gleiche Stellenwert eingeräumt werden kann wie der etablierten Methode der FC.

Die übereinstimmenden Aussagen, abgeleitet aus unterschiedlichen Fragestellungen unter Verwendung zweier Zellsysteme, an zwei gänzlich verschiedenen Mikroskopen und Flowzytometern, sollten genug Anlaß zur Hoffnung geben, daß generell zelluläre Systeme auf diese Art untersucht werden können.

Für den Fall, daß häufig auftretende inhomogene Ausleuchtungen über das betrachtete mikroskopische Feld nicht vom Gerät her beseitigt werden können, stehen methodische bildverarbeitende Ansätze zur Verfügung, welche die Inhomogenitäten durch Korrekturfunktionen in erster Näherung ‘nachbereitend‘ beheben können [Kap. 3.4.].

Diese Schlußfolgerungen stehen im Einklang mit aktuellen Veröffentlichungen. Den ersten Anlaß zur Hoffnung, daß mit mikroskopischen Systemen ebenfalls verläßliche quantitative und somit statistische Informationen aus Zellpopulationen abgeleitet werden können, geht auf Kamentsky & Kamentsky (1991) zurück. Das von ihnen entwickelte Laser-Scanning-Cytometer LSC® (heute kommerziell vermarktet von der Firma Compucyte [www.compycyte.com]) ist jedoch kein reines Mikroskop im eigentlichen Sinne, sondern eher ein in ein Mikroskop integriertes Flowzytometer mit bildgebenden Verfahren.

Fluoreszenzmarkierte Zellen werden mit Hilfe eines Objektträgers anstelle eines Wasserstrahls an den Laserstrahlen vorbeigefahren. Die Position der Zellen ist somit repositionierbar und kann später durch ein optisches System betrachtet oder mit Hilfe von CCD-Kameras digital abgespeichert werden. Diese Möglichkeit bedeutet schon einen gewaltigen Fortschritt, denn sie bietet bereits einen neuen Ansatz zur Interpretation beobachteter zellulärer Prozesse. Sie findet in der aktuellen Literatur deshalb auch zu Recht Würdigungen von höchster Stelle [Darzynkiewicz *et al.* 1999a&b, Bedner *et al.* 1999, Rew *et al.* 1998].

Jedoch: Die Information aus den primären Laser-Scanning-Bildern ist nur wenig detailliert und bietet keinen zufriedenstellenden optischen Eindruck. Außer dem integralen Fluoreszenzsignal und dessen einfachsten Ableitungen (wie maximale Fluoreszenzintensität) können kaum weitere Parameter abgeleitet werden. Die Konsequenzen aus dieser Problematik werden an späterer Stelle noch einmal aufgegriffen [Kap. 5.4.].

Auch der umgekehrte Weg (ein Mikroskop in ein Flowzytometer zu integrieren) wird derzeit beschritten [Wietzorrek *et al.* 1999].

Hierbei werden Zellen bei einer Geschwindigkeit des Wasserstrahls von 8m/s mit einer CCD-Kamera für 18ns abgelichtet. Solche Aufnahmen bieten eine schon recht akzeptable Bildqualität der Zellen. Aus ihnen könnten einige weiterführende Parameter zur Analyse abgeleitet werden.

Das einmal aufgenommene Bild muß jedoch für spätere Interpretationen ausreichen, da das Objekt, wie bei jedem Flowzytometer, nach der Messung nicht mehr identifiziert und genauer betrachtet werden kann.

Ferner bietet dieses Verfahren lediglich bei in Suspension wachsenden Zellen die Möglichkeit, die Morphologie der Zellen annähernd gut beschreiben zu können. Adhärent oder ‘quasi‘-adhärent wachsende Zellen müssen im Vorfeld von ihrem Haftfeld getrennt werden, was die natürliche Zellmorphologie stark beeinflußt.

5.2 Möglichkeiten quantitativer morphologischer Mikroskopie in Verbindung mit Multi-Parameter-Analysen

5.2.1 Identifizierung und Klassifizierung Di- und Triploider Lachserythrozyten durch Lichtmikroskopische Multi-Parameter- Bildverarbeitung: Eine neue Methode zur Quantifizierung von Triploidisationsraten in *Oncorhynchus mykiss* [Härtel *et al.* 1999]

Ein nicht zu unterschätzender Vorteil der mikroskopischen Multi-Parameter-Bildverarbeitung besteht in der Möglichkeit, Objekte anhand ihrer Morphologie und ihrer Textur zu parameterisieren und damit zu klassifizieren.

Am Beispiel di- und triploider Lachserythrozyten soll gezeigt werden, daß morphologische Parameter nicht nur als Ersatz für Parameter dienen können, wie sie durch quantitative Fluoreszenzmikroskopie oder Flowzytometrie ermittelt werden. Durch rein morphologische Parameterscharen kann sogar eine höhere Güte in der Separierung zweier Objektklassen ermöglicht werden.

Der Hintergrund der durchgeführten Untersuchungen an di- und triploiden Lachserythrozyten ist, daß für die kommerzielle Aufzucht von Lachsen den triploiden, weiblichen Tieren bessere Marktchancen eingeräumt werden. Heranwachsende triploide Tiere entwickeln keine Ovarien und unterlaufen auch keinen phenotypischen Veränderungen, welche sonst mit dem sexuellen Reifungsprozeß einhergehen und welche für eine Verminderung der Filetqualität verantwortlich gemacht werden.

Die für den Reifungsprozeß benötigte Energie wird außerdem zusätzlich in ein gesteigertes Wachstum investiert. Bis zu 28% Gewichtszuwachs ist für Atlantischen Lachs gemessen worden [Pepper 1997]. Es existieren verschiedene Methoden zur Triploidisierung kurz nach der Befruchtung der Eizelle durch die Samenzellen.

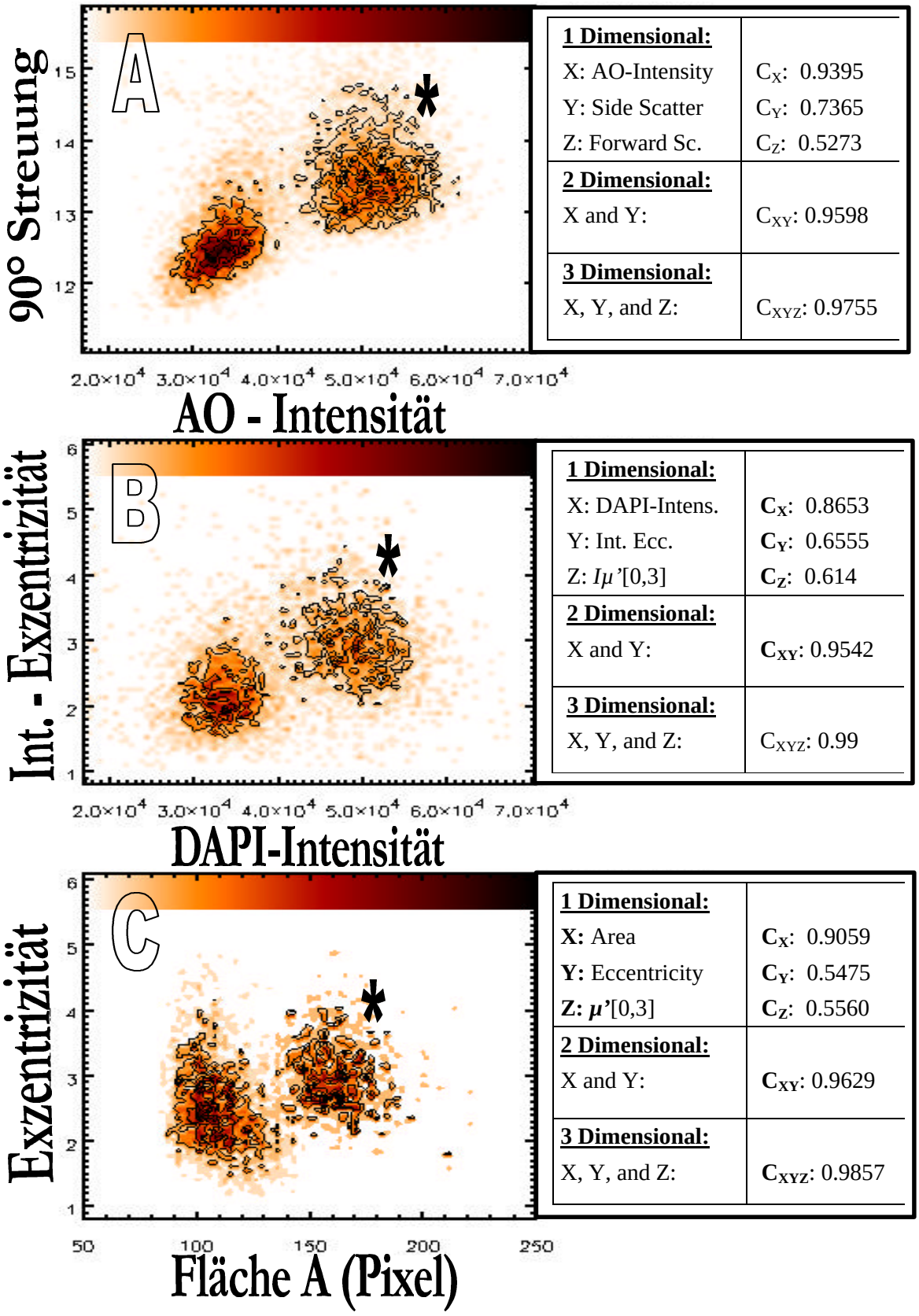


Abb.5.4.: Normierte Dichteverteilungen aus vergleichenden methodischen Messungen. [A]: der Flowzytometrie, [B]: der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie und [C]: der quantitativen morphologischen Mikroskopie. Die Histogramme zeigen di- und triploide (*) Lachserythrozyten mit Konturlinien. Die aufgetragenen Dichteverteilungen sowie die 1-, 2-, und 3-dimensionalen Statistiken wurden aus 86, 86×86, und 86×86×86 Voxeln in den gezeigten Parametergrenzen berechnet. Die gewählte Farbcodierung für die Dichte ist im oberen Bereich der Abbildungen angegeben. Die diskriminativen Kapazitäten (C_{index}) [3-36.] für 1-, 2-, und 3-Dimensionen sind auf der rechten Seite jeder Graphik aufgeführt.

Schnelle und verläßliche Methoden zur Quantifizierung des Triploidisationsgrades werden hingegen benötigt. Die Flowzytometrie war bislang die Methode der Wahl. FC-Untersuchungen sind jedoch recht kostenintensiv und kommen nicht ohne die Gesundheit gefährdende DNA-Farbstoffe aus. Die Möglichkeit, FC-Untersuchungen zu ersetzen (und damit den Einsatz der DNA-Farbstoffe), war ein willkommenes Nebenprodukt der durchgeführten grundlegenden Untersuchungen.

Eine Gegenüberstellung der flowzytometrisch, fluoreszezmikroskopisch und lichtmikroskopisch durchgeführten, vergleichenden Messungen findet sich in Abb. 5.4.a.-c.:

Abb.5.4.a./b. zeigen auf der X-Achse die flowzytometrisch und die fluoreszenzmikroskopisch ermittelten integralen Fluoreszenzintensitäten der verwendeten DNA-gebundenen Sonden. Auf der Y-Achse abgebildet sind die 90°-Streuungen der Zellen und ein intensitätsgekoppelter Texturparameter (I-Exzentrizität, Kap. 3.5.5.).

Abb.5.4.c. zeigt hingegen rein morphologische Parameter. Die Fläche (X-Achse) und die Exzentrizität (Y-Achse) wurden dabei aus der zweidimensionalen Maske des (Giemsas gefärbten) Zellkerns abgeleitet. Beispiele lichtmikroskopischer Bilder der di- und der triploiden Erythrozyten (dunkle Zellkerne, helleres Cytosol) sind in Abb. 5.5. zu sehen.

Die ‘Diskriminativen Kapazitäten‘ für 1-, 2-, und 3-dimensionale Statistiken sind für jede Methode rechts der Graphiken aufgetragen. In der dritten Dimension wurde als einzig verfügbarer Parameter aus den FC-Daten die Vorwärtsstreuung der Erythrozyten ausgewertet.

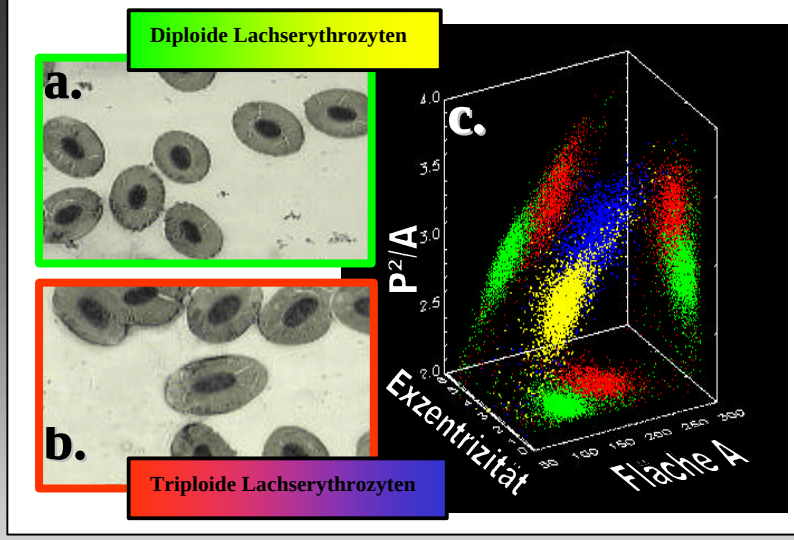


Abb.5.5.: Darstellung der auf rein morphologischen Parametern basierenden mikroskopischen Charakterisierung diploider [**a**, gelbe/grüne Punkte] und triploider [**b**, rote/blaue Punkte] Lachserythrozyten. Die Bildausschnitte a und b wurden mit einem 100× Öl-Immersionsobjektiv (Leica Epifluoreszenzmikroskop, DM LB) aufgenommen. Aus der Liste der abgeleiteten Parameter [Tab. 3-1.] sind die Fläche A, die Exzentrizität und der ‘Zirkularitätsparameter‘ **P²/A** für die zweidimensionalen (grün/rot) und dreidimensionale (gelb/blau) Darstellungen [**c**] ausgewählt. Jeder Parameter, welcher nicht mit den übrigen Parametern korreliert, aber einen beliebigen klassifizierenden Aspekt der Objekte beschreibt, trägt dazu bei, die Separierfähigkeit des Gesamtsystems zu erhöhen.

Für die mikroskopischen Bestimmungen wurden das intensitätsgekoppelte Moment dritter Ordnung hinsichtlich der zweiten Hauptrotationsachse ($I\mu'_{03}$, Abb. 5.4.b.) und deren zweidimensionales Äquivalent (μ_{03}, Abb. 5.4.c.) berechnet.

Obwohl für sich genommen die beiden ersten Parameter der FC-Daten bessere C-Werte [3-36.] liefern als jene der mikroskopischen Messungen, sind die zweidimensionalen Statistiken hinsichtlich der C-Werte für alle Methoden gleich zu bewerten (C ~0.96).

Der Grund dafür ist, daß die Korrelation zwischen den Daten im Falle der FC am stärksten ist (s. Tabelle A5.1.: Korrelationen, Gruppierungen korrelierender Parameter und Hauptachsentransformation).

Für die dreidimensionale Statistik ergeben die C-Werte der mikroskopischen Methoden dann auch bessere Werte als jene der FC [C_{xyz} in Abb. 5.4.a./b./c.]. Beide Gruppen sind fast vollständig voneinander getrennt, wie in Abb. 5.5.c. für die Parameter Kernfläche und die beiden Zirkularitätsparameter Exzentrizität und $\mathbf{P^2/A}$ zu sehen ist.

Bei visueller Betrachtung der di- oder triploiden Erythrozytenkerne in Abb. 5.5.a./b. ist erkennbar, daß sich die Zellkerne nicht nur anhand ihrer Größe, sondern auch anhand dessen unterscheiden, was wir unter dem Begriff ‚Zirkularität' subsummieren würden.

Es ist interessant zu beobachten, wie wenig die abgefragten Zirkularitätsparameter Randenergie $\mathbf{E_C}$/ Randenergiedichte $\bar{E}_C$, Randdistanz **D**, die mittlere Randdistanz $\bar{D}$, die Exzentrizität und $\mathbf{P^2/A}$ untereinander korrelieren [Tabelle A5.1.]. Schon bei diesem morphologisch recht einfach erscheinenden System ist daher ihr Einsatz berechtigt (vergl. Kap. 3.5.3.).

Wird jede der Populationen getrennt betrachtet, so könnte ein geübter menschlicher Betrachter gerade noch eine sichere Entscheidung treffen. Sollten in Mischpopulationen jedoch einzelne Zellen zugeordnet werden, so kann auch ein erfahrener Betrachter aufgrund der in Kapitel 3.1.3. aufgeführten Konstanzkriterien, denen sein visuelles System unterliegt, nur allzu leicht Fehlentscheidungen treffen.

Zellen, die zu klassifizieren sind, können durch das Kriterium der minimalen Distanz nahezu eindeutig der di- oder triploiden Population zugerechnet werden (vergl. 3-35. & Abb. A5.1.).

5.3 Von statischen zu dynamischen Zellulären Prozessen

Nachdem gezeigt wurde, daß mit Hilfe der bildverarbeitenden Mikroskopie Bestimmungen integraler Fluoreszenzintensitäten verläßlich durchgeführt werden können [Kap. 5.1.1.] und daß die ableitbaren morphologischen und textursensitiven Parameter ein hohes klassifizierendes Potential besitzen [Kap. 5.1.2.], soll im folgenden ein weiterer Aspekt dieser Methode beschrieben werden.

Es besteht die Möglichkeit, Zeitserien von Ereignissen aufzunehmen und über die Definition von Segmentierungen höherer Ordnung innerhalb einmal definierter Objekte den zu gewinnenden Informationsraum weiter aufzuspannen.

Ein Schwerpunkt gegenwärtiger zellbiologischer (biochemischer und biophysikalischer) Forschungen sind Untersuchungen von Prozessen, welche zu Schädigungen des Erbmaterials führen.

Damit in Verbindung stehen die zellulären Mechanismen, welche verursachte Schäden direkt zu beheben versuchen sowie Signalwechselwirkungen, welche die Zellzyklusphasen steuern. Sie beeinflussen direkt oder indirekt die Arettierung, Reparatur, Entartung, *Necrosis* oder die Initiierung apoptotischer Prozesse [Friedberg *et al.* 1995].

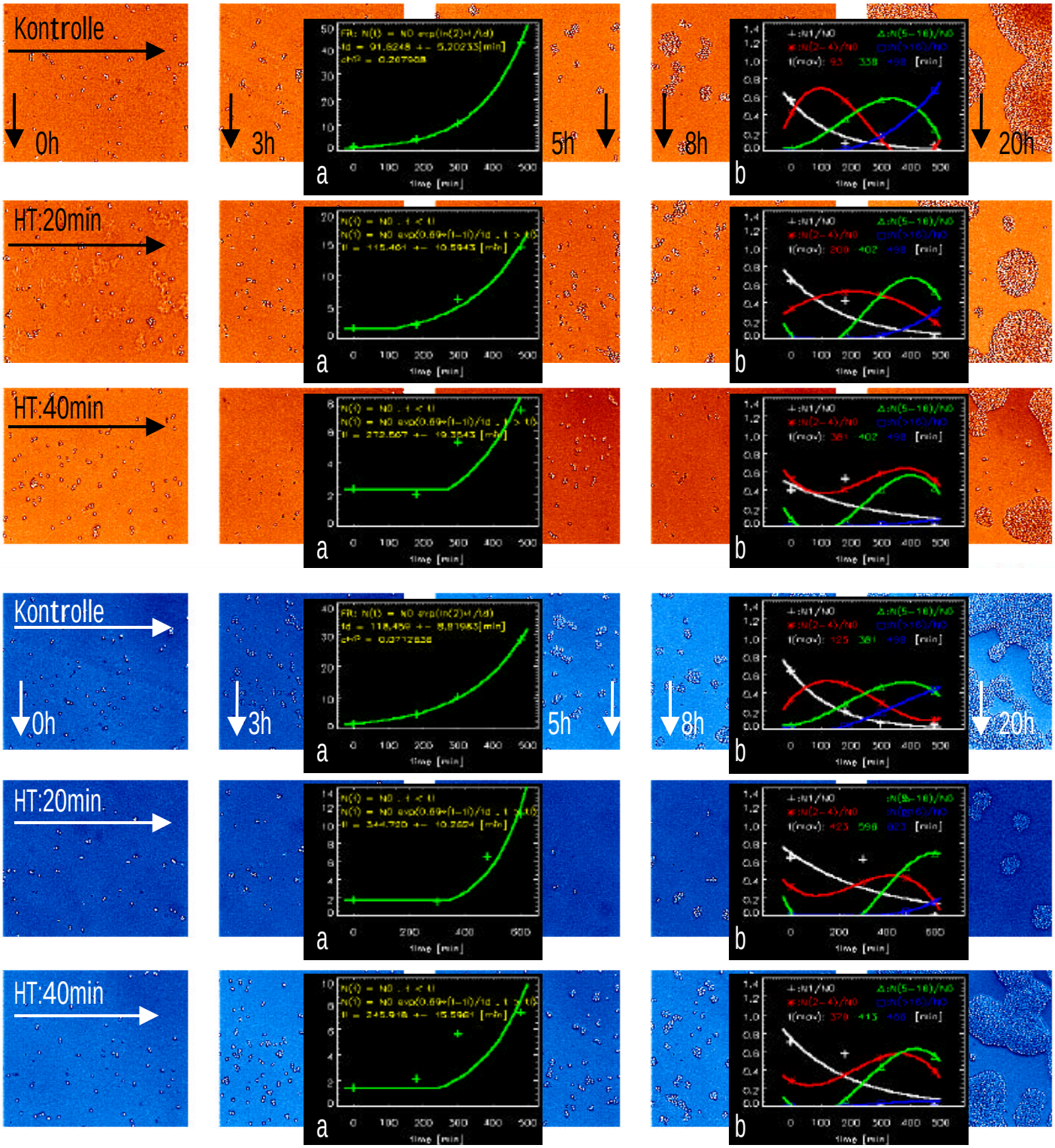


Abb.5.6.: Wachstumskurven der Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* (orange Serie) und deren Rad9-Gen-Mutant (blaue Serie). Die Bildserien (jeweils dargestellt ein repräsentativer Ausschnitt) wurden 0h, 3h, 5h, 8h und 20h nach Behandlungen mit Hyperthermie (48°C, 20 & 40 min) und nach Fixierung mit Formoldampf aufgenommen. Die Hefezellen wurden auf mit Agar verfestigtem YED-Medium (Hefeextrakt 0,5% und Dextrose 1%) gezüchtet und in ihren Wachstumsschalen mikroskopisch untersucht. Für die Auswertung der Experimente wurden nicht nur die einzelnen Zellen segmentiert, sondern ebenfalls die durch Teilung gebildeten 'Zellnester', deren Größen untereinander in Bezug gesetzt wurden. Aus dieser Auswertung lassen sich sofort die Wachtumskurven errechnen und die durch Hyperthermie induzierte Arretierzeit in einer der Zellzyklusphasen durch ein einfaches Modell im Sinne der kleinsten quadratischen Abweichungen 'fitten' [**a**]. Aus dem relativen Anteil der Hefenester mit [1/weiss], [3-4/rot], [5-16/grün] und [> 16/blau] Zellen an der Gesamtzahl der Nester lassen sich detailliertere Informationen über das Wachstumsverhalten der Zellen nach einer Stressbehandlung ableiten [**b**].

Um den Einfluß verschiedener Induktoren oder bestimmter Gene auf Zellzyklusphasen zu erforschen, werden häufig Hefezellen des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* (SX46) sowie aus diesen abgeleitete genmutierte Stämme als relativ gut definierte Modellsysteme verwendet.

An dieser Stelle interessiert ein Rad9-Mutant. Das Rad9-Gen ist eines von über 30 bekannten Rad *locii,* welche bei der zellulären Antwort auf ionisierende Strahlung in verschiedenen Reparaturmechanismen involviert sind [Friedberg *et al.* 1995].

Rad9 wird als Pendant zu dem in Säugetierzellen entdeckten Tumor-Supressor-Gen p53 diskutiert (von der Zeitschrift *Science* zum Molekül des Jahres 1993 gewählt) [Prives 1993, Nunes & Gelós 1995, Bork *et al.* 1997].

Alterationen des p53-Gens sind die Ursache für die Entstehung verschiedener Krebstypen, darunter auch einiger maligner Melanome von Patienten mit *Xeroderma pigmentosum* (XP) [Dumaz *et al.* 1993]. P53-Mutationen treten bei über 50 % aller bekannten menschlich Krebstypen auf. XP ist die erste Humanpathologie, bei der ein direkter Zusammenhang zwischen UV-induzierter Entstehung von Hautkrebs und dem Defekt eines Reparaturgens direkt nachgewiesen werden konnte.

P53 arretiert den Zellzyklus beim Übergang der G1- zur S-Phase. Rad9 besitzt einen zusätzlichen Kontrollpunkt in der G2-Phase. Bei DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung kommt es zu p53 / Rad9-gesteuerten Arretierungen der Zellzyklen, um den zellulären Reparaturmechanismen die nötige Zeit zum Beheben der DNA-Schäden zu geben [Kastan & Kuerbitz 1993, Prives 1993].

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, daß bei Induktion von DNA-Schäden durch Behandlung mit Hyperthermie (20 min, 48°C) und dem Superoxidradikale bildenden chemischen Agens Paraquat nicht zu unterschiedlichen Pertubationen der Zellzyklusphasen führten [Nunes & Siede 1996]. Die hier gezeigte Analyse ist das Ergebnis der Auswirkungen von 20 min und 40 min Behandlung mit Hyperthermie (48°C).

Mit Hilfe von Wachstums- und Überlebenskurven wurden bislang die Wirkungen der Induktoren und die Funktionen von Genen verglichen [Nunes & Siede 1996, Rowley *et al.* 1993, Keszenman *et al.* 1993].

Verschiedene Arbeitsschritte und Methoden wurden bislang verwendet, um Wachstumsanalysen der Gesamtpopulation, Größenverteilungen, Analysen der Zellklusterverteilung und flowzytometrische Zellzyklusanalysen zu ermitteln.

In den Abb. 5.6. & Abb. 5.7. sind Wachstumskurven und Größenverteilungen der einzelnen Zellen sowie der wachsenden Zellkluster des Rad9-Gen geschädigten Mutanten von *S. cerevisiae* und die der Stammzelle selber aufgetragen. In einem einzigen Arbeitsschritt wurden alle Parameter dabei einzig aus Versuchen von in Wachstumsschalen gezüchteten Zellen abgeleitet.

Aufgrund der Möglichkeit, mikroskopisch den DNA-Gehalt und damit die Zellzyklusphase von Zellen bestimmen zu können [Kap. 5.1.1.], wäre es prinzipiell möglich gewesen, die Zellen mit geeigneten DNA-Fluoreszenzmarkern ebenfalls hinsichtlich der Effekte auf ihren Zellzyklus zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen, daß Rad9 bei der Steuerung des Zellvolumens, des Wachstums und ebenfalls bei der Reaktion auf Behandlung mit Hyperthermie involviert ist (Rad9-Mutanten sind größer [Abb. 5.7.a.] und wachsen langsamer [Abb. 5.6.a.]: Verdopplungszeit **td** = 118 min an Stelle von 92 min).

Bei 20 min Hyperthermie ist die Arretierzeit des '*wild type*' viel kürzer als die des Rad9-Mutanten, bei 40 min sind sie hingegen annähernd gleich [Abb. 5.7.a.].

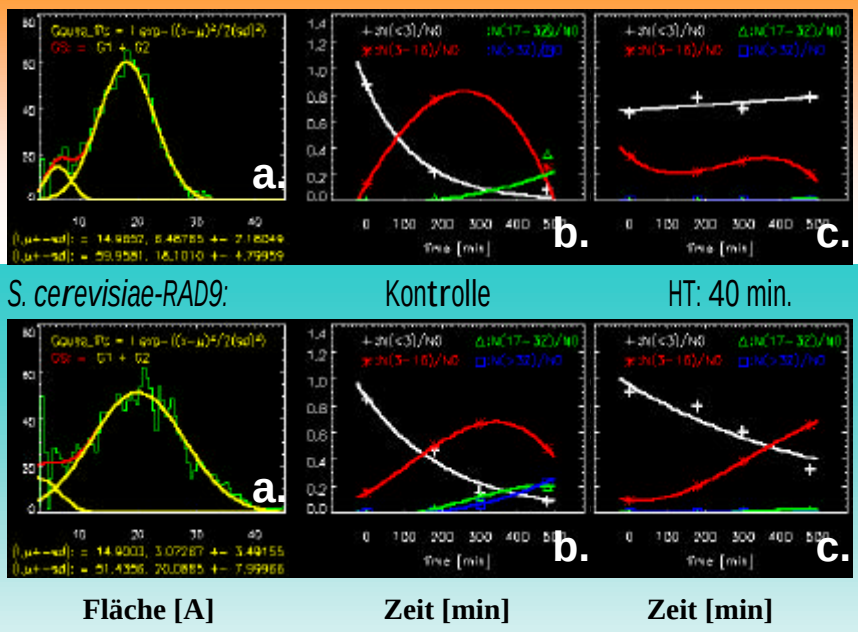


Abb.5.7.: Größenverteilungen [**a**] und zeitliche Entwicklung [**b** & **c**] wachsender Zellkluster von *Saccharomyces cerevisiae* (oben) und deren Rad9-Gen-Mutant (unten).

[**b**]: Kontrolle. [**c**]: Behandlung mit Hyperthermie bei 48°C für 40min.

Relative Anzahl der Zellnester (1-3) Zellen ist weiß, (3-16) rot, (17-32) grün und (>32) blau dargestellt. Die Stammzellen sind kleiner, wachsen etwas schneller und reagieren sensitiver auf die Behandlung mit 40 min. Hyperthermie. Alle Parameter wurden aus den in Abb. 5.6. gezeigten Bildserien abgeleitet.

Die Rate der sofort oder nach wenigen Zellzyklen absterbenden Zellkluster (n<3) ist jedoch für SX46 bei 40 min wesentlich höher als bei Rad9 [**b**].

Ein Erklärungsansatz könnte in Analogie zu p53 erfolgen. Durch DNA-Schäden steigt die p53-Konzentration.

Hohe p53-Konzentrationen sind demnach Anzeichen einer verstärkten Mutationsgefahr.

Apoptosis wird in vielen, wenn auch nicht in allen betroffenen Zelltypen induziert [Maity *et al.* 1994, Slichenmyer *et al.* 1993].

Rad9 könnte ebenfalls proportional zum Grad der DNA-Schädigungen exprimiert werden und *Apoptosis* induzieren. Dadurch könnte der erhöhte Anteil lethaler SX46-Zellen erklärt werden. Beim Rad9-Mutanten ist dieser Mechanismus gestört.

Die Ergebnisse wurden auf dem '*VII Congreso Ibero-Americano de Biología Celular*' in Montevideo, Uruguay, im Rahmen eines Vortrags vorgestellt [Bracesco *et al.* 1998].

5.4 Apoptotische Prozesse in der digitalen Mikroskopie

In den vorangehenden Kapiteln wurden drei wichtige, grundlegende Charakteristiken der bildverarbeitenden Mikroskopie dargestellt:

1. Relative Fluoreszenzintensitäten in zellulären Populationen können mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Systeme verläßlich und in hoher Güte bestimmt werden [Kap. 5.1.].
2. Durch die Verwendung mathematischer Morphologie in Kombination mit Methoden der Multi-Parameter-Analyse können auf Fluoreszenzeigenschaften basierende Parameter ergänzt oder gar substituiert werden [Kap. 5.2.].
3. Die Möglichkeit, zelluläre Einzelschicksale und die gesamte Populationsdynamik in der Zeit zu verfolgen, eröffnet neue Perspektiven der Interpretation dynamischer zellulärer Ereignisse [Kap. 5.3.].

Auf der so geschaffenen Basis methodischer Eigenschaften sollen im folgenden apoptotische Prozesse in mehrerern Zellsystemen untersucht und miteinander verglichen werden.

5.4.1 Die Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran zur Quantifizierung apoptotischer Prozesse

Fadok *et al.* publizierten 1992, daß apoptotische Lymphozyten die Exposition von Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Plasmamembranhälfte als Signal für makrophagische Prozesse verwenden. Seitdem wird der Verlust der Membranasymmetrie als frühes, nahezu ubiquitär auftretendes Merkmal apoptotischer Prozesse gehandelt [Kap. 2.6., Martin *et al.* 1995]. Die Frage, ob es sich bei diesem Prozeß um einen aktiven oder passiven Prozeß handelt, ist noch immer nicht abschließend geklärt.

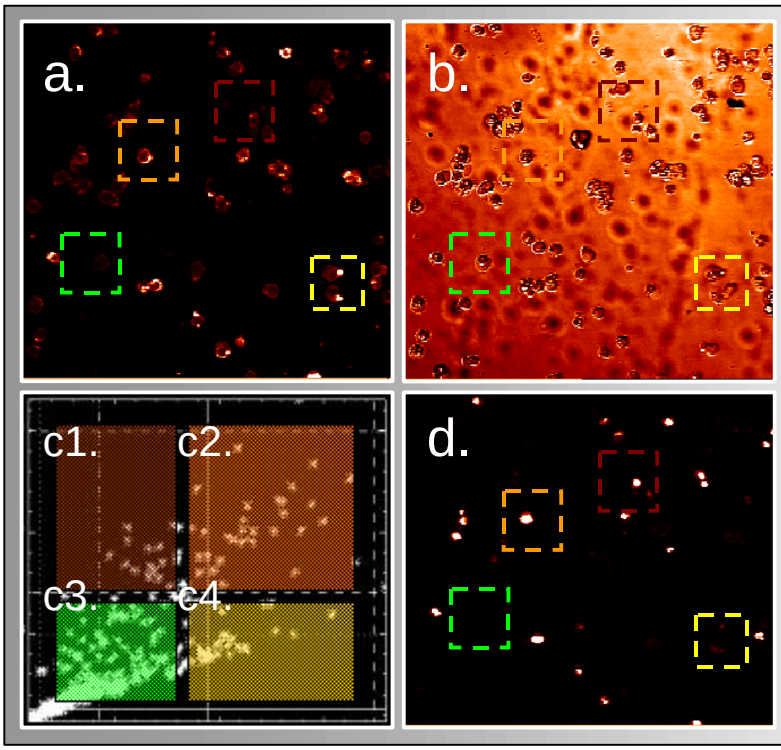


Abb.5.8.: Prinzip der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung des Anteils ‘lebendiger‘, apoptotischer, nekrotischer und sekundär nektrotischer EL-4-Zellen mit Hilfe der Fluorophore Annexin V-FITC (AV) und Propidium Iodid (PI) [40x,λ_{EX}=488 nm].

[**a**], [**b**], [**c**]: Aus dem digitalen Bild des Durchlichtkanals [**b**] werden EL-4-Zellen und Hintergrund segmentiert (s. Abb. 2.12.). Für jede Zelle werden die Intensitätswerte im AV-Kanal [**a**, λ_{EM}= 515-525 nm] und im PI-Kanal abgefragt [**d**, λ_{EM}= > 600 nm].

[**c**]: Bivariates Histogramm der integralen zellulären AV/PI- Fluoreszenzintensitäten (X/Y-Achse) aus a und d. Zellen werden wie folgt charakterisiert. [**c1/** Braun]: Frühe *Necrosis* (kurz nach Verlust der Membranintegrität). [**c2/** Orange]: Sekundäre/späte *Necrosis*. [**c3/** Grün]: ‘Lebendig‘ (integre, asymmetrische Membran). [**c4/** Gelb]: *Apoptosis* (noch intakte, aber PS exponierende Membran). Vergleiche dazu auch Abbildungen 2.6., 3.4. und 5.9..

Die Exposition von PS auf der äußeren Membranhälfte von Zellen konnte Dank der besonderen Eigenschaft eines Proteins entdeckt werden, definiert an PS zu binden. Das Protein wurde 1984 aus menschlicher Plazenta isoliert und trug die Bezeichnung '*Placenta Protein 4*' [Inaba *et al.* 1984]. Wegen der hohen Homologie zur Familie der Annexin-Proteine trägt es heute die Bezeichnung Annexin V. Nach erfolgreicher Klonierung wird es heute mit Hilfe von Bakterienstämmen exprimiert. Außer der Eigenschaft, unter Präsenz millimolarer Ca^{2+}-Konzentrationen an PS zu binden, fungiert es als Anit-Koagulant, Anit-Phospholipase und Anit-Kinase [Van Engeland *et al.* 1998].

Wird Annexin V (AV) mit den Fluorophoren Biotin oder Fluorescein (FITC) verbunden, so kann es in Kombination mit dem DNA-Fluorophor Propidium Iodid (PI) dazu verwendet werden,...

- **'unbeschädigte' Zellen** mit noch integerer, für PI undurchlässiger, asymmetrischer Plasmamembran (AV^-/PI^-), ...
- von **früh apoptotischen Zellen** mit noch integerer, aber PS- symmetrisierter Membran (AV^+/PI^-),...
- von **früh nekrotischen Zellen** mit teilweise aufgebrochener, für PI durchlässiger, aber asymmetrischer Membran (AV^-/PI^+) und ...
- von **spät** oder **sekundär nekrotischen Zellen** mit aufgebrochener Membran (AV^+/PI^+) ...

....zu unterscheiden (s. Abb. 5.8., 5.9. und Abb. 2.6.) .

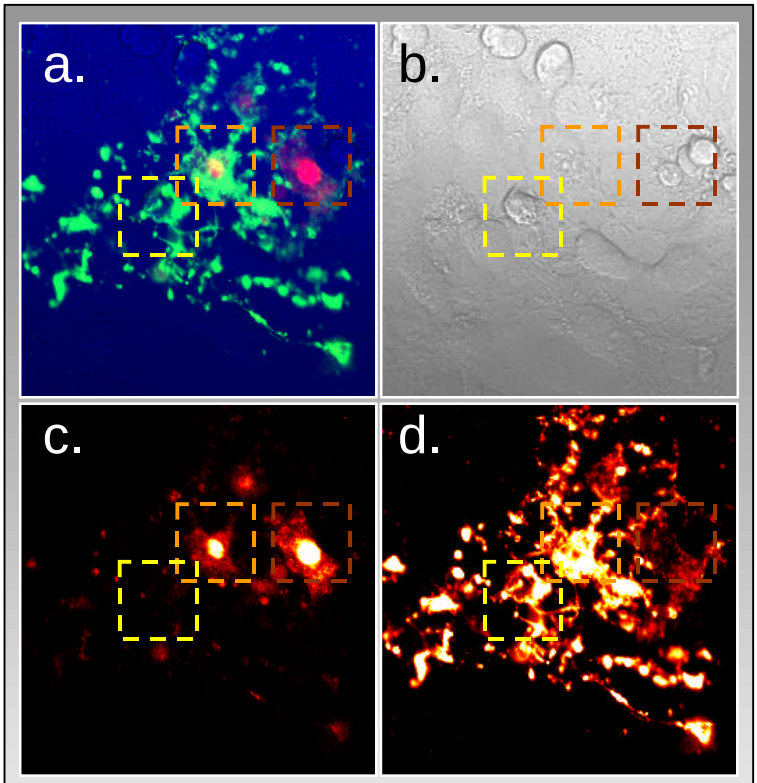


Abb.5.9.: Prinzip der Annexin V (AV)-FITC / Propidium Iodid (PI) charakterisierung apoptotischer und nekrotischer Zustände in adhärenten *Human Cornea Epithelial* (HCE) – Zellen [63x, λ_{EX}=488 nm].

Das überlagerte Bild [**a**], setzt sich aus dem digitalen Bild des Durchlichtkanals [**b**], dem PI-Kanal [**c:** λ_{EM}= > 600 nm] und dem AV-Kanal [**d:** λ_{EM}= 515-525 nm] zusammen.

Die Interpretationen der Farbcodierung der Quadrate verlaufen in Analogie zu Abb. 5.8. Zu erkennen sind: Eine apoptotische Zelle (gelb), eine spät/sekundär nekrotische Zelle (orange) und eine früh nekrotische Zelle (braun). Auch Fragmentierungen der Zellen in apoptotische Körperchen sind klar auszumachen. Die Situation ist ungleich komplexer als bei EL-4-Zellen. Dendriden und Agglomerationen machen die automatisierte Segmentierung einzelner Zellen aus b unmöglich (s. Abb. 5.10.).

In Verbindung mit flowzytometrischen Bestimmungen der relativen Fluoreszenzintensitäten, hat sich der AV/PI-Fluorophorcocktail weitläufig etabliert, um Suspensionszellen zu charakterisieren [Van Engeland *et al.* 1998].

Es gibt nach den Konsequenzen aus Kapiteln 5.1. bis 5.3. keinen Grund, den AV/PI-Fluorophorcocktail nicht auch in Verbindung mit bildverarbeitender Fluoreszenzmikroskopie anzuwenden.

Dieser methodische Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit bereits an quasiadherent wachsenden EL-4-Zellen unter Verwendung verschiedener Apoptotisinduktoren verwendet [Jessel *et al.* 2000].

Hier konnten mit Hilfe der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie biochemische und morphologische Parameter von Zellen kontrolliert und so eine Reihe möglicher Irrtümer ausgeschlossen werden, wie sie bei durchgeführten FC-Analysen entstehen können (siehe Zusammenstellung häufiger Fehlerquellen in Darzynkiewicz *et al.* 1997).

Besonders schwierig, wenn nicht unmöglich, erweisen sich bislang genaue Quantifizierungen von Apoptosisraten in adherent oder auch quasiadherent wachsenden Zellkulturen [Abb. 5.9.].

Da FC-Analysen an Einzelzellsuspensionen durchgeführt werden müssen, kommt man nicht umhin, angewachsene Zellen von ihrem Untergrund zu lösen. Zellen haften jedoch, je nach ihrem Zustand, stärker oder schwächer an ihren Wachtumsauflagen. An dieser Stelle führen unvorsichtige, mechanische Präparationsmethoden nach Darzynkiewicz *et al.* (1997) sehr häufig zu Fehlquantifizierungen, die auch veröffentlicht werden.

Auch von der gängigen Praxis, Zellen mit Hilfe von Trypsin von ihrem Hintergrund abzulösen, wird abgeraten, da PS-Expositionen durch Membranpertubationen artifiziell induziert werden können [Van Engeland *et al.* 1998]. Die Autoren empfehlen in Van Engeland *et al.* 1996, Zellen lieber gefühlvoll, aber bestimmt, mit den mechanischen Argumenten eines Gummipolizisten (‘*rubber policeman*‘) loszulösen. Dabei ist natürlich zu beachten, daß jede Form von mechanischem Einfluß unausweichlich wichtige morphologische Veränderungen, wie das Abrunden der betroffenen Zellen, induziert. Dies ist ein kritischer Punkt, da es oft gerade morphologische Veränderungen sind, die wegen der biochemischen Diversität letztendlich Kriterien der Klassifizierung liefern müssen [Darzynkiewicz *et al.* 1997, Bedner *et al.* 1999].

Eine Möglichkeit, störende Einflüsse zu unterbinden, bietet der in Abb. 4.29. beschriebene experimentelle Ansatz, Zellen unter Brutschrankbedingungen mit Hilfe der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie zu charakterisieren. Für Zellen der Linie EL-4, die keine Dendriden ausbilden oder agglomerieren, sind bildverarbeitende Charakterisierungen unter Brutschrankbedingungen durch

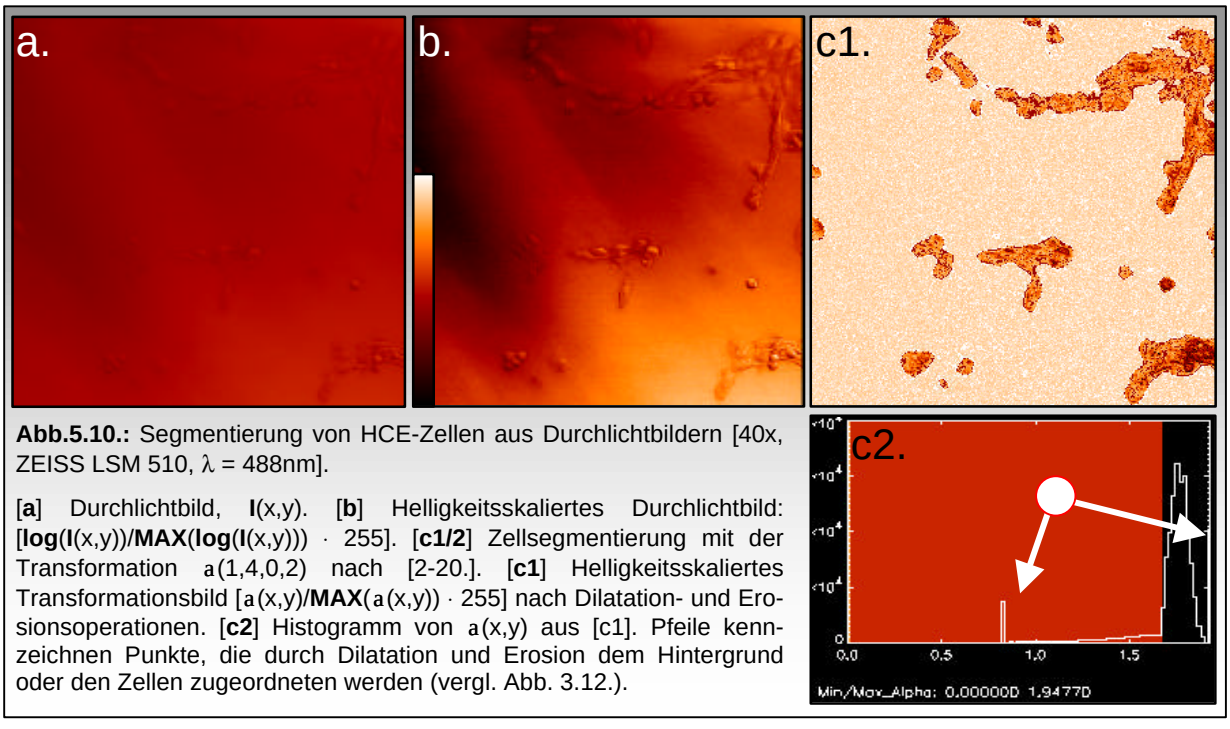


Abb.5.10.: Segmentierung von HCE-Zellen aus Durchlichtbildern [40x, ZEISS LSM 510, λ = 488nm].

[**a**] Durchlichtbild, **I**(x,y). [**b**] Helligkeitsskaliertes Durchlichtbild: [**log**(**I**(x,y))/**MAX**(**log**(**I**(x,y))) · 255]. [**c1/2**] Zellsegmentierung mit der Transformation a(1,4,0,2) nach [2-20.]. [**c1**] Helligkeitsskaliertes Transformationsbild [a(x,y)/**MAX**(a(x,y)) · 255] nach Dilatation- und Erosionsoperationen. [**c2**] Histogramm von a(x,y) aus [c1]. Pfeile kennzeichnen Punkte, die durch Dilatation und Erosion dem Hintergrund oder den Zellen zugeordneten werden (vergl. Abb. 3.12.).

einfache *in situ* Anfärbung leicht möglich (s. Abb. 5.8.). *Human cornea epithelial* (HCE) -Zellen sind hinsichtlich apoptotischer Prozesse weitaus schwieger zu charakterisieren als EL-4-Zellen [Zorn *et al.* 2000]. HCE-Zellen bilden verzweigte Zellfortsätze aus und wachsen in engen Zellverbänden. Einzelne Zellen können mit den bislang zur Verfügung stehenden Bildverarbeitungstechniken daher nicht segmentiert werden. Hier mußte eine alternative Methode entwickelt werden.

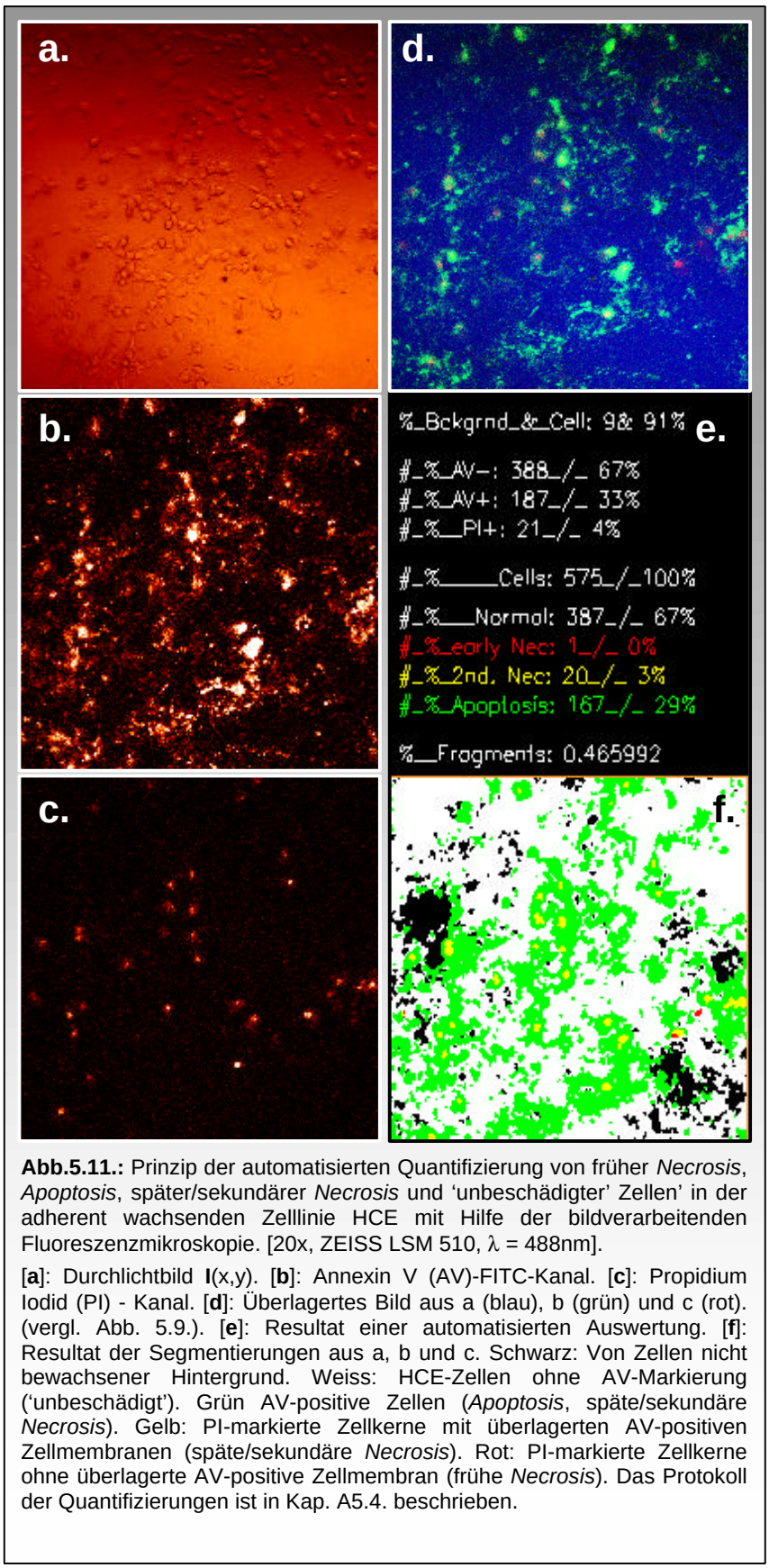


Abb.5.11.: Prinzip der automatisierten Quantifizierung von früher *Necrosis*, *Apoptosis*, später/sekundärer *Necrosis* und 'unbeschädigter' Zellen' in der adherent wachsenden Zelllinie HCE mit Hilfe der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie. [20x, ZEISS LSM 510, λ = 488nm].

[**a**]: Durchlichtbild **I**(x,y). [**b**]: Annexin V (AV)-FITC-Kanal. [**c**]: Propidium Iodid (PI) - Kanal. [**d**]: Überlagertes Bild aus a (blau), b (grün) und c (rot). (vergl. Abb. 5.9.). [**e**]: Resultat einer automatisierten Auswertung. [**f**]: Resultat der Segmentierungen aus a, b und c. Schwarz: Von Zellen nicht bewachsener Hintergrund. Weiss: HCE-Zellen ohne AV-Markierung ('unbeschädigt'). Grün AV-positive Zellen (*Apoptosis*, späte/sekundäre *Necrosis*). Gelb: PI-markierte Zellkerne mit überlagerten AV-positiven Zellmembranen (späte/sekundäre *Necrosis*). Rot: PI-markierte Zellkerne ohne überlagerte AV-positive Zellmembran (frühe *Necrosis*). Das Protokoll der Quantifizierungen ist in Kap. A5.4. beschrieben.

Erschwert wird die Segmentierung von HCE-Zellen aber nicht nur durch Agglomerationen. Da sie als Bestandteil der menschlichen Cornea (s. Abb. 3.3.a.) naturgemäß kaum Pigmentstoffe enthalten, sind Zellen schon mit dem Auge kaum zu erkennen. Dies verdeutlichen die Abbildungen 5.9.b., 5.10.a. und 5.11.a..

Die zusammenhängenden Agglomerationen von HCE-Zellen können als Ganzes jedoch sensitiv mit Hilfe der in Kap. 3.2. beschriebenen Methoden vom Hintergrund segmentiert werden [Abb. 5.10. & 5.11.].

Dies bildet die unbedingte Voraussetzung für die statistische Charakterisierung von HCE-Zellen unter Kulturbedingungen mit Hilfe des AV/PI-Fluorophorcocktails.

Das Prinzip der automatisierten Quantifizierung von früher *Necrosis*, *Apoptosis*, später/sekundärer *Necrosis* und ‘unbeschädigter’ adhärenter HCE-Zellen mit Hilfe der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie ist in Abb. 5.11. für einen Bildausschnitt beschrieben.

Aus den segmentierten Zellflächen kann indirekt auf die Zellzahlen rückgeschlossen werden, wenn man die durchschnittlichen Zellgrößen vorher mit Hilfe einer dünn ausgesäten Zellpopulation errechnet hat. Eine Einzelstatistik der PI-positiven Zellkerne ist hingegen direkt möglich, da diese nicht überlappen und somit nach einer Segmentierung direkt zugänglich sind [Abb. 5.11.c./f. & Kap. A5.3.4.].

Aus dem AV-Kanal kann als zusätzliche Information der Grad der Zellfragmentierung in apoptotische Körperchen abgeleitet werden. Diese lösen sich nach Exposition mit dem Proteinkinasen - Inhibitor Staurosporin [Kap. 5.4.2.] in den Randbereichen der HCE-Zellen ab (s. Abb. 5.9. und 5.14.).

Die Nuclei der HCE-Zellen fragmentieren jedoch nicht, und auch aus dem näheren Membranbereich um die Nuclei herum spalten sich keine größeren Zellfragmente ab. Bei HCE-Zellen kommt es demnach im Verlauf der apoptotischen Prozesse nicht zu einer völligen Desintegration des Zellkörpers (vergl. dazu T-Zellen aus Abb. 5.15.).

5.4.2 Kinetik der Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran bei EL-4-und HCE-Zellen

Im folgenden sollen die Kinetiken der Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran als Resultat der Apoptotisinduktion mit dem Proteinkinase C (PKC) - und dem Proteinkinase A (PKA) - Inhinhibitor Staurosporin untersucht werden.

Die apoptosischen Prozesse bei HCE-Zellen sind noch weitgehend ungeklärt. Daher wurden Versuche zur Absicherung der Methode parallel mit EL-4-Zellen durchgeführt. In EL-4-Zellen ist die Wirkung von Staurosporin im Vergleich mit anderen apoptosisinduzierenden Effektoren bereits eingehenden Untersuchungen unterzogen und definiert worden [Jessel *et al.* 2000]. In adherenten Ratten-1-Fibroblastzellen induziert Staurosporin *Apoptosis* durch den *apoptosis-inducing factor* (AIF) [Susin *et. al.* 1999].

Mit den in Abb. 5.8. und Abb. 5.11. beschriebenen Methoden wurde die Entwicklung der *Apoptosis* in HCE-und EL-4-Zellen nach Induktion mit 0.5, 1 und 2µM Staurosporin verfolgt [Abb. 5.12.a. und 5.13.a.]. In Abb. 5.12.b./c. und 5.13.b./c. sind die Experimente mit 1µM Staurosporin zeitaufgelöst zu sehen.

Im oberen Bereich der Abbildungen 5.12. und 5.13. geben repräsentative Mehrkanalbilder (Durchlicht, PI und AV) einen Eindruck von dem Zustand der Zellpopulationen 2h, 4h und 6h nach Induktion. Die Farbcodierung folgt dabei Abb. 5.9.. In HCE-und EL-4-Zellkulturen ist die Zunahme grüncodierter AV-FITC-Markierungen innerhalb der 6 Stunden gut zu erkennen.

Bei den Versuchen mit HCE-Zellen befinden sich unter der gewählten Vergrößerung (40x) in jedem Bild zwischen 300 und 500 Zellen, so daß für jeden ausgewerteten Meßwert aus Abb. 5.12.c. zwischen 2700 und 4500 Zellen verwendet werden konnten. Bei den Experimenten mit EL-4-Zellen wurden für jeden Meßwert ca. 2000 Zellen ausgewertet [Abb. 5.13.c.].

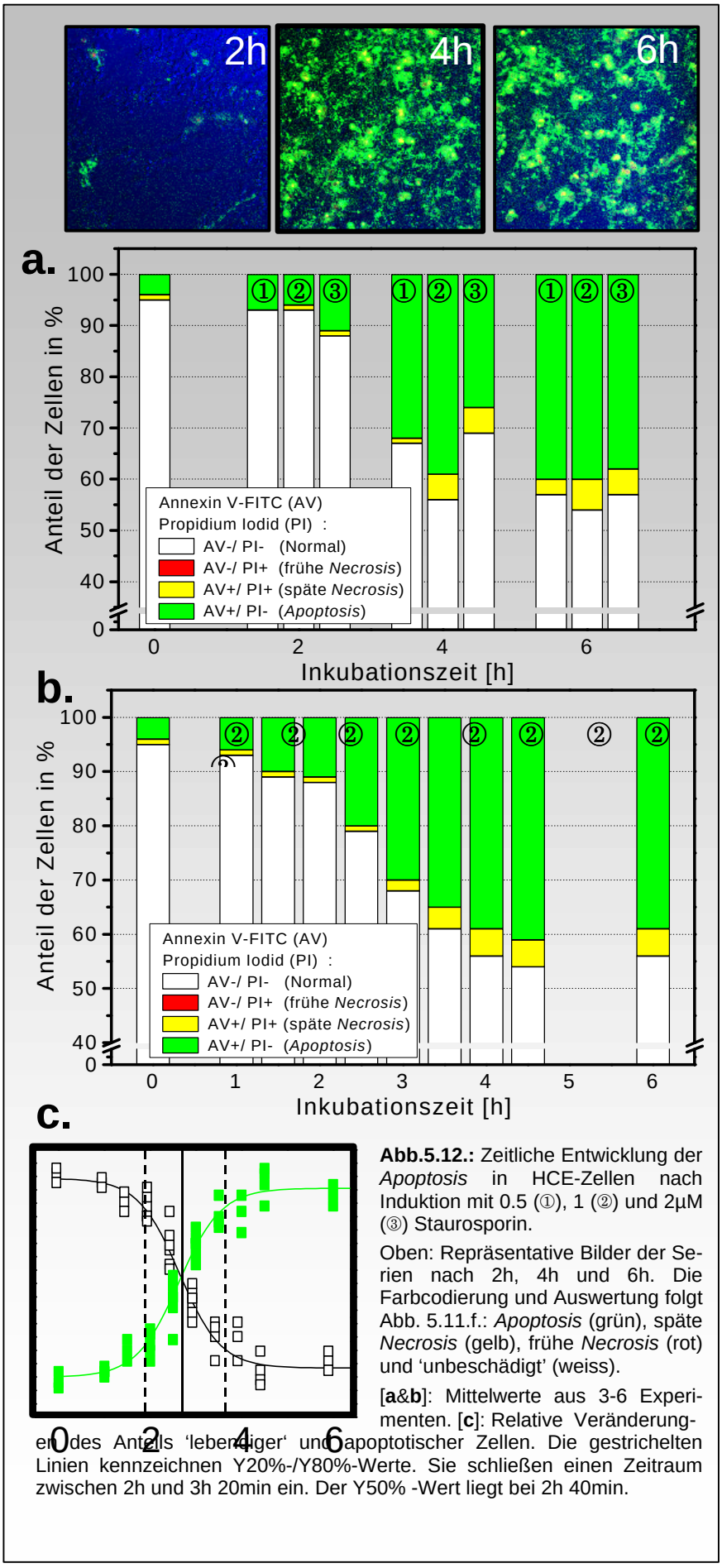


Abb.5.12.: Zeitliche Entwicklung der *Apoptosis* in HCE-Zellen nach Induktion mit 0.5 (①), 1 (②) und 2µM (③) Staurosporin.

Oben: Repräsentative Bilder der Serien nach 2h, 4h und 6h. Die Farbcodierung und Auswertung folgt Abb. 5.11.f.: *Apoptosis* (grün), späte *Necrosis* (gelb), frühe *Necrosis* (rot) und 'unbeschädigt' (weiss).

[**a**&**b**]: Mittelwerte aus 3-6 Experimenten. [**c**]: Relative Veränderungen des Anteils 'lebendiger' und apoptotischer Zellen. Die gestrichelten Linien kennzeichnen Y20%-/Y80%-Werte. Sie schließen einen Zeitraum zwischen 2h und 3h 20min ein. Der Y50% -Wert liegt bei 2h 40min.

Im Falle der HCE-Zellen sind bei den verwendeten Staurosporinkonzentrationen weder die Kinetik der apoptotischen Prozesse noch die absoluten Raten der *Apoptosis* / *Necrosis* voneinander zu unterscheiden [Abb. 5.12.a.].

Wie die Y20%-/Y80%-Werte aus Abb. 5.12.c. erkennen lassen, dauert es etwa 2h bis eine apoptotische Signalkaskade die PS-Exposition initialisiert und dann ca. 1½h bis dieser Prozeß abgeschlossen ist.

Nach 4h treten bereits keine nennenswerten Veränderungen im Sinne des AV/PI-Kriteriums auf. Alle Prozesse, welche die PS-Exposition in HCE-Zellen betreffen sind dann abgeschlossen.

Aus der Streuung der Meßwerte in Abb. 5.12.c. läßt sich die Reproduzierbarkeit des zellulären apoptotischen Systems in Verbindung mit der Auswertungsmethode abschätzen.

Es ist an dieser Stelle noch interessant zu bemerken, daß bei allen eingesetzten Staurosporinkonzentrationen letztendlich nur ca. 45% der Zellen PS exponierten.

Im Durchlichtbild lassen sich PS exponierende Zellen von PS-negativen Zellen nicht unterscheiden.

Die Kinetik apoptotischer Prozesse in EL-4-Zellen [Abb. 5.13.b./c.] ähnelt in überraschender Weise dem Verhalten apoptotischer HCE-Zellen.

Genau wie bei HCE-Zellen unterscheiden sich auch bei den EL-4-Zellen die absoluten Raten von *Apoptosis* und *Necrosis* unter den verwendeten Staurosporinkonzentrationen kaum voneinander [Abb. 5.13.a., 6h].

Der PS-exponierende Prozeß verläuft bei EL-4-Zellen ebenfalls in eine Sättigung, bevor 6h erreicht sind.

Allerdings konnte die lehrbuchartig verlaufende Kinetik der apoptotischen HCE-Zellen aus Abb. 5.12.c. mit EL-4-Zellen nur im Ansatz reproduziert werden. Die enzymatischen Initiationsprozesse scheinen bei EL-4-Zellen zeitlich etwas stärker gestreut zu sein als bei den HCE-Zellen (vergl. Y20%-und Y80%-Werte aus Abb. 5.12.c. und 5.13.c.). Zu beachten ist weiter, daß sich das absolute Niveau der induzierten Apoptosis bei den EL-4-Zellen auf höherem Niveau bewegt (~65%) als bei den HCE-Zellen (~45%). Auch EL-4-Zellen weisen nach 6h alle eine morphologisch einheitliche Gestalt auf. Unabhängig davon, ob sie PS-positiv oder PS-negativ markiert sind.

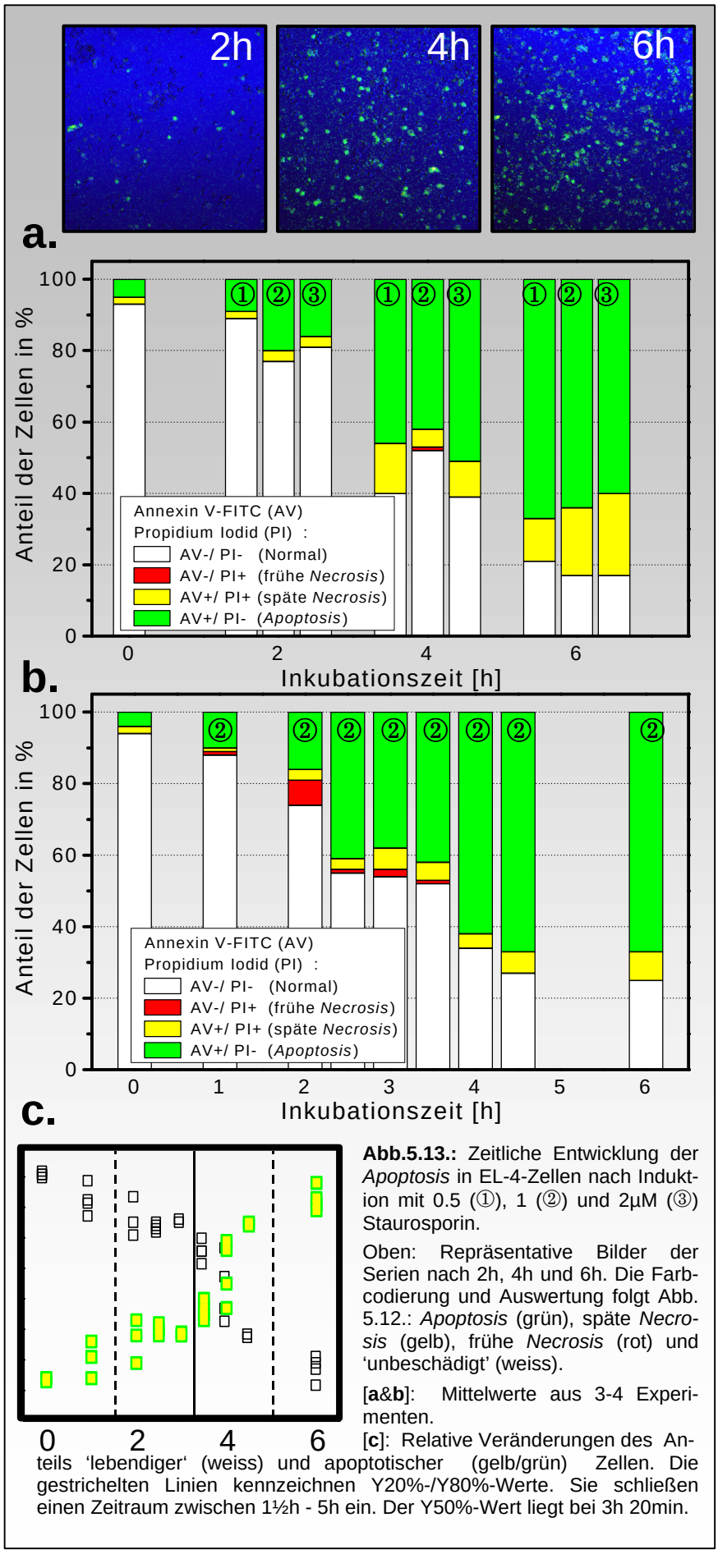
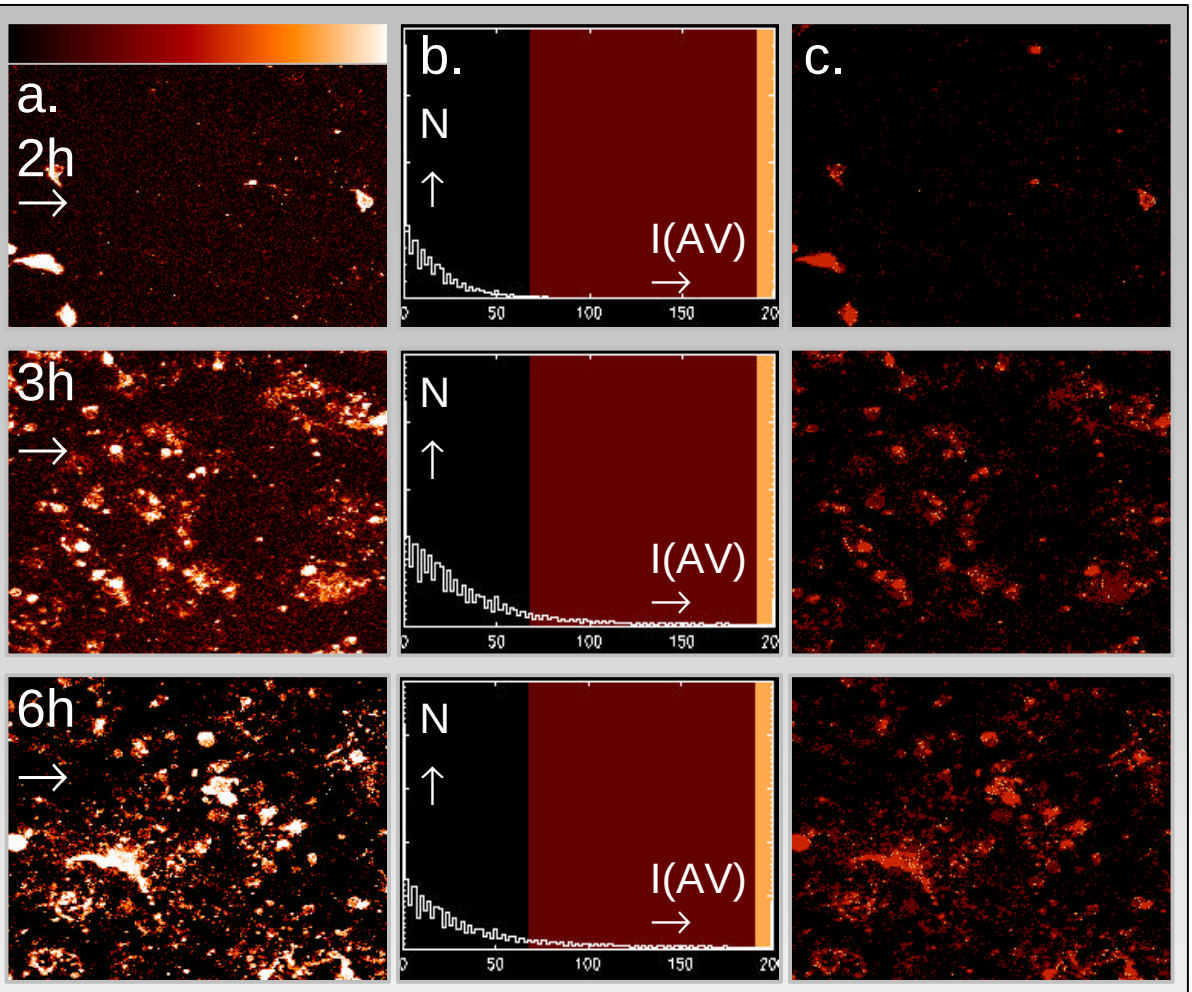


Abb.5.13.: Zeitliche Entwicklung der *Apoptosis* in EL-4-Zellen nach Induktion mit 0.5 (①), 1 (②) und 2µM (③) Staurosporin.

Oben: Repräsentative Bilder der Serien nach 2h, 4h und 6h. Die Farbcodierung und Auswertung folgt Abb. 5.12.: *Apoptosis* (grün), späte *Necrosis* (gelb), frühe *Necrosis* (rot) und 'unbeschädigt' (weiss).

[**a**&**b**]: Mittelwerte aus 3-4 Experimenten.

[**c**]: Relative Veränderungen des Anteils 'lebendiger' (weiss) und apoptotischer (gelb/grün) Zellen. Die gestrichelten Linien kennzeichnen Y20%-/Y80%-Werte. Sie schließen einen Zeitraum zwischen 1½h - 5h ein. Der Y50%-Wert liegt bei 3h 20min.



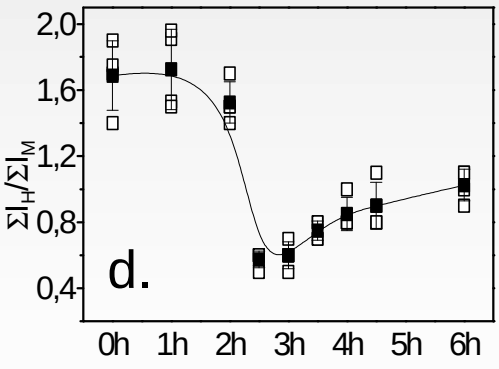


Abb.5.14.: Kinetik der Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran von HCE-Zellen nach Induktion mit 1µM Staurosporin. [**a**] Fluoreszenzintensität von Annexin V (AV)-FITC in repräsentativen Bildausschnitten 2h, 3h und 6h nach Induktion (vergl. Abb.5.12.c.). (Intensitätsskalierung oben in Bild a). [**b**] Histogramme der Intensitätsverteilung aus Bildern a. [**c**] Farbcodierte Bildausschnitte a mit den in Histogrammen b definierten Intensitätswerten. Braun: Mittlere AV-Intensitäten. Hellbraun: hohe AV-Intensitäten. [d]: Quotient aus den flächenmäßigen Anteilen hoher (ΣI_H) und mittlerer (ΣI_M) AV-FITC-Intensitäten in Abhängigkeit der Inkubationszeit (vergl. Abb.5.12.c.). Abgebildet sind die Quotienten einzelner Bilder (~500 Zellen,), Mittelwerte (■), Standardabweichung und eine angepaßte *b-Spline*-Funktion (Origin 5.0.). Das zeitliche Verhalten des Quotienten ($\Sigma I_H/\Sigma I_M$) lässt Rückschlüsse auf die Kinetik der PS-Exposition zu. Die Initiierung des Prozesses muß aufgrund des scharfen Anstiegs mittlerer AV-Intensitäten nach 2h zeitlich sehr eng definiert sein. Dies gilt auch für den Prozeß der PS-Exposition. Dieser ist zwischen 2½ - 3h bereits von einer Mehrzahl der betroffenen Zellen abgeschlossen .

Bei der bildverarbeitenden Fluoreszenzmikroskopie können Intensitätsverteilungen einzelner Objekte erfaßt und zur Auswertung herangezogen werden. Dies ist ein bedeutender methodischer Vorteil gegenüber der Flowzytometrie. Diese Eigenschaft soll nun herangezogen werden, um das Verständnis der PS-exponierenden Prozesse in HCE-Zellen noch etwas zu erweitern. Wenn man (wie in Abb. 5.14. ausgeführt wird) an Stelle der binären Entscheidung (AV^+/AV^-) die FITC-Intensitätsverteilung nach hohen und mittleren Intensitätsintervallen staffelt, so charakterisieren diese

Intervalle Membranbereiche mit abgeschlossener, maximaler PS-Exposition und Membranbereiche, die noch Gegenstand stattfindender PS-Umverteilungen sind.

Läge der Prozeß der PS-Exposition zeitlich im Bereich einiger Sekunden bis Minuten, so würde sich der Quotient aus den Flächenanteilen hoher und mittlerer AV-Intensitäten ($\Sigma I_H/\Sigma I_M$) mit der Zeit nur gerinfügig ändern. Dies ist jedoch nicht der Fall. Zeitlich eng definiert rutscht der Quotient nach 2h auf etwa ein Drittel seines Kontrollwertes ab. Ebenso deutlich erholt er sich aber sofort wieder, indem er nach 2½h in Richtung eines höheren Quotienten (~1.2) relaxiert [Abb.5.14.d.].

Koppelt man diese Information mit der Kinetik der integralen, binär-apoptotischen AV^+-Klassifizierung aus Abb. 5.12.c. so läßt sich übereinstimmend feststellen:

1. Der **Prozeß**, welcher **die PS-Exponierung initiiert** sowie...
2. der eigentliche Prozeß der **PS-Exposition**...

sind bei HCE-Zellen zeitlich zwischen einigen Minuten und weniger als ½h einzuordnen.

Gegenwärtig wird vermutet, daß die initiierenden Prozesse (1.) enzymatischer Natur sind (s. Kap. 2.5./6. & Kap. 5.4.4.). Prozesse die auf gleichen Zeitskalen ablaufen und einer funktionalen Einheit angehören (dem zellulären ‘Entsorgungs- und Verwertungsbetrieb‘) stehen zumindest im Verdacht, mechanistisch verwandt zu sein.

Die noch offene Frage, ‘*Transportiert eine aktive Translokase PS auf die äußere Zellmembran oder findet ein diffusionsgetriebenerTransport statt ?*‘ [Kap. 2.6.], kann anhand der angestellten Zeitskalenbetrachtung zwar nicht abschließend geklärt werden. Sie ist aber ein klares Indiz für die Existenz einer aktiven PS-Translokase. Die wichtigste treibende Kraft eines diffusiven Gleichverteilungsprozesses ist die Entropie. Diese dürfte in dem beobachteten Zeitraum kaum ausreichen, die schnellen Umstrukturierungen der Plasmamembranen zu erklären.

Noch eine weitere Beobachtung kann als Indiz gegen Diffusionsprozesse verwendet werden:

Schon vor und während der PS-Exposition kommt es zu extensiven Abspaltungen einzelner apoptotischer Körperchen (s. Kap. 2.6.). Diese zeichnen sich (s. Abb. 5.14.c.) überwiegend durch mittlere AV-Intensitäten aus. Im Gegensatz dazu sind die zentralen AV^+-Zellteile fast ausschließlich durch hohe AV-Intensitäten charakterisiert.

Prozesse diffusiver Natur sollten sowohl in den mit Plasmamembranen umschlossenen Vesikeln als auch im verbleibenden Zellkörper zu gleichen Fluoreszenzdichten führen. Hingegen ist ein aktiv gestaltender, enzymatischer Prozeß auf den zellulären Energieträger Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) angewiesen. Da das Verhältnis von Membranoberfläche zu Volumen mit abnehmendem Vesikelradius immer größer wird und über das Volumen das verfügbare ATP-Reservoir definiert ist, ist es möglich, daß dieser ATP-Vorrat nur in den größeren Zellvesikeln ausreicht, den PS-Translokationsprozeß abzuschließen.

Diese Beobachtung liefert auch eine Erklärung dafür, daß der intensitätsskalierte Flächenquotient $\Sigma I_H/\Sigma I_M$ aus Abb. 5.14.d. nicht mehr gegen den Wert der Kontrollpopulation relaxiert. In den Kontrollpopulation phagozytieren umliegende, aktive Zellen die PS-exponierenden kleinen Zellkörperchen apoptotischer Zellen schneller als die verbleibenden großen Zellüberreste. In den integral geschädigten Zellkulturen findet keinerlei Entsorgung statt. Die verbleibenden kleinen PS-Vesikel mittlerer AV-Intensität erhöhen so den Anteil ΣI_M und führen zu der beobachteten Absenkung des Sättigungsquotienten ($\Sigma I_H/\Sigma I_M$).

5.4.3 Chromatinkondensation und nukleosomale Fragmentierung

Apoptotische Effektoren und ihre Wirkung auf den Zellkern sind Gegenstand intensiver Forschungen. Derzeit differenziert sich das Wissen um die Prozesse weitläufig, und die gewonnen Erkenntnisse sind noch zu frisch, um geschlossen diskutiert werden zu können [Kap. 2.5.].

Auf der Ebene des Zellkerns existiert derzeit kein Ereignis, sei es 'nur' morphologischer Natur oder direkt das Resultat biochemischer Prozesse, welches bei der *Apoptosis* allgemein als grundlegendes Kriterium bewertet werden könnte. Tritt jedoch eines der in Abb. 2.5. beschriebenen Ereignisse auf, so kann dies teilweise als hinreichendes Kriterium oder aber starkes Indiz für einen stattfindenden apoptotischen Prozeß angesehen werden.

Im Verlauf dieses Kapitels sollen zunächst die Kernveränderungen eines apoptotisch 'abgesicherten' Systems besprochen werden, wie sie frisch isolierte Mäuse-Thymozyten darstellen [Härtel *et al.* 1998b]. Zum einen, weil die in den Kernen beobachtbaren Veränderungen modellhaften Charakter haben und zum anderen, weil an diesem System noch einmal die möglichen Probleme flowzytometrischer (FC) Messungen aufgezeigt werden können. Die Kernveränderungen sollen dann mit Beobachtungen bei IPC-81-Zellen aus Kapitel 5.1.2. verglichen werden, die ebenfalls apoptotisch sicher charakterisiert sind.

Die genaue Betrachtung beider Systeme ist notwendig, um im Anschluß beobachtete Veränderungen in den schwierig zu charakterisierenden HCE-Zellen möglichst gesichert interpretieren zu können.

5.4.3.1 Veränderungen der Chromatinstrukturen in apoptotischen Mäuse T-Zellen

In Abb. 5.15. sind die zeitlichen Veränderungen der Chromatinstrukturen und des Chromatingehalts im Verlauf natürlicher Apoptosis an frisch isolierten Mäuse T-Zellen dargestellt (vergl. Kap. A3.3.1./2.).

Im Verlauf der mikroskopischen, bildverarbeitenden Analyse der Chromatinveränderungen kristallisierten sich vier charakteristische Zustände heraus [Abb. 5.15.d.]: ①: Frisch isolierte Zellen. ②: Frühe *Pyknosis* in Verbindung mit peripherer Chromatinkondensation. ③: Späte *Pyknosis* / Frühe *Karyorrhexis*. ④: Späte *Karyorrhexis.*

Die 'räderartigen' Chromatinstrukturen frisch isolierter Zellen (①: zentrale *Nucleoli* und 'speichenartige' Vernetzungen mit einem dünnen Rand) ziehen sich wenige Stunden nach der Isolierung zusammen, die *Nucleoli* verlieren ihre Geschlossenheit und das Chromatin kondensiert peripher zum Kernrand hin (②). Dieser Prozeß endet in völligem Verlust erkennbarer Chromatinstrukturen (③).

Während der letzten erkennbar eintretenden Veränderung (④), gewinnt der *Nucleus* wieder an Struktur, indem das Chromatin auseinanderbricht. Wie durch Gelelektrophorese gezeigt wurde, findet die *Karyorrhexis* in Mäuse T-Zellen in Form von oligosomaler Chromatinfragmentierung statt [Härtel 1996]. Sie ist also in diesem Fall nicht allein ein morphologisches Phänomen, wie es durch Caspase-3 aktiviertes *Acinus* in HeLa-Zellen beobachtet werden kann (vergl. Abb.2.6., Sahara *et al.* 1999).

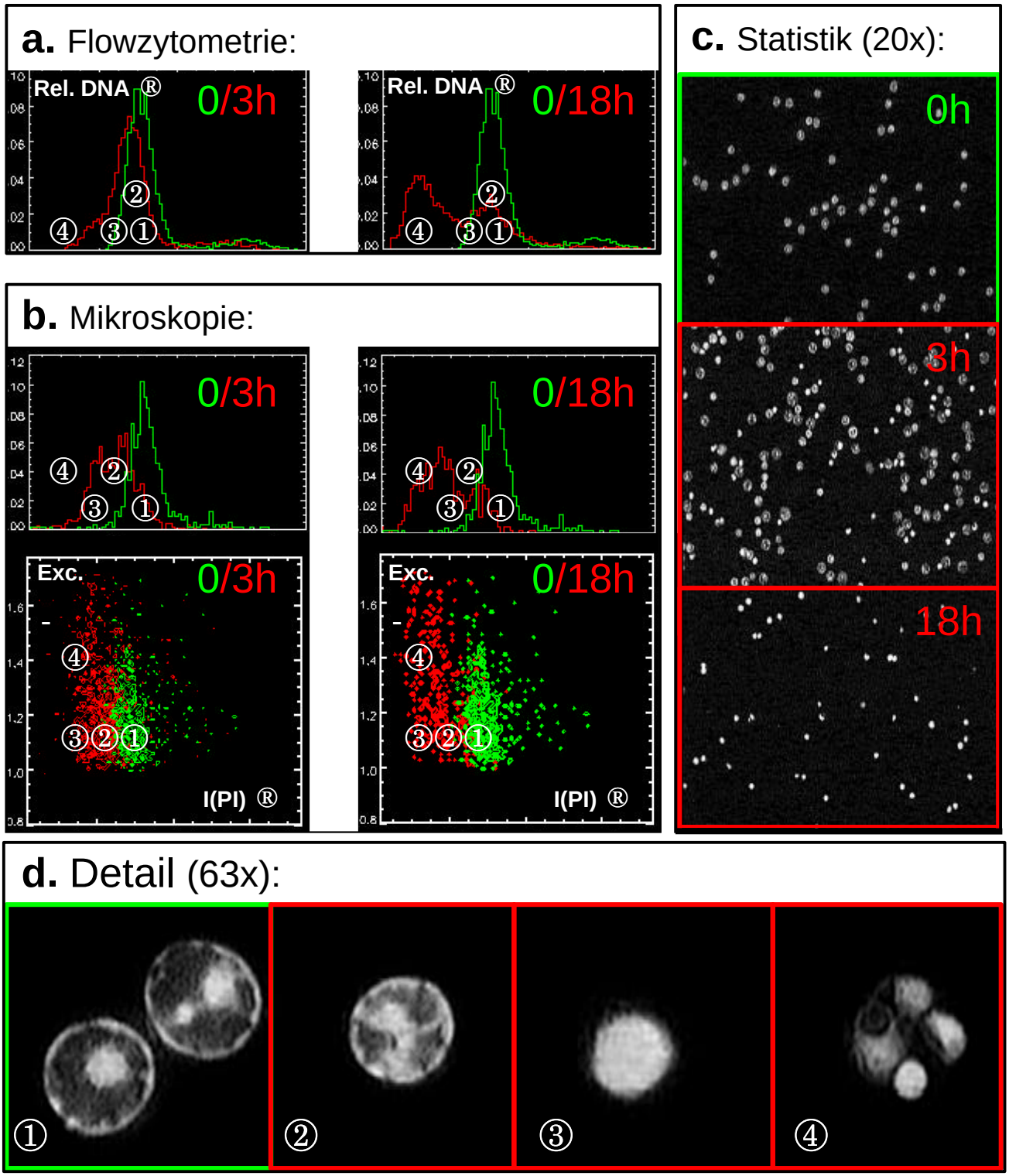


Abb.5.15.: Stufen der Chromatinkondensation im Verlauf natürlicher Apoptosis an frisch isolierten Mäuse-T-Zellen. Zellen wurden bis zu 18 Stunden nach der Isolierung sowohl flowzytometrisch [**a**] als auch mikroskopisch [**b**, **c**, und **d**] untersucht. Abb. a/b zeigen Messungen nach 0h (grün / Kontrolle), nach 3h (rot / links) und nach 18h (rot, rechts). In den Cytogrammen (b, unten) ist der morphologische Parameter Exzentrizität (Y-Achse) und der relative DNA -Gehalt (X-Achse) aufgetragen. FC-Messungen erfolgten mit Acridine Orange (AO). In der Mikroskopie brachten die Fluorophore AO, DAPI und Propidium Iodid (PI) qualitativ vergleichbare Ergebnisse. Die Ausschnitte in c zeigen für b verwendete Fluoreszenzbilder der Zellen nach 0h, 3h und 18h. d zeigt Detailaufnahmen vier charakteristischer Stadien der nuklearen T-Zell-*Apoptosis*: ①: Frisch isolierte Zellen. ②: Frühe *Pyknosis*. ③: Späte *Pyknosis* / Frühe *Karyorrhexis*. ④: Späte *Karyorrhexis.* In a und b ist gekennzeichnet, wo Stadien ① bis ④ in den Auswertungen repräsentiert sind. (Da I_{MAX}(PI) in der Kontrollpopulation gleich dem maximalen Intensitätswert (255) der CCD-Kamera gesetzt wurde, repräsentieren die abgebildeten Histogramme b.3h./18h. für ②/③ einen leicht verminderten relativen DNA-Gehalt der Zellen.)

Vergleich von bildverarbeitender Mikroskopie und Flowzytometrie:

In der FC-Verteilung weicht die 3h-Probe nur leicht von der 0h-Kontrolle ab. Gemeinsam werden die Zustände ①, ② und der Beginn von Zustand ③ bei FC-Messungen [Abb. 5.12.a.] unter dem sogenannten G0/G1-Peak subsummiert und somit als ‘normal‘ charakterisiert (vergl. die allgemein akzeptierte Interpretation in Abb. 5.2.). Zustände ② und ③ sind aber mikroskopisch bereits eindeutig als früh apoptotisch zu bewerten. (Vergl. Abb. 5.15.c. 0/3h und die Quantifizierung in Abb. 5.15.b.).

- **Es kommt zu Beginn apoptotischer Prozesse zu einer klaren Unterbewertung des apoptotischen Anteils von Zellen durch die Flowzytometrie.**

Zu einem späteren Zeitpunkt des Zustandes ③ und im Übergang zwischen den Zuständen ③ und ④ verliert der Nukleus als Ganzes Chromatin (wahrscheinlich in Form von Oligonucleotiden). Erst der späte Zustand ③ und die Kernfragmente ④ werden in der FC-Analyse als apoptotisch wahrgenommen, da sowohl die einzelnen Kernbruchstücke, wie die noch ganzen Kerne, im FC als Einzelsignale aufgefangen werden.

- **Es kommt letztendlich zu einer Überbewertung des apoptotischen Anteils der Zellen im Sub-G0/G1-Peak durch die Flowzytometrie.**

5.4.3.2 Veränderungen der Chromatinstrukturen in apoptotischen IPC-81-Zellen

Wie bei den Mäuse T-Zellen endet auch bei IPC-81-Kulturzellen der apoptotische Prozeß in einer oligonucleosomalen DNA-Fragmentierung (vergl. Abb. 5.2. & 5.16., Kap. A5.1., Zeise 1999). Die Entwicklung der *Apoptosis* gestaltet sich jedoch ein wenig anders, obwohl eine einfache FC-Analyse anhand des relativen DNA-Histogramms zunächst Ähnlichkeiten zu den frisch isolierten T-Zellen aufweist (vergl. Abb. 5.15.a. und 5.16.c.).

Bei beiden Zelltypen schrumpft die ‘normale‘ G0/G1-Population anfänglich ohne Chromatin zu verlieren (s. Größenparameter in Abb.5.16.c.: ① → ②, frühe *Pyknosis*).

IPC-81-Zellen verringern jedoch im Anschluß daran ihren Chromatingehalt sehr deutlich und in relativ kurzer Zeit (Abb.5.16.c.: ② → ③, erste *Karyorrhexis?*). Die Dynamik läßt sich aus der Beobachtung ableiten, daß sich im bivariaten Histogramm zwischen der ‘normalen‘ Population (②) und der von den geschrumpften Zellen ausgebildeten Population (③) kaum Zell-Datenpunkte befinden. In diesem Schritt unterscheiden sich die IPC-81-Zellen von den T-Zellen aus Abb.5.15.. In den Datailaufnahmen 5.16.b1./b2. sind die weiß umrandeten Vertreter der IPC-81-Population ③ dann auch durch sehr geringe PI-Intensitäten charakterisiert, und die T-Zell-Population ③ weist im Gegensatz dazu eine intensivierte Intensitätsdichte auf [Abb.5.15.d.③.]. Erst im Anschluß daran kommt es auch bei einem Teil der IPC-81-Zellen zu einem Auseinanderbrechen der Zellkerne (③→④). Diese spät apoptotischen Bruchstücke haben die gleiche Größe von zellulären Bruchstücken, die auch in normalen Kontrollpopulationen zu finden sind [Abb.5.16.a1./a2. weißer Rand]. Sie besitzen jedoch eine geringere PI-Intensitätsdichte. (Vergleiche dazu die Populationen in den eindimensionalen und dem bivariaten Histogramm in Abb.5.16.c.④.). Detaillierte Chromatinstrukturen sind bei den IPC-81-Zellen im Gegensatz zu den Mäuse T-Zellen kaum zu erkennen. Dies hat wahrscheinlich seinen Grund in der durchgeführten Ethanolfixierung und anschließender Behandlung mit RNAse, wie sie für FC-Messungen vor einer PI-Anfärbung im allgemeinen durchgeführt werden.

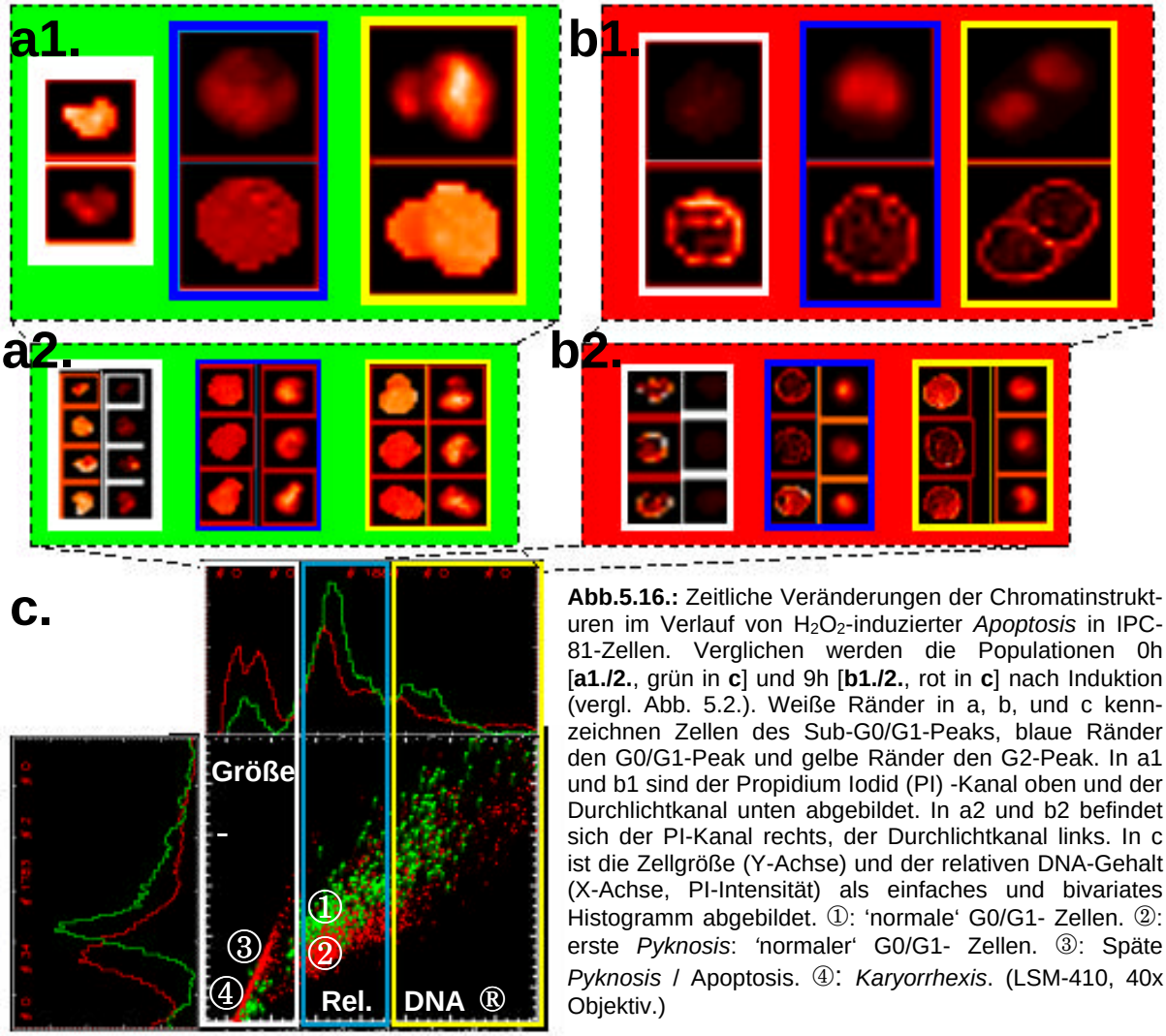


Abb.5.16.: Zeitliche Veränderungen der Chromatinstrukturen im Verlauf von H_2O_2-induzierter *Apoptosis* in IPC-81-Zellen. Verglichen werden die Populationen 0h [**a1./2.**, grün in **c**] und 9h [**b1./2.**, rot in **c**] nach Induktion (vergl. Abb. 5.2.). Weiße Ränder in a, b, und c kennzeichnen Zellen des Sub-G0/G1-Peaks, blaue Ränder den G0/G1-Peak und gelbe Ränder den G2-Peak. In a1 und b1 sind der Propidium Iodid (PI) -Kanal oben und der Durchlichtkanal unten abgebildet. In a2 und b2 befindet sich der PI-Kanal rechts, der Durchlichtkanal links. In c ist die Zellgröße (Y-Achse) und der relativen DNA-Gehalt (X-Achse, PI-Intensität) als einfaches und bivariates Histogramm abgebildet. ①: 'normale' G0/G1- Zellen. ②: erste *Pyknosis*: 'normaler' G0/G1- Zellen. ③: Späte *Pyknosis* / Apoptosis. ④: *Karyorrhexis*. (LSM-410, 40x Objektiv.)

Vergleich von bildverarbeitender Mikroskopie und Flowzytometrie:

Bei der herkömmlichen FC-Analyse zur Bewertung des apoptotischen Zustandes in IPC-81-Zellen kann zwischen den Populationen ① & ② sowie ③ & ④ nicht differenziert werden.

- **Apoptotische Zellbruchstücke (④) führen bei der Flowzytometrie zu einer Überbewertung des apoptotischen Anteils an der Gesamtpopulation.**

Die mikroskopische Analyse identifiziert eine Verminderung der Zellvolumina um etwa ¼ bei einem großen Anteil der H_2O_2-gestressten Zellpopulation (Abb.16.a.① → ②). Diese Beobachtung wirft sofort die Frage auf, ob die bei einer FC-Analyse zu treffende Entscheidung, Population ② den 'gesunden' Zellen zuzuordnen, nicht eine Vereinfachung oder gar eine grobe Mißinterpretation bedeutet. Der mikroskopischen Analyse folgend sind an dieser Stelle weiterführende Untersuchungen anzustellen, die darüber entscheiden, ob es sich bei der Verringerung der Zellvolumina um einen temporären, reversiblen Nebeneffekt des oxidativen H_2O_2-Stresses handelt, oder ob nekrotische oder spät onkotische Zustände induziert werden. Dies sind wichtige Fragen bei der Einschätzung und Interpretation der induzierten Ereignisse.

- **Es existieren 'blinde Flecken' bei der flowzytometrischen Analyse der EL-4-Zellpopulationen, welche zu Fehleinschätzungen der Gesamtsituation führen können.**

5.4.3.3 VERÄNDERUNGEN DER CHROMATINSTRUKTUR IN APOPTOTISCHEN HCE-ZELLEN

Der Mitochondrienpotential-Farbstoff Tetra-Methyl-Rhodamine (TMR) [Scaduto & Grotyohann 1999] und der DNA-Farbstoff SYTO-13® [Poot *et al.* 1997] sind aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften geeignet, parallel '*in vitro*'-Fluoreszenzmessungen des Mitochondrienpotentials und der zellulären Chromatinstruktur nach den in Abb. 4.29 und 5.17. vorgestellten Meßverfahren durchzuführen.

Beide Farbstoffe gelten in den verwendeten Konzentrationen als nicht toxisch. Um eine mögliche Toxizität bei kombinierter Anwendung auszuschließen, wurden Messungen über einen Zeitraum von

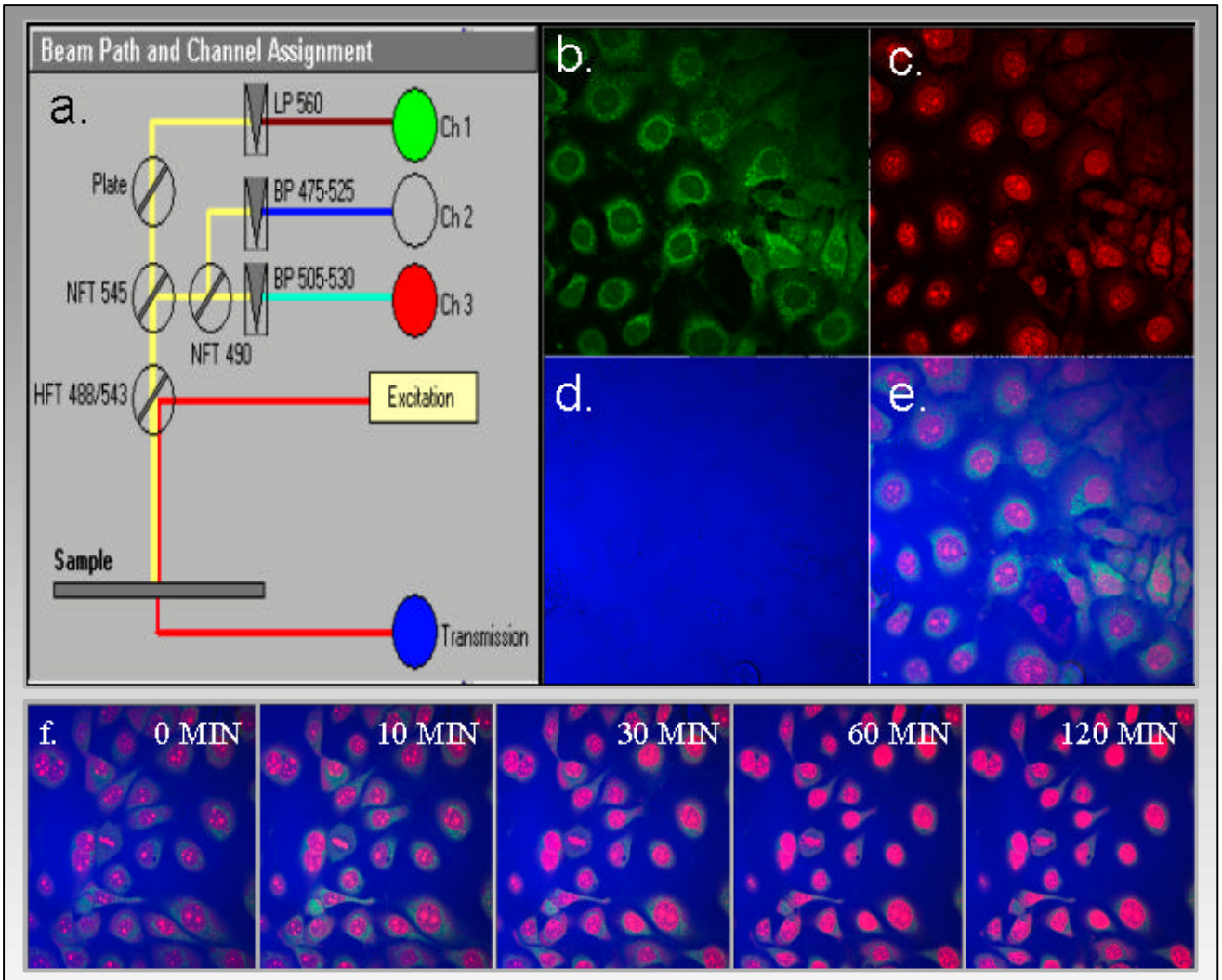


Abb.5.17.: Zeitliche Veränderungen der Chromatinstrukturen von HCE-Zellen nach Induktion mit Staurosporin (5µM).

[**a**]: Strahlengang (ZEISS LSM 510, 63x) Filter und Farbcodierung für die Darstellungen b bis f. [**b**]: HCE-Zellen mit dem Mitochondrienpotential-Farbstoff Tetra-Methyl-Rhodamine (300nM). [**c**]: DNA-Farbstoff SYTO-13 (100nM). [**d**] Transmission/ Durchlichtkanal. [**e**]: Überlagerung aus b, c und d.

[**f**]: Repräsentative Ausschnitte des zeitlichen Verlaufs der strukturellen Chromatinveränderungen bis zu 2h. Die *Nucleoli* normaler HCE-Zellen sind definiert abgerundet. Schon nach kurzer Zeit (10-20min) lösen sich die streng definierten Strukturen unter dem Einfluß von Staurosporin auf. Die *Nucleoli* 'fransen' fadenartig zum Rand hin aus und verteilen sich über den gesamten Nucleus. Die Intensität des SYTO-13-Farbstoffs intensiviert sich im gesamten Zellkern. Nach etwa 1½h sind die Umstrukturierungen abgeschlossen. Vergleiche dazu die Kinetik der PS-Exposition der HCE-Zellen auf der äußeren Zellmembran aus Abb. 5.12..

mehr als 24 Stunden durchgeführt. In Kontrollpopulationen ließen sich keine Veränderungen hinsichtlich der Zellzyklusverteilung, der Zellmobilität oder anderer zellulärer Parameter erkennen.

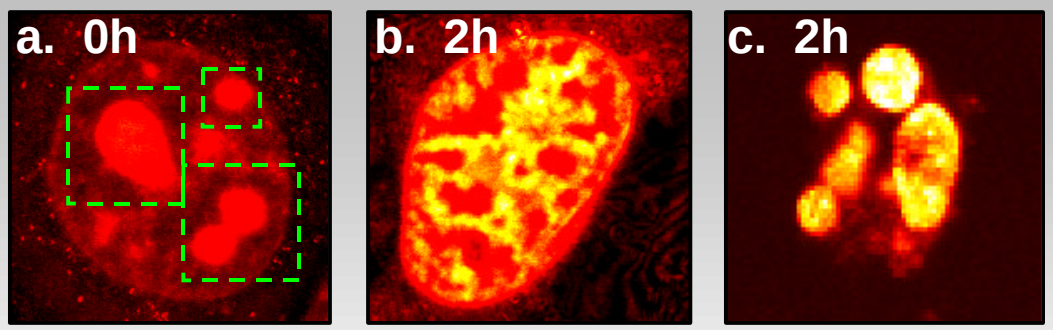


Abb.5.18.: Detail der Chromatinstrukturen von HCE-Zellen. Anfärbung mit dem DNA -Farbstoff SYTO-13 (100nM). (Zeiss LSM 510, 100x: [a] & [b], 40x/Zoom 2,5: [c])

[**a**]: Kontrolle. [**b**] & [**c**]: 2h nach Induktion mit Staurosporin (1µM). Die geschlossenen *Nucleoli* - Struktur in HCE-Kernen (a: grüne Quadrate) lösen sich im Verlauf von nur 1½ h nach *Apoptosis*-Induktion vollständig auf (b: vergl. Abb. 5.17.).

Morphologische Merkmale einer *Karyorrhexis* [c] treten nur äußert selten (<1%) als Folge apoptotischer Prozesse auf (vergl. Abb. 5.19. und Abb. 2.5./6.).

Nach Induktion mit Staurosporin im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 5µM zeigen die Chromatinstrukturen der HCE-Zellen klar ausgeprägte zeitliche Veränderungen. Die Umstrukturierungen beginnen bereits nach etwa 10min und sind nach ca. 1½h vollständig abgeschlossen [Abb. 5.17. und Abb. 5.18]. Danach treten keine weiteren Veränderungen der Kernstrukturen auf.

Die überwiegende Mehrzahl der Veränderungen zeigen Merkmale von peripheren, partiellen Chromatinkondensationen (PPCK, Anteil > 99%, vergl. Abbildungen 5.17/ 18/19. mit 2.5/6.). Morphologische Formen einer *Karyorrhexis* treten in HCE-Zellen sehr selten auf (<1%, s. Abb. 5.18.).

Diese schnellen Chromatinveränderungen warfen zunächst Rätsel auf, da sie bis 1999 nicht beschrieben waren.

Die Einteilungen konnten dann jedoch nach den im Laufe des Jahres erschienenen differenzierten Veröffentlichungen über Chromatinveränderungen erfolgen (s. Kap. 2.5., Susin *et. al.* 1999, Sahara *et al.* 1999, Zamzami & Kroemer 1999, Bedner *et al.* 1999).

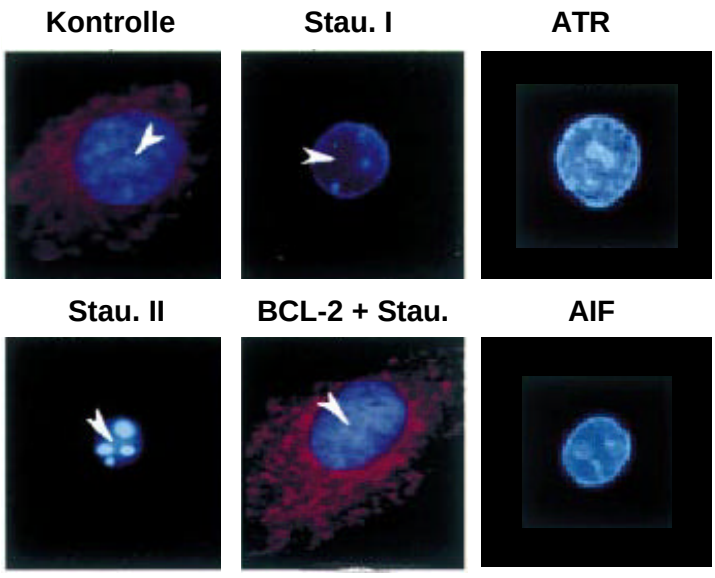


Abb.5.19.: Apoptotische Chromatinkondensation in Ratten-1-Fibroblastzellen induziert durch AIF (*apoptosis-inducing factor*). Behandlung mit 1µM Staurosporin (2h) führt zu peripherer-/partieller Chromatinkondensation (PPCK) [Stau I.] bei 80% und zu *Karyorrhexis* [Stau II.] bei 20% der Zellen. Direkte Zugabe von AIF und des PT (*permeability transition*)-Poren öffnenden ATR (*atractylosid*) induzieren ebenfalls PPCK. BCL-2 verhindert hingegen die Freisetzung von AIF (Bilder aus Susin *et. al.* 1999).

Susin *et. al.* (1999) veröffentlichten Untersuchungen zu Staurosporin-induzierter *Apoptosis* in Ratten-1-Fibroblast (R1F)- und HeLa-Zellen in Verbindung mit den Auswirkungen des AIF (*apoptosis-inducing factor*) auf nukleosomale Veränderungen. In R1F-Zellen fanden sie zwei Formen von Chromatinkondensationen:

1. PPCK in ca. 80% der Zellen (vergl. Abb. 5.18.b. mit Abb. 5.19.Stau.I., ATR und AIF).
2. Morphologische Merkmale einer *Karyorrhexis* in ca. 20% der Zellen (Abb. 5.18.c. mit Abb. 5.19.Stau.II.).

Über die morphologischen Ähnlichkeiten der apoptotischen *Nuclei* von HCE -, R1F- und HeLa-Zellen hinaus sind folgende Merkmale des AIF von Bedeutung (vergl. Kap. 2.4./5.):

- *AIF-Translokationen aus den Mitochondrien in die Zellkerne finden unabhängig von Caspasen und Cytochrom c (Cyt c) statt. Nur der mitochondriale Anti-Apoptosis-Faktor Bcl-2 verhindert die Freisetzung von AIF über die Regulierung der PT-Poren (s. Kap. 2.4.).*
- *AIF wirkt sehr schnell in zellfreien Kernsystemen (1min nach Zugabe).*
- *AIF bewirkt keine DNA-Fragmentierungen in kurzkettige 180bp-Oligonukleotide, sondern sehr grobe Fragmentierungen (>50 kb).*
- *AIF-Injektionen in Zellen bewirken von Caspasen unabhängige PS-Expositionen.*
- *AIF-Injektion induziert den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($D\psi_M$) und die Freisetzung von Cyt c sowie der Procaspasen 2, 3 und 9 aus Mitochondrien.*

Parallel zu den dargestellten mikroskopischen Untersuchungen sind Caspase-3-Aktivitäten und DNA-Fragmentierungen in Staurosporin-induzierten HCE-Zellen bestimmt worden. Die Ergebnisse brachten entscheidende Hinweise für die Interpretation der beobachteten Kernkondensation:

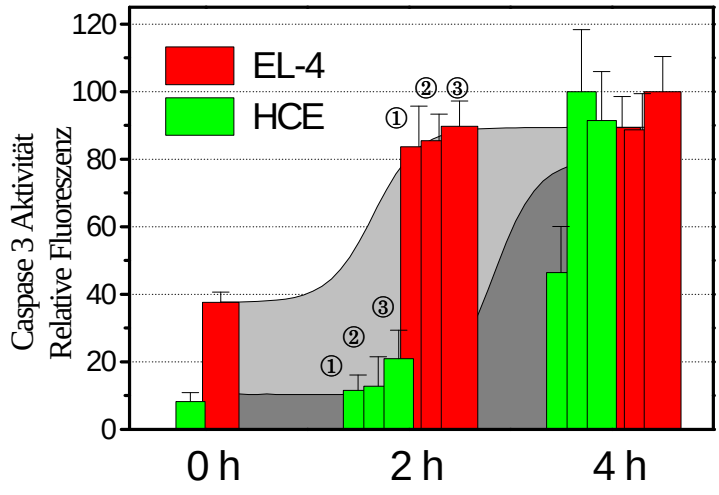


Abb.5.20.: Zeitliche Entwicklung der Caspase-3-Aktivität in EL-4- (rot) und HCE-Zellen (grün). Induktion mit 0.5 (①), 1 (②) und 2µM (③) Staurosporin für EL-4 und 1 (①), 2 (②) und 5µM (③) Staurosporin für HCE-Zellen.

Bei EL-4-Zellen erreicht die Caspase-3-Aktivität nach 2 h bereits ihr Maximum. Bei HCE-Zellen findet ein Anstieg hingegen erst nach 2h statt. Nach 6h findet im Vergleich zu 4h kein weiterer Anstieg der Caspase-3-Aktivitäten statt. Die Messungen wurden durchgeführt von Frau Dr. Michaela Zorn.

- *Die Aktivität von Caspase-3 in HCE-Zellen steigt erst nach 2h signifikant an [Abb. 5.20.]:*

Caspase-3 induzierte Chromatinkondensation (**direkt**, über **Cad** oder **Acinus**) kann somit ausgeschlossen werden.

Cyt c aktiviert mit ATP, Procaspase-9 und Apaf-1 die Caspase-3. Diese bewirkt über die Aktivierung von Cad Chromatinkondensationen und oligonukleosomale 180bp-Fragmentierung (s. Kap. 2.1.5., Li *et al.* 1997). Eine von **Cyt c** induzierte Chromatinkondensation kann ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die lysosomale Protease **Cathepsin B** scheint ebenfalls über die Freisetzung von mitochondrialem Cyt c und der Aktivierung von Caspase-3 zu wirken. Sie ist deshalb primär nicht involviert [Kessel *et al.* 2000]. Auch **L-DNase II**, **DNase I** und **DNase II** scheiden als mögliche Agitatoren aus, da die Charakteristik der Chromatinkondensation in HCE-Zellen eindeutig nicht der einer *Pyknosis* entspricht (vergl. Übersicht in Kap. 2.5., Abb. 5.18.b. und Abb. 5.15.d.③.).

- **Alle bisherigen Erkenntnisse unterstützen die Vermutung, daß die beobachteten Chromatinkondensationen in HCE-Zellen durch AIF induziert werden.**
- **Außer AIF liegen alle anderen derzeit diskutierten Effektoren in mindestens einem Punkt im Widerspruch zu den in HCE-Zellen beobachteten Chromatinkondensationen.**

Susin *et. al.* (1999) erklären den Anteil von 20% an R1F-Zellen mit morphologischen Merkmalen einer *Karyorrhexis* 2h nach der Induktion mit Staurosporin [Abb. 5.19.Stau.II.] mit der AIF-induzierten Freisetzung von Cyt c aus den Mitochondrien. Leider schweigen sich die Autoren darüber aus, ob und in welchem Ausmaß sich die Anteile über 2h hinaus verschieben.

Noch ist ungeklärt, ob sich die verschiedenen Mechanismen die zu Chromatinkondensationen führen komplementär ergänzen, oder ob sie redundant sind. In R1F-Zellen scheint ein über die Mitochondrien rückkoppelnder, cooperativer Prozeß über AIF aktiv zu sein. Bei HCE-Zellen ist dieser Vorgang, wenn überhaupt vorhanden, zu vernachlässigen (< 1%). An dieser Stelle wären Versuche mit apoptotischen Induktoren nötig, die nicht über Inhibierungen von Proteinkinasen wirken, wie Staurosporin.

Es konnte mit Hilfe des Mitochondrienpotential-Farbstoffs TMR leider nicht geklärt werden, ob das Mitochondrienpotential in HCE-Zellen durch Staurosporin, oder später durch AIF beeinflußt wurde.

5.4.3.4 Quantifizierung der Chromatinkondensation in apoptotischen HCE-Zellen

Gesunde HCE-*Nuclei*, mit SYTO-13® markiert, können mit dem Auge recht leicht von apoptotischen Zellkernen unterschieden werden (s. Abb. 5.17. & 5.18.). Für die automatisierte Quantifizierung mit Hilfe der Bildverarbeitung ist es jedoch nicht einfach, leicht zugängliche Parameter zu finden.

Die Größenverteilung und auch die Formverteilung gesunder HCE-Populationen und ihrer *Nuclei* sind in sich schon sehr heterogen (s. Abb. 5.17.). Wie in Abb. 5.21. zu sehen ist, unterscheiden sich die Größenverteilungen der *Nuclei* gesunder und apoptotischer HCE-Populationen nicht signifikant voneinander. Die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen aus den

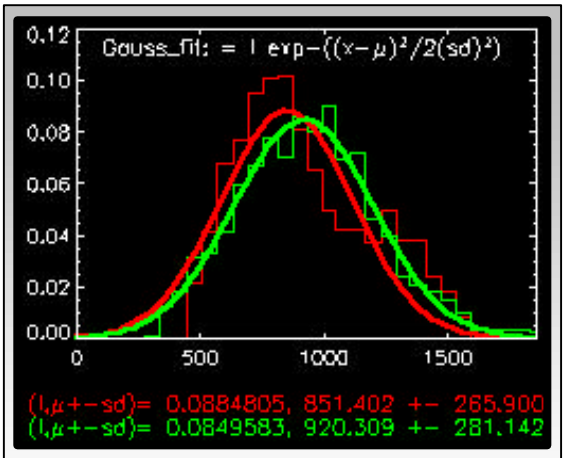


Abb.5.21.: Flächennormierte Histogramme der Größenverteilungen von normalen (grün) und apoptotischen (rot) HCE-Zellkernen [N ~ 200, Bedingungen entsprechen Abb. 5.17.f.].

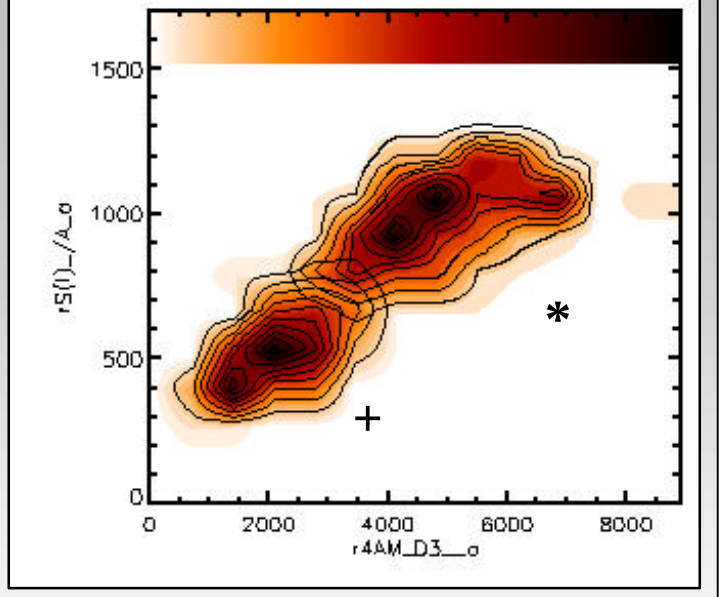


Abb.5.22.: Normierte Dichteverteilung gesunder (+) und apoptotischer (*) *Nuclei* zweier HCE-Zellpopulation [N ~ 200, Bedingungen entsprechen Abb. 5.17.f.].

Die X-Achse (r4AM_D3__a) repräsentiert das nach 3-31. errechnete Haralicksche Texturmaß '2nd Angular-Moment' mit dem Verschiebungsradius r = 4 und der Intensitätsdichte D25.

Die Y-Achse (rS(I)_/A_a) repräsentiert die nach 3-34. errechnete flächennormierte 'Entropie' der Kerne.

angepaßten Gauss-Verteilungen ergaben 920 ± 281 Pixel für gesunde und 851 ± 265 Pixel für apoptotischen Kerne. Auch die Formparameter aus Tab. 3.1. helfen an dieser Stelle nicht weiter.

Die Haralickschen Texturmaße [Kap. 3.5.6.] sind für Veränderungen der fluoreszenzmarkierten Chromatinstruktur allerdings sensitiv genug, um eine gesunde Population eindeutig von einer apoptotischen zu trennen.

Abb. 5.22. zeigt, daß schon mit zwei Texturmaßen eine recht eindeutige Trennung der *Nuclei*-Populationen erreicht werden kann.

Die ansteigende Entropiedichte (3-34., y-Achse) trägt der Beobachtung Rechnung, daß apoptotische *Nuclei* erhöhte Fluoreszenzintensitäten aufweisen (vergl. Abb. 5.17. mit Abb. 5.18.).

Der Grund dafür könnte in einer erhöhten Bindungsaffinität des Farbstoffs SYTO-13® an die durch AIF destrukturierten und gespaltenen Chromatinfäden liegen.

Die Entropiedichte trennt die gesunde und die apoptotische *Nuclei*-Population zu C_X = 74% ($C_{X,Y,Z}$, 'Diskriminative Kapazitäten' nach 3-36.). Mit dem Parameter 'r4AM_D3__a', dem '*2nd Angular-Moment*' aus 3-31. (Verschiebungsradius r4 = 4 und der Intensitätsdichte D_{25}), ergibt C_{XY} bereits 85 %. Mit dem Parameter 'r4µ_D3/A_a', der flächennormierten Inversen-Momenten-Differenz (3-32.), beträgt die dreidimensionale Statistik: C_{XYZ} > 96% (vergl. Kap. 5.2.1.).

- **Apoptotische HCE-Populationen sind mit Hilfe weniger Haralickscher Texturparameter eindeutig klassifizierbar und somit auch automatisiert quantifizierbar.**

5.4.4 Vergleich der Kinetik der apoptotischen Prozesse in HCE- und EL-4-Zellen

Abschließend sollen alle beobachteten apoptotischen Kintetiken in EL-4-und HCE-Zellen zusammenfassend gegenübergestellt werden.

Außer den biochemischen Parametern PS-Translokation [Kap. 5.4.2.], Chromatin-Kondensation und-Fragmentierung sowie der Caspase-3-Aktivität [Kap. 5.4.3.3.] werden die Migrationsfähigkeiten der Zellen und die Abspaltung von Zellvesikeln als sehr frühes Kennzeichen der Apoptosis diskutiert.

5.4.4.1 Chromatinkondensation, Aktivierung der Caspasen und Initiierung der Phosphatidylserin-Translokation

Eine der spannenden Fragen der apoptotischen Kaskaden betrifft die Initiierung der PS-Translokation von der inneren auf die äußere Zellmembranhälfte [Kap. 2.6. & Kap. 5.4.2.]. Vermutet wird einerseits, daß die PS-Translokation eines der ersten Zeichen für die Aktivität von Caspasen ist [Van Engeland *et al.* 1998]. Andererseits wurde von Susin *et. al* (1999) gezeigt, daß der '*Apoptosis* induzierende Faktor' AIF die PS-Translokationen auch dann initiiert, wenn Caspasen-Inhibitoren in Zellen wirksam sind.

- In EL-4-Zellen brachten parallele Bestimmungen der PS-Kintik und der Caspase-3-Aktivität keine zusätzliche Information [Abb. 5.13. & Abb. 5.20.]. Die Caspase-3-Aktivität in EL-4-Zellen hat nach 2h bereits ihren maximalen Wert erreicht; die Kinetik der PS-Translokation schließt eine Aktivierung durch Caspase-3 in diesem Falle nicht aus.

- Anders ist die Situation bei HCE-Zellen [Abb. 5.12./14. & Abb.5.20.]. Hier steigt die Caspase-3-Aktivität erst nach 2h an [Abb.5.20.] ! Die PS-Translokation hat zu diesem Zeitpunkt bereits begonnen [Abb. 5.14.d.]. Es muß demnach von einem anderen Aktivator ausgegangen werden.

Alle Anzeichen sprechen dafür, daß AIF in HCE-Zellen Chromatinkondensationen auslöst [Kap. 5.4.3.3.]. Diese Kondensationen sind bereits abgeschlossen, wenn PS-Translokationen einsetzen. AIF könnte demnach durchaus der gesuchte PS-Initiator in HCE-Zellen sein.

Allerdings setzen erste Merkmale der Chromatinkondensation bereits 10 - 20min nach Zugabe von Staurosporin ein. AIF muß zu diesem Zeitpunkt bereits von den Mitochondrien in den Zellkern translokiert sein und könnte bereits ebenfalls erste PS-Expositionen initiieren. Dies würde bedeuten, daß von Beginn der Initiierung bis zu ersten Anzeichen von PS auf der äußeren Membranhälfte etwa 90min vergehen.

Durch AIF-Mikroinjektionen in Zellen induzierten Susin *et al.* (1999) PS-Expositionen in RF1-Zellen. Auch sie inkubierten Zellen nach AIF-Injektionen für 90min unter Kulturbedingungen, bevor PS mit Annexin V-FITC detektiert wurde. Es ist möglich, daß ein retardierender Mechanismus die PS-Translokation so lange aufhält, bis die Chromatinkondensation weitgehend abgeschlossen ist.

Bis 1998 wurden Chromatinkondensationen in der überwiegenden Mehrzahl aller Veröffentlichungen zur Kinetik der *Apoptosis* ans Ende der apoptotischen Kaskaden gestellt (s. Kap. 2.5.). Dieses Bild muß nun eindeutig revidiert werden. In Abb. 2.5. sind neben AIF eine Reihe von Effektoren präsentiert, denen eine schnelle, direkte Wirkungen auf Chromatinstrukturen nachgewiesen wurde. Auch in EL-4-Zellen sind erste DNA-Fragmentierungen zeitgleich mit einsetzender PS-Exposition beobachtet worden [Jessel *et al.* 2000].

Eine möglichst schnelle Degradierung des zellulären Chromatins macht Sinn, wenn man den apoptotischen Mechanismus als Schutz vor Virus-bedingten Infektionen diskutiert [Wyllie 1998]. Es scheint plausibel, daß eine von Viren befallene Wirtszelle ihren gesamten zellulären DNA / RNA-Gehalt vernichtet, bevor ein Makrophage oder eine Nachbarzelle durch PS das Signal zur Phagozythose bekommt. Eine mögliche Übertragung von Virus-Sequenzen auf die Entsorger-Zellen wird so verläßlich unterbunden.

Vor diesem Hintergrund scheint die Chromatinkondensation in HCE-Zellen zeitlich geradezu perfekt auf die beginnende PS-Exposition abgestimmt zu sein (vergl. Abb. 5.14.d. & Abb. 5.17.f.).

Es sollte noch betont werden, daß allein wegen der zeitlich nach 2h angesiedelten Caspase-3-Aktivität in HCE-Zellen natürlich nicht definitiv geschlossen werden kann, daß Caspasen allgemein nicht bei der Initiierung der PS-Translokation beteiligt sind. Auch Procaspasen können schließlich rezeptorspezifisch binden und aktivierend wirken. Beispielsweise bindet Procaspase-8 an CD95 (Fas/Apo1)-Rezeptoren als Folge von T-Zell-Aktivierung und auto-aktiviert sich selbst [Ashkenazi & Dixit 1998]. Mikroinjektionen der mitochondrialen Procaspasen-2, -3 und -9 in Zellen könnten hier in Zukunft Aufschluß bringen.

5.4.4.2 Frühe Kennzeichen der *Apoptosis:* Migrationsfähigkeit und Abspaltung von Zellvesikeln

Bislang wurde die PS-Exposition als frühstes Kennzeichen der *Apoptosis* in EL-4-Zellen gehandelt [Jessel *et al.* 2000]. Verfolgt man die migratorischen Bewegungen von Zellen unter optimalen Kulturbedingungen mit dem Mikroskop (Sequenzen von 1 – 2 Bilder min^{-1}, s. Abb.4.29.) so erkennt man, daß EL-4-Zellen in mit einer Geschwindigkeit von bis zu mehreren Zelldurchmessern (∅ ~ 10µm) pro Minute migrieren (s. Abb. 5.23.a./b.). Nur zur Durchführung der Zell-Teilung beiben sie stehen, runden ab und führen die Teilung durch (M-Phase, 1 – 3min).

Schon wenige Minuten nach der Zugabe von Staurosporin (0.5, 1 und 2 µM) werden Migrationen weitgehend unterdrückt, die Zellen ‘fransen’ etwas aus und schnüren eine Vielzahl von kleinen und mittelgroßen Vesikeln ab [Abb. 5.23.c.-f.]. Größere Vesikel enthalten dabei Teile des cytomotorischen Skeletts. Sie wandern, wie die Mutterzellen, nunmehr sehr langsam auf ihren Wachstumsflächen umher und es sind noch schnelle (< min), intrinsische Verformungen der Membranoberflächen erkennbar. Diese werden allem Anschein nach von unkoordinierten Bewegungen der cytoplasmatischen Aktin-Myosinfilamente verursacht. Die morphologischen, statischen Veränderungen stehen hier im Einklang mit Beschreibungen von apoptotischen HL-60-Zellen von Bedner *et al.* (1999), die allerdings erst nach 4h erfolgten.

Zwischen 30 min und etwa 6h nach der Induktion von *Apoptosis*, der Zeitspanne der PS-Translokation in EL-4-Zellen, treten keine weiteren charakteristischen Veränderungen der morphologischen oder motorischen Parameter auf (vergl. Abb. 5.13.). Die Zellen degradieren weiter und die Wanderbewegungen kommen zu einem völligen Stillstand [Abb. 5.23.c.-f.].

- **Die schnellen, eindeutigen, morphologisch-motorischen Alterationen stehen im klaren Widerspruch zu Veröffentlichungen, die PS-Expositionen zeitlich vor morphologischen Veränderungen ansiedeln [Martin *et al.* 1995, Van Engeland *et al.* 1998].**

Auch Alterationen des Cytoskeletts werden nach PS-Translokationen diskutiert [Van Engeland *et al.* 1996]. Es ist bekannt, daß Laminastrukturen der Zellkerne im Verlauf der *Apoptosis* aktiv gespalten werden [Neamati *et al.* 1995] und daß Caspasen für diese Proteasen-Aktivität verantwortlich sind [Lazebnik *et al.* 1995]. Auch Mitglieder aus der Intermediären-Filament-Familie, wie das Cytokeratin werden angegriffen [Tinnemans *et al.* 1995]. Die aktive Degradierung von Lamin wird dabei sogar kausal in einen Zusammenhang mit Chromatinkondensationen gestellt [Lazebnik *et al.* 1995].

Für HCE-Zellen konnte gezeigt werden, daß erste Chromatinkondensationen bereits nach wenigen Minuten eintreten und abgeschlossen sind, bevor PS-Translokationen einsetzen [Kap. 5.4.4.1.]. Auch für EL-4-Zellen sind oligonucleosomale DNA-Fragmente zeitgleich mit PS-Translokationen beobachtet worden [Jessel *et al.* 2000].

Vor diesem Hintergrund sollte es nicht verwundern, wenn zu diesem sehr frühen Zeitpunkt auch die zellmotorischen Aktin-Myosinfilamente angegriffen werden.

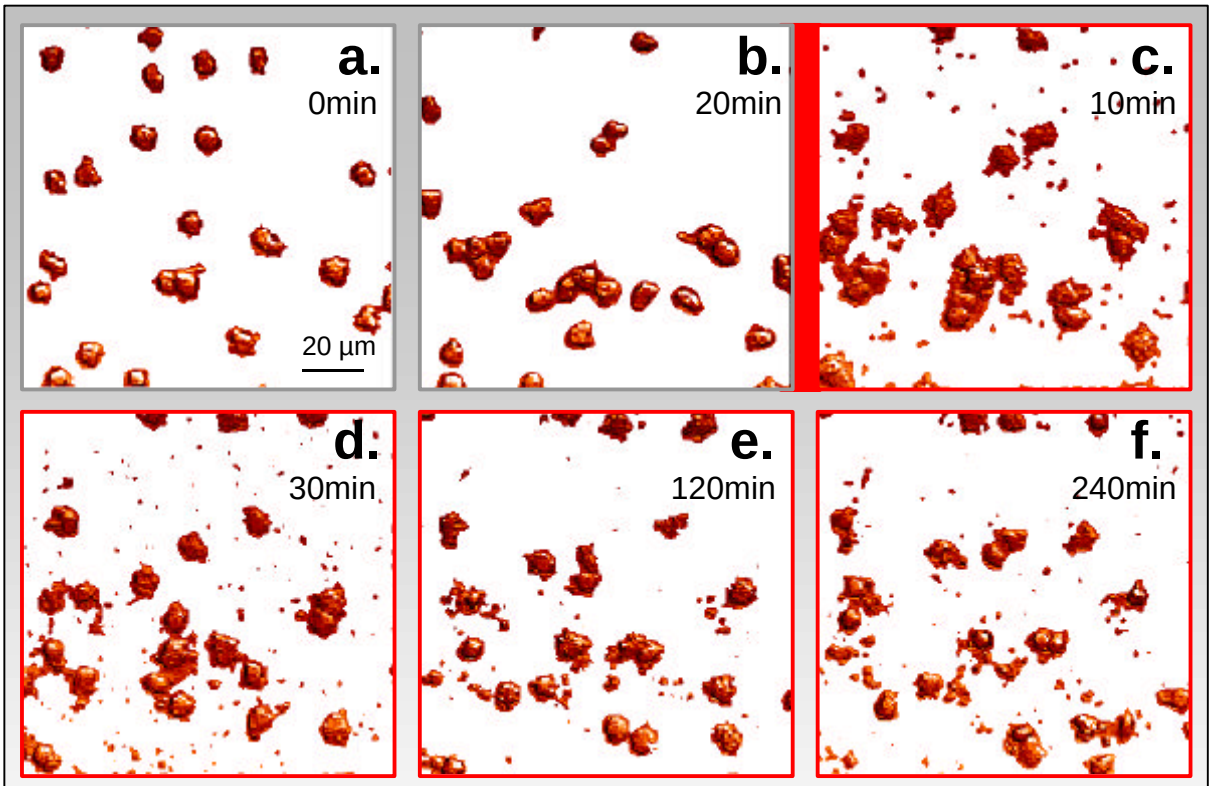


Abb.5.23.: Kinetik Staurosporin induzierter *Apoptosis* in El-4-Zellen (0,5µM). Repräsentative Ausschnitte aus Bildern einer Messung unter Kulturbedingung (20x, Zeiss LSM-410, s. Abb. 4.29.).

[**a**]: Zustand der Zellen zu Beginn des Experimentes [**b**]: 20min nach Beginn des Experimentes erfolgte die Zugabe von Staurosporin. [**c/d/e/f**]: 10/ 30/ 120/ 240 min nach Zugabe von Staurosporin.

EL-4 – Zellen bewegen sich unter Kulturbedingungen in einer Minute um Distanzen, die in etwa ihrem Durchmesser entsprechen [a & b]. Staurosporin inhibiert laterale Bewegungen bereits wenige Minuten nach Zugabe fast vollständig [c]. Desweiteren induziert Staurosporin massive Abschnürungen von Membranvesikeln von kleiner bis mittlerer Größe [c - f]. Diese Vesikel besitzten teilweise migratorische Fähigkeiten. Sie verändern ihre Morphologie wie die 'Mutterzellen' noch bis zu 6h nach Induktion [f].

Eine weitere mögliche Erklärung für die frühen zellmotorischen Störungen bieten Messungen, die vor kurzem von Bernd Säume an EL-4-Zellen mit Staurosporin durchgeführt wurden (unveröffentlichte Daten). Innerhalb von Minuten zeigten sich starke Schwankungen einiger cytoplasmatischer Ionenkonzentrationen (darunter Ca^{2+}) und des intrazellulären pH-Wertes. Ca^{2+} ist ein wichtiger Intermediator bei der ATP-regulierten Kontraktion des Aktin-Myosin Systems [De Duve 1984]. Hier ist ein direkter Zusammenhang mit der Zellmotorik möglich.

Auch bei HCE-Zellen werden Zellmigrationen durch Staurosporin inhibiert. Da sich die adherenten Corneazellen aber *per se* sicht so schnell bewegen, wie EL-4-Zellen, fällt die Störung der

Migrationsfähigkeit nicht so stark auf. Pertubationen der äußeren Zellembran sind bei HCE-Zellen ebenso zu beobachten wie bei EL-4. Wegen der geringen Pigmentierung der Zellen, sind diese allerdings ohne Fluorophore nicht zu erkennen.

Es wird klar, daß an dieser Stelle weiterführende, kinetisch detailliertere und abgestimmte Messungen der apoptotischen Prozesse nötig sein werden, um die aufgeworfenen Fragen befriedigend zu beantworten.

- **Die neuen Erkenntnisse über die fast instantanen Störungen der Zellmotorik, der Zellmorphologie, der Ionenkonzentrationen, der Chromatinkondensation sowie der Abspaltungen von motorisch autarken Vesikeln innerhalb von Minuten, öffnen ein neues Zeitfenster bei der Interpretation nekrobiologischer Prozesse.**

- **Für Untersuchungen derart schneller Prozesse ist das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte kombinierte System aus Bildverarbeitung und Video- (Fluoreszenz-) Mikroskopie an Zellen unter Kulturbedingung bestens geeignet. Nicht nur der individuelle Charakter jeder einzelnen Zelle wird anhand eines großen Parameterraums zeitlich verfolgt. Die individuellen Vorgänge lassen sich in direkter Verbindung mit dem Verhalten der gesamten Population detektieren und auswerten.**

6. KAPITEL:

ZUSAMMENFASSUNG

Die nekrobiologische Forschung konzentriert sich derzeit auf Formen des physiologischen Zelltods. Dazu gehören die *Necrosis*, die *Apoptosis* und die *Oncosis*. Insbesondere die *Apoptosis* zeichnet sich hierbei durch genetisch determinierte Prozesse aus. Dieser Form eines regulierten Zelltods kommt heute der gleiche Stellenwert zu, wie den bereits etablierten Phänomenen der Zellbiologie: Der *Mitosis*, der *Meiosis* und der zellulären Differenzierung. Neben der physiologischen Relevanz sind nekrobiologische Prozesse für die Entwicklung zukünftiger Strategien in der Pathologie von Bedeutung. Darunter insbesondere in der Krebsforschung, der Immunologie, der Neurologie und in der Virologie. Pathologisch relevante Fehlfunktionen auf molekulargenetischer Ebene nicht nur zu erkennen, sondern auch zu beheben, setzt unweigerlich das vollständige Verständnis der involvierten Mechanismen voraus.

Derzeit werden neue methodische Ansätze benötigt die es erlauben, strukturelle, kinetische und dynamische Prozesse in einzelnen Zellen vor dem Hintergrund der Situation einer ganzen Zellpopulation bewerten zu können. Es ist daher ein Ziel dieser Arbeit, einen solchen Zugang mit Hilfe eines nicht-invasiven Meßsystems für Zellkulturen zu schaffen. Dazu müssen zuerst die vielfältigen, komplexen morphologischen, motorischen und biochemischen Merkmale auf zellulärer Ebene verläßlich quantifiziert werden. In einem so geschaffenen hochdimensionalen Merkmalsraum müssen dann auch neue interpretatorische Wege eingeschlagen werden. Das Gesamtsystem besteht aus konventionellen fluoreszenzmikroskopischen Einheiten, aus einem selbstentwickelten Mehrkammer-Objektträger und aus einer konzipierten und geschriebenen bild- und datenverarbeitenden Software.

- In dem Mehrkammer-Objektträger können parallel bis zu acht getrennte Zellpopulationen über Tage hinweg unter optimalen Kulturbedingungen beobachtet werden. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskope (LSM) erlauben die Aufnahme von Video-Sequenzen in Durchlicht- und mehreren Fluoreszenzkanälen.
- Das entwickelte Programmpaket verarbeitet Bild- und Dateninformationen. Es enthält:
    1. Eine Bibliothek an Algorithmen für interaktive automatisierte optimale Segmentierung von Objekten auf mehreren Ebenen (Zellkluster, Zellen und Substrukturen).
    2. Eine Bibliothek für die Extraktion morphologischer Parameter aus segmentierten Objekten [z.B. Invariante Momente].
    3. Eine Bibliothek für die Extraktion texturbezogener Parameter aus segmentierten Objekten [z.B. Haralicksche Texturmaße].
    4. Auswertungsroutinen für den hochdimensionalen Multi-Parameter-Raum mit Hilfe gewichteter Hauptachsentransformationen.

Ein Schlüsselkriterium für den Erfolg des Gesamtkonzepts basiert auf einer verläßlichen automatisierten Segmentierung von Zellen in Durchlichtbildern: Dazu wurden Gütekriterien entwickelt und zwei Ansätze an unterschiedlichen Modell- und Zellsystemen untersucht:

1. Das erste Konzept, die *Skalierungs-Index-Methode*, bewertet die Umgebung eines jeden Bildpunktes als Maß für dessen Komplexität. Dieses Konzept ist von recht universellem Charakter.
2. Ein alternatives Konzept behandelt das Bild zunächst als stochastischen Prozeß. Die kausalen Zusammenhänge zwischen den Grauwerten eines jeden einzelnen Pixels und denen seiner Umgebung werden bewertet. Durch die freie Formulierung von *Cliquen-Potentialen* lassen sich mit Hilfe der Gibbs-Verteilung jedem Pixel einer Region eine Wahrscheinlichkeitsdichte zuordnen.

- Beide Ansätze lieferten sehr gute Segmentierungsergebnisse ohne einen signifikanten Unterschied. Die formale Äquivalenz der Konzepte konnte aufgezeigt werden.

Ein weiteres Schlüsselkriterium für den Erfolg des Gesamtsystems beruht auf verläßlichen quantitativen zellulären Fluoreszenzmessungen. Dazu wurde das entwickelte *Quantitative-Fluoreszenz-Mikroskop* (QFM) mit der etablierten Methode, der Flowzytometrie (FC), verglichen. Parallele Messungen an jeweils zwei verschiedenen mikroskopischen Systemen und Flowzytometern sowie zwei unterschiedlichen Zellsystemen zu unterschiedlichen Fragestellungen ergaben übereinstimmend:

- Beide Methoden sind für quantitative Messungen von relativen zellulären Fluoreszenzintensitäten von vergleichbarer Güte.

Als besondere Vorteile der QFM bei Messungen in Zellkulturen erwiesen sich:

- Messungen konnten praktisch störungsfrei unter Kulturbedingungen durchgeführt werden. Zeitliche Entwicklungen der Strukturen einzelner Zellen, deren Kinetik und Dynamik, konnten zeitgleich zu Entwicklungen in Gesamtpopulationen verfolgt werden.
- Morphologische und texturbasierte Zellparameter konnten Fluoreszenzparameter ersetzen und damit den Einsatz von Fluorophoren überflüssig machen. Mit Hilfe des entwickelten Multi-Parameter-Ansatzes wurden die separativen Kapazitäten der Flowzytometrie von der QFM noch übertroffen.
- In adherenten Kulturzellen wurden apoptotische Merkmale erstmals statistisch erfaßt.

Die methodisch abgesicherte QFM wurde eingesetzt, um nach einem geeigneten Fluorophor für die Bestimmung des Membranparameters *Fluidität* an ganzen Zellen zu suchen. Darüber hinaus wurden Struktur, Kinetik und Dynamik nekrobiologischer Prozesse unter besonderer Berücksichtigung früher biochemischer Merkmale der *Apoptosis* untersucht.

A. Membrandynamik und Fluoreszenz

Zellmembranen vereinigen strukturelle, kinetische und dynamische Eigenschaften. Das gegenwärtig diskutierte Modell beschreibt die Membran als einen sehr heterogenen Komplex. Lateral wie transversal zur Membranoberfläche wird Mikrostrukturen mit hochspezialisierten Funktionen eine immer größere Bedeutung zugesprochen. Der Einfluß der Lipiddynamik und des Phasenverhaltens lokaler Mikrostrukturen auf die vielfältigen Funktionen der Membran bleibt dabei noch weitgehend ungeklärt. Da Mikrostrukturen bislang nicht in Form von definierten Modellsystemen zur Verfügung stehen, müssen zu Untersuchungen intakte Zellmembranen herangezogen werden.

Die Fluoreszenzspektroskopie hat bis heute viel zum Verständnis von Membraneigenschaften beigetragen. Mit dieser Methode sind lokal aufgelöste Parameter in Membranen jedoch nicht direkt zugänglich. Eine Alternative, die Membranfluidität an lebenden Zellen lokal bestimmen zu können, bietet die Fluoreszenzmikroskopie, im besonderen die konfokale LSM. Für sie werden neue Fluorophore mit speziell definierten Eigenschaften benötigt. Im besonderen sind Photostabilität, hohe Quantenausbeute, definierte Lipophilie und toxische Aspekte zu berücksichtigen. Bislang ist kein Fluorophor beschrieben, der sich durch die genannten Eigenschaften auszeichnet und dazu sensitiv dynamische Informationen aus Lipidmembranen detektiert. Um einen geeigneten Fluorophor zu finden, wurden folgende Membransonden mit Fluoreszenzeigenschaften im sichtbaren Bereich ausgewählt: Nile Red, DilC_{18}, DilC_{16}, DilC_{12}, FAST-DilC_{18}, FM 4-64 und DCVJ. Eine Kalibrierung der grundlegenden dynamikrelevanten Fluoreszenzeigenschaften erfolgte spektrometrisch an definiert fluiden Eigelb-Liposomen. Dabei wurde die Lipiddynamik definiert mit Hilfe der Temperatur und des Cholesteringehalt reguliert. Die spektrometrisch charakterisierten, UV-sensitiven Membransonden DPH, TMA-DPH, Carboxyl-DPH und Laurdan dienten bei diesen Messungen als Referenz. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Die Referenzsonden der DPH-Familie und Laurdan zeigten in Eigelb-Liposomen das erwartete dynamiksensitive Verhalten. FM 4-64 und DCVJ wiesen in Abhängigkeit der Lipiddynamik keine nutzbringenden Veränderungen ihrer Spektraleigenschaften auf. Das Maximum des Emissionsspektrums von Nile Red zeigte mit zunehmendem Cholesteringehalt eine deutliche Verschiebung zu kleineren Wellenlängen.
- Bei DiIC_N-Sonden konnte eine ausgeprägte, charakteristische Veränderung des Emissionsspektrums in Abhängigkeit der Lipiddynamik aufgezeigt werden.
  - Die dafür verantwortlichen molekularen Wechselwirkungsprozesse finden mit einiger Sicherheit während der Lebensdauer des angeregten Zustands des Moleküls statt. Über die Natur dieser Wechselwirkung wurden Arbeitshypothesen für noch andauernde Untersuchungen aufgestellt.
  - In Analogie zu Laurdan eignete sich der Parameter ‘generalisierte Polarisation‘ zur Quantifizierung der beobachteten Spektralveränderungen.
  - Die absoluten Veränderungen der generalisierten Polarisation der DiI-Derivate folgten DiIC_{18} > DiIC_{16} > FAST-DiIC_{18} > DiIC_{12}.

Für die Interpretation fluorimetrischer Messungen an ganzen Zellen unter Kulturbedingungen ist die Verteilung der Sonden zwischen einzelnen Zellen und in den Zellkompartimenten entscheidend. Auch dieser Frage wurde nachgegangen. Grundlegende Untersuchungen der Membranfluorophore in EL-4-Zellen unter Kulturbedingung mit Hilfe der Ein-Photonen-LSM ergaben:

- Anreicherungen von Fluorophoren in toten Zellen und in Zellagglomerationen können die Intensitäten gesunder Zellen um ein Mehrfaches übertreffen. Der Einsatz selektiver Bildverarbeitungsroutinen bei fluoreszenzmikroskopischen Versuchen ist daher notwendig. Der Einsatz spektrometrischer, integraler Methoden wird prinzipiell in Frage gestellt.
- Für UV-sensitive Membranfluorophore ist die Ein-Photonen-LSM nur bedingt geeignet. In Zukunft müssen dynamiksensitive Fluoreszenzkonzepte mit Membransonden im sichtbaren Spektralbereich in Kombination mit Bildverarbeitungsroutinen verwendet werden.

B. Nekrobiologische Prozesse

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit behandelt aktuelle Fragen der Nekrobiologie. Dabei stehen folgende apoptotische Charakteristiken im Vordergrund: Chromatinkondensationen, die Aktivierung von

latenten Todesproteinen, den Caspasen, die Exposition des Membranlipids Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran, die Abspaltung apoptotischer Körperchen und zellmotorische Bewegungen.

Derzeit werden eine Reihe apoptotisch induzierter Ereignisse auf der Ebene des Zellkerns diskutiert. Zum einen morphologische Merkmale wie *Pyknosis, Karyorrhexis* und periphere Chromatinkondensationen. Zum anderen biochemische Merkmale wie die Fragmentierung der DNA in grobe (>60kbp) oder kleine Oligonucleotidsequenzen (~200bp). Kernveränderungen galten bislang als späte apoptotische Charakteristiken. Frühe Strukturveränderungen des Chromatins konnten mit Hilfe bildverarbeitender Fluoreszenzmikrokopie in frisch isolierten Mäusethymozyten, einer Ratten-Leukämie-Zellinie (IPC-81) und einer menschlichen epithelialen Cornea Zellinie (HCE) identifiziert werden.

- Die bislang verwendete Standardmethode, die Flowzytometrie, konnte Veränderungen dieser Art nicht detektieren. Die bildverarbeitende Fluoreszenzmikrokopie zeigte, daß Signale später apoptotischer Chromatinveränderungen, die in der Flowzytometrie bislang als apoptotische Zellen quantifiziert wurden, sowohl ganze Zellen als auch Zellbruchstücke repräsentieren.
- In HCE-Zellen konnten Chromatinveränderungen bereits 10min nach Induktion mit Staurosporin, einem Inhibitor von Proteinkinasen, detektiert werden. Die Aktivität von Caspase-3 steigt in HCE-Zellen erst nach 2h an. Daher muß von einer Caspase-3 unabhängigen Signalkette ausgegangen werden. Alle Indizien sprechen für den jüngst entdeckten mitochondrialen *Apoptosis Induzierenden Faktor* (AIF). Eine derart schnelle Vernichtung des zellulären DNA-Gehalts ist besonders als Schutzmechanismus gegen Virus-Infektionen sinnvoll.

Folgende Punkte wurden hinsichtlich der Translokation von PS auf die äußere Zellmembran in HCE-Zellen und einer Lymphoma-Zellinie (EL-4) untersucht und diskutiert:

- Wodurch wird die PS-Translokation initiiert? Gegenwärtig diskutiert werden in diesem Zusammenhang aktivierte Caspasen. In HCE-Zellen konnte im Gegensatz zu EL-4-Zellen ausgeschlossen werden, daß die PS-Translokation durch aktivierte Caspase-3 ausgelöst wird. Aufgrund der zeitlichen Dynamik der beobachteten Prozesse könnte AIF der gesuchte Initiator sein.
- Ist die PS-Translokation ein aktiv-proteingetriebener oder ein passiv-diffusiver Prozeß? Besonders in HCE-Zellen ist die PS-Translokation zeitlich eng definiert. Einmal initiiert, ist der Prozeß in Einzelzellen nach weniger als einer halben Stunde abgeschlossen. Diese Zeitskala spricht eindeutig gegen diffusive Prozesse.

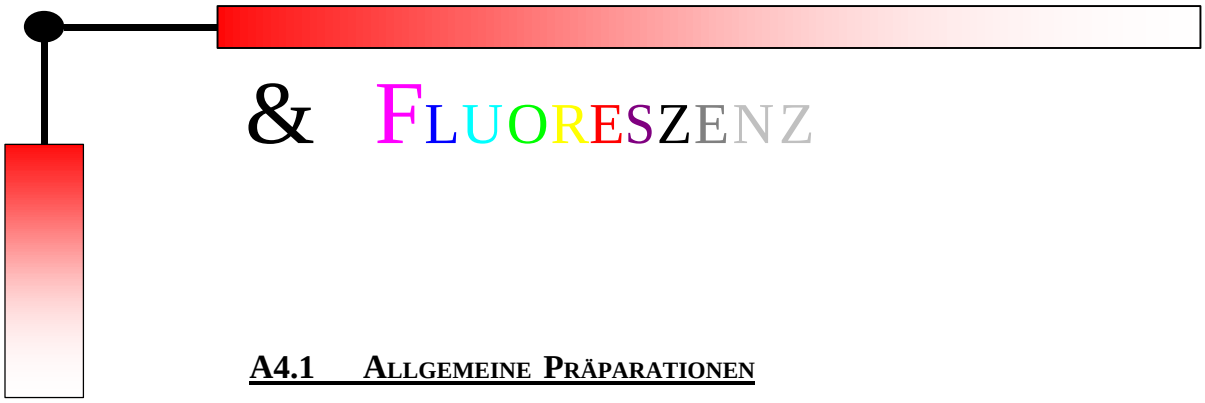
Frühe apoptotische Merkmale sind nicht nur von prinzipiellem Interesse. Sie sind besonders für diagnostische Zwecke wichtig. Bereits erwähnt wurden schnelle DNA-Veränderungen in HCE-Zellen.

- In EL-4-Zellen wurden zellmotorische Störungen und die Abspaltung von motorisch autarken Zellvesikeln innerhalb weniger Minuten nach Staurosporininduktion beobachtet. Die Ereignisse traten in beiden Zellkulturen deutlich vor PS-Translokationen oder aktivierter Caspase-3 auf. Die in der Literatur noch immer als ‘frühes‘ Ereignis beschriebene PS-Exposition wird in diesem Zusammenhang in Zukunft als späteres Ereignis bezeichnet werden müssen.

Die in dieser und anderen wissenschaftlichen Arbeiten bereits erzielten Ergebnisse mit dem hier entwickelten bildverarbeitenden mikroskopischen Meßsystem, lassen die Möglichkeiten zukünftiger Anwendungen erkennen. Überall, wo lokale und statistische Entwicklungen beurteilt werden müssen, kommt der Vorteil des Konzepts zum Tragen. Das Spektrum der Anwendungen reicht von biophysikalischer Grundlagenforschung an dynamiksensitiven Membransonden bis zu medizinischer Diagnostik.

7. KAPITEL: A4. ANHANG ZU KAPITEL 4

MEMBRANDYNAMIK & FLUORESZENZ



A4.1 ALLGEMEINE PRÄPARATIONEN

A4.1.1 LIPOSOMENPRÄPARATION

Reagenzien:

1. Phosphatidylcholine (Sigma Nr.P-967R1) oder anderes Lipid. (bei -20°C unter Stickstoff lagern)
2. Cholesterin (MW 386.7) von Sigma
3. 0,1M Tris-Puffer pH 7,4 (12,11g TRIZMA BASE (Tris[hydroxymethyl]aminomethane) / l H_2O, mit $HCl_{konz.}$ einstellen)
4. Ethanol, Dichlormethan/Methanol 2:1 oder Mischung je nach Löslichkeit des Lipids.

Es werden Lipid (MW~750) und Cholesterin in den gewünschten Verhältnissen in einen birnenförmigen Schliffkolben (25ml) eingewogen.

Danach wird mit 5 ml des Lösungsmittels (4) eine 10E-2M Lösung erzeugt. Im Wasserbad bei 30°C wird dann im Rotationsverdampfer unter Vakuum (im Falle von reinem Lösungsmittel) oder einem Stickstoffstrom (Vermeidung des vorzeitigen Auskochens einer Lösungsmittelkomponente) das Lösungsmittel vorsichtig wieder abgezogen, so daß sich eine möglichst gleichmäßige Lipidschicht an der Kolbenwand absetzt.

Das Kölbchen wird über Nacht bei 50°C in einem Vakuumtrockenschrank untergebracht, am nächsten Morgen mit Stickstoff belüftet, um anschließend mit 5 ml Tris-Puffer (R2) das Lipidgemisch von der Kolbenwand durch vortexen zu lösen.

Um nun kleine unilamellare Lipidvesikel (SUV) zu erhalten, wird die Präparation in einem Schnappdeckelgläschen bei etwa 55°C im Wasserbad unter Stickstoffbegasung der Oberfläche ultrabeschallt (15 min, Power 70%, Cycle 30%, 'Ultraschall-Desintegrator Sonopuls HD70 mit Titan-Sonotrode MS72, Fa. Bandelin).

Durch eine abschließende Ultrazentrifugation (1h bei RT und 105000g) werden nicht eingebaute Lipide, Cholesterin und Schmutzteilchen der Titanspitze als Pellet von der nun fertigen Liposomen-suspension getrennt. Der gereinigte Überstand wird entnommen, bei 4°C unter Stickstoff gelagert und innerhalb einer Woche verwendet.

Während des gesamten Herstellungsverfahren ist Sauerstoffzufuhr möglichst zu vermeiden, da die Gefahr von Lipidoxidation besteht. Die Größe der nach diesem Herstellungsverfahren gewonnen Liposomen wurde von H.C.Klockmann mittels quasielastischer Lichtstreuung auf einen mittleren ∅ von 77.2 nm ermittelt.

A4.1.2 Lipidbestimmung mit dem Stewart-Essay

Reagenzien:
R1) Ammoniumferrothiocyanat-Lösung:
0.1 M Fe(3)Cl 6 H_2O (27.03 g/l) und 0.1 M NH_4SCN (30.4 g/l) auf 1 l mit Aq_{dest} auffüllen.
R2) Lipidstammlösung für die Eichreihe:
0.1mg/ml des zu bestimmenden Phospholipids in Dichlormethan durch 30s vortexen lösen.

Für die Eichreihe (Dreifachbestimmung) werden 0 bis 1ml R2) in geeigneten Abständen mit Dichlormethan aufgefüllt und mit 2ml der Ammoniumferrothiocyanat-Lösung versehen sowie 30s gevortext, um dann 5min bei 300g eine Phasentrennung zu erreichen.
Die untere Phase enthält die sich gebildeten Komplexe aus Phospholipiden und R1). Sie wird abgesaugt (Pasteur-Pipetten) und die optische Dichte bei 485nm bestimmt. Über eine lineare Regression wird dann die Eichgerade (mg des betr. Phospholipids als Funktion der optischen Dichte) berechnet.

Zur Bestimmung des Phospholipidgehaltes der Liposomenpräparation werden 40µl mit 2ml Dichlormethan aufgefüllt und 30s gevortext. Die Lipide werden so aus dem Tris-Puffer extrahiert und befinden sich nach der Phasentrennung (kurz anzentrifugieren) in der unteren Phase.

Aus dieser wird nun 1ml entnommen und mit 1ml Dichlormethan und 2ml R1) aufgefüllt. Nach 30s Vortexen und 5min Zentrifugieren (3000upm) wird die untere Phase vorsichtig abgesaugt (s.o.) und die opt. Dichte bei 485nm bestimmt. Der Lipidgehalt in mg/ml wird dann aus der Eichregression errechnet.

Die Komplexbildung zwischen Phospholipid und R1) ist kopfgruppenabhängig. Die Messungen müssen deshalb für jedes Lipid spezifisch durchgeführt werden. Glycerinkopfgruppen hemmen die Komplexbildung besonders stark und sind deshalb zur Bestimmung nicht geeignet. Nichtorganische Phosphate interferieren nicht als Komplexbildner.

Wegen der hohen Flüchtigkeit von Dichlormethan ist schnell zu pipettieren.

A4.1.3 BESTIMMUNG DES LIPOSOMALEN CHOLESTERINANTEILS

Nach einer Lipidextraktion der Liposomenproben in Chloroform/Methanol [2:1] wurden Phospholipide vom Cholesterinanteil durch Dünnschichtchromatographie getrennt. Phospholipide wurden bei 200°C verbrannt und das isolierte Phosphor calorimetrisch nach Vaskowsky & Kostetsky (1968) bestimmt.

Die Quantifizierung des Cholesterins erfolgte durch Gaschromatographie mit folgenden Parametern: Säule: 15m*250µm*0,1µm DB-5cb, Injektionstemperatur: 275°C, Detektortemperatur (FID): 275°C, Trägergasdruck (He): 0,8 bar, Split-Verhältnis: 1:10, Temperaturprogramm: 200°C isotherm: 3min / 200-275°C: 6°C/min, 275°C isotherm: 1,5min / Gesamtdauer: 17 min..

Die Bestimmungen des resultierenden Lipid- und des Cholesterinanteils in den präparierten Liposomen wurden von Frau Dr. Svitlana Tichanova durchgeführt.

A4.1.4 PRÄPARATION DER LIPOSOMEN MIT MEMBRANFLUOROPHOREN FÜR SPEKTROMETRISCHE MESSUNGEN

- Die zur Bestimmung der Liposomenfluidität eingesetzten Fluorophore:

DPH '*(1,6,-diphenyl-1,3,5-hexatrine)'*,
TMA-DPH '*(1-(4-triethylammoniumphenyl)-6-diphenyl-1,3,5-hexatrine r-toluenesulfonate))'*,
Carboxyl-DPH '*4-((6,-diphenyl)-1,3,5-hexatrienyl) benzoic acid'*,
Laurdan '*(6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene)'*,
Nile Red, **DilC$_N$** '*(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate)*',
FM 4-64^{Ò} *'(N-(3-triethylammoniumpropyl) -4-(4-(dibutylamino)styryl) pyridinium dibromide)'*
und **DCVJ** *'(4-(dicyanovinyl)julolidine)'*.
wurden in DMSO als 10^{-3} bis $0{,}5\cdot10^{-4}$M Stammlösungen angesetzt.

- Liposomen mit variierendem Cholesteringehalt wurde nach A.4.1.1. hergestellt.
- Der Lipidgehalt wurde nach A.4.1.2. quantifiziert.
- Der Cholesteringehalt wurde nach A.4.1.3. quantifiziert. [A: 0%, B: 29%,C: 49%,D: 65%,E: 100% (mol[Chol.]/mol[PC]) · 100].

Für die fluoreszenzspektrometrischen Messungen wurden Liposomensuspensionen im 5ml Glaskölbchen gegeben und mit 0,1M Tris-Puffer (pH 7,4) zu einer Lipidkonzentration von 0,01mg Lipid/ml aufgefüllt (Ausnahme FM4-64: 0,025mg/ml).

Für die Fluorophore **DPH, TMA-DPH**, und **Carboxyl-DPH** betrug die Fluorophorkonzentration:

	$1{,}6 \cdot 10^{-7}$M	(16µl ($0{,}5\cdot10^{-4}$M) Stammlösung in 5 ml),
Laurdan:	$1{,}28 \cdot 10^{-6}$M	(6,4µl (10^{-3}M) Stammlösung in 5 ml),
Nile Red:	$3{,}2 \cdot 10^{-7}$M	(16µl (10^{-4}M) Stammlösung in 5 ml),
DilC$_N$ und **DCVJ:**	$1{,}92 \cdot 10^{-6}$M	(9,6µl ($0{,}5\cdot10^{-4}$M) Stammlösung in 5 ml),
FM 4-64^{Ò}**:**	$3{,}2 \cdot 10^{-6}$M	(16µl (10^{-3}M) Stammlösung in 5 ml).

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Proben in quadratische Quarzküvetten von 1cm^2 Grundfläche gefüllt und die Absorptions- und Emissionsspektren bei den angegebenen Temperaturen [10,15,20,...,50°C] mit einem Perkin Elmer Spektrofluorimeter bestimmt.

A4.1.5 Präparation von EL-4-Zellen mit Membranfluorophoren für mikroskopische Messungen unter Kulturbedingungen

- EL-4: '*Lymphoma Lymphoblast*' Mäusezelle. European Collection of Cell Cultures. EL-4-Zellen wurden in DMEM-Medium 10% FCS (v/v), 100U/ml Penicillin, und 100µg/ml Streptomycin bei einer Dichte von $1/(2) \times 10^5$ Zellen/ml in 5% CO_2 Atmosphäre bei 37°C gehalten. Alle 48/(72) h erfolgte eine Umsetzung der Zellen.

- Für Messungen der Zellen unter Kulturbedingungen wurden zwischen 200µl und 800µl Medium mit $70/(35) \times 10^5$ EL-4-Zellen / ml in speziell für mikroskopische Untersuchungen geeignete Zellkammern umgesetzt. Die Zellen in den Zellkammern wurden 24/(48)h in Inkubatoren gehalten und danach direkt in die beheizte und begaste mikroskopische Objektkammerträger gesetzt [Abb.4.29.].

- Die in A.4.1.4. aufgeführten Membranfluorophore wurden in den angegebenen Konzentrationen direkt in die Zellkammern gegeben

A4.2 SPEKTREN DER MEMBRANFLUOROPHORE

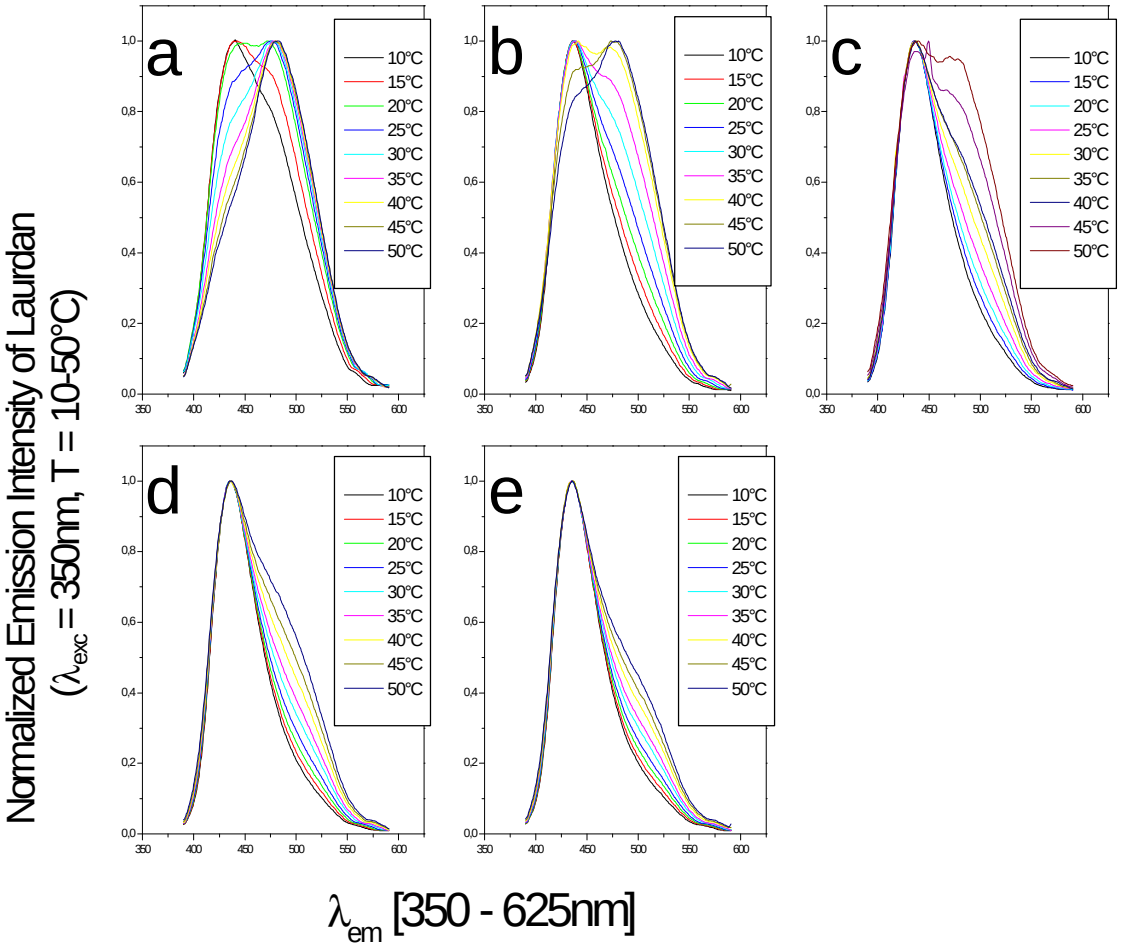


Abb.A4.1.: Normalisierte Emissionsspektren des lipophilen Fluorophors Laurdan in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Der Cholesteringehalt betrug in den Liposomengruppen a: 0%, b: 29%, c: 49%, d: 65%, e: 100% (mol(Ch.)/mol(PC)*100]. Die Emissionsspektren sind jeweils in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur von 10 bis 50°C aufgetragen. Die Emissionsspektren verändern die Lage ihrer Maxima sowohl in Abhängigkeit der Temperatur als auch in Abhängigkeit des Cholesteringehalts der Lipidmatrix. Bei höherer Rigidität der Matrix (geringe Temperatur / hoher Cholesterinanteil) verlagern sich die Maxima dabei zu kleineren Emissionswellenlängen.

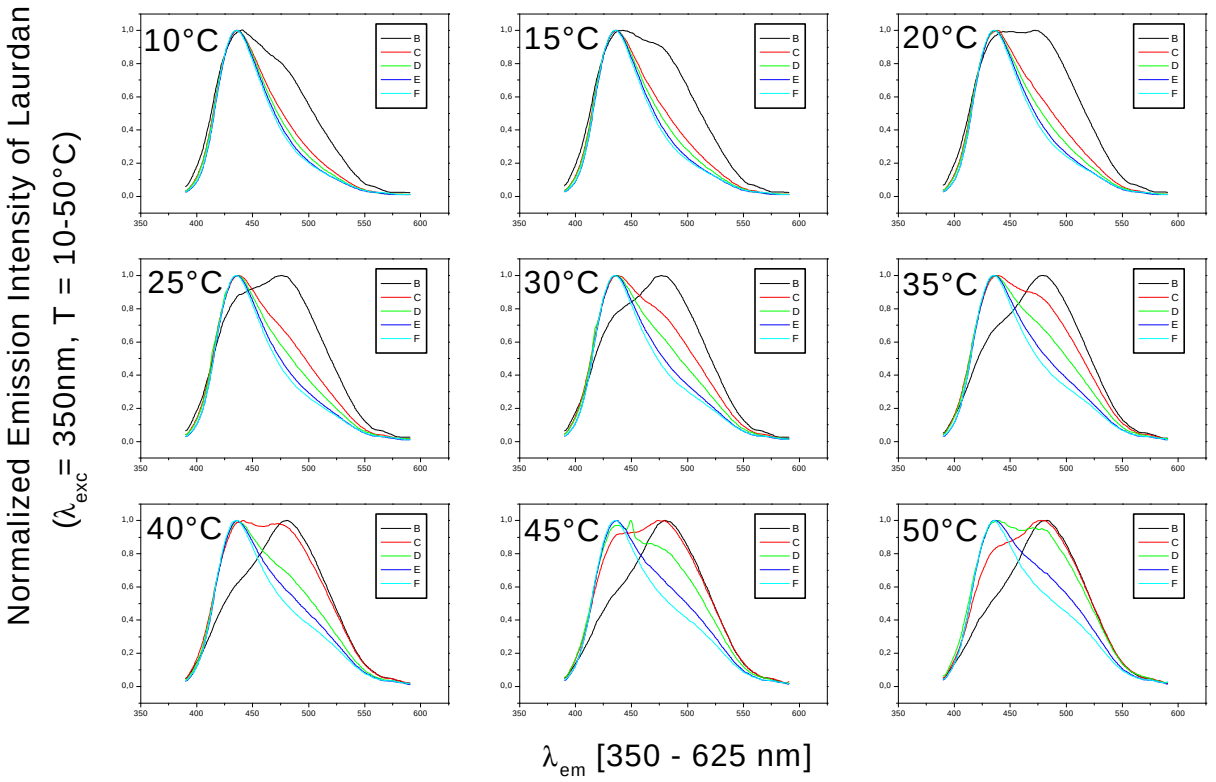


Abb.A4.2.: Normalisierte Emissionsspektren des lipophilen Fluorophors Laurdan in Liposomen (0,01mg Lipid/ml) mit verschiedenem Cholesteringehalt (ansteigende Cholesterinkonzentrationen farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau). Die Emissionsspektren verändern die Lage ihrer Maxima sowohl in Abhängigkeit der Temperatur als auch in Abhängigkeit des Cholesteringehalts der Lipidmatrix.

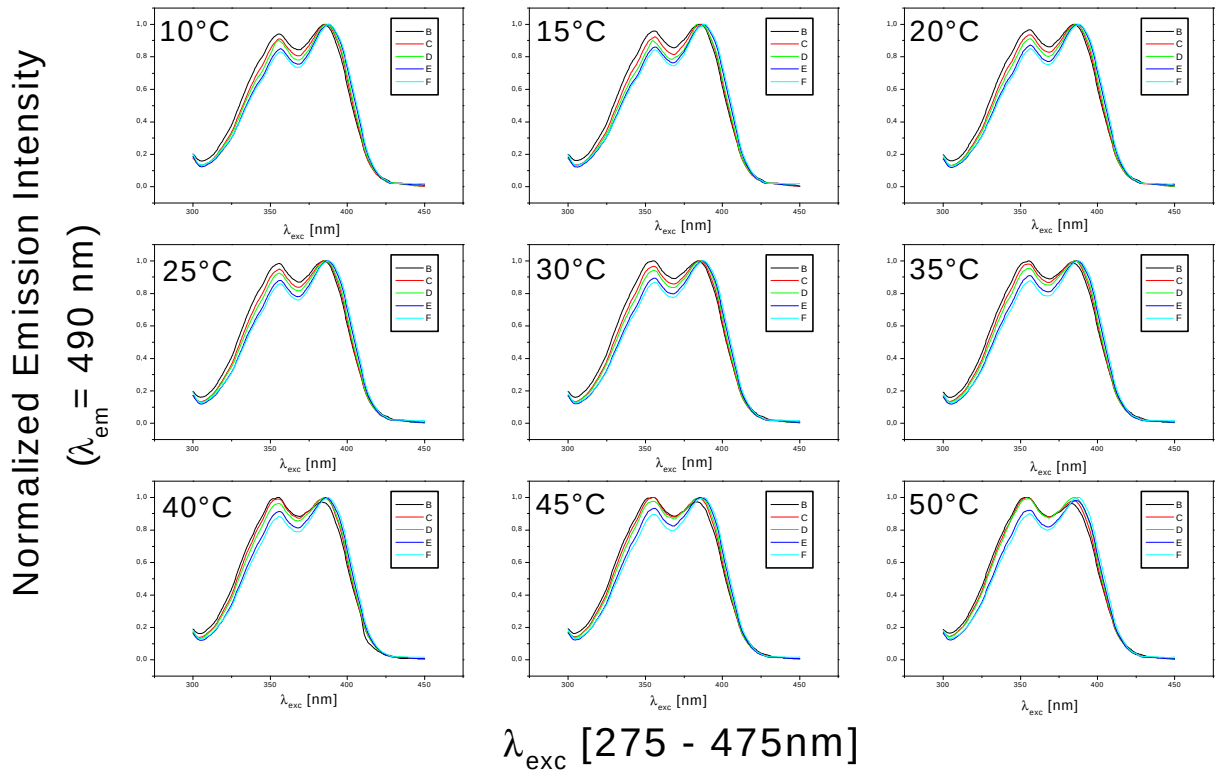


Abb.A4.3.: Normalisierte Exzitationsspektren des lipophilen Fluorophors Laurdan in Liposomen (0,01mg Lipid/ml) mit verschiedenem Cholesteringehalt (ansteigende Cholesterinkonzentrationen sind farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau]. Die Exzitationsspektren verändern die Lage ihrer Maxima sowohl in Abhängigkeit der Temperatur als auch in Abhängigkeit des Cholesteringehalts der Lipidmatrix. Bei höherer Rigidität der Matrix (geringe Temperatur / hoher Cholesterinanteil) verlagern sich die Maxima dabei zu größeren Exzitationswellenlängen.

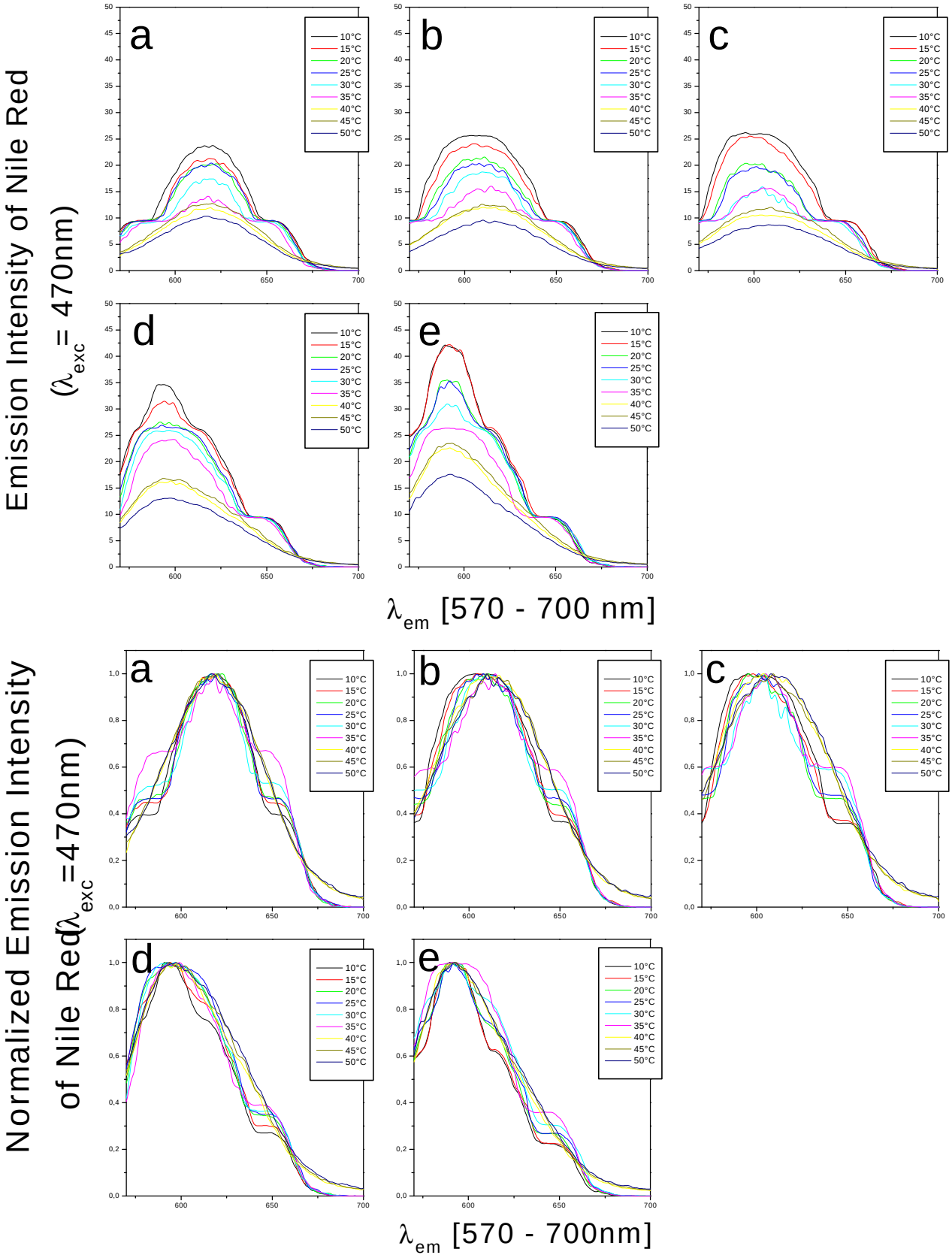


Abb.A4.4.: Emissionsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Emissionsspektren (untere Gruppe) des lipophilen Fluorophors Nile Red in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Der Cholesteringehalt betrug in den Liposomengruppen a: 0%, b: 29%, c: 49%, d: 65%, e: 100% (mol(Ch.)/mol(PC)*100]. Die Emissionsspektren sind jeweils in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur von 10 bis 50°C aufgetragen. Mit steigender Temperatur verringern die Emissionsspektren deutlich ihre Intensität. Auch die Lage der Emissionsmaxima ist geringfügig von der Temperatur abhängig.

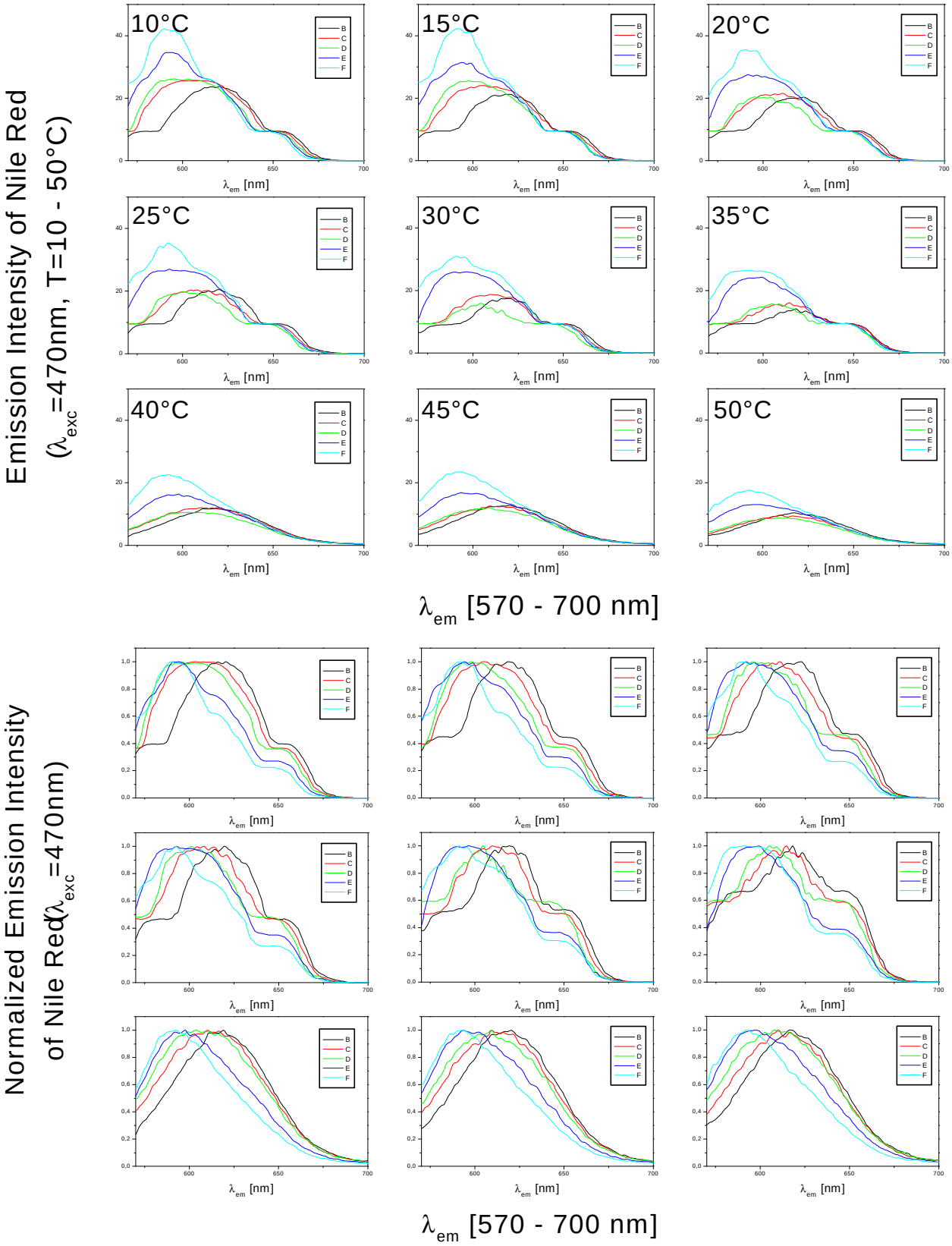


Abb.A4.5.: Emissionsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Emissionsspektren (untere Gruppe) des lipophilen Fluorophors Nile Red in Liposomen (0,01mg Lipid/ml) mit variierendem Cholesteringehalt (ansteigende Cholesterinkonzentrationen farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau). Mit steigendem Cholesteringehalt erhöhen sich die Intensitätsmaxima. Auch die Lage der Intensitätsmaxima ist deutlich von dem Cholesteringehalt abhängig. Es verschiebt sich mit zunehmendem Cholesterinanteil zu kleineren Wellenlängen.

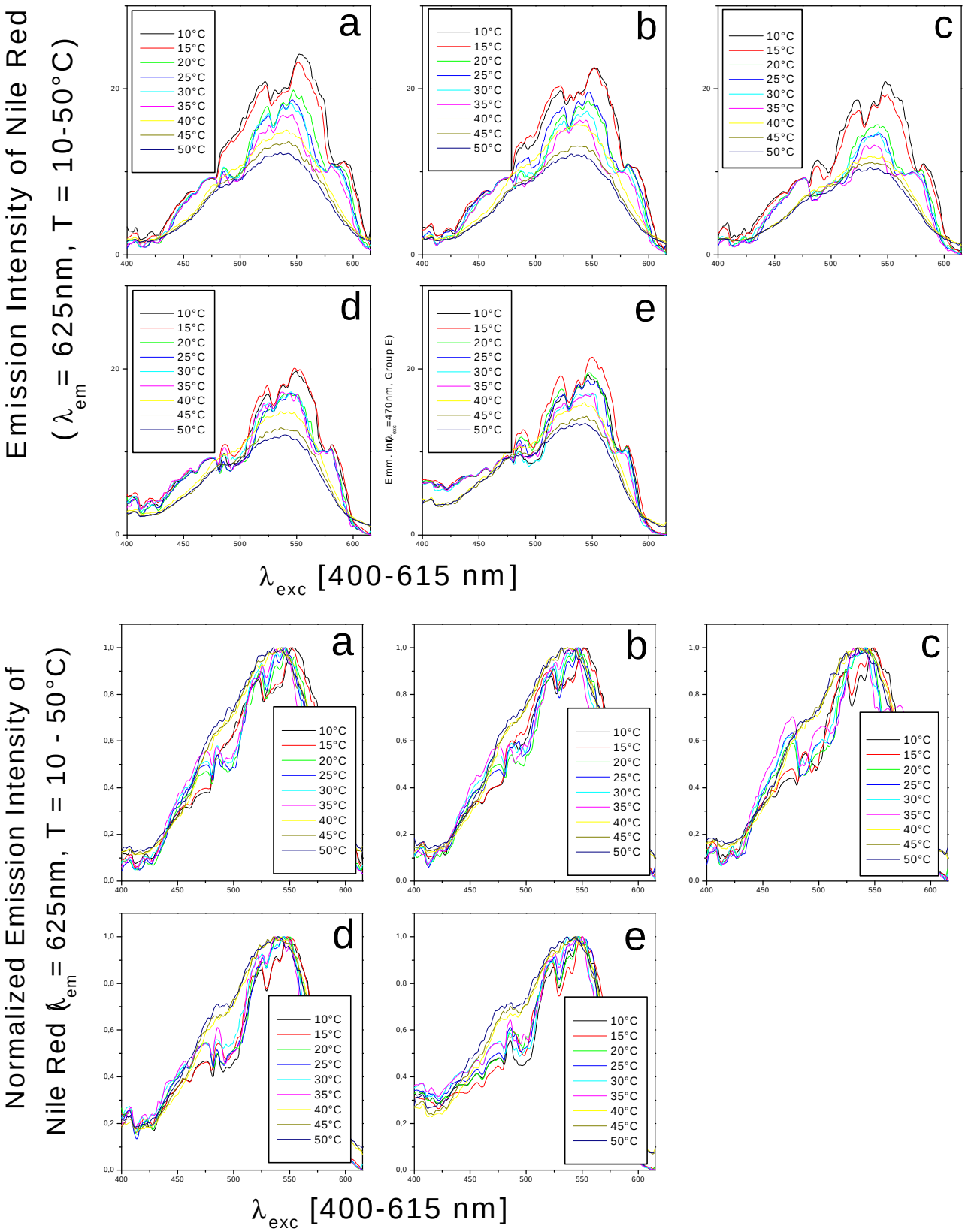


Abb.A4.6.: Exzitationsspektren (oben) und normalisierte Exzitationsspektren (unten) des lipophilen Fluorophors Nile Red in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Der Cholesteringehalt betrug in den Liposomengruppen a: 0%, b: 29%, c: 49%, d: 65%, e: 100% [mol(Ch.)/mol(PC)*100]. Die Exzitationsspektren sind jeweils in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur von 10 bis 50°C aufgetragen. Mit steigender Temperatur verringern die Exzitationsspektren deutlich ihre Intensität. Die Lage der Maxima ist kaum von der Temperatur abhängig.

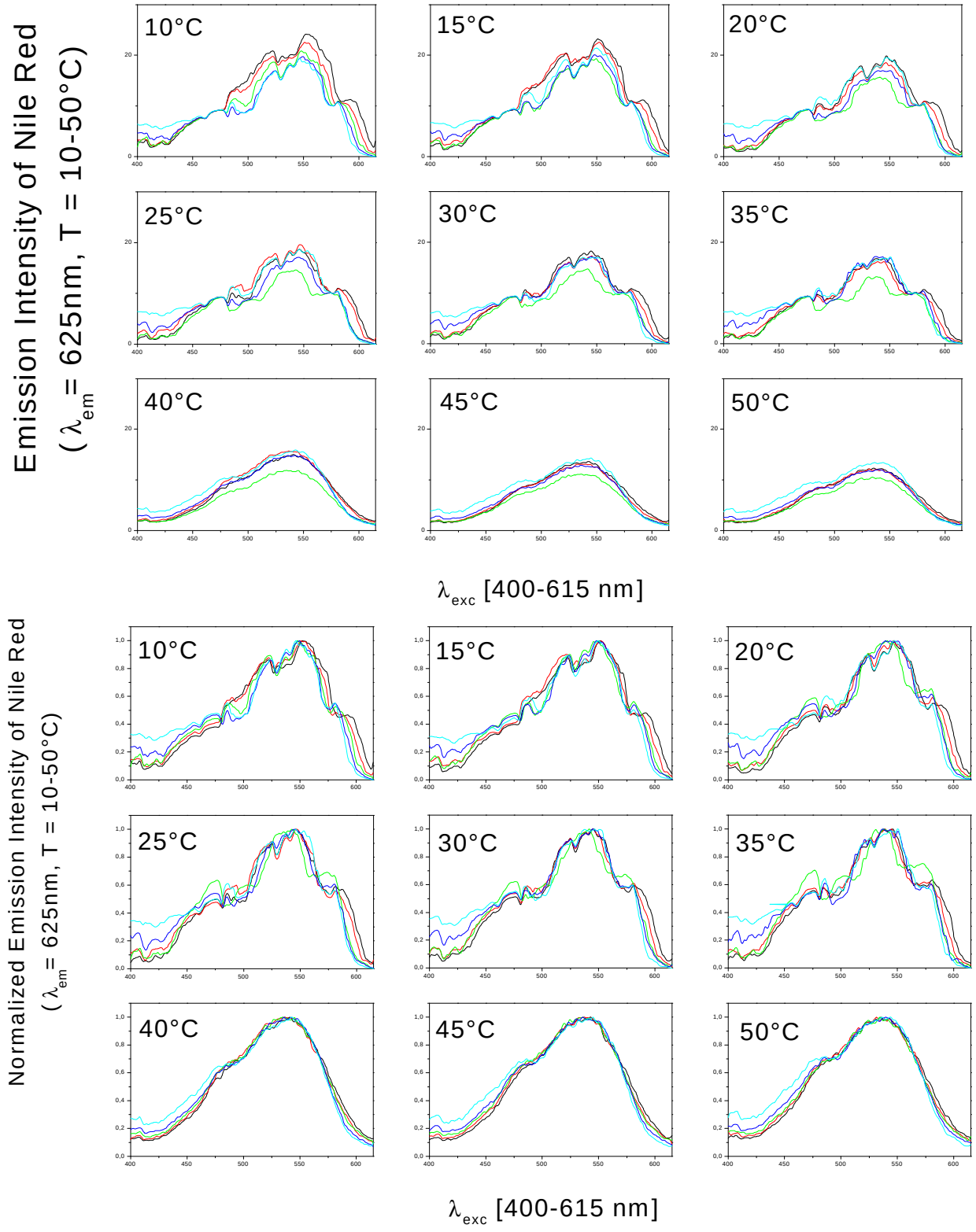


Abb.A4.7.: Exzitationsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Exzitationsspektren (untere Gruppe) des lipophilen Fluorophors Nile Red in Liposomen (0,01mg Lipid/ml) mit verschiedenem Cholesteringehalt. Ansteigende Cholesterinkonzentrationen farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau. Mit steigendem Cholesteringehalt verringern sich tendenziell die Intensitätsmaxima. Die Lage der Maxima ist hingegen nicht von dem Cholesteringehalt abhängig.

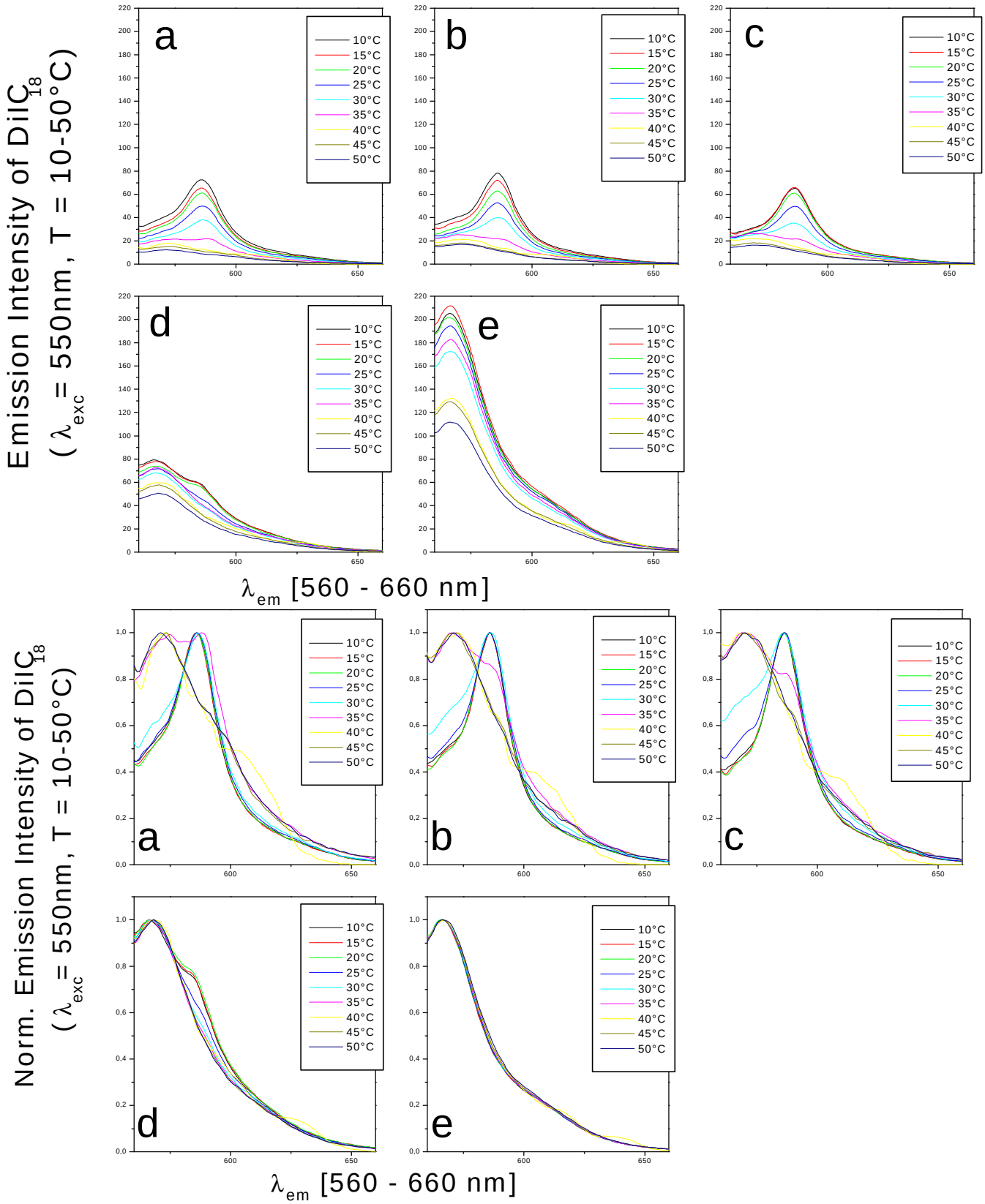


Abb.A4.8.: Emissionsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Emissionsspektren (untere Gruppe) des Fluorophors DiI_{C18} in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Der Cholesteringehalt betrug in den Liposomengruppen a: 0%, b: 29%, c: 49%, d: 65%, e: 100% (mol(Ch.)/mol(PC)*100]. Die Emissionsspektren sind jeweils in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur von 10 bis 50°C aufgetragen. Mit steigender Temperatur verringern die Emissionsspektren ihre Intensität. Auch die Lage der Intensitätsmaxima ist deutlich von der Temperatur abhängig. Mit steigender Temperatur sind die Maxima in Gruppen a bis d zu kleineren Wellenlängen hin verschoben.

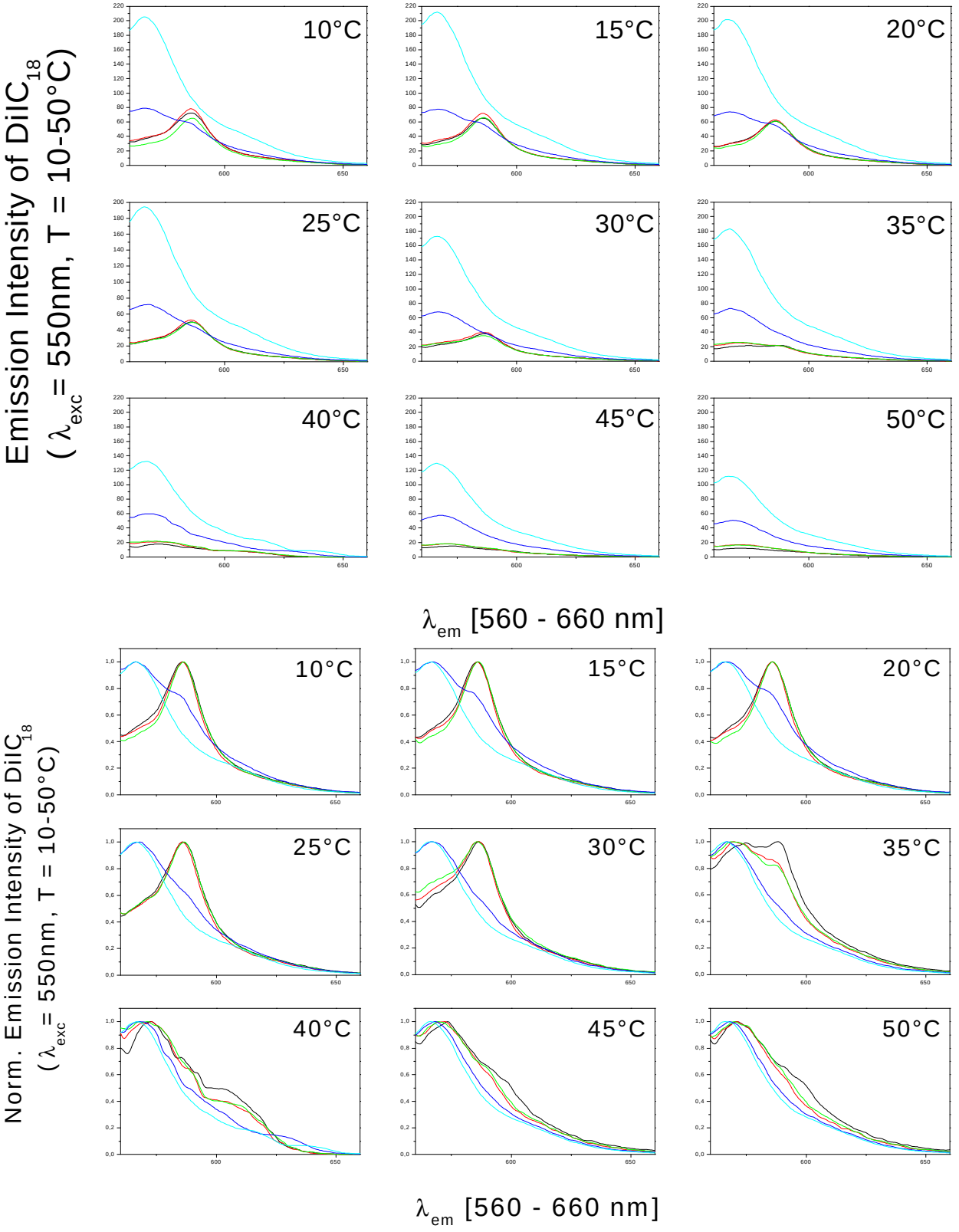


Abb.A4.9.: Emissionsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Emissionsspektren (untere Gruppe) des lipophilen Fluorophors DiI_{C18} in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Ansteigende liposomale Cholesterinkonzentrationen sind farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau. Mit steigendem Cholesteringehalt erhöhen sich die Intensitätsmaxima der DiI_{C18} Emission. Die Lage der Maxima ist ebenfalls vom Cholesteringehalt abhängig. Mit steigendem Cholesterinanteil verschieben sich die Maxima zu kleineren Wellenlängen.

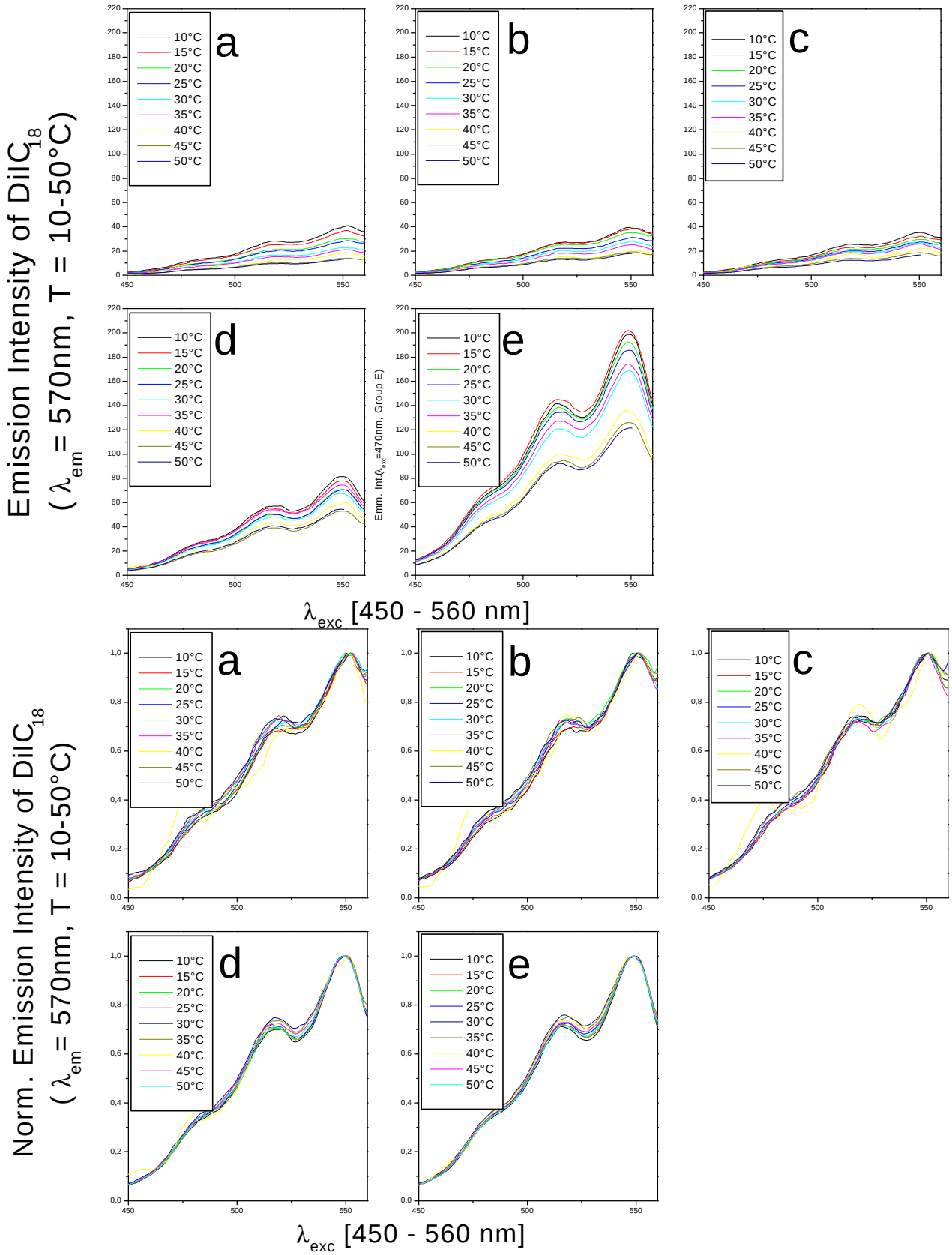


Abb.A4.10.: Exzitationsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Exzitationsspektren (untere Gruppe) des Fluorophors $DiIC_{18}$ in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Der Cholesteringehalt betrug in den Liposomengruppen a: 0%, b: 29%, c: 49%, d: 65%, e: 100% (mol(Ch.)/mol(PC)*100]. Die Exzitations-spektren sind jeweils in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur von 10 bis 50°C aufgetragen. Mit steigender Temperatur verringern die Exzitationsspektren ihre Intensität. Die Lage der Intensitätsmaxima ist anders als bei den Emissionsspektren von $DiIC_{18}$, nicht von der Temperatur abhängig.

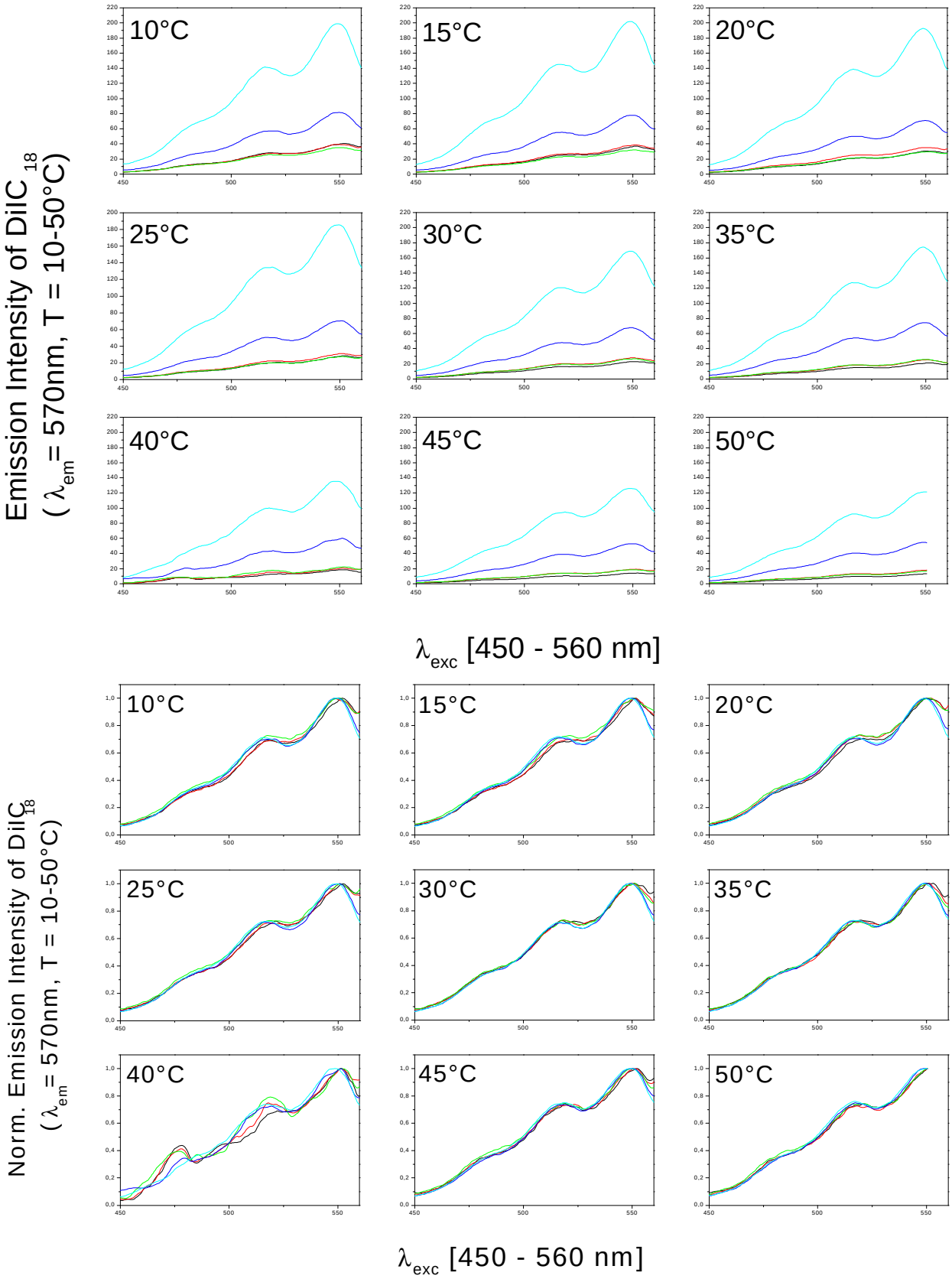


Abb.A4.11.: Exzitationsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Exzitationsspektren (untere Gruppe) des Fluorophors $DiIC_{18}$ in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Ansteigende liposomale Cholesterinkonzentrationen sind farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau. Mit steigendem Cholesterinanteil erhöhen die Exzitationsspektren ihre Intensität. Allerdings ist die Lage der Exzitationsmaxima, anders als bei den Emissionsspektren von $DiIC_{18}$, nicht von dem Cholesteringehalt abhängig.

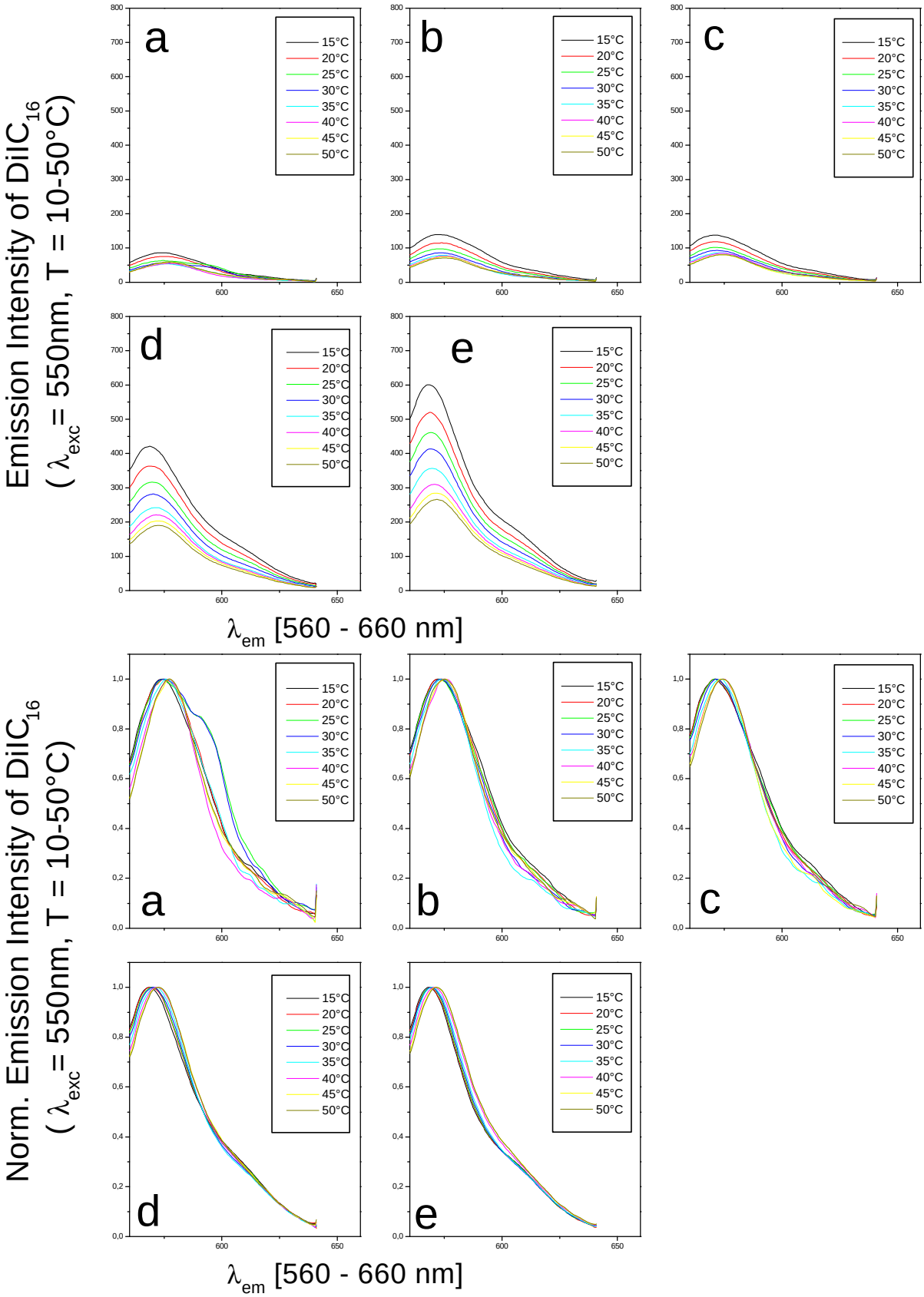


Abb.A4.12.: Emissionsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Emissionsspektren (untere Gruppe) des Fluorophors DiI_{C16} in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Der Cholesteringehalt betrug in den Liposomengruppen a: 0%, b: 29%, c: 49%, d: 65%, e: 100% [mol(Ch.)/mol(PC)*100]. Die Emissionsspektren sind jeweils in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur von 10 bis 50°C aufgetragen. Mit steigender Temperatur verringern die Emissionsspektren ihre Intensität. Auch die Lage der Intensitätsmaxima ist deutlich von der Temperatur abhängig. Mit steigender Temperatur sind die Maxima in Gruppen a bis d zu kleineren Wellenlängen hin verschoben.

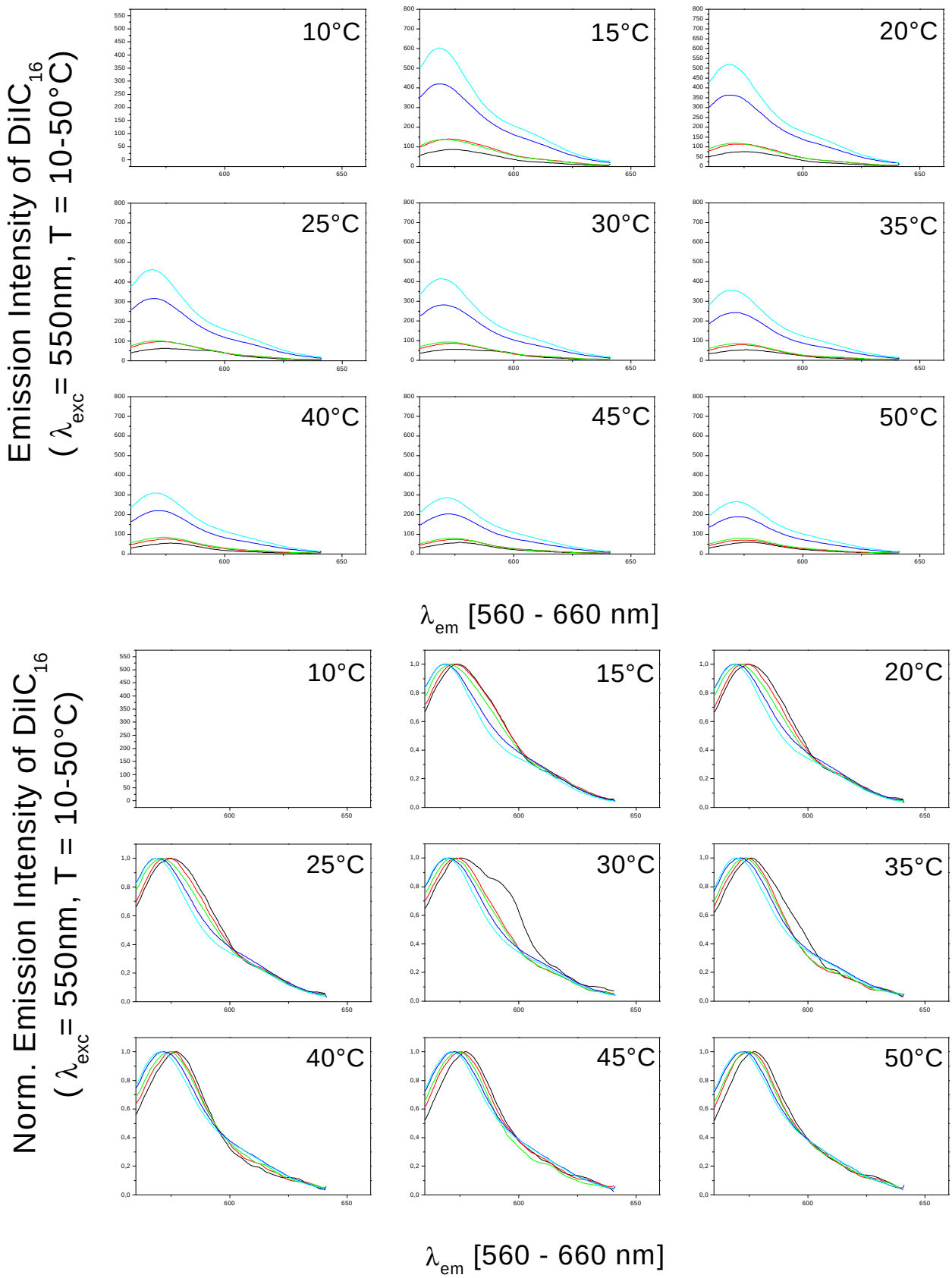


Abb.A4.13.: Emissionsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Emissionsspektren (untere Gruppe) des lipophilen Fluorophors DiI_{C16} in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Ansteigende liposomale Cholesterinkonzentrationen sind farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau. Mit steigendem Cholesteringehalt erhöhen sich die Intensitätsmaxima der DiI_{C16} Emission. Die Lage der Maxima ist ebenfalls vom Cholesteringehalt abhängig. Mit steigendem Cholesterinanteil verschieben sich die Maxima zu kleineren Wellenlängen.

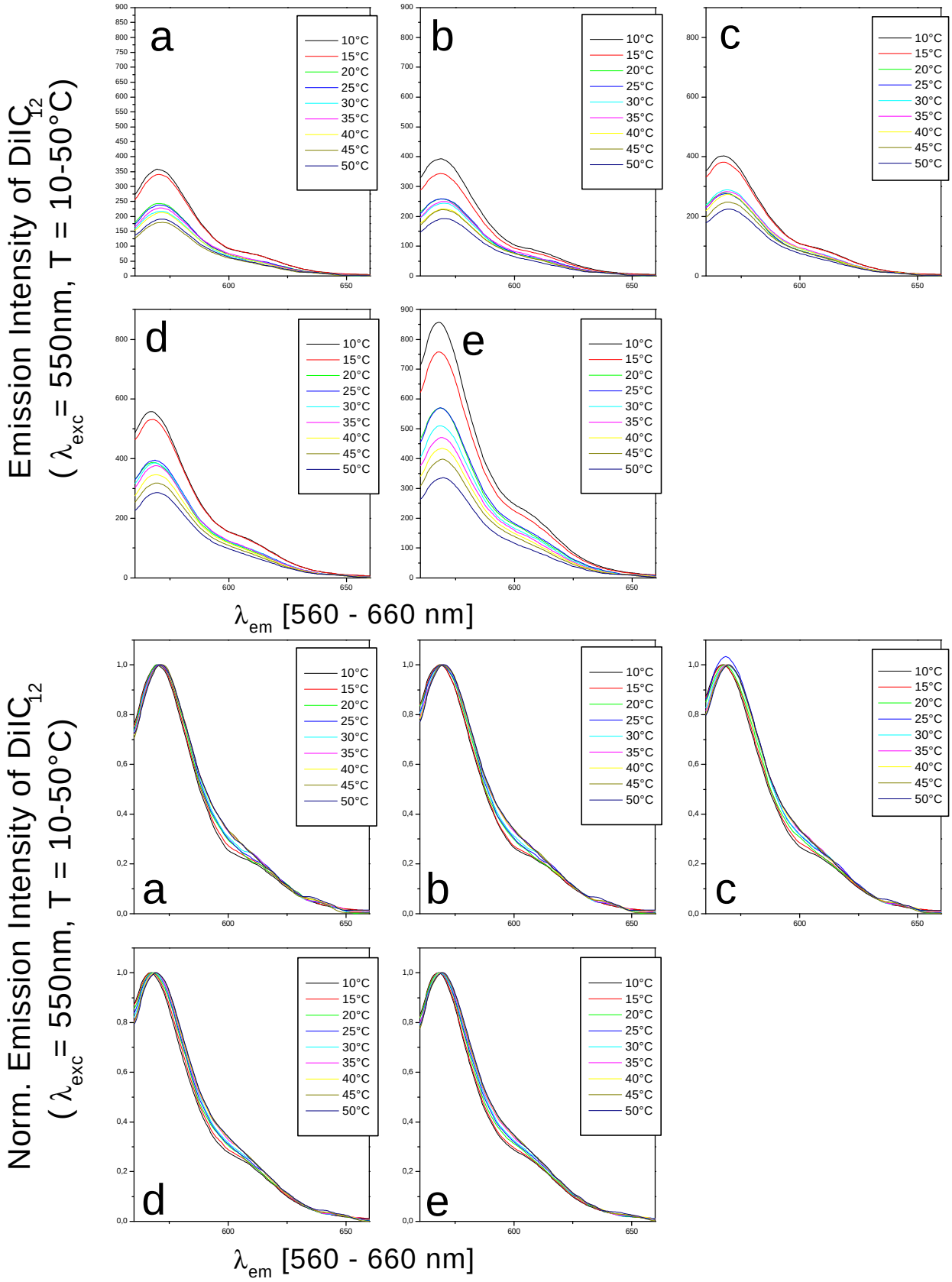


Abb.A4.14.: Emissionsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Emissionsspektren (untere Gruppe) des Fluorophors DiI_{C12} in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Der Cholesteringehalt betrug in den Liposomengruppen a: 0%, b: 29%, c: 49%, d: 65%, e: 100% [mol(Ch.)/mol(PC)*100]. Die Emissionsspektren sind jeweils in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur von 10 bis 50°C aufgetragen. Mit steigender Temperatur verringern die Emissionsspektren ihre Intensität. Auch die Lage der Intensitätsmaxima ist deutlich von der Temperatur abhängig. Mit steigender Temperatur sind die Maxima in Gruppen a bis d zu kleineren Wellenlängen hin verschoben.

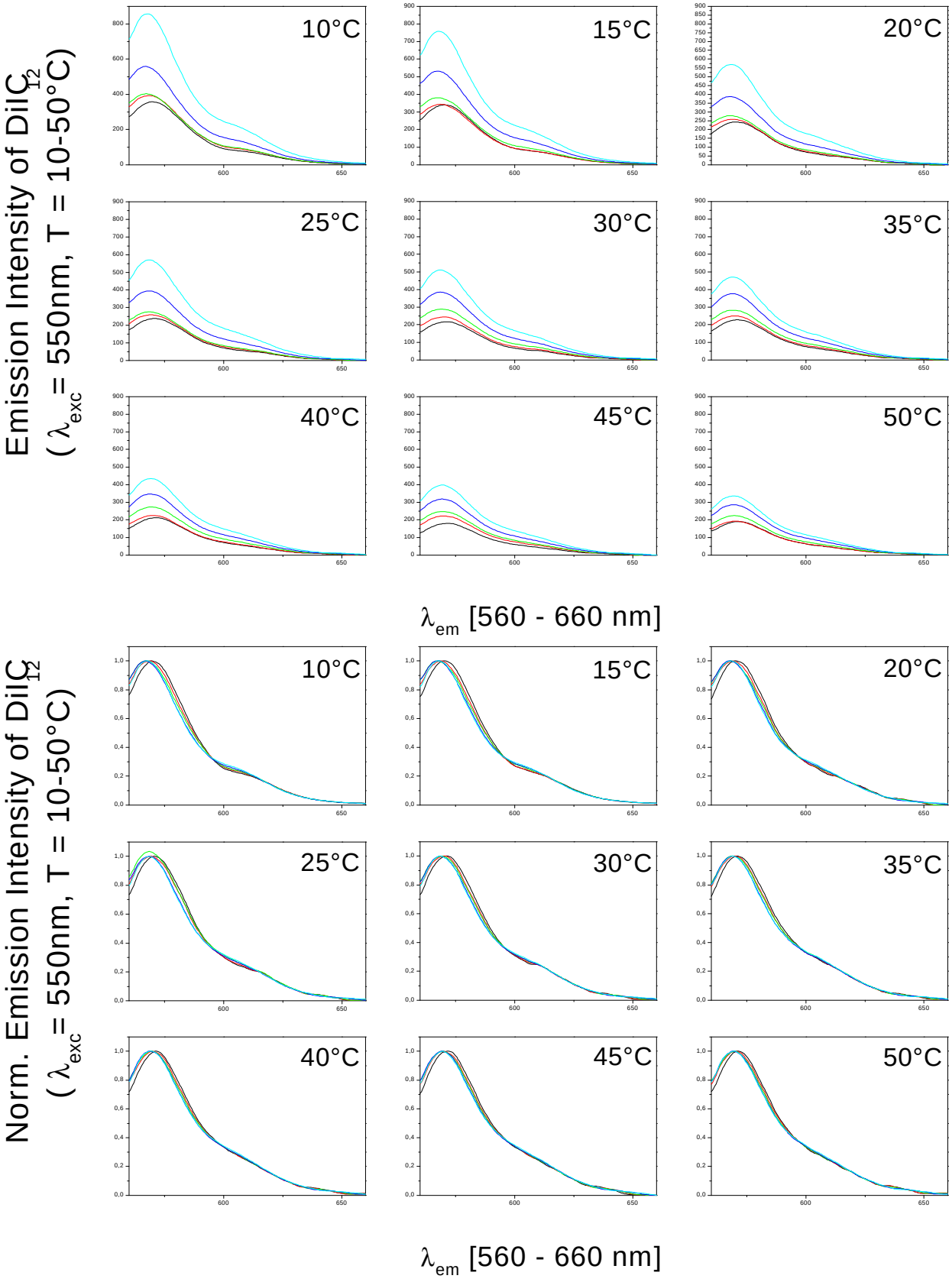


Abb.A4.15.: Emissionsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Emissionsspektren (untere Gruppe) des lipophilen Fluorophors $DiIC_{12}$ in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Ansteigende liposomale Cholesterinkonzentrationen sind farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau. Mit steigendem Cholesteringehalt erhöhen sich die Intensitätsmaxima der $DiIC_{12}$-Emission. Die Lage der Maxima ist ebenfalls vom Cholesteringehalt abhängig. Mit steigendem Cholesterinanteil verschieben sich die Maxima zu kleineren Wellenlängen.

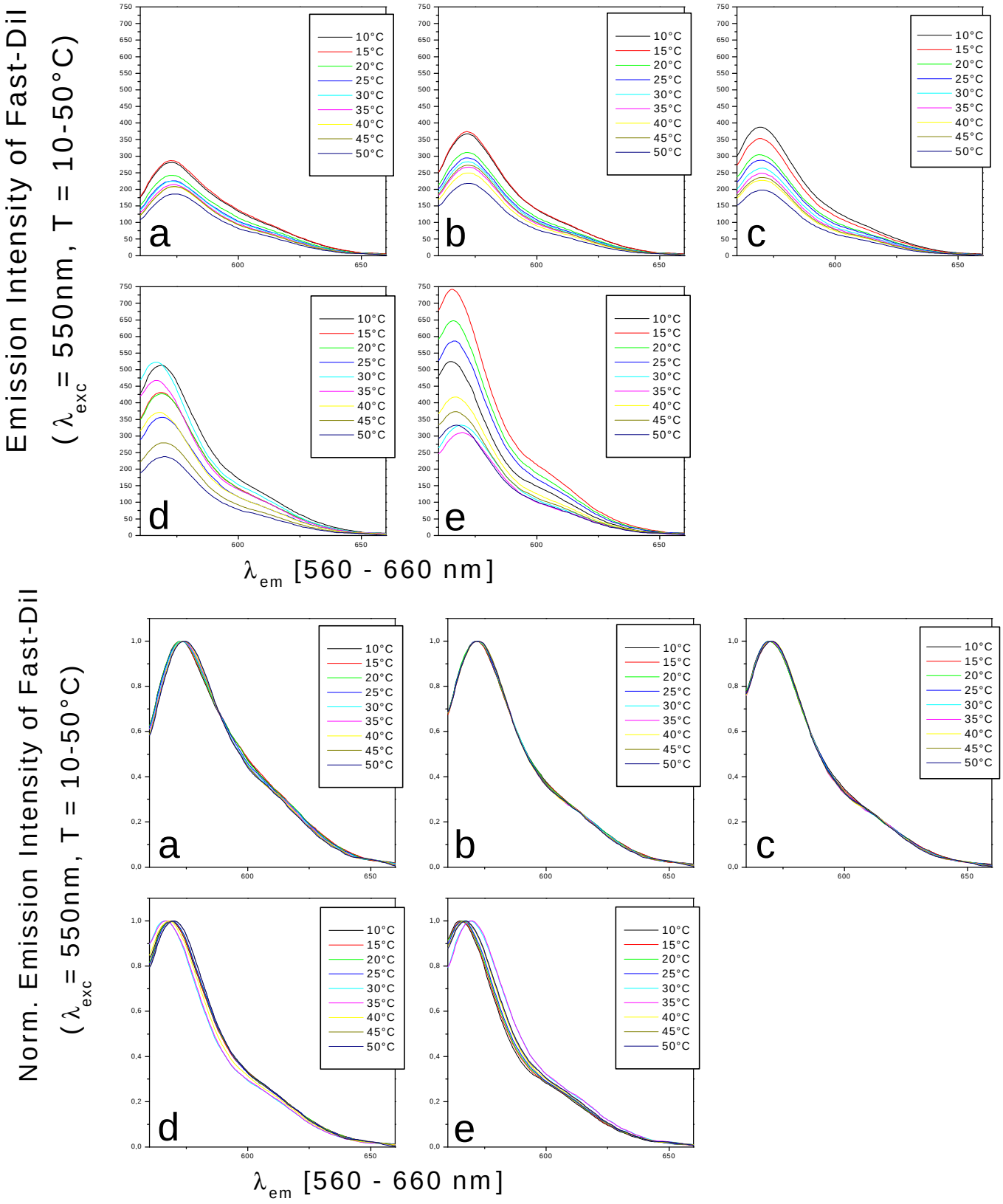


Abb.A4.16.: Emissionsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Emissionsspektren (untere Gruppe) des Fluorophors DiI_{FAST} in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Der Cholesteringehalt betrug in den Liposomengruppen a: 0%, b: 29%, c: 49%, d: 65%, e: 100% [mol(Ch.)/mol(PC)*100]. Die Emissionsspektren sind jeweils in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur von 10 bis 50°C aufgetragen. Mit steigender Temperatur verringern die Emissionsspektren ihre Intensität. Auch die Lage der Intensitätsmaxima ist deutlich von der Temperatur abhängig. Mit steigender Temperatur sind die Maxima in Gruppen a bis d zu kleineren Wellenlängen hin verschoben.

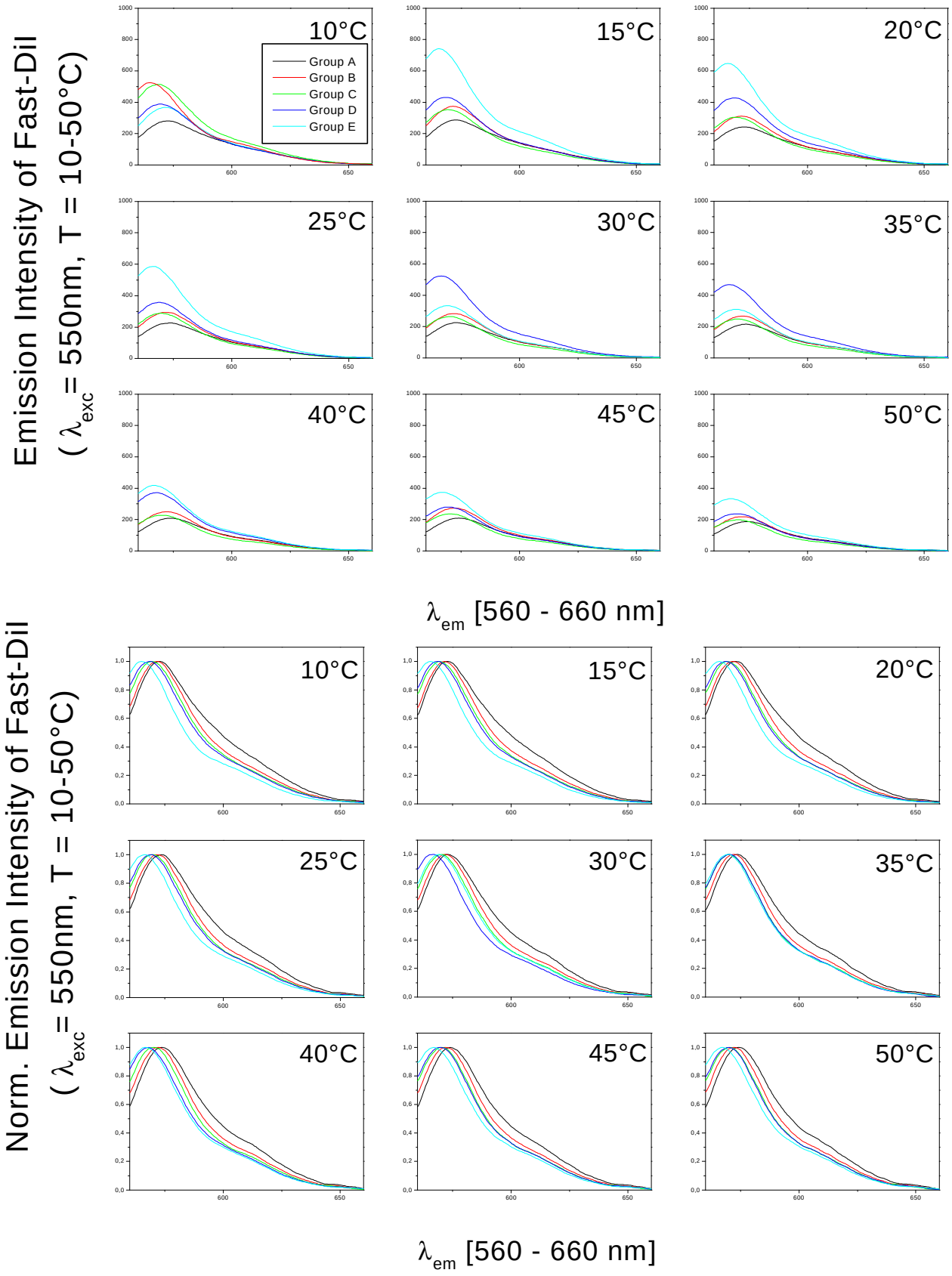


Abb.A4.17.: Emissionsspektren (obere Gruppe) und normalisierte Emissionsspektren (untere Gruppe) des lipophilen Fluorophors DiI_{FAST} in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Ansteigende liposomale Cholesterinkonzentrationen sind farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau. Mit steigendem Cholesteringehalt erhöhen sich die Intensitätsmaxima der DiI_{FAST} Emission. Die Lage der Maxima ist ebenfalls vom Cholesteringehalt abhängig. Mit steigendem Cholesterinanteil verschieben sich die Maxima zu kleineren Wellenlängen.

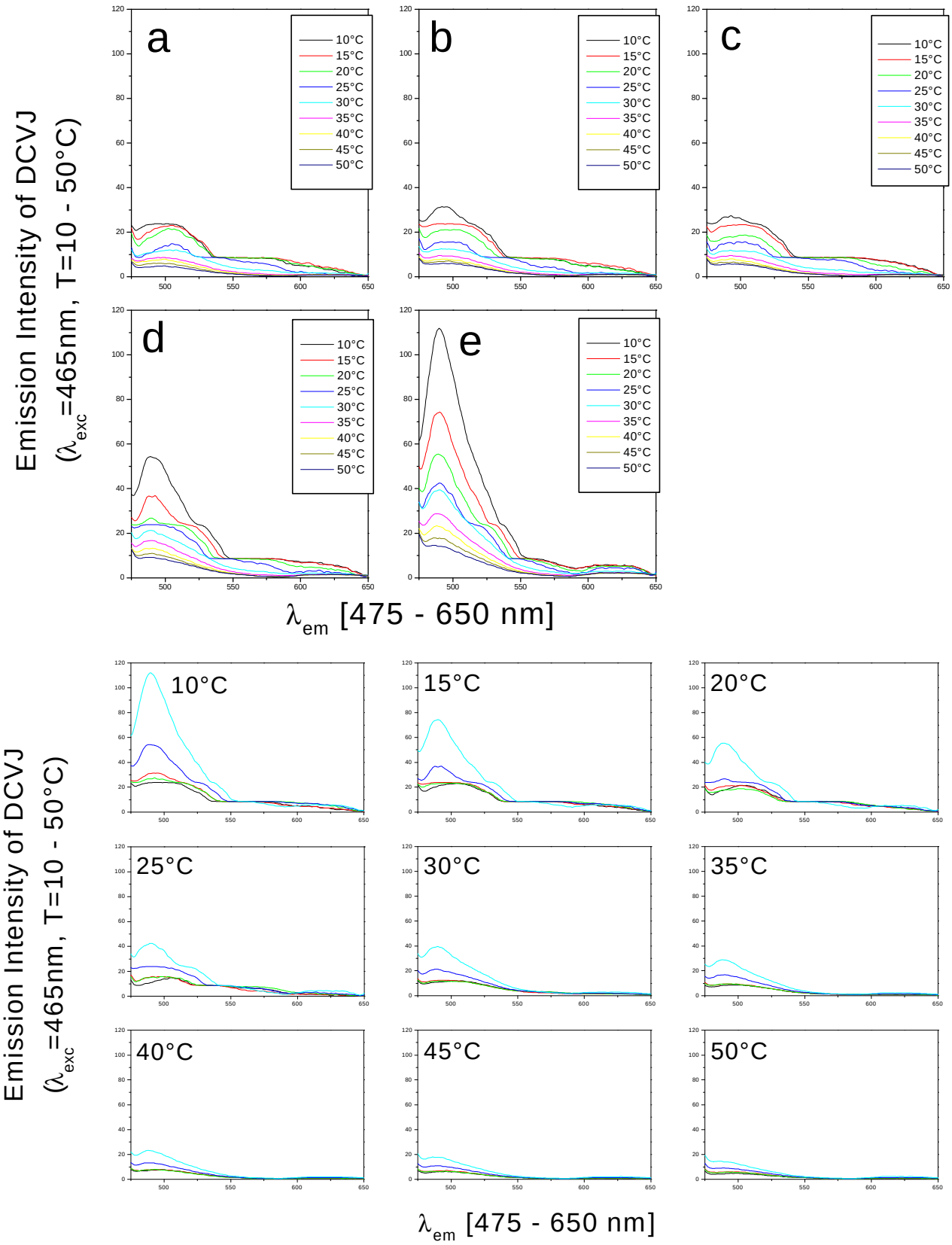


Abb.A4.18.: Emissionsspektren von DCVJ in Abhängigkeit der Temperatur (obere Gruppe) und in Abhängigkeit des Cholesteringehalts (untere Gruppe) in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Ansteigende liposomale Cholesterinkonzentrationen sind farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau. Die Emissionsspektren wurden im Temperaturbereich von 10 bis 50°C gemessen. Mit steigendem Cholesteringehalt erhöhen sich die Intensitätsmaxima von DCVJ. Mit steigendem Cholesterinanteil in den Liposomen verschieben sich die Emissionsmaxima zu kleineren Wellenlängen (untere Gruppe). Die Temperatur hat auf die Lage der Emissionsmaxima einen nur geringen Einfluß.

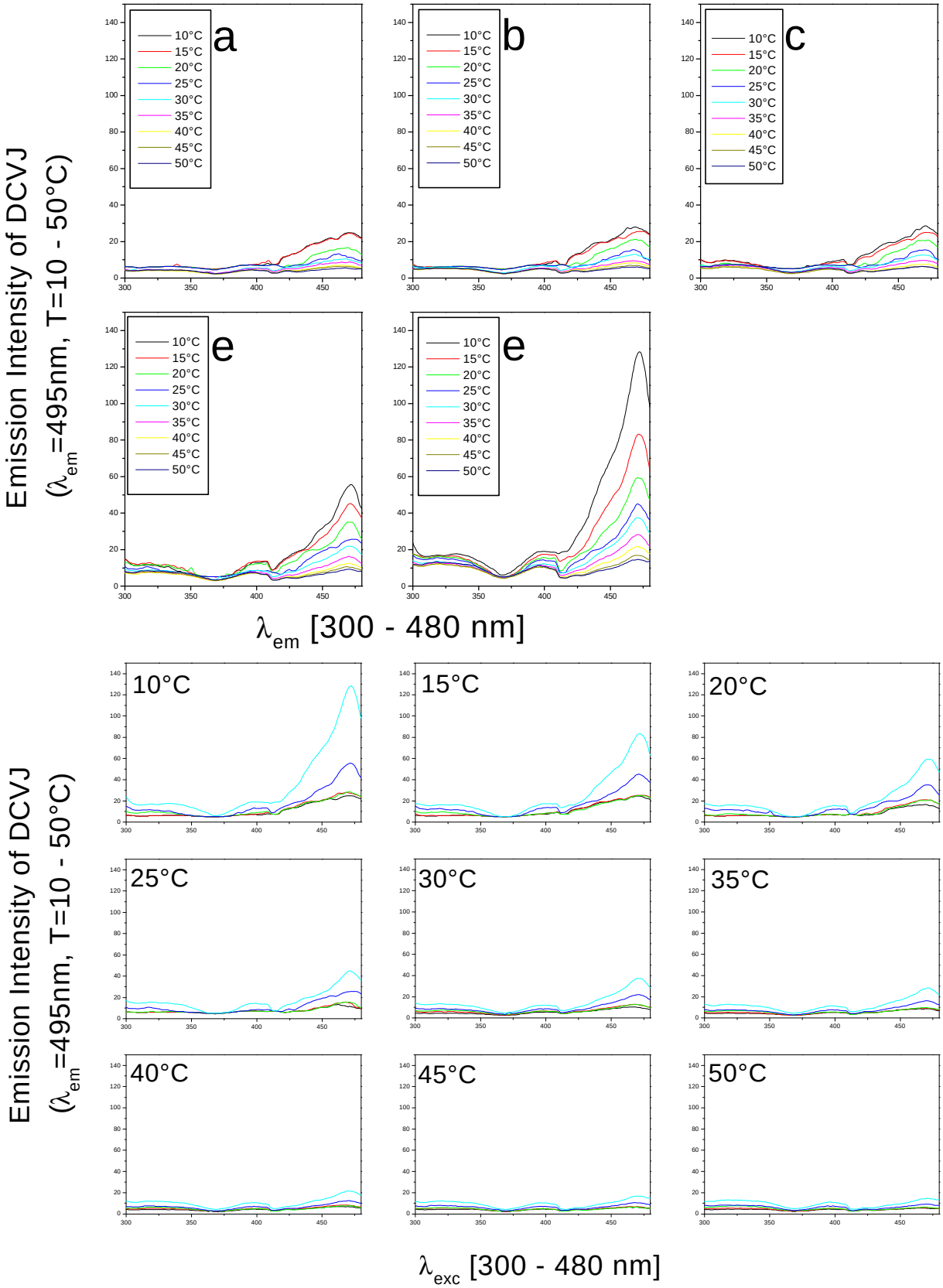


Abb.A4.19.: Exzitationsspektren von DCVJ in Abhängigkeit der Temperatur (obere Gruppe) und in Abhängigkeit des Cholesteringehalts (untere Gruppe) in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Ansteigende liposomale Cholesterinkonzentrationen sind farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau. Die Exzitationsspektren wurden im Temperaturbereich von 10 bis 50°C gemessen. Mit steigendem Cholesteringehalt erhöhen sich die Exzitationsmaxima von DCVJ. Die Lage der Exzitationsmaxima wird hingegen weder vom Cholesterinanteil noch von der Temperatur maßgeblich beeinflußt.

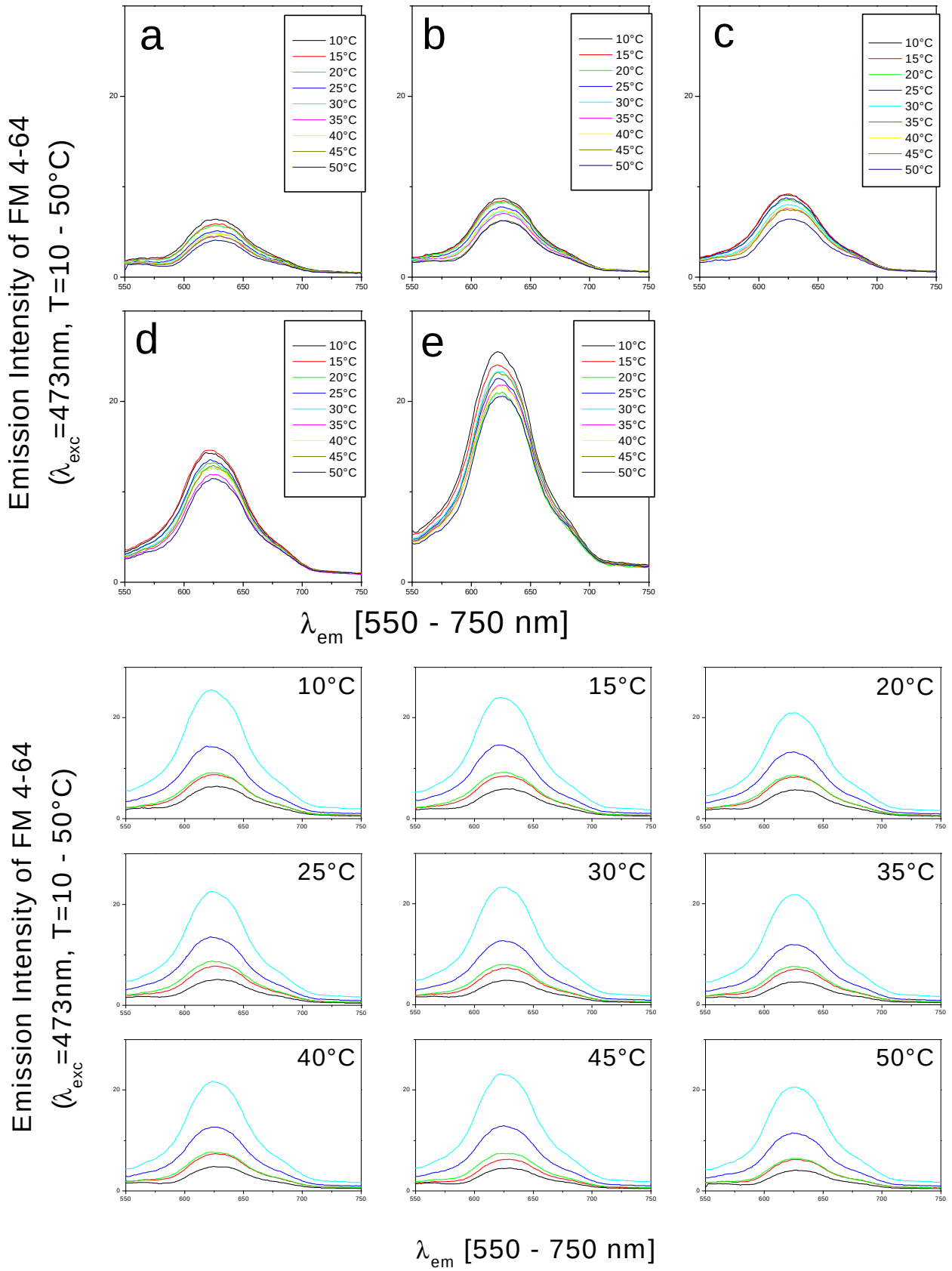


Abb.A4.20.: Emissionsspektren von FM 4-64 in Abhängigkeit der Temperatur (obere Gruppe) und in Abhängigkeit des Cholesteringehalts (untere Gruppe) in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Ansteigende liposomale Cholesterinkonzentrationen sind farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau. Die Emissionsspektren wurden im Temperaturbereich von 10 bis 50°C gemessen. Mit steigendem Cholesteringehalt erhöhen sich die Intensitätsmaxima von FM 4-64. Die Temperatur und der Cholesterinanteil haben auf die Lage der Emissionsmaxima einen nur geringen, jedoch stetigen Einfluß. Mit ansteigender Temperatur und sinkendem Cholesteringehalt verschieben sich die Emissionsmaxima zu höheren Wellenlängen.

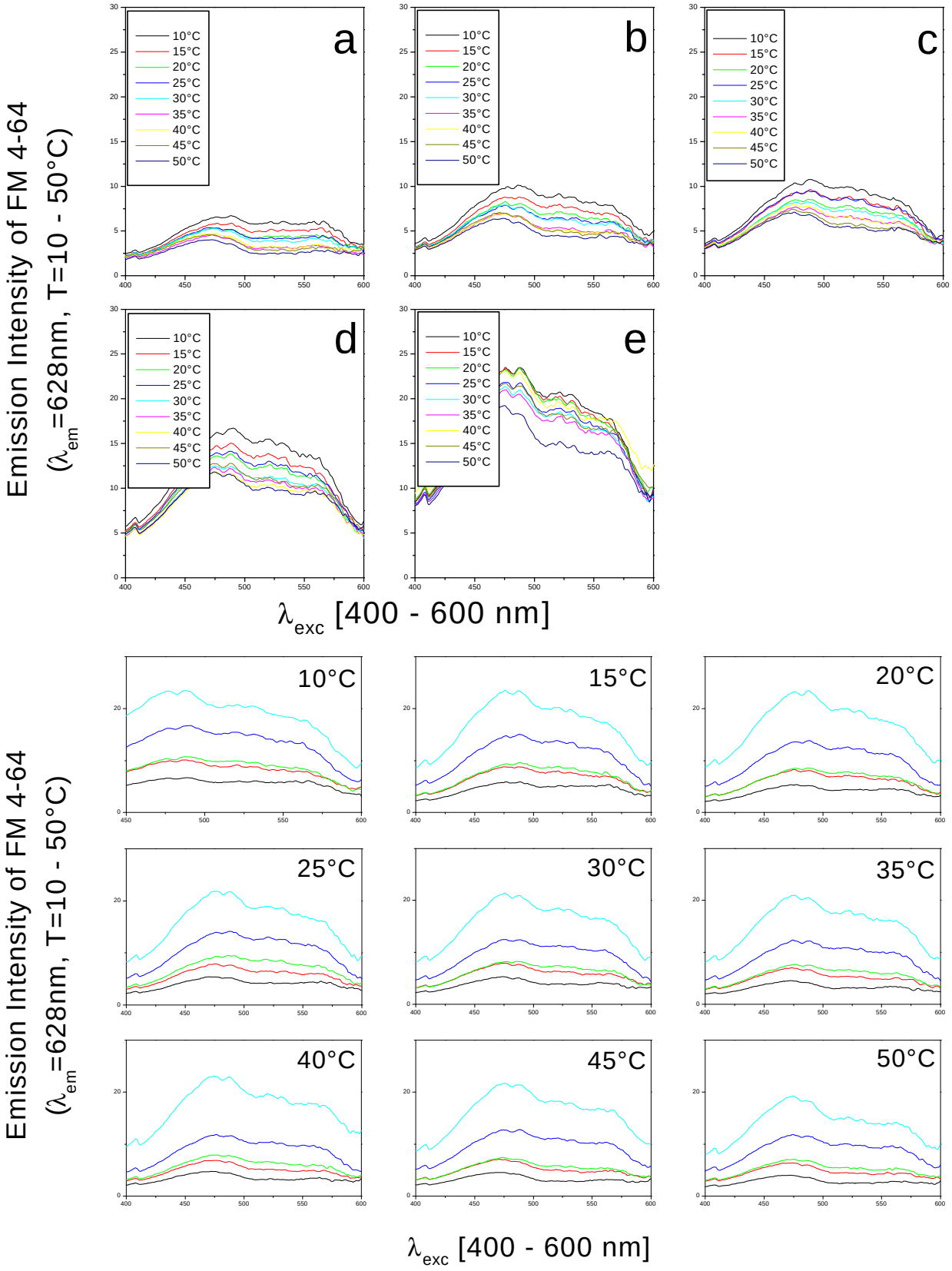


Abb.A4.21.: Exzitationsspektren von FM 4-64 in Abhängigkeit der Temperatur (obere Gruppe) und in Abhängigkeit des Cholesteringehalts (untere Gruppe) in Liposomen (0,01mg Lipid/ml). Ansteigende liposomale Cholesterinkonzentrationen sind farbmarkiert mit schwarz, rot, grün, blau und hellblau. Die Exzitationsspektren wurden im Temperaturbereich von 10 bis 50°C gemessen. Mit steigendem Cholesteringehalt und mit sinkender Temperatur erhöhen sich die Exzitationsmaxima von FM 4-64. Die Lage der Exzitationsmaxima wird hingegen weder vom Cholesterinanteil noch von der Temperatur maßgeblich beeinflußt

A5. ANHANG ZU KAPITEL 5:

BILDVERARBEITENDE MIKROSKOPIE

A5.1 MESSUNGEN MIT IPC-81-ZELLEN

A5.1.1 ZELLKULTUR UND ZELLZUCHT: IPC-81 [MODIFIZIERT NACH ZEISE 1999]

IPC-81 (promyelozytische Rattenleukemiezellen) wurden in RPMI 1640-Medium 10% FCS (v/v), 100U/ml Penicillin, und 100µg/ml Streptomycin bei einer Dichte von 5 × 10^5 Zellen/ml in 5% CO_2 Atmosphäre bei 37°C gehalten. Alle 48 h wurden die Zellen umgesetzt.

A5.1.2 APPLIKATION VON H_2O_2 -STRESS

- Perhydrol (Fa. Merck)
- PBS (8g NaCl; 0,2g KH_2PO_4; 1,15g Na_2HPO_4 ad 1000ml; pH 7,4)

Als Ausgangslösung wurde 30 % H_2O_2-Lösung (Perhydrol, Fa. Merck) verwendet, die lichtgeschützt bei 4°C gelagert werden muß. Die H_2O_2-Gebrauchslösung (10mM H_2O_2 in PBS) wurde unmittelbar vor dem Versuchsbeginn angesetzt und der Zellsuspension in der entsprechenden Konzentration (0-75µM H_2O_2) zugegeben. Da die Perhydrol-Stammlösung eine äußerst begrenzte Haltbarkeit hat, wurde sie nach dem ersten Öffnen maximal 10-mal benutzt.

Bei längerer Lagerung empfiehlt es sich, die Konzentration der Perhydrolstammlösung photometrisch zu überprüfen. Der molare Extinktionskoeffizient von H_2O_2 beträgt bei 240 nm 43,6 M^{-1} cm^{-1}. Von entscheidender Bedeutung für die Applikation von H_2O_2 ist, daß das verwendete RPMI 1640-Medium kein Eisen enthält und somit nicht zur Bildung der hochreaktiven Hydroxylradikale über die Fenton-Reaktion beiträgt.

Da die Effektivität der H_2O_2-Behandlung maßgeblich durch die Zellzahl des Versuchsansatzes bestimmt wird, wurde sie bei jedem Versuch ermittelt und auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt.

A5.1.3 Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels Flowzytometrie (FC) und mittels quantitativer Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie (QFM)

- PBS (8g NaCl; 0,2g KH_2PO_4; 1,15g Na_2HPO_4 ad 1000ml; pH 7,4)
- Citrat-Phosphat-Puffer (192ml 0,2M Na_2HPO_4 + 8ml 0,1M Citrat; pH 7,8)
- Propidium Jodid /RNAse Lsg. [100mg RNAse + 200µl PI (5µg/µl) ad 100ml PBS]

Um den relativen Anteil apoptotischer Zellen in einer Zellpopulation zu quantifizieren, wurde der DNA-Gehalt fixierter und Propidium-Iodid-gefärbter Zellen mit Hilfe der FC und mittels der QFM bestimmt.

Diese Methode ist für die FC aus der Zellzyklusanalyse bekannt. Sie wird eingesetzt, um den relativen Anteil von Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen (G1, S, G2/M) anhand des DNA-Gehaltes (2n, 2-4n, 4n) zu ermitteln und zu quantifizieren. Bei der Analyse apoptotischer Zellen erhält man zusätzlich zu den einzelnen Zellzyklusphasen weitere Fluoreszenzsignale im Sub-G1-Bereich, die durch Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt (< 2n) verursacht werden.

Die flowzytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes einzelner Zellen ermöglicht es, zusätzlich zur Quantifizierung der Sub-G1-Population die Verteilung der überlebenden Zellen innerhalb der einzelnen Zellzyklusphasen ermitteln zu können.

Im Unterschied zur Zellzyklusanalyse reicht bei der Untersuchung der Apoptosis die flowzytometrische DNA-Analyse allein nicht aus, da anhand der Sub-G1-Fraktion nicht zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelltod unterschieden werden kann. Aus diesem Grund ist zusätzlich eine gelelektrophoretische Analyse der fragmentierten DNA erforderlich [Zeise 1999].

Nach der Behandlung mit H_2O_2 wurden IPC-81-Zellen in PBS gewaschen, in 85% Ethanol fixiert und bei -20°C für mindestens 24h gelagert. Vor der flowzytometrischen Analyse wurden die fixierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Um degradierte DNA vollständig aus den apoptotischen Zellen herauszuwaschen, wurden die Zellen anschließend in 1ml Citrat-Phoshat-Puffer aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren des Citrat-Phosphat-Puffers wurden die Zellen dann in 250µl PI/RNase Lösung aufgenommen und für 30 min bei RT (lichtgeschützt!) mit der PI/RNase-Lösung inkubiert.

Anschließend wurden die gefärbten Zellen in einem Becton Dickinson FACScan durch einen 488 nm Argonlaser angeregt und die emittierte Fluoreszenz im FL3-Kanal (> 610 nm) detektiert. Bei jeder Messung wurden 10 000 Zellen analysiert und die Daten mit dem Lysis II Analysis Programm ausgewertet und quantifiziert.

Für die mikroskopischen Messungen wurden IPC-81-Zellen in der gleichen Weise wie für die FACScan Messungen vorbereitet. Die Messungen erfolgten an einem ZEISS LSM-410 Laser-Scanning Mikroskop. Anregung von PI erfolgte durch einen 488 nm Argonlaser und die emittierte Fluoreszenz wurde bei Wellenlängen (> 610 nm) detektiert. Bei jeder Messung wurden hier zwischen 500 und 1800 Zellen analysiert und die Daten mit Hilfe selbstgeschriebener Software quantifiziert.

A5.2 Auszüge aus Härtel *et al.* (1999) eingereicht bei der Zeitschrift '*Aquaculture*'

A5.2.1 Material und Methoden

Triploidization method & collection of blood samples:

Triploidization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Smith & Stearly, 1989) was obtained applying heat shock (28ºC for 10 min) to the fertilised cells, 40 min. after the fertilisation procedure.

Blood samples (1ml) were obtained from immature fishes of 350 ± 50 gr. by piercing the caudal vein. Heparin (Sigma) was added in order to inhibit blood coagulation.

DNA labeling technique with acridine orange (AO) for the discrimination of di- and triploid erythrocytes by flow cytometry (FC):

Following Darzynkiewicz *et al.* (1979), 10^5 erythrocytes in a 100 µl suspension were mixed with 200 µl of acid detergent (0.1 % Triton X-100, 0.08 N HCl and 150 mM NaCl). After 30 sec, 600 µl of the AO staining solution were added (100 ml contained 1.2 mg AO (Sigma), 29 mg ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA), 150 mM NaCl, 0.1 M $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, and 0.2 M Na_2HPO_4).

All steps were performed in a 0°C ice water bath. After 10 min, the DNA content of the erythrocyte nuclei was determined with a FC unit previously described (Ojeda *et al.* 1992).

DNA content per nucleus was determined using the fluorescence signal of each individual cell in the green spectral range (515-575 nm, AO bound to DNA). Exzitation was performed by a 50 mW laser at 488 nm and 5000 cells were counted for each analysis.

AO fluorescence intensity, side scattering intensity at 90°, and forward scattering intensity were monitored for each cell and analyzed as described below.

DNA labeling technique with AO, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), and propidium iodide (PI) for the discrimination of di- and triploid erythrocytes using quantitative fluorescence microscopy (QFM):

For AO staining on microscopic slides, the same acid detergent and AO staining solutions were used as described above. For PI staining, we also used the acid detergent and a 50 µg/ml PI staining solution. For DAPI staining, we used a 50 µg/ml DAPI staining solution.

For AO, PI, and DAPI staining, 5 µl of blood samples were pipetted on different microscopic slides. Erythrocyte membranes were permeabilised with 5 µl of the acid detergent (added to the cover slides) in order to allow better diffusion of AO and PI through the cellular membranes into the nuclear region of the cells which then bind efficiently to the DNA.

Cells and acid detergent on the slides were gently shaken for 1 min. After 5 min of incubation, 5 µl of the staining solution was added. In case of DAPI, the staining solution (5 µl) was directly added to the cells without any previous treatment, since the small dye freely diffuses into the chromosomal region of the cells.

The slides were gently shaken for about 1 min and after an incubation time of 10 min, superfluous sample volume was removed from the slides by slowly soaking volume into a 10 µl Eppendorff pipette, moving it concentrically around the center of the samples until cover slides could adequately be added.

A Leica epifluorescence microscope DM LB equipped with a type A filter set and a CS 50 W-4/L2 lamp was used in fluorescent and bright field mode.

Images were digitised using a CCD camera (CE. Model OS70D. HR., Taiwan**)** and GrabIT frame grabber soft- and hardware (AIMS Lab., USA). 8-bit gray scale pictures with intensities $I(x,y) \in [0, 255]$ and a 701×480 pixel dimension were recorded.

DNA labeling technique with GIEMSAS for the discrimination of di- and triploid erythrocytes using bright field quantitative morphological microscopy (QMM):

For GIEMSAS staining of the erythrocyte nuclei on microscopic slides, small aliquots of blood samples were homogeneously spread out on the slides and dried at room temperature in order to obtain a uniform erythrocyte coverage of the slides.

These slides were covered with May Grünwalds solution from SIGMA for 1 min, then covered with aq_{dest} for 3 min and washed with aq_{dest}. Afterwards, slides were covered with GIEMSAS solution from SIGMA (2 drops/ml aq_{dest}) for 15 min and cleaned with aq_{dest}.

A5.2.2 EIGENVEKTOREN DER DIPLOIDEN ERYTHROZYTENPOPULATION AUS QUANTITATIVEN MORPHOLOGISCH-MIKROSKOPISCHEN (QMM) DATEN

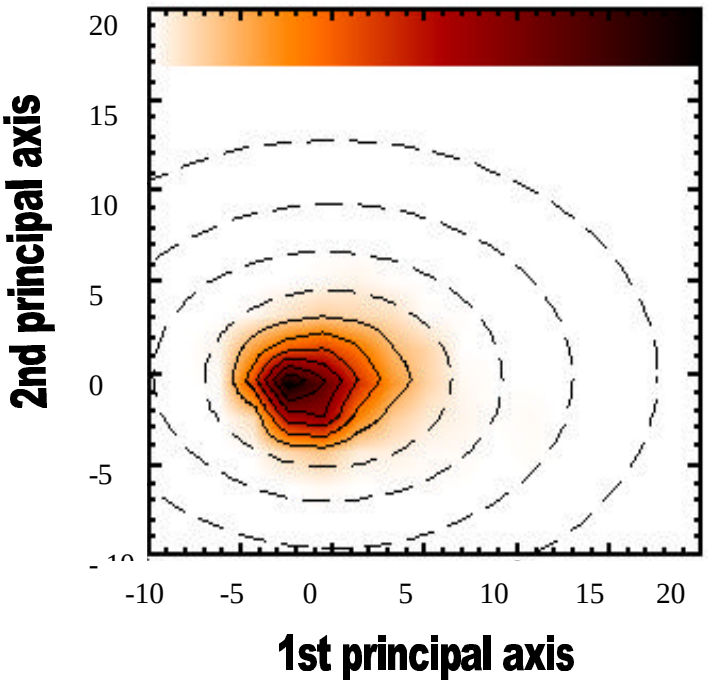


Abb.A5.1.: Bivariate density histogram in relation to the first two eigen vectors of the diploid erythrocyte data using QMM (see Fig.4.5. & Tab.A4.1.). The eigen values of the first two principal axes are λ_1 = 36.6 and λ_2 = 16.9. The perimeter P (with a participation of 12.4%), the invariant moments μ'_{22} (11.3%) and μ'_{44} (11.1%), and the area A (10.2%) are the most important single parameters for the first axis. For the second axis, the curvature dependent parameters $\mathbf{E_C}$, $\bar{\mathbf{E}}_\mathbf{C}$, 2^{nd}_d, and 2^{nd}_d dominate the composition of the axis (total participation 67.1%). Dashed lines of the ellipses mark constant distances of the $\sqrt{\lambda_i}$ weighted distance function which is needed for the classification of unknown erythrocyte samples as described in material & methods. The ratio of the standard deviation of the diploid nuclei in relation to the first two principal axis $\sqrt{\lambda_1}$ / $\sqrt{\lambda_2}$ = 1.47 defines the axis length of the ellipses.

Tab.A5.1.: (see next page) Correlation table of FC, QFM, and QMM data. The first part shows the correlation between the parameters used to calculate the discriminative capacities **C** in Fig. 4.4.A/B/C.. In the 2nd part, correlation between intensity dependent and pure morphological parameters of the QFM data set are shown. High correlation coefficients justify the complete substitution of the intensity dependent parameters with pure morphological data. In the 3rd part, parameter groups formed by parameters with a covariance greater then 0.95 is presented for the QMM data. Finally, the participation of the groups in the first 3 principal axes are shown for both eigen vector systems. The relative sizes of the eigen values, given for each principal axis, represent the importance of each axis for the calculation of the minimum distance criteria used for the separation of di- and triploid erythrocytes in Fig. A5.1..

A5.2.3 KORRELATIONSTABELLE DER FLOWZYTOMETRISCHEN (FC), QUANTITATIVEN FLUORESZENZ-MIKROSKOPISCHEN (QFM) UND QUANTITATIVEN MORPHOLOGISCH-MIKROSKOPISCHEN (QMM) DATEN

	FC	QFM	QMM
Correlation between X- , Y-, and Z- axis parameters of fig. 2.	X_Y: 0.5837 X_Z: 0.0723 Y_Z: 0.3594	X_Y: 0.3637 X_Z: 0.1944 Y_Z: 0.1749	X_Y: 0.0545 X_Z: 0.3443 Y_Z: 0.1124

Correlation between intensity dependent and morphological parameters.	***QFM***	
	Diploid cells	Triploid cells
Intensity:	0.998 **A**	0.998 **A**
I-Ecc:	0.985 **D**	0.969 **D**
$I\mu'_{03:}$:	0.963 **P**	0.964 $[\mu'_{22}]$
	0.997 ***Ecc***	0.998 ***Ecc***
	0.488 $[\mu'_{03}]$	0.643 $[\mu'_{03}]$

Groups formed by the morphologic parameters with correlation coefficients greater than 0.95.	**QMM**	
	Diploid cells	Triploid cells
	A: $[\mu'_{22}]$ $[\mu'_{44}]$ ____ **B:** E_C, $\overline{E}_C$, 2^{nd}_d, $\overline{2^{nd}_d}$ **C:** $[\mu'_{04}]$ **D:** $\overline{D}$ **E: A** **F: D** **G:** $[\mu'_{40}]$ **H:** $[\mu'_{03}]$, $[\mu'_{05}]$ **I:** $[\mu'_{33}]$, $[\mu'_{55}]$ **J:** $[\mu'_{30}]$, $[\mu'_{50}]$ **K:** ***Ecc*** **L:** P^2/A **M: P**	**A:** **A**, **D**, $[\mu'_{22}]$, $[\mu'_{44}]$ **B:** E_C, $\overline{E}_C$ **C:** $[\mu'_{04}]$ **D:** $\overline{D}$ **E:** $\mathbf{2^{nd}_d}$, $\mathbf{\overline{2^{nd}_d}}$ **F:** $[\mu'_{33}]$ **G:** $[\mu'_{40}]$ **H:** $[\mu'_{03}]$, $[\mu'_{05}]$ **I:** $[\mu'_{55}]$ **J:** $[\mu'_{30}]$, $[\mu'_{50}]$ **K:** ***Ecc*** **L:** P^2/A **M: P**
Participation of the parameter groups in the first 3 principal axis in [%] and the size of the eigen values (l) of the axis in relation to the sum of all ls.	**1^{st} axis, l_1 = 0.42:** (**A**: 16.8) (**C**: 11.9) (**E**: 16.3) (**F**: 15.2) (**M**: 16.4) **2^{nd} axis, l_2 = 0.2:** (**G**: 10.0) (**H** 11.1) (**K**: 28.4) (**L**: 25.9) **3^{rd} axis, l_3 = 0.1:** (**I**: 50.3) (**J**: 48.9)	**1^{st} axis, l_1 = 0.38:** (**A**: 17.1) (**C**: 15.5) (**G**: 12.8) (**M**: 18.0) **2^{nd} axis, l_2 = 0.16:** (**F**: 42.9) (**I**: 43.1) **3^{rd} axis, l_3 = 0.14:** (**B**: 11.5) (**D**: 14.0) (**E**: 15.8) (**K**: 26.7) (**L**: 12.0)

A5.3 VERSUCHE MIT FRISCHEN MÄUSE-T-ZELLEN

A5.3.1 PRÄPARATION FRISCHER MÄUSE-T-ZELLEN *EX VIVO*

Reagenzien:

1) RPMI-1640 Zellmedium (R-6504 von Sigma für 1 Liter)
10mM Hepes H3375 (2.4g/l)
2g/l Natriumhydrogencarbonat $NaHCO_3$ (Merck)
.... auf 1 Liter mit Aq_{dest} auffüllen.

Junge, männliche Rk- Mäuse aus der hauseigenen Linie (UACH, Instituto de Inmunologia, Valdivia, Chile) werden mit einer Überdosis Ether getötet und der Thymus frisch entnommen. Der Thymus wird auf einem kleinmaschigen Sieb in einigen Tropfen 1) mit einer Schere in möglichst kleine Stücke geschnitten und anschließend mit ca. 8 ml 1) durch das Sieb gerührt und gespült. Die Zellsuspension wird nun durch eine dünne Schicht Watte in einen geeigneten Kolben gesiebt und somit von übriggebliebenen Klümpchen und Zellagglomerationen befreit. Auf diese Weise werden pro Maus um die $200 \cdot 10^6$ T-Zellen gewonnen.

Alle Arbeitsschritte sind wieder möglichst schnell und unter Eiskühlung auszuführen.

A5.3.2 PRÄPARATION DER MÄUSE - ZELLEN FÜR FLOWZYTOMETRISCHE MESSUNGEN

Reagenzien:

1) Triton X-100 Lösung für Zellysis (100ml):
- 0.88g NaCl in etwa 50ml Aq_{dest} lösen, 0.64ml HCl und 0.1ml Triton X-100 hinzufügen und mit Aq_{dest} auf 100ml auffüllen. Triton X-100 löst sich von allein auf bei Lagerung über Nacht bei 4ºC. Bei 4ºC lagern.

2) Acridine Orange Lösung zur DNA-Markierung (100ml):
- 1.2 ml (1mgAO/ml) AO, 0.88g NaCl und 29 mg EDTAmit 36.5ml (0.1M = 2.1g/100ml) Zitronensäure ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) mit 62.3ml (0.2M = 3.6g/100ml) Na_2HPO_4 auffüllen und mit dem Magnetrührer lösen. Bei 4ºC lagern.

Zur Präparation 200µl 1) mit 10^5 Zellen in einem mit Eis gekühlten geeigneten Gefäß gut mischen. Nach 1min mit 600 µl 2) wiederum gut mischen und vor der Messung mindestens 10min bei 4°C inkubieren lassen.

A5.4 Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung nekrobiologischer Prozesse in HCE-Zellen

Die einzelnen Schritte für eine vollständige fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung einer HCE-Population sind:

A. Vorbereitung:

A.1. Zunächst wird die **durchschnittliche Größe einer einzelnen Zelle** in einer gewünschten Vergrößerung berechnet. Dazu werden Zellagglomerationen nach Abb. 5.10. segmentiert und deren Größe berechnet. Die Zellenzahl in den Agglomerationen wird manuell bestimmt und ein Durchschnittswert gebildet (N>100).

A.2. Die **Durchschnittsgröße von apoptotischen Körperchen** / Membranfragmentierungen in einer gewünschten Vergrößerung wird nach automatisierter Segmentierung AV-positiver Membranen aus den AV-Kanälen einer definiert apoptotischen Zellkultur berechnet. Es wird interaktiv ein Schwellwert für die Größe bestimmt, welche apoptotischen Körperchen / Membranfragmentierungen definierten.

A.3. Die **Durchschnittsgröße von früh/spät/sekundär- (fss-) nekrotischen Zellkernen** in der gewünschten Vergrößerung wird nach automatisierter Segmentierung der Zellkerne aus den PI-Kanälen einer definiert fss-nekrotischen Zellkultur berechnet. Es wird interaktiv ein Schwellwert für die Größe bestimmt, welche fss-nekrotische Zellkerne definiert.

B. Auswertung:

B.1. Im Durchlichtkanal werden Zellagglomerationen wie unter A.1. segmentiert [Abb.5.10.].

B.2. Im Fluoreszenzbild des AV-FITC-Kanals wird eine Segmentierung gewählt, welche AV-positive und AV-negative Membranbereiche definieren.

B.3. Im Fluoreszenzbild des PI-Kanals wird eine Segmentierung gewählt, welche PI-positive und PI-negative Kernbereiche definieren.

Automatisiert wird nun in einer Bildserie berechnet:

1. Aus A.1. und B.1. wird die **gesamte Anzahl von Zellen** in jedem Bild berechnet.
2. Aus A.1., B.1. und B.2. wird berechnet, welcher Anteil der Zellen AV-positiv (*Apoptosis* oder späte/sekundäre *Necrosis*) und AV-negativ (‘unbeschädigt‘ oder frühe *Necrosis*) ist.
3. Aus A.3. und B.3. wird die Anzahl fss-nekrotischer Zellen berechnet.
4. Aus A.3. und B.2., B3. und B5. wird die Anzahl **früh-nekrotischer Zellen** berechnet: PI-positive Zellkerne deren Fläche zu weniger als 20% mit AV-positiven Membranen bedeckt ist.
5. Aus A.3. und B.2., B3. und B5. wird die Anzahl **spät/sekundär-nekrotischer Zellen** berechnet: PI-positive Zellkerne deren Fläche zu mehr als 20% mit AV-positiven Membranen bedeckt ist.
6. Aus A.4. bis A.8. ergibt sich die Anzahl der **apoptotischen Zellen** und die Anzahl der ‘unbeschädigten‘ Zellen.

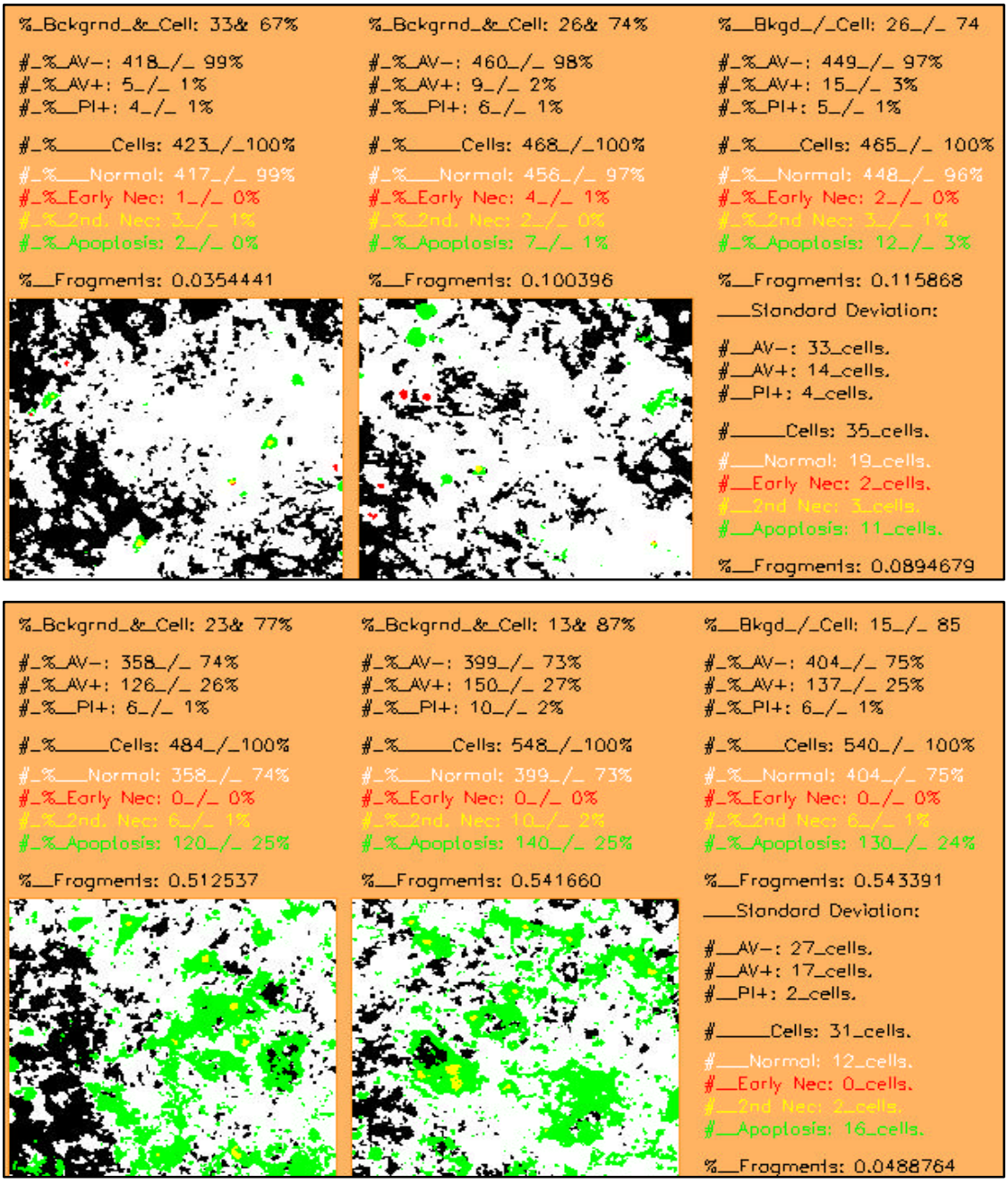
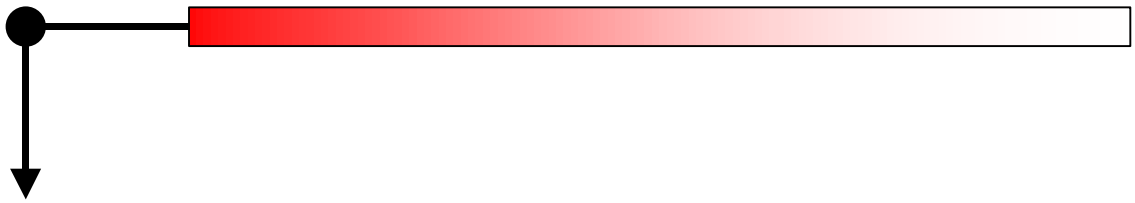


Abb.A5.2.: Beispiel einer Auswertung der Apoptosis, der frühen und der späten Necrosis und 'unbeschädigter' adhärenter HCE-Zellen. Die Bestimmung eines Zustandes erfolgt aus etwa 9 Feldern einer Zellkammer. Das Ergebnis der im Text beschriebenen Auswertung ist exemplarisch für jeweils 2 Bilder einer Situation gezeigt. **Oben:** Kontrolle. **Unten:** 2.5h nach Induktion mit 1µM Staurosporin. Die Daten über den Bildern kennzeichnen die jeweilige Bildstatistik. Die Daten rechts sind die Mittelwerte (oben) und die Standardabweichungen über die Gesamtheit der jeweils ausgewerteten Bilder.

7. Aus A.2. und B.2. wird der Anteil apoptotischer Körperchen / Membranfragmentierungen berechnet. Der Anteil ergibt sich aus der Anzahl der apoptotischen Körperchen (deren Größe ist kleiner als die Hälfte einer durchschnittlichen Zelle) und der Gesamtzahl der Zellen [Abb.A5.2.].

LITERATUR



Adams, J.M. & Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 218, 1322-1325.

Alt, F.L. (1962) Digital pattern recognition by moments. *JACM*, 9, 240-258.

Anderson, T.W., An introduction to multivariate statistical analysis. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1984.

Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308.

Atkinson, E.A. & Bleackley, R.C. (1995) Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells. *Crit Rev Immunol*, 15(3-4), 359-384.

Bagatolli, L.A. & Gratton, E. (2000) Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. *Biophysical Journal*, 78(1), 290-305.

Barinaga, M. (1998) Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. *Science*, 281(5381), 1302-1303.

Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., Melamed, M.R. & Darzynkiewicz, Z. (1999) Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry*, 35(3), 181-195.

Berczi, C., Bocsi, J., Lapis, K. & Balazs, G. (1997) Effect of the DNA ploidity on survival in patients with carcinoma of papilla of vater. *Acta Chir Hung*, 36(1-4), 27-29.

Betz, W.J. & Bewick, G.S. (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science*, 25.

Bevers, E.M., Comfurius, P. & Zwaal, R.F. (1993) Mechanisms involved in platelet procoagulant response. *Adv Exp Med Biol*, 344, 195-207.

Bigos, M., Baumgarth, N., Jager, G.C., Herman, O.C., Nozaki, T., Stovel, R.T., Parks, D.R. & Herzenberg, L.A. (1999) Nine color eleven parameter immunophenotyping using three laser flow cytometry. C*ytometry*, 36(1), 36-45.

Blumenthal, R., Sarkar, D.P., Durell, S., Howard, D.E. & Morris S.J. (1996) Dilation of the influenza hemagglutinin fusion pore revealed by the kinetics of individual cell-cell fusion events. *Journal of Cell Biology*, 135(1), 63-71.

Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F. & Koonin, E.V. (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J*, 11(1), 68-76.

Bracesco, N., Härtel, S. & Nunes, E., Posible control del volumen celular por el gen rad9 en *Saccharomyces cerevisiae*. VII Congreso Ibero-Americano de Biologia Celular, Montevideo, Uruguay, Oktober 1998.

Bretscher, M.S. (1972) Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature New Biol*, 236(61), 11-12.

Butler, J.W., Mutler, M.K. & Strout, A., Automatic classification of chromosomes. Ed. in Enslein, K., Data Aquisition and Processing in Biology and Medicine, 3, Pergamon Press, NY, 1964.

Castleman, K.R., Digital image processing. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NY, Chapter 19, 1996.

Chancerelle, Y., Mathieu, J. & Kergonou, J.F. (1994) Recognition and elimination of senescent erythrocytes: implication of antibodies specific for malonic dialdehyde-protein adducts, as demonstrated by flow cytometry. *Biochem Mol Biol Int*, 34(6), 1259-1270.

Chen, C.S., Martin, O.C. & Pagano, R.E. (1997) Changes in the spectral properties of a plasma membrane lipid analog during the first seconds of endocytosis in living cells. *Biophysical Journal*, 72(1), 37-50.

Cheng, K.H., Ruymgaart, Liu, L.I., Somerharju, P. & Sugar, I.P. (1994) Intramolecular excimer kinetics of fluorescent dipyrenyl lipids. *Biophysical J*, 67, 902-913.

Chong, P.L. & Wong, P.T. (1993) Interactions of Laurdan with phosphatidylcholine liposomes: a high pressure FTIR study. *Biochim Biophys Acta*, 1149(2), 260-266.

Connor, J., Pak, C.H., Zwaal, R.F., Schroit, A.J. (1992) Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *Jounal of Biological Chemistry*, 267(27), 19412-19417.

Coren, S. & Girguss, J.S., Seeing is deceiving: the psychology of visual illusions. Lawrence Erlbaum Associates, 1978.

Danielson, P.E. (1978) A new shape factor. *Computer and Image Processing*, 7, 292-299.

Darzynkiewicz, Z., Evanso, D., Staiano-Coico, L., Sharpless, T. & Melamed, M.R. (1979) Relation between RNA content and progression of lymphocytes through S phase cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76, 358-362.

Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T. & Traganos, F. (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27(1), 1-20.

Darzynkiewicz, Z., Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W. & Melamed, M.R. (1999a) Laser-scanning cytometry: a new instrumentation with many applications. *Exp Cell Res*, 25, 249(1), 1-12.

Darzynkiewicz, Z., Li, X. & Bedner, E. (1999b) Detection of DNA strand breakage in the analysis of apoptosis and cell proliferation by flow and laser scanning cytometry. *Methods Mol Biol*, 113, 607-619.

Davey, H.M., Jones, A., Shaw, A.D. & Kell, D.B. (1999) Variable selection and multivariate methods for the identification of microorganisms by flow cytometry. *Cytometry*, 35, 162-168.

Davidson, F. & Steller, H. (1998) Blocking apoptosis prevents blindness in Drosphilia retinal degeneration mutants. *Nature*, 392, 587-591.

De Duve, C., Die Zelle, Spektrum Verlag, Heidelberg, ISBN 3-922508-96-0, 1986.

Demandolx, D. & Davoust, J. (1997) Multiparameter image cytometry: from confocal micrographs to subcellular fluorograms. *Bioimaging*, 5, 159-169.

Deubel, H. & Hauske, G., The programming of visually guided Saccades. In: Processing Structures of Perception and Action. VCH Verlagsgesellschaft. 1998.

Devaux, P.F. (1991) Static and dynamik asymmetry in cell membranes. *Biochemistry*, 48, 47-71.

Deye, J.F., Berger, T.A. & Anderson, A.G. (1990) Nile red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids. *Anal Chem*, 62, 615.

Diaz, C. & Schroit, A.J. (1996) Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J Membr Biol*, 151(1), 1-9.

Dorst, L. & Smeulders, A.W.M., Length estimators compared, in Pattern Recognition in Practice II. Ed. E.S. Gelsema and L.N. Kanal, Elsevier Science: Amsterdam, pp: 73-80, 1986.

Dumaz, N., Drougard, C., Sarasin, A. & Daya-Grosjean, L. (1993) Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficientxeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci*, 90(22), 10529-10533.

Ebeling, W., Freund, J. & Schweizer, F., Komlexe Strukturen: Entropie und Information. B. G. Teubner Verlag, Stuttgart, Leibzig. (1998).

Earnshaw, W.C. (1999) Apoptosis. A cellular poison cupboard. *Nature*, 397(6718), 387-389.

Ellis, R.E., Yuan, J.Y. & Horvitz, H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*, 7, 663-698.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S. (1998) Related articles, protein, nucleotide. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43-50.

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. & Henson, P.M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148(7), 2207-2216.

Fadok, V.A., Laszlo, D.J., Noble, P.W., Weinstein, L., Riches, D.W. & Henson, P.M. (1993) Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *J Immunol*, 151(8), 4274-4285.

Fine, J., Interacción a los análisis de datos multidimensionales a partir de ejemplos. PRESTA, Europe Amérique Latine, 1996.

Förster, T. & Hoffmann, G. (1971) Zeitung für Physikalische Chemie. Wiesbaden, 75, 63-76.

Freeman, H., Boundery encoding and processing. In Picture Processing and Psychopictorics. Ed. B.S. Lipkin and Rosenfeld, Academic Press: New York, pp: 241-266, 1970.

Friedberg, E.C., Walker, G.C. & Siede, W., DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, DC, 1994.

Friedberg, I., Belzer, I., Oged-Plesz, O. & Kuebler, D. (1995) Activation of cell growth inhibitor by ectoprotein kinase-mediated phosphorylation in transformed mouse fibroblasts. *Jounal of Biological Chemistry*, 270(35), 20560-20567.

Frisby, J.P., Seeing: illusion, brain and mind. Oxford, England: Oxford University Press, 160, 1980.

García-Ruiz, C., Colell, A., Mari, M., Morales, A. & Fernandez-Checa, J.C. (1997) Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *Jounal of Biological Chemistry*, 25, 272(17), 11369-11377.

Gocze, P.M. & Freeman, D.A. (1994) Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 leydig tumor cells. *Cytometry*, 17, 151.

Godar, D.E. (1999) UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *Invest Dermatol*, 112(1), 3-12.

Gonzales, R.C. & Woods, R.E., Digital image processing. Reading, Massachusetts: Addison-Wesley, 716, 1990.

Gordon, G.W., Chazotte, B., Wang, X.F. & Herman, B. (1995) Analysis of simulated and experimental fluorescence recovery after photobleaching. Data for two diffusing components. *Biophysical Journal*, 68(3), 766-778.

Gottesman, M.M. & Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*, 62, 385-427.

Grassberger, P., Badii, R. & Politi, A. (1988) Scaling laws for invariant measures on hyperbilic and nonhyperbilic attractors. *J Stat Phys*, 51, 135-178.

Green, D.R. & Reed J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309-1312.

Gregory, R.L., The intelligent eye. Mc-Graw-Hill, 1970.

Haralick, R.M., Schanmugan, K. & Dinstein, I. (1973) Textural features for image classification. *IEEE SMC*, 3, 610-621.

Haralick, R.M. (1979) Statistical and structural approaches to textures. *Proc IEEE*, 67, 786-804.

Härtel, S., Experimentell induzierte Fluiditätsänderung von Membranen im Zusammenhang mit der Induktion von Apoptosis an Thymozyten. Diplomarbeit Universität Bremen, 1996.

Härtel, S., Diehl, H.A. & Ojeda, F. (1998a) Methyl-beta-cyclodextrins and liposomes as watersoluble carriers for cholesterol incorporation into membranes and its evaluation by a microenzymatic fluorescence assay and membrane fluidity-sensitive dyes. *Anal Biochem*, 258(2), 277-284.

Härtel, S., Ojeda, F. & Diehl, H.A. (1998b) Cholesterol induced variations of membrane dynamics related to the induction of apoptosis in mouse thymocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 74(5), 607-615.

Härtel, S., Rojas, R., Goicoechea, O. & Räth, C. (1999) Identification and classification of di- and triploid erythrocytes by multiparameter image analysis: A new method for the quantification of triploidization rates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Submitted to *Aquaculture*.

Harwood, D., Subbarao, M. & Davis, L.S. (1985) Texture classification by local rank correlation. *CVGIP*, 32, 404-411.

Hauske, G., Systemtheorie der visuellen Wahrnehmung. B.G. Teubner, Stuttgart, 1994.

Hill, K.L., Catlett, N.L & Weisman., L.S. (1996) Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 135, 1535.

Hough, P.V.C., A method and means for recognizing complex pattern. US Patent Application No. 3069654, 1962.

Inaba, N., Sato, N., Ijchi, M., Fukazawa, I., Nito, A., Takamizawa, H., Luben, G & Bohn, H. (1984) The immunocytochemicel location of two membrane associated placental proteins in human and cynomolgus monkey placentae. *Tumor Biol*, 5, 75-85.

Jacobsen, K., Sheets, E.D. & Simon, R. (1995) Revisiting the fluid mosaic modell of membranes. *Science*, 268, 1441-1442.

Jessel, R., Härtel, S., Tichonova, S. & Diehl, H.A., (1999) Time Dependent Evidence of Apoptotic Markers of EL-4 cells exogeneously induced to apoptosis. Submitted to *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA).

Johann, S., Blumel, G., Lipp, M. & Forster, R. (1995) A versatile flow cytometry-based assay for the determination of short- and long-term natural killer cell activity. *J Immunol Methods*, 185(2), 209-216.

Kamentsky, L.A. & Kamentsky, L.D. (1991) Microscope-based multiparameter laser scanning cytometer yielding data comparable to flow cytometry data. *Cytometry*, 12(5), 381-387.

Kastan, M.B. & Kuerbitz, S.J. (1993) Control of G1 arrest after DNA damage. *Environ Health Perspect*, Review, 101 Suppl 5, 55-58.

Kerr, J.F. (1971) Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol*, 105(1), 13-20.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257.

Kessel, D., Luo, Y., Mathieu, P. & Reiners, J.J. (2000) Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. *Photochem Photobiol*, 71(2), 196-200.

Keszenman, D.J., Salvo, V.A. & Nunes, E. (1992) Effects of bleomycin on growth kinetics and survival of *Saccharomyces cerevisiae*: a model of repair pathways. *J Bacteriol*, 174(10), 3125-3132.

Klausner, R.D. & Wolf, D.E. (1980) Selectivity of fluorescent lipid analogues for lipid domains. *Biochemistry*, 19(26), 6199-6203.

Klockmann, H.C., Untersuchungen zum Einfluß von Intermolekularen Wechselwirkungen auf die Eignung von Pyrenen als Sonden zur Messung der lateralen Diffusion in biologischen Membranen. Dissertation, Bremen, 1993.

Korlach, J., Schwille, P., Webb, W.W. & Feigenson, G.W. (1999) Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(15), 8461-8466.

Kulpa, Z., Area and perimeter measurement of blobs in discrete binary pictures. Computer Vision, Graphics and Image Processing, 6, pp: 434-454, 1977.

Kung, C.E. & Reed, J.K. (1986) Microviscosity measurements of phospholipid bilayers using fluorescent dyes that undergo torsional relaxation. *Biochemistry*, 25, 6114-6121.

Kung, C.E. & Reed, J.K. (1989) Fluorescent molecular rotors: a new class of probes for tubulin structure and assembly. *Biochemistry*, 28(16), 6678-6686.

Kutchai, H., Cooper, R.A. & Forster, R.E. (1980) Effect of anesthetic alc. and alt. in the level of membrane cholesterol in erytrocyte water permeability. *Bioch et Biophys Acta*, 600, 542-552.

Lakowicz, J.R., Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York, 1983.

Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H. & Earnshaw, W.C. (1995) Studies of the lamin proteasereveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic excecution. *Proc Natl Acad Sci* USA, 92, 9042-9046.

Lee, J., Gustafsson, M., Magnusson, K.E. & Jacobson, K. (1990) The direction of membrane lipid flow in locomoting polymorphonuclear leukocytes. *Science*, 247, 1229.

Lehmann, T., Oberschelp, W., Pelikan, E. & Repges, R., Bildverarbeitung für die Medizin. Springer-Verlag, 1997.

Lenz, B.R. (1989) Membran fluidity as detected by DPH probes. *Chemestry and Physics of Lipids*, 50, 171-190.

Li, L.H., Hensen, M.L., Zhao, Y.L. & Hui, S.W. (1996) Electrofusion between heterogeneous-sized mammalian cells in a pellet: potential applications in drug delivery and hybridoma formation. *Biophysical Journal*, 71(1), 479-486.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. & Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489.

Liu ,W., Staecker, H., Stupak, H., Malgrange, B., Lefebvre, P. & Van De Water, T.R. (1998a) Caspase inhibitors prevent cisplatin-induced apoptosis of auditory sensory cells. *Neuroreport*, 9(11), 2609-2614.

Liu, X., Li ,P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T. & Wang, X. (1998b) The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15), 8461-8466.

Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. & Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441-446.

Lohne, K., Urdal, P., Leren, T.P., Tonstad, S. & Ose, L. (1995) Standardization of a flow cytometric method for measurement of low-density lipoprotein receptor activity on blood mononuclear cells. *Cytometry*, 20(4), 290-295.

MacDonald, A.G., Wahle, K.W.J., Cossins, A.R. & Behan, M.K. (1987) Temperature, pressure and cholesterol effects on bilayer fluidity, a comparison of pyrene excimer/monomer ratios with the steady-state fluorescence polarization of diphenylhexatriene in liposomes and microsomes. *Biochim Biophys Acta*, 938, 231-242.

MacGregor, R.B. & Weber, G. (1981) Fluorophores in polar media: spectral effects of the Langevin distribution of electrostatic interactions. *Ann N.Y. Acad Sci*, 366, 140-154.

Maity, A., McKenna, W.G. & Muschel, R. J. (1994) The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiother Oncol*, 31(1), 1-13.

Mandelbrot, B.B., The Fractal Geometry of Nature, Freeman, N.Y, 1983.

Martin, O.C. & Pagano, R.E. (1987) Transbilayer movement of fluorescent analogs of phosphatidyl-serine and phosphatidylethanolamine at the plasma membrane of cultured cells. Evidence for a protein-mediated and ATP-dependent process(es). *Jounal of Biological Chemistry*, 262(12), 5890-5898.

Martin, S. J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., Van Schie, R.C., LaFace, D.M. & Green, D. R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 182(5), 1545-1556.

Matko, J. & Eddin, M. (1997) Energy transfer methods for detecting molecular clusters on cell surfaces. *Meth Enzymol*, 278, 444-462.

McIntosh, T.J. (1978) The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 513(1), 43-58.

McMullen, T.P.W. & McElhaney, R.N. (1994) New aspects of the interaction of cholesterol with DMPC bilayers as revealed by high-sensitive differential scanning calometry. *Biochim Biophys Acta*, 1234, 90-98.

Merlo, S. & Yager, P. (1990) Optical method for monitoring the concentration of general anesthetics and other small organic molecules. An example of phase transition sensing. *Anal Chem*, 62(24), 2728-2735.

Meyaard, L., Otto, S.A., Schuitemaker, H. & Miedema, F. (1992) Effects of HIV-1 Tat protein on human T cell proliferation. *Eur J Immunol*, 22(10), 2729-2732.

Morfill, G.E. & Schmidt, G. (1994) Komplexitätsanalyse in der Kardiologie: Fahndung nach Frühzeichen des plötzlichen Hertodes. *Phys Bl*, 50(2), 156-160.

Mukae, N., Enari, M., Sakahira, H., Fukuda, Y., Inazawa, J., Toh, H. & Nagata, S. (1998) Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16), 9123-9128.

Mukherjee, S., Soe, T.T. & Maxfield, F.R. (1999) Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *Journal of Cell Biology*, 144(6), 1271-1284.

Murch, G.M., Visual and auditory perception. New York: Bobbs–Merrill Company, Inc. 403, 1973.

Muthing, J. & Heitmann, D. (1993) Nondestructive detection of gangliosides with lipophilic fluorochromes and their employment for preparative high-performance thin-layer chromatography. *Anal Biochem*, 208, 121.

Nagata, S. & Golstein, P. (1995) The Fas death factor. *Science*, 267(5203), 1449-1456.

Neamati, N., Fernandez, A., Wright, S., Kiefer, J. & Mc Coney, D.J. (1995) Degradation of lamin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *J Immunol*, 154, 3788-3795.

Netten, H., Automated image analysis of FISH-stained cell nuclei. PHD Thesis Delft University of Technology, 1997.

Nordmeier, V. & Schlichting, H.J. (1996) Auf der Suche nach Strukturen komplexer Phänomene. PdN-Ph., 1/45, 22-28.

Nunes, E. & Gelós, U., Proliferación celular y su pertubación: aspectos cuantitativos y moleculares, Oficina del Libro, AFM, Montevideo, 1995.

Nunes, E. & Siede, W. (1996) Hyperthermia and paraquat induced G1 arrest in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is independent od the RAD9 gene.

Ojeda, F., Guarda, M. I., Maldonado, C. & Folch, H. (1992a) A flow-cytometric method to study DNA fragmentation in lymphocytes. *J Immunol Methods*, 152(2), 171-176.

Ojeda, F., Guarda, M.I., Maldonado, C., Folch, H. & Diehl, H. (1992b) Role of protein kinase-C in thymocyte apoptosis induced by irradiation. *International Journal of Radiation Biologyl*, 61(5), 663-667.

Op den Kamp, J.A. (1979) Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem*, 48, 47-71.

Parasassi, T., De Stasio, G., D'Ubaldo, A. & Gratton, E. (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 57(6), 1179-1186.

Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R.M. & Gratton, E. (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 60, 179.

Parasassi, T., Ravagnan, G., Rusch, R.M. & Gratton, E. (1993) Modulation and dynamics of phase properties in phospholipid mixtures detected by laurdan fluorescence. *Photochem Photobiol*, 57(3), 403-410.

Parasassi, T., Di Stefano, M., Loiero, M., Ravagnan, G. & Gratton, E. (1994a) Influence of cholesterol on phospholipid bilayers phase domains as detected by laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 66(1), 120-132.

Parasassi, T., Di Stefano, M., Loiero, M., Ravagnan, G. & Gratton, E. (1994b) Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipid bilayers: a fluorescence study using laurdan probe. *Biophysical Journal*, 66, 763.

Parasassi, T., Giusti, A.M., Raimondi, M. & Gratton, E. (1995) Abrupt modifications of phospholipid bilayer properties at critical cholesterol concentrations. *Biophysical Journal*, 68(5), 1895-1902.

Parasassi, T., Gratton, E., Yu, W., Wilson, P. & Levi, M. (1997) Two-photon fluorescence microscopy of laurdan generalized polarization domains in model and natural membranes. *Biophysical Journal*, 72(6), 2413-2429.

Pepper, V., 'Atlantic salmon sterilization and triploidy research'. 101001 Fisheries and Oceans Canada, Northwest Atlantic Fisheries Centre, Icar-id: 95000465, St. John's, Newfoundland, A1C 5X1, 1997.

Polyak, K., Xia, Y., Zweier J.L., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 389(6648), 300-305.

Poot, M., Gibson, L.L. & Singer, V.L. (1997) Detection of apoptosis in Live Cells by MitoTracker Red CMXRos and SYTO dye flow cytometry. *Cytometry*, 27, 358-364.

Poppe, B., Kirchner, G. & Fischer, H., Source detection and separation of tomographic artifacts in nuclear medicine imaging by the concept of weighted scaling indices. Proceedings of Medical Imaging 1999, Dan Diego, USA.

Prives, C. (1993) Doing the right thing: feedback control and p53. *Curr Opin Cell Biol*, 5(2), 214-218.

Raff M. (1998) Cell suicide for beginners. *Nature*, 396(6707), 119-122.

Ragnarson, B., Bengtsson, L. & Haegerstrand, A. (1992) Labeling with fluorescent carbocyanine dyes of cultured endothelial and smooth muscle cells by growth in dye-containing medium. *Histochemistry*, 97(4), 329-333.

Ramanathan, R., Wilkemeyer, M.F., Mittal, B., Perides, G. & Charness, M.E. (1996) Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. *Journal of Cell Biology*, 133(2), 381-390.

Rao, A.R. & Lohse,G.L. (1993) Identifying high level features of texture perception. *CVGIP*, 55, 128-233.

Räth, C. & Morfill, G. (1997) Texture detection and texture discrimination with anisotropic scaling indices. *J Opt Soc Am*, 12, 1-8.

Rew, D.A., Reeve, L.J. & Wilson, G.D. (1998) Comparison of flow and laser scanning cytometry for the assay of cell proliferation in human solid tumors. *Cytometry*, 33(3), 355-361.

Riede, U.N. & Schäfer, H.E., Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thime Verlag, Stuttgart, 1993.

Rock,. I., Wahrnehmung : vom visuellen Reiz zum Sehen und Erkennen. Heidelberg, Spektrum der Wissenschaft, 1985.

Rothberg, K.G., Ying, Y.S., Kamen, B.A. & Anderson, R.G.W. (1990) Cholesterol controls the clustering of the glycophospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *Journal of Cell Biology*, 111, 2931-2938.

Rowley, A., Johnston, G.C., Butler, B., Werner-Washburn, M. & Singer, R.A. (1993) Heat shock mediated cell cycle blockage and G1 cyclin expression in *Saccharomyces cerevisiae. Molecular Cell Biology*, 13, 1034-1041.

Rubenstein, J.L.R., Smith, B.A & McConnell, H.M. (1979) Lateral diffusion in binary mixtures of cholesterol and phosphatidylcholines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 15-18.

Sackett, D.L. & Wolff, J. (1987) Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein. *Anal Biochem*, 167, 228-234.

Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y. & Tsujimoto, Y. (1999) Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*, 401(6749), 168-173.

Sandhoff, K. & Klein, A. (1994) Intracellular trafficing of glycosphingolipids: role of sphingolipid activatior proteins in the topology of endocytosis and lysomal digestion. *FEBS Lett*, 346, 103-107.

Sawada, S., Lio, T., Hayashi, Y. & Takahashi, S. (1992) Fluorescent rotors and their applications to the study of G-F transformation of actin. *Anal Biochem*, 204, 110-117.

Scaduto, R.C. Jr. & Grotyohann, L. (1999) Measurement of mitochondrial potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical Journal*, 76, 469–477.

Schon, A. & Freire, E. (1989) Thermodynamics of intersubunit interactions in cholera toxin upon binding to the oligosaccharide portion of its cell surface receptor, ganglioside GM1. *Biochemistry*, 28(12), 5019-5024.

Skalka, M., Cejkova, M. & Matyasova, J. (1976) The sensitivity of chromatin from thymuses and spleens of irradiated mice to alkaline solutions. *Folia Biol* (Praha), 22(5), 335-342.

Schwille, P., Haupts, U., Maiti, S. & Webb, W.W. (1999) Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophysical Journal*, 77(4), 2251-2265.

Schulz, C.M., Who do you think you are, Charlie Brown? Fawcett World Library, N.Y., 1958.

Scott, J. (1999) Heart disease. Good cholesterol news. *Nature*, 400(6747), 816-819.

Seigneuret, M. & Devaux, P.F. (1984) ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(12), 3751-3755.

Shepherd, J.C. & Buldt, G. (1979) The influence of cholesterol on head group mobility in phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, 558(1), 41-47.

Shorte, S.L., Stafford, S.J., Collett, V.J. & Schofield, J.G. (1995) Simultaneous measurement of Ca^{2+} and secretion-coupled membrane turnover, by single cell fluorescence microscopy. *Cell Calcium*, 18, 440.

Simons, K. & Ikonen, E. (1997) Funktional rafts in membranes. *Nature*, 387, 569-570.

Singer, S.A. & Nicolson G.L. (1972) The fluid mosaik model of the structure of the cell membranes. *Science*, 173, 720-731.

Slichenmyer, W.J., Nelson, W.G., Slebos, R.J. & Kastan, M.B. (1993) Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res*, 53(18), 4164-4168.

Spink, C.H., Yeager, M.D. & Feigenson, G.W. (1990) Partitioning behavior of indocarbocyanine probes between coexisting gel and fluid phases in model membranes. *Biochim Biophys Acta*., 1023(1), 25-33.

Spotl, L., Sarti, A., Dierich, M.P. & Most, J. (1995) Cell membrane labeling with fluorescent dyes for the demonstration of cytokine-induced fusion between monocytes and tumor cells. *Cytometry*, 21(2), 160-169.

Stewart, J.C.M. (1980) Colorimetric determination of Phospholipids with ammonium ferrocyanate, *Anal Biochem*, 104, 10-14.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. & Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441-446.

Suzuki, S., Tsuchiya, A., Hara, K. & Abe, R. (1997) Nuclear DNA content, S-phase fraction analysis and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) of normal and hyperplastic/neoplastic parathyroid glands. *Fukushima J Med Sci*, 43(1), 41-50.

Theiler, E. (1990) Estimating fractal dimension. *J Opt Soc Am A*, 7(6), 1055-1072.

Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.

Tinnemans, M.M., Lenders, M.H., Ten Velde, G.P., Ramaekers, F.C. & Schutte, B. (1995) Alterations in cytosceletal and nuclear matrix-associated proteins during apoptosis. *Eur Journal of Cell Biology*, 68, 35-46.

Tizhoosh, H.R. Fuzzy-Bildverarbeitung: Einführung in Theorie und Praxis. Springer, 1998.

Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J.Y., Chaudun, E., Treton, J., Courtois, Y. & Counis, M.F. (1998) L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor. *Molecular Cell Biology*, 18(6), 3612-3619.

Van Engeland, M., Ramaekers, F.C.S., Schutte, B. & Reutelingsperger, C.P.M. (1996) A novel assay to measure loss of membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*, 24, 131-139.

Van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. & Reutelingsperger, C.P. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Review. *Cytometry*, 31(1), 1-9.

Vancompernolle, K., Van Herreweghe, F., Pynaert, G., Van de Craen, M., De Vos K, Totty, N., Sterling, A., Fiers, W., Vandenabeele, P. & Grooten, J. (1998) Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett*, 6, 438(3), 150-8.

Van Meer, G. (1989) Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol*, 5, 247-275.

Van Vliet, L.J., Grey-scale measurements in multi-dimensional digitized images. PHD Thesis Delft University of Technology, 1993.

Vanags, D.M., Porn-Ares, M.I., Coppola, S., Burgess, D.H. & Orrenius, S. (1996) Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *Jounal of Biological Chemistry*, 271(49), 31075-31085.

Varma, R. & Mayor, S. (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, 394(6695), 798-801.

Vaskowsky, V.E. & Kostetsky, E.Y. (1968) *Journal of lipid research*, 9, 396.

Ventouras, E., Papageorgiu, C., Uzunoglu, N.K., Rabavilas, A. & Stefanis, C., Performance of hopfield ANN in simulating optical illusions: the Müller-lyer paradigm. In: Artificial Neuronal Networks 2, Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam, 1992.

Verhoven, B., Schlegel, R.A. & Williamson, P. (1995) Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*, 182(5), 1597-1601.

Vida, T.A. & Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *Emr Journal of Cell Biology*, 128, 779.

Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y. & Lanzavecchia, A. (1999) T Lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science*, 283, 680-682.

Vossepoel, A.M. & Smeulders, A.W.M., Vector code propabilities and metrication error in the representation of straight lines of finite lenght. Computer Graphics and Image Processing, 20, pp: 347-364, 1982.

Weber, F.J. & Farris, G. (1979) Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-Propionyl-2-dimethylaminonaphthalen. *Biochemistry*, 18, 3075.

Wietzorrek, J., Plesnila, N., Baethmann, A. & Kachel, V. (1999) A new multiparameter flow cytometer: optical and electrical cell analysis in combination with video microscopy in flow. *Cytometry*, 35(4), 291-301.

Wolf, D.E., Scott, B.K. & Millette, C.F. (1986) The development of regionalized lipid diffusibility in the germ cell plasma membrane during spermatogenesis in the mouse. *Journal of Cell Biology*, 103(5), 1745-1750.

Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756), 555-556.

Wyllie, A.H. (1998) An endonuclease at least. *Nature*, 391, 10-21.

Yeagle, P.L. (1981) Cholesterol rotation in phospholipid vesicles as observed by 13C-NMR. *Biochim Biophys Acta*, 640(1), 263-273.

Young, I.T., Walker, J.E. & Bowie, J.E. (1974) An analysis technique for biological shape. *Information and Control*, 25, 357-370.

Young, I.T., Gerbrands, J.J. & Van Vliet, L.J., Fundamentals of image processing. Cip-Data-Koninklijke Bibliotheek den haag, ISBN 90-75691-01-7, 19-32, 1995 & 1997.

Yu, W., So, P.T., French, T. & Gratton, E. (1996) Fluorescence generalized polarization of cell membranes: a two-photon scanning microscopy approach. *Biophysical Journal*, 70(2), 626-636.

Zachowski, A., Herrmann, A., Paraf, A. & Devaux, P.F. (1987) Phospholipid outside-inside translocation in lymphocyte plasma membranes is a protein-mediated phenomenon. *Biochim Biophys Acta*, 897(1), 197-200.

Zachowski, A., Henry, J.P. & Devaux P.F. (1989) Control of transmembrane lipid asymmetry in chromaffin granules by an ATP-dependent protein. *Nature*, 340(6228), 75-76.

Zamzami, N. & Kroemer, G. (1999) Condensed matter in cell death. *Nature*, 401(6749), 127-128.

Zanello, L.P., Aztiria, E., Antollini, S. & Barrantes, F.J. (1996) Nicotinic acetylcholine receptor channels are influenced by the physical state of their membrane environment. *Biophysical Journal*, 70 (5), 2155-2164.

Zeise, E., Stress–induzierte Apoptose bei Ratten IPC-81–Leukämiezellen: Vergleichende Untersuchung bei hyperthermisch vorbehandelten und nicht hyperthermisch vorbehandelten Zellen. Dissertation, Bremen, Dezember 1999.

Zeng, J. & Chong, P.L. (1995) Effect of ethanol-induced lipid interdigitation on the membrane solubility of prodan, acdan & laurdan. *Biophysical Journal*, 68(2), 567-573.

Zorn-Kruppa, M., Tykhonova, S., Härtel, S., Engelke, M. & Diehl, H.A., Staurosporine-induced apoptosis in human cornea epithelial cells in vitro, 3rd International Symposium on Ocular Pharmacology and Pharmaceutics–ISOPP, Lisbon, Portugal, 10-13 Februar, 2000.

Zwaal, R.F. & Schroit, A.J. (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 89(4), 1121-1132.

CURRICULUM VITAE:

Name und Vorname: Härtel Steffen

Geburtsdatum: 24.11.1968

Geburtsort: Frankfurt (Main) Deutschland

Schule:

Grundschule:	07.1975 / 06.1981	Heiligenstockschule in Hofheim am Taunus
Gymnasium:	07.1981 / 06.1985	Gesamtschule am Rosenberg
	07.1985 / 06.1986	Mills E. Godwin High School, Richmond, Virginia, USA
	07.1986 / 06.1989	Abschluß der allgemeinen Hochschulreife an der gymnasialen Oberstufe Hofheim

Universitätsausbildung:

Grundstudium	10.1989 / 09.1991	J.W. von Goethe Universität Frankfurt am Main
Physik	10.1991 / 09.1992	Studium der Mathematik, Physik und der Volkswirtschaften an der 'Universidad Nacional de Córdoba', Córdoba, Argentinien
Hauptstudium	10.1992 / 08.1995	Universität Bremen
Physik	09.1995 / 03.1996	Forschungsaufenthalt an der 'Universidad Austral de Chile', Valdivia, Chile. Teilfinanziert durch Stipendien des DAAD und des Bremer Studienfonds
	04.1996 / 10.1996	Abschluß des Studiums der Physik an der Universität Bremen
Dissertation	01.1997 / 11.1997	Inst. f. exp. Physik an der Universität Bremen
Physik:	12.1997 / 09.1998	Forschungsaufenthalte an der 'Universidad Austral de Chile', Valdivia, Chile. 'Facultad de Medicina, Dept. de Biofísica', Montevideo, Uruguay. Finanziert durch den DAAD
	10.1998 / 01.2000	Inst. f. exp. Physik (Biophysik) an der Universität Bremen

Posterbeiträge bei Tagungen:

Härtel, S., & Diehl, H., Radiation induced membrane effects in thymocyte apoptosis. *XIIth International Biophysics Congress.* Amsterdam, Holland, 11-16 August, 1996.

Härtel, S., & Diehl, H., Interactive image processing as a tool to link statistical characterisations of cell communities with individual microscopic observations. *2nd Conference on Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes*. Prague, Tschechien, 9-12 April, 1997.

Härtel, S., Diehl, H., Jessel, R., Düßmann, H., & Ojeda, F., Quantitative Multiparameter Image Analysis to Detect Early Apoptotical Events in Thymocytes. *International Symposium of Biological Applications of Confocal Microscopy*. Belo Horizonte, Brasil, 6-8 April, 1998.

Düßmann, H., Härtel, S., & Mayer, A., Confocal Imaging of Ion-Activities in Living Cell Lines of Glial Origin, *26th Göttinger Neurobiology Conference*, Germany, 1998.

Härtel, S., Zeise, E., Rojas, R., Goicoechea, O. & Diehl, H., Flow Cytometry and Quantitative Multiparameter Microscopy: Competing and Complementing Methods for the Detection of Apoptosis and for the Quantification of Triploid Erythrocytes of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), 14th Annual Clinical Applications of Cytometry, Palm Springs, CA, USA, 26-29 September, 1999.

Zorn-Kruppa, M., Tykhonova, S., Härtel, S., Engelke, M., & Diehl, H., Staurosporine-induced apoptosis in human cornea epithelial cells in vitro, 3rd International Symposium on Ocular Pharmacology and Pharmaceutics- ISOPP, Lisbon, Portugal,10-13 Februar, 2000.

Vorträge bei Tagungen:

Härtel, S., Guarda, M., Diehl, H., Ojeda, F., & Goicoechea, O. Quantitative digitale Multiparameter Fluoreszenz-Mikroskopie und Fluß-Zytometrie: Ein Methodenvergleich zum Separationsvermögen di- und triploider Lachserythrozyten sowie der Bestimmung spontaner Apoptosisraten in frisch isolierten Mäusethymozyten. *11th Heidelberg Cytometry Symposium*, Annual Meeting of the German Society of Cytometry, 22. – 24. Oktober 1998.

Bracesco, N., Härtel, S., Nunes, E., Posible Control del volumen celular por el gen rad9 en saccharomyces cerevisiae. *VII* Congreso Ibero-Americano de Bíologia Celular, Montevideo Uruguay, 26-30 de Octubre 1998.

Diehl, H., Jessel, R., Härtel, S., Tykhonova, S., & Socaciu, C., Cell membranes: Target or chain link in the process of exogenously induced apoptosis, ICCF: NATO Science Conference Bukarest, Romenia, 21.-24. Oktober 1999.

Socaciu, C., Diehl, H., Lancrajan, I., Härtel, S., Zorn-Kruppa, M., Liposomes as biovavailable carriers for carotenoid molecules: Effects on natural membrane properties. ICCF: NATO Science Conference Bukarest, Romenia, 21.-24. Oktober 1999.

Veröffentlichungen in Zeitschriften:

Härtel, S., Diehl, H., & Ojeda, F. (1998) Methyl-beta-cyclodextrins and liposomes as water-soluble carriers for cholesterol incorporation into membranes and its evaluation by a microenzymatic fluorescence assay and membrane fluidity-sensitive dyes. *Analytical Biochemistry*, 258(2), 277-84.

Härtel, S., Ojeda, F., & Diehl, H. (1998) Cholesterol induced variations of membrane dynamics related to the induction of apoptosis in mouse thymocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 74(5), 607-15.

Härtel, S., Rojas, R., Goicoechea, O., & Räth C. (1999) Identification and Classification of Di- and Triploid Erythrocytes by Multiparameter Image Analysis: A New Method for the Quantification of Triploidization Rates in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Submitted to *Aquaculture*.

Jessel, R., Härtel, S., Tichonova, S., & Diehl, H. (1999) Time Dependent Evidence of Apoptotic Markers of EL-4 cells exogeneously induced to apoptosis. Submitted to *Biochimica et Biophysica Acta.*

Härtel, S., Haas, M., Tichonova, S., & Diehl, H. (1999) Membrane Fluidity Sensitive Fluorescent Dyes and Their Application in Fluorescence Microscopy. In preparation for *Biophysical Journal*.

Rezensionen für die Zeitschrift: '*International Journal of Radiation Biology*':

- 'Lipid composition of nuclear, microsomal and mitochondrial fractions of liver after chronic low dose-rates gamma-irradiation of rats.' (1999)
- 'Ionizing radiation modifies liver cholesterol metabolism and plasma lipoproteins in Syrian hamster.' (1999)
- 'Structural Radio-Induced membrane modifications: A potential Bioindicator of ionising radiation exposure.' (1999)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle folgt ein großer, besonders herzlicher Dank an alle, die mit gutem Willen etwas zur Gestalt der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Horst A. Diehl möchte ich, neben allen grundlegenden Dingen, besonders für seine stete Aufmerksamkeit und seinen unermüdlichen Einsatz bei der Unterstützung verschiedener Projekte danken. Das von ihm kreierte wissenschaftliche Ambiente bot eine verläßliche und zugleich inspirierende Grundlage für die Verwirklichung der vorgestellten Arbeiten.

An Herrn Prof. Dr. Detlef Gabel ist mein Dank gerichtet, da er mit Interesse und ohne zu zögern meiner überfallartig geäußerten Bitte nachkam, die vorliegende Arbeit zügig zu begutachten.

Frau Dr. Michaela Zorn-Kruppa möchte ich sehr herzlich für ihr kritisches, detailliertes und klares Auge bei der Durchsicht großer Teile dieser Arbeit danken. Vor allem Ihre freundliche und gewissenhafte Art bei gemeinsamen Arbeiten und Diskussionen waren für mich von großem Wert.

Herrn Dipl. Phys. Heiko Düssmann danke ich für die gute Zusammenarbeit in allen Bereichen, besonders bei der Entwicklung des temperierbaren und begasbaren mikroskopischen Zellkammerobjektträgers. Die in einigen Messungen verwendete Objektivheizung wurde vom ihm zur Verfügung gestellt.

Frau Christina Kernst hat durch erfreulichen Einfallsreichtum zur Durchführung einer Reihe experimenteller Arbeiten beigetragen. Ihre breite Laborerfahrung war von großem Wert. Frau Edda Toma und Herrn Marcus Haas danke ich für die Durchführung spektroskopischer Messreihen.

Frau Dr. Svitlana Tykhonova und Dr. Maria Engelke gilt mein Dank für Ihre stete Diskussionsbereitschaft, für gute Tips und die immer angenehme Arbeitsatmosphäre. Frau Dr. Elke Zeise danke ich für die interessante, leider zu kurze Zusammenarbeit mit apoptotischen IPC-81-Zellen.

Für die Finanzierung von Teilen meines Forschungsaufenthaltes in Chile, Argentinien, Uruguay und Brasilien danke ich dem DAAD. La estadia en la Universidad Austral de Chile, Valdivia, ha sido una experiencia inolvidable, gracias al Prof. Dr. Flavio Ojeda, María Inés Guarda, Prof. Carmen Maldonado, Prof. Dr. Oscar Goicoechea, Prof. Lilian Villanueva y demás integrantes del Instituto de Física. De todo corazón quiero agradecer por la buena voluntad que se expresaba en muchas facettas innombrables.

Mi estadía demasiada corta en la facultad de Medicina en Montevideo, Uruguay, ha sido un gran placer, gracias a personas tan profundamente amables como Prof. Dr. Elia Nunes, Dr. Virgilio Salvo, Nelson Bracesco y otros Ramblistas mas.

I would also like to thank Prof. Dr. I. T. Young for giving me the opportunity to visit his highly experienced image processing group at the Technical University in Delft, Netherlands.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Heyser vom UFT Bremen und Herrn Prof. Dr. Rudolf Amann des MPI Bremen danke ich für die freundliche Bereitstellung von Meßzeiten an Laser-Scanning-Mikroskopen. Am MPI Bremen hat sich vor allem Herr Dr. Jakob Pernthaler viel Mühe bei der Einarbeitung gegeben.

Der Universidad Austral de Chile (UACH), dem DAAD und den Professoren Dr. Siegfried Boseck, Dr. Horst. Diehl und Dr. Adalbert Mayer-Heinricy möchte ich für Ihr finanzielles Engagement bei der

Durchführung eines dreimonatigen Aufenthalts dreier Studenten der Informatik der UACH in unserem Institut danken.

Pamela Barria, Rodrigo Rojas y Victor Espinosa han colaborado con entusiasmo en algunas partes del programa, desarollado en este trabajo. En este contexto, Rodrigo Rojas creó Abb. 3.16..

Die Firma Creaso unterstützte sowohl meinen einjährigen Auslandsaufenthalt, also auch den dreimonatigen Arbeitsaufenthalt der chilenischen Studenten mit freien IDL-Lizenzen. Vielen Dank für dieses Entgegenkommen.

Herrn Dipl. Phys. Björn Poppe und Herrn Dr. Christoph Räth (MPI-Graching) danke ich für Ideen und Diskussionen im Zusammenhang mit der Skalierung-Index-Methode und der gewichteten Hauptachsen-Transformation. Herrn Prof. G. Morfill vom MPI in Garching danke ich für die Finanzierung der Reise zum II.SIMposium, Feb. 2000, in Garching.

Herr Dr. Georg Heygster stellte freundlicherweise einen Zugang auf UNIX-Rechner des Instituts für Umweltphysik zur Verfügung.

Für die gute, freundliche Zusammenarbeit in der mechanischen Werkstatt danke ich Frau Elke Sorgenicht und Herrn Volker Grönemeier.