

Beiersdorf



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie in lebenden Keratinozyten

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Robin Sieg
2047173

Hamburg

am 10. Juni 2015

Gutachter: Prof./Dr.
Gutachter: Dr.

Oliver Ullrich
Frank Fischer

(HAW Hamburg)
(Beiersdorf AG)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor Mikroskopie der Beiersdorf AG, Hamburg

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Theoretischer Hintergrund.....	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Anatomie der humanen Haut	1
1.3 Zellulärer Energiestoffwechsel	2
1.4 Mitochondriale Morphologie	5
1.5 Das schaltbare Fluoreszenzprotein Mito-Dreiklang	6
1.6 Aufgabenstellung.....	10
2 Material.....	11
2.1 Geräte.....	11
2.1.1 Leica SR GSD.....	11
2.1.2 Zellkulturgeräte	11
2.2 Puffer und Medien	12
2.3 Weitere Substanzen	12
2.4 Zellen.....	13
3 Methoden	14
3.1 Zellkultur.....	14
3.1.1 Inkulturnahme kryokonservierter Zellen.....	14
3.1.2 Kryokonservierung	14
3.2 Plasmid Präparation	15
3.2.1 Medienansatz.....	15
3.2.2 Retransformation	15
3.2.3 Plasmidisolierung und -aufreinigung.....	15
3.3 Transfektion von Keratinozyten mit dem Neon® System	16
3.4 Substanzzugabe.....	16
3.5 GSD-Mikroskopie	17
3.6 Quantifizierung der Mitochondrien	18
4 Ergebnisse und Diskussion.....	21
4.1 Mito-Dreiklang in der GSD-Mikroskopie.....	21
4.2 Mito-Dreiklang zur Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie	29
5 Zusammenfassung	36
6 Danksagung.....	37
7 Literaturverzeichnis.....	38
8 Abbildungsverzeichnis.....	40

9	Tabellenverzeichnis	41
10	Anhang	42
10.1	Abkürzungen	42
10.2	VBA-Makro zur Datenzusammenführung	44

1 Theoretischer Hintergrund

1.1 Einleitung

Da die Haut durch ihre allgegenwärtige Erscheinung indirekt für den Gesundheitszustand einer Person steht, gilt sie in allen ethnischen und kulturellen Gruppen als Schönheitsmerkmal. Die Hautgesundheit stellt damit nicht nur ein medizinisches, sondern auch ein kulturelles Bedürfnis jedes Menschen dar. Entscheidend für die Hautgesundheit ist ein gut funktionierender Energiestoffwechsel der einzelnen Hautzellen. Das dynamische Netzwerk der Mitochondrien ist in den Zellen für die Energieversorgung verantwortlich. Die Quantifizierung dieses Netzwerkes und die Veränderung des Netzwerkes bei veränderten Umgebungsbedingungen bzw. bei Zugabe ausgewählter Substanzen ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.2 Anatomie der humanen Haut

Die Haut stellt in ihrer Gesamtheit die äußerste Barriere zur Umwelt dar und ist mit einer Masse von 3,5 - 10 kg eines der größten Organe des Menschen. Sie ist ein komplexes System unterschiedlichster Zelltypen, Faserproteine, Drüsen, Kanäle, Nerven, Gefäße und Schichten ¹. Die Haut besteht aus zwei Schichten, der Dermis und der darüberliegenden Epidermis. Die Dermis ist ein straffes, faserreiches Bindegewebe, welches über Papillen stark mit der Epidermis verzahnt ist. Hauptbestandteile der Dermis sind Fibroblasten, Bindegewebsfasern, wie Elastin und Kollagen, zahlreiche Zelltypen der Immunabwehr sowie Rezeptororgane, Nerven und Gefäße. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf Keratinozyten, einem Zelltyp der Epidermis. Die Epidermis (siehe Abbildung 1) ist ein sich ständig erneuerndes Plattenepithel ohne Gefäßversorgungssystem, bestehend aus fünf Schichten, wobei die Basalmembran, ein Geflecht aus Kollagenfasern, die Epidermis zur darunterliegenden Dermis abgrenzt. Oberhalb der Basalmembran liegt das *Stratum basale*, in welcher Tochterzellen aus Stammzellen gebildet werden. Die Tochterzellen bilden entweder Klone, welche im *Stratum basale* verweilen, oder wandern in darüberliegende Schichten. Dieser Vorgang wird als Differenzierung bezeichnet. Sobald die Keratinozyten durch das *Stratum spinosum* in das *Stratum granulosum* gewandert sind, beginnen sie abzuflachen. Das *Stratum lucidum* findet sich ausschließlich in der Epidermis der Leistenhaut. Hat der Keratinozyt schließlich das *Stratum corneum* erreicht, ist dieser zellkernlos und abgestorben, welcher dann durch mechanisches Einwirken als Hornschuppe abgeschilfert wird ².

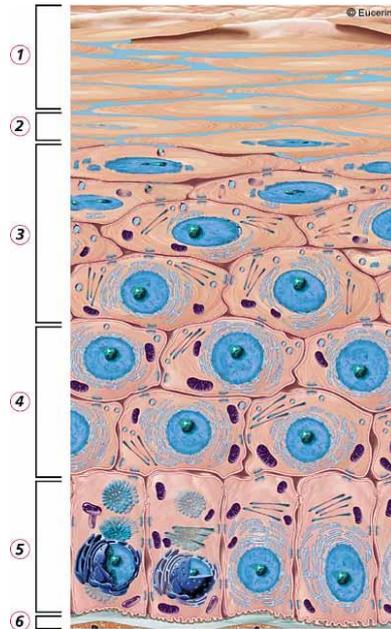


Abbildung 1: Histologie der Epidermis

1) *Stratum corneum*, 2) *Stratum lucidum*, 3) *Stratum granulosum*, 4) *Stratum spinosum*, 5) *Stratum basale*, 6) Basalmembran³.

Für die objektive Analyse verschiedener Parameter der Haut, wie zum Beispiel der Trockenheit, Rauheit und Elastizität, stehen unterschiedliche Methoden, vielfach im Bereich der mikroskopischen Bildanalyse, zur Verfügung. Ziel dieser Analysen ist das Kategorisieren der Hautbeschaffenheit, die dann einem Hautzustand zugeordnet werden kann. Ein anderer, in dieser Arbeit näher betrachtete Aspekt des Hautzustandes ist der zelluläre Energiestoffwechsel.

1.3 Zellulärer Energiestoffwechsel

In dem zellulären Energiestoffwechsel nehmen die Mitochondrien eine bedeutende Schlüsselposition ein. Mitochondrien besitzen zwei Membranen, eine äußere und eine innere, welche stark gefaltet ist („Cristae“). Die innere Membran umschließt die Matrix, in der metabolische Enzyme und mitochondriale DNS (mtDNS) vorliegen. Etwa 1000 Gene codieren für Proteine der Mitochondrien. Nur 13 Gene befinden sich auf der mtDNS, wovon alle für Untereinheiten des oxidativen Phosphorylierungs-Systems codieren. Hieraus lässt sich auf ein komplex gesteuertes System und auf eine hochkomplexe Koordination der Genexpression für die mitochondrialen Proteine schließen. Die Expressionen mitochondrialer Proteine werden durch mitochondriale (Dys-)Funktionen, durch Veränderungen des Membranpotentials sowie dem mitochondrialen und/oder zytosolischen

ATP Level angestoßen. Signale werden in beide Richtungen (Mitochondrium - Zellkern und Zellkern - Mitochondrium) ausgesendet ⁴.

Katabolische Mechanismen haben das Ziel, energiereiche Moleküle hervorzubringen. Diese Energiespeicher, welche auch als biochemische Energieäquivalente bezeichnet werden, werden für endotherme Reaktionen benötigt, welche ohne Energiezufuhr gar nicht oder nur sehr langsam ablaufen würden, wie beispielsweise eine Vielzahl enzymatischer Reaktionen. Zu diesen Energiespeichern gehört das ATP, ein Ribonukleosidtriphosphat welches bei der Aufspaltung der Phosphorsäureanhydrid-Bindung unter Abspaltung eines Pyrophosphats (ATP zu AMP) rund - 46 kJ/mol an freier Enthalpie liefert ⁵.

In Abbildung 2 ist die Bilanzierung der ATP-Synthese und Reduktionsäquivalente im Glukosestoffwechsel gezeigt. ATP kann auf verschiedenen biochemischen Pfaden erzeugt werden. Mit dem Abbau von Kohlenhydraten erfolgt der erste Schritt über die Glykolyse, wobei Glukose in zehn Einzelschritten im Zytosol zu Pyruvat umgewandelt wird ⁵. In der Glykolyse entstehen pro Glukosemolekül 2 ATP und 2 NADH/H⁺, ein Reduktionsäquivalent wie das FADH₂, welche beide in der oxidativen Phosphorylierung für die ATP-Generierung verwendet werden. Das Pyruvat kann durch den aeroben, mitochondrialen Weg über die Pyruvat-Dehydrogenase, den Citratzyklus und schließlich durch die oxidative Phosphorylierung über NADH/H⁺, FADH₂ oder GTP für die ATP-Synthese verwertet werden oder den Weg der anaerobe Glykolyse unter Bildung von Laktat einschlagen. Die ATP-Synthese erfolgt nur über die Glykolyse und die aerobe Atmung durch die Mitochondrien. Die anaerobe Glykolyse generiert lediglich NAD⁺ und stellt damit sicher, dass die Glykolyse durch einen NAD⁺-Mangel nicht zum Erliegen kommt.

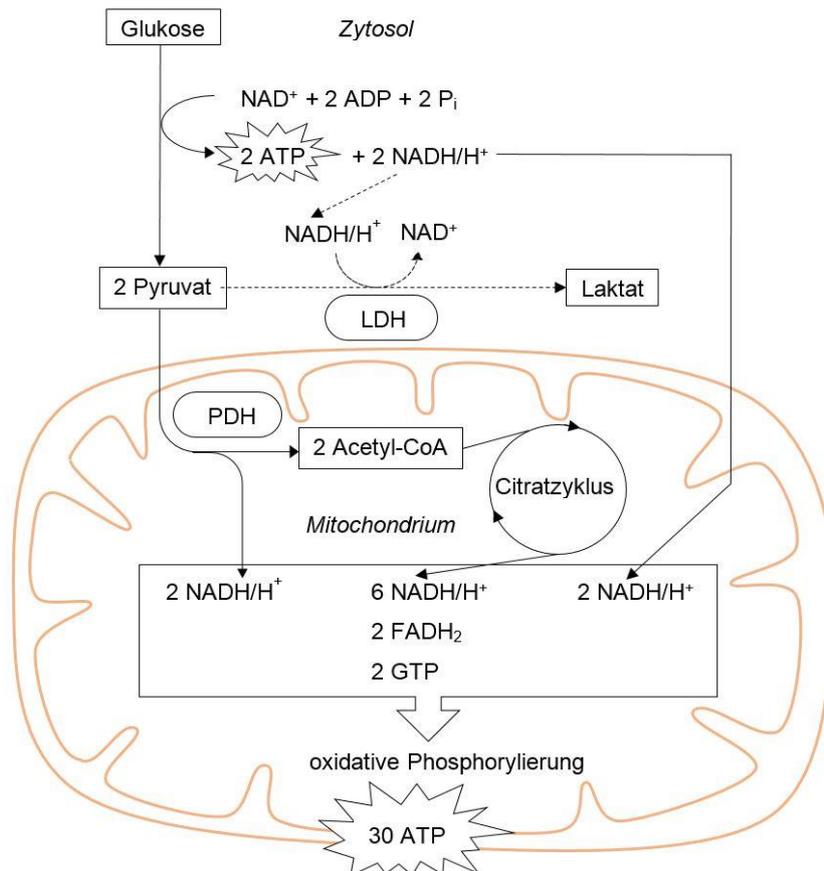


Abbildung 2: Bilanzierung der ATP-Synthese und Reduktionsäquivalente im Glukosestoffwechsel

Glukose wird in der Glykolyse unter Verbrauch von NAD^+ , 2 ADP und 2 P_i zu 2 Pyruvat, 2 ATP und 2 NADH/H^+ umgesetzt. Pyruvat wird entweder über die Laktat-Dehydrogenase unter Umsetzung von NADH/H^+ zu NAD^+ in Laktat, oder durch die Pyruvat-Dehydrogenase zu 2 Acetyl-CoA und 2 NADH/H^+ gewandelt. In dem darauffolgenden, regenerativen Prozess, erfolgt die Übertragung der Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoA auf Oxalacetat. Das entstandene Citrat wird dann wiederkehrend in einem Kreisprozess (Citratzyklus) für die Herstellung von 6 NADH/H^+ , 2 FADH_2 und 2 GTP zu Oxalacetat umgesetzt. Über die oxidative Phosphorylierung dienen die Reduktionsäquivalente schließlich dem Erhalt eines Protonengradienten, welcher die ATP-Synthase antreibt und das energiereiche ATP synthetisiert. Glukose liefert durch die Glykolyse 2 ATP. Die mitochondriale, aerobe Respiration liefert zusammengefasst 30 ATP pro Glukosemolekül.

Untersuchungen haben gezeigt, dass Keratinozyten zwei Drittel der aufgenommenen Glukose über die anaerobe Glykolyse in Laktat umwandeln ⁶. Dieses Ergebnis steht im Einklang zum fehlenden Gefäßversorgungssystem der Epidermis und der dadurch nicht vorhandenen unmittelbaren Sauerstoffversorgung der Zellen. Neuere Untersuchungen haben hingegen gezeigt, dass die epidermale Respiration signifikant den Sauerstoffbedarf in Hautschichttiefen von 0.25 - 0.40 mm (in etwa die der Epidermis) deckt ⁷. Die mitochondriale, aerobe Respiration spielt also möglicherweise doch eine wichtige Rolle für die Energieversorgung der Keratinozyten.

1.4 Mitochondriale Morphologie

Unter dem Fluoreszenzmikroskop erscheinen Mitochondrien in lebenden Keratinozyten nicht stationär, sondern als ein dynamisches, sehr aktives Netzwerk. Ihre Formen verändern sich kontinuierlich, wobei die Mitochondrien ständigen Fusions- und Fragmentierungsprozessen unterliegen. Literaturdaten zeigen, dass Fusion (stärker vernetzte Mitochondrienstrukturen) für eine gesündere Vitalität der Mitochondrien steht, wohingegen Fission (fragmentierte Mitochondrienstrukturen) auf zellulären Stress schließen lässt oder sogar Prozesse der Autophagozytose im Sinne einer Apoptose darstellen^{8,9}. Mitochondriale Fusion wirkt ebenfalls durch den Austausch mitochondrialer Makromoleküle und mtDNS bei vorhandenen mtDNS-Schäden der Zellalterung entgegen¹⁰. Die Fusion von Mitochondrien gestaltet sich durch die vier Kompartimente (äußere Mitochondrienmembran, Intermembranraum, innere Mitochondrienmembran und Mitochondrienmatrix) komplizierter als beispielweise die Endozytose von Vesikeln. Die Funktionsweisen der wichtigsten Fusion- und Fission-Proteine sind in Abbildung 3 verdeutlicht.

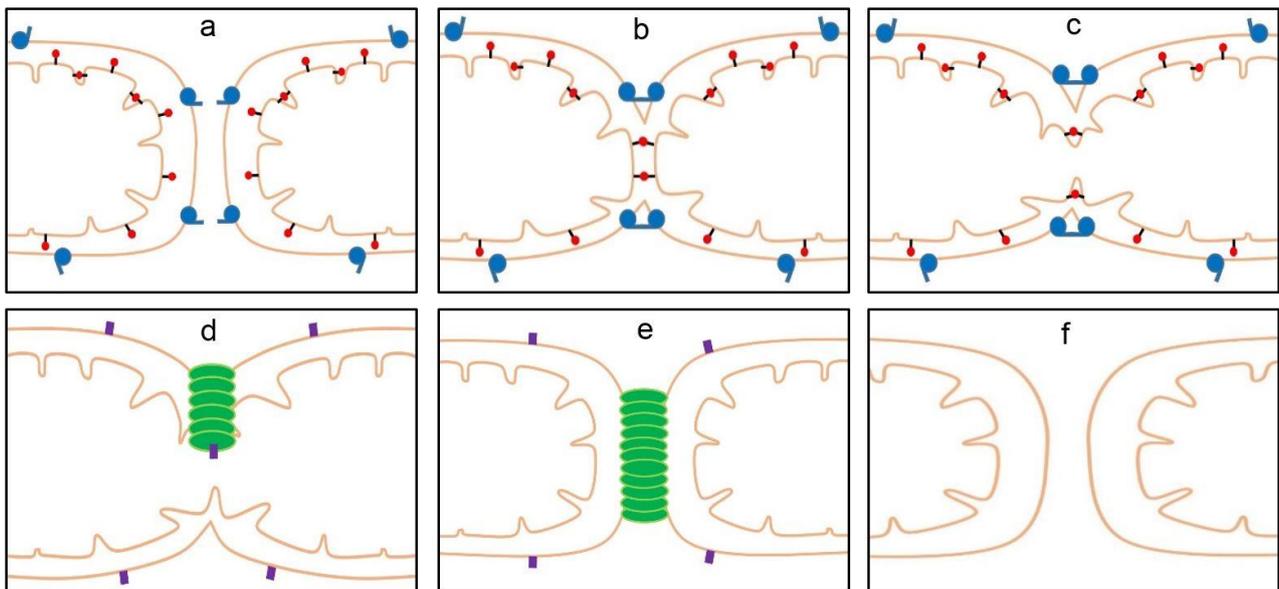


Abbildung 3: Fusion- und Fission-Proteine von Mitochondrien

Die zentralen Fusionsproteine von Mitochondrien sind Mfn1 und Mfn2 (blau) und OPA1 (rot). Mfn1 und Mfn2 vermitteln hierbei die Fusion der äußeren Mitochondrienmembran, während OPA1 für die Fusion der inneren Mitochondrienmembran und zugleich für die Bildung der Cristae verantwortlich gemacht wird (siehe **a - c**). Für die Teilung der Mitochondrien triggert das auf der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierte Fis1-Protein (lila) die Anlagerung von Drp1 (grün). Drp1 lagert sich um die äußere Mitochondrienmembran und schnürt diese ein bis es zur Teilung der Mitochondrien kommt (siehe **d - f**)^{11,12}.

Da die unter 1.3 beschriebene Glykolyse bei einem Überangebot von Glukose den ATP-Bedarf der Zelle wohlmöglich komplett befriedigt und die ATP-Synthese über die oxidative Phosphorylierung dann einen geringeren Stellenwert bekommt, muss die mitochondriale ATP-Synthese für eine höhere mitochondriale Aktivität erzwungen werden. Erreicht wird dies *in-vitro* mittels Glukosemangelmedium. Zu erwarten ist hierbei, dass die Rate an anaerober Glykolyse abnimmt, während der resultierende ATP-Mangel die oxidative Phosphorylierung und somit die Aktivität der Mitochondrien anregt.

1.5 Das schaltbare Fluoreszenzprotein Mito-Dreiklang

Für die Markierung von Mitochondrien wurde in dieser Arbeit das am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen entwickelte Mito-Dreiklang (M3K) verwendet. M3K ist ein photoschaltbares Fluoreszenzprotein. Die mitochondriale Zielsequenz ist die Untereinheit VIII der humanen Cytochrom-c-Oxidase, welche die Lokalisierung von M3K in die Mitochondrienmatrix bedingt. M3K besitzt drei Arten von reversiblen Schaltmechanismen, einen photochemischen ON/OFF-Schalter durch Bestrahlung mit zwei Wellenlängen und einen Transfer in einen elektronischen, langlebigen Dunkelzustand (*long-lived dark state*). Die photochemische, reversible Schaltbarkeit von M3K beruht auf einer Hydratisierungs- und Dehydratisierungsreaktion, welche durch die Bestrahlung mit 365 nm (ON) bzw. 405 nm (OFF) induziert werden und das Chromophor des Proteins durch Wasseranlagerung und -abspaltung modifiziert (siehe Abbildung 4). Die Hydratisierungsreaktion kann ebenfalls durch thermische Anregung erfolgen¹³.

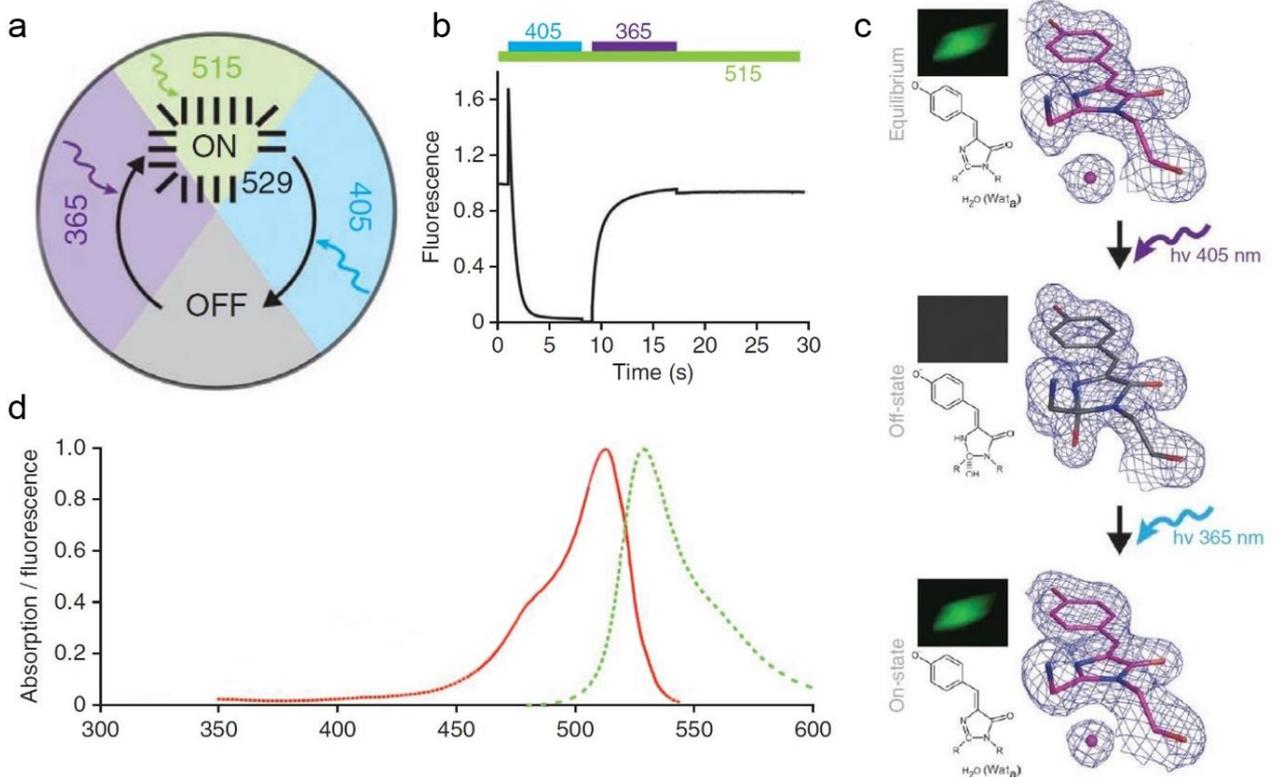


Abbildung 4: Schaltbarkeit, Chromophor, Extinktion und Emission von Dreiklang

a Schema der Fluoreszenzschaltbarkeit von Dreiklang. **b** Schaltkurve der Fluoreszenz, aufgenommen in *E. coli*. Die Laserbestrahlungsintervalle sind über dem Graphen aufgetragen. **c** (oben und unten) Chromophor des Dreiklangproteins. Durch die Bestrahlung mit 405 nm kommt es zur Hydratisierung an C₆₅, wobei das planare, sp³-hybridisierte π -Elektronen-System verzogen wird und M3K das Chromophor verliert. **d** Extinktions- (rot) und Emissionsspektrum (grün) der Fluoreszenz von M3K. Das Extinktionsmaximum von M3K liegt bei 515 nm, das Emissionsmaximum bei 529 nm (Abbildung **d** verändert) ¹³.

Der dritte Schaltmechanismus kann durch Zuhilfenahme des Jablonski-Diagramms erklärt werden (siehe Abbildung 5). Hierbei werden Elektronen vom Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (S_1) angehoben und springen dabei nicht direkt, wie bei der klassischen Fluoreszenzmikroskopie, unter Emission eines Photons zurück auf S_0 , sondern gelangen über den Mechanismus des *intersystem crossing* in den *long-lived dark state* (D), von welchem sie zeitverzögert (bis zu einigen Millisekunden) ohne Emission nach S_0 zurückspringen. Erst bei einer erneuten Anregung der Elektronen des Fluoreszenzmoleküls nach S_1 kann es zu einem Übergang zu S_0 kommen, es wird ein Photon emittiert ^{14,15}.

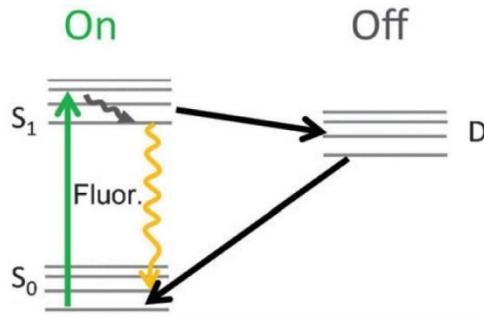


Abbildung 5: Jablonski-Diagramm der Elektronenniveaus eines Fluorophors.

S₀: Grundzustand; S₁: angeregter Zustand; D: *long-lived dark state* ¹⁶.

Mito-Dreiklang wurde in den Keratinozyten transient exprimiert. Für die Transfektion durch Elektroporation wurde ein verändertes pDsRed1-Mito Plasmid verwendet, das zuvor in *E. coli* vermehrt wurde. Die Vektor-Plasmid-Karte ist in Abbildung 6 dargestellt.

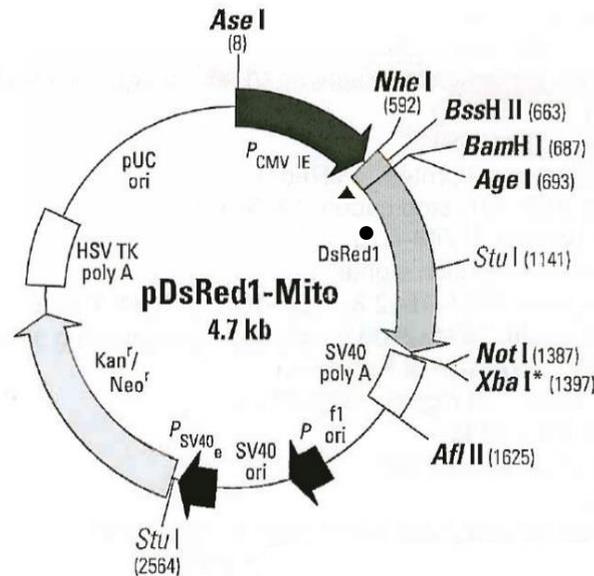


Abbildung 6: Vektor-Plasmid-Karte von Mito-Dreiklang

Dargestellt ist die Vektor-Plasmid-Karte von Mito-Dreiklang. Das schwarze Dreieck (▲) markiert die mitochondriale Zielsequenz der Untereinheit VIII der humanen Cytochrom-c-Oxidase, der schwarze Kreis (●) markiert die DsRed1-Sequenz, welches gegen die Mito-Dreiklang-Sequenz ausgetauscht wurde. Der Mito-Dreiklang-Sequenz ist am 3'-Ende eine SV40-Polyadenylierungssequenz nachgeschaltet. Des Weiteren befindet sich ein SV40 Replikationsursprung für Säuger, ein pUC Replikationsursprung für *E. coli* und ein f1 Ursprung für die single-stranded DNS Produktion auf dem Plasmid. P, P_{CMV IE} und P_{SV40e} sind Promotoren. P_{SV40e} ist der Promotor für die Neomycinresistenz, P ist der Promotor für die Kanamycinresistenz und P_{CMV IE} reguliert die Expression von Mito-Dreiklang. Auf dem Plasmid befinden sich zur Selektion in *E. coli* zudem eine Kanamycin- und eine Neomycinresistenz. Das HSV TK poly A Gen würde eine Selektion stabil transfizierter, eukaryotischer Zellen unter Anwendung von G418 zulassen ¹⁷.

Die oben beschriebene Schaltbarkeit des fluoreszierenden Proteins M3K hat seinen entscheidenden Vorteil in der Anwendung zur Superresolution-Mikroskopie, speziell in der RESOLFT - Mikroskopie (*reversible saturable optical fluorescence transitions*) zu der auch die GSD-Mikroskopie gehört. Dieses Prinzip beruht auf der Aufnahme der Fluoreszenz von Einzelmolekülen, während benachbarte Fluoreszenzmoleküle im OFF-State sind. Über mehrere tausend Einzelbilder treten andere Fluoreszenzmoleküle in den ON-State, während die ursprünglich fluoreszierenden wieder in den OFF-State gehen. Diese „Blinkereignisse“ liefern dann über stochastische Berechnungen auf Grundlage der Gaußschen Normalverteilung das räumliche Zentrum der Fluoreszenzemission mit einer Auflösung unterhalb der optischen Beugungsgrenze. Durch eine Überlagerung der errechneten Blinkereignisse entsteht dann eine Superresolution-Aufnahme. Diese durchbricht die seit 1873 von Ernst Abbé als Limit der mikroskopischen Auflösung geltende Beugungsgrenze von rund 200 nm^{18,19}.

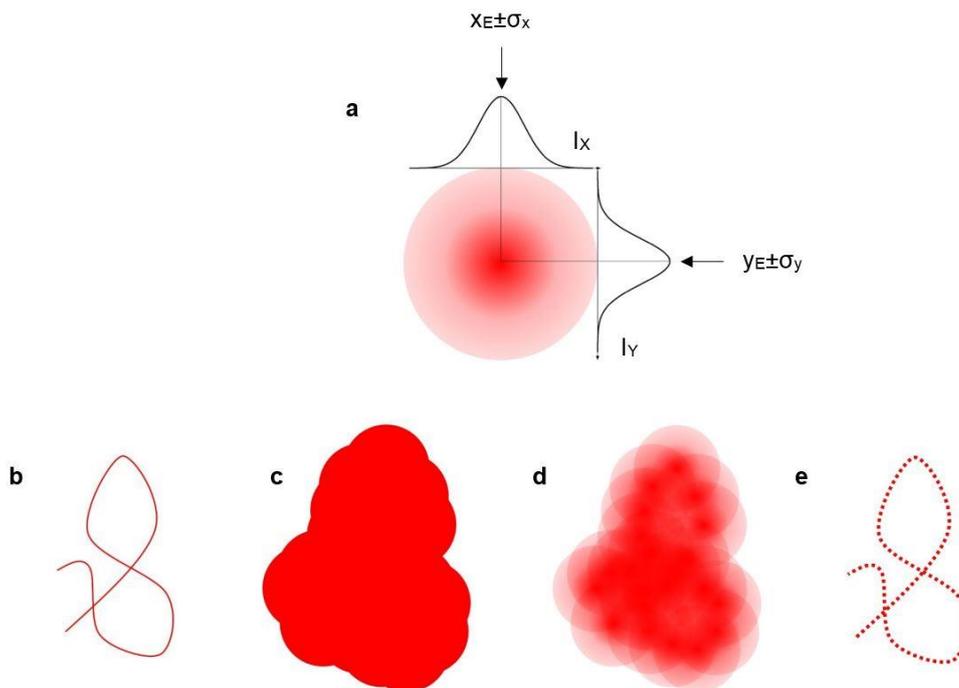


Abbildung 7: Prinzip der RESOLFT-Mikroskopie

In **a** ist die Emissionsintensität (I_x ; I_y) in x- und y-Richtung eines Einzelfluoreszenzmoleküls gezeigt. Durch die zweidimensionale Gaußsche Verteilungskurve lässt sich anhand der Mittelwerte und Varianz $x_{E\pm\sigma_x}$ und $y_{E\pm\sigma_y}$ das Fluoreszenzsignal eines Einzelevents auf einen kleinen Punkt reduzieren. Verdeutlicht wird das Prinzip der Strukturanalyse durch **b - e**. **b** repräsentiert die tatsächliche Struktur. In der Weitfeld-Aufnahme **c** ist die Struktur durch die optische Beugungsgrenze unscharf zu erkennen. Über die Einzelfluoreszenzmoleküldetektion mehrerer Einzelbilder und Überlagerung **d** sowie der anschließenden Rückrechnung durch Anwendung der Gaußschen Normalverteilung wird die Fluoreszenzsignallokalisation deutlich genauer und damit die Struktur in der Abbildung deutlich schärfer **e**²⁰.

1.6 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung von mikroskopischen Methoden zur morphologischen Mitochondrienquantifizierung an lebenden Zellen mit Hilfe eines fluoreszierenden Proteins, dem Mito-Dreiklang. Betrachtet werden hierzu Weitfeld-Aufnahmen und Aufnahmen im GSD-Modus, sowohl im TIRF- als auch im EPI-Modus. Des Weiteren wird der zum Teil aus der Literatur bekannte Einfluss von ausgewählten Substanzen auf die mitochondriale Morphologie quantifiziert.

Ethanol hat eine fragmentierende Wirkung auf das mitochondriale Netzwerk in vaskulären Epithelzellen ²¹. Der Einfluss auf die mitochondriale Morphologie in Keratinozyten ist bisher unbeschrieben und daher Bestandteil dieser Arbeit. Der Einsatz von **H₂O₂** als Stimulanz für oxidativen Stress (ROS) ist ein etabliertes Verfahren und wird in dieser Arbeit ebenfalls für die ROS-Simulation verwendet. **FCCP** und **Oligomycin** sind Substanzen, welche das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi_m$) verändern. FCCP wirkt als Entkoppler der Atmungskette und führt als H⁺-Carrier zur Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials. Oligomycin inhibiert die ATP-Synthase und sorgt so für einen Anstieg der Protonenkonzentration im Intermembranraum (Hyperpolarisation). Der Einfluss eines lipophilen Lösungsmittels (**LPLM**) auf die mitochondriale Morphologie wird neben den oben genannten Substanzen in dieser Arbeit untersucht.

2 Material

2.1 Geräte

2.1.1 Leica SR GSD

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Mikroskop	Leica CTR	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Steuereinheit		
Mikroskop Stativ	Leica DMI6000B (invers)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
TIRF/GSD-Module	Leica SR GSD	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Ölimmersionsobjektiv	HCX PL APO 100x/1.47 oil	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Laser	405 nm / 30 mW 488 nm / 300 mW 532 nm / 500 mW 642 nm / 500 mW	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kamera	sCMOS pco.edge-1420, mono	PCO AG, Kelheim, Deutschland
Piezo Steuereinheit	E-665 LVPZT	Physik Instrumente GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Antivibrationstisch	TS-140	Table Stable LTD., Mettmenstetten, Schweiz
Fluoreszenzlampe	Type: EL6000	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Temperier-System	The Cube	Life Imaging Services GmbH, Basel, Schweiz
Mikroskopbox	The Box	Life Imaging Services GmbH, Basel, Schweiz
Computer	XENON-Prozessor, 64-Bit, Windows 7	Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Deutschland
Software	LAS X 1.1 Beta	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland

2.1.2 Zellkulturgeräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Brutschrank	HERA cell 240	Thermo Scientific Inc., Braunschweig, Deutschland
Zellzähler	CASY, Model TT	Innovatis AG, Bielefeld, Deutschland
Zentrifuge I	Centrifuge 570 RH	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge II	Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific Inc., Braunschweig, Deutschland
Wasserbad	Typ 1017	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Sicherheitswerkbank	HERA safe, KS 18	Thermo Scientific Inc., Braunschweig, Deutschland
Kammerdeckgläser	Nunc™ Lab-Tek™ Chambered Coverglass, 2x4 well	Thermo Scientific Inc., Braunschweig, Deutschland
NanoDrop	ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Deutschland
Thermoblock	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Deutschland

2.2 Puffer und Medien

Bezeichnung	Volumen	Stoff	Hersteller
PBS	500 ml	Phosphat Buffered Saline	Life Technologies, Kalifornien, USA
Kera-Stopp	44,5 ml	PBS	Life Technologies, Kalifornien, USA
	5 ml	FCS	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
	0,5 ml	Pen/Strep	Life Technologies, Kalifornien, USA
Kera-Freeze	48 ml	KBM-Gold™	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
	13 ml	FCS	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Medium A	5 ml	DMSO	Sigma-Aldrich, Deutschland
	500 ml	KBM-Gold™	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Medium B	490 ml	KGM-Gold SingleQuot Kit	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
		KBM-Gold™	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
	10 ml	KGM-Gold SingleQuot Kit w/o GA-Sup HEPES 1 M	Lonza Group AG, Basel, Schweiz Life Technologies, Kalifornien, USA
Medium C	490 ml	KBM-Gold™	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
	10 ml	KGM-Gold SingleQuot Kit HEPES 1 M	Lonza Group AG, Basel, Schweiz Life Technologies
Medium D	490 ml	KBM-Gold™ w/o Phenolrot and Ca2+	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
		KGM-Gold SingleQuot Kit	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
	50 µl	1M CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Deutschland
	10 ml	HEPES 1 M	Life Technologies, Kalifornien, USA
Medium E	100 ml	DMEMgfp-2	Evrogen, Moskau, Russland

2.3 Weitere Substanzen

Substanz	Hersteller
PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	Sigma-Aldrich, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Deutschland
H ₂ O ₂ , 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Oligomycin	Seahorse Bioscience Inc., Kopenhagen, Dänemark
FCCP	Seahorse Bioscience Inc., Kopenhagen, Dänemark
Ethanol, absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälber Serum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Deutschland
Immersion Oil, n _e ²³ =1,5718	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Trypsin EDTA 1x	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Agilent Technologies Inc. Kalifornien, USA
Mito-Dreiklang Plasmid, (β = 1,4 µg/µl)	Max-Planck-Institut, Göttingen, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Luria/Miller-Medium (LB-Medium)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luria/Miller-Agar (LB-Agar)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande

2.4 Zellen

Zelltyp

Keratinocyten

E. coli

Typ

neonatale normale humane epidermale Keratinocyten (neoNHEK), isoliert aus Vorhaut, Lot. 245638;

E. coli XL10 Gold Ultracompetent

Hersteller

Lonza Group AG, Basel, Schweiz

Agilent Technologies Inc. Kalifornien, USA

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Zu Beginn wurden die gekauften neoNHEK-Keratinocyten (P₀-Generation) in Kultur genommen, gesplittet und als P₁-Generation kryokonserviert. Alle weiteren Arbeiten wurden mit der P₁-Generation durchgeführt. Die Zellkultivierung und Behandlung erfolgte nach folgendem Zeitplan:

Tag 1: Inkulturnahme der P₁-neoNHEK in Medium A

Tag 4: Transfektion mittels Elektroporation und Inkubation in Medium B

Tag 5: Medienwechsel auf Medium C

Tag 6: Substanzzugabe in Medium D / GSD-Aufnahme

Tag 7: Abbildungen am Leica SR GSD

3.1.1 Inkulturnahme kryokonservierter Zellen

Für die Inkulturnahme von Keratinocyten wurde zunächst Medium A im Wasserbad auf 37 °C vortemperiert und anschließend ein kleines Zentrifugenröhrchen mit 4 ml und eine kleine Zellkulturflasche mit 8 ml Medium befüllt. Das Kryogefäß wurde im Wasserbad schnell auf 37 °C aufgewärmt und in das vorbereitete Zentrifugenröhrchen pipettiert. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen bei 1000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml resuspendiert. Danach wurde die Suspension in eine kleine Zellkulturflasche überführt, verteilt und die Zellen für 72 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

3.1.2 Kryokonservierung

Altes Medium wurde von den Zellen abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und 1 ml Trypsin auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 7 min im Brutschrank inkubiert, durch Klopfen gelöst, in 10 ml Kera-Stopp resuspendiert und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml in Kera-Freeze aufgenommen und die Zellen in Portionen zu je 1 ml (entspricht 10⁶ Zellen) in Kryogefäße überführt. Die Gefäße wurden in ein auf 4 °C gekühltes Isopropanol-Kryogefäß gestellt und bei -80 °C gelagert. Nach zwei Tagen erfolgte die Überführung in eine Kryobox.

3.2 Plasmid Präparation

3.2.1 Medienansatz

Zunächst wurden zwei LB-Medien ($\beta = 25 \text{ g/l}$) und ein LB-Agar ($\beta = 40 \text{ g/l}$) angesetzt und unter Rühren gelöst. Das Medium und der Agar wurden mit Rührfisch autoklaviert und unter Rühren abgekühlt. Kanamycin wurde in einer Verdünnung von 1:1000 zum Agar und zu einem der beiden LB-Medium Ansätze hinzugegeben. Anschließend wurde der Agar in 10 cm Petrischalen gegossen ($\approx 20 \text{ ml}$) und nach dem Abkühlen umgedreht im Kühlschrank gelagert.

3.2.2 Retransformation

100 μl *E. coli* XL10 Gold Ultracompetent wurden auf Eis aufgetaut und mit 4 μl β -Mercaptoethanol für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,5 μl Plasmid. Nach weiteren 30 min auf Eis folgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C und 200 rpm im Thermoblock. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 900 μl , auf 37 °C vorgewärmtes, kanamycinfreies LB-Medium hinzugegeben und die Zellsuspension bei 37 °C für eine Stunde bei 250 rpm im Thermoblock inkubiert. Danach erfolgte das Ausplattieren von 100 μl der Zellsuspension auf LB-Agar-Platten (mit Kanamycin). Die restlichen 900 μl wurden für 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Pellet im restlichen Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Sobald die Platten angetrocknet waren, wurden sie für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle wurden zusätzlich *E. coli* XL10 Gold Ultracompetent nach gleichem Protokoll ohne Plasmid behandelt. Am Folgetag erfolgte die Vereinzelung. Hierzu wurde eine angewachsene Kolonie gepickt und auf einer frischen LB-Agar-Platte ausgestrichen. Nach einer erneuten Inkubation für 24 h bei 37 °C wurde mit einer vereinzelt Kolonie das LB-Medium (150 ml, mit Kanamycin) inokuliert. Die Inkubation der Suspensionskultur erfolgte für 24 h bei 37 °C im Schüttelkolben.

3.2.3 Plasmidisolierung und -aufreinigung

Die Plasmidisolierung wurde nach dem Protokoll des HiSpeed® Plasmid Purification Handbook (11/2005) der Firma Qiagen unter Verwendung des HiSpeed Midi Kits durchgeführt.

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten, aufgereinigten Plasmid DNS mittels NanoDrop ergab eine Konzentration von 358,8 ng/ μl .

3.3 Transfektion von Keratinozyten mit dem Neon® System

Die neonatalen Keratinozyten wurden mit Hilfe des Neon® Systems von Life Technologies mittels Elektroporation transfiziert.

Zunächst wurde das alte Medium A der seit 72 h kultivierten P₁-neoNHEK abgesaugt, und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt, 1 ml Trypsin über den Zellen verteilt und für 7 min bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Durch kräftiges Klopfen wurden die Zellen von der Zellkulturflasche abgelöst, in 10 ml Kera-Stopp aufgenommen und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation für 5 min und 1000 rpm bei RT wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und die Zellkonzentration bestimmt. Anschließend wurde das entsprechende Volumen mit der gewünschten Zellzahl in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut bei RT und 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 130 µl R-Puffer resuspendiert und die Suspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Das Plasmid wurde in einer Konzentration von 2 µg/300.000 Zellen in das Mikroreaktionsgefäß dazugeben. Die Küvette des Neon®-Systems wurde mit 3 ml E2-Puffer befüllt und der Zell/Plasmid-Mix in die 100 µl Neon®-Tip blasenfrei aufgezogen. Die Neon®-Tip-Pipette wurde in die Küvette gesteckt und die Elektroporation mit einem Puls bei 20 ms und 1700 Volt gestartet. Anschließend wurden die 100 µl transfizierten Zellen bei einer Konzentration von $3,2 \cdot 10^5$ Zellen/ml in Medium B gegeben und die Zellen zu je 250 µl/well à 80.000 Zellen in LabTek-Chamberslides ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel auf Medium C.

3.4 Substanzzugabe

Nach weiteren 24 h (Tag 6) wurde das Medium C abgesaugt. Die Substanzen wurden in Medium D gelöst und zu 250 µl/well über die Zellen gegeben und für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Konzentrationen der Substanzen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Ethanol	50 mM
H ₂ O ₂	0,5 mM
FCCP	300 nM
Oligomycin	0,001 mM
Lipophiles Lösungsmittel	0,0113 % PEG-40 Hydrogenated Castor Oil + 0,0113 % Glycerol (Massenprozent)

3.5 GSD-Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden am Leica SR GSD im Weitfeld, EPI-GSD-Modus, TIRF-Modus und im TIRF-GSD-Modus durchgeführt. Der entscheidende Vorteil des TIRF-Modus (*total internal reflection fluorescence*) besteht in seiner besseren Auflösung in z-Richtung. Die TIRF-Modi eignen sich jedoch nur, um Deckglas nahe Strukturen abzubilden. Für die TIRF-Modi wird von den unterschiedlichen Brechungsindizes zwischen Deckglas und Ölimmersion (n_1) und Probe (n_2) Gebrauch gemacht. Anstatt die Probe wie im Weitfeld- und EPI-GSD-Modus gerade zu beleuchten, trifft die Anregungswellenlänge im TIRF- und TIRF-GSD-Modus in einem Winkel (θ_1) von etwas größer als 60° auf das Deckglas und wird total reflektiert. Lediglich die Fluoreszenzmoleküle im evaneszenten Feld, im Abstand bis zu 200 nm über dem Deckglas, werden zur Fluoreszenz angeregt (siehe Abbildung 8).

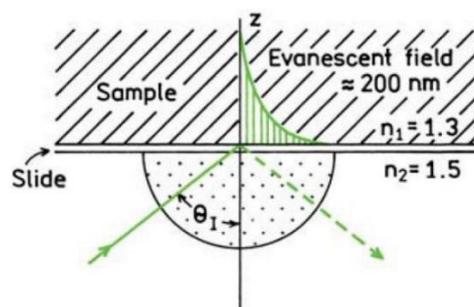


Abbildung 8: Prinzip der TIRF- und TIRF-GSD-Mikroskopie

Beschreibung im Text oben. n_1 und n_2 sind Brechungsindizes, θ_1 ist der Einfallswinkel. Das evaneszente Feld bildet sich bis in eine Höhe von 200 nm über dem Deckglas aus ¹⁴.

Gearbeitet wurde mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv mit 1,6-facher Zwischenvergrößerung. Um eine gute Photostabilität des Fluoreszenzproteins bei langen Aufnahmen zu gewährleisten, erfolgte eine der GSD-Aufnahmen von Mito-Dreiklang (Abbildung 12, Abbildung 14 und Abbildung 15) mittels Medium E.

Um die in Kapitel „Theoretischer Hintergrund“ erklärten OFF-Zustand und langlebigen Dunkelzustand zu erreichen, wurden die Keratinozyten zunächst für ca. 5 Sekunden mit 405 nm (100 % Laserleistung) bestrahlt, wodurch die Hydratisierung an C₆₅ des Mito-Dreiklang Chromophores induziert wurde. Anschließend wurde der 405 nm Laser aus- und der 488 nm Laser (50 % Laserleistung) eingeschaltet. Sobald die thermisch bedingte Dehydratisierung von M3K das Chromophor aktivierte und für Fluoreszenzevents sorgte, pumpte der 488 nm Laser die Elektronen in den langlebigen Dunkelzustand, von

welchem die Elektronen ohne Emission und zeitverzögert wieder nach S_0 sprangen. Bei erneuter Anregung nach S_1 und einem mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit eintretenden Zurückfallen nach S_0 kam es zum Blinken. Die Aufnahme wurde bereits zum Zeitpunkt des 405 nm Lasers gestartet und nach einer unterschiedlichen Anzahl von Bildern bei einer Rate von 10 ms/Einzelbild beendet. Für die Berechnung des anschließenden GSD-Bildes, wurden die ersten 2000 Einzelbilder übergangen und am Mikroskop ein *detection threshold* von 15 Photonen/Pixel und eine xy-Pixelgröße von 20 nm gewählt.

3.6 Quantifizierung der Mitochondrien

Für die morphologische Auswertung der Mitochondrien wurden pro Substanzbehandlung rund 20 Weitfeld-Aufnahmen mit je 1 - 4 Keratinozyten pro Bild am Leica SR GSD aufgenommen. Die Grundvoraussetzung war, dass es sich bei den Aufnahmen um lebende Keratinozyten handelt, d.h. in denen zumindest eine geringe mitochondriale Dynamik zu beobachten war. Tote Zellen oder welche ohne mitochondriale Bewegung wurden nicht aufgenommen. Insgesamt ergaben sich hierdurch zwischen 3000 und 4000 Mitochondrien pro Behandlung in einem Versuch. Die Versuche wurden drei Mal durchgeführt.

Die Binarisierung der Aufnahme inklusive der Bestimmung der morphologischen Parameter der Mitochondrien erfolgte mit Hilfe von „MicroP 1.1.11b“²², einer von Jyh-Ying Peng im Biomedical Image Informatics Lab entwickelten Software, welche üblicherweise für die Bildanalyse von Mitochondrien durch Zuweisung von Klassen wie *small globules*, *swollen globules*, *loops*, *branched tubules*, *twisted tubules* und *linear tubules* eingesetzt wird²³. Die Binarisierungsparameter wurden einmal vor der Analyse eingestellt und für alle Aufnahmen, Behandlungen und Versuche beibehalten (siehe Abbildung 9 und Tabelle 1)

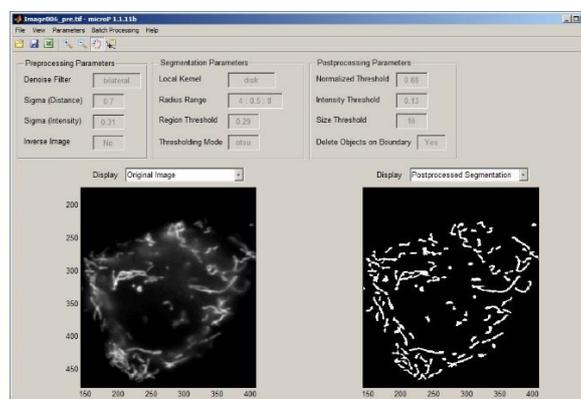


Abbildung 9: Screenshot MicroP

Dargestellt ist die verwendete Software zur Formanalyse der Mitochondrien. Links befindet sich das Eingangsbild, rechts der binarisierte Output. Die eingestellten Parameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Verwendete Parameter in MicroP zur Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie

Die aufgelisteten Parameter sind einmalig eingestellt und auf alle Aufnahmen angewendet worden.

Filter	Wert	Filter	Wert	Filter	Wert
sigma_dist	0,7	rgn_thd	0,29	bound	1
sigma_int	0,31	low_mode	otsu	area_thd	40
inverse	0	low_thd	0,35	ratio_thd	2,5
kernel	disk	high_thd	0,880002	branch_thd	0,33
rrange	4 - 8	gray_thd	0,13	axial_thd	3
rdelta	0,5	size_thd	16		

Die Bildeingabe in MicroP erfolgte ordnerweise über das *Batch-Processing*. Der MicroP-Output wurde auf das binarisierte Bild (*Postprocessed Segmentation*) sowie auf die CSV-Datei, in welcher die morphologischen Parameter gespeichert wurden, beschränkt. Das Einlesen der CSV-Datei in Excel, die anschließende Zusammenführung der Daten pro Behandlung und pro Versuch wie auch die Verarbeitung der Werte wurde durch ein VBA-Makro (*Visual Basic for Applications*) in Excel programmiert und durchgeführt (siehe 10.2).

Folgende Parameter wurden pro Mitochondrium bestimmt:

- Die mittlere mitochondriale Fläche A_m [Pixel],
- der Formfaktor F [-]

$$F = \frac{U^2}{(4\pi A)}$$

mit U := Umfang [Pixelseite]; A := Fläche [Pixel] sowie

- das Aspect Ratio AR [-] (z. Dt. Querschnittsverhältnis)

$$AR = \frac{l_{major}}{l_{minor}}$$

mit l_{major} := längster Strecke des mitochondrialen Skeletts und l_{minor} := kürzeste Strecke des mitochondrialen Skeletts.

A_m stellt ein Maß für die mitochondriale Masse dar. Die verwendeten Parameter AR und F können einen minimalen Wert von 1 annehmen, was einem perfekten Kreis entspräche. AR beschreibt dabei die mitochondriale Länge, während F die mitochondriale Länge wie auch den Grad der Verzweigung widerspiegelt ²⁴.

Für die Signifikanzbestimmung wurde der Mann-Whitney-U-Test in Statistica 12 verwendet. Hierzu wurden zunächst die Mittelwerte der Parameter Am , AR und F aus den Einzelbildern in Excel berechnet und die Mittelwerte innerhalb eines Versuches mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests miteinander verglichen. Der Grund für die Bildung der Mittelwerte pro Bild lag in der recht hohen Varianz der Zellen. In einigen Aufnahmen kamen große Zellen, in anderen Aufnahmen eher kleine Zellen vor. Durch die Mittelwertbildung pro Bild sollte vermieden werden, dass große Zellen mit vielen Mitochondrien gegenüber kleineren Keratinozyten mit einem geringeren Mitochondriengehalt in der statistischen Analyse stärker gewichtet werden.

Die Graphen zur den statistischen Ergebnissen wurden mit Hilfe von Origin 8 als Box-Plots erstellt. Die Box beginnt am unteren Quartil und endet am oberen Quartil. Der Median ist als Linie, der Mittelwert als kleines Rechteck eingezeichnet. Die Whisker wurden mit einer Länge des 1,5-fachen Interquartilen-Abstands gewählt.

Die Teilprozesse der Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie sind in dem Fließdiagramm in Abbildung 10 veranschaulicht.



Abbildung 10: Fließdiagramm der Teilprozesse zur Analyse der mitochondrialen Morphologie

Das Fließdiagramm beschreibt die Reihenfolge der durchlaufenden Schritte zur Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Mito-Dreiklang in der GSD-Mikroskopie

Anhand der eindeutigen Fluoreszenz von Mito-Dreiklang in den Mitochondrien (siehe Abbildung 11) ist abzuleiten, dass die Plasmid Präparation, die Plasmidisolierung und -aufreinigung ebenso wie die anschließende Transfektion mittels Elektroporation erfolgreich verlief. Die unter 3.3 gewählten Parameter der Elektroporation waren mit einer Transfektionseffizienz von beinahe 100 % (Daten nicht dargestellt) sehr erfolgreich und daher zu empfehlen.

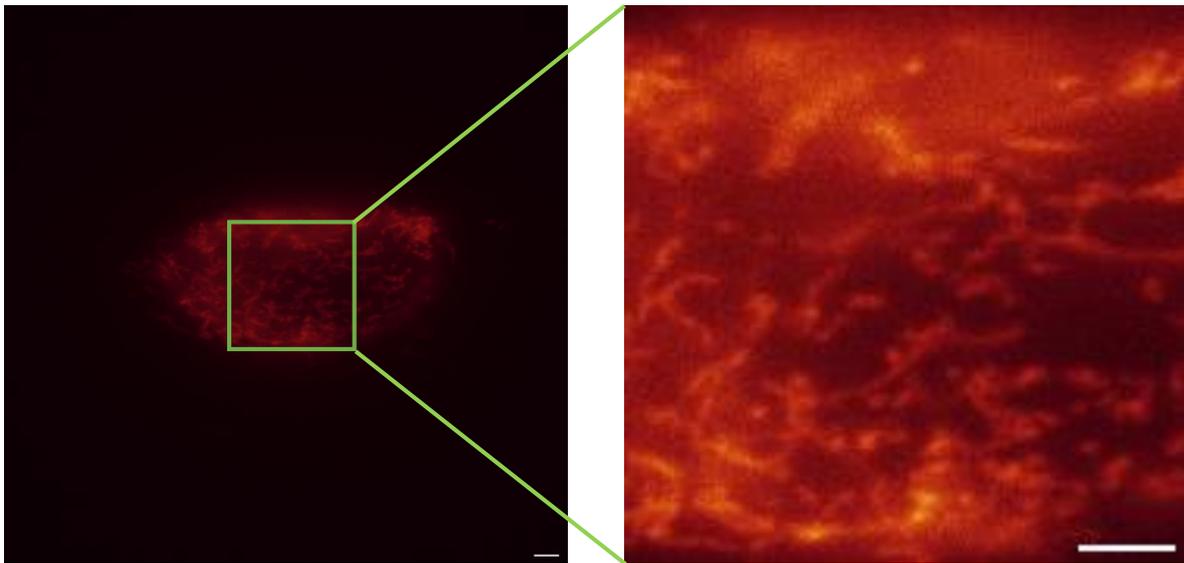


Abbildung 11: Mito-Dreiklang in der Weitfeldaufnahme

Dargestellt sind Mito-Dreiklang transfizierte, neonatale normale humane epidermale Keratinozyten. Links befindet sich die Übersichtsaufnahme, rechts die *region of interest* (ROI). Das Fluoreszenzsignal von Mito-Dreiklang ist in den Mitochondrien lokalisiert. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm. Der Messbalken entspricht 2,5 μm .

Das Fluoreszenzsignal der Mitochondrien (Abbildung 11, rechts) wirkt in dem Weitfeldmodus und der dadurch entsprechenden großen Schichtdicke des Emissionssignals und durch die beugungsbegrenzte Abbildung verschwommen. Das Hintergrundrauschen ist klar erkennbar. Verantwortlich dafür sind neben Emissionen aus darüberliegenden, nicht fokussierten Schichten auch Einstrahlungen und Lichtbrechungen aus benachbarten Strukturen. Des Weiteren benötigt M3K nach der Translation noch Transportzeit, bevor M3K die zielequenzvermittelte Mitochondrienmatrix erreicht. Bis dahin könnte das diffus vorkommende zytoplasmatische M3K das Hintergrundrauschen

verstärken. In der ROI sind tubuläre und globuläre Strukturen zu erkennen. Einige Strukturen sind im Fusion Zustand, wohingegen andere bereits fragmentierter sind.

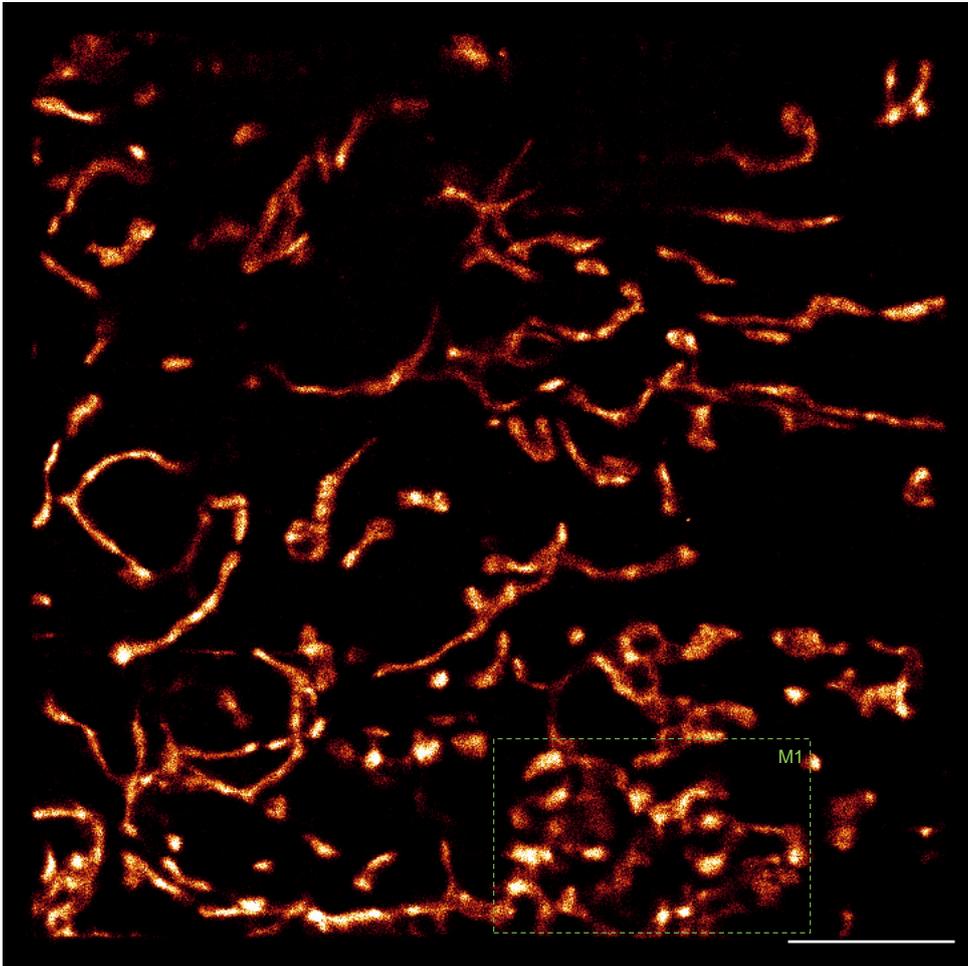


Abbildung 12: Mito-Dreiklang in der EPI-GSD-Aufnahme

Dargestellt ist die ROI aus Abbildung 11 im EPI-GSD-Modus. Die Aufnahme wurde aus 39076 Einzelbildern generiert. Der Messbalken entspricht 2,5 μm .

Die Detektion der Einzelfluoreszenz-Ereignisse durch Erreichen der OFF-States über die in 1.5 beschriebene Vorgehensweise war zielführend. Die in Abbildung 12 gezeigten Mitochondrien in der GSD-Aufnahme sind eindeutig feiner und detaillierter als in Abbildung 11. Das Hintergrundrauschen ist beinahe verschwunden. Lediglich im unteren Bereich lässt sich ein Hintergrundrauschen erkennen (siehe Markierung M1). Einige Strukturen sind überbelichtet, andere Strukturen wirken etwas geschwollen. Die füllig wirkenden Strukturen können mehrere Ursachen haben. Zum einen handelte es sich um lebende Keratinozyten, welche, wenn auch nur langsam, durch das LabTek wandern. Zum anderen handelt es sich bei den Mitochondrien um ein sehr dynamisches Netzwerk, welches sich kontinuierlich bewegt. Schließlich führt die intensive Laserstrahlung während der Aufnahme zu

Veränderungen in der Mitochondrienmorphologie. Die Mitochondrien scheinen sehr empfindlich auf die Laserleistung zu reagieren, da sie mit der zunehmenden Dauer der Aufnahme anfangen zu fragmentieren. Da die Einzelbilder für die resultierende Gesamtaufnahme zusammen gerechnet werden und die oben beschriebenen Bewegungen für eine Verschiebung der Fluorophore mit zunehmender Zeit sorgen, wirken die Strukturen bei langen Aufnahmen geschwollen. Hierbei sollte man bei jeder Aufnahme erneut abwägen, ob man vergrößerte Strukturen akzeptiert und damit mehr Signale aufzeichnet oder ob man eine Aufnahme von kurzer Dauer macht, in welcher die bewegungsanfälligen Strukturen feiner sind. Die Eventrate über die GSD-Aufnahme ist in Abbildung 13 dargestellt.

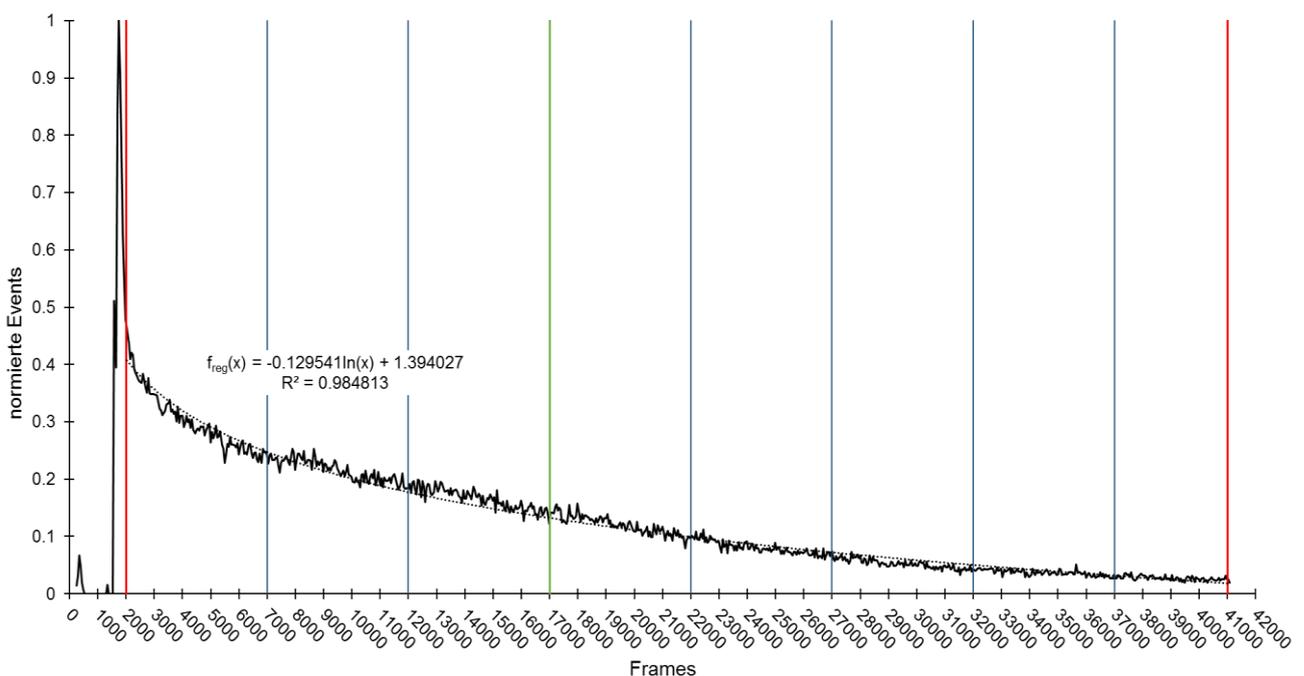


Abbildung 13: Diagramm der normierten Events über 41.076 Frames

In dem Diagramm sind die normierten Einzelevents der Superresolution-Aufnahme aus Abbildung 12 über 41.076 Frames dargestellt. Das Diagramm wurde für die Darstellung durch die Verwendung von nur jedem fünfzigsten Frame geglättet. Zwischen den roten Markierungen treten Blinkerevents auf. Die in diesem Intervall auftretenden Einzelevents wurden für die Berechnung in die Superresolution-Aufnahme aus Abbildung 12 verwendet. Ab Frame 2.000 markieren die blauen Linien die Intervallgrenzen von 5000 Frames. Für den Bereich zwischen den roten Markierungen wurde eine logarithmische Regression vorgenommen. Die grüne Markierung liegt bei 17.000 Frames.

Durch die Bestimmung der Fläche unter dem Graphen lässt sich der prozentuale Anteil der Gesamt Ereignisse auf bestimmte Intervalle verteilen. Aus der Gesamtfläche unter dem Graphen mit

$$(III) \quad \int_{2000}^{41076} -0,12954 \ln x + 1,394027 \, dx \triangleq 100\%$$

ergeben sich folgende prozentualen Anteile der Gesamtevents für die angegebenen Intervalle.

Tabelle 2: Prozentualer Anteil an der Gesamtheit der Events für bestimmte Intervalle

Intervall	Prozentualer Anteil an Gesamtevents	Intervalldauer
2000 -7000	31,31 %	50 Sekunden
7000-12000	21,00 %	50 Sekunden
12000-17000	15,41 %	50 Sekunden
17000-22000	11,53 %	50 Sekunden
22000-27000	8,54 %	50 Sekunden
27000-32000	6,12 %	50 Sekunden
32000-37000	4,08 %	50 Sekunden
37000-41076	2,01 %	40,76 Sekunden

Vergleicht man die Dauer der Aufnahme mit der Qualität der Aufnahme und dem prozentualen Anteil der entsprechenden Events an den Gesamtevents, ist es möglich in etwa abzuschätzen, wie viele Bilder für die Erstellung der GSD-Aufnahme verrechnet werden sollten.

Nachfolgend sind die verrechneten Aufnahmen zu den dazugehörigen Intervallen gezeigt.

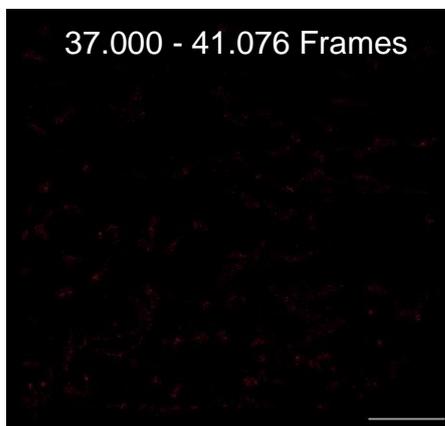
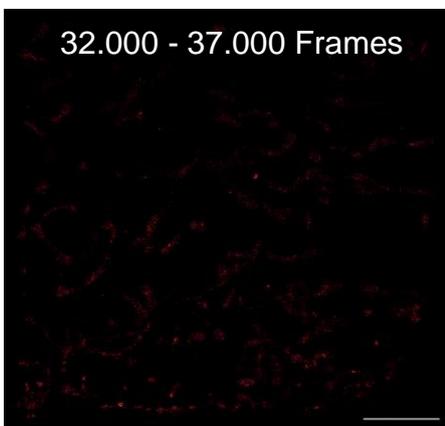
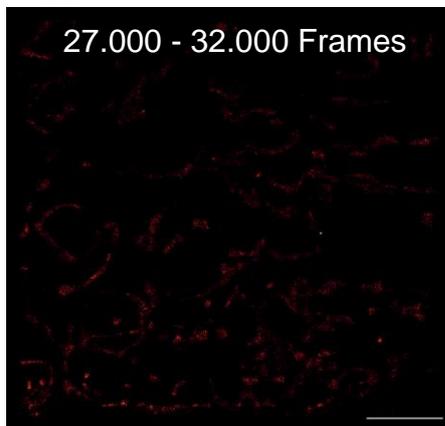
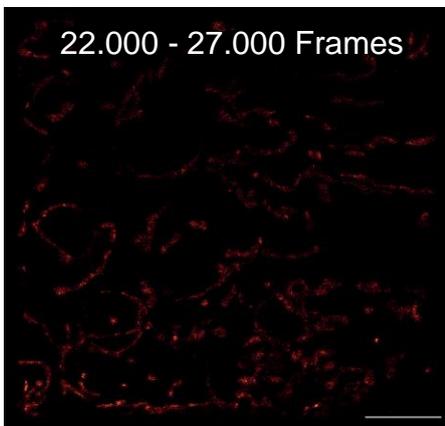
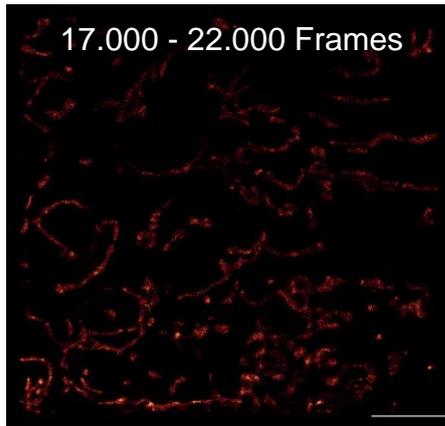
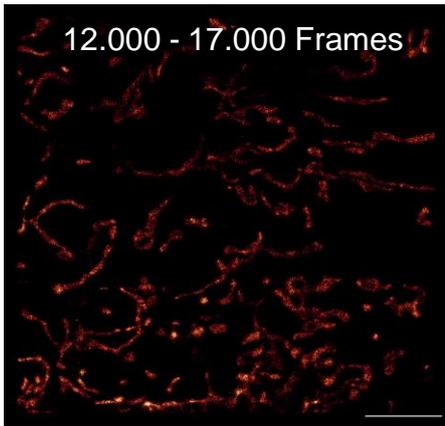
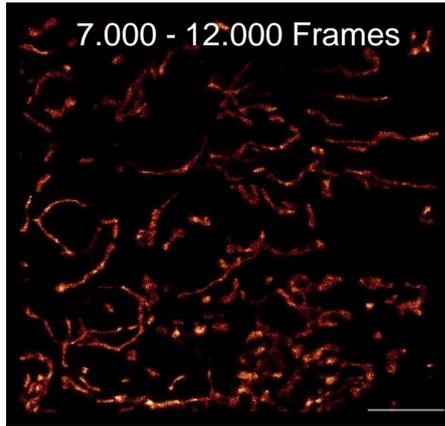
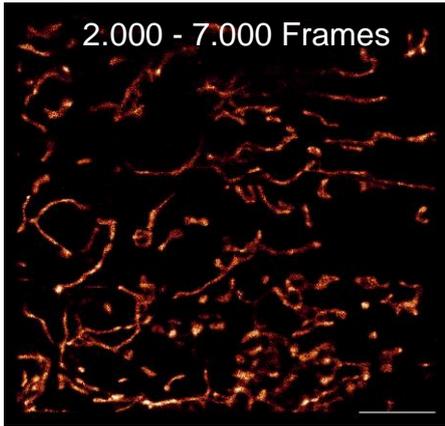


Abbildung 14:
Superresolution-Aufnahmen
für angegebene Intervalle

Auf Grund der sinkenden Eventrate pro Intervall, verblassen die verrechneten Bilder mit steigender Dauer der Aufnahme. Bei genauer Betrachtung der Strukturen fällt auf, dass die Mitochondrien mit zunehmenden Intervallen fragmentieren und globuläre Strukturen annehmen. Der Messbalken entspricht 2,5 μm .

Nach Abschätzung der geeigneten Intervalle für die Berechnung der GSD-Aufnahme, wurde ein Bild aus den ersten drei Intervallen, also aus 15.000 Einzelbildern, generiert. Dieses enthält laut Regressionskurve 67,72 % aller aufgezeichneten Ereignisse mit einer Ereignisdetektionszeit von 2,5 Minuten. Alle anschließenden Ereignisse wurden abgeschnitten. In Abbildung 15 ist die generierte Aufnahme gezeigt.

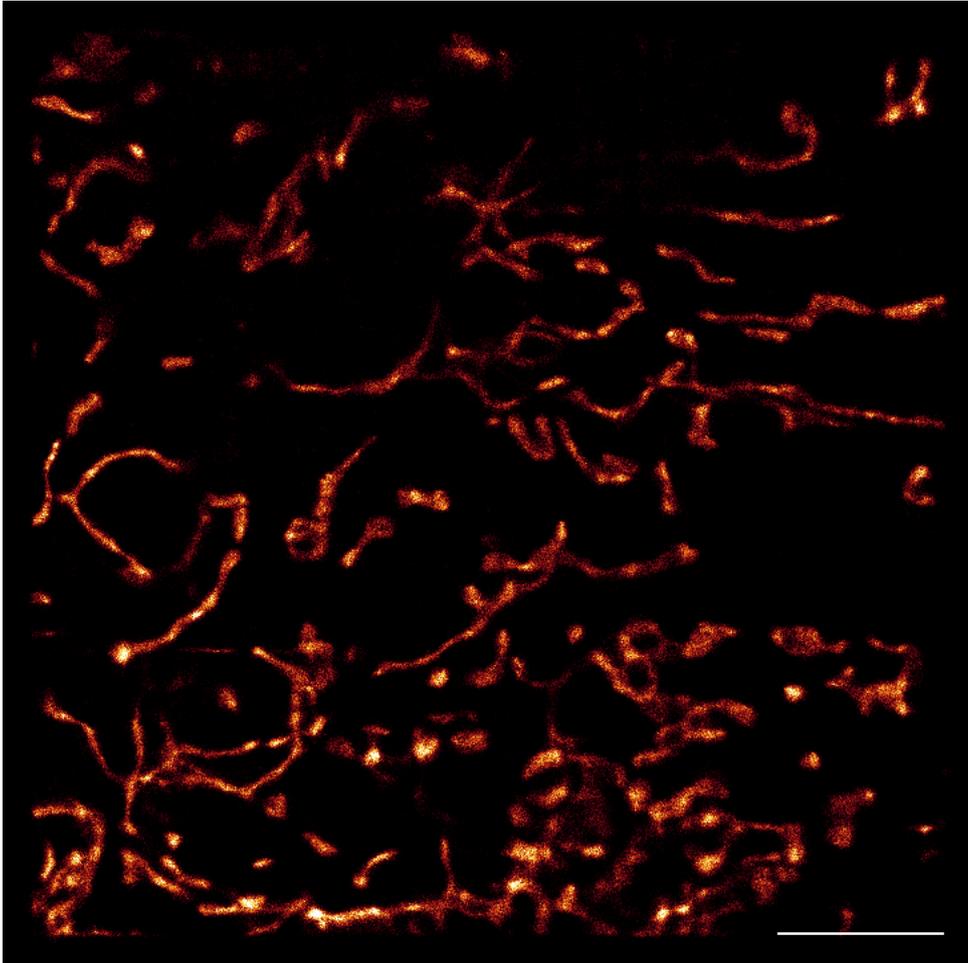


Abbildung 15: Superresolution-Aufnahme von Mitochondrien nach Eventanalyse

Dargestellt ist die ROI aus Abbildung 11 im EPI-GSD-Modus. Die Aufnahme wurde aus 15.000 Einzelbildern generiert. Der Messbalken entspricht 2,5 μm .

Vergleicht man Abbildung 12 mit Abbildung 15 fallen trotz Eventanalyse keine großen Unterschiede auf. Die Strukturen wirken in der neu verrechneten Aufnahme dunkler, nur geringfügig feiner und das Hintergrundrauschen wurde nur in wenigen Bereichen minimiert.

Um eine Struktur im GSD-Mikroskop in z-Richtung besser auflösen zu können, können die Aufnahmen im TIRF-GSD-Modus gemacht werden. Durch das evaneszente Feld werden Strukturen oberhalb von 200 nm über dem Deckglas nicht bestrahlt, wodurch ein optischer Schnitt entsteht. In Abbildung 16 befindet sich eine Übersichtsaufnahme und die ROI im TIRF-Modus.

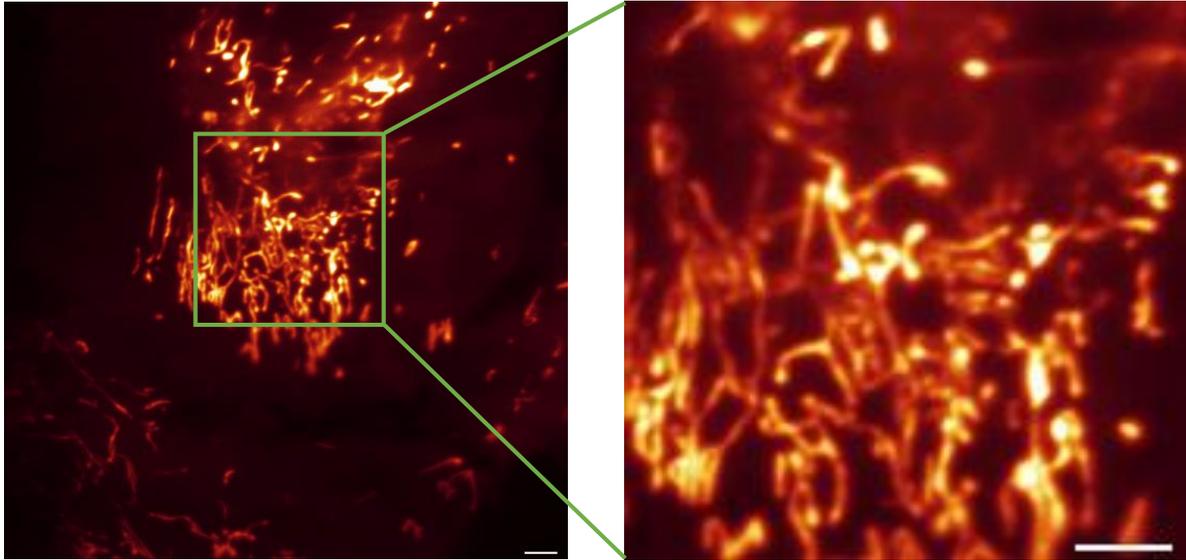


Abbildung 16: Mito-Dreiklang in der TIRF-Aufnahme

Dargestellt sind Mito-Dreiklang transfizierte, neonatale normale humane epidermale Keratinozyten im TIRF-Modus. Links befindet sich die Übersichtsaufnahme, rechts die *region of interest* (ROI). Das Fluoreszenzsignal von Mito-Dreiklang ist in den Mitochondrien lokalisiert. Die Fluoreszenzanregung erfolgt bei einer Wellenlänge von 488 nm. Der Messbalken entspricht 2,5 μm .

Wie in der Übersichtsaufnahme erkennbar, befinden sich nicht in jeder Zelle und nicht an jeder Position innerhalb der Zelle Mitochondrien in Deckglasnähe. Im Vergleich zu Abbildung 11 ist die Bildqualität der ROI bereits deutlich besser. Einige Bereiche sind etwas überbelichtet. Das Hintergrundrauschen ist minimiert. Verzweigte, fusionierte sowie globuläre, fragmentierte Strukturen sind zu erkennen. In Abbildung 17 befindet sich die TIRF-GSD-Aufnahme.

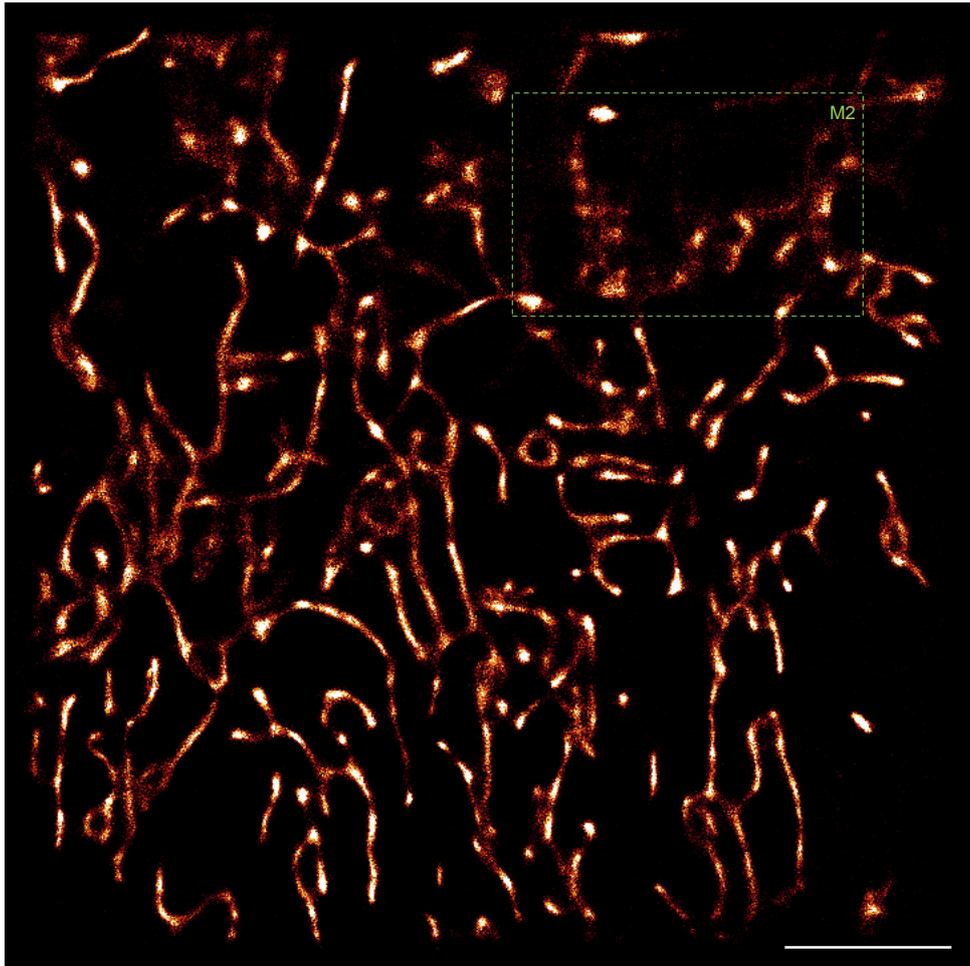


Abbildung 17: TIRF-GSD-Aufnahme von Mito-Dreiklang in Keratinozyten

Dargestellt ist die ROI aus Abbildung 16 im TIRF-GSD-Modus. Die Aufnahme wurde aus 3132 Einzelbildern generiert. Der Messbalken entspricht 2,5 μm .

In Abbildung 17 sind die mitochondrialen Strukturen grafisch deutlich besser aufgelöst als in Abbildung 16. Da die GSD-Aufnahme zudem nur aus 3.132 Einzelbildern generiert wurde, was einer Aufnahmezeit von 31,32 Sekunden entspricht, konnten die Mitochondrien sehr fein dargestellt werden, da die Bewegungsunschärfe durch die kurze Aufnahmezeit minimiert wurde. Das Hintergrundrauschen ist sehr gering. Im markierten Bereich M2 sind die Mitochondrien an der oberen Grenze des evaneszenten Feldes angesiedelt, weshalb die Strukturen verschwommen wirken. Die Verwendung von Medium D an Stelle von Medium E (erhöhte Photostabilität von Fluoreszenzproteinen) hatte dank der kurzen Aufnahmedauer keinen merklichen Einfluss gezeigt. Es lassen sich Mitochondrien im fusionierten und fragmentierten Zustand beobachten. Allerdings ist es nicht auszuschließen, dass fusionierte Mitochondrien, welche aufrecht in z-Richtung verlaufen in der Aufnahme als globuläre Strukturen zu erkennen sind.

4.2 Mito-Dreiklang zur Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie

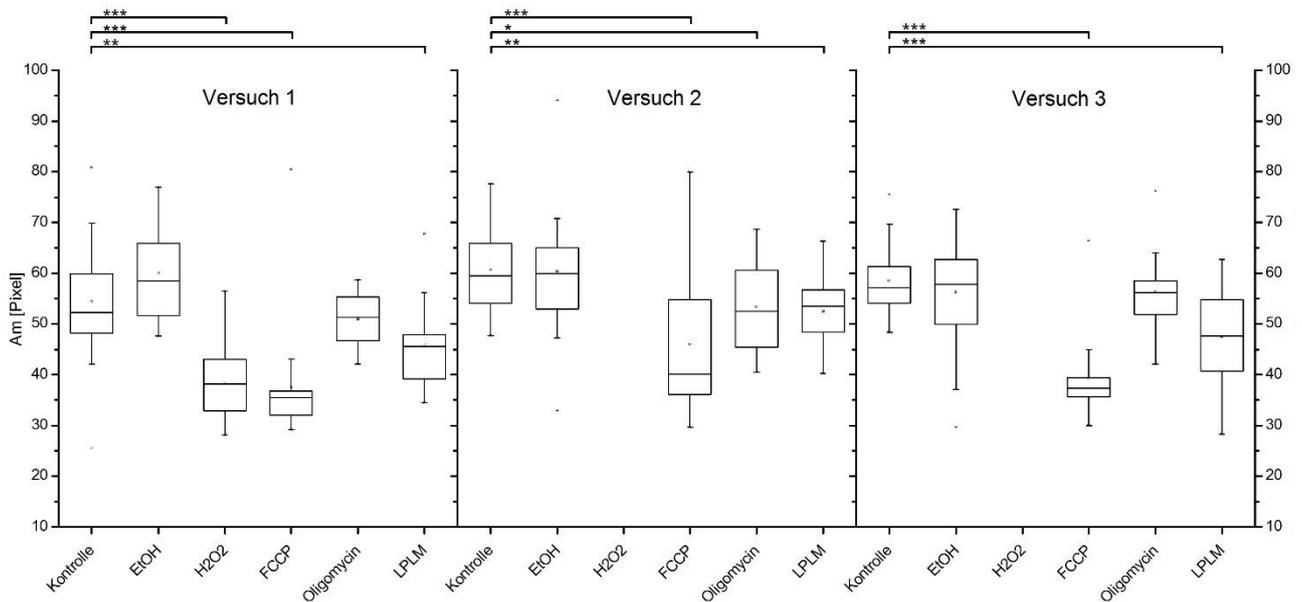


Abbildung 18: Boxplot der mitochondrialen Fläche A_m aller Versuche

Dargestellt ist die mitochondriale Fläche A_m der Versuche 1-3 bei angegebener Behandlung. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind pro Versuch über den Diagrammen aufgeführt. Die Signifikanzniveaus sind durch Sterne gekennzeichnet, mit * = p-Wert $\leq 0,05$; ** = p-Wert $\leq 0,01$; *** = p-Wert $\leq 0,001$. Deskriptive Unterschiede sind nicht kenntlich gemacht.

Tabelle 3: Signifikanzwerte sowie absolute und relative Abweichungen der mitochondrialen Masse A_m

		mitochondriale Fläche A_m			
		Kontrolle vs. ...	p-Wert	absolute Mittelwertabweichung	relative Mittelwertabweichung in %
Versuch 1	EtOH		0,053104	5,79	10,68
	H ₂ O ₂		0,000033	-15,64	-28,82
	FCCP		0,000016	-16,79	-30,96
	Oligomycin		0,245785	-3,33	-6,14
	LPLM		0,005116	-8,27	-15,25
Versuch 2	EtOH		0,917238	-0,25	-0,41
	H ₂ O ₂		 	 	
	FCCP		0,000244	-14,64	-24,13
	Oligomycin		0,015430	-7,32	-12,06
	LPLM		0,002655	-8,24	-13,59
Versuch 3	EtOH		0,839232	-2,29534	-3,92
	H ₂ O ₂		 	 	
	FCCP		0,000001	-19,28	-32,94
	Oligomycin		0,409356	-2,23	-3,82
	LPLM		0,000563	-11,02	-18,83

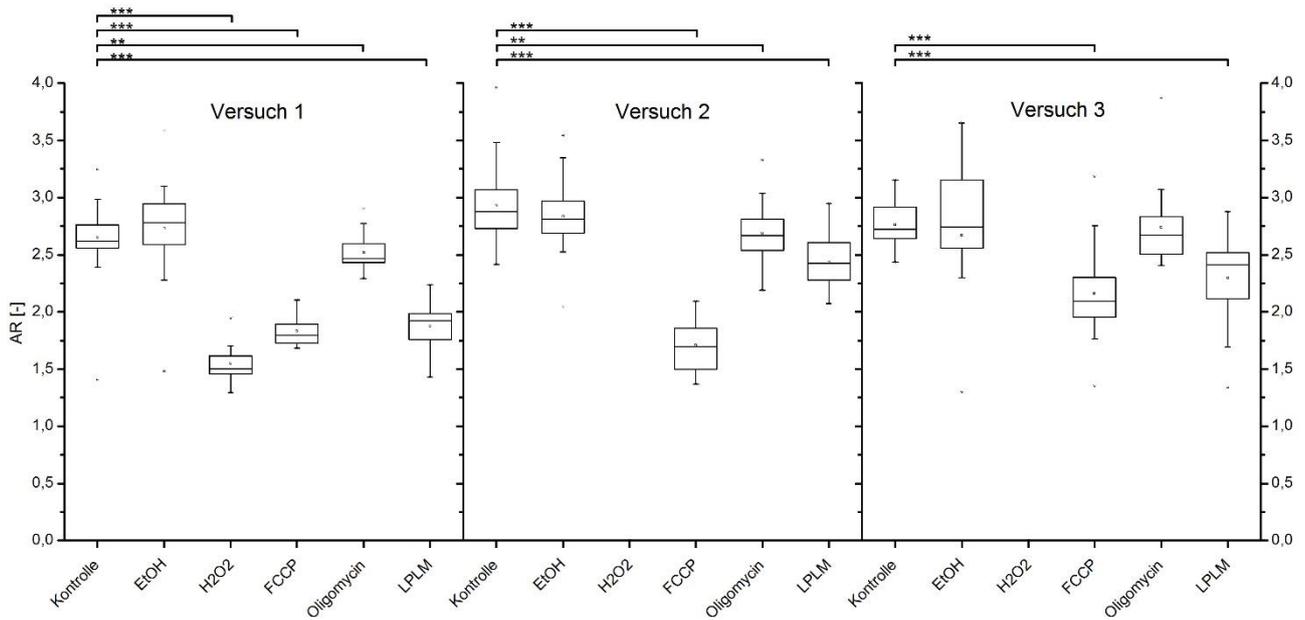


Abbildung 19: Boxplot des Aspect Ratio AR aller Versuche

Dargestellt ist das *Aspect Ratio* AR der Versuche 1-3 bei angegebener Behandlung. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind pro Versuch über den Diagrammen aufgeführt. Die Signifikanzniveaus sind durch Sterne gekennzeichnet, mit * = p-Wert $\leq 0,05$; ** = p-Wert $\leq 0,01$; *** = p-Wert $\leq 0,001$. Deskriptive Unterschiede sind nicht kenntlich gemacht.

Tabelle 4: Signifikanzwerte sowie absolute und relative Abweichungen des Aspect Ratio AR

		<i>Aspect Ratio AR</i>			
		Kontrolle vs. ...	p-Wert	absolute Mittelwertabweichung	relative Mittelwertabweichung in %
Versuch 1	EtOH		0,208454	0,08	3,00
	H ₂ O ₂		0,000001	-1,10	-41,55
	FCCP		0,000001	-0,82	-30,86
	Oligomycin		0,007509	-0,13	-4,85
	LPLM		0,000001	-0,77	-29,09
Versuch 2	EtOH		0,360488	-0,09	-3,24
	H ₂ O ₂		0,000000	0,00	0,00
	FCCP		0,000000	-1,22	-41,67
	Oligomycin		0,005713	-0,24	-8,24
	LPLM		0,000000	-0,49	-16,78
Versuch 3	EtOH		0,714980	-0,09	-3,42
	H ₂ O ₂		0,000000	0,00	0,00
	FCCP		0,000007	-0,60	-21,84
	Oligomycin		0,336916	-0,03	-1,01
	LPLM		0,000008	-0,47	-16,86

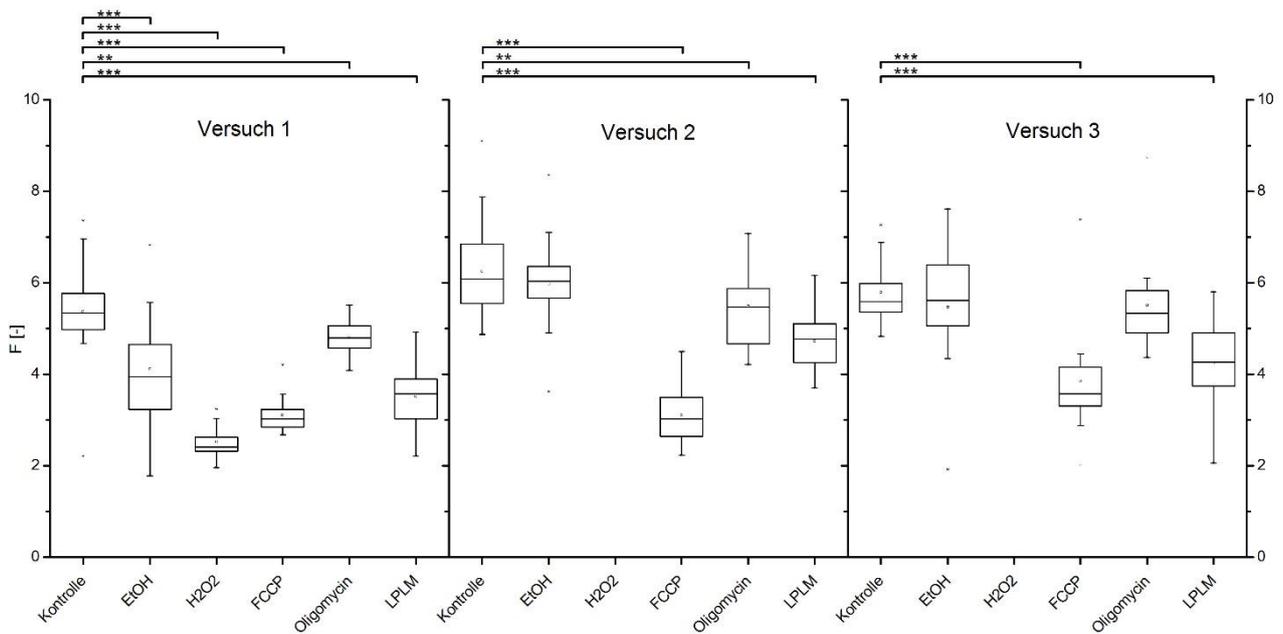


Abbildung 20: Boxplot des Formfaktors F aller Versuche

Dargestellt ist der Formfaktor F der Versuche 1-3 bei angegebener Behandlung. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind pro Versuch über den Diagrammen aufgeführt. Die Signifikanzniveaus sind durch Sterne gekennzeichnet, mit * = p -Wert $\leq 0,05$; ** = p -Wert $\leq 0,01$; *** = p -Wert $\leq 0,001$. Deskriptive Unterschiede sind nicht kenntlich gemacht.

Tabelle 5: Signifikanzwerte sowie absolute und relative Abweichungen des Formfaktors F

		Formfaktor F			
		Kontrolle vs. ...	p-Wert	absolute Mittelwertabweichung	relative Mittelwertabweichung in %
Versuch 1	EtOH		0,000338	-1,26	-23,51
	H ₂ O ₂		0,000001	-2,85	-53,03
	FCCP		0,000001	-2,28	-42,35
	Oligomycin		0,001997	-0,55	-10,20
	LPLM		0,000002	-1,86	-34,67
Versuch 2	EtOH		0,532970	-0,28	-4,54
	H ₂ O ₂		0,000000	-3,16	-50,54
	FCCP		0,000000	-3,16	-50,54
	Oligomycin		0,009796	-0,78	-12,38
	LPLM		0,000000	-1,53	-24,49
Versuch 3	EtOH		0,946084	-0,33	-5,62
	H ₂ O ₂		0,000000	-1,94	-33,50
	FCCP		0,000003	-1,94	-33,50
	Oligomycin		0,096197	-0,28	-4,81
	LPLM		0,000001	-1,56	-26,87

Die mitochondriale Fläche *Am* sowie das *Aspect Ratio AR* sind in allen Versuchen und Behandlungen, außer bei der Behandlung mit Ethanol in Versuch 1, signifikant oder zumindest deskriptiv im Vergleich zu den Kontrollen gesunken. Der Formfaktor *F* ist in allen Behandlungen und Versuchen im Vergleich zu den Kontrollen gefallen.

Ethanol hatte in keinem der Versuche signifikante Auswirkungen auf die mitochondriale Fläche *Am* und das *Aspect Ratio AR*, wobei die relativen Abweichungen beider Parameter in Versuch 2 und 3 negativ und in Versuch 1 positiv deskriptiv waren. Bei der Betrachtung des Formfaktors der behandelten Zellen mit Ethanol fällt eine ungewöhnlich große Diskrepanz im Vergleich zwischen Versuch 1 und Versuch 2 und 3 auf. Während in Versuch 1 eine signifikante relative Mittelwertabnahme des Formfaktors von ca. 24 % beobachtet werden konnte, liegt die Abnahme in Versuch 2 und 3 deskriptiv gerade einmal zwischen 4 bis 6 %. Da sich bei der Behandlung mit Ethanol *Am*, *AR* und *F* in Versuch 2 und 3 sehr ähneln, wird die Ethanolbehandlung in Versuch 1 als Ausreißer gewertet. Durch die Vernachlässigung von Versuch 1 lässt sich sagen, dass eine 24 Stunden Behandlung mit 50 mM Ethanol keine signifikante Auswirkung auf die mitochondriale Morphologie in Keratinozyten hat. Keratinozyten reagieren somit nicht wie vaskuläre Endothelzellen, welche nach einer 30 Stunden Behandlung mit 50 mM Ethanol deutlich fragmentierter vorliegen. Der Hintergrund für die mitochondriale Fragmentierung war in den Versuchen mit den vaskulären Endothelzellen durch eine Zunahme der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies, welche zu einer veränderten Ca^{2+} Abwicklung und somit zur mitochondrialen Dysfunktion führte, zu erklären ²¹.

Die Bildanalyse und Parameterbestimmung der mitochondrialen Struktur in Keratinozyten, welche mit 0,5 mM H_2O_2 behandelt wurden, konnte nur in Versuch 1 durchgeführt werden. Die Keratinozyten in Versuch 2 und 3 waren zum Zeitpunkt der Aufnahmen bereits apoptotisch bzw. nekrotisch (siehe Abbildung 21).

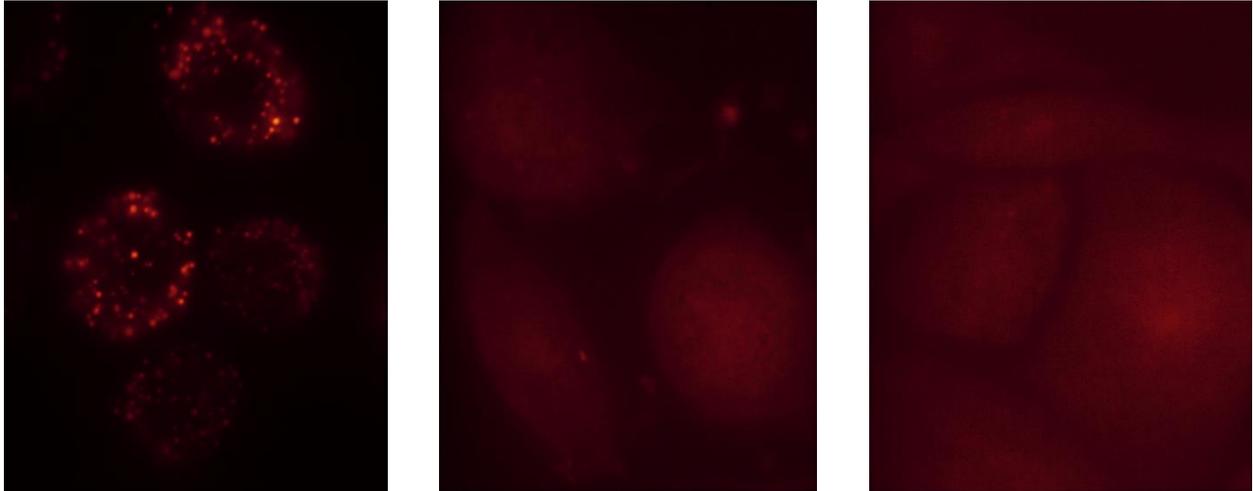


Abbildung 21: Keratinozyten 24 Stunden nach 0,5 mM H₂O₂ Behandlung

In der Aufnahme aus Versuch 1 (links) sind globuläre Strukturen erkennbar. In den Aufnahmen aus Versuch 2 (mitte) und Versuch 3 (rechts) sind keine mitochondrialen Strukturen mehr zu erkennen. Vermutlich wurden die Mitochondrien im Verlauf der Apoptose zurückgebildet (Autophagozytose). Einige fluoreszierende Agglomerate sind noch erkennbar, hierbei handelt es sich um nicht degradierte, denaturierte Proteinkomplexe.

FCCP hatte in allen Versuchen einen signifikanten Einfluss mit einem p-Wert $\leq 0,001$. Die Fläche eines Mitochondriums hat im Vergleich zur Kontrolle im Mittel zwischen 14 - 20 Pixel je nach Versuch abgenommen, was einer relativen Abweichung zwischen 24 % - 33 % entspricht. Das *Aspect Ratio* nahm im Vergleich zur Kontrolle zwischen 22 % - 42 %, der Formfaktor im Vergleich zur Kontrolle sogar zwischen 34 %- 51% ab. FCCP hatte in Versuch 1 im Vergleich zur Behandlung mit H₂O₂ einen größeren Abfall an mitochondrialer Fläche zu verzeichnen.

Das *Aspect Ratio* und der Formfaktor von FCCP behandelten Keratinozyten liegt oberhalb der H₂O₂ Behandlung. Diese Parameterwerte passen zu der Beobachtung der apoptotischen Zellen der H₂O₂ Behandlung in Versuch 2 und 3 wie auch zu den Angaben aus der Literatur. In der Literatur werden geschwollene, sehr runde mitochondriale Strukturen, demnach also Mitochondrien mit $Am_{H_2O_2} > Am_{min}$, $AR_{H_2O_2} = AR_{min}$ und $F_{H_2O_2} = F_{min}$ als Mitochondrien mit rupturierter äußerer Mitochondrienmembran im Sinne der Apoptose beschrieben²⁵. Als Fission Standard konnte sich der membrangängige H⁺-Ionen Carrier FCCP, welcher als Entkoppler des mitochondrialen Membranpotentials durch Ausschleusung der H⁺-Ionen aus der Mitochondrienmatrix wirkt²⁶ bei einer Konzentration von 300 nM behaupten. H₂O₂ (0,5 mM), das für die Simulation von ROS eingesetzt wurde hatte deutlich verheerendere Folgen für die zelluläre Vitalität als FCCP.

Oligomycin, das als Inhibitor der ATP-Synthase bekannt ist und das Membranpotential innerhalb der Mitochondrienmatrix durch Zurückhaltung der H⁺-Ionen steigert ²⁶, hatte nur in Versuch 2 im Vergleich zur Kontrolle mit einer relativen Mittelwertabweichung um -12 % und einem Signifikanzniveau mit einem p-Wert $\leq 0,05$ einen Einfluss auf die mitochondriale Fläche gezeigt. In Versuch 1 und 2 war der Einfluss deskriptiv erniedrigt. Das *Aspect Ratio* und der Formfaktor waren hingegen in Versuch 1 und 2 signifikant mit einem p-Wert $\leq 0,01$ erniedrigt. In Versuch 3 waren das *Aspect Ratio* und der Formfaktor nur deskriptiv erniedrigt. Da sich die Parameter und somit das unterschiedliche Verhalten der mitochondrialen Morphologie nach der Oligomycin Behandlung nicht zwischen bestimmten Versuchen unterscheiden, und daher ein Versuch als Ausreißer bezeichnet werden konnte, kann nur von einer tendenziellen Fragmentierung gesprochen werden. Für genaue Aussagen sollten die Versuche hinsichtlich der Oligomycin-Behandlung wiederholt werden.

In allen Versuchen hatte das **lipophile Lösungsmittel** einen signifikanten Einfluss auf die mitochondriale Morphologie im Vergleich zur Kontrolle. Alle morphologischen Parameter (*Am*, *AR* und *F*) sind gesunken. Das LPLM sorgt somit eindeutig für ein fissionierteres mitochondriales Netzwerk.

Vergleicht man alle Behandlungen innerhalb der Versuche miteinander lässt sich sagen, dass FCCP das höchste Maß an fragmentierten Mitochondrien induziert. H₂O₂ sorgt für eine geringere Fragmentierung als FCCP, verursacht allerdings einen deutlich massiveren Schaden in der Zelle und führt vermutlich zur Apoptose. Das LPLM lässt die Mitochondrien zwar ebenfalls signifikant fragmentieren, jedoch weniger als FCCP und H₂O₂. An letzter Stelle kommt Oligomycin mit einer durch Ausreißer belasteten eher deskriptiven Einschätzung zur Fragmentierung. Ethanol hatte keinen signifikanten Einfluss auf die mitochondriale Morphologie. Es konnten Fragmentierungen von Mitochondrien mit unterschiedlich starker Ausprägung gezeigt werden.

Für die Genauigkeitsbeurteilung des Messprinzips, der Auswertungsmethode und der Ergebnisse sind mehrere Aspekte anzubringen. Zum einen handelt es sich um ein komplexes biologisches System, welches durch viele unterschiedliche Faktoren beeinflusst wird. Kleine Schwankungen in der Luftfeuchtigkeit und der Temperatur in der Umgebung, ebenso wie Schwankungen des pH-Wertes während der Kultivierung und der Aufnahmen könnten bereits Einflüsse auf die mitochondriale Funktion haben. Ebenfalls sollten die Keratinozyten nicht zu dünn ausgesät werden, da es ihnen bei zellulärem Kontakt besser

ergeht. Die Variationen zwischen einzelnen Zellen innerhalb eines Versuches und einer Behandlung waren teilweise sehr hoch, so waren Zellen unter dem Mikroskop in unterschiedlicher Form und Größe zu beobachten. Hierzu sei anzufügen, dass es zwingend erforderlich ist, keine subjektive Zellauswahl zu treffen.

Der nächste Aspekt wäre die händische Einstellung der Parameter in der MicroP Software. Durch das Konstanthalten der Auswertungsparameter der Software wird die Fehlerwahrscheinlichkeit allerdings in allen Aufnahmen die gleiche sein. Eine Alternative wäre eine vollkommen automatisierte Binarisierung ohne subjektive Parameterwahl, welche leider durch die Kürze der vorhandenen Bearbeitungszeit nicht entwickelt werden konnte. Fehler der Binarisierung hatten teilweise auffällige Ausreißer verursacht, welche aufgrund der angewendeten Statistik über die Mittelwertbildung pro Bild und Mittelwertbildung pro Behandlung sowie der Signifikanzbestimmung über den Mann-Whitney-U-Test weitestgehend unter Kontrolle gebracht wurden. Alternativ wäre durch die Anwendung eines t-Tests auf alle Mitochondrien innerhalb einer Behandlung im Vergleich zum vorher beschriebenen Verfahren keine Beeinflussung der Standardabweichungen vorgekommen. Da der t-Test den Mittelwert mit einbezieht, reagiert dieser allerdings sehr sensibel auf Ausreißer und Extremwerte. Zudem wäre der t-Test nur auf Normalverteilungen anzuwenden, die hier nicht vorlagen. Bei der Betrachtung des Histogramms war augenscheinlich, dass es sich um eine schiefe Verteilung gehandelt hat. Eine Stichprobenuntersuchung konnte dies allerdings nicht signifikant bestätigen.

Trotz der genannten Fehlerfaktoren war eine Auswertung der Aufnahmen möglich und klare Signifikanzen sowie gleichbleibende Parameter erkennbar.

5 Zusammenfassung

Die mitochondriale Morphologie, welche als Indiz für die zelluläre Vitalität, aber auch für eine Degeneration von zellulären Prozessen durch zellulären Stress oder Apoptose herangezogen werden kann, bedarf der Suche nach einem geeigneten Quantifizierungsstandard.

In dieser Arbeit ist es gelungen, die hochkomplexe, netzartige Morphologie der Mitochondrien, welche durch Fusions- und Teilungsprozesse beeinflusst wird, durch die GSD-Mikroskopie unterhalb der optischen Beugungsgrenze als auch durch eine automatisierte Verarbeitung von Weitfeld-Mikroskopieaufnahmen, quantitativ zu beschreiben. Als mitochondriale Markierung diente Mito-Dreiklang, ein photoschaltbares Fluoreszenzprotein, welches für Aufnahmen von lebenden Keratinozyten (*in-vitro*) verwendet wurde. Die automatisierte Verarbeitung von Weitfeldaufnahmen konnte signifikante Einflüsse von ausgewählten Substanzen (H_2O_2 , FCCP und das LPLM) auf das Fusion- und Fission-Netzwerk quantifizierbar und dadurch miteinander vergleichbar machen.

6 Danksagung

Im Rahmen dieser Abschlussarbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Abteilung der Biophysik der Beiersdorf AG für Ihre Unterstützung während meiner Arbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Dr. Frank Fischer, Meike Halm, Daniel Mellem, Sonja Pagel-Wolff und Martin Sattler, welche mir interessante Gedankenanstöße und Ideen zukommen ließen, zu Diskussionen bereit waren und mich während meiner Abschlussarbeit hervorragend unterstützten und betreuten.

Ebenso möchte ich mich besonderes für den fachlichen Rat zur GSD-Mikroskopie bei Herrn Dr. Jonas Fölling bedanken, der mir bei softwareseitigen Fragen in Bezug zur GSD-Mikroskopie zur Seite stand. Mein spezieller Dank geht an Dr. Stefan Jakobs und Dr. Nickels Jensen, welchen ich für die einmalige Chance des fachlichen Informationsaustauschs vor Ort am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie und den regen E-Mail-Verkehr hinsichtlich des Umgangs mit Mito-Dreiklang und dem Leica SR GSD danke.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Freunden und Kommilitonen für die wunderschöne Zeit während, aber vor allem neben den Lernphasen bedanken. Sie haben mich immer in meiner Sache bestärkt und waren mir immer eine erstklassige Motivation.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre Liebe, ihre Ausdauer und das Ermöglichen meines Studiums danken. Durch sie habe ich meine Ziele nie aus den Augen verloren.

7 Literaturverzeichnis

1. Jung, E. G. *Dermatologie*. (Hippokrates, 1998).
2. Wilke, K. Struktur- und Funktionsaufklärung von Schweißdrüsen und ihre Interaktion mit Antitranspirantien. (Technische Universität Hamburg-Harburg, 2005).
3. Eucerin.de. (2012). at <<http://www2.eucerin.com/skin-expertise/about-the-skin/the-skin-and-its-cells/the-epidermis/?L=18>>
4. Tronstad, K. *et al.* Regulation And Quantification Of Cellular Mitochondrial Morphology And Content. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 5634–5652 (2014).
5. Horn, F. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. (Thieme, 2012).
6. Freinkel, R. K. *Biochemistry and Physiology of the Skin*. (Oxford University Press, 1983).
7. Stücker, M. *et al.* The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. *J. Physiol.* **538**, 985–94 (2002).
8. Youle, R. J. & Karbowski, M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 657–663 (2005).
9. Youle, R. J. & van der Bliek, a. M. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science (80-)*. **337**, 1062–1065 (2012).
10. Ono, T., Isobe, K., Nakada, K. & Hayashi, J. I. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.* **28**, 272–5 (2001).
11. Seo, A. Y. *et al.* New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J. Cell Sci.* **123**, 2533–2542 (2010).
12. Westermann, B. Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J. Biol. Chem.* **283**, 13501–13505 (2008).
13. Brakemann, T. *et al.* A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching. *Nat. Biotechnol.* **29**, 942–947 (2011).
14. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4
15. Bretschneider, S., Eggeling, C. & Hell, S. W. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving. *Phys. Rev. Lett.* **98**, 218103 (2007).

16. Jensen, N. A. *et al.* Coordinate-targeted and coordinate-stochastic super-resolution microscopy with the reversibly switchable fluorescent protein dreiklang. *ChemPhysChem* **15**, 756–762 (2014).
17. Clontech Laboratories Inc. *pDSRed1-Mito Vector Information Protocol #PT3451-5, Version #PR13516*. (2001).
18. Fölling, J. *et al.* Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat. Methods* **5**, 943–945 (2008).
19. Abbe, E. C. in *Archiv für mikroskopische Anatomie* 413 – 418 (1873). doi:10.1007/BF02956173
20. Borlinghaus, R. T. STED and GSDIM : Diffraction Unlimited Resolution for all Types of Fluorescence Imaging. *Curr. Microsc. Contricutions to Adv. Sci. Technol.* 848–854 (2012).
21. Chandramoorthy, H., Mallilankaraman, K. & Madesh, M. in *Trends in Alcoholic Liver Disease Research - Clinical and Scientific Aspects* (2012).
22. Peng, J.-Y. MicroP. (2011). at <<http://bmi.ym.edu.tw/jypeng/>>
23. Peng, J.-Y. *et al.* Automatic morphological subtyping reveals new roles of caspases in mitochondrial dynamics. *PLoS Comput. Biol.* **7**, (2011).
24. Koopman, W. J. H. *et al.* Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂⁻-mediated mitochondrial outgrowth. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, 1440–1450 (2005).
25. Yoshii, S. R., Kishi, C., Ishihara, N. & Mizushima, N. Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **286**, 19630–19640 (2011).
26. Perry, S. W., Norman, J. P., Barbieri, J., Brown, E. B. & Gelbard, H. a. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: A practical usage guide. *Biotechniques* **50**, 98–115 (2011).
27. administrator.de. (2014). at <<http://www.administrator.de/frage/csv-dateien-ordner-vba-makro-einlesen-teil-2-232282.html>>
28. Ron de Bruin Excel Automation. (2013). at <<http://www.rondebruin.nl/win/s3/win003.htm>>
29. herber.de. (2012). at <http://www.herber.de/forum/archiv/1288to1292/1291020_Einzelne_Dateien_erstellen.html>

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologie der Epidermis.....	2
Abbildung 2: Bilanzierung der ATP-Synthese und Reduktionsäquivalente im Glukosestoffwechsel	4
Abbildung 3: Fusion- und Fission-Proteine von Mitochondrien	5
Abbildung 4: Schaltbarkeit, Chromophor, Extinktion und Emission von Dreiklang	7
Abbildung 5: Jablonski-Diagramm der Elektronenniveaus eines Fluorophors.	8
Abbildung 6: Vektor-Plasmid-Karte von Mito-Dreiklang	8
Abbildung 7: Prinzip der RESOLFT-Mikroskopie	9
Abbildung 8: Prinzip der TIRF- und TIRF-GSD-Mikroskopie.....	17
Abbildung 9: Screenshot MicroP	18
Abbildung 10: Fließdiagramm der Teilprozesse zur Analyse der mitochondrialen Morphologie	20
Abbildung 11: Mito-Dreiklang in der Weitfeldaufnahme	21
Abbildung 12: Mito-Dreiklang in der EPI-GSD-Aufnahme.....	22
Abbildung 13: Diagramm der normierten Events über 41.076 Frames.....	23
Abbildung 14: Superresolution-Aufnahmen für angegebene Intervalle.....	25
Abbildung 15: Superresolution-Aufnahme von Mitochondrien nach Eventanalyse.....	26
Abbildung 16: Mito-Dreiklang in der TIRF-Aufnahme.....	27
Abbildung 17: TIRF-GSD-Aufnahme von Mito-Dreiklang in Keratinozyten.....	28
Abbildung 18: Boxplot der mitochondrialen Fläche A_m aller Versuche	29
Abbildung 19: Boxplot des <i>Aspect Ratio</i> AR aller Versuche	30
Abbildung 20: Boxplot des Formfaktors F aller Versuche	31
Abbildung 21: Keratinozyten 24 Stunden nach 0,5 mM H_2O_2 Behandlung.....	33

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Parameter in MicroP zur Quantifizierung der mitochondrialen Morphologie	19
Tabelle 2: Prozentualer Anteil an der Gesamtheit der Events für bestimmte Intervalle.....	24
Tabelle 3: Signifikanzwerte sowie absolute und relative Abweichungen der mitochondrialen Masse Am	29
Tabelle 4: Signifikanzwerte sowie absolute und relative Abweichungen des <i>Aspect Ratio</i> AR	30
Tabelle 5: Signifikanzwerte sowie absolute und relative Abweichungen des Formfaktors F	31

10 Anhang

10.1 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat	
<i>Am</i>	mitochondriale Fläche	[Pixel]
AMP	Adenosinmonophosphat	
<i>AR</i>	Aspect Ratio (z. Dt. Querschnittsverhältnis)	[-]
ATP	Adenosintriphosphat	
β	Massenkonzentration	[g/ml]
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNS	Desoxyribonukleinsäure	
<i>F</i>	Formfaktor	[-]
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)	
FCCP	p-trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenyl hydrazone	
GSDIM	<i>ground state depletion followed by individual molecule return microscopy</i>	
GTP	Guanosintriphosphat	
LDH	Laktat-Dehydrogenase	
LPLM	lipophiles Lösungsmittel	
M3K	Mito-Dreiklang	
mtDNS	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure	
max	maximal	
min	minimal	
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)	
NADH/H ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)	
neoNHEK	neonatale normale humane epidermale Keratinozyten	

P _i	Phosphat
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
RT	Raumtemperatur
RESOLFT	<i>reversible saturable optical fluorescence transitions</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
VBA	<i>Visual Basic for Applications</i>

10.2 VBA-Makro zur Datenzusammenführung

```
Sub Import()  
'  
'Import'  
  Dim startFolder As String  
  startFolder = "T:\Eigene Dateien\Auswertung"  
  Dim CSVPFAD As String  
  CSVPFAD = GetFolder(startFolder)  
  Dim wbTarget As Workbook, wbSource As Workbook, ws As Worksheet  
  Set fso = CreateObject("Scripting.FileSystemObject")  
  Set wbTarget = ActiveWorkbook  
  Application.DisplayAlerts = False  
  
  'Lösche alle Arbeitsblätter bevor wir alle neu anlegen  
  If wbTarget.Worksheets.Count > 1 Then  
    For i = 1 To wbTarget.Worksheets.Count - 1  
      wbTarget.Worksheets(i).Delete  
    Next  
  End If  
  For Each F In fso.GetFolder(CSVPFAD).Files  
    If LCase(Right(F.Name, 9)) = "stats.csv" Then  
      Workbooks.OpenText Filename:=F.Path  
      Set wbSource = ActiveWorkbook  
      On Error Resume Next  
      Set ws = wbTarget.Worksheets(F.Name)  
      If Err <> 0 Then  
        Set ws = wbTarget.Worksheets.Add  
        ws.Name = Right(F.Name, 25)  
        ws.Range("A:ZZ").Clear  
      End If  
  
      wbSource.Worksheets(1).Range("A:A").TextToColumns Destination:=Range("A1"),  
      DataType:=xlDelimited, TextQualifier:=xlDoubleQuote, ConsecutiveDelimiter:=False, Comma:=True,  
      TrailingMinusNumbers:=True  
      wbSource.Worksheets(1).Range("A:ZZ").Copy Destination:=ws.Range("A1")  
      wbSource.Close False  
    End If  
  Next  
  Application.DisplayAlerts = True  
  Set fso = Nothing  
  
'Auf alle anwenden'  
Application.DisplayAlerts = False  
For Each s In ActiveWorkbook.Sheets  
  If Left(s.Name, 8) = "Tabelle1" Then  
    s.Delete  
  End If  
Next s  
  
Application.DisplayAlerts = True  
  
  Dim workShe As Worksheet  
  For Each workShe In ActiveWorkbook.Worksheets  
    workShe.Activate  
    EinzelAuswertung  
  Next  
  
End Sub  
  
Function GetFolder(strPath As String) As String  
  Dim fldr As FileDialog  
  Dim sItem As String  
  Set fldr = Application.FileDialog(msoFileDialogFolderPicker)  
  With fldr  
    .Title = "Select a Folder"  
    .AllowMultiSelect = False  
    .InitialFileName = strPath  
    If .Show <> -1 Then GoTo NextCode  
    sItem = .SelectedItems(1)  
  End With  
NextCode:
```

```

    GetFolder = sItem
    Set fldr = Nothing
End Function

Sub ZusammenführungDaten()
'ZusammenführungDaten
'ACHTUNG! DAS ERSTE ARBEITSBLATT (GANZ LINKS) MUSS VOR DEM STARTEN AUSGEWÄHLT SEIN!'
'ACHTUNG! DIESES MAKRO IST NICHT MEHR NACH Sub ZusammenfassungDaten() auszuführen!'

Dim Wks As Worksheet
Dim Bereich As Range
Dim strLC As String
Dim i As Integer

Set Wks = Worksheets.Add
Wks.Name = "Zusammenfassung"

For i = 2 To Worksheets.Count
With Worksheets(i).UsedRange
    strLC = .Cells(.Rows.Count, 6).Address
    Set Bereich = .Range("A2:" & strLC)
    Bereich.Copy Destination:= _
    Wks.Cells(Rows.Count, 1).End(xlUp).Offset(1, 0)
End With
Next i

'Füge Header hinzu
Wks.Range("A1:F1").Value = Array("Num", "Am", "L-Axis", "S-Axis", "AR", "F")

End Sub

Sub EinzelAuswertung()
'
' EinzelAuswertung und Kürzung
'DeleteAndRename'

    Range("J:J").Select
    Selection.ClearContents
    Range("I:I").Select
    Selection.ClearContents
    Range("G:G").Select
    Selection.ClearContents
    Range("H:H").Select
    Selection.ClearContents

    Cells(1, 2).Value = "Am"
    Cells(1, 5).Value = "AR"
    Cells(1, 6).Value = "F"

    Cells(1, 1).Select

'Mitochondrienanzahl'

Dim l As Integer
Dim N As Integer

l = 2
N = 0
Do While Not IsEmpty(Cells(l, 1))
    If Cells(l, 1).Value > N Then N = Cells(l, 1).Value

    l = l + 1
Loop

Cells(1, 7).Value = "NumberOfMitochondriaInPicture"
Cells(2, 7).Value = "N"
Cells(3, 7).Value = N

'Mitochondrial Area'

Dim i As Integer
Dim SumAm As Integer

```

```

i = 2
SumAm = 0
Do While Not IsEmpty(Cells(i, 2))

    SumAm = SumAm + Cells(i, 2).Value

i = i + 1
Loop

Cells(1, 8).Value = "SumMitochondrialArea"
Cells(2, 8).Value = "SumAm"
Cells(3, 8).Value = SumAm

'MeanAm - Durchschnittliche Mitochondrienfläche'

Dim MeanAm As Double

MeanAm = Application.WorksheetFunction.Average(ActiveSheet.Range("B:B"))

Cells(1, 9).Value = "MeanMitochondrialArea"
Cells(2, 9).Value = "MeanAm"
Cells(3, 9).Value = MeanAm

'STABWMeanAm - Durchschnittliche Mitochondrienfläche'

Dim STABWMeanAm As Double

STABWMeanAm = Application.WorksheetFunction.StDev(ActiveSheet.Range("B:B"))

Cells(1, 10).Value = "STABWMitochondrialArea"
Cells(2, 10).Value = "STABWMeanAm"
Cells(3, 10).Value = STABWMeanAm

'MeanAspectRatio'

Dim MeanAR As Double

MeanAR = Application.WorksheetFunction.Average(ActiveSheet.Range("E:E"))

Cells(1, 11).Value = "MeanAspectRatio"
Cells(2, 11).Value = "MeanAR"
Cells(3, 11).Value = MeanAR

'STABWMeanAspectRatio'

Dim STABWMeanAR As Double

STABWMeanAR = Application.WorksheetFunction.StDev(ActiveSheet.Range("E:E"))

Cells(1, 12).Value = "STABWMeanAspectRatio"
Cells(2, 12).Value = "STABWMeanAR"
Cells(3, 12).Value = STABWMeanAR

'MeanFormfactor'

Dim MeanF As Double

MeanF = Application.WorksheetFunction.Average(ActiveSheet.Range("F:F"))

Cells(1, 13).Value = "MeanFormfactor"
Cells(2, 13).Value = "MeanF"
Cells(3, 13).Value = MeanF

'STABWMeanFormfactor'

Dim STABWMeanF As Double

STABWMeanF = Application.WorksheetFunction.StDev(ActiveSheet.Range("F:F"))

Cells(1, 14).Value = "STABWMeanFormfactor"
Cells(2, 14).Value = "STABWMeanF"
Cells(3, 14).Value = STABWMeanF

```

```

'ZellenAutoFit'

Range("G1:N3").Select
Selection.Columns.AutoFit
Cells(1, 1).Select

End Sub

Sub ZusammenfassungDaten()
'Fasst Alle Standardabweichungen und Mittelwerte pro Behandlung in einem Arbeitsblatt zusammen'
'ACHTUNG! Das ZWEITE ARBEITSBLATT (von LINKS) MUSS VOR dem Starten Ausgewählt sein, sofern
ZusammenführungDaten() schon ausgeführt wurde. ansonsten muss die ERSTE ARBEITSMAPPE AUSGEWÄHLT SEIN.'

    Dim Sh As Worksheet
    Dim Newsh As Worksheet
    Dim myCell As Range
    Dim ColNum As Integer
    Dim RwNum As Long
    Dim Basebook As Workbook

    With Application
        .Calculation = xlCalculationManual
        .ScreenUpdating = False
    End With

    'Lösche das Arbeitsblatt "Summary-Sheet" sofern es existiert
    Application.DisplayAlerts = False
    On Error Resume Next
    ThisWorkbook.Worksheets("Summary-Sheet").Delete
    On Error GoTo 0
    Application.DisplayAlerts = True

    'Füge ein Arbeitsblatt mit dem Titel "Summary-Sheet" ein'
    Set Basebook = ThisWorkbook
    Set Newsh = Basebook.Worksheets.Add
    Newsh.Name = "Summary-Sheet"

    RwNum = 1

    For Each Sh In Basebook.Worksheets
        If Sh.Name <> Newsh.Name And Sh.Visible Then
            ColNum = 1
            RwNum = RwNum + 1
            'Kopiere die Arbeitsblattnamen in A Spalte'
            Newsh.Cells(RwNum, 1).Value = Sh.Name

            For Each myCell In Sh.Range("G3:N3") 'Kopierbereich
                ColNum = ColNum + 1
                Newsh.Cells(RwNum, ColNum).Formula = _
                    "=" & Sh.Name & "!" & myCell.Address(False, False)
            Next myCell

        End If
    Next Sh

    Newsh.UsedRange.Columns.AutoFit

    With Application
        .Calculation = xlCalculationAutomatic
        .ScreenUpdating = True
    End With

    'Füge Header hinzu
    Newsh.Range("A1:I1").Value = Array("File", "Nc", "SumAm", "MeanAm", "STABWMeanAm", "MeanAR", "STABWMeanAR",
    "MeanF", "STABWMeanF")

    'Stellt das aktive Arbeitsblatt an den Anfang'
    ThisWorkbook.Worksheets("Summary-Sheet").Move _
        After:=ActiveWorkbook.Sheets(ActiveWorkbook.Sheets.Count)
End Sub

```

Der VBA-Code wurde mit Hilfe von Beiträgen aus unterschiedlichen Internetforen zusammengestellt. 27–29