
Entwicklung und Evaluation einer Software
zur Erkennung von Kerntransportvorgängen in
apoptotischen Zellen

Diplomarbeit

vorgelegt am
Lehrstuhl für Molekulare Toxikologie
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion,
Fachbereich Biologie,
Universität Konstanz

Konstanz, 15.08.2002

Sebastian Röhrig

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit von November 2001 bis Juni 2002 am Lehrstuhl für Molekulare Toxikologie. Das Projekt wurde unter der Anleitung und Betreuung von Dr. Elisa Ferrando-May durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt im einzelnen:

PROF. DR. ALBRECHT WENDEL für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas

Dr. ELISA FERRANDO-MAY für die gute Betreuung und stetige Bereitschaft mir bei Problemen mit Rat und Tat und guten Gesprächen zur Seite zu stehen

Dr. KAY DIEDERICHS für die Übernahme des Zweitgutachtens

Den Herren ULF ELLWANGER und RÜDIGER LÜDKE der Firma DatInf (Tübingen) für die Entwicklung der Software und die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Testdaten

JANINA THIEM, FLORIAN BOLDT und SARA SEPPELFELD für die Bereitschaft, mir als Blindtester der Software zur Verfügung zu stehen

CHRISTINE WÜNSCH für ihr unvergleichliches Lachen und viele gute Gespräche

ANJA TABBERT für die Durchführung der Kernpermeabilitäts-Assays, die Herstellung der Zytosole und für die ein oder andere Tiefkühlpizza

Sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe im Laborhaus IV für die stetige Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima

Meinen Kommilitonen KARSTEN SCHÄFER, RAINER MOLL, HOLGER MARTIN, ALEXANDER BROSIG und ANNA DILLER sowie allen meinen anderen Freunden und Bekannten für die vielen gemeinsamen Aktionen kulinarischer

und anderer Art. Ohne Euch wäre die Zeit in Konstanz deutlich langweiliger
gewesen.

Meiner Familie für die Unterstützung meines Studiums in jeglicher nur denk-
barer Hinsicht

Meiner Freundin JANINA



Dieses Dokument wurde mit L^AT_EX2e erstellt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Apoptose und Kerntransport	1
1.2	Die Kernhülle als passive Diffusionsbarriere	6
1.2.1	In vitro Assay zur Messung der passiven Kerndiffusion	9
1.3	Aufgabenstellung und Ziel	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	14
2.1.1	Abkürzungen	14
2.1.2	Chemikalien	15
2.1.3	Pufferlösungen	15
2.1.4	Geräte	15
2.1.5	Computerprogramme	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Zellbiologische Methoden	17
2.2.2	Mikroskopische Methoden	22
2.2.3	Statistische Methoden	23
3	Ergebnisse	28
3.1	Software Versionen und Evaluation	28
3.1.1	Definition des Softwareprofils	29
3.1.2	Allgemeine Überlegungen zum Testdesign	33
3.1.3	Test der Version 0400	34
3.1.4	Test der Version 0401	47
3.1.5	Test der Version 0402	68

INHALTSVERZEICHNIS

3.1.6	Test der Version 1.1	90
3.1.7	Wahl des Kennwertes für die biologisch relevanten Analysen	92
3.2	Anwendung der evaluierten Software	94
3.2.1	Analyse von bereits durchgeführten Permeabilitäts-Assays	94
3.2.2	Analyse von neu durchgeführten Permeabilitäts-Assays	101
4	Diskussion	104
4.1	Software-Evaluation	104
4.2	Permeabilitäts-Assay	108
5	Anhang	111
5.1	Verwendete Bildserien	111
5.1.1	Testbilder Zellkerne.exe Version 0400	111
5.1.2	Testbilder Zellkerne.exe Version 0401	111
5.1.3	Testbilder Zellkerne.exe Version 0402	112
5.2	Inhalt der beigelegten CD-ROM	114

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Apoptose und Kerntransport	1
1.2 Die Kernhülle als passive Diffusionsbarriere . .	6
1.2.1 In vitro Assay zur Messung der passiven Kerndif- fusion	9
1.3 Aufgabenstellung und Ziel	12

1.1 Apoptose und Kerntransport

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, die durch charakteristische morphologische Veränderungen der Zelle definiert ist. Hierzu gehört das Schrumpfen der Zellorganellen, die Kondensation des Kernchromatins, sowie die Entstehung von Plasmamembranabschnürungen, das sogenannte *Blebbing* und die daraus folgende Verkleinerung des Zellvolumens (Kerr, J.F. et al. (1972); Kerr, J.F.R. (1971); Wyllie, A.H. et al. (1980)). Wichtiges Merkmal apoptotischer Zellen ist weiterhin, dass sie spezifische Signale an der Plasmamembran exponieren, die durch patrouillierende Makrophagen erkannt werden und zur Phagozytose der Zellen führen. Phagozytierte apoptotische Zellen werden in ihre molekularen Bestandteile zerlegt und wiederverwertet, so dass kein Schaden für das umliegende Gewebe durch auslaufende Zytosolbestandteile entsteht. Im Gegensatz hierzu stellt die *Nekrose* eine passive

1.1 Apoptose und Kerntransport

Lyse von Zellen dar, die oft mit Entzündungsreaktionen einhergeht.

Als einer genetisch kontrollierten stillen Form des Zelltodes kommt der Apoptose sowohl bei der Entwicklung als auch beim Umbau und der Erneuerung von Geweben in höheren Organismen eine zentrale Bedeutung zu. Andererseits kann Apoptose auch an der Entstehung von verschiedenen pathologischen Zuständen beteiligt sein. Neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. das Parkinsonsche Syndrom, lassen sich auf extensive Apoptose zurückführen. Umgekehrt kann das Ausbleiben von Apoptose für die Entstehung von Tumoren und Autoimmunkrankheiten verantwortlich sein. Das Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen ist daher Gegenstand der aktuellen molekularbiologischen Forschung.

Die in apoptotischen Zellen stattfindenden degradativen Prozesse werden durch verschiedene, z.T. noch nicht bekannte Exekutionsfaktoren vermittelt. Eine Hauptrolle kommt hierbei den Caspasen zu (Cohen, G.M. (1997); Samejima, K. et al. (1999)), einer Familie von aspartatspezifischen Cystein-Proteasen, die in nicht-apoptotischen Zellen als inaktive Pro-Caspasen vorliegen. Basierend auf ihrer jeweiligen Substratspezifität können Caspasen in drei Gruppen eingeteilt werden (Grutter, M.G, (2000)). Caspasen der Gruppe I (Caspasen 1, 4, 5 und 13) sind an der Erzeugung von Zytokinen beteiligt. Eine direkte Mitwirkung an der Apoptose wird nicht angenommen. Die Mitglieder der Gruppe II (Caspasen 2, 3, und 7) sind sogenannte „Executioner“-Caspasen, welche direkt für die Spaltung essentieller Zellbestandteile verantwortlich sind und damit aktiv an den apoptotischen Vorgängen teilnehmen. Die Caspasen der Gruppe III (Caspasen 6, 8, 9 und 10) sind „Aktivator“-Caspasen, die Mitglieder der beiden anderen Gruppen aktivieren (Grutter, M.G, (2000)).

Caspasen sind auch maßgeblich an der Zerstörung des Zellkerns beteiligt. Neben einer starken Chromatinkondensation, findet dabei ein Abbau der DNA in Fragmente definierter Länge und die proteolytische Spaltung verschiedener nukleärer Proteine statt (Wyllie, A.H. et al. (1980); Robertson, J.D. et al. (2000)). Essentielle Kernfunktionen werden durch den Abbau von DNA-Replikations- und -Reparaturenzymen stillgelegt (Earnshaw, W.C. et al. (1999)). Die Spaltung der DNA in oligonukleosomale Fragmente erfolgt

1.1 Apoptose und Kerntransport

durch einen von Caspase-3 proteolytisch aktivierten DNA-Fragmentierungsfaktor CAD/DFF-40 (Enari, M. et al. (1998); Liu, X. et al. (1997)), während die Chromatinkondensation durch weitere Faktoren, z.B. den caspase-abhängigen Faktor Acinus, hervorgerufen wird (Sahara, S. et al. (1999)). Auch Caspase-unabhängige Faktoren können zur Kernzerstörung beitragen, so z.B. der Apoptose-induzierende Faktor AIF, der die Fragmentierung des Chromatins in hochmolekulare Bruchstücke vermittelt (Susin, S.A. et al. (1999)).

Nukleäre Exekutionsfaktoren können residente Proteine des Kerns sein, wie die Caspase-2, Acinus und CAD (Sahara, S. et al. (1999); Colussi, P.A. et al. (1998); Samejima, K. and Earnshaw, W.C. (2000); Lechardeur, D. et al. (2000)). Sie liegen als latente Vorstufen im Kern vor. Andere wie AIF, DEDD (death effector domain-containing DNA-binding protein) und viele Caspasen, insbesondere Caspase-3, befinden sich zunächst im Zytosol oder anderen subzellulären Organellen, wie den Mitochondrien und müssen im Laufe der Apoptose die Kern-Zytoplasma Membran durchqueren (Daugas, E. et al. (2000); Stegh, A.H. et al. (1998); Chandler, J.M. et al. (1998); Krajewski, S. et al. (1999); Mandal, M. et al. (1999); Mao, P-L. et al (1998)).

In apoptotischen Zellen kann der Transport von aktivierten Exekutionsfaktoren und/oder von proapoptotischen Signalmolekülen über die Kernmembran entweder über aktive Translokation, vermittelt durch spezifische Transportrezeptoren, oder durch passive Diffusion geschehen. Aus der Kenntnis der beteiligten Mechanismen könnten sich Strategien ableiten, um in die Abbauprozesse des Kernes einzugreifen und damit die Zelle vor Apoptose zu schützen.

In gesunden Zellen wird der Austausch molekularer Bestandteile der Zelle zwischen Kern und Cytoplasma in beide Richtungen durch Kernporenkomplexe spezifisch katalysiert. Zu den importierten Molekülen gehören in erster Linie nukleäre Proteine, ribosomale Proteine und snRNPs. Der Export umfasst unter anderem mRNAs, tRNAs, snRNAs und Pre-Ribosomen (Bagley, S. et al. (2000)). Die Kinetik des Transports ist beeindruckend: Eine Kernpore kann durchschnittlich 10-20 MDa Material pro Sekunde transportieren. Die maximale Rate liegt gar bei 80 MDa (Ribbeck, K. and Goerlich, D. (2001)). Kernporenkomplexe sind große supramolekulare Strukturen mit einer mole-

1.1 Apoptose und Kerntransport

kularen Masse von 50 MDa in Hefe und 120 MDa in Vertebraten. In Hefe setzen sich die Komplexe aus etwa 30 Proteinen zusammen, während in Vertebraten 50-100 Proteine beteiligt sind. Die Proteine der Kernporenkomplexe werden als Nukleoporine bezeichnet. Kleine Moleküle mit einer Masse von 20-50 kDa können passiv durch die Pore diffundieren, während für große Moleküle eine Reihe von signal- und temperaturabhängigen Transportmechanismen existieren (Bagley, S. et al. (2000)).

Damit ein Transportgut aktiv durch die Pore transportiert werden kann, muss es über bestimmte Eigenschaften verfügen, welche durch Transportrezeptoren vermittelt werden. Zu diesen Transportmediatoren gehören die Mitglieder der Importin- β Familie, die in zwei Formen vorliegen. Zum einen gibt es Importmediatoren (Importine), die den Import von Molekülen in den Kern bewerkstelligen. Auf der anderen Seite gibt es Exportine, welche den Export vom Nukleoplasma ins Zytosol vermitteln (Ribbeck, K. and Goerlich, D. (2002)).

Für einen erfolgreichen kontrollierten Transport durch den Porenkomplex ist eine Interaktion zwischen Transportrezeptor:Transportgut-Komplex und dem Porenkomplex nötig. Viele Nukleoporine besitzen bis zu 30 hydrophobe Phenylalanin-reiche Cluster (z.B. FxFG oder GLFG), ein Kernporenkomplex kann bis zu 10^4 solcher Wiederholungen enthalten. Diese hydrophoben Cluster sind an der Bindung von Importin- β Transportrezeptoren, NTF2 (Nuclear Transport Factor 2) und mRNA Export Mediatoren beteiligt (Ribbeck, K. and Goerlich, D. (2002)). Obwohl die Vorgänge des Targetings von Transportgütern zur Kernpore mittlerweile gut untersucht wurden, sind die Details der eigentlichen Translokationsprozesse durch den Kernporenkomplex weitgehend unbekannt. Es existieren verschiedene Modelle, die die beobachteten Phänomene jedoch nur partiell erklären können.

Ein vielversprechender Ansatz ist das „Selective phase model“ (Ribbeck, K. and Goerlich, D. (2001)), welches einen großen Kanal in der Mitte des Komplexes annimmt. Dieser Kanal ist nicht leer, sondern mit einer selektiven Phase gefüllt. Die selektive Phase wird dabei durch Phenylalanin-reiche Wiederholungen gebildet, die durch schwache hydrophobe Wechselwirkungen miteinander interagieren. Dadurch bildet sich im Inneren der Po-

1.1 Apoptose und Kerntransport

re ein „hydrophober Maschendraht“, durch dessen Maschen kleine Moleküle bis etwa 50 kDa frei diffundieren können. Inerte große Moleküle, ohne gebundene Transportmediatoren können diese selektive Phase nicht passieren. Transportrezeptor:Transportgut-Komplexe können jedoch durch ihre partiell hydrophoben Eigenschaften in das hydrophobe Geflecht inkorporiert und so durch die Pore transloziert werden (Ribbeck, K. and Goerlich, D. (2001)).

Für eine wichtige Rolle des aktiven Kern-Zytoplasma Transportes bei der apoptotischen Kernzerstörung sprechen Versuche, in denen Kernimportinhibitoren in Zellen injiziert wurden, bevor diese den apoptotischen Stimulus erhielten. Die Auflösung des Kernes ließ sich dadurch verhindern oder signifikant verzögern (Yasuhara, N. et al. (1997)). Außerdem sind putative Kernlokalisationssequenzen (NLS), die Proteine für den aktiven Import in den Kern markieren, in vielen nukleären Exekutionsfaktoren gefunden worden (Acinus, CAD/DFF40, AIF, DEDD) (Sahara, S. et al. (1999); Enari, M. et al. (1998); Liu, X. et al. (1997); Susin, S.A. et al. (1999); Stegh, A.H. et al. (1998)). Schließlich kann das Lectin WGA, das an die Kernpore bindet und sie dadurch verschließt, die durch AIF und Acinus ausgelöste Chromatinkondensation hemmen (Susin, S.A. et al. (1999); Sahara, S. et al. (1999)).

Obwohl diese Befunde dafür sprechen, dass aktive Transportmechanismen bei der Translokation apoptotischer Signale in den Kern eine Rolle spielen, ist bisher für keinen der bekannten Exekutionsfaktoren der Transportweg aufgeklärt worden. Die Tatsache, dass ATP-Depletion, die den Import klassischer NLS-Substrate effizient hemmt, die Akkumulation von AIF in den Kern nicht inhibieren kann, zeigt, dass möglicherweise andere, vom klassischen NLS-abhängigen Import abweichende Transportwege in der Apoptose aktiviert werden (Daugas, E. et al. (2000)).

Es besteht derzeit noch keine Klarheit darüber, zu welchem Zeitpunkt und über welche Transportwege nicht residente Exekutionsfaktoren in den Kern gelangen. Genauso wenig ist bekannt, welche Signale zur Aktivierung von im Kern bereits vorliegenden Faktoren führen.

1.2 Die Kernhülle als passive Diffusionsbarriere

Unter physiologischen Bedingungen ist eine ungehinderte, diffusionskontrollierte Passage durch die Kernpore für Moleküle bis ca. 50 kD möglich (Paine, P.L. et al. (1975); Bagley, S. et al. (2000)).

Auf der einen Seite beeinflussen die physikalischen und chemischen Eigenschaften eines Moleküls dessen Diffusionseigenschaften und bieten damit eine Möglichkeit die Diffusionsvorgänge an der Kernhülle zu regulieren. Andere regulatorische Mechanismen könnten eine Änderung der Permeabilitätseigenschaften der Kernporenkomplexe oder Populationen von Kernporenkomplexen einschließen.

Dass die Permeabilität auf der Ebene der Kernporen reguliert wird, und nicht von der Verfügbarkeit löslicher Bestandteile des Zytoplasmas abhängt, konnte durch Zellfusionsexperimente gezeigt werden. Hierbei werden zwei Zellen durch chemische oder mechanische Einwirkung miteinander verschmolzen, so dass die fusionierten Zytoplasmamembranen ein Kompartiment umschließen, welches das Zytoplasma beider Zellen sowie beide Zellkerne enthält. Das so entstandene Konstrukt wird als Heterokaryon bezeichnet. Feldherr et al. konnten zeigen, dass in Heterokaryons mit Kernen aus ruhenden und proliferierenden Zellen die Kerne unterschiedliche Transportaktivitäten für mikroinjiziertes Nucleoplasmin (ein nukleäres Protein mit Kernlokalisationssequenz in *Xenopus* Oozyten), markiert mit kolloidalem Gold aufwiesen, obwohl sie von identischem Zytoplasma umgeben waren (Feldherr, C.M. and Akin, D. (1993)). Außerdem konnte vom selben Autor gezeigt werden, dass sich die funktionelle Größe der Kernporen in Abhängigkeit von der Zellform verändert (Feldherr, C.M. and Akin, D. (1993)).

Auch die Diffusionseigenschaften der Kernhülle stellen keine konstanten Größen dar, sondern verändern sich in Abhängigkeit der verschiedenen physiologischen Zustände der Zelle. Werden Zellen, welche sich in unterschiedlichen Phasen der Mitose befinden, mit BSA-stabilisiertem kolloidalem Gold unterschiedlicher Größe mikroinjiziert, zeigen sich deutliche Differenzen im Bezug auf die Ausschlussgrenze der Kernhülle (Feldherr, C.M. and Akin, D. (1990)).

1.2 Die Kernhülle als passive Diffusionsbarriere

Da die verwendeten BSA-Goldpartikel keine Kernlokalisationssequenzen aufweisen, lassen sich die beobachteten unterschiedlichen Verteilungen der Goldpartikel in Zytoplasma und Nukleoplasma auf Modulationen der Diffusionseigenschaften der Kernhülle zurückführen.

Diese und andere Experimente bestätigen (Feldherr, C.M. and Akin, D. (1990); Feldherr, C.M. and Akin, D. (1993)), dass die Permeabilität der Kernhülle Kontrollsystemen unterliegt. Es ist daher berechtigt anzunehmen, dass auch im Zuge der Apoptose die Kernpermeabilität reguliert wird.

Entsprechend konnte in vorangehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe Nicotera gezeigt werden, dass die Ausschlussgröße der Kernhülle in der frühen Apoptose moduliert wird (Ferrando-May, E. et al. (2001)). Hierbei wurden HeLa Zellen mit 70 kDa fluoreszentem Dextran zytoplasmatisch injiziert und anschließend mit dem Protein-Kinase Inhibitor STS zur Apoptose stimuliert. Die Kontrollzellen wurden nur mit fluoreszentem 70 kDa Dextran mikroinjiziert, nicht aber zur Apoptose stimuliert. Die Diffusion des Dextrans in den Kern wurde mit Hilfe eines CLSM observiert. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die apoptotischen Zellen eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität im Nukleoplasma, woraus auf ein Vorhandensein des Dextrans im Kern geschlossen werden kann. Die hier beobachteten Änderungen der Ausschlussgrenze der Kernhülle sind Caspase unabhängig, da sie durch den Caspase-Hemmer zVAD nicht beeinträchtigt wurden und der Effekt vor der Aktivierung von Caspasen beobachtet werden konnte.

In einem fortgeschrittenen Stadium der Apoptose, wenn die Caspasen eine maximale Aktivität entfalten, kollabiert dann die Diffusionsbarriere auf Grund der Proteolyse der Kernlamina und der in ihr verankerten Nukleoporine. Für Faktoren, deren Aktivierung Caspasen-abhängig ist, wie DEDD, oder für Caspasen wie Caspase-3, die in den Kern zur Aktivierung von CAD und Acinus benötigt werden, sollte die Kernmembran daher kein Diffusionshindernis darstellen.

Es scheint insgesamt plausibel, dass sowohl aktive als auch diffusionskontrollierte Transportmechanismen bei der apoptotischen Kernzerstörung eine Rolle spielen. Während die Diffusion durch die Kernmembran vermutlich ein spätes Ereignis ist, das die vollständige Exekution des Kernes auch un-

1.2 Die Kernhülle als passive Diffusionsbarriere

ter den Bedingungen des zusammengebrochenen Energiehaushaltes der Zelle gewährleistet, scheint aktiver Import bereits zu einem frühen Stadium der Apoptose notwendig zu sein, bevor die zytosolische Caspasenkaskade aktiviert wird. Dafür spricht, dass importgehemmte Zellen nicht nur vor den nukleären, sondern auch vor den zytoplasmatischen Erscheinungen der Apoptose geschützt sind (Yasuhara, N. et al. (1997)).

1.2 Die Kernhülle als passive Diffusionsbarriere

1.2.1 In vitro Assay zur Messung der passiven Kerndiffusion

Um die in lebenden Zellen beobachtete frühe Modulation der Ausschlussgrenze der Kernhülle (Ferrando-May, E. et al. (2001)) zu charakterisieren, wurde ein zellfreies System entwickelt, mit dem Veränderungen der passiven Kernpermeabilität detektiert werden können.

Hierfür werden HeLa Zellen auf kleinen runden Glasplättchen (im Folgenden „Coverslips“) in geeigneter Dichte ausgebracht. Zur Permeabilisierung der Plasmamembran, werden die Zellen mit dem nicht-ionischen Detergent Digitonin inkubiert. Die Permeabilisierungsbedingungen (Pufferzusammensetzung, Ionenstärke, pH, etc.) können dabei genau eingestellt werden. In der Folge der Permeabilisierung werden die HeLa-Zellen von dem eigenen Zytosol depletiert und können anschließend mit Kontroll- oder apoptotischen Zellextrakten in Anwesenheit eines fluoreszierenden 70 kDa Dextranmarkers rekonstituiert werden. Das Dextran dient dabei als Reporter für die Durchlässigkeit der Kernhülle in Abhängigkeit vom verwendeten Zellextrakt.

Die eingesetzten Zellextrakte können auf einfache Weise aus Jurkat Zellen gewonnen werden

(s. Abschnitt 2.2.1, S.19). Als Kontrollen dienen dabei Zellextrakte aus Zellen, die keinen Apoptose-Stimulus erhalten. Um Zellextrakte aus apoptotischen Zellen zu gewinnen, wurden Jurkat Zellen mit CD95-Ligand (im Folgenden „CD95-L“) behandelt, welcher aus CD95-L überproduzierenden Neurobla-

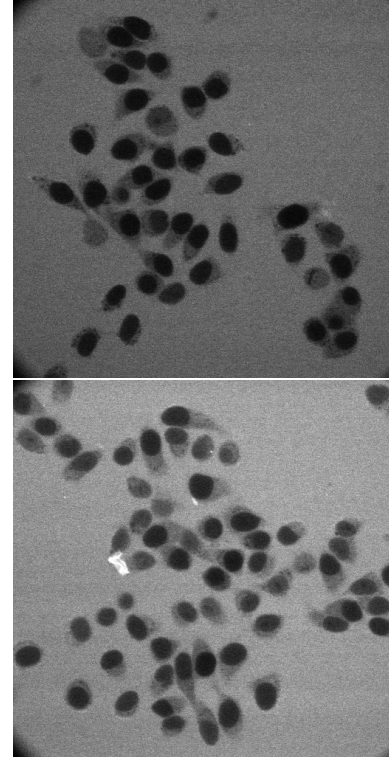


Abbildung 1.1: Zellfreies System: CLSM Aufnahmen von Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen auf Coverslips.

Oben: HeLa-Zellen rekonstituiert mit Zellextrakt aus nicht-apoptotischen Jurkat Zellen in Anwesenheit eines fluoreszierenden 70 kDa Dextranmarkers (Kontrolle)

Unten: HeLa-Zellen rekonstituiert mit Zellextrakt aus FAS-stimulierten Jurkat Zellen in Anwesenheit eines fluoreszierenden 70 kDa Dextranmarkers

1.2 Die Kernhülle als passive Diffusionsbarriere

stomzelllinie gewonnen wurde. Der CD95-Rezeptor (im Folgenden „CD95“) ist ein Mitglied der TNF/NGF-Rezeptor-Superfamilie und befindet sich vorwiegend auf Zellen lymphatischen Ursprungs. Die Bindung von CD95L an CD95 aktiviert ein Signaltransduktionskaskade, welche zur Apoptose führt (Krammer, P.H. (2000); Krammer, P.H. (1998); Li-Weber, M. and Krammer, P.H. (2002); Mariani, S.M. et al. (1996)). Das CD95 System wurde gewählt, da es sehr gut charakterisiert, leicht zu handhaben und in den Laboren des Lehrstuhls etabliert ist.

Die Extrakte aus CD95-L stimulierten, apoptotischen Zellen können auf ihre Permeabilisierungsaktivität hin getestet und maximal aktive Extrakte für die weiteren Analysen identifiziert werden.

Die Analyse der *in vitro* Ansätze erfolgt an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop System. Im Fluoreszenzmikroskop weisen die Kontrollzellen ein typisches räumliches Verteilungsmuster des Dextranmarkers auf, welches dadurch charakterisiert ist, dass der Kern keine Fluoreszenz aufweist und als schwarz erscheint. Die Fluoreszenz ist ausschließlich auf Zytoplasma und das die Zellen umgebende Medium beschränkt, da die Dextranmoleküle nicht in den Kern diffundieren können (s.Abb. 1.1 oben, S.9). Im Gegensatz hierzu kommt es in Gegenwart von apoptotischem Zellextrakt zu einer Diffusion des Markers in den Kern. Im Fluoreszenzmikroskop ändert sich also das Verteilungsmuster der Fluoreszenz dahingehend, dass die Fluoreszenzintensität im von der Kernmembran umschlossenen Kompartiment im Vergleich zu nicht-apoptotischen Bedingungen zunimmt (s.Abb. 1.1 unten, S.9).

Die Aufnahme des Markers in den Kern kann durch die Zugabe von verschiedenen Inhibitoren, von denen erwartet wird, dass sie Einfluss auf die Diffusionseigenschaften der Kernhülle haben, manipuliert werden. Der Effekt sollte sich in entweder zunehmender oder abnehmender Fluoreszenzintensität im Kern in Abhängigkeit von der zugegebenen Substanz niederschlagen.

Werden von den mikroskopierten Zellen Bilder aufgenommen, so lassen sich die apoptotischen Kerne von den nicht-apoptotischen durch die Helligkeit unterscheiden, wobei die Helligkeit der Kerne als Maß für die Effektivität der Markeraufnahme verwendet werden kann. Durch die hohe Anzahl der simultan erfassbaren Kerne im CLSM werden hochsignifikante Ergebnisse

1.2 Die Kernhülle als passive Diffusionsbarriere

gewonnen. Es ergeben sich für jedes durchgeführtes Experiment mindesten zwei verschiedene Bildtypen (s.Abb. 1.1, S.9) :

- Kontrollbilder
- apoptotische Bilder

1.3 Aufgabenstellung und Ziel

Um die Effekte der apoptotischen Zellextrakte auf die Permeabilisierung der Kernhülle genau zu charakterisieren, muss der oben beschriebene *in vitro* Assay quantitativ ausgewertet werden. Dies erfordert eine schnelle und einfach durchzuführende Analyse der CLSM-Bilder.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung einer speziell auf diese Anforderungen zugeschnittenen Software in Zusammenarbeit mit der Firma DatInf (Tübingen). Die Software soll die Kerne auf den CLSM-Bildern erkennen und das zugehörige Fluoreszenzsignal quantitativ erfassen. In Kombination mit dieser Software soll der Kernpermeabilitäts-Assay es ermöglichen, Diffusionsvorgänge an der Kernhülle im lebenden humanen *in vitro* System zu analysieren.

Um repräsentative Ergebnisse zu erlangen, sollen die von der EDV gelieferten quantitativen Analysedaten einer statistischen Prüfung unterzogen werden. Voraussetzung dafür ist, dass die Experimente unter gleichen Randbedingungen durchgeführt werden, da dann die Analysewerte der unterschiedlichen Experimente als verbundene Stichproben angesehen werden können. Damit wird eine statistische Analyse der Daten mit Hilfe eines verbundenen T-Tests möglich (Dallmann, H. und Elster, K.H. (1992); Köhler et al. (1995); Kühnel, S-M. und Krebs, D. (2001)) und es sollten sich statistisch signifikante Abweichungen zwischen den Kernhelligkeiten der verschiedenen Experimente feststellen lassen. Mit Hilfe der im statistischen Sinne signifikanten Differenzen der mittleren korrigierten Helligkeit der gesamten erkannten Kernfläche lassen sich unter biologischen Fragestellungen Aussagen über den Einfluss der zugegebenen zytosolischen Extrakte ableiten.

Zunächst soll eine Aussage über den Effekt des apoptotischen Extrakts gemacht werden. Die Fragestellung ist also, ob die Abweichung der durchschnittlichen Kernhelligkeiten zwischen Kontrollbildern und apoptotischen Bildern signifikant ist.

Der Assay bietet eine große Flexibilität bezüglich der Reaktionsbedingungen. So ist es denkbar in weiterführenden Arbeiten den Einfluss exogener Faktoren auf die Diffusionseigenschaften der Kernhülle zu untersuchen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1	Material	14
2.1.1	Abkürzungen	14
2.1.2	Chemikalien	15
2.1.3	Pufferlösungen	15
2.1.4	Geräte	15
2.1.5	Computerprogramme	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Zellbiologische Methoden	17
	Zellkulturen	17
	Herstellung von zytosolischen Zellextrakten	19
	Kernpermeabilitäts-Assay	20
2.2.2	Mikroskopische Methoden	22
	Erstellung der Bilder am CLSM	22
2.2.3	Statistische Methoden	23
	Stichproben	23
	Gepaarter T-Test	24
	Formeln	25

2.1 Material

2.1 Material

2.1.1 Abkürzungen

ATP	Adenosine-triphosphate
BSA	Bovine serum albumine
CD95	CD95 (Apo-1/Fas)-Receptor
CD95-L	CD95 (Apo-1/Fas)-Ligand
CEB	Cytosolic extraction buffer
CS	Coverslips
Dig/PP	Digitonin/Permeabilization Buffer
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EDTA	Ethylendiamin tetraacetic acid
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether) tetraacetic acid
E-Mix	Energy-Mix
FCS	Fetal calf serum
GTP	Guanosine-triphosphate
PBS	Phosphate-buffered saline
HEPES	Hydroxyethyl-piperazylsulfonic-acid
KOH	Potassiumhydroxide
Ka-Acetat	Potassium acetate
Mg-Acetat	Magnesium acetate
Na-Acetat	Natrium acetate
NaCl	Natrium chloride
NPZ	Non-permeabilized Cell
PP	Permeabilization Buffer
P/S	Penicilline/Streptomycine
PVP	Polyvinylpyrrolidone
PZ	Permeabilized Cell
ROI	Region of interest
rpm	rounds per minute
RT	Room temperature
SRS	Simple Random Sample
STS	Staurosporine
TEP	Tris EDTA PVP
TRP	Transport Buffer
V0400	Version 0400 Zellkerne.exe
V0401	Version 0401 Zellkerne.exe
V0402	Version 0402 Zellkerne.exe
V1.1	Version 1.1 Zellkerne.exe

2.1 Material

2.1.2 Chemikalien

Biochrom AG, Berlin, Germany: RPMI-1640

Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany: FCS, ATP, GTP

Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein, Germany: DMEM, P/S

Molecular Probes Europe BV, Leiden, Netherlands: Texasred labeled
70kD Dextran

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Germany: Creatin, Crea-
tinkinase, Digitonin, DMSO, EDTA, EGTA, Trypanblau 0.4%

Alle weiteren nicht genauer spezifizierten Reagenzien stammen von Roth GmbH & Co (Karlsruhe, Germany) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Germany).

2.1.3 Pufferlösungen

Permeabilisierungspuffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 110 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 0.5 mM EGTA

20x E-Mix: 10 mM ATP, 10 mM GTP, 250 mM Glukose, 200 mM Phosphokreatin, 10 μ l Kreatinkinase 10 U/ml, 20 mM HEPES/KOH pH 7.3, ad 500 μ l MilliQ \Rightarrow 15 μ l Aliquots, fl. N₂, -80°C lagern

1x Transportpuffer: 20 mM HEPES/KOH, 110 mM Ka-Acetat, 5 mM Na-Acetat, 2 mM Mg-Acetat, 0.5 mM EGTA, 250 mM Sucrose

PBS: 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄, pH 7.4

2.1.4 Geräte

Laser Scan Confocal Microscop System: TCS 4D UV/VIS (Leica AG, Benzheim and Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany)

Laser: Argon und Krypton Ionen Laser System (Omnichrome, Chino, CA, USA), *EnterpriseTM* Ion Laser (Coherent, Laser Group, Santa Clara, CA, USA), Cooling System *Laser PureTM* Heat Exchanger (Coherent, Auburn, CA, USA)

Inkubatoren: Model BB 6220 (Heraeus Instruments, Hanau, Germany)

Zellkulturflaschen: Costar GmbH (Bodenheim, Germany) und

2.1 Material

Greiner GmbH (Frickenhausen, Germany)

Zentrifugen: Biofuge fresco und Megafuge 1.0 R (Heraeus Instruments, Hanau, Germany)

Pipetten: Eppendorf (Eppendorf-Netheler-Hintz GmbH, Hamburg, Germany) und Gilson (Abimed, Langenfeld, Germany)

2.1.5 Computerprogramme

Betriebssysteme: Microsoft Windows NT 4.0 Workstation und Server, Microsoft Windows 98 SE, SuSE Linux 7.2

Textverarbeitung: XEmacs für Linux/Unix und Microsoft Windows NT 4.0, L^AT_EX₂e, Open Office StarWriter (Version 640)

Datenauswertung: GraphPad Prism, Version 3.0, Microsoft Excel2000, Open Office StarCalc (Version 640)

Graphikbearbeitung: Adobe Photoshop, Version 5.01, The Gimp, Version 1.2

Sonstige: Adobe Acrobat, Version 4.0, VMware Workstation 2.0.3. build-799

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Zellkulturen

1. Jurkat Clon E6 (human T-cell leukemia)
2. HeLa 229 (human cervix carcinoma)

Auftauen der Zellen Medium, FCS und P/S wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Alle Gegenstände, die unter die Clean Bench kamen, wurden zuvor mit 70% Ethanol desinfiziert. Eine 75 cm² Kulturflasche und ein Falcon-Röhrchen wurden mit je 30 ml Medium befüllt. Einige ml wurden in der Pipette zurückbehalten.

Ein Cryo Vial (2 ml mit 6000 Zellen) wurde aus dem flüssigen N₂-Tank entnommen und im Wasserbad bei 37°C so lange aufgetaut, bis noch ein kleiner Rest Eis sichtbar war. An der Clean Bench wurde das Cryo Vial kurz mit dem Gasbrenner sterilisiert und die Zellsuspension schnell in das zuvor mit Medium befüllte Falcon-Röhrchen überführt. Dadurch wurde das DMSO, mit welchem die Zellen eingefroren wurden schnell verdünnt. Mit dem in der Pipette belassenen Medium wurde der Rest Zellen aus dem Cryo-Röhrchen gespült. Die Zellsuspension im Falcon-Röhrchen wurde dann 5 min bei 1000 rpm und RT abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und in die vorbereitete Zellkulturflasche überführt.

Kultivierung der Zellen

1. *Jurkat E6*

Jurkat Zellen werden in Suspension kultiviert. Als Medium wurde RPMI 1640, Biochrom #FC 1215 + 10% FCS (hitzeinaktiviert) + 1% P/S verwendet.

Die Zellen wachsen logarithmisch von 2 x 10⁵ Zellen/ml auf 1 x 10⁶ Zellen/ml und bilden dabei Aggregate, welche leicht mit einer Pipette resuspendiert werden können. Eine frische Kultur wird alle 48 h mit

2.2 Methoden

3×10^5 Zellen/ml inokuliert. Falls nötig können die Kulturen auch mit frischem Medium verdünnt werden. Die Zellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

2. *HeLa 229*

HeLa-Zellen wachsen adhärent. Als Medium wurde DMEM, Life Technologies #41966-029 +5%FCS (hitzeinaktiviert)+1% P/S verwendet. Die Zellen werden passagiert, wenn auf dem Boden der Kulturflasche ein dichter Zellrasen gewachsen ist.

Das alte Medium wird abgesaugt und die Zellen einmal mit ca. 10 ml warmem HBS gewaschen. Nach dem Absaugen des HBS wird mit TEP für 5 min bei 37°C trypsinisiert, um die Zellen vom Boden der Flasche abzulösen. Das Ablösen kann durch Klopfen an die Flasche beschleunigt werden.

Die Reaktion wird durch Zugabe von ca. 8 ml warmem Medium abgestoppt, die Zellen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wird das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.1, Seite 18). In der Regel wird dann in einem Verhältnis 1:5 gesplittet, d.h. 25 ml Medium werden mit 1 ml der Zellsuspension beschickt. Die Anzahl der passagierten Zellen richtet sich nach den Erfordernissen der Experimente.

Bestimmung der Zellzahl Um die Anzahl der Zellen in einer gegebenen Zellsuspension zu ermitteln wurden $50 \mu\text{l}$ von 5 ml Zellsuspension mit $10 \mu\text{l}$ 0.4% Trypanblau in einem Eppendorf-Gefäß vermischt.

Die Neubauerzählkammer wurde durch Anhauchen des Deckglases vorbereitet. Diese wurde dann solange auf dem Trägerglas verschoben, bis Newtonsche Ringe erschienen.

$10 \mu\text{l}$ der gefärbten Zellen wurden an den Rand des Deckglases pipettiert und durch Kapillarkräfte in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Trägerglas gesogen. Am Mikroskop wurden dann 2×16 Quadrate der Neubauerzählkammer ausgezählt.

2.2 Methoden

Die Zellzahl in der Suspension ergab sich dann nach folgender Berechnung :

*Mittelwert der beiden Zählungen $\times 1.2$ (Verdünnung 60/50) $\times 5$ (Gesamt-
volumen) $\times 10^4 = x$ Zellen.*

Herstellung von zytosolischen Zellextrakten

Der Totalzellextrakt von 400-500 ml Jurkat Zellen (entspricht: 4×10^8 Zellen) wurde entweder direkt oder nach zuvoriger Apoptosestimulation mittels einer Frier-Tau-Methode gewonnen.

Zur Herstellung der apoptotischen Zellextrakte wurden die Zellen nach 5 min Zentrifugation bei 1000 rpm einmal in 50 ml serumfreiem Medium gewaschen und anschließend in 25 ml desselben Mediums resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einer 6 cm Petrischale mit 12,5% Kulturüberstand einer CD95-L überproduzierenden Neuroblastomzelllinie (N2A) stimuliert und bei 37°C für 60-90 min inkubiert. Der apoptotische Zustand der Zellen wurde mittels einer Chromatinanfärbung in regelmäßigen Abständen überprüft. Dazu wurden 2 μ l der Zellsuspension in 200 μ l PBS verdünnt und mit 10 μ l 5 μ g/ml Höchst angefärbt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte bevor extensive apoptotische morphologische Veränderungen sichtbar wurden, d.h. sobald 5-10% der Zellen die charakteristische Chromatinkondensation zeigten.

Die Apoptotischen sowie die Kontrollzellen wurden bei 1200 rpm, 4°C 5 min abzentrifugiert und anschließend zweimal in 50 ml kaltem PBS und einmal in 20 ml kaltem CEB mit Proteaseinhibitoren (PMSF, Leupeptin, Pepstatin und Aprotinin) gewaschen. Nach den Waschungen wurden die Zellpellets in 1 ml CEB resuspendiert, in ein Eppendorf Gefäß überführt und die Zellen vorsichtig bei niedriger Drehzahl in einer vorgekühlten Zentrifuge (4°C) abzentrifugiert. Das Volumen der gepackten Zellen wurde abgeschätzt, der Überstand abgesaugt und das Pellet in einem dem Pelletvolumen äquivalenten Volumen CEB Puffer aufgenommen. Dieses betrug etwa 100 μ l pro 1×10^8 Jurkatzellen/ml.

Zum Aufschluss der Zellen wurde ein Frier-Tau-Zyklus durchgeführt. Hierzu werden die Zellen in flüssigem N₂ gefroren und dann schnell im 37°C Was-

2.2 Methoden

serbad wieder aufgetaut. Die Effizienz der Lyse wurde durch Trypanblau Färbung verfolgt. Zu diesem Zweck wurden 2 μl der Suspension entnommen und mit 200 μl 0.04% Trypanblau-Lösung versetzt. Die angefärbte Suspension wurde mikroskopiert. Im Normalfall genügt ein Frier-Auftau-Zyklus um 100% Lyse zu erzielen. Falls notwendig müssen mehrer solcher Zyklen durchgeführt werden.

Das Lysat wurde dann in ein frisches Eppendorf Gefäss überführt und 20 min bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und erneut so lange zentrifugiert, bis keine Trübung mehr festzustellen war.

Die so hergestellten zytosolischen Extrakte wurden mit flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C für bis zu zwei Monate aufbewahrt.

Kernpermeabilitäts-Assay

Vorbereitung der Zellen ein Tag vor den Experimenten ¹ Für den Kernpermeabilitäts-Assay müssen die Reporter-Zellen auf kleine runde Glasplättchen (Coverslips) mit einem Durchmesser von 16 mm ausgebracht werden. Die CS wurden mit einer 1:1 Mischung aus Ethanol und Aceton gereinigt und entfettet. Nach dem Entfetten wurden die Plättchen in PBS und entionisiertem Wasser gewaschen und getrocknet.

Anschließend wurden die CS in die Vertiefungen einer 12-Well Platte gelegt. Die Platte mit den CS wurde in einem Mikrowellengerät sterilisiert.

Um die Zellen für den Assay zu gewinnen, wurden eine HeLa-Zellkultur verwendet (siehe Abschnitt 2.2.1, Seite 17). Die Anzahl der Zellen wurde nach dem im Abschnitt 2.2.1 auf Seite 18 beschriebenen Prozedere bestimmt. Durch Verdünnung mit Medium wurde die Zellzahl dann auf 1.4-1.5 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt.

Die Zellsuspension wurde dann in die mit CS präparierte 12-Well-Platten überführt. Auf jedes Plättchen wurden je 1 ml Zellsuspension pipettiert. Die Platte wurde danach vorsichtig geschüttelt, um eine homogene Verteilung

¹Eine detaillierte Methodenbeschreibung für den Assay findet sich auf der beigelegten CD-ROM

2.2 Methoden

der Zellen auf den Plättchen zu erreichen. Die Inkubation erfolgte für 24 h im Brutschrank.

Vorbereitung der Experimente

- 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Digitonin/Permeabilisations Puffer (PP) herstellen:
- Auftauen: 20 x E-mix, Äquilibriumspuffer, 2.5 M Sucrose, Kontroll- bzw. Apo- Zytosol direkt vor Verwendung (nur max. 2h auf Eis lagern)
- Alle Puffer auf Eis oder im Kühlschrank kalt lagern
- In 6-Well Platte auf Eis je ein Well mit PBS, 5 ml Dig/PP und TRP (+250 mM Sucrose) vorlegen
- Direkt vor Verwendung: Osmolarität der Zytosole mit 1/10 Volumen TRP und 1/10 Volumen 2.5M Sucrose einstellen (Finale Salz Konzentrationen der Zytosole: 55 mM HEPES pH 7.4, 100 mM Kalium, 5 mM EGTA, 7 mM Magnesium)

Durchführung der Experimente Nachdem die Zellen 24 Stunden kultiviert und mikroskopisch observiert worden waren, wurden die Plättchen in eine 6-Well Platte mit eiskaltem PBS überführt. Die Platte wurde dabei auf Eis gehalten. Anschließend wurden die CS in Dig/PP überführt. Die Inkubation mit Digitonin erfolgte für 4-5 min, wobei für eine homogene Verteilung die Platte mehrmals geschwenkt wurde. Bei jeder Experimentreihe wurde vor den eigentlichen Versuchen der Permeabilisierungsgrad der Zellen mikroskopisch untersucht. Dabei sollten möglichst alle Zellmembranen und *keine* Kernmembranen permeabilisiert sein. Die geeignete Permeabilisierungszeit muss dann für alle Versuche der Experimentreihe eingehalten werden. Nach der Behandlung mit Digitonin wurde dreimal für eine, fünf, und zehn min mit kaltem PP ohne Digitonin gewaschen.

Nach den Waschgängen wurden die CS in TRP äquilibriert. Die Glasplättchen wurden dann in eine mit Parafilm ausgelegte Petrischale gelegt, nachdem überschüssiger TRP mit einem Papiertuch abgetupft wurde.

2.2 Methoden

Die Zellen auf den CS wurden dann mit verschiedenen Zytosolischen Extrakten inkubiert. Die Ansätze wurden wie folgt vorbereitet :

Pro Ansatz wurden 340 μg zytosolischer Extrakt mit 1.5 μl 20 x E-Mix versetzt und dann mit TRP auf 30 μl aufgefüllt. Der Zytosolextrakt-Mix wurde 2 min vorinkubiert und dann auf ein CS pipettiert. Nach einer Reaktionszeit von 7 min bei RT wurden 10 μl Dextran-Mix (30 μl 2 mg/ml 70 kDa Dextran Texas Red +70 μl TRP) zugegeben und weitere 7 min bei RT inkubiert.

Für die Observation am LCSM wurde ein Coversliphalter verwendet. Auf der Unterseite des Halters wurde mit Exikatorfett ein leeres gereinigtes CS befestigt. In die Vertiefung wurden 100 μl 0.2 mg/ml fluoreszenzmarkiertes Dextran in TRP vorgelegt, um eine Flüssigkeitsvolumen zu erhalten, welches eine Blasenfreiheit des Präparates garantierte. Das Glasplättchen mit den vorbereiteten Zellen wurde dann mit den Zellen in Richtung der Dextranlösung ebenfalls mit Exikatorfett auf den Halter gelegt und mit einer Pinzette angepresst, um ein Auslaufen des eingeschlossenen Flüssigkeitsvolumens zu verhindern.

Die Präparate wurden dann *sofort* am Konfokalmikroskop observiert und Bilder von verschiedenen Regionen der Plättchen angefertigt.

2.2.2 Mikroskopische Methoden

Erstellung der Bilder am CLSM

Bei der Erstellung der Bilder wurde auf eine zügige Arbeitsweise geachtet, da es sich bei den Präparaten um lebende Zellen in der Apoptose handelte. Daher treten nach mehr als zehn min morphologische Veränderungen auf, die die gewünschten Effekte möglicherweise beeinflussen könnten (siehe auch Abschnitt 1.1, Seite 1). Von jedem der Präparate wurden acht Bilder erstellt. Es wurde ein 40X Ölimmersionsobjektiv gewählt. Bei der Fokussierung wurde darauf geachtet, möglichst viele der im Bildausschnitt vorhandenen Zellen scharf einzustellen. Die Ausschnitte wurden im Durchlicht gewählt. Das Anregungslicht ($\lambda=488\text{ nm}$) wurde von einer Argon-Krypton-Laser geliefert. Als Speicherformat wurde das Tagged-Image-File (TIFF) mit einer Daten-

2.2 Methoden

tiefe von 8-bit und 256 Graustufen gewählt.²

2.2.3 Statistische Methoden

Stichproben

Die am CLSM erzeugten Bilder der Zellen auf den CS sind Klumpenstichproben, die bei der statistischen Auswertung als einfache Zufallsstichproben (simple random sample, SRS) behandelt werden können (Kühnel, S-M. und Krebs, D. (2001)). Bei der Grundgesamtheit, aus der die Stichproben entnommen wurden, handelt es sich um alle Zellen, die auf einem CS ausgebracht wurden. Die Auswahl der Stichproben erfolgte so, dass jede mögliche Stichprobe die gleiche Chance hatte, realisiert zu werden. Die Ausschnitte des Präparats wurden daher so gewählt, dass sie nicht miteinander überlappten. Von jedem CS wurden acht Bilder erzeugt. Die Geräteeinstellungen für den Scann-Vorgang wurden bei allen Bildern eines CS konstant gehalten.

Der Zufallsmechanismus bei der Auswahl der Stichproben erlaubt mit Hilfe von statistischen Methoden eine induktive Verallgemeinerung auf die Population. Dabei wird von den in der Stichprobe beobachteten Verteilungen und Zusammenhängen von Variablen auf die Charakteristika der Population generalisiert. Die beobachteten Kennwerte der Stichprobe (*sample statistics*) stellen somit die Basis für die unbekanntenen Kennwerte (Parameter) der Population.

Mit Hilfe von Methoden der induktiven Statistik und Aufnahmen von verschiedenen Regionen der Plättchen lassen sich also die durchschnittliche Kernhelligkeit des gesamten Präparats und außerdem die Fehlschlussrisiken berechnen.

Ob sich die mit dem Hintergrund korrigierte durchschnittliche Kernhelligkeit,

²TIFF ist ein tag-basiertes Fileformat zur Speicherung und Beschreibung von Rasterbild-Daten. Typischerweise sind dies Bilddaten von Scannern, Frame Grabbern (CCD's) sowie gängigen Bildbearbeitungsprogrammen. Der Vorteil von TIFF liegt in seinen vielfältigen Einsatzmöglichkeiten. Es kann dazu dienen schwarzweiße, graustufige und farbige Bilddaten zu beschreiben. Zudem ist es nicht an bestimmte Scanner-, Druck- oder Displayhardware gebunden und außerdem plattformunabhängig. (Aldus Corporation (1992)).

2.2 Methoden

oder der Quozient aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrund (s. Abschnitt 3.1 auf Seite 28) besser für die statistische Analyse eignet musste getestet werden.

Gepaarter T-Test

Als statistisches Werkzeug wurde ein gepaarter t-Test mit 99% Konfidenzintervall gewählt. Ein gepaarter t-Test vergleicht zwei gepaarte Gruppen von Stichprobenwerten. Zwei Stichproben sind gepaart, wenn je ein Wert der einen Stichprobe einen besonderen Zusammenhang mit einem bestimmten Wert der anderen Stichprobe hat. Dies ist dann der Fall, wenn sich die Stichprobe auf dasselbe Objekt bezieht. Bei gepaarten Stichproben untersucht man die Paardifferenz. Die Paardifferenzen bilden eine neue Stichprobe, die mit Hilfe des Einstichproben t-Tests geprüft werden kann, unter der Annahme, dass die Differenzen in der Grundgesamtheit einer Gaußschen Normalverteilung folgen. Der Wert der Teststatistik t berechnet sich als der Quozient aus dem Mittelwert der Paardifferenzen und der Standardabweichung der Paardifferenzen. Mit Hilfe des t Wertes kann das empirische Signifikanzniveau P berechnet werden, mit Hilfe derer eine Aussage darüber getroffen werden kann, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass eine signifikant abweichendes Ergebnis zufällig auftreten kann.

2.2 Methoden

Formeln

VARIANZ s_x^2

$$\begin{aligned} s_x^2 &= \frac{SQ}{FG} = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^m f_i \cdot (x_i - \bar{x})^2 \\ &= \frac{1}{n-1} \cdot \left[\sum_{i=1}^m f_i x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^m f_i x_i)^2}{n} \right] \end{aligned} \quad (2.1)$$

- m die Anzahl verschiedener Messwerte
- x_i der i-te der verschiedenen Messwerte
- f_i die Häufigkeit des Messwertes x_i
- n der Stichprobenumfang
- FG=n-1 der Freiheitsgrad
- i der Laufindex von 1 bis m

STANDARDABWEICHUNG s_x

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \left[\sum_{i=1}^m f_i x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^m f_i x_i)^2}{n} \right]} \quad (2.2)$$

- m die Anzahl verschiedener Messwerte
- x_i der i-te der verschiedenen Messwerte
- f_i die Häufigkeit des Messwertes x_i
- n der Stichprobenumfang
- i der Laufindex von 1 bis m

2.2 Methoden

ARITHMETISCHES MITTEL \bar{x}

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{f_1 \cdot x_1 + f_2 \cdot x_2 + \dots + f_m \cdot x_m}{f_1 + f_2 + \dots + f_m} = \frac{\sum f_i x_i}{\sum f_i} \\ &= \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^m f_i x_i\end{aligned}\quad (2.3)$$

- m die Anzahl verschiedener Messwerte
x_i der i-te der verschiedenen Messwerte
f_i die Häufigkeit des Messwertes x_i
n der Stichprobenumfang
i der Laufindex von 1 bis m

T-WERT t_{emp}

$$t_{emp} = \frac{|\bar{d}|}{s_d} \cdot \sqrt{n}\quad (2.4)$$

mit

$$d_i = x_i - y_i\quad (2.5)$$

$$\bar{d} = \frac{1}{n} \cdot \sum d_i\quad (2.6)$$

$$s_d = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \left[\left(\sum d^2 \right) - \frac{(\sum d)^2}{n} \right]}\quad (2.7)$$

- n Stichprobenumfang
d_i die i-te Meßwertdifferenz
 \bar{d} das arithmetische Mittel der Differenzen d_i
s_d die Standardabweichung der d_i

2.2 Methoden

KONFIDENZINTERVALL

$$\begin{aligned}c.i.(\mu_X) &= \bar{x} \pm \hat{\sigma}_{\bar{X}} \cdot t_{n-1;1-\alpha/2} \\ &= \bar{x} \pm \frac{\hat{\sigma}_{\bar{X}}}{\sqrt{n}} \cdot t_{n-1;1-\alpha/2} \\ &= \bar{x} \pm \frac{s_X}{\sqrt{n-1}} \cdot t_{n-1;1-\alpha/2}\end{aligned}\tag{2.8}$$

$\hat{\sigma}_{\bar{X}}$	geschätzter Standardfehler des Stichprobenmittelwerts
\bar{x}	Stichprobenmittelwert der Variablen X
n	Stichprobenumfang
s_X	die Standardabweichung von X in der Stichprobe
$t_{n-1;1-\alpha/2}$	Quantilwert t des $(1-\alpha/2)$ -Quantils der T-Verteilung mit n-1 Freiheitsgraden

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1	Software Versionen und Evaluation	28
3.1.1	Definition des Softwareprofils	29
3.1.2	Allgemeine Überlegungen zum Testdesign	33
3.1.3	Test der Version 0400	34
3.1.4	Test der Version 0401	47
3.1.5	Test der Version 0402	68
3.1.6	Test der Version 1.1	90
3.1.7	Wahl des Kennwertes für die biologisch relevanten Analysen	92
3.2	Anwendung der evaluierten Software	94
3.2.1	Analyse von bereits durchgeführten Permeabilitäts- Assays	94
3.2.2	Analyse von neu durchgeführten Permeabilitäts- Assays	101

3.1 Software Versionen und Evaluation

Alle hier vorgestellten Softwareversionen finden sich auf der beigelegten CD-ROM im Verzeichnis „Programmversionen“.

3.1 Software Versionen und Evaluation

3.1.1 Definition des Softwareprofils

Im Vorfeld der Softwareprogrammierung wurde eine Reihe von Kriterien festgelegt, die das Programm erfüllen muss, um den gestellten Anforderungen zu genügen.

Das Program muss über einen geeigneten Algorithmus zur Mustererkennung verfügen, um die auf den Bildern vorhandenen Objekte voneinander zu trennen und ihnen entsprechende Kennwerte zuzuweisen. Dabei soll jedes einzelne Pixel des Bildes analysiert werden und einen absoluten Graustufenwert zugewiesen bekommen.

Die relevante Objekte auf den Bildern sind der Hintergrund, das Plasma der Zellen, sowie die Zellkerne (s. Abb.3.1). Die Software soll also in der Lage, sein dem Hintergrund einen durchschnittlichen Graustufenwert zuzuordnen sowie das Plasma der einzelnen Zellen zu erkennen und einzuzichnen. Dies ist notwendig um Zellen zu erkennen, deren Zytoplasmamembran nicht durch Digitonin permeabilisiert wurde (im folgenden: nicht-permeabilisierte Zellen (NPZ)) (s.Abb. 3.2, S.30).

Weiter soll das Program die Zellkerne der einzelnen Zellen erkennen, einzeichnen und deren Helligkeiten einen Graustufenwert zuordnen. Es ist dann erforderlich aus den Graustufenwerten aller relevanten und erkannten Zellen einen Mittelwert zu bilden.

Für eine verlässliche Interpretation des Graustufenwertes der gesamten erkannten Kernfläche muss allerdings auch der Hintergrund des Bildes berücksichtigt werden, da dieser ebenfalls zum Graustufenwert der Kerne beiträgt. Der Hintergrund wird in allen Fällen deutlich heller sein, als die darauffliegenden Kerne (s.Abb. 3.1,S.29), d.h. er wird einen größeren Graustufenwert aufweisen.

Bei der Subtraktion dieses Wertes von dem der durchschnittlichen Kernhelligkeit wird sich also ein negativer Wert ergeben. Dies sind für Graustufen jedoch nicht definiert. Durch leichte mathematische Umformungen kann dies

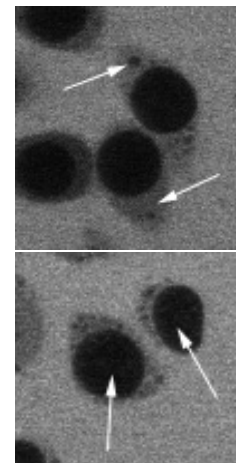


Abbildung 3.1: Definition des Softwareprofils: Relevante Objekte auf den CLSM-Bildern; vergrößerter Ausschnitt aus einem CLSM-Bild.
Oben: Plasma (Pfeile) und Hintergrund
Unten: Zellkerne

3.1 Software Versionen und Evaluation

korrigiert werden (s. Formel 3.1-3.3, S.30).

Für die Ausgabe des korrigierten Graustufenwerts der gesamten erkannten Kernfläche muss die Software also diese Berechnung durchführen können.

$$-\bar{x}_{\text{corr}} = \bar{x} - BG \quad (3.1)$$

$$\bar{x}_{\text{corr}} = -\bar{x} + BG \quad (3.2)$$

$$\bar{x}_{\text{corr}} = BG - \bar{x} \quad (3.3)$$

\bar{x}_{corr} der mit dem Hintergrund korrigierte durchschnittliche Graustufenwert der Kerne
 \bar{x} der durchschnittliche Graustufenwert der Kerne
BG der Graustufenwert des Hintergrundes

Da die Qualität der Fluoreszenzbilder in Hinblick auf die Hintergrundhelligkeit stark variiert, erscheint es außerdem sinnvoll den Quozienten aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrund anzugeben, um eine von diesen Schwankungen unabhängige Messgröße zu erhalten. Der so erhaltene Faktor gibt an, um wieviel dunkler die gesamte analysierte Kernfläche im Vergleich zum Hintergrund ist. Welcher dieser zwei Kennwerte sich weniger anfällig für die bei den Bildtypen einer Versuchsreihe auftretenden Schwankungen der Hintergrundhelligkeiten zeigt, muss durch Tests ermittelt werden.

Die ermittelten Werte sollten außerdem in eine Datei ausgegeben werden. Das Format der Ausgabedatei sollte keine überflüssigen Formatierungsangaben enthalten und plattformunabhängig sein. Es bietet sich als Format also eine nicht formatierte Textdatei (Plain Text) an.

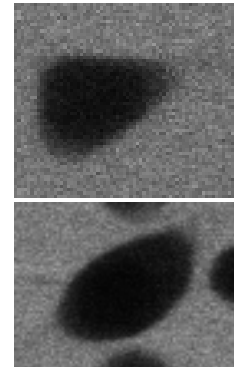


Abbildung 3.2: Definition des Softwareprofils: Unrelevante Objekte auf den CLSM-Bildern; vergrößerter Ausschnitt aus einem CLSM-Bild. Nicht permeabilisierte Zellen

3.1 Software Versionen und Evaluation

Die zu analysierenden Bilder enthalten neben den interessierenden Objekten auch Artefakte und Objekte, die auf keinen Fall in die Analyse miteinbezogen werden dürfen (s. Abb. 3.2-3.4, S.30f.).

Dies sind

- nicht-permeabilisierte Zellen (s. Abb.3.2), d.h. Zellen, die den Fluoreszenzmarker nicht aufgenommen haben und daher vollständig schwarz sind. Diese Zellen liefern keine brauchbare Fluoreszenzinformation. Da die Fläche der gesamten Zellen natürlich größer als die Fläche des Kerns ist, würde die Einbeziehung eines oder mehrerer solcher Objekte die relevanten Analysedaten nicht unerheblich beeinflussen.
- die Ecken des Bildes (s. Abb. 3.3). Einigen Bildern zeigen sehr dunkle Ecken. Dies könnte auf die Berechnung des Graustufenwerts des Hintergrunds einen deutlichen Effekt zeigen.
- Gegebenenfalls Zellkerne, die ausserhalb der Fokusebene liegen und daher nur unvollständig in den durchschnittlichen Graustufenwert der Kerne miteingehen (s. Abb.3.4). Problematisch ist hier die Festlegung der Fokusgrenzen, die von der subjektiven Einschätzung des Experimentators abhängen. Ob diese Objekte tatsächlich ausgeschlossen werden müssen, oder ob der damit erzeugte Fehler bei ausreichend großer Fallzahl nicht in Gewicht fällt, muss statistisch getestet werden.

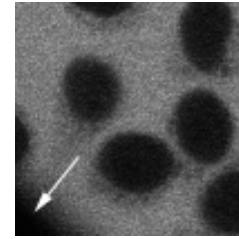


Abbildung 3.3: Definition des Softwareprofils: Unrelevante Objekte auf den CLSM-Bildern; vergrößerter Ausschnitt aus einem CLSM-Bild. Ecken des CS (Pfeil)

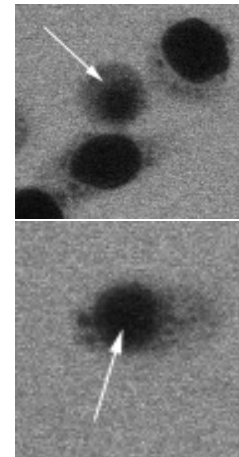


Abbildung 3.4: Definition des Softwareprofils: Unrelevante Objekte auf den CLSM-Bildern; vergrößerter Ausschnitt aus einem CLSM-Bild. Kerne ausserhalb der Fokusebene (Pfeile)

Es ist auch davon auszugehen, dass „unklare“ Objekte auftreten werden, die sich durch die festgelegten Kriterien nicht sicher definieren lassen. Da allerdings eine relativ große Anzahl von Kernen pro Bild betrachtet wird (der

3.1 Software Versionen und Evaluation

Stichprobenumfang ist ausreichend groß), sollte sich statistisch zwischen den Experimenten ein vorhandener Effekt zeigen lassen.

Um weiterhin objektive Ergebnisse im Sinne eines Messsystems zu erhalten, muss die Möglichkeiten der Einflussnahme durch den Benutzer auf die Analysedaten möglichst gering gehalten werden. Wünschenswert wäre daher eine vollautomatische Analyse.

Zur visuellen Überprüfung, ob alle relevanten Objekte richtig erkannt und in die Analyse miteinbezogen wurden, soll das analysierte Bild mit den erkannten Objekten dargestellt werden. Außerdem muss es natürlich möglich sein, einzelnen Bilder im Tiff-Format zu laden und zu analysieren. Hierfür sind jeweils Buttons erforderlich. Der Name des geladenen Bildes soll angezeigt werden.

Die Darstellung der Analysedaten soll in absoluten Werten und in Form eines Histogramms der Graustufenverteilung erfolgen. Denkbar sind auch Einstellmöglichkeiten für die Parameter der Mustererkennung, um gegebenenfalls Optimierungen vornehmen zu können. Falls eine vollautomatische Erkennung aller relevanten Objekte nicht möglich sein sollte, wäre eine manuelle Auswahlmaske ideal, um falsch erkannte Objekte in die Analyse miteinbeziehen oder ausschließen zu können.

3.1 Software Versionen und Evaluation

3.1.2 Allgemeine Überlegungen zum Testdesign

Die durch die Firma DatInf (Tübingen) programmierte Software musste auf verschiedene Parameter hin getestet werden, wobei sich die Wahl der Parameter mit forlaufender Entwicklung des Programms änderte. Das genaue Design der jeweiligen Tests wurde der aktuellsten Version der Software angepasst und ist abhängig von den Ergebnissen der Tests mit der Vorgängerversion.

Es wurden zunächst die Mustererkennungscharakteristiken der verschiedenen Versionen geprüft. Nach der Optimierung der Mustererkennung wurde mit weiteren statistischen Tests überprüft, ob mit den erhaltenen Analysewerten aussagekräftige und biologisch relevante Thesen aufgestellt werden konnten. Weiter wurden dann auch Effekte der Benutzermanipulation auf die Analysedaten untersucht.

In den Tests wurde ein weites Spektrum an Trainingsbildern verwendet, um möglichst viele unterschiedliche Bildmerkmale zu erfassen. Für die Evaluation der Software wurden Bildserien von Kernpermeabilitäts-Experimenten verwendet, welche in den Jahren 1999/2000 von Frau Dr. Elisa Ferrando-May durchgeführt wurden. Eine Zusammenstellung der verwendeten Bilder findet sich im Anhang auf Seite 111. Die Bilder selbst befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM.

Anschließend wurden die Permeabilitäts-Assays erneut durchgeführt und reproduziert und die erhaltenen Bilder mit der evaluierten Software analysiert.

3.1 Software Versionen und Evaluation

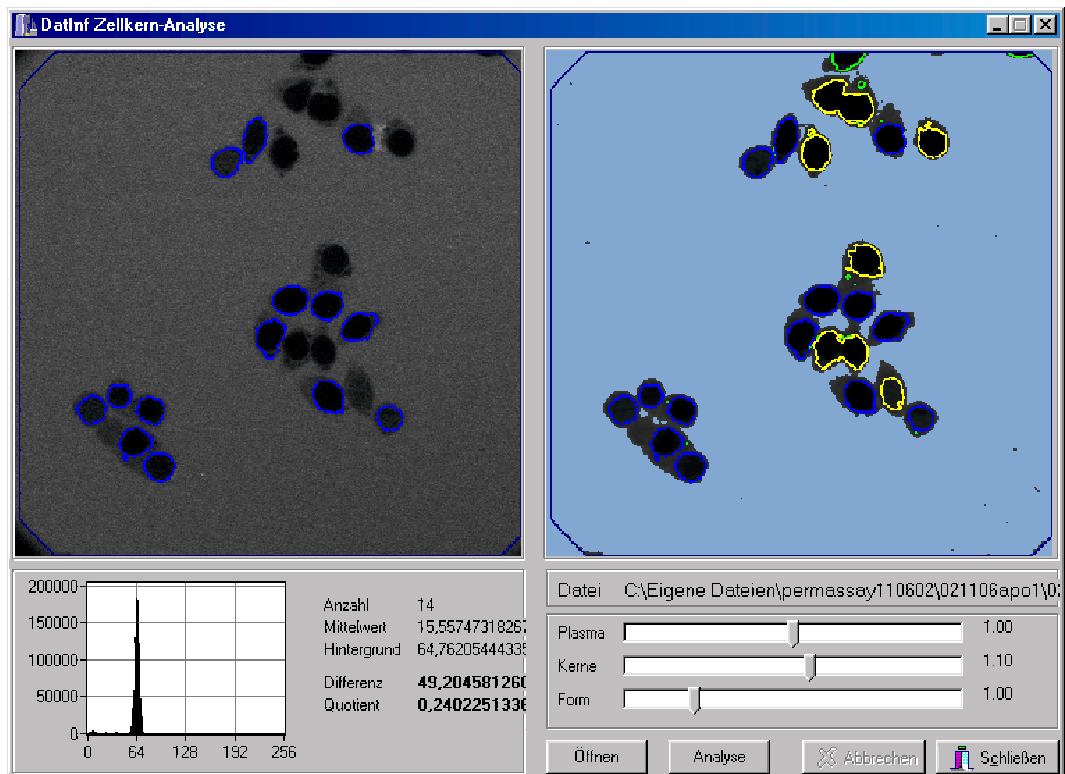


Abbildung 3.5: Softwareversionen und Evaluation: Layout der Programmversion Zellkerne.exe 0400 mit analysiertem Bild und farbig markierten Kernen

3.1.3 Test der Version 0400

Layout der Version 0400

Die erste von der Firma DatInf gelieferte Testversion umfasste die ausführbare Datei „Zellkern.exe“, die Programmbibliothek „mst33cb3.dll“ und die Konfigurationsdatei „Zellkerne.ini“. Das Programm ist lauffähig in Microsoft Windows Umgebungen und benötigt eine Farbtiefe von 32 bit.

Das Programm stellt zwei Anzeigebereiche für das analysierte Bild zur Verfügung. Im rechten Anzeigebereich wird das analysierte Bild mit allen erkannten Objekten dargestellt. Der linke Anzeigebereich stellt das analysierte Bild mit den letztlich in Analyse einbezogenen Kernen dar (s. Abb.3.5, S. 34).

Unterhalb der Anzeigebereiche befinden sich rechts Schieberegler für die Parameter der Mustererkennung. Der Erkennungsalgorithmus der Version 0400

3.1 Software Versionen und Evaluation

basiert auf der Festlegung von Schwellenwerten für die entsprechenden Objekte, welche vom Experimentator festgelegt werden können (s. Abb. 3.6, S.35). Der mit „Plasma“ bezeichnete Schieberegler legt die relative Schwelle für die Abgrenzung des Plasmas fest. Analog wird mit dem „Kerne“-Regler die relative Schwelle für die Auffindung von Kernen definiert. Mit dem Parameter „Form“ lässt sich festlegen wie stark die Form eines erkannten Kernes von einem Kreis abweichen darf.

Unterhalb der Schieberegler befinden sich vier Buttons, mit denen sich ein Bild laden und analysieren lässt. Außerdem kann die Analyse abgebrochen und das Programm geschlossen werden (s. Abb. 3.6, S. 35).

Unter dem linken Anzeigebereich werden die Ergebnisse der Analyse dargestellt (s. Abb.3.7, S. 35). Die graphische Darstellung für die Verteilung der Graustufenwerte erfolgt mit Hilfe eines Histogramms, an dem in dieser Version noch die Einheitsangaben

fehlten. Rechts vom Histogramm werden die Anzahl der erkannten und in die Analyse miteinbezogenen Kerne, der Graustufenmittelwert der einzelnen mittleren Kernhelligkeiten, der Graustufen Mittelwert des Hintergrundes, die Differenz aus „Hintergrund“ und „Mittelwert“, sowie der Quozient aus „Mittelwert“ und „Hintergrund“ angegeben.

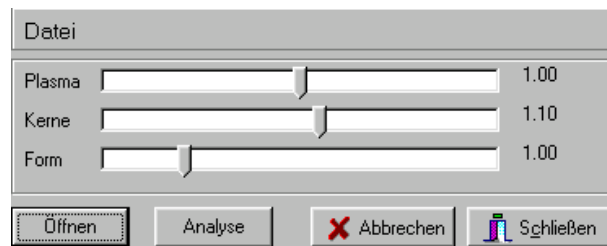


Abbildung 3.6: Softwareversionen und Evaluation: Schieberegler zur Einstellung der Erkennungsparameter „Plasma“, „Kerne“ und „Form“ der Programmversion Zellkerne.exe 0400

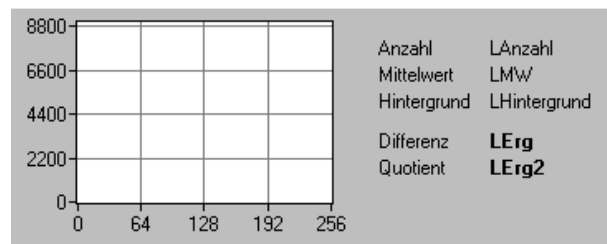


Abbildung 3.7: Softwareversionen und Evaluation: Histogramm und ausgegebene Analysewerte der Programmversion Zellkerne.exe 0400

3.1 Software Versionen und Evaluation

Der Status der Objekte wird durch unterschiedliche farbige Umrandungen markiert. Dabei kommen den Farben folgende Bedeutungen zu :

- blaue Umrandung : akzeptierte Kerne
- gelbe Umrandung : nicht-akzeptierte Kerne wegen Abweichung von Form (zu unrund)
- grüne Umrandung : nicht-akzeptierte Kerne wegen Randberührung oder zu kleiner Größe
- rote Umrandung : nicht-akzeptierte Kerne wegen zu wenig Plasmaumgebung der Kerne

Testdesign für die Version 0400

Bevor eine statistische Auswertung von Analysedaten vorgenommen werden konnte, musste sichergestellt werden, dass die Mustererkennungsalgorithmen die relevanten und irrelevanten Objekte zuverlässig erkennen und trennen konnten. Die gelieferten Analysewerte wurden zunächst nicht berücksichtigt. Um einen Überblick über das Erkennungsverhalten der Version Zellkerne.exe V0400 zu erhalten wurde ein Testset von 19 Bildern ausgewählt, welches die vorkommenden Bildtypen weitestgehend abdeckte. Eine Zusammenstellung der Bilder findet sich im Abschnitt 5.1 auf Seite 111. Die Bilder selbst befinden sich auf der beiliegenden CD-ROM.

Da die verwendeten „Trainingsbilder“ in Hinblick auf Kontrast und Helligkeitsverteilung eine ausgesprochene Heterogenität zeigten, stellte sich zunächst die Frage, ob für die im Abschnitt 1.2 auf Seite 11 aufgeführten Bildtypen einer Experimentreihe dieselben Einstellungen für die Parameter „Plasma“, „Kerne“ und „Form“ verwendet werden können, ohne dabei eine Qualitätseinbuße bei der Objekterkennung zu verzeichnen.

Bei der Durchführung wurde der Parameter „Form“ zunächst nicht manipuliert, da dieser Parameter nicht unabhängig von der Festlegung der Schwellenwerte für Plasma und Kerne ist. Der Standardwert 1 wurde konsequent bei allen hier verwendeten Trainingsbildern angewandt. Jedes Bild wurde zweimal analysiert. Bei der ersten Analyse wurden die voreingestellten Werte für

3.1 Software Versionen und Evaluation

die drei Parameter verwendet, bei der zweiten Analyse wurden die Schieberegler solange manipuliert, bis eine optimale Mustererkennung stattfand. Dabei wurden generell alle am Rand liegenden nur unvollständig erfassten Kerne ausgeschlossen. Der Begriff der optimalen Erkennungscharakteristik ist problematisch, da er unmittelbar von der subjektiven Einschätzung des Experimentators abhängt. Da eine manuelle Auswahl von Objekten und die Festlegung deren Stati in dieser Programmversion noch nicht möglich war, wurde versucht ein möglichst optimales Verhältnis aus relevanten erkannten und in die Analyse miteinbezogenen Objekten und nicht-relevanten, aber in die Analyse einbezogene Objekte zu erreichen. Die Ergebnisse des Tests wurden mit Hilfe von Bildschirmschnappschüssen dokumentiert.

3.1 Software Versionen und Evaluation

Ergebnisse des Mustererkennungstests

Die Manipulation der Regler für die Schwellenwerte zeigte bei der Analyse folgende charakteristische Effekte:

Schwellenwerte für die Plasmaerkennung

Eine Erhöhung des Schwellenwertes (Verschiebung des Reglers nach rechts) für die Erkennung des Plasmas (im Folgenden „P“), führte dazu, dass Pixel mit einem größeren Graustufenwert dem Objekttyp „Plasma“ zugeordnet wurden. Damit nahm die Gesamtfläche an Hintergrund ab. Außerdem führte die Veränderung dazu, dass Kerne, die nur über einen sehr schmalen Cytoplasmarand verfügten und daher in der Analyse mit Voreinstellungen mit rot markiert und von der Analyse ausgeschlossen wurden nun mit in den Analyseprozess aufgenommen waren (siehe Abbildung 3.8 auf Seite 38). Eine Verringerung des Schwellenwertes (Verschiebung des Reglers nach links) für die Plasmaerkennung schlug sich in einem gegenteiligen Effekt nieder. Dadurch, dass Pixel erst ab dunkleren Graustufenwerten als Plasma gewertet wurden, wurde die gesamte erkannte Kernfläche kleiner. Bereiche, die mit Standardeinstellungen dem Objekttyp „Kern“ zugeordnet wurden, waren nun dem Typ „Plasma“ zugewiesen. Dies wurde insgesamt als negativ bewertet, da damit u.a. die Anzahl der relevanten Kerne abnahm.

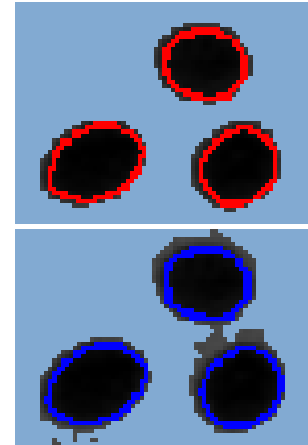


Abbildung 3.8: Ergebnisse des Mustererkennungstests der V0400: Effekt der Veränderung des Schwellenwertes für die Plasmaerkennung,
Oben: Erkennung mit Standard $P=1$
Unten: Erkennung mit nach oben modifizierter Einstellung $P=1.25$

Schwellenwerte für die Kernererkennung

Eine Erhöhung des Schwellenwertes für die Kernererkennung (im Folgenden „K“) hatte zur Folge, dass Bereiche, die mit Standardeinstellungen zum Zytoplasma gezählt, nun als Kernfläche erkannt wurden. Damit verringerte sich

3.1 Software Versionen und Evaluation

die gesamte erkannte Plasmafläche. Umgekehrt hatte eine Verringerung der Schwelle den Effekt, dass erst Pixel mit einem niedrigeren Graustufenwert als zur Kernfläche gehörig erkannt wurden. Entsprechend nahm die Plasmafläche zu.

Durch die Kombination der Manipulation beider Schwellenwerte ließ sich die Mustererkennung im Bezug auf bestimmte Objekte im Vergleich zu den vordefinierten Standardeinstellungen z.T. deutlich verbessern.

Eine Erhöhung des Schwellenwertes für die Plasmaerkennung zielte in die gleiche Richtung, wie die Verringerung des Schwellenwertes für die Kernerken-
nung. Beide Manipulationen hatten u.a. den Effekt der Vergrößerung des Plasmabereiches, was bei rot markierten Objekten (ausgeschlossen da zu kleiner Cytoplasmarand) zur Aufnahme dieser Objekte in die Analyse führte.

Auf der anderen Seite führte diese Änderung der Einstellungen auch zur deutlich schlechteren Trennung anderer Objekte, z.B. eng beieinander liegende Kerne. Diese werden dann als ein grosser Kern erkannt und ausgeschlossen, da die Form zu stark vom Richtwert abweicht. Der Effekt ist in Abbildung 3.9 auf Seite 39 dargestellt. Der Bereich der verwendeten Reglereinstellungen lässt sich der Tabelle 3.1 auf Seite 44 entnehmen. Es lässt sich die Tendenz erkennen, dass für den Parameter „Plasma“ eher höhere Werte und für den Parameter „Kerne“ eher niedrigere Werte einzustellen sind.

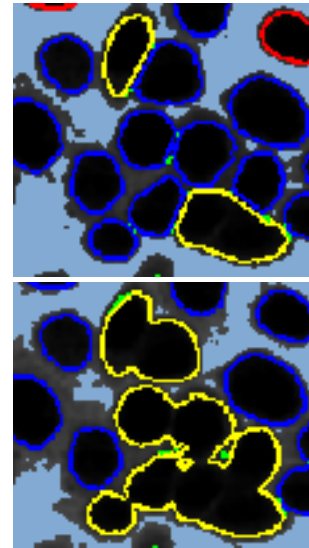


Abbildung 3.9: Ergebnisse des Mustererkennungstests der V0400: Effekt der Veränderung der Schwellenwerte für die Plasma- und Kernerken-
Oben: Erkennung mit Standard $P=1, K=1$
Unten: Erkennung mit nach oben modifizierter Einstellung $P=1.25, K=0.88$

3.1 Software Versionen und Evaluation

Im Folgenden wurden von den insgesamt 19 getesteten Bildern drei Bilder mit unterschiedlichen Charakteristiken für die Auswertung der Mustererkennungseigenschaften der Softwareversion 0400 herangezogen :

1. EXP10.tif als Beispiel für ein Bild mit homogener Kernhelligkeit(Abb.:3.10)
2. EXP5.tif als Beispiel für ein Bild mit heterogener Kernhelligkeit
3. EXP14.tif als Beispiel für ein Bild mit extremer Heterogenität der Kernhelligkeit

1) EXP10.tif: Homogene Kernhelligkeit

Bei der Analyse von Bildern mit homogener Kernhelligkeit lieferte die Version 0400 nach der Optimierung der Schwellenwerte zufriedenstellende Ergebnisse (s.Abb.3.12 auf Seite 41). Die Analyse mit den voreingestellten Werten resultierte in einer mäßig guten Erkennung (s.Abb.3.11 auf Seite 41), bei der v.a. relevante Kerne mit wenig Cytoplasmaumgebung nicht akzeptiert wurden. Dies konnte durch Manipulation der Schwellenwerte sowohl für Cytoplasma als auch für Kerne verbessert werden, wobei der unter 3.1.3 genannte Effekt auftrat, dass dann eng beieinander liegende Kerne nicht mehr separiert werden konnten. In diesem Fall wiegt dieser Umstand jedoch nicht so schwer, da es sich bei den ausgeschlossenen Zellen z.T. um nicht-permeabilisierte Zellen handelt, die ohnehin nicht mit in den Analyseprozess einbezogen werden sollten (s. Abb.3.9,S. 39 und Abb. 3.12,S. 41).

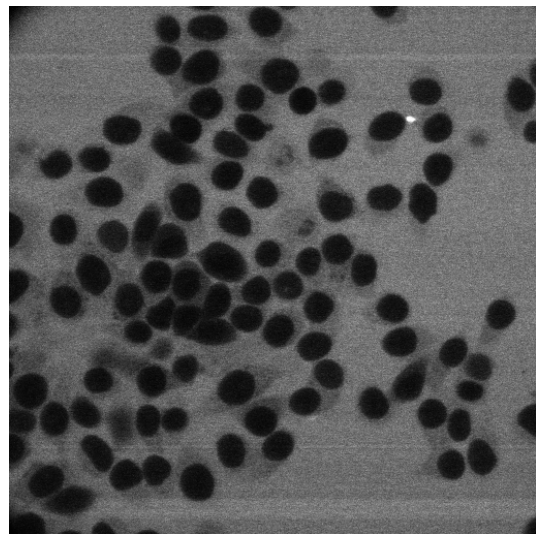


Abbildung 3.10: Zellfreies System: CLSM Aufnahmen von Digitonin-permeabilisierten Hela-Zellen auf Coverslips.

Testbild für die Mustererkennung der Version 0400 Zellkerne.exe: EXP10.tif mit homogener Verteilung der Kernhelligkeit

3.1 Software Versionen und Evaluation

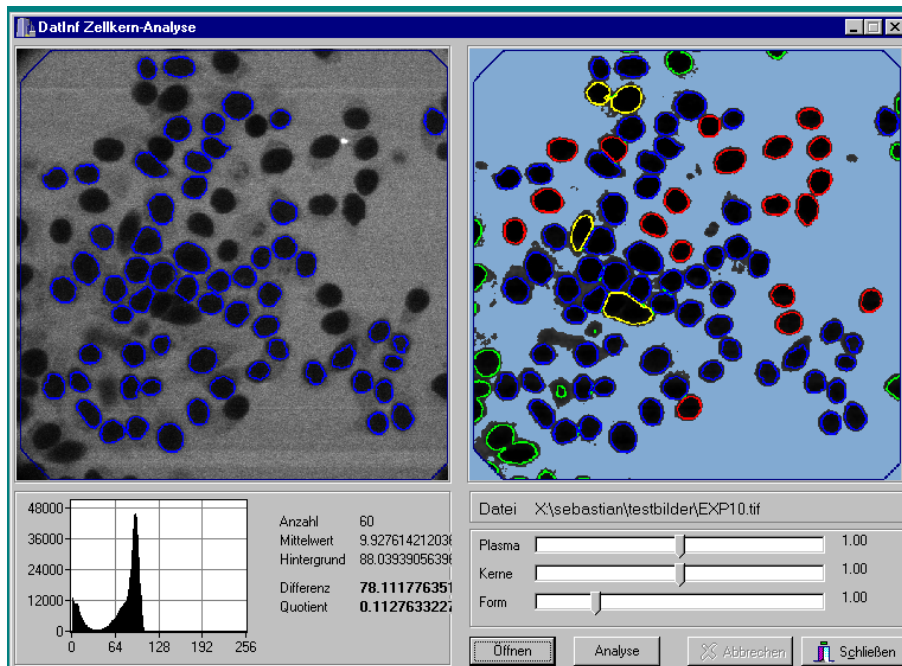


Abbildung 3.11: Ergebnisse der Mustererkennung V0400: Bild EXP10.tif analysiert mit Parametervoreinstellungen $P=1$, $K=1$, $F=1$

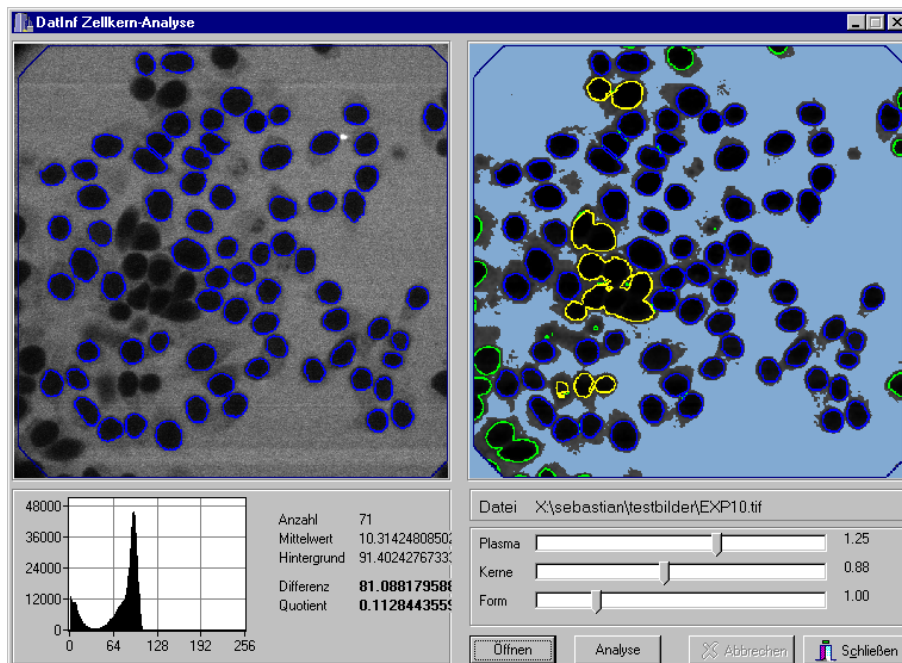


Abbildung 3.12: Ergebnisse der Mustererkennung V0400: Bild EXP10.tif analysiert mit optimierten Parametereinstellungen $P=1.25$, $K=0.88$, $F=1$

3.1 Software Versionen und Evaluation

2) EXP5.tif: Heterogene Kernhelligkeit

Bei Bildern mit heterogener Helligkeitsverteilung der Kerne zeigt die Version 0400 ein eher schlechtes Erkennungsverhalten, das auch durch Veränderung der Schwellenwerte nicht deutlich verbessert werden konnte (s. Abb.3.15, S.43 und 3.16, S.43). Je geringer die Differenz zwischen Grauwerten der Kerne und Grauwerten des Plasmas werden, desto schlechter funktioniert die Objekttrennung. Probleme ergeben sich durch die Nukleoli. Da diese den Marker generell nicht aufnehmen können, erscheinen sie in einem fluoreszenzmikroskopischen Bild immer dunkel. Liegt die Helligkeit des Kerns nahe and der Helligkeit des Plasmas, werden die deutlich kleineren Nukleoli als Kerne erkannt (aber nicht in die Analyse miteinbezogen) und der eigentliche Kern als Cytoplasma (s.Abb.3.14, Seite 42).

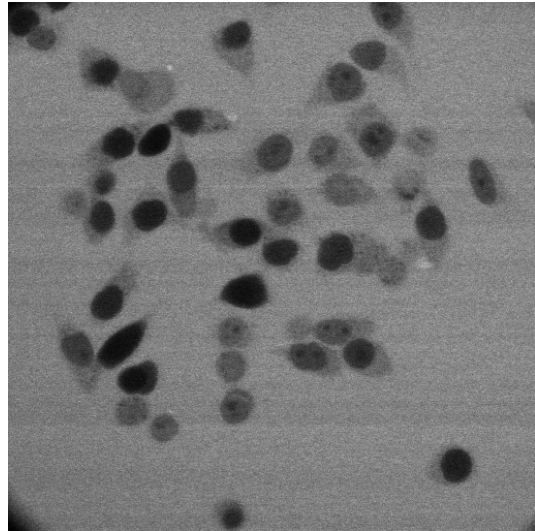


Abbildung 3.13: Zellfreies System: CLSM Aufnahmen von Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen auf Coverslips. Testbild für die Mustererkennung der Version 0400 Zellkerne.exe: EXP5.tif mit heterogener Verteilung der Kernhelligkeit

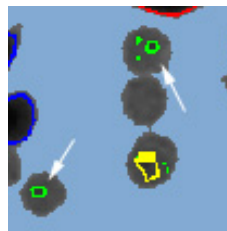


Abbildung 3.14: Zellfreies System: CLSM Aufnahmen von Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen; Testbild für die Mustererkennung der V0400,EXP5.tif analysiert mit Parametervoreinstellungen, P=1, K=1, F=1. Der Ausschnitt zeigt als Kerne erkannte Nukleoli (Pfeile)

3.1 Software Versionen und Evaluation

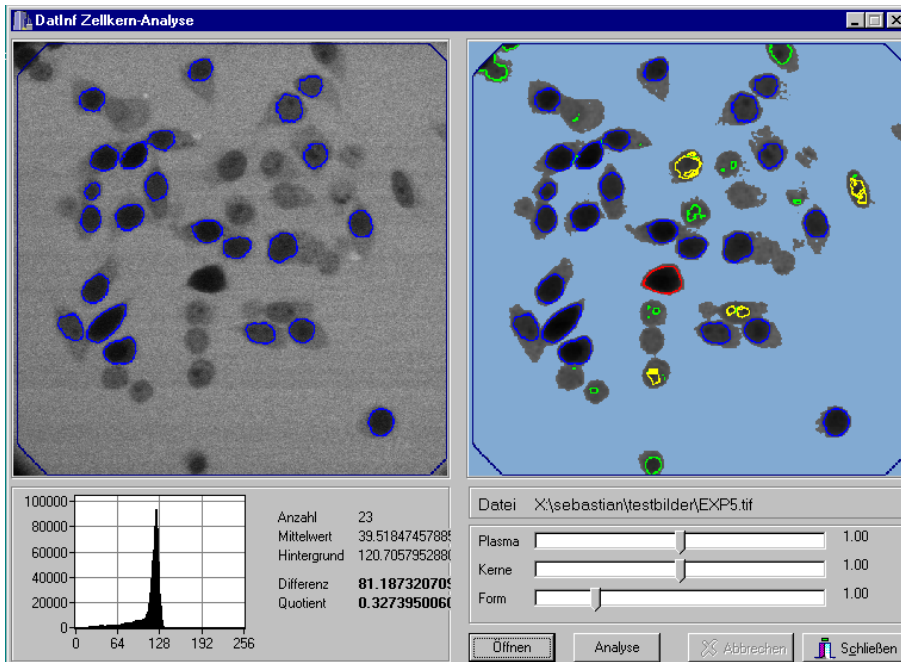


Abbildung 3.15: Ergebnisse der Mustererkennung V0400: Bild EXP5.tif analysiert mit Parametereinstellungen $P=1$, $K=1$, $F=1$

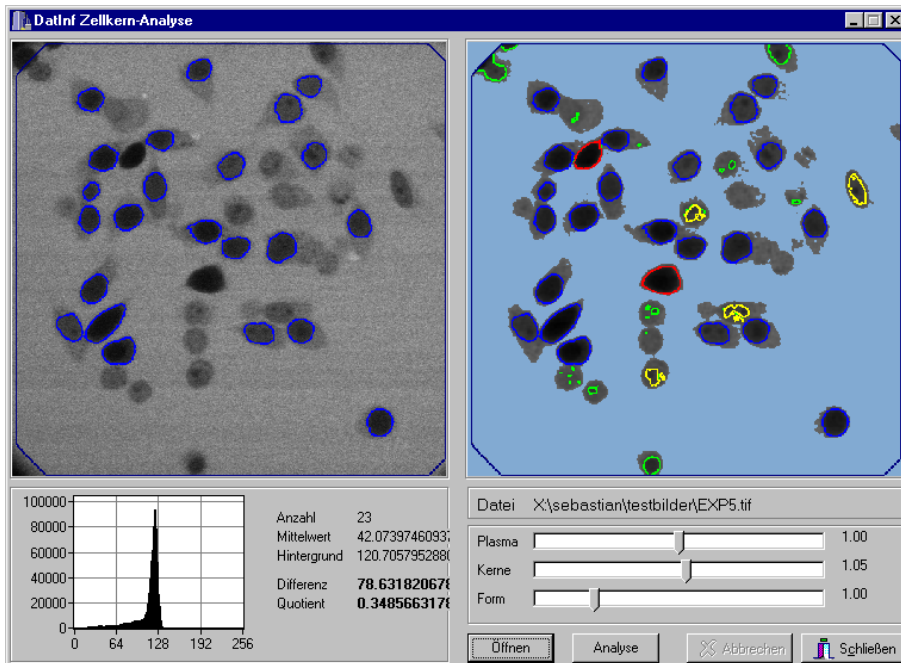


Abbildung 3.16: Ergebnisse der Mustererkennung V0400: Bild EXP5.tif analysiert mit optimierten Parametereinstellungen $P=1.00$, $K=1.05$, $F=1$

3.1 Software Versionen und Evaluation

3) EXP14.tif: Extrem heterogene Kernhelligkeit

Bilder mit sehr großen Graustufenschwankungen der Kernhelligkeit können mit der Version 0400 nahezu nicht ausgewertet werden. Die Erkennungscharakteristik ist dadurch gekennzeichnet, dass entweder alle dunklen Kerne, oder alle hellen Kerne erkannt und in die Analyse miteinbezogen werden, und dies auch nur dann, wenn die Reglereinstellungen extrem geändert werden. Bei moderaten Regleränderungen lässt sich nahezu kein Unterschied zur Analyse mit Standardeinstellungen feststellen (s. Abb. 3.18, S.45 und Abb. 3.19, S.45).

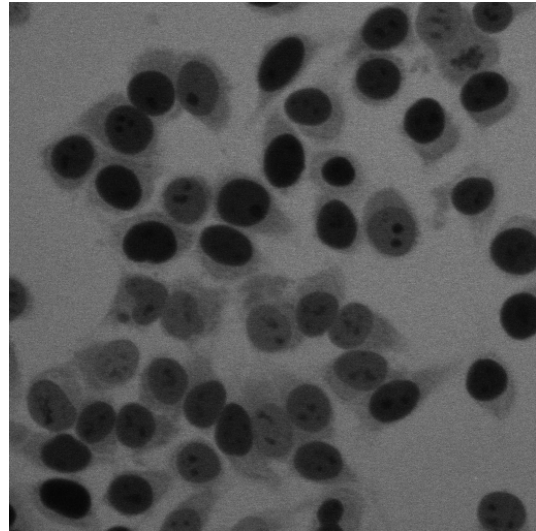


Abbildung 3.17: Zellfreies System: CLSM Aufnahmen von Digitonin-permeabilisierten Hela-Zellen auf Coverslips.
Testbild für die Mustererkennung der Version 0400
Zellkerne.exe: EXP14.tif mit extrem heterogener Verteilung der Kernhelligkeit

Parameter	min. Wert	max. Wert
Plasma(P)	0.95	1.25
Kerne(K)	0.65	1.05
Form(F)	1	1

Tabelle 3.1: Bereich der Parametereinstellungen für den Mustererkennungstest der Version 0400

3.1 Software Versionen und Evaluation

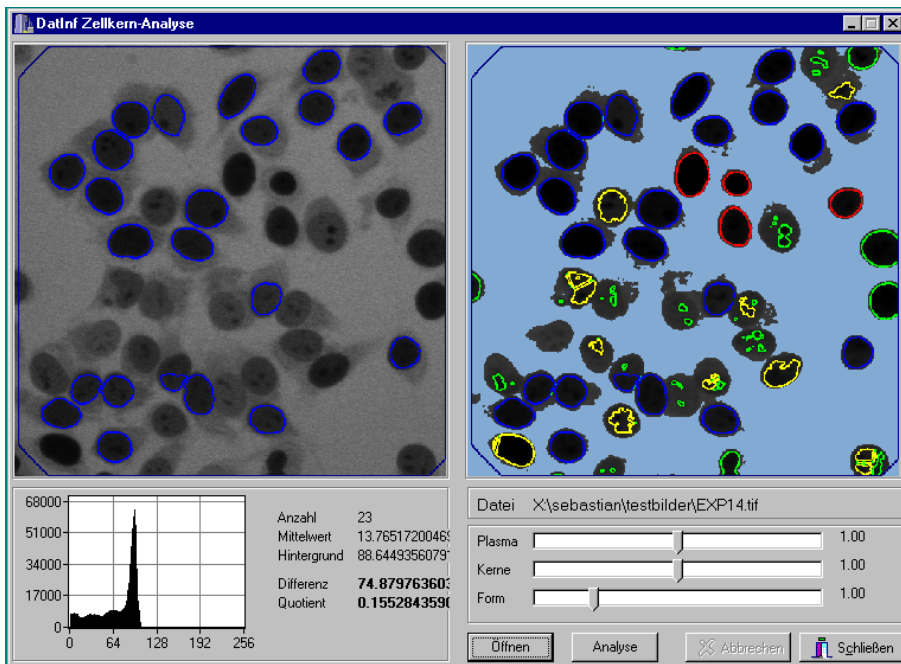


Abbildung 3.18: Ergebnisse der Mustererkennung V0400: Bild EXP14.tif analysiert mit Parametervoreinstellungen $P=1$, $K=1$, $F=1$

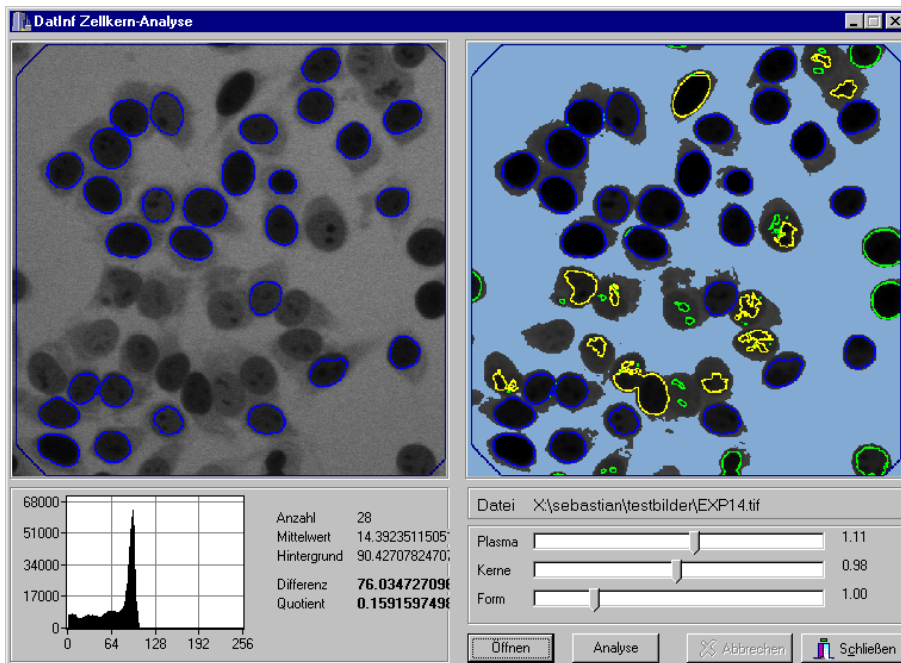


Abbildung 3.19: Ergebnisse der Mustererkennung V0400: Bild EXP14.tif analysiert mit optimierten Parametereinstellungen $P=1.11$, $K=0.98$, $F=1$

3.1 Software Versionen und Evaluation

Zusammenfassung der Mustererkennung V0400

Die Analyse der oben genannten Bilder ergab, dass folgende Aspekte der Mustererkennung weiterer Optimierung bedürfen:

- Nukleoli müssen als solche erkannt werden, damit die hellen Kerne nicht als Plasma erkannt werden, sondern mit in die Analyse eingehen
- Die Erkennung für Kerne, deren Helligkeit nahe an der des Plasmas liegt, muss verbessert werden
- Es ist für eine erfolgversprechende Analyse absolut notwendig, dass beide Objekttypen, also helle *und* dunkle Kerne erkannt und in die Analyse miteinbezogen werden, um gegebenenfalls vorhanden Unterschiede zwischen zwei Experimenten anhand der statistisch signifikanten Abweichung feststellen zu können.

3.1 Software Versionen und Evaluation

3.1.4 Test der Version 0401

Layout der Version 0401

Das generelle Layout der Version 0401 hat sich im Vergleich zur Vorgängerversion nicht geändert. Allerdings verwendet diese Version einen Erkennungsalgorithmus zur Erkennung des Randes von Zellkernen unabhängig von der Helligkeit, da aufgrund der Ergebnisse des Tests der Vorgängerversion festgestellt wurde, dass ein Algorithmus basierend auf Schwellenwerten den Problemen der Kernererkennung nicht gerecht werden kann.

Die Voreinstellungen für die Schwellenwerte wurden entsprechend den Ergebnissen des Vorgängertests angepasst (s.Tab 3.2, S.47). Dabei wurden jeweils Mittelwerte aus den verwendeten Reglereinstellungen gebildet und in der Konfigurationsdatei „Zellkerne.ini“ eingetragen.

Parameter	Default V0400	Default V0401
Plasma(P)	1	1.10
Kerne(K)	1	0.89
Form(F)	1	1

Tabelle 3.2: Parametervoreinstellungen der Versionen 0400 und 0401

Testdesign für die Version 0401

Da in der Version 0400 ein anderer Erkennungsalgorithmus verwendet wurde als in der aktuellen Version 0401 des Programs, schien es plausibel einen Vergleich der Erkennungscharakteristiken der beiden Versionen anzustellen. Der Vergleichstest wurde mit den Trainingsbildern EXP10.tif, EXP5.tif und EXP14.tif durchgeführt. Alle Bilder wurden mit jeder der beiden Programmversionen in zwei Durchläufen analysiert - einmal mit Voreinstellungen und einmal mit optimierten Einstellungen.

Die Auswertung der analysierten Bilder erfolgte durch Klassifizierung und Abzählen der erkannten Objekte. Von den analysierten Bildern wurden Screenshots erstellt (s. Abschnitt 3.1.4, S.49). Die abgezählten und klassifizierten Objekte wurden in den erstellten Screenshots mit Pfeilen unterschiedlicher Farbe gekennzeichnet :

3.1 Software Versionen und Evaluation

- *Rote Pfeile* bezeichnen Kerne, die falsch erkannt wurden, d.h. eigentlich nicht in den Analyseprozess hätten miteinbezogen werden sollen
- *Hellblaue Pfeile* bezeichnen Kerne, die in den Analyseprozess hätten miteinbezogen werden sollen
- *Grüne Pfeile* indizieren Kerne, die korrekterweise nicht in die Analyse miteinbezogen wurden.

Eine Beschreibung der relevanten und irrelevanten Objekte findet sich im Abschnitt 3.1.1 „Definition des Softwareprofils“ auf Seite 29.

Aus den ermittelten Zahlenwerten wurden folgende Prozentsätze berechnet:

1. *Anteil der erkannten Kerne von der Sollkernanzahl :*
Für die Berechnung dieses Anteils wurden die insgesamt erkannten Kerne unabhängig von der Relevanz ins Verhältnis zur zu erkennenden Sollkernanzahl gesetzt. Die Sollkernanzahl ergibt sich als die Differenz aus der gesamten erkannten Kernzahl und den irrelevanten erkannten Kernen plus die relevanten nicht erkannten Kerne.
2. *Anteil der irrelevanten erkannten Kerne:*
Die Anzahl der irrelevanten erkannten Kerne wurde ins Verhältnis gesetzt mit der gesamten erkannten Kernanzahl.
3. *Anteil der erkannten relevanten Kerne:*
Ergibt sich aus der Differenz des Anteils der erkannten Kerne von der Sollkernanzahl (1.) und dem Anteil der irrelevanten erkannten Kerne (2.).
4. *Anteil der nicht erkannten relevanten Kerne:*
Ergibt sich aus der Anzahl der relevanten nicht erkannten Kerne im Verhältnis zur Sollkernanzahl.
5. *Anteil der korrekterweise ausgeschlossenen Kerne an den tatsächlich auszuschließenden Kernen:*
Ergibt sich aus der Anzahl der relevanten nicht erkannten Kerne im Verhältnis zur Anzahl der auszuschließenden Kerne.

3.1 Software Versionen und Evaluation

Auch bei diesem Test wurden die ausgegebenen absoluten Analysewerte nicht miteinbezogen. Allerdings wurde berücksichtigt, ob sich durch unterschiedliche Anzahlen an erkannten Objekten Änderungen an den Analysewerten erkennen ließen.

Ergebnisse des Vergleichs der Mustererkennung der Versionen 0400 und 0401

1a) EXP10.tif: Homogene Kernhelligkeit, Bild analysiert mit Parametervoreinstellungen

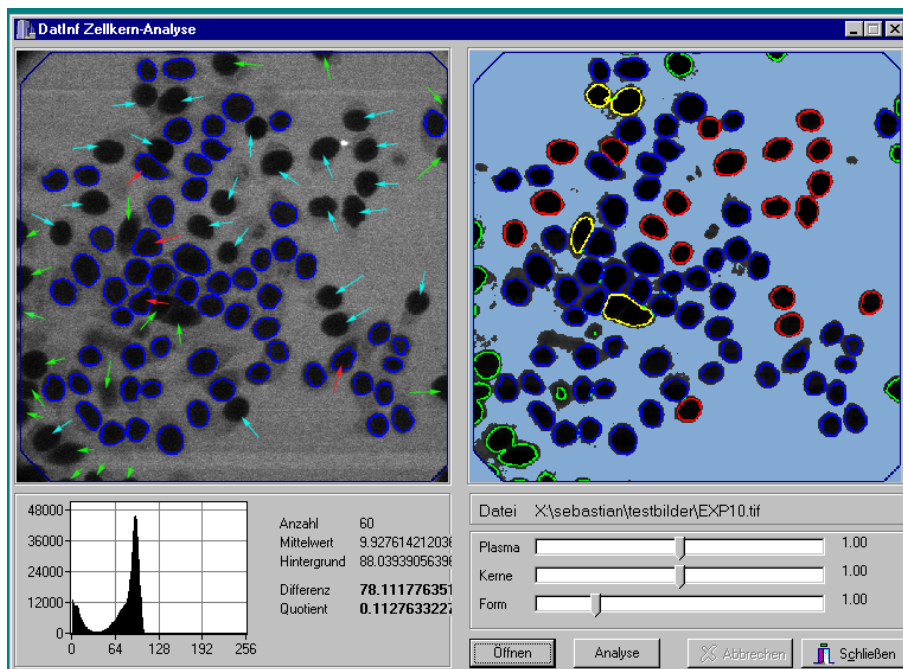


Abbildung 3.20: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP10.tif analysiert mit V0400 und Voreinstellungen P=1, K=1, F=1.
Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

3.1 Software Versionen und Evaluation

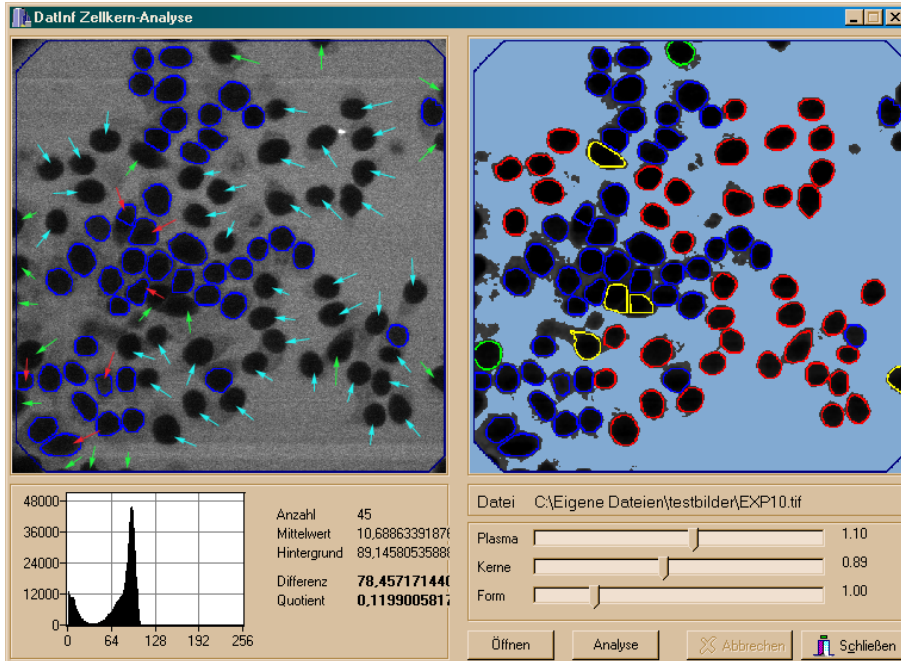


Abbildung 3.21: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP10.tif analysiert mit V0401 und Voreinstellungen P=1.10, K=0.98, F=1. Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

Gezählte und klassifizierte Objekte:	
<i>EXP10.tif analysiert mit V0400 und Voreinstellungen (s. Abb. 3.20)</i>	
P:1, K:1, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	60
Sollkernanzahl ($(K_{soll}) = (K_{ges} - K_3) + K_2$)	78
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	19
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus} = K_1 + K_3$)	23
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	22
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	4
<i>EXP10.tif analysiert mit V0401 und Voreinstellungen (s. Abb. 3.21)</i>	
P:1.1, K:0.89, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	45
Sollkernanzahl ($(K_{soll}) = (K_{ges} - K_3) + K_2$)	78
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	17
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus} = K_1 + K_3$)	23
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	39
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	6

Tabelle 3.3: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP10.tif analysiert mit Voreinstellungen, Gezählte und klassifizierte Objekte

3.1 Software Versionen und Evaluation

Damit ergeben sich folgende Prozentsätze:

		<i>EXP10.tif analysiert mit V0400 und Voreinstellungen (s.Abb. 3.20)</i>
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 0.77$	Es wurden ca. 77% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.07$	ca. 7% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.7$	ca. 70% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.28$	ca. 30% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 0.83$	ca. 83% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen
		<i>EXP10.tif analysiert mit V0401 und Voreinstellungen (s.Abb. 3.21)</i>
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 0.57$	Es wurden ca. 57% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.13$	ca. 13% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.44$	ca. 44% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.5$	ca. 50% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 0.74$	ca. 74% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen

Tabelle 3.4: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP10.tif analysiert mit Voreinstellungen, Berechnete Anteile der verschiedenen Objekte als Prozentangabe

Vergleicht man die Ergebnisse der Analyse des Bildes EXP10.tif mit Software Version 0400, bzw. 0401, zeigt sich, dass die Version 0401 15 Kerne weniger erkennt. Der Mittelwert der Kernhelligkeit ändert sich jedoch nur geringfügig von 9.93 in der Version 0400 auf 10.69 in der Version 0401. Auch das Histogramm zeigt nur geringe bis keine Abweichungen (s. Abb.3.20, S.49 und Abb.3.21, S.50). Daraus lässt sich entnehmen, dass die verwendeten Algorithmen in den beiden Versionen sich in ihrer Erkennungscharakteristik unterscheiden und verschiedene Objekte unterschiedlich gut erkennen. Insgesamt zeigt die Version 0401 bei diesem Bild im Vergleich zur Version 0400 eine schlechtere Erkennungscharakteristik wenn die Parametervoreinstellungen für die Analyse verwendet werden. Es werden ca. 26% weniger relevante Kerne erkannt als in V0400. Der Anteil der erkannten, aber unrelevanten Kerne ist um 6% höher als bei der Analyse mit der Version 0400 (s.Tab.3.4, S.51).

3.1 Software Versionen und Evaluation

1b) EXP10.tif: Homogene Kernhelligkeit, Bild analysiert mit optimierten Parametereinstellungen

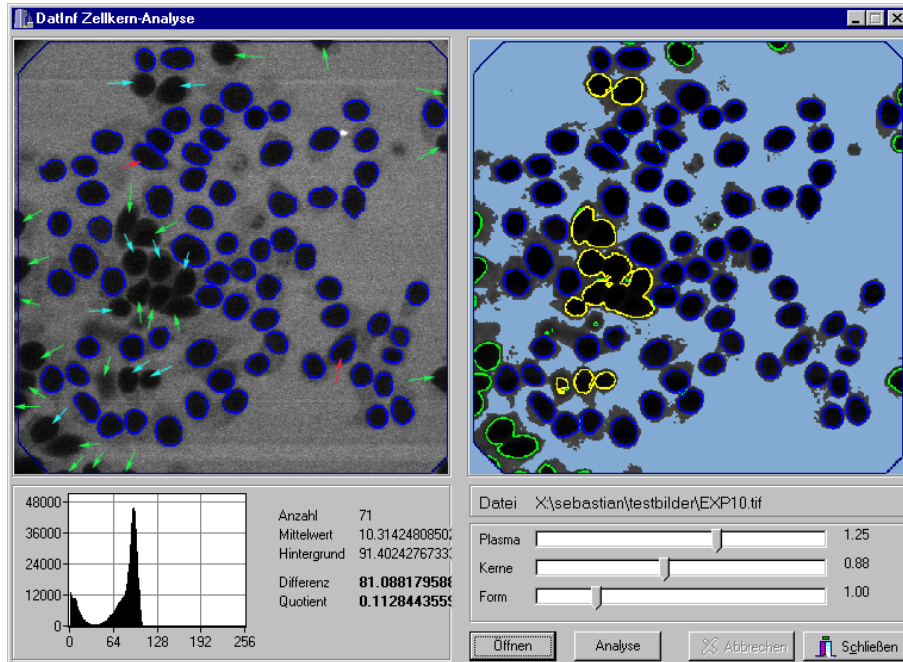


Abbildung 3.22: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP10.tif analysiert mit V0400 und optimierten Parametereinstellungen $P=1.25$, $K=0.88$, $F=1$. Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

3.1 Software Versionen und Evaluation

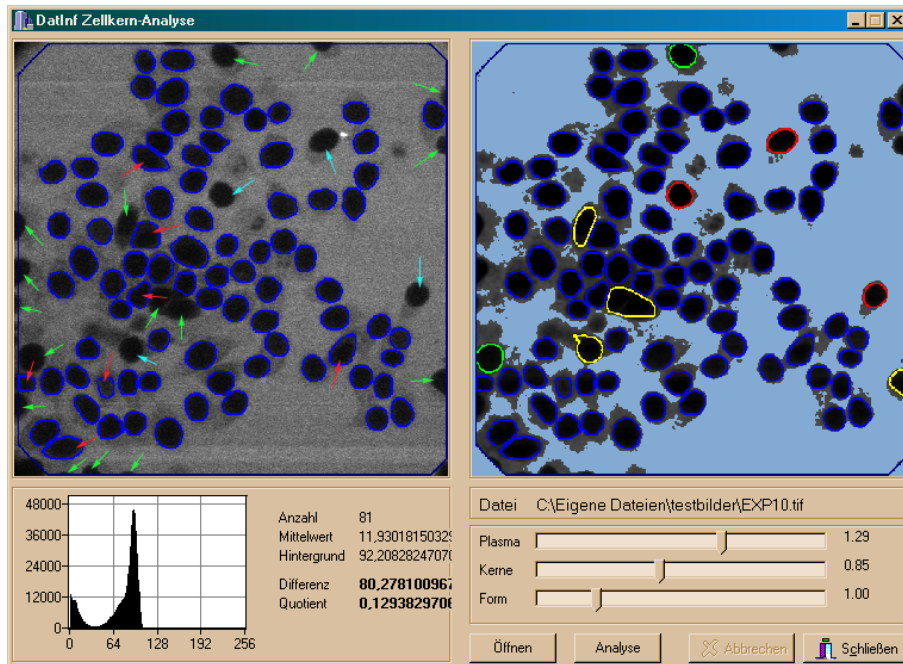


Abbildung 3.23: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP10.tif analysiert mit V0401 und optimierten Parametereinstellungen $P=1.29$, $K=0.85$, $F=1$. Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

Gezählte und klassifizierte Objekte:	
<i>EXP10.tif analysiert mit V0400 und optimierten Parametereinstellungen (s. Abb. 3.22)</i>	
P:1.25, K:0.88, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	71
Sollkernanzahl ($(K_{soll})=(K_{ges}-K_3)+K_2$)	78
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	21
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus}=K_1+K_3$)	23
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	9
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	2
<i>EXP10.tif analysiert mit V0401 und optimierten Parametereinstellungen (s. Abb. 3.23)</i>	
P:1.29, K:0.85, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	81
Sollkernanzahl ($(K_{soll})=(K_{ges}-K_3)+K_2$)	78
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	16
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus}=K_1+K_3$)	23
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	4
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	7x

Tabelle 3.5: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP10.tif analysiert mit optimierten Parametereinstellungen, Gezählte und klassifizierte Objekte

3.1 Software Versionen und Evaluation

Damit ergeben sich folgende Prozentsätze:

<i>EXP10.tif analysiert mit V0400 und optimierten (Parametereinstellungen s.Abb. 3.22)</i>		
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 0.91$	Es wurden ca. 91% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.03$	ca. 3% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.88$	ca. 88% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.11$	ca. 11% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 0.91$	ca. 91% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen
<i>EXP10.tif analysiert mit V0401 und optimierten Parametereinstellungen (s.Abb. 3.23)</i>		
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 1.04$	Es wurden ca. 104% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.9$	ca. 9% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.95$	ca. 95% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.05$	ca. 5% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 0.70$	ca. 70% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen

Tabelle 3.6: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP10.tif analysiert mit optimierten Parametereinstellungen, Berechnete Anteile der verschiedenen Objekte als Prozentangabe

Der Vergleich der beiden Screenshots (s.Abb 3.22, S.52 und Abb.3.23, S.53) zeigt, dass die Version 0401 im Bild zehn Kerne mehr erkennt als die Version 0400. Der Mittelwert der Kernhelligkeit ändert sich um ca. 1,6 Einheiten. Das Histogramm zeigt nur geringe bis keine Abweichungen.

Insgesamt funktioniert die Erkennung mit optimierten Einstellungen mit Version 0401 besser als mit Version 0400. V0401 erkennt ca. 95% der relevanten Kerne, das sind 7% mehr als in V0400. Allerdings repräsentiert dieser Bildtyp nur einen Teil der in der Praxis zu erwartenden Bilder.

Schwierigkeiten bereitet noch die Erkennung der nicht-relevanten Kerne, bzw. deren Ausschluss aus der Analyse. V0401 erkennt ca. 21% weniger auszuschließende Kerne im Vergleich zu V0400. Dies legt die Integration einer manuellen Auswahlmaske, oder die automatische Erkennung für unrelevante Kerne nahe.

3.1 Software Versionen und Evaluation

2a) EXP5.tif: Heterogene Helligkeitsverteilung der Kerne, Bild analysiert mit Voreinstellungen

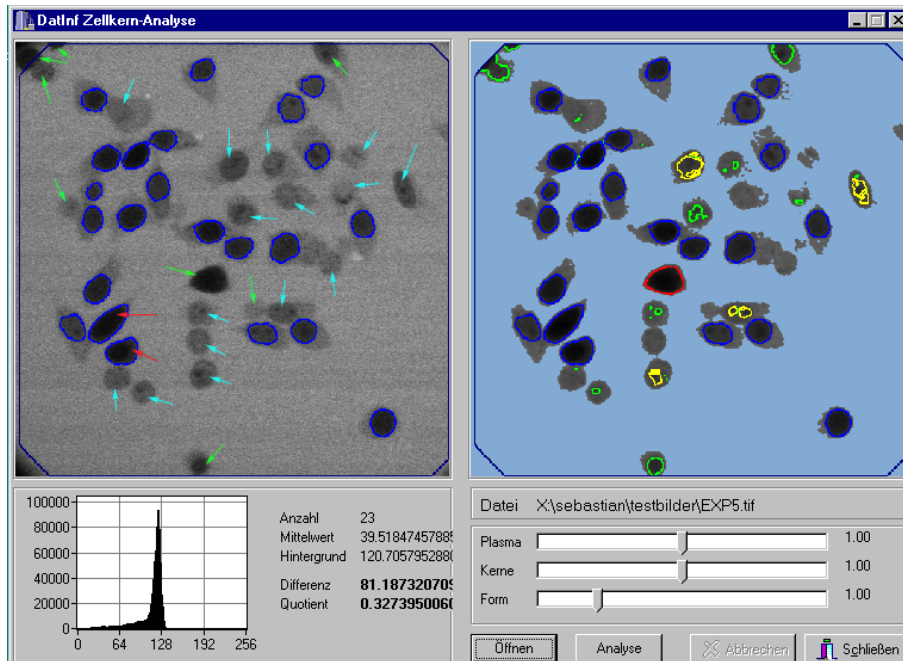


Abbildung 3.24: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP5.tif analysiert mit V0400 und Voreinstellungen P=1, K=1, F=1.

Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

3.1 Software Versionen und Evaluation

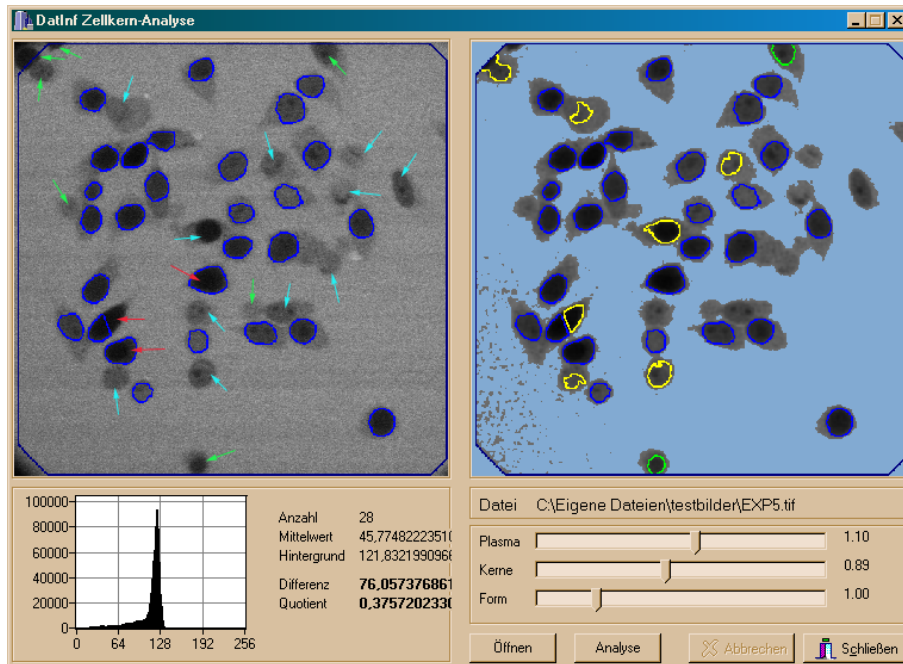


Abbildung 3.25: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP5.tif analysiert mit V0401 und Voreinstellungen P=1.1, K=0.89, F=1.

Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

Gezählte und klassifizierte Objekte:	
<i>EXP5.tif analysiert mit V0400 und Voreinstellungen (s. Abb. 3.24)</i>	
P:1, K:1, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	23
Sollkernanzahl ($(K_{soll})=(K_{ges}-K_3)+K_2$)	36
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	8
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus}=K_1+K_3$)	10
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	10
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	2
<i>EXP5.tif analysiert mit V0401 und Voreinstellungen (s. Abb. 3.25)</i>	
P:1.1, K:0.89, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	28
Sollkernanzahl ($(K_{soll})=(K_{ges}-K_3)+K_2$)	36
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	7
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus}=K_1+K_3$)	10
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	11
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	3

Tabelle 3.7: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP5.tif analysiert mit Voreinstellungen, Gezählte und klassifizierte Objekte

3.1 Software Versionen und Evaluation

Damit ergeben sich folgende Prozentsätze:

		<i>EXP5.tif analysiert mit V0400 und Voreinstellungen (s.Abb. 3.24)</i>
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 0.64$	Es wurden ca. 64% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.09$	ca. 9% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.55$	ca. 55% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.41$	ca. 41% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 0.8$	ca. 80% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen
		<i>EXP5.tif analysiert mit V0401 und Voreinstellungen (s.Abb. 3.25)</i>
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 0.78$	Es wurden ca. 78% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.11$	ca. 11% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.67$	ca. 67% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.3$	ca. 30% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 0.70$	ca. 70% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen

Tabelle 3.8: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP5.tif analysiert mit Voreinstellungen, Berechnete Anteile der verschiedenen Objekte als Prozentangabe

Der Vergleich der beiden Bilder zeigt, dass die Version 0401 im Bild fünf Kerne mehr als erkennt als die Version 0400. Der Mittelwert der Kernhelligkeit ändert sich um etwa 6,2 Einheiten. Das Histogramm zeigt nur geringe bis keine Abweichungen. Die Erkennung ist mit V0401 und Voreinstellungen für die Parameter erfolgreicher, als mit V0400. Es werden 12% mehr relevante Kerne erkannt. Es zeigt sich allerdings wieder die Problematik des Ausschlusses unrelevanter Kerne. Im Vergleich zu V0400 werden 10% weniger unrelevante Kerne ausgeschlossen.

3.1 Software Versionen und Evaluation

2b) EXP5.tif: Heterogene Helligkeitsverteilung der Kerne, Bild analysiert mit optimierten Parametereinstellungen

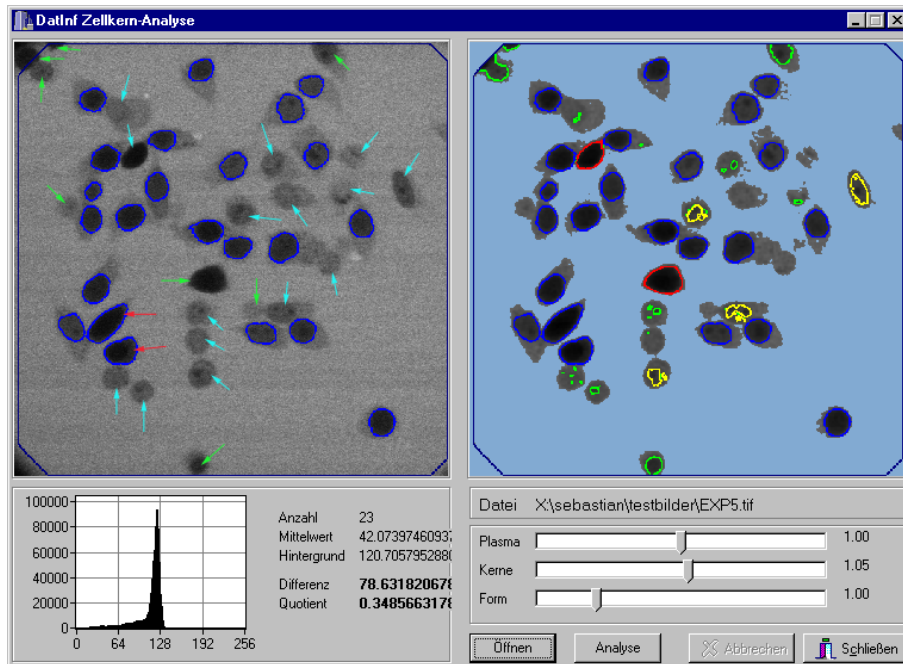


Abbildung 3.26: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP5.tif analysiert mit V0400 und optimierten Parametereinstellungen P=1, K=1.05, F=1. Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

3.1 Software Versionen und Evaluation

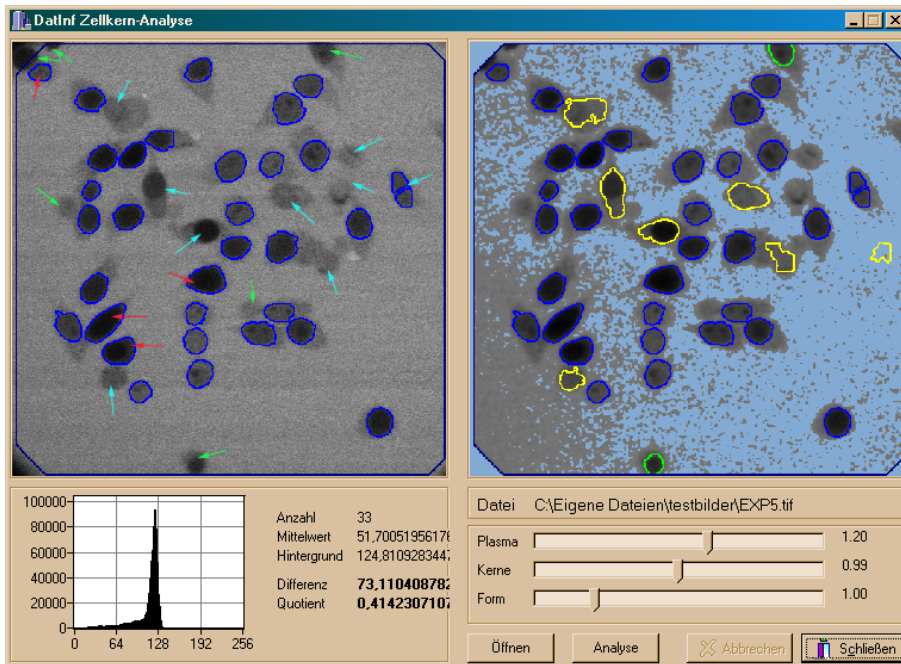


Abbildung 3.27: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP5.tif analysiert mit V0401 und optimierten Parametereinstellungen $P=1.20$, $K=0.99$, $F=1$. Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

Gezählte und klassifizierte Objekte:	
<i>EXP5.tif analysiert mit V0400 und optimierten Parametereinstellungen (s. Abb. 3.26)</i>	
P:1, K:1.05, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	23
Sollkernanzahl ($(K_{soll})=(K_{ges}-K_3)+K_2$)	36
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	8
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus}=K_1+K_3$)	10
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	15
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	2
<i>EXP5.tif analysiert mit V0401 und optimierten Parametereinstellungen (s. Abb. 3.27)</i>	
P:1.20, K:0.99, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	31
Sollkernanzahl ($(K_{soll})=(K_{ges}-K_3)+K_2$)	36
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	6
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus}=K_1+K_3$)	10
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	9
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	4

Tabelle 3.9: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP5.tif analysiert mit optimierten Parametereinstellungen, Gezählte und klassifizierte Objekte

3.1 Software Versionen und Evaluation

Damit ergeben sich folgende Prozentsätze:

		<i>EXP5.tif analysiert mit V0400 und optimierten (Parametereinstellungen s.Abb. 3.26)</i>
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 0.64$	Es wurden ca. 64% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.09$	ca. 9% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.55$	ca. 55% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.41$	ca. 41% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 0.8$	ca. 80% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen
		<i>EXP5.tif analysiert mit V0401 und optimierten Parametereinstellungen (s.Abb. 3.27)</i>
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 0.86$	Es wurden ca. 86% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.13$	ca. 13% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.73$	ca. 73% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.25$	ca. 25% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 0.60$	ca. 60% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen

Tabelle 3.10: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP5.tif analysiert mit optimierten Parametereinstellungen, Berechnete Anteile der verschiedenen Objekte als Prozentangabe

Der Vergleich der beiden Bilder zeigt, dass die Version 0401 im Bild acht Kerne mehr erkennt als die Version 0400. Der Mittelwert der Kernhelligkeit ändert sich um ca. zehn Einheiten. Das Histogramm zeigt nur geringe bis keine Abweichungen.

Anmerkung: Ein Kern wurde als zwei Kerne erkannt (rechte obere Ecke). Dieser Kern wurde als relevant, aber nicht erkannt gewertet (d.h. hellblauer Pfeil). Die Gesamtzahl der erkannten Kerne wurde entsprechend korrigiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit den korrigierten Werten.

Die Analyse spiegelt die tendenzielle Erkennungscharakteristik wider, die auch schon bei den Analysen mit Voreinstellungen erkennbar wird. Die Erkennung ist hier mit V0401 besser als mit V0400. Es werden etwa 18% mehr relevante Kerne erkannt. Allerdings bleibt nach wie vor ein Viertel der relevanten Kerne unerkannt. Dies ist insofern von Bedeutung, als da der hier getestete Bildtyp einen grossen Teil der in der Praxis auftretenden Bilder repräsentiert. Der Anteil der auszuschließenden Kerne verschlechtert sich drastisch, hier um 20% im Vergleich zur Vorgängerversion.

3.1 Software Versionen und Evaluation

3a) EXP14.tif: Extrem heterogene Helligkeitsverteilung der Kerne, Bild analysiert mit Voreinstellungen

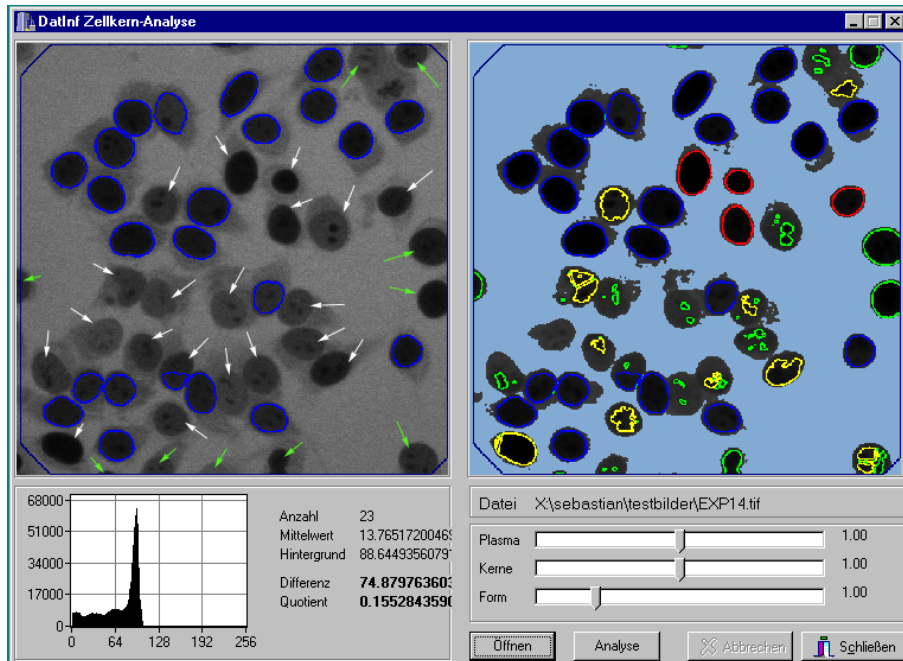


Abbildung 3.28: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP14.tif analysiert mit V0400 und Voreinstellungen P=1, K=1, F=1.

Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

3.1 Software Versionen und Evaluation

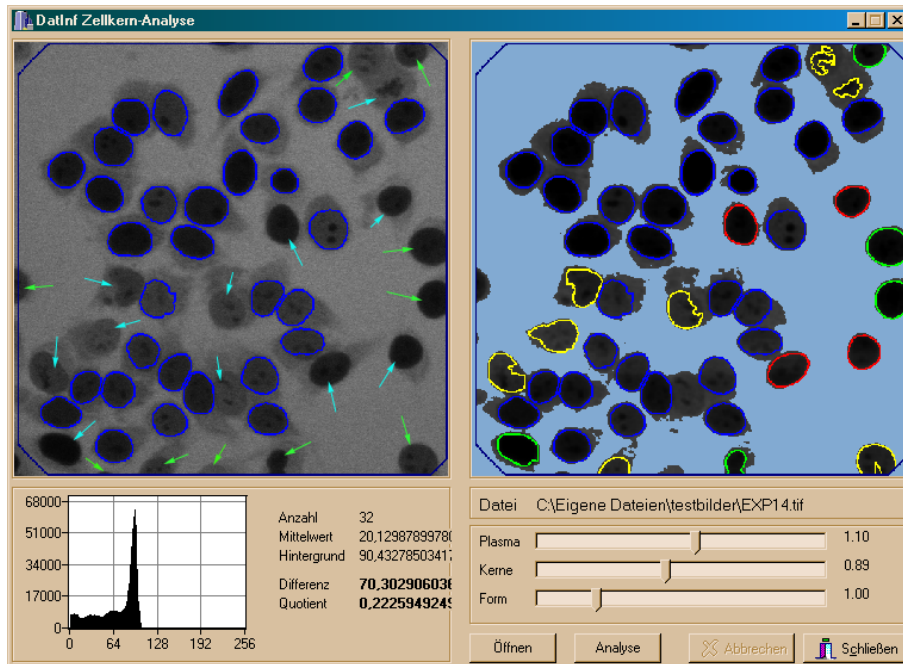


Abbildung 3.29: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP14.tif analysiert mit V0401 und Voreinstellungen P=1.1, K=0.89, F=1.

Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

Gezählte und klassifizierte Objekte:	
<i>EXP14.tif analysiert mit V0400 und Voreinstellungen (s. Abb. 3.28)</i>	
P:1, K:1, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	23
Sollkernanzahl ($(K_{soll})=(K_{ges}-K_3)+K_2$)	43
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	10
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus}=K_1+K_3$)	10
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	20
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	0
<i>EXP14.tif analysiert mit V0401 und Voreinstellungen (s. Abb. 3.29)</i>	
P:1.1, K:0.89, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	32
Sollkernanzahl ($(K_{soll})=(K_{ges}-K_3)+K_2$)	43
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	10
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus}=K_1+K_3$)	10
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	11
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	0

Tabelle 3.11: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP14.tif analysiert mit Voreinstellungen, Gezählte und klassifizierte Objekte

3.1 Software Versionen und Evaluation

Damit ergeben sich folgende Prozentsätze:

		<i>EXP14.tif analysiert mit V0400 und Voreinstellungen (s.Abb. 3.28)</i>
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 0.53$	Es wurden ca. 53% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.00$	ca. 0% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.53$	ca. 53% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.41$	ca. 41% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 1.0$	ca. 100% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen
		<i>EXP14.tif analysiert mit V0401 und Voreinstellungen (s.Abb. 3.29)</i>
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 0.74$	Es wurden ca. 74% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.00$	ca. 0% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.74$	ca. 74% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.26$	ca. 26% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 1.00$	ca. 100% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen

Tabelle 3.12: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP14.tif analysiert mit Voreinstellungen, Berechnete Anteile der verschiedenen Objekte als Prozentangabe

V0400 erkennt insgesamt 23 Kerne, V0401 insgesamt 32 Kerne. Der Graustufenmittelwert ändert sich um ca. 6,4 Einheiten nach oben. Die V0401 zeigt mit default Einstellungen hier eine erheblich bessere Erkennungscharakteristik. Es werden 21% der relevanten Kerne mehr erkannt als dies in V0400 der Fall ist. Es werden ebenso wie in V0400 alle auszuschließenden Kerne ausgeschlossen. Allerdings enthält das verwendete Bild keine nicht-permeabilisierten Zellen. Die vorhandenen auszuschließenden Kerne liegen ausnahmslos am Rand.

3.1 Software Versionen und Evaluation

3b) EXP14.tif: Extrem heterogene Helligkeitsverteilung der Kerne, Bild analysiert mit optimierten Parametereinstellungen

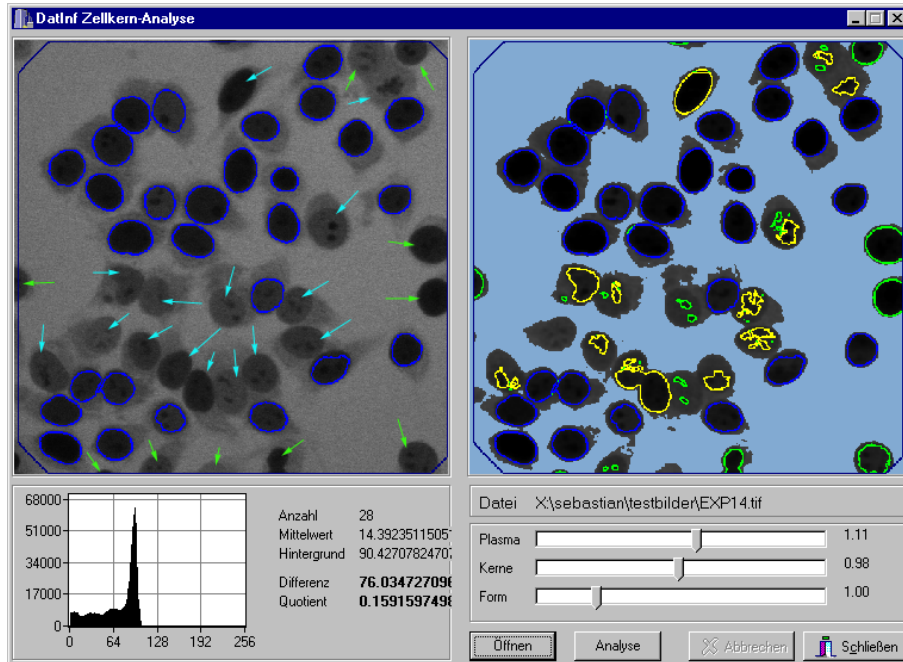


Abbildung 3.30: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP14.tif analysiert mit V0400 und optimierten Parametereinstellungen $P=1$, $K=0.89$, $F=1$. Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

3.1 Software Versionen und Evaluation

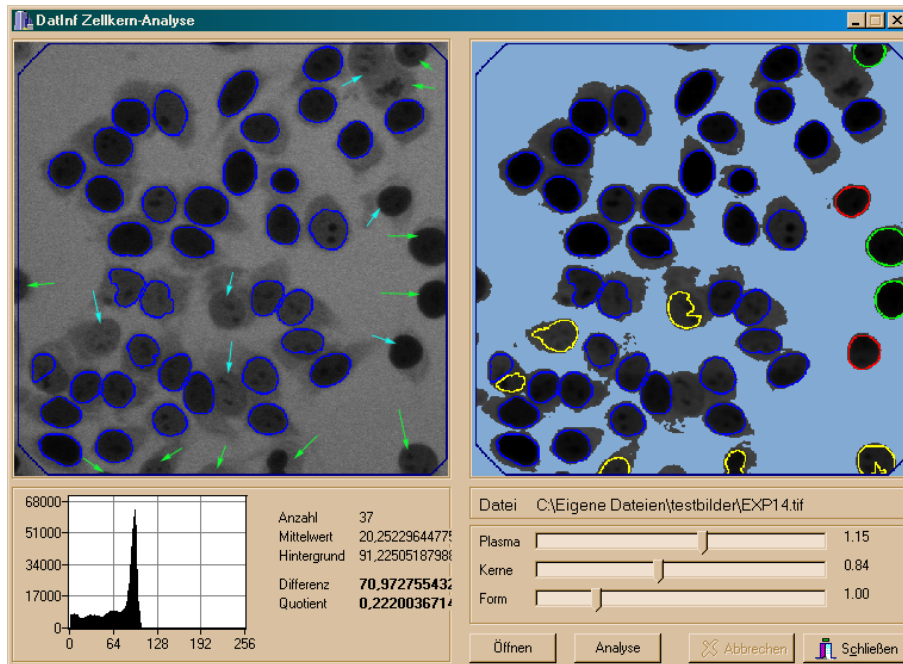


Abbildung 3.31: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: Bild EXP14.tif analysiert mit V0401 und optimierten Parametereinstellungen $P=1.15$, $K=0.84$, $F=1$. Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

Gezählte und klassifizierte Objekte:	
<i>EXP14.tif analysiert mit V0400 und optimierten Parametereinstellungen (s.Abb. 3.30)</i>	
P:1.1, K:0.89, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	28
Sollkernanzahl ($(K_{soll})=(K_{ges}-K_3)+K_2$)	43
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	10
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus}=K_1+K_3$)	10
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	15
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	0
<i>EXP14.tif analysiert mit V0401 und optimierten Parametereinstellungen (s.Abb. 3.31)</i>	
P:1.15, K:0.84, F:1	
Gesamt erkannte Kerne (K_{ges})	37
Sollkernanzahl ($(K_{soll})=(K_{ges}-K_3)+K_2$)	43
Korrekt ausgesch. Kerne (K_1)	10
Ausschluss-Sollanzahl ($K_{sollaus}=K_1+K_3$)	10
Relevante, nicht erk. Kerne (K_2)	5
Unrelevante, erk. Kerne (K_3)	0

Tabelle 3.13: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP14.tif analysiert mit optimierten Parametereinstellungen, Gezählte und klassifizierte Objekte

3.1 Software Versionen und Evaluation

Damit ergeben sich folgende Prozentsätze:

		<i>EXP14.tif analysiert mit V0400 und optimierten (Parametereinstellungen s.Abb. 3.30)</i>
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 0.65$	Es wurden ca. 65% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.00$	ca. 0% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.65$	ca. 65% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.35$	ca. 35% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 1.0$	ca. 100% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen
		<i>EXP14.tif analysiert mit V0401 und optimierten Parametereinstellungen (s.Abb. 3.31)</i>
1)	$K_{ges}/K_{soll} = 0.86$	Es wurden ca. 86% der Sollkernanzahl erkannt
2)	$K_3/K_{ges} = 0.00$	ca. 0% der erkannten Kerne sind unrelevant
3)	$1)-2) = 0.86$	ca. 86% der relevanten Kerne wurden erkannt
4)	$K_2/K_{soll} = 0.12$	ca. 12% der relevanten Kerne wurden nicht erkannt
5)	$K_1/K_{sollaus} = 1.0$	ca. 100% der auszuschließenden Kerne wurden ausgeschlossen

Tabelle 3.14: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0400 und 0401: EXP14.tif analysiert mit optimierten Parametereinstellungen, Berechnete Anteile der verschiedenen Objekte als Prozentangabe

V0400 erkennt insgesamt 28 Kerne, V0401 insgesamt 37 Kerne. Der Graustufenmittelwert ändert sich um ca. 5,7 Einheiten nach oben. Die V0401 zeigt mit optimierten Einstellungen ein erheblich bessere Erkennungscharakteristik. Es werden 21% der relevanten Kerne mehr erkannt als dies mit optimierten Einstellungen in V0400 der Fall ist. Es werden ebenso wie in V0400 alle auszuschließenden Kerne ausgeschlossen. Allerdings enthält das verwendete Bild keine nicht-permeabilisierte Zellen. Die vorhandenen auszuschließenden Kerne liegen ausnahmslos am Rand.

3.1 Software Versionen und Evaluation

Zusammenfassung des Vergleichs der Mustererkennung V0400 und V0401

Die vergleichende Analyse der oben genannten Bilder mit den Versionen 0400 und 0401 ergab:

- Die Version 0401 zeigt insgesamt eine bessere Erkennungscharakteristik in Bezug auf die relevanten Kerne. Dies gilt insbesondere für den Vergleich mit optimierten Einstellungen
- Verbesserungen sind noch im Bereich des Ausschlusses von irrelevanten Objekten nötig. Hier zeigt die V0401 eine eher schlechtere Charakteristik als die Vorgängerversion
- Gegebenenfalls ist die Implementierung einer Auswahlmöglichkeit für die erkannten Objekte nötig, um den Status der einzelnen Objekte manuell festlegen zu können

3.1 Software Versionen und Evaluation

3.1.5 Test der Version 0402

Layout der Version 0402

Das generelle Layout der Version 0402 hat sich im Vergleich zur Vorgängerversion nicht geändert. Da sich jedoch bei den vorhergehenden Tests herausgestellt hatte, dass eine vollautomatische Mustererkennung nicht realisierbar scheint, wurde der Version eine Auswahlmaske implementiert, die es dem Experimentator ermöglicht, den Status einzelner Objekte manuell festzulegen (s.Abb.3.32, S.68). Die Maske erlaubt den Einschluß, den Ausschluß oder die Wiederherstellung des Status für alle von der Software erkannten Objekte.

Den Objekten wird je nach Status ein anderer Farbcode zugeordnet :

- Objekte, die durch manuelle Auswahl in die Analyse miteinbezogen wurden, werden durch einen gestrichelten blauen Rand markiert (s.Abb.3.33, S.68)
- Objekte, die durch manuelle Auswahl von der Analyse ausgeschlossen wurden erhalten einen weiß gestrichelten Rand (s.Abb.3.34, S.68)

Nach dem Setzen der Stati für die einzelnen Objekte werden die Analysewerte direkt neu berechnet und angezeigt. Die Version 0402 weist außerdem einige weitere Korrekturen im Vergleich zu den Vorgängerversionen auf:

- Am Histogramm sind jetzt Einheiten angezeigt
- Die Anzeige der Analysewerte ist auf maximal 3 Nachkommastellen begrenzt
- Für die Einstellung der Mustererkennungs-Parameter sind Eingabefelder vorhanden



Abbildung 3.32: Auswahlmaske zur Festlegung des Objektstatus der Programmversion Zellkerne.exe 0402

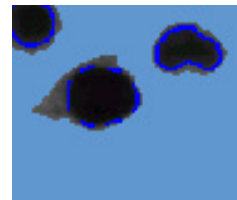


Abbildung 3.33: Auswahlmaske V0402: Blau gestrichelt markierter Kern nach manuellem Einschluß

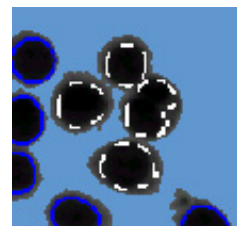


Abbildung 3.34: Auswahlmaske V0402: Weiß gestrichelt markierter Kern nach manuellem Ausschluß

3.1 Software Versionen und Evaluation

- Die Software erfordert für die Darstellung nur noch 16 bit Farbtiefe

Testdesign für die Version 0402

Vergleich der Erkennungscharakteristik der Versionen 0401 und 0402 *ohne* Verwendung der Auswahlmaske

Um zu überprüfen, ob sich die Erkennungscharakteristik der neuen Softwareversion von der der Vorgängerversion 0401 unterscheidet, wurde wiederum ein Vergleich der beiden Versionen angestellt. Dabei wurde das Testdesign für den Vergleich der Versionen 0400 und 0401 übernommen (s.Abschnitt 3.1.4, S.47). Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurde bei diesem Test die neu implementierte Auswahlmaske *nicht* verwendet, da dieses Feature in der Version 0401 nicht verfügbar war. Als Testbilder wurden die bereits zuvor verwendeten Bilder EXP10.tif, EXP5.tif und EXP14.tif gewählt.

Ergebnisse des Vergleichs der Mustererkennungscharakteristik der Versionen 0401 und 0402 *ohne* Verwendung der Auswahlmaske

1a) EXP10.tif: Homogene Kernhelligkeit, Bild analysiert mit Parametervoreinstellungen

Die Version 0402 weist im Vergleich zur Vorgängerversion 0401 mit Voreinstellungen keine Unterschiede bei der Erkennungscharakteristik der Kerne auf. Die ermittelten Analysewerte stimmen genau überein. Auch die erkannten Objekte sind identisch (s.Abb. 3.35, S.70 und Abb. 3.36, S.70).

Rücksprache mit den Entwicklern der Firma DatInf ergab, dass sich der Erkennungsalgorithmus der beiden Versionen nicht unterscheidet. Daher wurde auf weitere Bildanalysen verzichtet.

Die Tests zur Mustererkennung wurden an dieser Stelle abgeschlossen. Eine vollautomatische Erkennung der Objekte ließ sich unter den gegebenen Voraussetzungen nicht realisieren. Um dennoch eine ausreichend gute Analyse zu gewährleisten, wurde der Version 0402 eine manuelle Auswahlmaske implementiert (s.Abschnitt 3.1.5, S.68).

3.1 Software Versionen und Evaluation

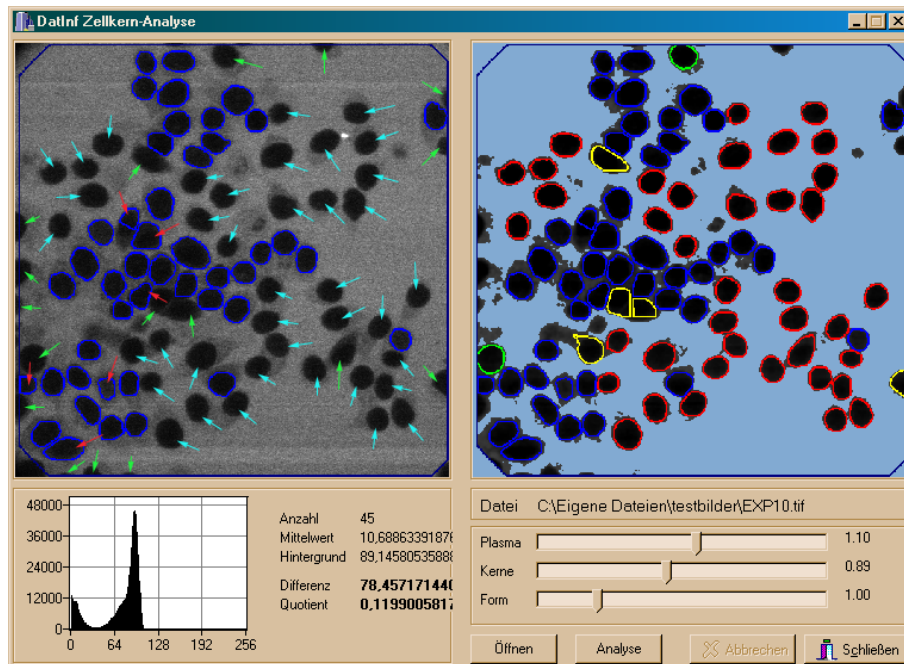


Abbildung 3.35: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0401 und 0402: Bild EXP10.tif analysiert mit V0401 und Voreinstellungen P=1, K=1, F=1. Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

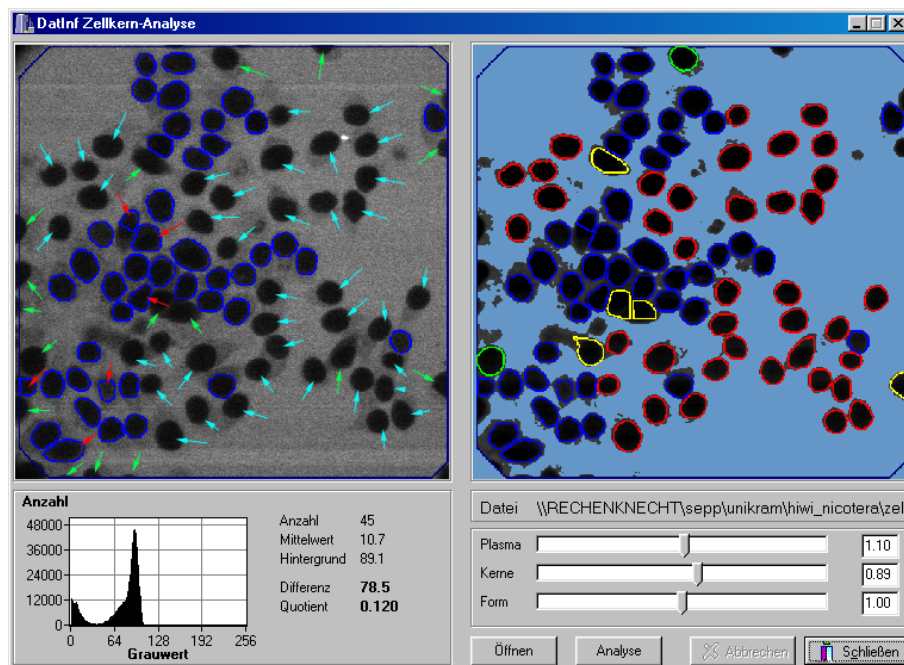


Abbildung 3.36: Ergebnisse des Vergleichstest der Versionen 0401 und 0402: Bild EXP10.tif analysiert mit V0402 und Voreinstellungen P=1.10, K=0.98, F=1. Legende für markierte Objekte siehe Abschnitt 3.1.4, S.47

3.1 Software Versionen und Evaluation

Test der Version 0402 *mit* Anwendung der Maske

Einfluss der Parametereinstellungen auf die Analysedaten. Das Problem der eigentlichen Objekterkennung sollte durch die neu implementierte Auswahlmaske zumindest im Ansatz gelöst sein, auch wenn eine weitere Verbesserung der automatischen Erkennung wünschenswert ist.

Da durch den manuellen Eingriff mit Hilfe der Maske davon ausgegangen werden kann, dass alle relevanten Kerne in die Analyse mit eingehen, sowie alle nicht-relevanten ausgeschlossen werden, macht ein Test auf der Basis der Anteile der relevanten bzw. nicht-relevanten Kerne keinen Sinn.

Das Testdesign für die Version 0402 konzentriert sich daher auf die Ergebnisse der Analyse, speziell Mittelwert der Graustufenwerte der analysierten Kerne, korrigierter Graustufenmittelwert der Kerne, sowie Graustufenwert des Hintergrundes in Abhängigkeit von den Werten der Parameter „Kerne“, „Plasma“ und „Form“. Mit der Änderung dieser Parameter ändern sich die Grenzwerte für die Abgrenzung von Kernen und Plasma, und damit auch die jeweiligen „Kernflächen“, welche für die Berechnung der Analysewerte verwendet werden.

Ziel des Tests war es, herauszufinden, ob die durch den Benutzer modifizierte Parametereinstellungen der Schwellenwerte für Plasma, Kerne und Form einen signifikanten Einfluss auf die Analysedaten haben. Sollte dies der Fall sein, so hätte der Experimentator die Möglichkeit gezielt die Daten zu manipulieren. Damit wäre die Objektivität des Messsystems nicht mehr gewährleistet.

Für diesen Testzweck wurden nicht mehr die in den vorhergehenden Tests verwendeten Bilder analysiert. Es wurden zunächst 30 Bilder des Typs „Kontrolle“ ausgewählt. Eine tabellarische Zusammenstellung der Bilder findet sich im Abschnitt 5.1 auf Seite 111. Die Bilder selbst sind auf der beiliegenden CD-ROM enthalten. Ein Beispiel für den Bildtypen „Kontrolle“ finden sich in Abbildung 3.43 auf Seite 87. Es wurde wie folgt getestet:

Jedes der ausgewählten Bilder wurde mit zwei verschiedenen Parametereinstellungen analysiert. Die manuelle Auswahlmaske wurde in allen Fällen ver-

3.1 Software Versionen und Evaluation

wendet. Es wurde darauf geachtet, dass bei den Analysen mit beiden Parametereinstellungen die gleich Anzahl an Kernen in die Analyse eingingen. Von den analysierten Bildern wurden die ermittelten Werte und Parametereinstellungen tabellarisch dokumentiert.

Als Parametereinstellungen wurden gewählt :

1. Voreinstellung
2. optimierte Einstellungen

Beim Testen wurde jeweils die folgende Reihenfolge eingehalten :

1. Analyse des Bildes mit den jeweiligen Parametereinstellungen
2. manuelle Kernausswahl mit der Maske
3. Dokumentation der Werte / Screenshot

Der Begriff der optimierten Einstellungen ist problematisch. Von meiner Seite her wurden bei der Optimierung folgende Kriterien angelegt :

- Die Einstellungen wurden so gewählt, da möglichst alle Kerne, relevante und unrelevante erkannt wurden
- Die Umrandung sollte nur den Kern umfassen
- falsch erkannte Kerne wurden anschließend mit der Maske ausgeschlossen, bzw. nicht richtig erkannte eingeschlossen

Die gewählten Bilder stammen aus zwei unterschiedlichen Experimenten, gehören jedoch zum Typ „Kontrolle“ und sollten damit gleiche Charakteristika aufweisen. Eine Behandlung dieser Bilder als Cluster sollte somit zulässig sein. Die relevante Analysedaten „Differenz“ und „Quozient“ wurden mit Hilfe eines gepaarten T-Tests (s.Abschnitt 2.2.3, S.23) auf signifikante Abweichungen untersucht.

3.1 Software Versionen und Evaluation

Ergebnisse der Tests des Einflusses der Parametereinstellungen auf die Analysedaten

Die Tabellen 3.15 bis 3.17 zeigen die Analysedaten des Tests der Version 0402 unter Verwendung der Auswahlmaske, welcher auf Seite 71 beschrieben ist.

Bild	Parameter	P	K	F	Anzahl	\bar{x}	BG	BG- \bar{x}	$\frac{\bar{x}}{BG}$
(ti300500*)									
co30410.tif	default	1.10	0.89	1.00	43	19.2	85.4	66.2	0.224
	optimiert	1.10	0.80	1.15	43	16.7	85.4	68.7	0.196
co30411.tif	default	1.10	0.89	1.00	46	28.0	126.2	98.2	0.222
	optimiert	1.10	0.65	1.20	46	22.5	126.2	103.7	0.178
co30412.tif	default	1.10	0.89	1.00	48	28.0	131.6	103.5	0.213
	optimiert	1.15	0.89	1.20	48	28.0	132.0	103.9	0.212
co30413.tif	default	1.10	0.89	1.00	42	26.9	119.8	93.0	0.224
	optimiert	1.10	0.80	1.30	42	24.0	119.9	95.9	0.200
co30414.tif	default	1.10	0.89	1.00	44	26.1	109.3	83.1	0.239
	optimiert	1.10	0.89	1.00	44	26.1	109.3	83.1	0.239
co30415.tif	default	1.10	0.89	1.00	51	24.5	121.5	97.0	0.202
	optimiert	1.20	0.80	1.20	51	22.7	122.4	99.7	0.185
co30416.tif	default	1.10	0.89	1.00	60	28.3	131.0	102.7	0.216
	optimiert	1.20	0.85	1.10	60	27.4	132.0	104.6	0.207
co30417.tif	default	1.10	0.89	1.00	52	29.8	135.1	105.2	0.221
	optimiert	1.20	0.75	0.95	52	26.5	136.1	109.6	0.195
co30418.tif	default	1.10	0.89	1.00	55	33.0	137.2	104.3	0.240
	optimiert	1.15	0.75	1.00	55	29.6	137.7	108.1	0.215

Tabelle 3.15: Einfluss der Parametereinstellungen auf die Analysewerte (V0402):Ergebnisse der Analysen von Bildern der Serie tight300500 jeweils mit Voreinstellungen und optimierten Einstellungen, I

3.1 Software Versionen und Evaluation

Bild	Parameter	P	K	F	Anzahl	\bar{x}	BG	BG- \bar{x}	$\frac{\bar{x}}{BG}$
(ti300500*)									
co110.tif	default	1.10	0.89	1.00	35	19.2	90.7	71.5	0.212
	optimiert	1.15	0.85	1.15	35	18.5	91.1	72.6	0.203
co111.tif	default	1.10	0.89	1.00	37	20.6	89.8	69.2	0.230
	optimiert	1.15	0.75	1.10	37	18.2	90.2	72.0	0.201
co112.tif	default	1.10	0.89	1.00	33	19.2	89.8	70.6	0.214
	optimiert	1.15	0.70	1.20	33	16.3	90.2	73.9	0.181
co113.tif	default	1.10	0.89	1.00	36	33.2	90.3	57.1	0.368
	optimiert	1.10	0.80	1.30	36	31.2	90.3	59.0	0.346
co114.tif	default	1.10	0.89	1.00	35	19.8	87.7	67.9	0.226
	optimiert	1.15	0.85	1.20	35	18.9	88.1	69.1	0.215
co115.tif	default	1.10	0.89	1.00	41	20.2	90.8	70.6	0.223
	optimiert	1.15	0.85	1.05	41	19.4	90.8	71.4	0.214
co116.tif	default	1.10	0.89	1.00	34	20.9	87.9	67.0	0.238
	optimiert	1.10	0.80	1.20	34	19.4	87.9	68.5	0.221
co210.tif	default	1.10	0.89	1.00	32	17.1	88.9	71.8	0.193
	optimiert	1.10	0.80	1.15	32	15.6	88.9	73.3	0.176
co211.tif	default	1.10	0.89	1.00	29	14.6	84.1	69.5	0.174
	optimiert	1.10	0.89	1.10	29	14.6	84.1	69.5	0.174
co212.tif	default	1.10	0.89	1.00	46	15.7	81.7	66.0	0.192
	optimiert	1.10	0.80	1.10	46	14.4	81.7	67.3	0.176
co213.tif	default	1.10	0.89	1.00	42	15.0	81.8	66.8	0.184
	optimiert	1.15	0.80	1.05	42	13.9	82.1	68.3	0.169

Tabelle 3.16: Einfluss der Parametereinstellungen auf die Analysewerte (V0402):Ergebnisse der Analysen von Bildern der Serie tight300500 jeweils mit Voreinstellungen und optimierten Einstellungen, II

3.1 Software Versionen und Evaluation

Bild	Parameter	P	K	F	Anzahl	\bar{x}	BG	BG- \bar{x}	$\frac{\bar{x}}{BG}$
(ti25500*)									
co110.tif	default	1.10	0.89	1.00	29	12.8	54.3	41.5	0.236
	optimiert	1.10	0.75	1.00	29	11.3	54.3	43.0	0.209
co111.tif	default	1.10	0.89	1.00	49	12.3	53.8	41.5	0.228
	optimiert	1.15	0.75	1.10	49	10.8	54.3	43.5	0.199
co112.tif	default	1.10	0.89	1.00	32	13.1	54.9	41.8	0.239
	optimiert	1.10	0.75	1.15	32	11.7	54.9	43.1	0.214
co113.tif	default	1.10	0.89	1.00	30	13.2	55.2	42.0	0.239
	optimiert	1.10	0.85	1.25	30	12.6	55.2	42.5	0.229
co114.tif	default	1.10	0.89	1.00	33	14.1	56.8	42.8	0.247
	optimiert	1.15	0.89	1.04	33	14.1	57.7	43.7	0.243
co115.tif	default	1.10	0.89	1.00	45	13.5	55.9	42.4	0.241
	optimiert	1.10	0.80	1.15	45	12.6	55.9	43.3	0.226
co116.tif	default	1.10	0.89	1.00	34	12.4	56.9	44.5	0.218
	optimiert	1.10	0.85	1.10	34	12.0	56.9	44.9	0.211
co117.tif	default	1.10	0.89	1.00	38	13.6	57.0	43.4	0.239
	optimiert	1.15	0.87	1.15	38	13.4	57.9	44.5	0.231
co210.tif	default	1.10	0.89	1.00	38	8.2	47.0	38.9	0.174
	optimiert	1.10	0.85	1.15	38	7.7	47.0	39.3	0.163
co211.tif	default	1.10	0.89	1.00	30	9.8	52.2	42.4	0.188
	optimiert	1.15	0.89	1.10	30	9.8	52.9	43.1	0.186

Tabelle 3.17: Einfluss der Parametereinstellungen auf die Analysewerte (V0402):Ergebnisse der Analysen von Bildern der Serie tight25500 jeweils mit Voreinstellungen und optimierten Einstellungen III

3.1 Software Versionen und Evaluation

T-Test der Analysedaten „Differenz“ und „Quozient“

Die relevanten Analysedaten „Differenz“ und „Quozient“ aus obigen Tabellen wurden mit einem zweiseitigen gepaarten T-Test auf signifikante Abweichungen untersucht. Tabelle 3.18 auf Seite 77 zeigt die Ergebnisse des Tests.

Eine graphische Darstellung der Mittelwerte aller analysierten Bilder für die beiden relevanten Parameter „Differenz“ und „Quozient“ findet sich in den Abbildungen 3.37 und 3.38.

Mit

$$t_{emp} \leq t_{tab} \Rightarrow H_0(\delta = 0), H_0(\mu_x = \mu_y)$$

$$t_{emp} > t_{tab} \Rightarrow H_A(\delta \neq 0), H_A(\mu_x \neq \mu_y)$$

und

$$P \geq \alpha \Rightarrow H_0$$

$$P < \alpha \Rightarrow H_A$$

sowie den Daten aus der Tabelle 3.18 auf Seite 77 wird die Nullhypothese H_0 mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% abgelehnt. Entsprechend wird die Alternativhypothese H_A angenommen. Die Mittelwerte \bar{x} und \bar{y} der verbundenen Stichproben X und Y sind signifikant voneinander verschieden. Dies bedeutet, dass die ermittelten Daten mit Voreinstellungen signifikant

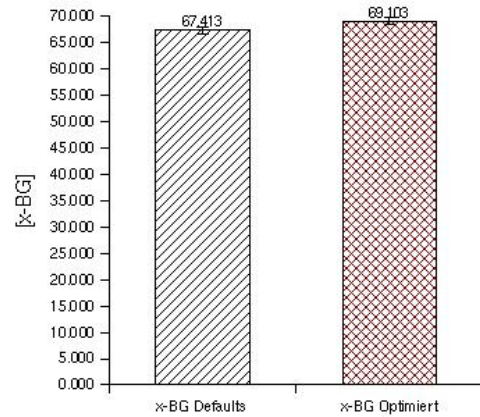


Abbildung 3.37: Einfluss der Parametereinstellungen auf die Analysedaten: Differenz x-BG mit Voreinstellungen und optimierten Einstellungen

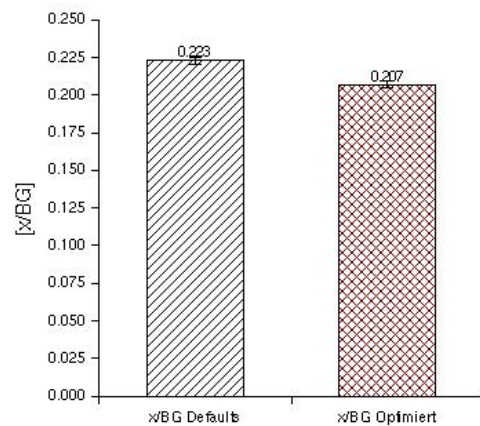


Abbildung 3.38: Einfluss der Parametereinstellungen auf die Analysedaten: Quozient x/BG mit Voreinstellungen und optimierten Einstellungen

3.1 Software Versionen und Evaluation

	<i>T-Test</i> $BG - \bar{x}$	<i>T-Test</i> $\frac{\bar{x}}{BG}$
α	0.01	0.01
n	30	30
DF	29	29
t_{emp}	7.050	8.150
t_{tab}	2.756	2.756
P	9.36E-08	5.50E-09
c.i.	6.023	0.009

Tabelle 3.18: Ergebnisse des gepaarten zweiseitigen T-Tests mit den Analysedaten der Kontrollbilder der Version 0402 unter Verwendung der Auswahlmaske

	<i>Alte Werte</i>	<i>Neue Werte</i>
Plasma	1.10	1.13
Kerne	0.90	0.80
Form	1.0	1.15

Tabelle 3.19: Neue Parametervoreinstellungen der Version 0402

von denen mit optimierten Einstellungen abweichen. In der endgültigen Version sollten daher die Möglichkeiten eines Benutzereingriffs an dieser Stelle möglichst gering gehalten werden. Dazu ist es notwendig für die bisher modifizierbaren Parameter für die Schwellen von Kernen, Plasma sowie Formfaktor Einstellungen zu finden, die für möglichst alle vorkommenden Bildtypen zufriedenstellende Ergebnisse liefern. Ob die Heterogenität der verschiedenen Bildtypen dies zulässt bleibt zu prüfen und ist Gegenstand von weiteren Tests.

T-Test der Werte der Voreinstellungen gegen optimierte Parametereinstellungen

Eine statistische Analyse der voreingestellten Parameterwerte gegen die optimierten Werte aus den Tabellen 3.15 bis 3.17 ergab, dass auch diese signifikant voneinander abweichen (Daten nicht gezeigt). Damit scheinen die Voreinstellungen, welche in der Konfigurationsdatei eingetragen waren nicht optimal zu sein. Aus den Werten für die entsprechenden Parameter wurden neue gemittelte Voreinstellungen ermittelt (s. Tab.3.19, S.77) und in die Kon-

3.1 Software Versionen und Evaluation

figurationsdatei eingetragen. Die Eignung der Parameter für die Mustererkennung wurden in einem weiteren Testschritt ermittelt (Testdesign s.3.1.5, S.79)

3.1 Software Versionen und Evaluation

Test der neuen Parametereinstellungen. Die statistische Analyse der Parameter- Voreinstellungen und der optimierten Einstellungen, welche für den Test im Abschnitt 3.1.5 „Einfluss der Parametereinstellungen auf die Analysedaten“ auf Seite 71 verwendet wurden, hatte ergeben, dass zwischen diesen Werten eine signifikante Differenz besteht (s.3.1.5, S.73). Die neuen aus der Tabellen ermittelten Voreinstellungen wurden in einem weiteren Test auf ihre Eignung überprüft.

Zu diesem Zweck wurden zunächst die gleichen Bilder des Typs Kontrolle wie unter 3.1.5 „Einfluss der Parametereinstellungen auf die Analysedaten“ verwendet. Die Bilder wurden ohne manuelle Modifikation, aber unter Verwendung der Auswahlmaske mit den neuen Voreinstellungen analysiert und die Analysedaten dokumentiert. Es wurde dabei darauf geachtet, dass bei der Verwendung der Maske jeweils dieselben Kerne ein-, bzw. ausgeschlossen wurden, wie im Vorgängertest. Die erhaltenen Daten wurden gegen die Analysedaten des Tests „Einfluss der Parametereinstellungen auf die Analysedaten“ mit optimierten Parameter-Einstellungen mit Hilfe eines gepaarten T-Tests ausgewertet. Die Ergebnisse finden sich im Abschnitt 3.1.5 auf Seite 80.

Da es wünschenswert ist, für alle vorkommenden Bildtypen einheitliche Parametereinstellungen verwenden zu können (s.Abschnitt 3.1.5, S.76), wurden in einem zweiten Schritt die neuen Voreinstellungen mit Bildern des Typs „Apoptose“ geprüft. Eine tabellarische Zusammenstellung der Bilder findet sich im Abschnitt 5.1 auf Seite 111. Die Bilder selbst sind auf der beiliegenden CD-ROM enthalten. Die verwendeten Apoptosebilder stammen aus den Serien tight300500 und tight060600. Beispiele für die jeweiligen Bildtypen finden sich im Abschnitt 3.1.5 auf Seite 86. Die Bilder der jeweiligen Experimente wurden getrennt analysiert und getestet.

Die Bilder wurden, wie bereits zuvor beschrieben, erst mit den neuen Voreinstellungen und dann mit optimierten Einstellungen analysiert. Die Daten wurden dokumentiert und anschließend einem gepaarten T-Test unterworfen. Die Ergebnisse finden sich im Abschnitt 3.1.5 auf Seite 81.

3.1 Software Versionen und Evaluation

Ergebnisse des Tests der neuen Parametervoreinstellungen

*T-Test der Analysewerte mit **neuen** Parameter-Voreinstellungen gegen optimierte Parametereinstellungen mit Bildern des Typs **Kontrolle**.* Die Kontrollbilder wurden wie im Abschnitt 3.1.5 auf Seite 79 beschrieben getestet. Die Ergebnisse des gepaarten zweiseitigen T-Tests finden sich in der Tabelle 3.20.

	<i>T-Test</i> $BG - \bar{x}$	<i>T-Test</i> $\frac{\bar{x}}{BG}$
α	0.01	0.01
n	30	30
DF	29	29
t_{emp}	1.104	0.316
t_{tab}	2.756	2.756
P	0.279	0.754
c.i.	6.428	0.006

Tabelle 3.20: T-Test der Analysewerte mit neuen Parameter-Voreinstellungen gegen optimierte Parametereinstellungen mit Bildern des Typs Kontrolle (Serien tight300500 und 25500)

Mit

$$t_{emp} \leq t_{tab} \Rightarrow H_0(\delta = 0), H_0(\mu_x = \mu_y)$$
$$t_{emp} > t_{tab} \Rightarrow H_A(\delta \neq 0), H_A(\mu_x \neq \mu_y)$$

und

$$P \geq \alpha \Rightarrow H_0$$
$$P < \alpha \Rightarrow H_A$$

sowie den Daten aus der Tabelle 3.20 auf Seite 80 wird die Nullhypothese H_0 mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% angenommen. Entsprechend wird

3.1 Software Versionen und Evaluation

die Alternativhypothese H_A abgelehnt. Die Mittelwerte \bar{x} und \bar{y} der verbundenen Stichproben X und Y sind *nicht* signifikant voneinander verschieden. Damit können die neuen Voreinstellungen für die Parameter zumindest für den Bildtyp „Kontrolle“ übernommen werden.

*T-Test der Analysewerte mit **neuen** Parameter-Voreinstellungen gegen optimierte Parametereinstellungen mit Bildern des Typs **Apoptose**.* Die Apoptosebilder wurden wie im Abschnitt 3.1.5 auf Seite 79 beschrieben getestet. Die Ergebnisse der gepaarten zweiseitigen T-Tests der Analysedaten der zu den jeweiligen Experimenten gehörigen Bilder finden sich in den Tabellen 3.21 bis 3.24.

	<i>T-Test</i> $BG - \bar{x}$	<i>T-Test</i> $\frac{\bar{x}}{BG}$
α	0.01	0.01
n	11	11
DF	10	10
t_{emp}	0.350	0.814
t_{tab}	3.169	3.169
P	0.734	0.435
c.i.	1.337	0.000

Tabelle 3.21: T-Test der Analysewerte mit neuen Parameter-Voreinstellungen gegen optimierte Parametereinstellungen mit Bildern des Typs Apoptose, „Apoalt“ (Serie tight300500)

3.1 Software Versionen und Evaluation

	$T\text{-Test } BG - \bar{x}$	$T\text{-Test } \frac{\bar{x}}{BG}$
α	0.01	0.01
n	9	9
DF	8	8
t_{emp}	1.789	2.289
t_{tab}	3.355	3.355
P	0.111	0.051
c.i.	0.462	0.031

Tabelle 3.22: T-Test der Analysewerte mit neuen Parameter-Voreinstellungen gegen optimierte Parametereinstellungen mit Bildern des Typs Apoptose, „Ohnecyt“ (Serie tight300500)

	$T\text{-Test } BG - \bar{x}$	$T\text{-Test } \frac{\bar{x}}{BG}$
α	0.01	0.01
n	7	7
DF	6	6
t_{emp}	1.367	1.649
t_{tab}	3.707	3.707
P	0.221	0.150
c.i.	8.069	0.002

Tabelle 3.23: T-Test der Analysewerte mit neuen Parameter-Voreinstellungen gegen optimierte Parametereinstellungen mit Bildern des Typs Apoptose, „ApoaimpWGA“ (Serien tight060600)

3.1 Software Versionen und Evaluation

	<i>T-Test</i> $BG - \bar{x}$	<i>T-Test</i> $\frac{\bar{x}}{BG}$
α	0.01	0.01
n	8	8
DF	7	7
t_{emp}	2.235	2.264
t_{tab}	3.499	3.499
P	0.060	0.058
c.i.	3.676	0.030

Tabelle 3.24: T-Test der Analysewerte mit neuen Parameter-Voreinstellungen gegen optimierte Parametereinstellungen mit Bildern des Typs Apoptose, „ApoaimpzV“ (Serien tight060600)

Mit

$$t_{emp} \leq t_{tab} \Rightarrow H_0(\delta = 0), H_0(\mu_x = \mu_y)$$

$$t_{emp} > t_{tab} \Rightarrow H_A(\delta \neq 0), H_A(\mu_x \neq \mu_y)$$

und

$$P \geq \alpha \Rightarrow H_0$$

$$P < \alpha \Rightarrow H_A$$

sowie den Daten aus den Tabellen 3.21 bis 3.24 auf den Seiten 81 bis 83 wird die Nullhypothese H_0 mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% angenommen. Entsprechend wird die Alternativhypothese H_A abgelehnt. Die Mittelwerte \bar{x} und \bar{y} der verbundenen Stichproben X und Y sind *nicht* signifikant voneinander verschieden.

Damit können die neuen Voreinstellungen für die Erkennungsparameter auch für Bilder des Typs Apoptose verwendet werden. In Kombination mit der Auswahlmaske ist es also nun möglich, die auftretenden Bildtypen *ohne* Eingriff des Experimentators auf der Ebene der Erkennungsparameter zu analysieren. Ein manipulierender Effekt an dieser Stelle konnte damit eliminiert werden.

3.1 Software Versionen und Evaluation

Einfluss der manuellen Auswahl von Objekten auf die Analysedaten. Eine weitere Stelle, an der der Experimentator potenziell die Möglichkeit hätte, die vorhandene Analysedaten zu manipulieren, ist die manuelle Auswahl von Objekten mit Hilfe der Maske. Die Wahl der ein-, bzw. auszuschließenden Objekte ist stark von der subjektiven Einschätzung und der Zielsetzung des jeweiligen Benutzers des Programms abhängig.

Um sicherzustellen, dass sich die Analysedaten resistent gegen diese benutzerabhängige Objektauswahl verhalten, wurden drei Testpersonen *ohne* biologische Vorbildung herangezogen. Die Testpersonen erhielten die absolut notwendigen Informationen um mit dem Programm arbeiten zu können. Hierzu zählten die grundlegenden Bedienelemente, sowie eine kurze Information bezüglich der auf den Bildern vorhandenen Objekte. Die eigentliche Zielsetzung der Software-Entwicklung wurde jedoch nicht bekanntgegeben. Es wurde ein Set von 30 verschiedenen Bildern zur Analyse vorgegeben. Die Testpersonen sollten mit ihrem rudimentären Wissen über die Bilder eine subjektive Wahl an ein-, bzw. auszuschließenden Objekten treffen. Eine Manipulation der Parameter fand nicht statt. Die Analysedaten wurden dokumentiert und anschließend einem gepaarten T-Test unterzogen. Als Teststatistik wurde der Quozient aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrundhelligkeit verwendet, da sich dieser als robuster gegenüber Schwankungen innerhalb der Bildcharakteristika erwies (s. Abschnitt 3.1.7, S.92). Alle Bilder wurden auch vom Autor selbst analysiert.

Die Testbilder setzten sich aus drei verschiedenen Experimenten zusammen:

- Kontrollbilder (ti300500co30410-ti300500co30418.tif)
- Apoptosebilder (ti300500ohnecyt010-ti300500ohnecyt018.tif)
- Kontrollbilder (ti300500co304imp010-ti300500co304imp018.tif)

Da zum Zeitpunkt diese Tests bereits bekannt war, dass für alle Bilder identische Parametereinstellungen verwendet werden konnten, wurde mit dem T-Test nach signifikanten Unterschieden zwischen den Analyseergebnissen der Bilder der einzelnen Experimente gesucht. Dabei wurde erwartet, dass

3.1 Software Versionen und Evaluation

1. zwischen den Kontrollbildern (ti300500co30410-ti300500co30418.tif) und den Apoptosebildern (ti300500ohnecyt010-ti300500ohnecyt018.tif) ein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Kernhelligkeit besteht
2. zwischen dem ersten Set an Kontrollbildern (ti300500co30410-ti300500co30418.tif) und dem zweiten Set an Kontrollbildern (ti300500co304imp010-ti300500co304imp018.tif) *kein* signifikanter Unterschied besteht.

Die Ergebnisse diese Tests finden sich im Abschnitt 3.1.5 auf Seite 87.

3.1 Software Versionen und Evaluation

Beispiele für die analysierten Bildtypen

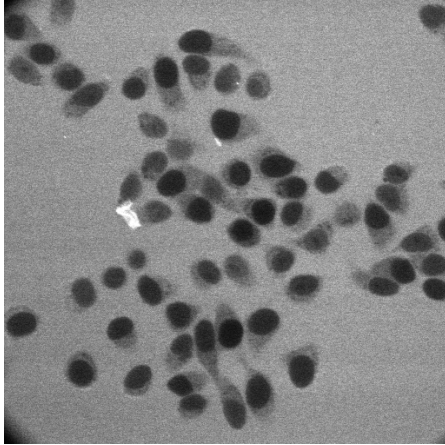


Abbildung 3.39: Test des Einflusses der Parametereinstellungen auf die Analysedaten mit V0402: Beispiel für ein analysiertes Bild des Typs Apoptose aus der Serie tight 300500, ti300500ohnecyt

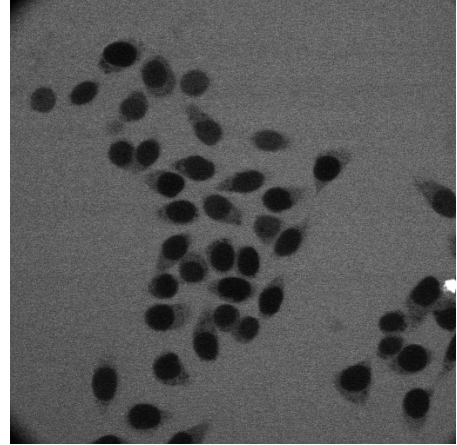


Abbildung 3.40: Test des Einflusses der Parametereinstellungen auf die Analysedaten mit V0402: Beispiel für ein analysiertes Bild des Typs Apoptose aus der Serie tight 300500, ti300500apoalt

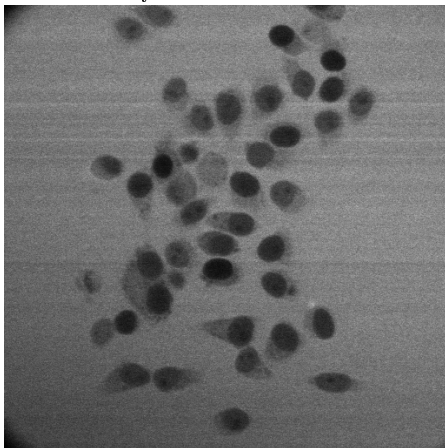


Abbildung 3.41: Test des Einflusses der Parametereinstellungen auf die Analysedaten mit V0402: Beispiel für ein analysiertes Bild des Typs Apoptose aus der Serie tight 060600, ti060600apoaimpwga

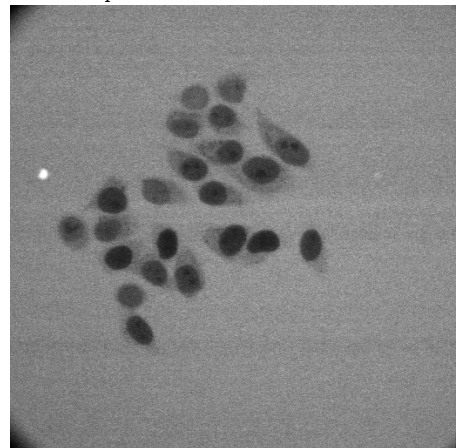


Abbildung 3.42: Test des Einflusses der Parametereinstellungen auf die Analysedaten mit V0402: Beispiel für ein analysiertes Bild des Typs Apoptose aus der Serie tight 060600, ti060600apoaimpzv

3.1 Software Versionen und Evaluation

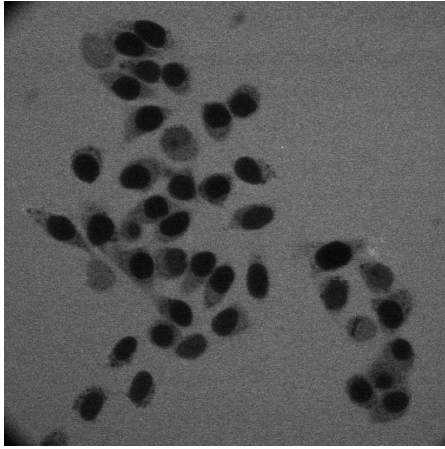


Abbildung 3.43: Test des Einflusses der Parametereinstellungen auf die Analysedaten mit V0402: Beispiel für ein analysiertes Bild des Typs Kontrolle aus der Serie tight 300500

Ergebnisse des Tests des Einflusses der manuellen Auswahl von Objekten auf die Analysedaten

In den Tabellen 3.25 bis 3.27 sind die Ergebnisse der T-Tests mit den Analysedaten des Blindtests, wie er im Abschnitt 3.1.5 auf Seite 84 beschrieben ist dargestellt. Als Kennwert wurde der Quozient aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrundhelligkeit verwendet.

	<i>Kontrolle vs Apoptose</i>	<i>Kontrolle vs Kontrolle</i>
α	0.01	0.01
n	9	9
DF	8	8
t_{emp}	10.711	2.251
t_{tab}	3.355	3.355
P	5.07E-006	0.054
c.i.	0.012	0.012

Tabelle 3.25: Einfluss der manuellen Auswahl von Objekten auf die Analysedaten: Blindtest I,
linke Kolumne: Analysedaten der Kontrollbilder getestet gegen die Analysedaten der Apoptosebilder
Rechte Kolumne: Analysedaten der Kontrollbilder gegeneinander getestet

3.1 Software Versionen und Evaluation

	<i>Kontrolle vs Apoptose</i>	<i>Kontrolle vs Kontrolle</i>
α	0.01	0.01
n	9	9
DF	8	8
t_{emp}	14.870	3.140
t_{tab}	3.355	3.355
P	4.12E-007	0.014
c.i.	0.08	0.008

Tabelle 3.26: Einfluss der manuellen Auswahl von Objekten auf die Analysedaten: Blindtest II,
linke Kolumne: Analysedaten der Kontrollbilder getestet gegen die Analysedaten der Apoptosebilder
Rechte Kolumne: Analysedaten der Kontrollbilder gegeneinander getestet

	<i>Kontrolle vs Apoptose</i>	<i>Kontrolle vs Kontrolle</i>
α	0.01	0.01
n	9	9
DF	8	8
t_{emp}	14.373	2.622
t_{tab}	3.355	3.355
P	5.36E-007	0.031
c.i.	0.08	0.008

Tabelle 3.27: Einfluss der manuellen Auswahl von Objekten auf die Analysedaten: Blindtest III,
linke Kolumne: Analysedaten der Kontrollbilder getestet gegen die Analysedaten der Apoptosebilder
Rechte Kolumne: Analysedaten der Kontrollbilder gegeneinander getestet

Mit

$$t_{emp} \leq t_{tab} \Rightarrow H_0(\delta = 0), H_0(\mu_x = \mu_y)$$

$$t_{emp} > t_{tab} \Rightarrow H_A(\delta \neq 0), H_A(\mu_x \neq \mu_y)$$

und

$$P \geq \alpha \Rightarrow H_0$$

$$P < \alpha \Rightarrow H_A$$

3.1 Software Versionen und Evaluation

sowie den Daten aus den Tabellen 3.25 bis 3.27 auf den Seiten 87 bis 88 können für die beiden Tests folgende Aussagen gemacht werden :

1. Die Quozienten der Kontrollbilder und der Apoptosebilder weichen signifikant voneinander ab, d.h. H_0 wird mit einem α -Fehler von 1% abgelehnt, H_A wird angenommen
2. Die Quozienten der beiden Kontrollbildreihen weichen *nicht* signifikant voneinander ab, d.h. H_0 wird mit einem α -Fehler von 1% angenommen, H_A wird abgelehnt

Dieses Ergebniss gilt für alle drei durchgeführten Blindtests. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die subjektive Verwendung der Auswahlmaske keinen erheblichen Einfluss auf die Analysedaten hat.

3.1 Software Versionen und Evaluation

3.1.6 Test der Version 1.1

Die Version 1.1 des Programmes Zellkerne.exe unterscheidet sich von den Vorgängerversionen lediglich durch Äußerlichkeiten. An den eigentlichen Analyseeigenschaften des Programms wurde im Vergleich zur Version 0402 nichts geändert. Daher wurden mit dieser Version auch keine weiteren Tests bezüglich Analyse und Mustererkennung mehr durchgeführt. Die Veränderungen sind im Einzelnen:

- Alle Beschriftungen und Hinweise wurden in englischer Sprache abgefasst. Das Programm heißt jetzt „Analysis of nuclei“. Die Spracheinstellungen lassen sich in der Konfigurationsdatei „language.ini“ verändern
- Eine Legende für die Farbmarkierungen der erkannten Objekte ist verfügbar (s.Abb. 3.44)
- Da es relativ schwierig ist, bei den bereits farblich markierten Objekten zu entscheiden, welcher Status zugewiesen werden soll, ist nun eine Ansicht des nativen unmarkierten Bildes verfügbar (s.Abb. 3.47, S.91)

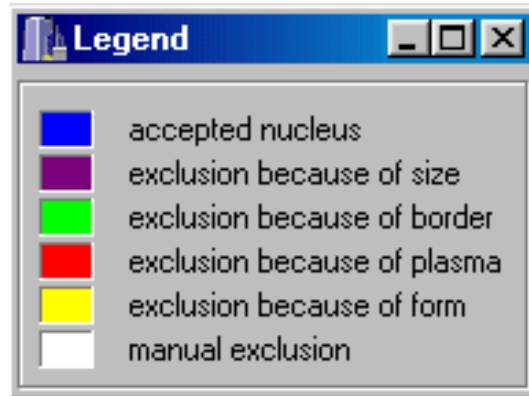


Abbildung 3.44: Nach einem Klick auf den mit „Legende“ beschrifteten Button erscheint die Farblegende der V1.1

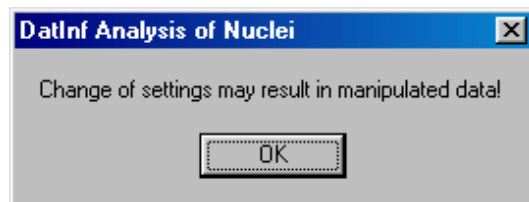


Abbildung 3.45: Nach einem Klick auf den mit „Settings“ beschrifteten Button erscheint ein Warnhinweis, dass mit der Veränderung der Parameter auch eine Manipulation der Daten möglich ist

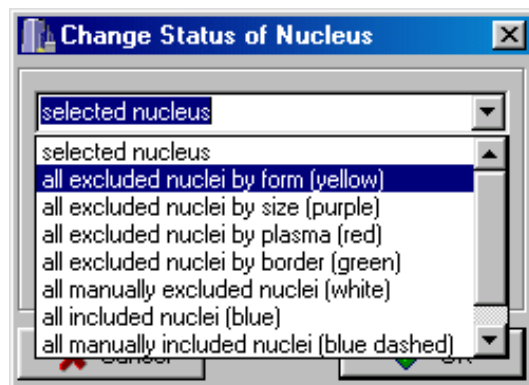


Abbildung 3.46: Nach einem Klick auf eine beliebigen Kern erscheint ein Dialogfenster, welches die Auswahl ganzer Populationen von Kernen, sowie einzelner Kerne gestattet

3.1 Software Versionen und Evaluation

- Die Auswahlmaske wurde erweitert. Nach einem Klick auf einen beliebigen Kern ist es nun möglich, einzelne Kerne oder ganze Populationen von Kernen ein- oder auszuschließen. Die gewünschte Population lässt sich aus einem Pull-Down-Menü auswählen (s.Abb. 3.46, S. 90)
- Analysedaten und Parametereinstellungen wurden hinter eigenen Buttons versteckt. Werden die Regler für die Parametereinstellungen aufgerufen, erscheint ein Warnhinweis, dass an dieser Stelle die Möglichkeit zur Manipulation der Daten besteht (s.Abb. 3.45, S.90)
- Ein Infobutton stellt Informationen über Softwareversion und Hersteller zur Verfügung

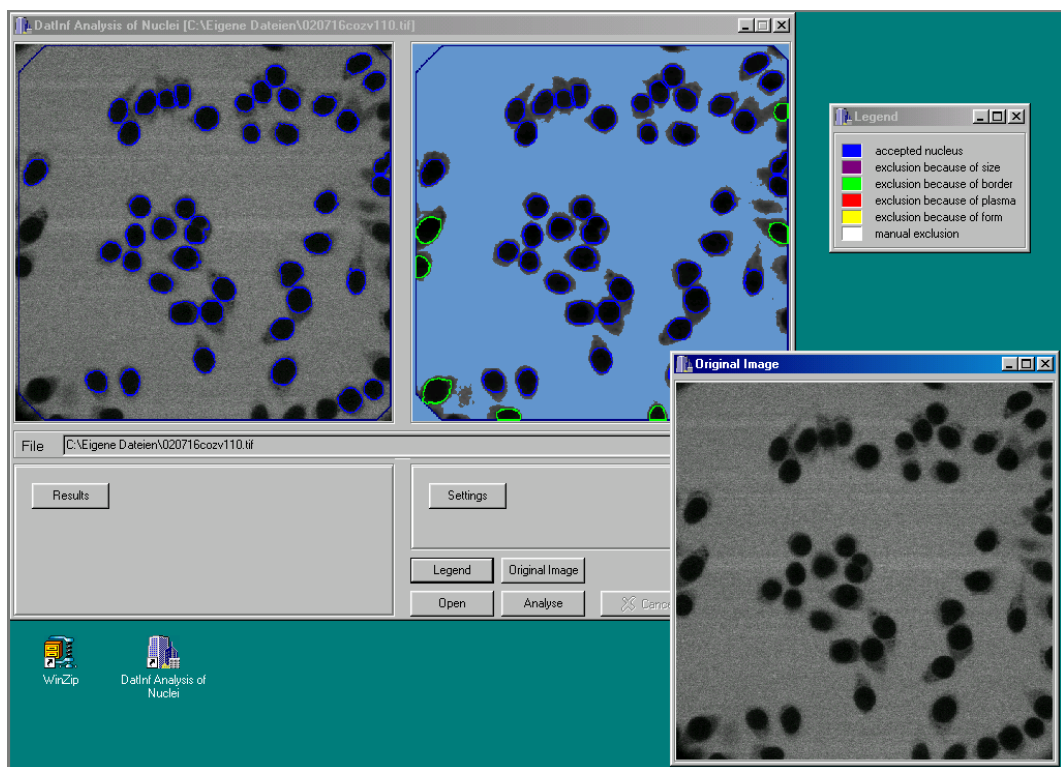


Abbildung 3.47: Layout der Version 1.1 „Analysis of nuclei“ mit Legende und Ansichtsfenster für das native Bild. Ergebnisse und Parametereinstellungen werden erst nach einem Klick auf die entsprechenden Buttons sichtbar.

3.1 Software Versionen und Evaluation

3.1.7 Wahl des Kennwertes für die biologisch relevanten Analysen

Um zu ermitteln, welcher der beiden Kennwerte „Differenz“ und „Quozient“ sich stabiler gegenüber den in den Bildern auftretenden Schwankungen erweist und daher besser für die statistischen Analysen geeignet erscheint, wurden die in den Tabellen 3.15 bis 3.17 auf den Seiten 73 bis 75 gezeigten Analysewerte „Differenz“ und „Quozient“ für die jeweiligen Bilder von der Firma DatInf in eine graphische Darstellung überführt (s. Abb. 3.48 und 3.49, S.92). Für jedes Bild waren für jeden der beiden Kennwerte zwei Zahlenwerte verfügbar - einer für die Analyse mit Voreinstellungen und einer für die Analyse mit optimierten Einstellungen. Werden diese für jedes Bild in einem Diagramm aufgetragen, so zeigt sich, dass

- bei der Differenz die Unterschiede zwischen den Bildern größer sind als die Unterschiede zwischen Voreinstellungen und optimierten Einstellungen
- beim Quozienten die Unterschiede zwischen den Bildern kleiner sind als die Unterschiede zwischen Voreinstellungen und optimierten Einstellungen.

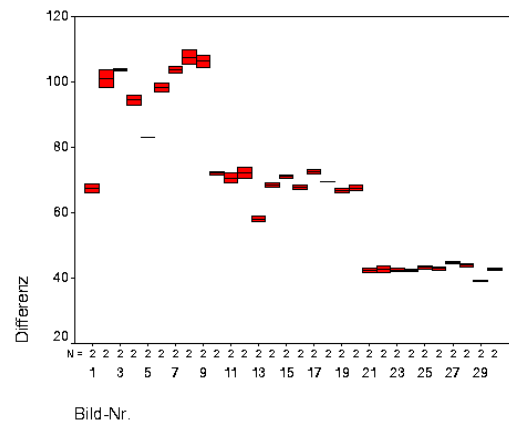


Abbildung 3.48: Wahl des Kennwertes: Graphische Darstellung der Differenzen bei Kontrollbildern analysiert mit Voreinstellungen und optimierten Einstellungen

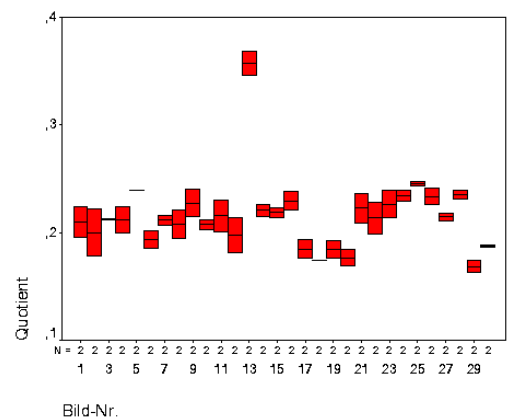


Abbildung 3.49: Wahl des Kennwertes: Graphische Darstellung des Quozienten bei Kontrollbildern analysiert mit Voreinstellungen und optimierten Einstellungen

3.1 Software Versionen und Evaluation

Da die Daten von Bildern stammen, die alle dem Typ Kontrolle angehören, sollte das Merkmal für die statistische Analyse gewählt werden, in dem sich die Bilder *nicht* unterscheiden. Wie die graphische Darstellung veranschaulicht, ist dies der Fall für den Quozienten aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrund. Damit eignet sich dieser Kennwert für die Analysen besser als die Differenz aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrund.

3.2 Anwendung der evaluierten Software

3.2.1 Analyse von bereits durchgeführten Permeabilitäts-Assays

Nachdem sichergestellt wurde, dass die zu entwickelnde Software in Hinsicht auf Mustererkennung und Datenmanipulation den gestellten Anforderungen genügte, war das nächste Ziel die Anwendung der Software auf die Bilder der Kernpermeabilitäts-Assays, welche von Frau Dr. Elisa Ferrando-May in den Jahren 1999/2000 durchgeführt wurden. Die Experimente erfolgten an verschiedenen Tagen und völlig unabhängig voneinander. Mit Hilfe der digitalen Bildanalyse und den erzeugten Daten sollte festgestellt werden, ob signifikante Unterschiede im Bezug auf die durchschnittliche Kernhelligkeit zwischen Kontrollbildern und Apoptosebildern bestanden.

Alle Bilder wurden mit der evaluierten Software in der Version 0402 unter Verwendung der Auswahlmaske, aber *ohne* Manipulation der Parametereinstellungen analysiert. Die so erzeugten Daten wurden statistisch ausgewertet. Dabei wurde diesmal ein rechtsseitiger gepaarter T-Test als statistisches Werkzeug gewählt, da von einer Abweichung der Kernhelligkeit nach oben ausgegangen werden konnte. Getestet wurden jeweils Kontrollbilder gegen Apoptosebilder aus einer Serie.

Eine Zusammenstellung der hier analysierten Bilder findet sich im Anhang 5.1 auf Seite 111. Beispiele für die verwendeten Bilder sind auf Seite 99f. abgebildet. Die vollständigen Analysedaten befinden sich auf der beigelegten CD-ROM im Verzeichnis „Analysedate“. Im Folgenden sind die Ergebnisse der gepaarten rechtsseitigen T-Tests und jeweils eine graphische Darstellung der Quozientenmittelwerte gezeigt.

3.2 Anwendung der evaluierten Software

Serie tight111099, Kontrollen gegen Apoptosebilder

<i>Serie tight111099, Kontrolle vs Apoptose</i>	
α	0.01
n	7
DF	6
t_{emp}	5.928
t_{tab}	3.142
P	5.14E-004
c.i.	0.033

Tabelle 3.28: Rechtsseitiger gepaarter T-Test Serie tight111099: Analysedaten der Kontrollbilder getestet gegen die Analysedaten der Apoptosebilder

Mit

$$t_{emp} \leq t_{tab} \Rightarrow H_0(\delta = 0), H_0(\mu_x = \mu_y)$$

$$t_{emp} > t_{tab} \Rightarrow H_A(\delta \neq 0), H_A(\mu_x \neq \mu_y)$$

und

$$P \geq \alpha \Rightarrow H_0$$

$$P < \alpha \Rightarrow H_A$$

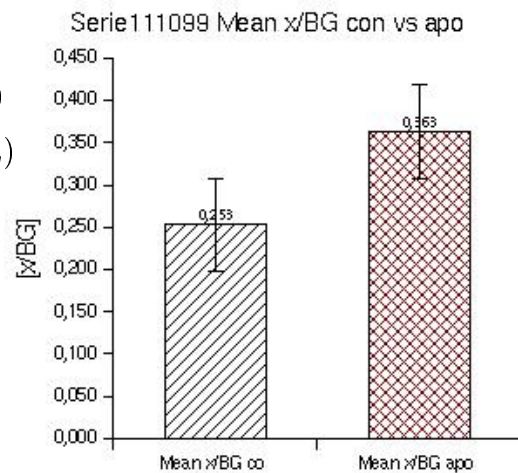


Abbildung 3.50: Serie tight111099: Graphische Darstellung der Quotientenmittelwerte von Kontrollen und Apoptosebildern

und den Daten aus Tabelle 3.28 wird die Nullhypothese H_0 mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% abgelehnt. Entsprechend wird die Alternativhypothese H_A angenommen.

Damit weicht der in der Serie tight111099 der Quotient aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrundhelligkeit der Apoptosebilder signifikant von dem der Kontrollbilder nach oben ab.

3.2 Anwendung der evaluierten Software

Serie tight170699, Kontrollen gegen Apoptosebilder

<i>Serie tight170699, Kontrolle vs Apoptose</i>	
α	0.01
n	10
DF	9
t_{emp}	4.891
t_{tab}	2.821
P	4.29E-004
c.i.	0.036

Tabelle 3.29: Rechtsseitiger gepaarter T-Test Serie tight170699: Analysedaten der Kontrollbilder getestet gegen die Analysedaten der Apoptosebilder

Mit

$$t_{emp} \leq t_{tab} \Rightarrow H_0(\delta = 0), H_0(\mu_x = \mu_y)$$

$$t_{emp} > t_{tab} \Rightarrow H_A(\delta \neq 0), H_A(\mu_x \neq \mu_y)$$

und

$$P \geq \alpha \Rightarrow H_0$$

$$P < \alpha \Rightarrow H_A$$

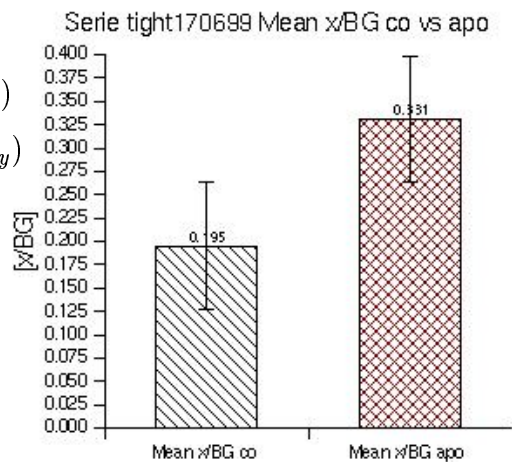


Abbildung 3.51: Serie tight170699: Graphische Darstellung der Quotientenmittelwerte von Kontrollen und Apoptosebildern

und den Daten aus Tabelle 3.29 wird die Nullhypothese H_0 mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% abgelehnt. Entsprechend wird die Alternativhypothese H_A angenommen.

Damit weicht in der Serie tight170699 der Quozient aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrundhelligkeit der Apoptosebilder signifikant von dem der Kontrollbilder nach oben ab.

3.2 Anwendung der evaluierten Software

Serie tight190600, Kontrollen gegen Apoptosebilder

<i>Serie tight190600, Kontrolle vs Apoptose</i>	
α	0.01
n	8
DF	7
t_{emp}	7.687
t_{tab}	2.998
P	5.88E-005
c.i.	0.001

Tabelle 3.30: Rechtsseitiger gepaarter T-Test Serie tight190600: Analysedaten der Kontrollbilder getestet gegen die Analysedaten der Apoptosebilder

Mit

$$t_{emp} \leq t_{tab} \Rightarrow H_0(\delta = 0), H_0(\mu_x = \mu_y)$$

$$t_{emp} > t_{tab} \Rightarrow H_A(\delta \neq 0), H_A(\mu_x \neq \mu_y)$$

und

$$P \geq \alpha \Rightarrow H_0$$

$$P < \alpha \Rightarrow H_A$$

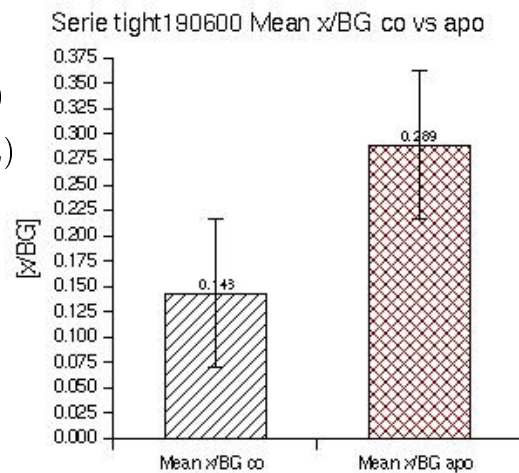


Abbildung 3.52: Serie tight190600: Graphische Darstellung der Quotientenmittelwerte von Kontrollen und Apoptosebildern

und den Daten aus Tabelle 3.30 wird die Nullhypothese H_0 mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% abgelehnt. Entsprechend wird die Alternativhypothese H_A angenommen.

Damit weicht in der Serie tight190600 der Quozient aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrundhelligkeit der Apoptosebilder signifikant von dem der Kontrollbilder nach oben ab.

3.2 Anwendung der evaluierten Software

Serie tight280799, Kontrollen gegen Apoptosebilder

<i>Serie tight280799, Kontrolle vs Apoptose</i>	
α	0.01
n	7
DF	6
t_{emp}	5.653
t_{tab}	3.143
P	6.58E-004
c.i.	0.063

Tabelle 3.31: Rechtsseitiger gepaarter T-Test Serie tight280799: Analysedaten der Kontrollbilder getestet gegen die Analysedaten der Apoptosebilder

Mit

$$t_{emp} \leq t_{tab} \Rightarrow H_0(\delta = 0), H_0(\mu_x = \mu_y)$$

$$t_{emp} > t_{tab} \Rightarrow H_A(\delta \neq 0), H_A(\mu_x \neq \mu_y)$$

und

$$P \geq \alpha \Rightarrow H_0$$

$$P < \alpha \Rightarrow H_A$$

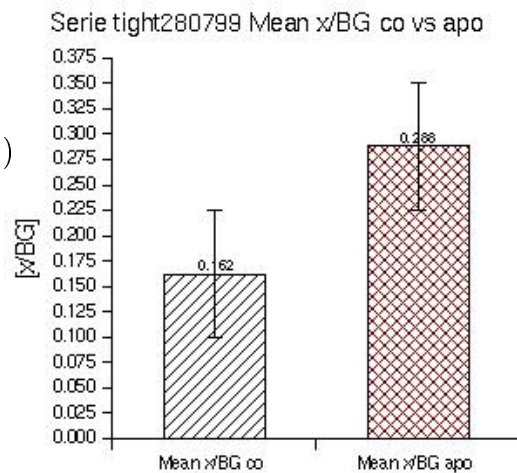


Abbildung 3.53: Serie tight280799: Graphische Darstellung der Quotientenmittelwerte von Kontrollen und Apoptosebildern

und den Daten aus Tabelle 3.31 wird die Nullhypothese H_0 mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% abgelehnt. Entsprechend wird die Alternativhypothese H_A angenommen.

Damit weicht in der Serie tight280799 der Quotient aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrundhelligkeit der Apoptosebilder signifikant von dem der Kontrollbilder nach oben ab.

3.2 Anwendung der evaluierten Software

Beispiele für Bilder aus den getesteten Serien tight111099, tight17099, tight190600, tight280799

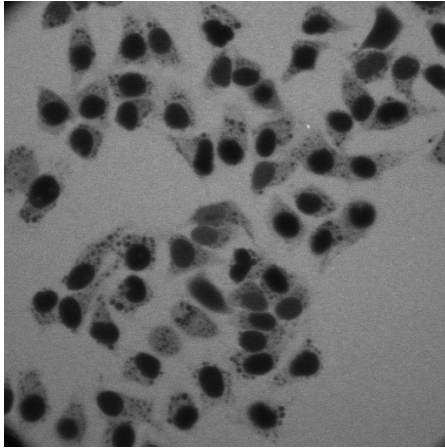


Abbildung 3.54: Anwendung der evaluierten Software: Beispiel für die analysierten Bildtypen; Kontrollbild aus der Serie tight111099

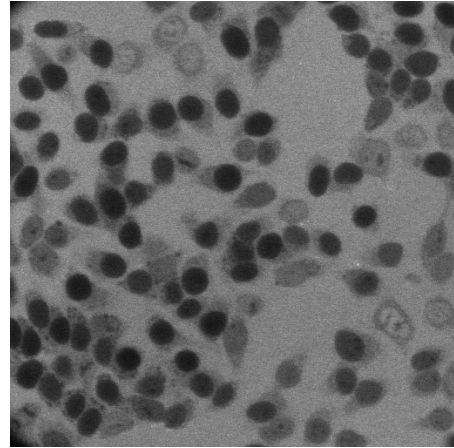


Abbildung 3.55: Anwendung der evaluierten Software: Beispiel für die analysierten Bildtypen; Apoptosebild aus der Serie tight111099

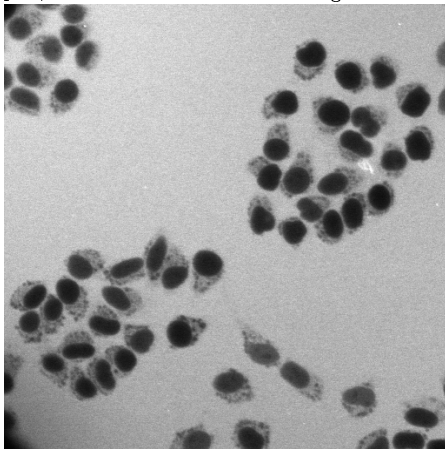


Abbildung 3.56: Anwendung der evaluierten Software: Beispiel für die analysierten Bildtypen; Kontrollbild aus der Serie tight170699

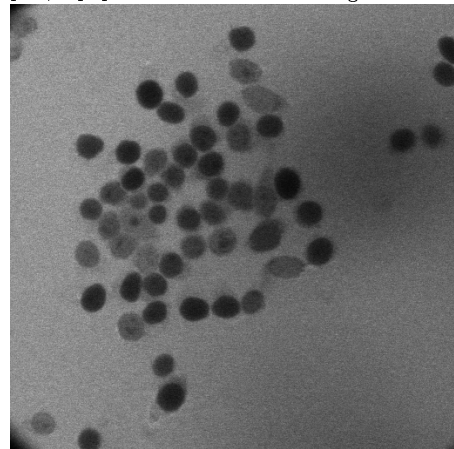


Abbildung 3.57: Anwendung der evaluierten Software: Beispiel für die analysierten Bildtypen; Apoptosebild aus der Serie tight170699

3.2 Anwendung der evaluierten Software

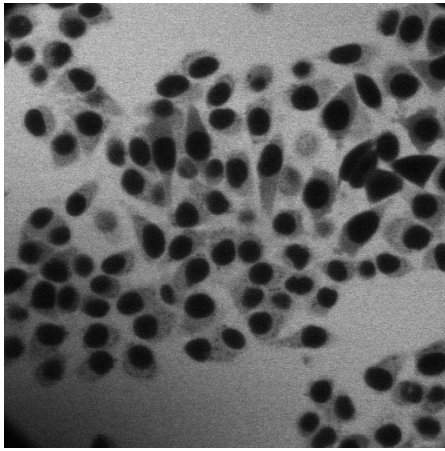


Abbildung 3.58: Anwendung der evaluierten Software: Beispiel für die analysierten Bildtypen; Kontrollbild aus der Serie tight190600

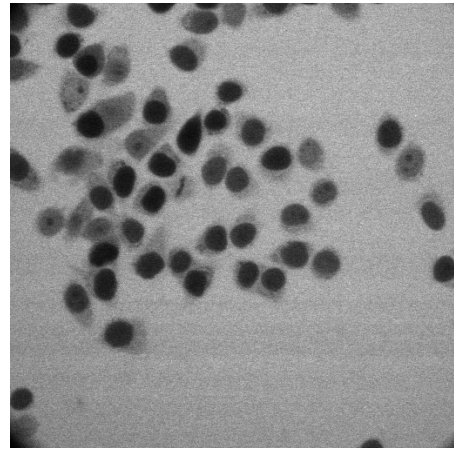


Abbildung 3.59: Anwendung der evaluierten Software: Beispiel für die analysierten Bildtypen; Apoptosebild aus der Serie tight190600

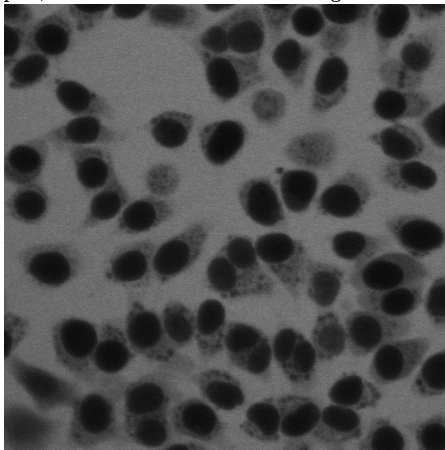


Abbildung 3.60: Anwendung der evaluierten Software: Beispiel für die analysierten Bildtypen; Kontrollbild aus der Serie tight280799

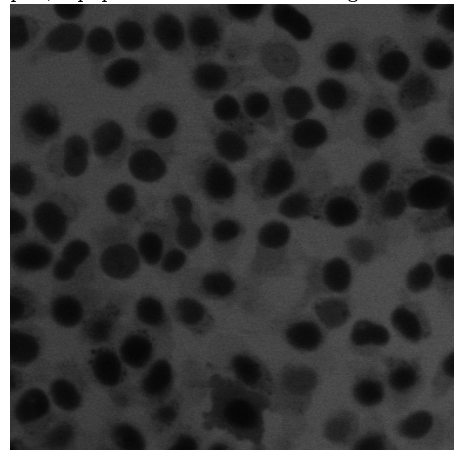


Abbildung 3.61: Anwendung der evaluierten Software: Beispiel für die analysierten Bildtypen; Apoptosebild aus der Serie tight280799

Bei allen hier getesteten Serien ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den Quozienten x/BG der Kontrollbilder und der Bilder von Zellen, welche mit apoptotischen Zytosol inkubiert wurden, feststellen. Dabei wichen die Werte der Apoptosebilder deutlich nach oben ab, womit auf eine intensivere Fluoreszenzintensität des 70kDa Dextrans in den Kernen der apoptotischen Zellen geschlossen werden kann.

3.2 Anwendung der evaluierten Software

3.2.2 Analyse von neu durchgeführten Permeabilitäts-Assays

Um weiter sicherzustellen, dass die im Abschnitt 3.2.1 ermittelten Ergebnisse reproduzierbar sind, wurde der Permeabilitätsassay wie im Abschnitt 2.2.1 auf Seite 20 beschrieben erneut durchgeführt und die ermittelten Bildanalyse-daten wiederum mit rechtsseitigen gepaarten T-Tests untersucht.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der statistischen Analyse sowie zwei Beispielbilder dargestellt.

Beispiele für Bilder aus den getesteten Serien permassay020702

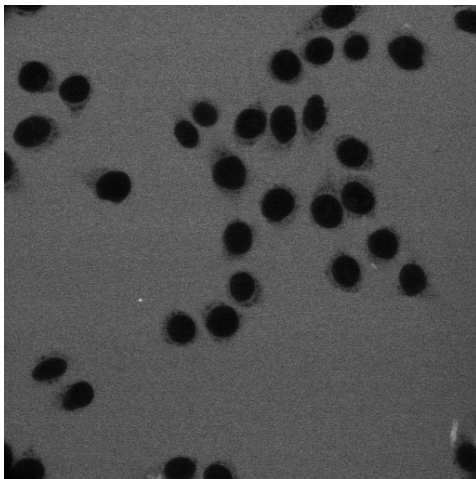


Abbildung 3.62: Anwendung der evaluierten Software; Beispiel für die analysierten Bildtypen; Kontrollbild aus der Serie permassay020702

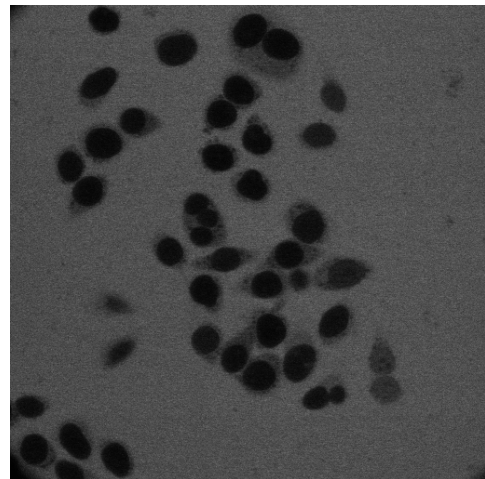


Abbildung 3.63: Anwendung der evaluierten Software; Beispiel für die analysierten Bildtypen; Apoptosebild aus der Serie permassay020702

3.2 Anwendung der evaluierten Software

Serie permassay020702, Kontrolle gegen Apoptosebilder

Serie permassay020702, Kontrolle vs Apoptose	
α	0.01
n	16
DF	15
t_{emp}	6.008
t_{tab}	2.602
P	1.20E-005
c.i.	0.023

Tabelle 3.32: Rechtsseitiger gepaarter T-Test Serie permassay020702: Analysedaten der Kontrollbilder getestet gegen die Analysedaten der Apoptosebilder

Mit

$$t_{emp} \leq t_{tab} \Rightarrow H_0(\delta = 0), H_0(\mu_x = \mu_y)$$

$$t_{emp} > t_{tab} \Rightarrow H_A(\delta \neq 0), H_A(\mu_x \neq \mu_y)$$

und

$$P \geq \alpha \Rightarrow H_0$$

$$P < \alpha \Rightarrow H_A$$

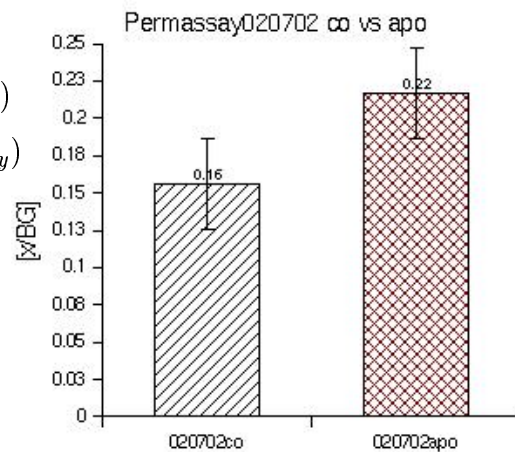


Abbildung 3.64: Serie permassay020702: Graphische Darstellung der Quozientenmittelwerte von Kontrollen und Apoptosebildern

und den Daten aus Tabelle 3.31 wird die Nullhypothese H_0 mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 1% abgelehnt. Entsprechend wird die Alternativhypothese H_A angenommen.

Damit weicht in der Serie permassay020702 der Quozient aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrundhelligkeit der Apoptosebilder signifikant von dem der Kontrollbilder nach oben ab.

3.2 Anwendung der evaluierten Software

Mit diesem Ergebnis kann darauf geschlossen werden, dass auch in diesem Experiment die Fluoreszenzintensität des 70 kDa Dextranmarkers im von der Kernhülle umschlossenen Kompartiment bei Zellen, die mit apoptotischen zytosolischen Extrakten inkubiert wurden, im Vergleich zu den Kontrollbildern zunimmt.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Software-Evaluation	104
4.2 Permeabilitäts-Assay	108

4.1 Software-Evaluation

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder des vorgestellten Permeabilitäts-Assays enthalten sehr heterogene Verteilungen unterschiedlicher Objekte, da weder eine homogene Verteilung der Zellen auf den CS, noch eine gleichmäßige Diffusion der verwendeten Reagentien experimentell realisierbar ist. Damit ergeben sich für eine digitale Analyse der Bilder im Hinblick auf die korrekte Erkennung der relevanten Objekte wenig konstante Bedingungen und hohe Anforderungen an die Mustererkennungsalgorithmen. Die bisher auf dem Markt befindlichen Programme konnten den Problemen der Mustererkennung in diesem speziellen Fall nicht gerecht werden, so dass eine Eigenentwicklung nötig wurde, um eine quantitative Auswertung der erstellten Bilder unter den genannten biologischen Fragestellungen zu ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden in umfangreichen Tests die Mustererkennungseigenschaften der von der Firma DatInf (Tübingen) entwickelten Software sowie potentielle Manipulationsmöglichkeiten durch den Benutzer der Software untersucht.

4.1 Software-Evaluation

Ab der Version 0402 ist eine ausreichend gute Mustererkennung und Identifikation der relevanten Objekte auf den Bildern möglich. Eine vollautomatische Erkennung konnte jedoch nicht erreicht werden. Daher wurde der Software ein Auswahlmaske implementiert, welche die manuelle Auswahl von Objekten und die Festlegung deren Stati erlaubte.

Es konnte festgestellt werden, dass sich durch die Einstellmöglichkeiten für die Erkennungsparameter „Plasma“, „Kerne“ und „Form“ deutliche Manipulationsmöglichkeiten von Seiten des Benutzers eröffneten. Die Ursache hierfür ist in dem Umstand zu sehen, dass durch die Festlegung der Schwellenwerte für Plasma und Kerne sich die Größe der jeweils zugehörigen Objekte ändert, d.h. sobald der Schwellenwert für die Kernererkennung in Richtung größere Graustufenwerte verschoben wird, wird auch die Fläche der erkannten Kerne größer. Damit ist es dann auch denkbar, dass Bereiche, die eigentlich dem Objekttyp „Plasma“ zuzuordnen sind, nun zur Kernfläche gerechnet werden. Da das Plasma in der Regel deutlich heller als die Kernbereiche ist, wird sich dadurch der Graustufenwert der erkannten Kernfläche nach oben verschieben. Als Folge ergibt sich dann auch eine benutzerinduzierte Modifikation der Analysewerte „Quozient“ (x/BG) und „Differenz“ ($BG-x$).

Da dies im Gegensatz zu einem objektiven Messsystem stand, wurden einheitliche Parametereinstellungen ermittelt, mit denen eine ausreichend gute Erkennung aller vorhandenen Bildtypen möglich wurde. Die Möglichkeit zur manuellen Einstellung der Mustererkennungsparameter blieb jedoch zusätzlich zu den Voreinstellungen erhalten, um eine Anpassung der Software an andere Bildtypen als die hier verwendeten zu ermöglichen. Bei einer Anpassung der Werte sollte jedoch unbedingt darauf geachtet werden, dass an dieser Stelle eine Manipulation der Analysedaten möglich ist. Diesem Umstand wurde durch eine Warnung Rechnung getragen, welche erscheint, wenn die Schieberegler zur Parameterjustierung aufgerufen werden. In jedem Fall muss nach einer Reglermodifikation durch statistische Berechnungen geprüft werden, ob die vorgenommenen Änderungen signifikante Auswirkungen auf die Analysewerte haben.

Weiter wurden auch die Manipulationsmöglichkeiten durch die subjektive Auswahl von Objekten mit Hilfe der Auswahlmaske untersucht. Durch ma-

4.1 Software-Evaluation

nuelle Ein-, oder Ausschlüsse von Objekten, welche durch ihren Graustufenwert zu den errechneten Analyseergebnissen beitragen, ist ein signifikanter Einfluss auch hier denkbar. Es ergab sich jedoch durch wiederholte Blindtests mit unterschiedlichen Personen ohne biologische Vorbildung, dass die Verwendung dieses Werkzeuge unproblematisch ist, da sich keine signifikanten Veränderungen der Analysedaten feststellen ließ.

An dieser Stelle wurde die Evaluierung der Software im Hinblick auf die Mustererkennung abgeschlossen.

Es musste nun noch ermittelt werden, welches Merkmal der zu analysierenden Bilder sich am besten für die notwendigen statistischen Analysen eignete. Hier stellte sich heraus, dass der Quozient aus durchschnittlicher Kernhelligkeit und Hintergrundhelligkeit sich als stabil gegenüber den in den Bildern auftretenden Schwankungen zeigte und damit für die Charakterisierung der jeweiligen Bildtypen geeignet schien.

Der endgültigen Version 1.1 wurden keine wesentlichen Änderungen bezüglich der Analyseigenschaften mehr implementiert. Alle Änderungen waren äußerlicher Art und bezogen sich auf die bessere und komfortablere Handhabung der Software. Es steht damit ein Werkzeug zur Verfügung, welches den gestellten Anforderungen genügt. Es ist möglich, die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der Kernpermeabilitätsassays zu analysieren und mit den Daten statistische Untersuchungen durchzuführen, um damit biologisch relevante Aussagen treffen zu können.

Die hier entwickelte Software erfordert eine semiautomatische Analyse jedes einzelnen Bildes, da wie oben erwähnt keine vollautomatische Mustererkennung erreicht werden konnte. Damit ergibt sich bei größeren Bildmengen ein relativ großer Zeit- und Arbeitsaufwand. Ein alternativer Ansatz, mit dem dieses Problem gelöst werden könnte ist die Entwicklung eines lernfähigen Programmes mit implementierter Datenbank. Im Laufe der hier vorgestellten Arbeit, konnte vom Autor festgestellt werden, dass die analysierten Bilder immer wiederkehrende Muster von Objekten aufwiesen. Wenn es entsprechend nur eine begrenzte Anzahl an möglichen Objekten gibt, wäre es dann z.B. denkbar mit einem repräsentativen Testset von Bildern durch se-

4.1 Software-Evaluation

miautomatische Auswertung die Datenbank mit den verschiedenen Objekttypen „relevante, einzuschließende Objekte“ und „unrelevante, auszuschließende Objekte“ zu füllen. Nach dem Lernprozess könnte die Software dann vollautomatisch ohne Benutzereingriffe ganze Arrays von Bildern auswerten. Dieser Ansatz konnte hier jedoch aus Zeitgründen nicht realisiert werden. Eine weitere Verbesserung des hier vorgestellten Assays könnte auf der Ebene der mikroskopischen Bilderstellung vorgenommen werden. Die Methode erfordert bei der Erstellung der Bilder zügiges Arbeiten, da es sich bei den mikroskopierten Objekten um lebende Zellen handelt, welche sich z.T. in der Apoptose befinden. Mit zunehmender Zeit zeigen diese Zellen Effekte (Kondensation des Kernes, Blebbing), die die hier gewünschten zu beobachtenden Effekte überlagern könnten.

Das in dieser Arbeit verwendete CLSM erfordert bei der Bilderstellung viele zeitkonsumierende manuelle Eingriffe (Auswahl der ROI, manuelles Öffnen und Schließen der Shutter für die Strahlengänge, langsame Computer, langsame Software), welche es nicht erlauben über die gesamte Fläche des Präparates Bilder zu erstellen.

Um ein repräsentatives Bild des Präparates zu bekommen ist dies allerdings von enormer Wichtigkeit. Bei der Herstellung der Präparate kann die absolut homogene Verteilung der Zellen auf den CS genausowenig gewährleistet werden, wie die gleichmäßige Diffusion der zugesetzten Agentien. Die Gefahr, dass bei einer zeitlich limitierten manuellen Auswahl von Bildausschnitten keine realistische Repräsentation des Präparates erfolgt, ist also als relativ hoch einzuschätzen.

Ein großes Potenzial bieten hier modernere, leistungsfähigere CLSM-Systeme, mit denen ein vollautomatischer Scan des kompletten Präparates in einem Bruchteil der bisher nötigen Zeit möglich ist. Damit wird die Anzahl der gezogenen Stichproben pro Präparat größer und die Aussagekraft der statistischen Induktionsschlüsse, welche mit den Analysedaten der Bilder anschließend vorgenommen werden, erhöht sich.

4.2 Permeabilitäts-Assay

Das vorgestellte *in vitro* System in Kombination mit der entwickelten EDV stellt eine spezielle quantitative Methode zur Untersuchung von Kern-Zytoplasma Transportprozessen in der Apoptose dar. Der Assay ist flexibel und kann für einen weiten Bereich von Fragestellungen eingesetzt werden. Neben der Messung der passiven Diffusion stellt der aktive Import eine weitere für die Apoptoseforschung wichtige Anwendung dar (s. Einleitung). Wird die Quelle der apoptotischen Extrakte variiert, kann der Assay auch auf beliebig viele Apoptosemodelle ausgedehnt werden. Für die Etablierung des Systems wurde auf die durch CD95-L ausgelöste Apoptose zurückgegriffen (s. Einleitung). Weitere Experimente sind geplant, in denen verschiedene Extrakte, gewonnen z.B. aus Zellen, die über DNA-Schaden oder mitochondrielle Schädigung apoptotisch stimuliert wurden, bezüglich ihrer Effekte auf die Ausschlussgrenze der Kernhülle verglichen werden sollen. Schließlich bietet der Assay die Möglichkeit den Einfluss exogener Faktoren (z.B. Importmediatoren, Proteaseinhibitoren, s.unten) zu untersuchen, indem diese einfach den Extrakten zugegeben werden.

Der hier vorgestellte Assay unterscheidet sich grundsätzlich von anderen in der Literatur beschriebenen Methoden zur Messung der passiven Kerndiffusion darin, dass hier intakte, nicht fixierte Zellen beobachtet werden. Die Untersuchungen von Feldherr basieren auf der elektronenmikroskopischen Analyse der Verteilung kolloidaler Goldpartikel, die nur an fixierten Zellen durchführbar und extrem zeitaufwendig ist. Andere Untersuchungen, wie die von Peters et al. (Keminer, O. et al. (1999); Radtke, T. et al. (2001)) finden nicht an intakten Zellen statt.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von statistischen Untersuchungen der digitalen Bildanalysedaten gezeigt werden, dass die Methode es ermöglicht signifikante Differenzen zwischen den Diffusionseigenschaften der Kernhülle in lebenden Kontrollzellen und apoptotischen Zellen quantitativ zu erfassen. Die Quozienten der durchschnittlichen Kernhelligkeit und Hintergrundhelligkeit, x/BG der Kontrollbilder und der Bilder mit Zellen, die mit apoptotischem Zellextrakten inkubiert wurden weichen im statistischen Sinne signi-

4.2 Permeabilitäts-Assay

fikant voneinander ab. Der verwendete Reporter, ein fluoreszenzmarkiertes 70 kDa Dextran kann in den Kontrollzellen nicht in den Kern gelangen. Die Kerne sind hier schwarz und weisen keine, oder nur sehr geringe Fluoreszenzintensitäten auf. In den Zellen die mit apoptotischen Zellextrakten versetzt wurden, weist die deutlich gesteigerte Fluoreszenzintensität im Kern auf ein Vorhandensein des Dextranmarkers in diesem Kompartiment hin.

Da der verwendete Reporter nicht über Signale verfügt, welche ihn für den aktiven Transport durch den Kernporenkomplex mit Hilfe von Transportmediatoren markieren, kann davon ausgegangen werden, dass der Durchtritt durch die Kernhülle durch Diffusion erfolgte. Die in der Folge zunehmende Fluoreszenzintensität im Nukleoplasma konnte mit Hilfe der entwickelten Software auf einer quantitativen Basis ausgewertet werden.

Aus den durchgeführten Experimenten und der quantitativen Analyse der Bilddaten, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die zytosolischen Extrakte aus apoptotischen Jurkat E6-Zellen Faktoren enthalten, die in den Reporterzellen (Hela 229) zu einem frühen Zeitpunkt die Ausschlussgröße der Kernhülle so verändern, dass das 70 kDa Dextran in das Nukleoplasma diffundieren kann.

Für eine nähere Charakterisierung der beteiligten Faktoren können die apoptotischen Zellextrakte durch Ultrazentrifugation in Fraktionen getrennt werden und ihr Einfluss auf die Kernpermeabilität getestet werden. Damit könnten Informationen über den Ursprung der an der Permeabilitätsmodulation beteiligten Faktoren gewonnen werden. Ein in diesem Sinne wirksamer S100 Überstand würde auf lösliche Faktoren zytosolischen Ursprungs hindeuten, während wirksame Membranfraktionen (Pellets), z.B. auf einen mitochondrialen oder lysosomalen Ursprung hinweisen würden.

Weiter ist denkbar die Effekte verschiedener Inhibitoren in Kombination mit zytosolischen Zellextrakten unterschiedlicher Herkunft auf die Kernpermeabilität zu untersuchen. Denkbare Inhibitoren sind zum Beispiel der Caspase-Inhibitor zVAD-fmk oder das Lectin WGA, welches die Kernpore verschließt. Auch die Einflüsse verschiedener Transportmediatoren, z.B. Mitglieder der Importin- β Familie auf den aktiven Transport über die Kernporenkomplexe könnte mit Hilfe fluoreszierender Substrate quantitativ analysiert werden.

4.2 Permeabilitäts-Assay

Wie Feldherr et al. zeigen konnten, ist die Permeabilität der Kernhülle auch von der Form des Zellkörpers abhängig (Feldherr, C.M. and Akin, D. (1993)). Dieser Effekt könnte mit dem hier vorgestellten Assay und der entwickelten EDV quantitativ ausgewertet werden. Die Zellform der Reporterzellen kann dadurch reguliert werden, dass auf nicht-adhäsiven Coverslips Palladiuminseln definierter Größe aufgebracht werden. In Abhängigkeit von der Größe dieser Inseln können ausgebrachte Zellen nur rundlich wachsen, oder sie haben ausreichen Platz um eine flache Zellform einzunehmen (Ireland, G. et al. (1987)). Mit den so ausgebrachten Zellen könnte der vorgestellte Permeabilitäts Assay durchgeführt und die Transportaktivität in den einzelnen Zellen abhängig von der Zellform ausgewertet werden.

Kapitel 5

Anhang

5.1	Verwendete Bildserien	111
5.1.1	Testbilder Zellkerne.exe Version 0400	111
5.1.2	Testbilder Zellkerne.exe Version 0401	111
5.1.3	Testbilder Zellkerne.exe Version 0402	112
5.2	Inhalt der beigelegten CD-ROM	114

5.1 Verwendete Bildserien

5.1.1 Testbilder Zellkerne.exe Version 0400

Bildname	Bildtyp	Pfad auf beiliegender CD-ROM
CO1.tif - CO3.tif	Kontrolle	/Testbilder/V0400/
EXP1.tif - EXP16.tif	Apoptose	/Testbilder/V0400/

5.1.2 Testbilder Zellkerne.exe Version 0401

Bildname	Bildtyp	Pfad auf beiliegender CD-ROM
EXP5.tif	Apoptose	/Test bilder/V0401/
EXP10.tif	Apoptose	/Test bilder/V0401/
EXP14.tif	Apoptose	/Test bilder/V0401/

5.1 Verwendete Bildserien

5.1.3 Testbilder Zellkerne.exe Version 0402

Bildname	Bildtyp	Pfad auf beiliegender CD-ROM	Verwendung
EXP10.tif	Apoptose	/Testbilder/V0402/Vergleich/	Vergleich der Mustererkennung der Versionen 0401 und 0402 (s.Abschnitt 3.1.5, S.69)
ti25500co110.tif- ti25500co117.tif ti25500co210.tif- ti25500co211.tif ti300500co110.tif- ti300500co116.tif ti300500c210.tif- ti300500co213.tif ti300500c30410.tif- ti300500co30418.tif	Kontrolle	/Testbilder/V0402/Parametereinfluss/	Test des Einflusses der Parameter-einstellungen auf die Analysedaten (s.Abschnitt 3.1.5, S.69)
ti300500co30410.tif- ti300500co30418.tif	Kontrolle	/Testbilder/V0402/Auswahleinfluss/	Test des Einflusses der manuellen Auswahl von Objekten auf die Analysedaten (Blindtest) (s.Abschnitt 3.1.5, S.69)
ti300500ohnecyt010.tif- ti300500ohnecyt018.tif	Apoptose		
ti300500co304imp010.tif- ti300500co304imp018.tif	Kontrolle		
ti25500co110.tif- ti25500co117.tif ti25500co210.tif- ti25500co211.tif ti300500co110.tif- ti300500co116.tif ti300500c210.tif- ti300500co213.tif ti300500c30410.tif- ti300500co30418.tif	Kontrolle Kontrolle Kontrolle Kontrolle Kontrolle	/Testbilder/V0402/Neue Parameter/ Kontrolle/	Test der neuen Parameter-einstellungen (s.Abschnitt 3.1.5, S.69)

5.1 Verwendete Bildserien

Bildname	Bildtyp	Pfad auf beiliegender CD-ROM	Verwendung
apoaimpWGA660010.tif- apoaimpWGA660017.tif	Apoptose		
apoaimpWGA660010.tif- apoaimpWGA660017.tif	Apoptose	/Testbilder/V0402/Neue Parameter/ Apoptose/	Test der neuen Parameter- einstellungen (s.Abschnitt 3.1.5, S.69)
ti300500apoalt116.tif ti300500apoalt126.tif	Apoptose		
ti300500ohneeyt110.tif- ti300500ohneeyt118.tif	Apoptose		
ti25500co110.tif- ti25500co117.tif			
ti25500co210.tif- ti25500co211.tif			
ti300500co110.tif- ti300500co116.tif	Kontrolle	/Testbilder/V0402/Kennwert/	Wahl des Kennwertes für die biolog.relevanten Analysen (s.Abschnitt 3.1.7, S.92)
ti300500co210.tif- ti300500co213.tif			
ti300500co30410.tif- ti300500co30418.tif			
tight111099apo010.tif- tight111099apo016.tif	Apoptose		
tight111099con010.tif- tight111099con016.tif	Kontrolle		
tightapob17069914.tif- tightapob17069923.tif	Apoptose		
tightapob17069925.tif- tightapob17069935.tif	Kontrolle		
apoa1960010.tif- apoa1960017.tif	Apoptose	/Testbilder/V0402/Anwendung/	Anwendung der evaluierten Software zur Feststellung von signifikanten Unterschieden zwischen den Quozienten von Kontrollbildern und Apoptosebildern (s.Abschnitt 3.2, S.94)
coa1960010.tif- coa1960017.tif	Kontrolle		
tight280799no510.tif- tight280799no516.tif	Apoptose		
tight280799no410.tif- tight280799no416.tif	Kontrolle		
020702apozwei310.tif- 020702apozwei317.tif	Apoptose		
020702apodrei510.tif- 020702apodrei517.tif	Apoptose		
020702co210.tif- 020702co217.tif	Kontrolle		
020702cozwei410.tif- 020702cozwei417.tif	Kontrolle		

5.2 Inhalt der beigelegten CD-ROM

1. **Analysedaten:** In diesem Verzeichnis befinden sich die vollständigen Datenblätter für alle durchgeführten Analysen im Abschnitt 3.2 auf Seite 94. Die Datenblätter liegen in zwei Formaten vor: Einmal im Open Office StarCalc (Version 640) Format (*.sxc) und einmal im Microsoft Office Excel 2000 Format (*.xls).
2. **Dokumentation:** Im Unterordner „Diplomarbeit“ befindet sich die vorliegende Arbeit als pdf-File sowie als PostScript-File. Im Unterordner „Permessay“ befindet sich eine Anleitung für die praktische Durchführung des Permeabilitäts-Assays.
3. **Programmversionen:** In diesem Verzeichnis befinden sich alle in der vorliegenden Arbeit getesteten Programmversionen der digitalen Bildanalysesoftware „Zellkern.exe“. Die einzelnen Versionen sind jeweils in eigenen Verzeichnissen untergebracht.
4. **Testbilder:** In diesem Verzeichnis befinden sich alle für die Tests verwendeten Bilder. In den entsprechenden Verzeichnissen liegen alle Bilder als *.Tif-Dateien vor. Die Datei „images.html“ enthält für eine bessere Übersicht eine Bildergalerie der getesteten Bilder. Die Beschriftung der Verweise folgt den in den Tabellen im Abschnitt 5.1 verwendeten Pfadangaben.

Literaturverzeichnis

- ALBERTS, B. ET AL. (1995): Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage, Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo : VCH, 1386-87, 1540.
- ALDUS CORPORATION (1992): TIFF 6.0 Specification. Final-June 3,1992, Aldus Corporation, 411 First Avenue South, Seattle,WA 98104-2871, .
- DALLMANN, H., ELSTER, K.H. (1992): Einführung in die höhere Mathematik. 2. Auflage, Band III, Jena: Fischer, 575 ff..
- KNIPPERS, R. (1997): Molekulare Genetik. 7. Auflage, Stuttgart; New York: Georg Thieme, 464.
- KÖHLER, W.,SCHACHTEL, G.,VOLESKE, P. (1995): Biostatistik. 2. Auflage, London;Paris;Tokyo;Hong Kong;Barcelona;Budapest:Springer, 90-98.
- KÜHNEL, S-M.,KREBS, D.(2001): Statistik für die Sozialwissenschaften. Originalausgabe, Hamburg:Rowohlt, 225-304.
- BAGLEY, S., GOLDBERG, M.W., CRONSHAW, J.M., RUTHERFORD, S.A. AND ALLEN, T.D(2000): The nuclear pore complex. Journal of Cell Science **113**, 3885-3886.
- CHANDLER, J.M., COHEN, G.M. AND MACFARLANE, M.(1998): Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following fas-induced apoptosis in mouse liver. J. Biol. Chem. **273**, 10815-10818.
- COHEN, G.M.(1997): Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J **326**, 1-16.

LITERATURVERZEICHNIS

- COLUSSI, P.A., HARVEY, N.L. AND KUMAR, S.(1998): Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. *J. Biol. Chem.* **273**, 24535-24542.
- DAUGAS, E., SUSIN, S.A., ZAMZAMI, N., FERRI, K.F., IRINOPOULOU, T., LAROCLETTE, N., PREVOST, M.C., LEBER, B., ANDREWS, D., PENNINGER, J. AND KROEMER, G.(2000): Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* **14**, 729-739.
- DEFRANCE, T., BILLIAN, G., KRAMMER, P.H., LAGRESLE, C.(1997): Fas-dependent and Fas-independent mechanisms for selection of the mature human B cell repertoire. *Ann N Y Acad Sci* **815**, 67-74.
- EARNSHAW, W.C.(1995): Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 337-343.
- EARNSHAW, W.C., MARTINS, L.M. AND KAUFMANN, S.H.(1999): Mammalian caspases: structure,activation,substrates,and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424.
- ENARI, M., SAKAHIRA, H., YOKOHAMA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A. AND NAGATA, S.(1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50.
- FALEIRO, L. AND LAZEBNIK, Y.(2000): Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol* **151**, 951-959.
- FELDHERR, C.M. AND AKIN, D.(1990): The permeability of the nuclear envelope in dividing and nondividing cell cultures. *J. Cell Biol.* **111**, 1-8.
- FELDHERR, C.M. AND AKIN, D.(1993): Regulation of nuclear transport in proliferating and quiescent cells. *Exp. Cell Res* **205**, 179-186.
- FERRANDO-MAY, E., CORDES, V., BILLER, I., GRILICH, D., MIRKOVIC, J. AND NICOTERA, P.(2001): Caspases mediate nucleoporin cleavage but not early redistribution of transport factors and mRNA in apoptosis.. *Cell Death Differ* **8**, 495-505.

LITERATURVERZEICHNIS

- GOERLICH, D. AND KUTAY, U.(1999): Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 607-60.
- GRUTTER, M.G.(2000): Caspases: key players in programmed cell death. *Curr.Opin.Struct.Biol* **10**, 649-655.
- IRELAND, G., DOPPING-HEPENSTAL, P., JORDAN, P., O'NEILL, G.(1987): Effect of patterned surfaces of adhesive islands on the shape, cytoskeleton, adhesion and behaviour of Swiss mouse 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci, Suppl.* **8**, 19-33.
- KEMINER, O., SIEBRASSE, J.P., ZERF, K., PETERS, R.(1999): Optical recording of signal-mediated protein transport through single nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 11842-11847.
- KERR, J.F., WYLLIE, A.H. AND CURRIE, A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
- KERR, J.F.R. (1971): Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* **105**, 13-22.
- KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., ELLERBY, L.M., WELSH, K., XIE, Z., DEVERAUX, Q.L., SALVESEN, G.S., BREDESEN, D.E., ROSENTHAL, R.E., FISKUM, G. AND REED, J.C.(1999): Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5752-5757.
- KRAMMER, P.H. (1998): The CD95(Apo-1/Fas)/CD95L system. *Toxicol Lett* **102-103**, 131-137.
- KRAMMER, P.H. (2000): CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795.
- LANG, I., SCHOLZ, M., PETERS, R.(1986): Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells. *J Cell Biol* **102**, 1183-1190.

LITERATURVERZEICHNIS

- LECHARDEUR, D., DRZYMALA, L., SHARMA, M., ZYLKA, D., KINACH, R., PACIA, J., HICKS, C., USMANI, N., ROMMENS, J.M. AND LUKACS, G.L.(2000): Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *J. Cell Biol.* **in press 2000**, .
- LIU, X., ZOU, H., SLAUGHTER, C. AND WANG, X.(1997): DFF, a heterotrimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**, 175-184.
- LI-WEBER, M. AND KRAMMER, P.H.(2002): The death of a T-cell: expression of the CD95 ligand. *Cell Death Differ* **9**, 101-103.
- MANDAL, M., ADAM, L. AND KUMAR, R.(1999): Redistribution of activated caspase-3 to the nucleus during butyric acid-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **260**, 775-780.
- MAO, P-L., JIANG, Y., WEE, B.Y. AND PORTER, A.G.(1998): Activation of caspase-1 in the nucleus requires nuclear translocation of pro-caspase-1 mediated by its prodomain. *J. Biol. Chem.* **273**, 23621-23624.
- MARIANI, S.M., MATIBA, B., KRAMMER, P.H.(1996): CD 95 (Apo-1/Fas) and its ligand in the mouse immune system. *Behring Inst Mitt* **97**, 12-23.
- MENDELSON, A.R., HAMER, J.D., WANG, Z.B AND BRENT, R.(2002): Cyclin D3 activates Caspase 2, connecting cell proliferation with cell death. *PNAS* **99**, 6871-6876.
- OBERHAMMER, F.A., HOCHEGGER, K., FRISCHL, G., TIEFENBACHER, R. AND PAVELKA, M.(1994): Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A + B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J. Cell Biol* **126**, 827-837.
- PAINE, P.L., MOORE, L.C. AND HOROWITZ, S.B.(1975): Nuclear envelope permeability. *Nature* **254**, 109-114.

LITERATURVERZEICHNIS

- PETERS, R.(1984): Nucleo-cytoplasmic flux and intracellular mobility in single hepatocytes measured by fluorescence microphotolysis. *EMBO* **3**, 1831-1836.
- RADTKE, T., SCHMALZ, D., COUTAVAS, E., SOLIMAN, T.M., PETERS, R.(2001): Kinetics of protein import into isolated *Xenopus* oocyte nuclei. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 2407-2412.
- RIBBECK, K. AND GOERLICH, D.(2002): The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO* **21**, 2664-2671.
- RIBBECK, K. AND GOERLICH, D.(2001): Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO* **20**, 1320-1330.
- ROBERTSON, J.D., ORRENIUS, S. AND ZHIVOTOVSKY, B.(2000): Review: Nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* **129**, 346-58.
- SAHARA, S., AOTO, M., EGUCHI, Y., IMAMOTO, N., YONEDA, Y. AND TSUJIMOTO, Y.(1999): Acinus is a caspase-3 activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* **401**, 168-73.
- SAMEJIMA, K., VILLA, P. AND EARNSHAW, W.C.(1999): Role of factors downstream of caspases in nuclear disassembly during apoptotic execution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 1591-1598, discussion:1589-9.
- SAMEJIMA, K. AND EARNSHAW, W.C.(2000): Differential localization of ICAD-L and ICAD-S in cells due to removal of a C-terminal NLS from ICAD-L by alternative splicing. *Exp Cell Res* **255**, 314-20.
- SARTORIUS, U., SCHMITZ, I., KRAMMER, P.H.(2001): Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *ChemBiochem* **2**, 20-29.
- SCAFFIDI, C., KIRCHHOFF, S., KRAMMER, P.H., PETER, M.E.(1999): Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **11**, 277-285.

LITERATURVERZEICHNIS

- SCHMITZ, I., KIRCHHOFF, S., KRAMMER, P.H.(2000): Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 1123-1136.
- STEGH, A.H., SCHICKLING, O., EHRET, A., SCAFFIDI, C., PETERHANSEL, C., HOFMANN, T.G., GRUMMT, I., KRAMMER, P.H. AND PETER, M.E.(1998): DEDD, a novel death effector domain-containing protein, targeted to the nucleolus. *Embo J* **17**, 5974-86.
- SUSIN, S.A., LORENZO, H.K., ZAMZAMI, N., MARZO, I., SNOW, B.E., BROTHERS, G.M., MANGION, J., JACOTOT, E., COSTANTINI, P., LOEFFLER, M., LAROCLETTE, N., GOODLETT, D.R., AEBERSOLD, R., SIDEROVSKI, D.P., PENNINGER, J.M. AND KROEMER, G.(1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.
- SUSIN, S.A., DAUGAS, E., RAVAGNAN, L., SAMEJIMA, K., ZAMZAMI, N., LOEFFLER, M., COSTANTINI, P., FERRI, K.F., IRINOPOULOU, T., PREVOST, M.C., BROTHERS, G., MAK, T.W., PENNINGER, J., EARNSHAW, W.C. AND KROEMER, G.(2000): Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *J Exp Med* **192**, 571-579.
- TAKAHASHI, A. AND EARNSHAW, W.C.(1997): In vitro systems for the study of apoptosis. *Adv. Pharmacol.* **41**, 89-106.
- WALCZAK, H. AND KRAMMER, P.H. (2000): The CD95 (Apo-1/Fas) and the TRAIL (Apo-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* **256**, 58-66.
- WYLLIE, A.H., KERR, J.F., AND CURRIE, A.R.(1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306.
- YASUHARA, N., EGUCHI, Y., TACHIBANA, T., IMAMOTO, N., YONEDA, Y. AND TSUJIMOTO, Y.(1997): Essential role of active nuclear transport in apoptosis. *Genes Cells* **2**, 55-64.
- ZHAO, Y., WU, M., SHEN, Y. AND ZHAI, Z.(2001): Analysis of nuclear apoptotic process in a cell-free system. *Cell Mol Life Sci* **58**, 298-306.

LITERATURVERZEICHNIS

R & D SYSTEMS, 614 MCKINLEY PLACE NE, MINNEAPOLIS, MN 55413,

R & D Systems - Caspases,

<http://www.rndsystems.com>, 19.06.2002.

Einleitung : Apoptose und Kernpermeabilität