

Stand: 28.08.2014



# Abschlussbericht

zum Teilvorhaben

## **Skalenübergreifende Lokalisation und Präparation identischer Probenstellen für die molekulare Nanoskopie**

im Verbundprojekt

## **Grundlagen und Verfahren für die Abbildung von Funktion und Struktur in der Nanoskopie**

Zuwendungsempfänger:

**Carl Zeiss AG  
73446 Oberkochen**

Förderkennzeichen:

**13N11402**

Laufzeit des Vorhabens:

**1.3.2011 – 31.8.2014**

Berichtszeitraum:

**1.3.2011 – 31.8.2014**

Teilprojektleitung:

**Dr. Christian Dietrich  
christian.dietrich@zeiss.com**

# Teil I: Zusammenfassung

## 1) Aufgabenstellung

Die im Verbund NanoCombine durchgeführten Arbeiten ordnen sich in die Technologie-Initiative *Optische Technologien in den Lebenswissenschaften - Grundlagen zellulärer Funktionen (Biophotonik 4)* des Bundes ein.

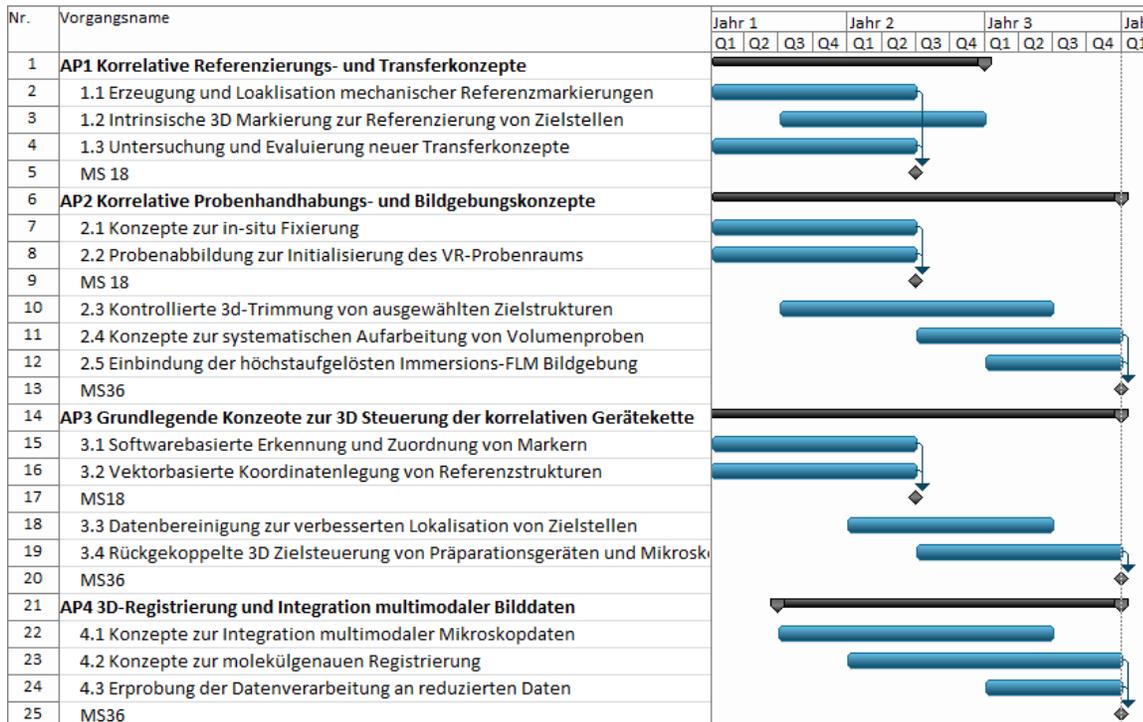
Aufgabe im Teilvorhaben der Carl Zeiss AG bestand in der Erarbeitung von Geräteabläufen, um an identischen Zielstellen sowohl die licht-, als auch elektronenmikroskopische Abbildung von biologischen Gewebe- und Zellstrukturen mit molekularer Auflösung zu ermöglichen. Ziel war es damit an einer Probe funktionelle Vorgänge mit dem Lichtmikroskop (LM) zu studieren und molekülgenau die strukturelle Information eines Elektronenmikroskops (EM) zu überlagern. Zentraler Ansatz im Teilvorhaben bestand darin, sehr leistungsstarke und innovative Mikroskopieverfahren an spezialisierten Geräteplattformen über definierten Probentransfer zu verbinden und die jeweils aufgenommenen Bilddaten auf ultrastruktureller Dimension korrekt zu überlagern.

Nach einer Konzeptionsphase sollte die Umsetzung von erfolgreich erprobten Konzepten so weit vorangetrieben werden, dass zusammen mit Verbundpartnern relevante Applikationen adressiert werden können. Die Carl Zeiss Microscopy GmbH stand als wichtiger Verbundpartner zur Verfügung, um Implementierung an den Spezialgeräten zu unterstützen. Die Erarbeitung und Anpassung der notwendigen korrelativen Probenpräparationen wurde von dem Projektpartner der Universität Heidelberg übernommen. In Zusammenarbeit mit diesem Verbundpartner wurde die Darstellung der Verteilung des Acetylcholin-Rezeptors in Nervensynapsen sowie der Utrastruktur von Viren-Partikel beim Eindringen in die Zelle adressiert. Diese Applikationen wurden ausgewählt, da sie exemplarisch Forschungsbereiche der Neurowissenschaften und Virologie repräsentieren, die von grundlegender gesellschaftlicher Bedeutung sind. Weiterhin wurde eine Interaktion mit dem Verbund „Live Cell Superresolution Mikroskopie“ (Projektpartner Universität Würzburg) vorgesehen, um die Möglichkeit der Einbindung neuester höchstauflösender 3D Lichtmikroskopie Methoden in die erarbeiteten Arbeitsabläufe zu untersuchen.

## 2) Voraussetzungen und Aufplanung

Die Carl Zeiss AG zeichnet sich durch Kompetenzträger im Bereich der Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie aus, die an den Standorten Jena und Oberkochen Zugang zu den innovativsten und leistungsstärksten Mikroskopsystemen im adressierten Applikationsfeld haben. Dies hat bereits vor dem Förderprojekt zur erfolgreichen Initialisierung der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie bei der Carl Zeiss Microscopy GmbH geführt. Produkte wie Shuttle & Find (Wiederspahn M., 2010) standen damit bereits vor dem Förderprojekt zur Verfügung und waren entsprechend patenrechtlich abgesichert. Damit bestanden sehr günstige Voraussetzungen, um die äußerst anspruchsvollen Ziele des Teilvorhabens zu erreichen. Wie in Diagramm 1 dargestellt wurden dazu vier Arbeitsschwerpunkte definiert.

Arbeitspaket AP1 umfasst Untersuchungen für Konzepte zur korrelativen Referenzierung von 3D Proben und deren korrelativen Probentransfer. In Arbeitspaket AP2 wurden technische Probenhandhabungs- und Bildgebungskonzepte erforscht. Arbeitspaket AP3 beschäftigte sich parallel zu AP2 mit den notwendigen Algorithmen und Software-technologischen Grundlagen im Rahmen der VR-Probenraum Realisierung, der Steuerung der Zielpräparation und dem Wiederfinden der Zielvolumina. Arbeitspaket AP4 behandelte schließlich die Aufgabe, die erhaltenen Abbildungsdaten molekülgenau zuzuordnen und in einer 3D Visualisierung zu überlagern.



**Diagramm 1: Arbeitsplan des Teilvorhabens der Carl Zeiss AG**

### **3) Wissenschaftlicher und technischer Stand**

Die wachsende Bedeutung der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie wurde in der Projektlaufzeit durch die wachsende Zahl an Publikationen auf diesem Gebiet sowie der Themenlegung innerhalb von Konferenzen unterstrichen.

Zum einen werden integrative Ansätze verfolgt, wobei Licht- und Elektronenmikroskope in einem Gerät vereinigt werden (Agronskaia et al., 2008; Najan et al., 2013).

Wie bereits im Antrag dargestellt, wurde in diesem Teilvorhaben der Ansatz verfolgt, leistungsstarke Spezialgeräte über definierten Probentransfer zu verbinden, da somit konstruktive Kompromisse obsolet werden, und die Leistungsfähigkeit der einzelnen Mikroskopsysteme uneingeschränkt erhalten bleibt. In der Literatur ist festzustellen, dass aktuelle Arbeiten vorwiegend diesem Ansatz folgen. Besonders interessant und herausfordernd stellt sich die Integration der Hochauflösungsmikroskopie dar, mit der der Auflösungsunterschied zur Elektronenmikroskopie reduziert wird (Kopek et al., 2013; Paez-Segala et al., 2015). Mit der erfolgreichen Implementierung der Lokalisierungsmikroskopie zur korrelativen Darstellung von Serienschnitten, wurde mit dem Teilvorhaben ein neuer internationaler Qualitätsstand erzielt (Fuchs et al., 2014), der eine erfolgreiche Verwertung verspricht.

Weiterhin ist der vermehrte Einsatz der kombinierten Ionenstrahl Ablation mit Rasterelektronenmikroskopie (FIB-REM) im Bereich der Lebenswissenschaften festzustellen (Kizilyaprak et al., 2014). Vilinger et al., 2012 zeigten auf, wie mit dieser Technologie kontrastreiche, hochaufgelöste drei dimensionale (3D) Darstellungen von biologischen Proben möglich werden. Ebenso wurden Verbesserungen in der Aufnahme und Verrechnung von 3D Datensätzen (Narayan et al., 2014; Felts et al., 2010) erzielt. Die Technik erlaubt eine isotrope, in allen Raumrichtungen hohe Auflösung, und verspricht einen hohen Grad an Automatisierung. So wurde auch eine Verbindung der Technik mit 3D Lokalisierungsmikroskopie publiziert (Kopek et al, 2012). Im Teilvorhaben der Carl Zeiss AG gelang es die Verbindung von FIB-REM mit konfokaler Laserscanning Mikroskopie (KLSM) herzustellen. Damit wurde es ermöglicht Kompartimente von Virenpartikel mittels Fluoreszenz (KLSM) zu lokalisieren und die Ultrastruktur der Zielstelle mit FIB-REM darzustellen (Höhn et al., 2015), um ein wesentlich tieferes Verständnis der mit den Virenpartikeln verbundenen biologischen Abläufe zu erhalten. Mit der sehr weiten Verbreitung der KLSM und der adressierbaren applikativen Fragestellungen ist eine Vielzahl von weiteren Anwendungen für diese Geräteketten zu erwarten.

## **Teil II: Eingehende Darstellung**

### **4) Durchführung und Arbeitserfolg**

Alle Arbeitspakete wurden wie geplant bearbeitet. Mit Ausnahme von Arbeitspaket 2.5, das die Einbindung eines hochauflösenden 3D Lichtmikroskopie Verfahrens zum Ziel hatte, wurden alle Arbeitspakete innerhalb der Projektlaufzeit mit erfolgreichen Ergebnissen zum Abschluss gebracht. Die Genehmigung der beantragten zuwendungsneutralen Verlängerung des Verbundvorhabens um 6 Monate war entscheidend, um die gegen Ende der Projektlaufzeit verfügbaren applikative Daten für die adressierten Anwendungen zu erhalten und daraus nachhaltige technische Lösungsansätze zu entwickeln. Mit diesen Daten konnten zusammen mit der Universität Heidelberg zwei Veröffentlichungen erarbeitet werden (Höhn et al., 2015; Pfannmöller et al.) die neben der Darstellung der neu erarbeiteten korrelativen Methoden die Anwendbarkeit für wichtige Themenfelder der Lebenswissenschaften demonstrieren.

Trotz einer Vielzahl von speziellen Präparationsmethoden und Bildgebungsmodalitäten, die bei der korrelativen Mikroskopie Anwendung finden können, hat sich im Teilprojekt bei der systematischen Abarbeitung von Proben (AP 2.4) die grundsätzliche Unterscheidung in Serienschnitte oder Blockproben als sinnvoll und hilfreich erwiesen. Für beide Probentypen wurde jeweils eine korrelative Arbeitskette erarbeitet. Bei Serienschnitten wurde die Verbindung von Hochauflösungslichtmikroskopie (Betzig et al., 2006) mit REM erfolgreich behandelt, und Registriergenauigkeiten von wenigen 10 Nanometern konnten mit Hilfe von korrelativen Referenzpartikeln systematisch realisiert werden. Die zweite korrelative Arbeitskette behandelt den Probentransfer von Blockproben zwischen konfokaler Laserscanning Mikroskopie (LSM) und FIB-REM.

Alle erarbeiteten Markierungs- und Transferkonzepte (AP 1) können einen der beiden korrelativen Arbeitskettens zugeordnet werden. Für Serienschnitte wurden transparente und elektrisch leitende Substratträger für Ultradünnschnitte umgesetzt, die mit geeigneten

Referenzmarkierungen versehen sind, um Zielstellen bis auf wenige Mikrometer genau anfahren zu können. Ebenso wurde ein Zieltrimmer<sup>1</sup> erfolgreich umgesetzt (AP 2.3.), der es erlaubt Zielstellen in Proben bis auf wenige Mikrometer ( $< 5 \mu\text{m}$ ) anzutrimmen. Serienschnitte werden damit nicht zufällig, sondern gezielt für die gewünschten Probenbereiche hergestellt.

Für Blockproben wurden Halterungen und Referenzmarkierungen an Grenzflächen etabliert, um den definierten Transfer zwischen Gerätesystemen der KLSM und FIB-REM sicherzustellen.

Als zielführend hat sich im Projekt der Ansatz erwiesen, die Bildanalyse als einen integralen Bestandteil zur Gerätesteuerung einzusetzen (AP 3). Nur dadurch ließ sich eine robuste Abarbeitung von Proben mit der geforderten hohen Genauigkeit erreichen. Z.B. wurden bei der finalen Implementierung für die Abarbeitung von Serienschnitten die Aufnahmen von Zielstellen erst nach deren Identifikation und Zentrierung ausgeführt. Die automatisierte Erkennung und korrekte Zuordnung von Merkmalen in Bilddaten wurde ein zentraler Bildverarbeitungsbaustein, der eingehend untersucht wurde. Positioniergenauigkeiten von Zielstellen konnten somit in den Bereich des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops ( $\ll 1 \mu\text{m}$ ) gebracht werden.

Um die Registrierung von multimodalen Bilddaten mit einer Genauigkeit von wenigen 10 Nanometern zu erreichen (AP 4), wurde die automatisierte Auswertung der Position von korrelative Mikropartikeln umgesetzt, die der Probe zugegeben wurden. Essentiell ist eine Veränderung der Probenstrukturen bei dem Transfer zwischen Licht- und Elektronenmikroskopen zu vermeiden. Die experimentellen Arbeiten im Teilprojekt der Carl Zeiss AG belegten das umfassende Erfüllen dieser Anforderungen durch das Aufbringen der Serienschnitte auf die im Rahmen des Förderprojektes eingeführten Trägersubstrate (siehe AP 1.1). Solange die lichtmikroskopische Abbildung an Blockproben (AP 2.2) ebenfalls an den eingebetteten und ausgehärteten Blöcken erfolgt ist auch hier eine Veränderung der Probe im REM unbedingt zu vermeiden. Hier besteht eine besondere Abhängigkeit des Erfolges der späteren Korrelation von der Probenpräparation, die sowohl die Fluoreszenzerhaltung für die Lichtmikroskopie, als auch die gleichzeitige Erhaltung der Ultrastruktur zur Abbildung im EM gewährleisten muss. Die präparativen Anforderungen wurden sowohl für Serienschnitte als auch Blockproben erfolgreich von den applikativen Verbundpartnern (Universität Heidelberg) adressiert.

---

<sup>1</sup> Das Gerät wurde zur Leihe an den Projektpartner Universität Heidelberg übergeben.

Ein weiterer wichtiger Verbundpartner für die Durchführung des Teilvorhabens war die Carl Zeiss Microscopy GmbH. Die Interaktion mit Gerätespezialisten war essentiell, um die korrelative Arbeitskettens gemeinsam zu konzipieren und deren Umsetzungen zu erproben.

Wichtig für die applikative Erprobung der erarbeiteten Systemlösungen war insbesondere der Verbundpartner Universität Heidelberg. So wurde mit der Arbeitsgruppe (AG) von Prof. Schröder erfolgreich die hochaufgelöste Darstellung der Rezeptorverteilung an Nervensynapsen an Serienschnitten umgesetzt. Ergebnisse dieser Arbeiten wurden in einem Artikel (Pfanmöller et al.) zusammengefasst und zur Veröffentlichung bei der renommierten Zeitschrift „Nature Methods“ vorbereitet. Weiterhin wurde mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kräusslich für die dort präparierten Blockproben ein Workflow evaluiert und optimiert, der mit der Verbindung von KLSM und FIB-REM die gezielte Identifikation und ultrastrukturelle Abbildung von subzellulären Strukturen erreicht. Zu diesem Arbeitsablauf wurde zusammen mit der AG Prof. Kräusslich ein Manuskript zur Methodik verfasst, das zwischenzeitlich von der Zeitschrift „Journal of Microscopy“ zur Veröffentlichung angenommen wurde (Höhn et al., 2015).

Bei der Planung des Teilvorhabens wurde ein Arbeitspaket zur Einbindung einer innovativen 3D Lokalisierungsmikroskopie (AP 2.5) zum Ende des Teilvorhabens vorgesehen. Die Verbindung dieses innovativen Lichtmikroskopie Verfahrens mit FIB-REM wurde zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sauer (Universität Würzburg) verfolgt. Einzelne Arbeitsschritte wurden erfolgreich getestet. Da die Fixierung und Einbettung der Zellproben noch nicht die notwendige ultrastrukturelle Erhaltung gezeigt hat, hat dieses Arbeitspaket innerhalb des Förderprojekts noch nicht zu den angestrebten applikativen Ergebnissen geführt. Die im Rahmen des Förderprojektes gewonnenen Erkenntnisse sind jedoch so vielversprechend, dass Experten zur Probenpräparation innerhalb der Carl Zeiss Microscopy GmbH auch nach dem Förderprojekt diese Arbeiten unterstützen werden, um diese Zielsetzung zu einem erfolgreichen und verwertbaren Ergebnis zu führen .

## **5) Veröffentlichungen / Verwertung**

Bereits während des Teilprojektes wurden kontinuierlich Ergebnisse zusammen mit Verbundpartnern aus dem Teilvorhaben auf Tagungen präsentiert. Unter Führung der Carl Zeiss AG wurden folgende Präsentationen erstellt:

Poster: Microscopy Conference (MC); Regensburg 25. - 30.08.2013  
**Comparison of localization algorithms for correlative 3D reconstruction of superresolution fluorescence images of ultrathin serial sections**

J. Fuchs<sup>1</sup>, T. Kalkbrenner<sup>2</sup>, I.V. Röder<sup>3</sup>, R.R. Schröder<sup>3,4</sup> and C. Dietrich<sup>5</sup>

1 Carl Zeiss AG, Carl-Zeiss-Str. 22, 73447 Oberkochen, Germany

2 Carl Zeiss Microscopy GmbH, Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena, Germany

3 CellNetworks, BioQuant, Universität Heidelberg, Heidelberg, Germany

4 HEiKA Correlative Imaging Platform, Heidelberg Karlsruhe Research Partnership

5 Carl Zeiss AG, Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena, Germany

Poster: Correlative Microscopy Workshop; Gent (Belgien); 8. - 9.03.2014  
**3D Correlative Superresolution Light and Electron Microscopy based on Serial Sections**

J. Fuchs<sup>1</sup>, C. Wojek<sup>1</sup>, I.V. Röder<sup>2</sup>, R.R. Schröder<sup>2</sup> and C. Dietrich<sup>3</sup>

1 Carl Zeiss AG, Carl-Zeiss-Str. 22, 73447 Oberkochen, Germany

2 Cryo-EM, CellNetworks, BioQuant, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Germany

3 Carl Zeiss AG, Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena, Germany

Vortrag: Focus on Microscopy (FOM); Sidney (Australien) 12.04.2014 - 16.04.2014  
**3D Correlative Superresolution Light and Electron Microscopy based on Serial Sections**

J. Fuchs<sup>1</sup>, C. Wojek<sup>1</sup>, I.V. Röder<sup>2</sup>, R.R. Schröder<sup>2</sup> and C. Dietrich<sup>3</sup>

1 Carl Zeiss AG, Carl-Zeiss-Str. 22, 73447 Oberkochen, Germany

2 Cryo-EM, CellNetworks, BioQuant, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Germany

3 Carl Zeiss AG, Carl-Zeiss-Promenade 10, 07745 Jena, Germany

Zwei Manuskripte, die im Wesentlichen auf Ergebnissen des Teilvorhabens beruhen, wurden zur Publikation bei renommierten wissenschaftlichen Zeitschriften vorbereitet:

*Journal of Microscopy* (angenommen):

**Single-molecule multicolour correlative light and electron microscopy**

Martin Pfannmöller<sup>1,4</sup>, Ira V. Röder<sup>1\*</sup>, Christian Dietrich<sup>2</sup>, Jochen Fuchs<sup>2</sup>, Christian Wojek<sup>2</sup>, Isabel Angert<sup>3</sup>, Armand Béch  <sup>4</sup>, Jo Verbeeck<sup>4</sup>, Sara Bals<sup>4</sup>, Timo Mappes<sup>2</sup>, Rasmus R. Schröder<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cryo-EM, CellNetworks, BioQuant, Universitätsklinikum Heidelberg, Heidelberg, Germany

<sup>2</sup> Carl Zeiss AG, Jena, Germany

<sup>3</sup> Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany

<sup>4</sup> EMAT, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

*Nature Methods* (zur Einreichung vorbereitet):

**Preservation of protein fluorescence in embedded human dendritic cells for targeted 3D light and electron microscopy**

Katharina Höhn<sup>1</sup>, Jochen Fuchs<sup>2</sup>, Alexander Fr  ber<sup>2</sup>, Robert Kirmse<sup>3</sup>, Bärbel Glass<sup>1</sup>, Maria Anders-  sswein<sup>1</sup>, Paul Walther<sup>4</sup>, Hans-Georg Kräusslich<sup>1</sup> and Christian Dietrich<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Infectious Diseases, Virology, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany

<sup>2</sup> Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany

<sup>3</sup> Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany

<sup>4</sup> Electron Microscopy Facility, Ulm University, Ulm, Germany

Weitere Veröffentlichungen, die sich mit den Ergebnissen aus der Anwendung der erarbeiteten Methoden befassen, sind in Vorbereitung.

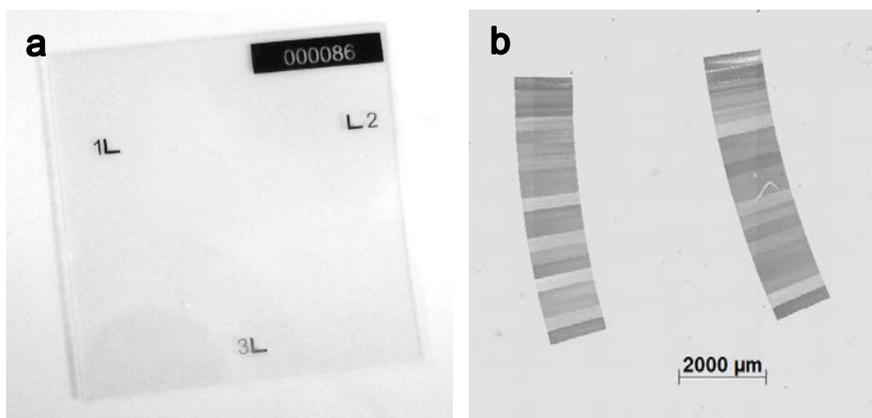
## Teil III:

# Ausführlicher Sachbericht

In diesem Teil wird detailliert auf die Arbeiten eingegangen, die innerhalb der aufgeplanten Arbeitspakete (AP) ausgeführt wurden. Soweit sinnvoll, wurden Ergebnisse aus Zwischen- und Jahresberichten übernommen, die bereits für das Teilvorhaben erstellt wurden.

### **AP1 Erforschung der technischen Grundlagen zur Probenhandhabung und zur gezielten Bildaufnahme in der korrelativen Mikroskopie**

AP 1 wurde entsprechen der Planung bereits zum Halbzeitmeilenstein MS18 abgearbeitet (Siehe Bericht zum Teilvorhaben vom September 2012). Im weiteren Verlauf des Projektes wurden die daraus erzielten Ergebnisse angewendet. Bei der Implementierung von Arbeitsschritten für die Zielapplikationen wurden teilweise noch Optimierungen und Anpassungen vorgenommen. Dies betrifft zum einen die Nutzung der Trägersubstrate (Abb. 1), die für die Ablage von Serienschnitten konzipiert und umgesetzt wurden. Design und Schichtaufbau sind optimiert, so dass für beide Kontraste eine automatisierte Erkennung und präzise Lokalisierung der Referenzmarkierungen mittels Bildverarbeitung erfolgen konnte (siehe AP 3.1).



**Abbildung 1: Trägersubstrat für Licht- und Elektronenmikroskopie mit Referenzmarkierungen die eine präzise und automatisierte Erkennung erlauben.**

**(a) Foto des elektrisch leitenden und transparenten Trägers (Kantenlänge: 22 x 22 mm<sup>2</sup>) mit drei Referenzmarkierung und fortlaufender Substratnummer.**

**(b) Abbildung von zwei Bändern mit jeweils 20 Ultradünnschnitten die im Zentralbereich des Trägers abgelegt wurden. Die 70nm dicken Ultradünnschnitte sind mittels Reflektionskontrast (5x/0.13) dargestellt.**

Für den Transfer von Blockproben wurde ebenfalls ein Halterungssystem implementiert (siehe Höhn et al., 2015 Fig. S1) welches die genaue Ausrichtung der Blockoberfläche senkrecht zur Beobachtungrichtung ermöglicht. Der Halter ist so gefertigt, dass ein einfacher und definierten Transfer zwischen den Mikroskopsystemen ermöglicht wird. Das dazu etablierte Transferkonzept ist detailliert publiziert (Höhn et al., 2015).

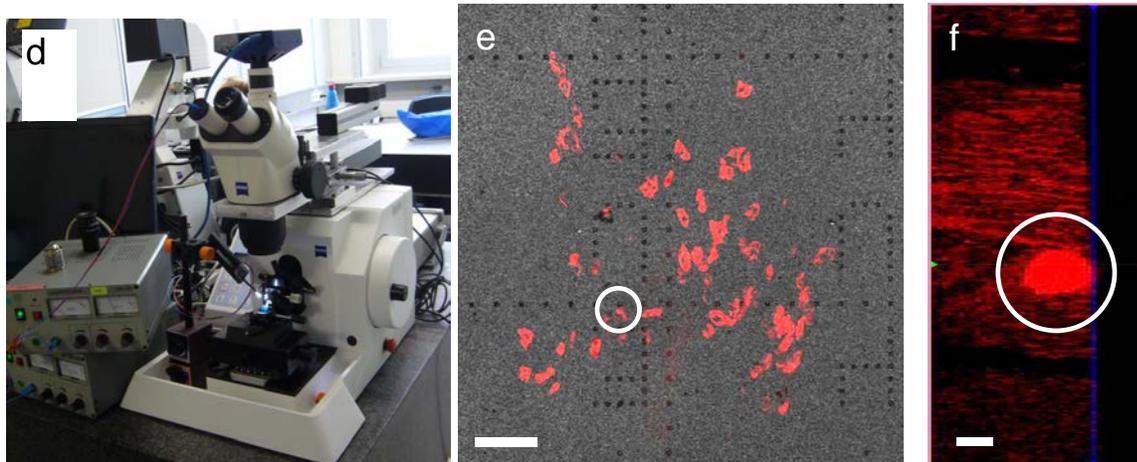
## **AP2 Erforschung der technischen Grundlagen zur Probenhandhabung und zur gezielten Bildaufnahme in der korrelativen Mikroskopie**

Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse zu den Arbeitspaketen AP 2.1, AP 2.2 und AP 2.3 wurde im Zwischenbericht 2012 gegeben und wird hier nur kurz, zusammenfassend behandelt. Innerhalb von AP 2.1 wurde eine Einbettung etabliert, die Lebendbeobachtung von Zellen in geeigneten mikrostrukturierten Substraten erlaubt und deren Fixierung zu keiner signifikanten lateralen Verschiebung führt. Dies gilt ebenso für die nachfolgende Einbettung. Die eingeführte Mikrostrukturierung (AP 1) an der Trägeroberfläche kann als feste Referenzebenen zwischen den verschiedenen Kontrastmodi im LM und EM genutzt werden. Designs und Ausführungen der Mikrostrukturierungen wurden soweit optimiert, dass ein Transfer von Zielkoordinaten zwischen Mikroskopsystemen mit Mikrometer Genauigkeit erreicht werden konnte. Dabei erwiesen sich Referenzfelder in einer Größe von  $200 \times 200 \mu\text{m}^2$  vorteilhaft, die mittels Laserablation oder Diamantspitzen aufgebracht wurden (vergleiche Zwischenbericht 2012).

In AP 2.2 wurden vorteilhafte Abbildungsmodalitäten von Proben im Lichtmikroskop untersucht. Sowohl für Serienschnitte, als auch Blockproben konnten Optiken eingesetzt werden, die auf Wasser- oder Ölimmersionen basieren und höchstauflösende Objektive mit einer numerischen Apertur von bis zu 1.56 zum Einsatz kommen lassen. Dies wurde möglich, da die verwendeten Einbettmaterialien einen zur Immersion ähnlichen Brechungsindex aufweisen, und die erarbeiteten Halterungen eine Verschmutzung durch die verwendeten Immersionsmedien ausschließen.

Der in AP 2.3 adressierte Präzisionstrimmer (Abb. 2) wurde nach Plan umgesetzt und dem Verbundpartner (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Damit war es möglich Zielstellen in Blöcken bis auf wenige Mikrometer ( $< 5 \mu\text{m}$ ) freizulegen, um daraus Serienschnitte

herzustellen. Wie in Abbildung 2b dargestellt, werden dazu Referenzmarkierungen an der Oberfläche des Einbettungsblocks genutzt. Die Position von Zielstellen, die mittels Fluoreszenzbildgebung an einem Lichtmikroskop identifiziert werden (vergleiche AP 2.2), können in diesem Referenzsystem sichtbar gemacht werden. Die Freilegung der Zielstelle erfolgt über die Trimmung des Blocks bis zu der festgelegten Referenzkoordinate, wobei nur wenige Mikrometer Sicherheitsabstand vorgesehen werden müssen. Dadurch wurde bei der Bildgebung in erheblichem Maße Zeit eingespart und die aufgenommene Datenmenge reduziert.



**Abbildung 2: Ergebnisse zu Arbeitspaket 2.3 Präzisionstrimmer**

**(a) Foto des Gerätesystems. (b) In Harz eingebettetes Muskelgewebe mit Fluoreszenz markierten neuromuskulären Synapsen (rot) und Oberflächenmarkierungen (grau) die zur Referenzierung an der Blockoberfläche aufgebracht sind. Zielstelle ist mit einem weißen Kreis markiert und wurde angetrimmt. (c) Kontrollaufnahme nach dem Trimmen von der Seite. Blaue Linie markiert die angetrimmte Oberfläche. Maßstabsbalken: (b) 50 µm, (c) 10 µm.**

AP 2.4 Konzepte zur systematischen Aufarbeitung von Volumenproben:

AP2.4 stellte ein zentrales Arbeitspaket des Teilvorhabens dar, in dem viele Ergebnisse aus anderen Arbeitspaketen einfließen, um die angestrebten applikativen Fragestellungen adressieren und erfolgreich abarbeiten zu können.

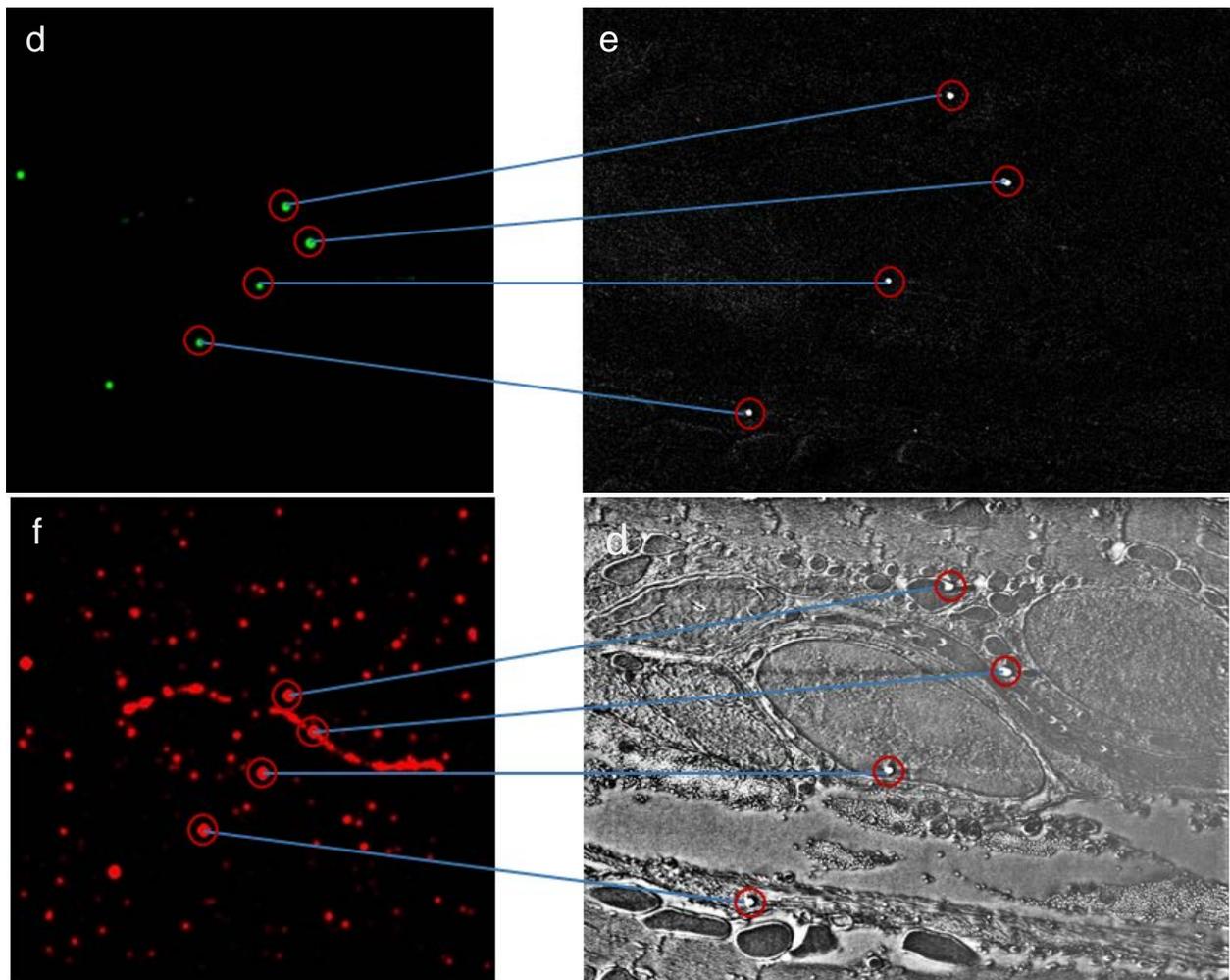
**Abarbeiten von ultradünnen Serienschritten**

Einerseits wurde die korrelative Darstellung der Rezeptorverteilung in Synapsen mittels der sogenannten Array Tomography (Micheva et al., 2007) adressiert. Dazu wurde von der Zielstelle, nach Freilegung mit dem Mikrotom, eine Serie von Ultradünnschnitten hergestellt und auf transparenten, elektrisch leitfähigen Substraten abgelegt (siehe AP. 1). Bei einer Schnittdicke von ca. 70nm sind einige hundert Schnitte notwendig um eine Synapse vollständig aufzuarbeiten. Startpunkt für die robuste und systematische Abarbeitung der korrespondierenden Zielstellen auf den Schnitten, ist die automatisierte Erkennung der Schnittpositionen über eine Schnittranderkennung (siehe AP 3.2). Nach der Identifizierung einer Zielstelle in einem Schnitt, werden die Koordinaten der korrespondierende Zielstellen in allen anderen Schnitten durch geometrische Übertragung) ermittelt. Es zeigt sich beim Anfahren, dass die damit erzielte Anfahrgenauigkeit der Zielstellen bei  $\pm 25 \mu\text{m}$  liegt. Damit kann sichergestellt werden, dass die Zielstelle nach dem Anfahren der Zielkoordinaten sich im Bildfeld eines Lichtmikroskops (ca.  $70 \mu\text{m}$  Kantenlänge für Sichtfeld eines 100x Objektivs) befindet. Für die hochauflösende Lokalisierungsmikroskopie oder REM ist diese Anfahrgenauigkeit allerdings nicht ausreichend, da große Datenmengen von nicht relevanten Probenbereichen aufgenommen werden müssten, um sicherzustellen, dass die Zielstelle sicher abgebildet wird. Daher wurden Bildverarbeitungsalgorithmen implementiert, um Zielstellen im Lichtmikroskop zu erkennen, und deren Zielkoordinaten zu optimieren (Zielstellen-Optimierung). Details zu diesem Vorgehen sind im Abschnitt zu AP 3.4 dokumentiert.

Für das genaue Anfahren von Zielstellen im REM und zur hochgenauen Registrierung (siehe AP 4.2) wurden korrelative Referenzpartikel auf die Schnitte aufgebracht, die mit geeigneten Aufnahmeparametern sowohl im LM (Abb. 3a ) als auch im REM (Abb. 3b) sehr selektiv sichtbar gemacht werden können. Kolloides Gold von 80nm Partikelgröße und 100nm kleine fluoreszierende Polystyrolpartikel erwiesen sich als vorteilhafte Referenzmaterialien. Dagegen waren die ursprünglich favorisierten Q-Dots problematisch, da ein signifikanter Anteil der Nanopartikel keine Fluoreszenz zeigte, und eine Zuordnung somit erschwert wurde (siehe AP 3.3). Durch die Erkennung der Referenzpartikel wurde es möglich, die Position für die zeitaufwendige Detailaufnahme für das REM genau vorherzubestimmen (Abb. 3d). Ungenauigkeiten des Probentischsystems, die sich noch im Bereich von mehreren Mikrometern

befinden, konnten damit korrigiert werden. Weiterhin wurden die Referenzpartikel zur Driftkorrektur der Zeitserie verwendet, die aufgenommen werden muss, um die hochaufgelöste lichtmikroskopische Darstellung der Synapse zu erhalten (Abb. 3c).

Die gesamte korrelative Arbeitskette ist detailliert in einem zur Einreichung anstehenden Manuskript (Pfanmüller et. al.) dokumentiert. Dort ist ebenfalls die Implementierung der hochaufgelösten Lokalisierungsmikroskopie beschrieben und eine dreidimensionale Darstellung der Rezeptorverteilung von Acetylcholin gezeigt.



**Abbildung 3: Nutzung von korrelativen Referenzpartikeln zur Steuerung und Registrierung.**

*Mit angepassten Bildaufnahmeparameter können Referenzpartikel spezifisch und kontrastreich im LM (a) und EM (b) dargestellt werden. Damit wird es möglich die Position der Partikel genau zu bestimmen und Positionsinformationen aus der LM Hochauflösungsaufnahme (c) zur Festlegung der hochaufgelösten Aufnahme mit dem EM (d) zu nutzen.*

### ***Abarbeiten von Blockproben***

Im Zwischenbericht 2012 wurde bereits das verfolgte Konzept zur Aufarbeitung von Blockproben beschrieben. Dabei wird das Zielvolumen in einem Harzblock über die 3D Bildgebung mit einem Konfokalen Lichtmikroskop (KLSM) bestimmt. Über Mikrostrukturen an der Blockoberfläche wird die Position von Zielstellen referenziert. Durch Registrierung des Oberflächenbildes das mit dem FIB-REM aufgenommen wird, kann die Zielstelle präzise vorhergesagt, und die 3D Bilddatenaufnahme gesteuert werden. Die Genauigkeit der Methode wurde systematisch untersucht mittels fluoreszierender Partikel ( $\varnothing 5 \mu\text{m}$ ) die als Teststrukturen in das Harz eingebettet wurden. Fig. S2 (Höhn et al., 2015) zeigt ein typisches Ergebnis dieser Evaluierung und belegt eine Genauigkeit beim Anfahren der Zielstellen im FIB-REM von besser als  $1 \mu\text{m}$ .

Ein Schema der vollständigen Arbeitskette die zusammen mit den Partnern der Universität Heidelberg (AG Prof. Kräusslich) für Suspensionszellen im Rahmen des Förderprojektes erarbeitet wurde ist in Fig. 1 in Höhn et al. (2015) dargestellt. Diese beginnt mit der Lebendbeobachtung der Zellen und führt über die Identifikation und Darstellung von fluoreszierenden Virenkompartiments mittels KLSM zur hochaufgelösten ultrastrukturellen Darstellung des Kompartiments, wofür die FIB-REM Technologie eingesetzt wurde. Applikative Ergebnisse sind in Fig. 4 (Höhn et al., 2015) zusammengestellt.

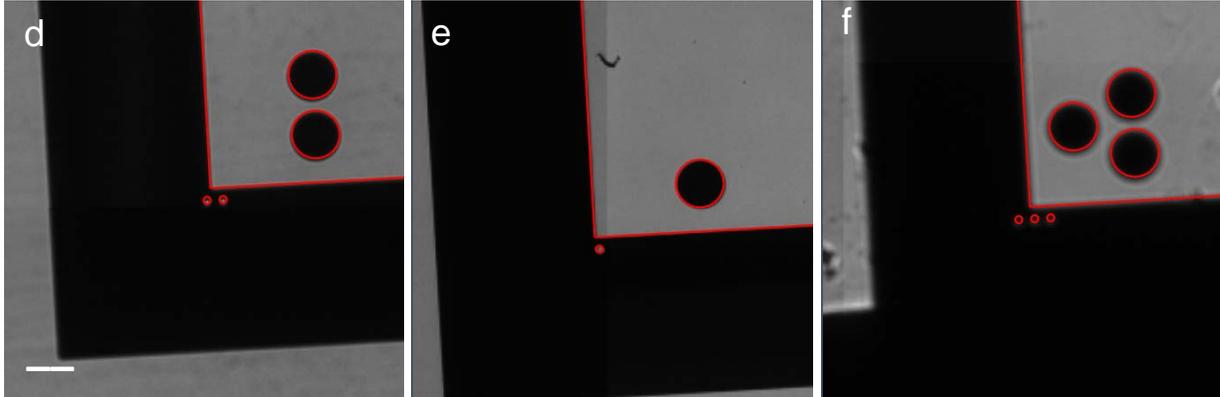
AP 2.5 Einbindung der höchstauflösten Immersions-FLM Bildgebung:

In diesem Arbeitspaket wurde die Kombination von 3D Hochauflösungsmikroskopie mit Elektronenmikroskopie vorgesehen. Erfolgreiche Vorarbeiten wurden bereits im Zwischenbericht 2012 dokumentiert, in dem die axiale Lokalisierung von Testpartikel mit einer Genauigkeit von 30nm dokumentiert wurde. In Abstimmung mit der AG Prof. Sauer (Universität Würzburg) aus dem Verbund *Integriertes Live Cell 3D Super-Resolution Imaging* wurden Kernporen als Modellsystem ausgewählt, da für dieses System die Aufnahme von 3D Hochauflösungsbildern mittels Lokalisierungsmikroskopie bereits gezeigt wurde. Mehrere Versuche wurden unternommen, die Präparate nach der 3D Lichtmikroskopie für die FIB-REM Mikroskopie zu kontrastieren und in ein Harz einzubetten. Die Zielstellen konnten mit Hilfe der etablierten KLSM FIB-REM Arbeitskette mit der gewünschten Genauigkeit angefahren werden. Leider zeigten die Präparate nicht die erforderliche ultrastrukturelle Erhaltung und lieferten im REM keine verwertbaren morphologischen Bilder. So konnte innerhalb der Projektlaufzeit noch keine erfolgreiche applikative Umsetzung demonstriert werden. Experten zur Probenpräparation innerhalb der Carl Zeiss Microscopy GmbH werden nach dem Ende der Förderung des Projektes diese Arbeiten unterstützen, um diese Zielsetzung zu einem erfolgreichen und verwertbaren Ergebnis zu führen.

**AP3 Erprobung grundlegender Konzepte zur 3D Steuerung der korrelativen Geräteketten**

AP 3.1. Erforschung der Software basierten Erkennung sowie Zuordnung von Markern und Probenstrukturen zur Probenreferenzierung:

Die wichtigsten Ergebnisse aus AP 3.1. wurden entsprechend dem Arbeitsplan bereits im Zwischenbericht zum Halbzeitmeilenstein dokumentiert. Im weiteren Verlauf des Vorhabens wurden die erzielten Ergebnisse genutzt und in den erarbeiteten korrelativen Arbeitskettens implementiert. Als Beispiel zeigt Abbildung 4 das Ergebnis der automatisierten Erkennung von Referenzmarkierungen, die auf den Trägersubstraten für die Ablage von Serienschnitten aufgebracht sind. Diese wurden so entworfen, dass die Indizierung der Referenzmarkierung über die Anzahl von dort hinterlegten Kreisstrukturen erfolgt, die durch Bildanalyse erkannt werden und somit eine eindeutige Zuordnung der Referenzmarkierungen erlaubt. Ebenfalls wird die Verdrehung der Probe aus der Orientierung der Linienstrukturen extrahiert, und beim Anfahren der verschiedenen Referenzpositionen berücksichtigt.



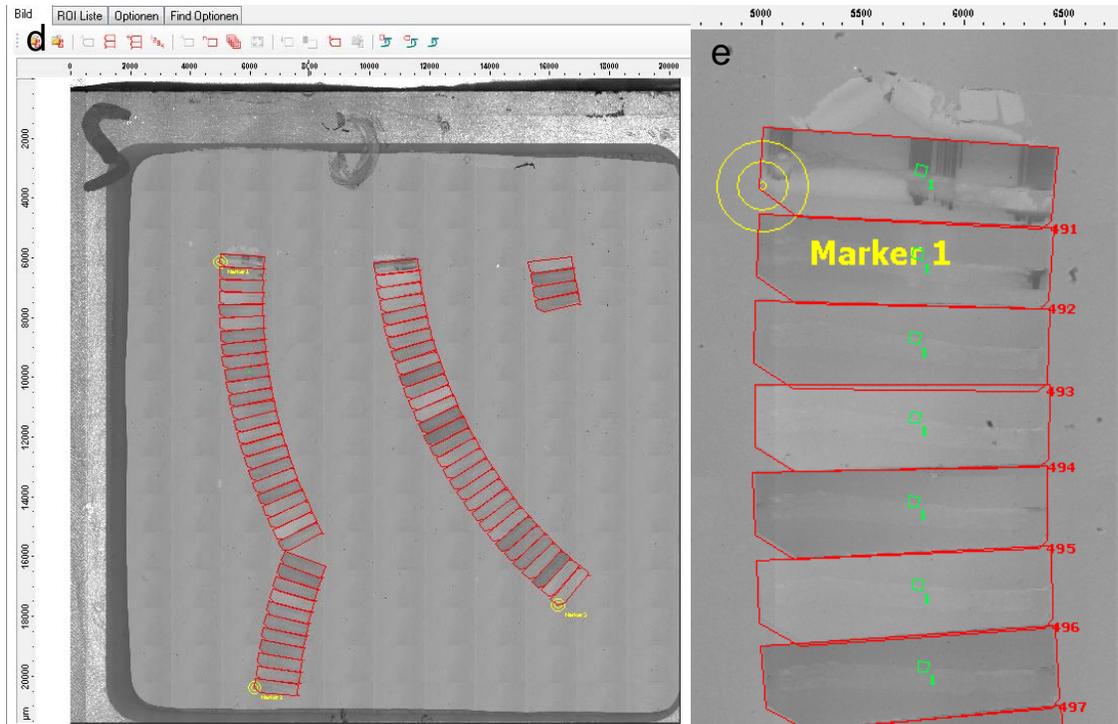
**Abbildung 4: Automatisierte Erkennung von Referenzmarkierungen auf Trägersubstrat.**

**Von der Bildanalyse erkannte Strukturen in (a), (b) und (c) werden als rote Überlagerung dargestellt. Linien erlauben die Ermittlung der Orientierung und Position der Referenzstruktur, während Kreise die Indizierung kodieren. Skalenbalken in (a) entspricht 60  $\mu\text{m}$ .**

### AP 3.2. Vektorbasierten Koordinatenlegung von Referenzstrukturen zur flexiblen Probennavigation:

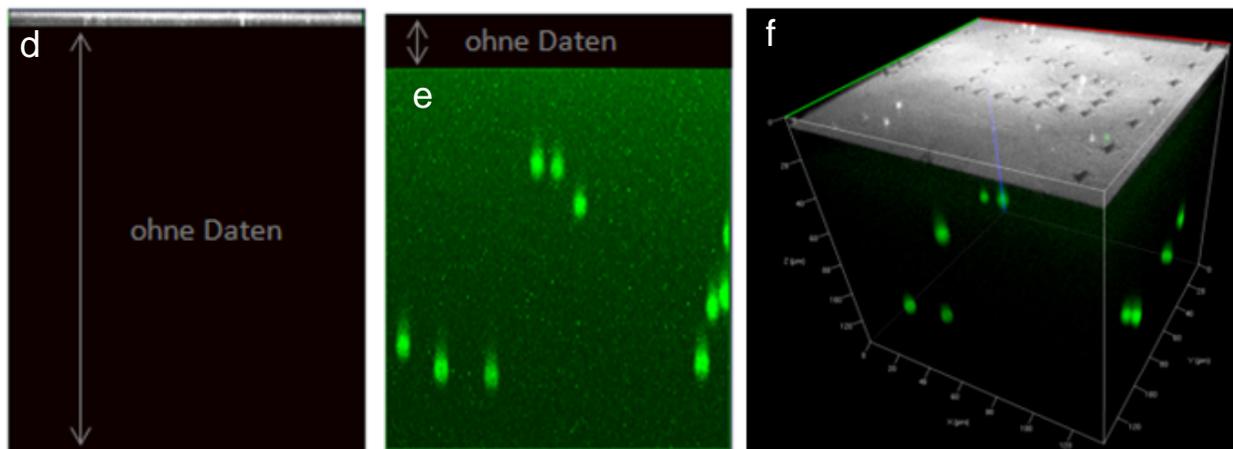
Konzeptionell sehr wichtig war die Integration von Bild- und Referenzdaten in einen virtuellen Probenraum. Dazu wurden für 2D (siehe Abbildung 5) und 3D (Abbildung 6) Softwareplattformen erarbeitet. Der Probenraum für Serienschnitte diente ebenso zur kontrollierten Steuerung der Mikroskopsysteme, um zu den entsprechenden Zielstellen zu gelangen (grüne Rahmen in Abb. 5b). Die definierte Verwaltung der Informationen zur Lage und Orientierung von Zielstellen stellte im Verlauf der Arbeiten einen wichtigen Eingangsparameter dar, um die Robustheit der Alignierungsroutinen durch eine gute Initialisierung sicherstellen zu können. Festlegungen von Konventionen zur Beschreibung von Referenzstrukturen, Proben und Gerätekoordinaten waren dazu notwendig.

Dies gilt ganz analog für die korrelative Geräteketten von Blockproben. Da ein LSM eine Vielzahl von Optionen zur Abbildung von Probenbereichen mit unterschiedlichen Rotations- oder Zoomparametern bietet, müssen Bilddaten korrekt und eindeutig gegenüber dem Koordinatensystem der Referenzfläche referenziert werden (siehe Abb. 6).



**Abbildung 5: Umsetzung des virtuellen Probenraum(2D) für Serienschicht-Proben.**

(a) Neben der Darstellung der Ultradünnschnitte werden Ergebnisse aus der Schnitttranderkennung (rote Polygone) und manuell oder automatisch erkannte Referenzstrukturen in einem virtuellen Probenraum verwaltet. (b) Detailansicht visualisiert die Lagen von korrespondierenden Zielstellen (grüne Rahmen) im Probenraum und die Indizierung der abgelegten Schnitte.

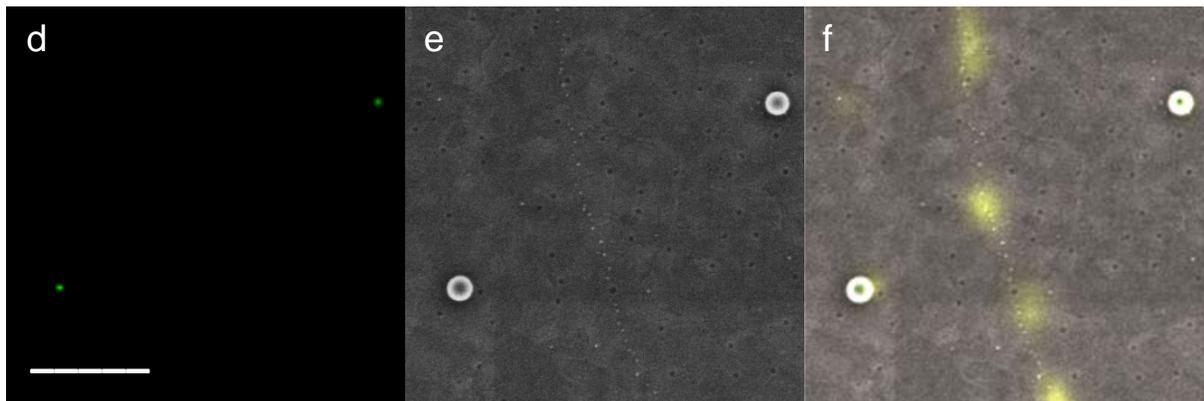


**Abbildung 6: Virtuelle Probenraum (3D) für Blockproben zur Integration von Bilddaten.**

(a) Darstellung des Probenraums in orthogonaler Projektion zur optischen Achse des Mikroskops für konfokalen Reflektionskontrast. Damit wird die Referenzebene an der Oberfläche dargestellt die als helle Linie erkennbar ist während der größte Teil für diesen Kanal ohne Daten bleibt. (b) Analoge Darstellung des konfokalen Fluoreszenzsignals (grün) im Probenblock. (c) Animierte Darstellung der im virtuellen Probenraum zusammengefassten Daten. Die fluoreszierenden Partikel (grün,  $\varnothing$  5  $\mu$ m) werden durch die an der Oberfläche vorhandenen Markierungen exakt in ihrer Lage referenziert.

AP 3.3. Datenbereinigung zur verbesserten Lokalisation von Zielstellen:

Die im Zwischenbericht 2012 beschriebenen Arbeiten an Modellpartikeln wurden an applikativen Nanopartikeln fortgesetzt. Unter anderem wurden Q-Dots, kolloides Gold und mit Fluoreszenzfarbstoff versehene Nanopartikel evaluiert. Bei der applikativen Umsetzung wurden bevorzugt 100nm große Fluoreszenzpartikel verwendet. Größere Referenzpartikel weisen eine hohe Signalstärke auf, womit eine Lokalisierungsgenauigkeit von wenigen Nanometern sowohl für das LM als auch EM sichergestellt werden konnte. Wesentlich ist ebenfalls, dass diese auch selektiv im LM und REM dargestellt werden können, womit eine fehlerhafte Zuordnung zuverlässig ausgeschlossen werden kann. Die untersuchten Q-Dots zeigten dagegen teilweise keine Fluoreszenz (siehe Abb. 7c).



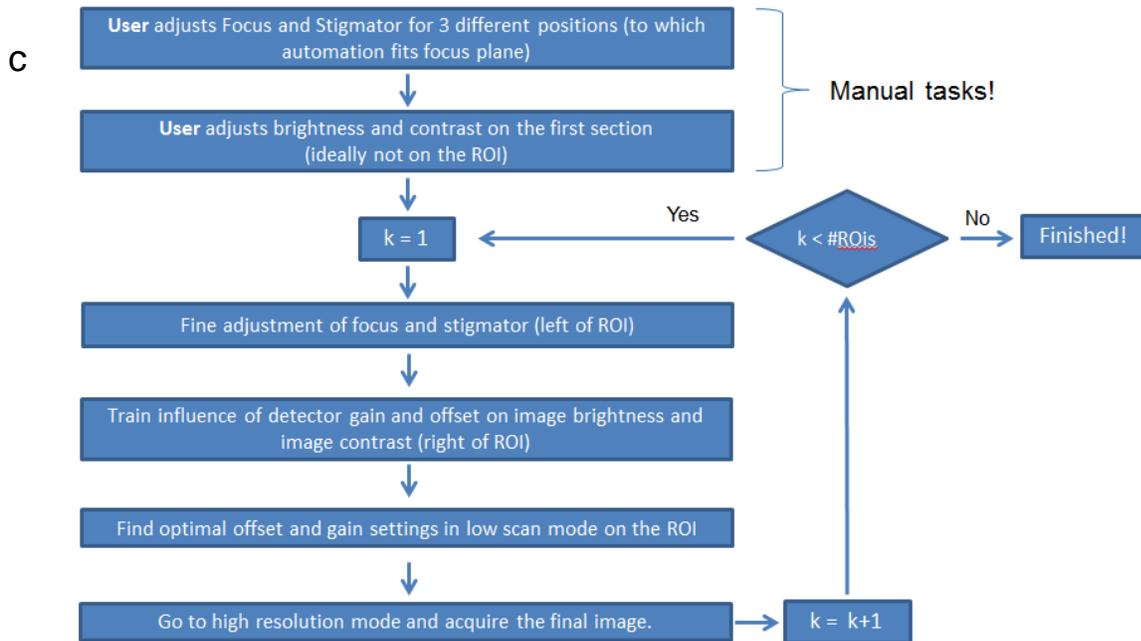
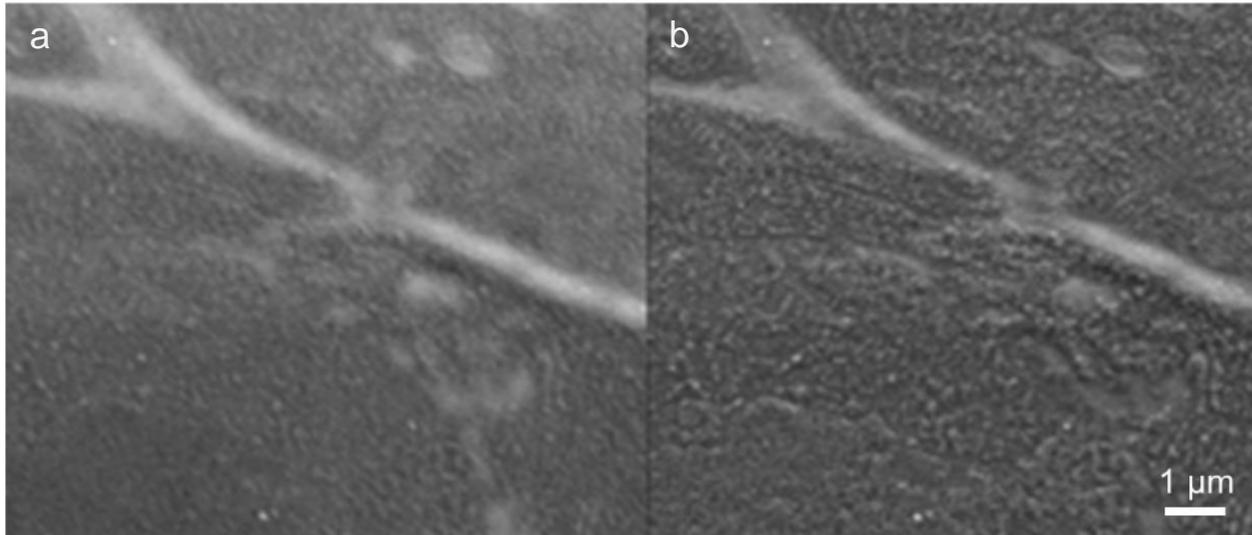
**Abbildung 7: Darstellung von korrelativen Referenzpartikeln (fluoreszierende Polystyrolpartikel  $\varnothing$  100nm) die zusammen mit Q-Dots auf Substratträger aufgebracht wurden.**

**(a) Ergebnis der Lokalisierung der Polystyrolpartikel im LM ergibt zwei grüne Zentroide. (b) REM erlaubt exakte Darstellung der Partikel über ihre Morphologie (c) Überlagerung von Hochauflösungs-Fluoreszenzkanal der Q-Dots (gelb) mit REM basiert auf Registrierung der ermittelten Positionen für die Referenzpartikel. Skalenbalken in (a) entspricht 500 nm.**

AP 3.4. Untersuchung der rückgekoppelten 3D Zielsteuerung von Präparationsgeräten und Mikroskopen:

Wie im Zwischenbericht 2012 angemerkt wurde, ist die Sicherstellung der Bildgüte bei der automatisierten Aufnahme von Zielstellen essentiell, um robuste Steuerungsparameter aus der Bildauswertung zu erhalten. Dies betrifft sowohl die korrekte Positionierung der Bildaufnahmeestelle in drei Dimensionen, als auch die korrekte Wahl von Einstellparametern bezüglich Helligkeit und Kontrast. Insbesondere für REM besteht die Notwendigkeit, erste aufgenommene Bilder mittels digitaler Bildalgorithmen auszuwerten, und mit Hilfe der Ergebnisse

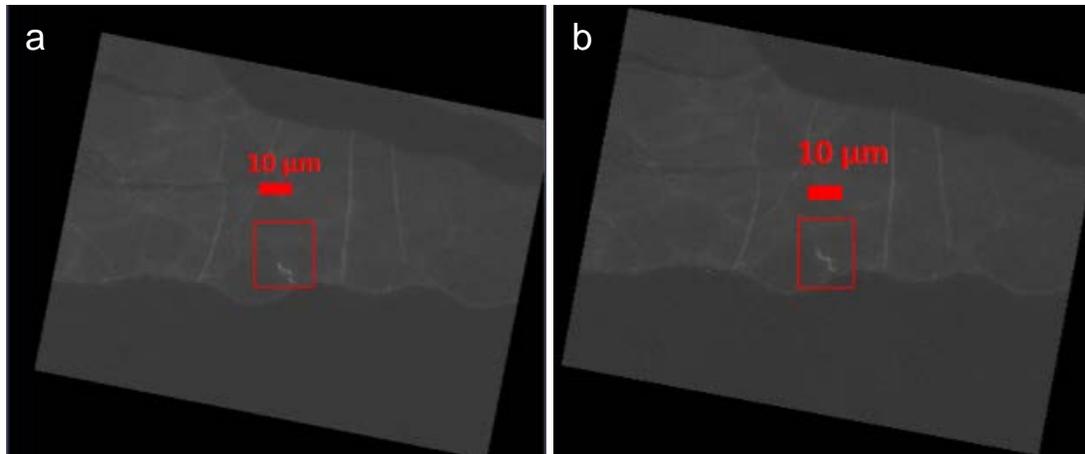
die eigentlichen Detailaufnahmen zu verbessern. Für Serienschritte konnte damit eine automatisierte Bildaufnahme von korrespondierenden Zielstellen umgesetzt werden, bei denen immer eine optimale Bildschärfe sichergestellt wird. Abbildung 8 zeigt den Vergleich einer Aufnahme ohne und mit dieser Rückkopplung.



**Abbildung 8:** Vergleich der Aufnahme eines Ultradünnschnittes im REM.-Bildaufnahme vor (a) und nach (b) einer automatisierten Rückkopplung zur Bildparameteroptimierung. (c) Implementiertes Feedback-Schema.

Analog gilt dies auch für die laterale Positionierung der Bildaufnahme. Gerade bei hochauflösender LM, die zu kleinen Bildfeldern führt, ist es essentiell die Zielstelle innerhalb des

Bildfelds des Detailbildes korrekt auszuwählen. Dazu wurde eine Zielstellenoptimierung implementiert, die innerhalb von Detailbildern die eigentlichen Zielstellen identifiziert. Abbildung 9 zeigt den Vergleich der Zielstellenauswahl ohne und mit einer bildbasierten Positionsoptimierung. Dabei ist zu erkennen, dass erst nach der Zielstellenoptimierung, die neuromuskuläre Synapse (NMJ) im Zentrum des Detailbildes (roter Rahmen) liegt. So war es möglich die Lage der Zielstelle korrekt an das LM weiterzugegeben.



**Abbildung 9:** Vergleich der Zielstellenbestimmung auf einem Ultradünnschnitt ohne (a) und mit (b) bildbasierter Zielstellen-Optimierung

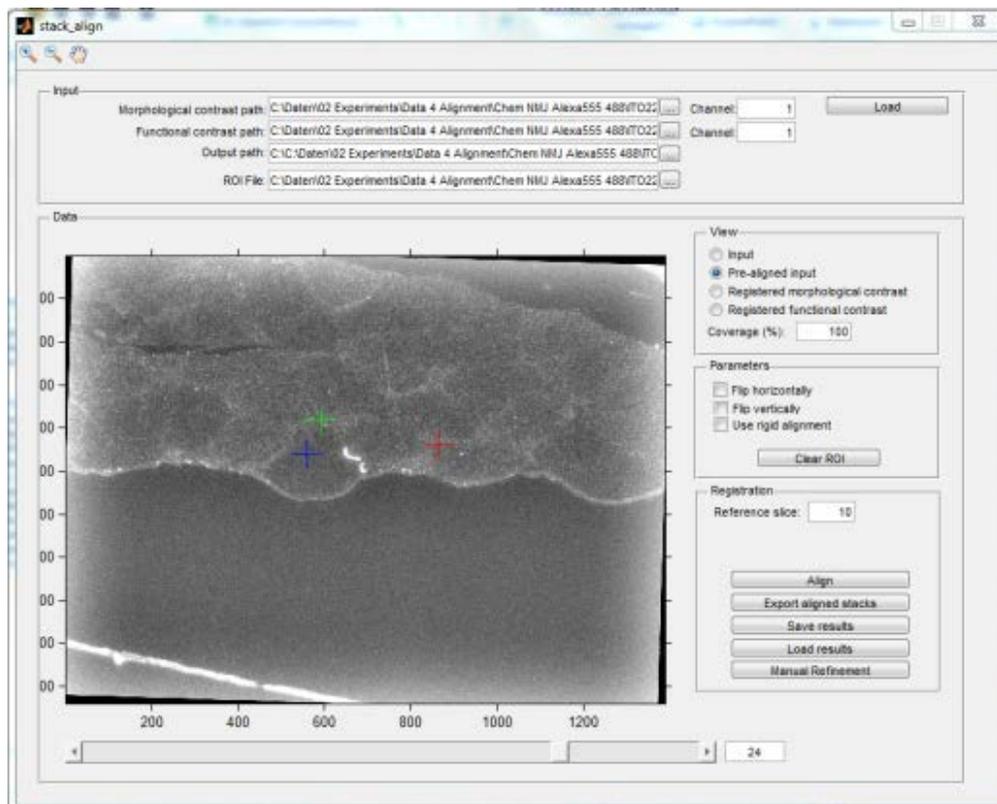
## **AP4 Erforschung der 3D-Registrierung und Integration multimodaler Bilddaten**

### AP 4.1. Untersuchung zur Integration multimodaler Mikroskopdaten:

Bis zum Ende des Vorhabens wurde die bereits aufgesetzte Bildverarbeitungsstrecke für die Verrechnung von Serienschritten mit weiteren Funktionen versehen. Dazu wurde ein Alignierungsdemonstrator prototypisch mit Matlab (MathWorks, Natick USA) umgesetzt. Dieser wurde mit einer Bedieneroberfläche (siehe Abbildung 10) versehen, um in der Bildverarbeitung unterschiedlichste vorgebildeten Anwendern die Verarbeitung von applikativen Daten zu erlauben. Wichtig ist, dass dabei zusätzlich die Option einer manuellen Interaktion hinterlegt wurde, um fehlerhafte automatisierte Alignierungen an qualitativ minderwertigen Schnitten manuell zu korrigieren. Solch fehlerhafte Schnitte treten manchmal am Anfang (Anschnneiden) von Teilbändern auf und führen an einem Schnitt zu einer fehlerhaften automatisierten Alignierung, die sich über die gesamte weitere Verarbeitung fortsetzt. Ebenso wurden mehrere Funktionalitäten implementiert, um die Alignierung robuster zu machen. Ein Beispiel dieser

Verbesserung ist die Einschränkung des regionalen Suchbereichs zur Alignierung von detektierten Features.

Weiterhin war es essentiell Informationen zu der Probenorientierung, die aus Gerätesteuerung oder Bildauswertung zur Verfügung stand, korrekt im Koordinatensystem des virtuellen Probenraums zu verwalten, und für die Alignierung oder auch Registrierung zu nutzen. Insbesondere erlaubte dies, Datensätze korrekt vor zu orientieren, womit die Robustheit gesteigert und Zeitaufwand zur Verrechnung reduziert werden konnte.



**Abbildung 10: Graphische Nutzeroberfläche des Alignierungsdemonstrators, zum Abarbeiten von applikativen Datensätzen.**

Der implementierte Algorithmus arbeitet sowohl mit funktionellen Fluoreszenz-, als auch morphologischen Brückenkontrast. Es zeigte sich, dass die Freigabe der Skalierung als Fitparameter bei längeren Schnittserien zu einer signifikanten Vergrößerung oder Verkleinerung von Schnitten führt, die außerhalb der Messungenauigkeit der Bildaufnahme liegen. Robuster und damit zu bevorzugen war die Vorgabe einer rigiden Alignierung. Beispiele für Ergebnisse die mit Hilfe des Demonstrators erzielt wurden erscheinen in dem zur Publikation angenommenen (Höhn et al., 2015) und zur Einreichung vorbereiteten Manuskript (Pfanmüller et al.).

AP 4.2 Molekülgenaue Registrierung von Datensätzen:

Um LM und SEM Bilddaten bis auf wenige Nanometer genau zu registrieren ist es notwendig, Partikel auf die Probe zu bringen, die in beiden Kontrastmethoden auf wenige Nanometer genau lokalisiert werden können (vergleiche AP 3.3). Erste applikative Ergebnisse die auf diesen Ansatz basieren wurden bereits für den Berichtszeitraum 2013 dokumentiert. Folgende Aspekte wurden im weiteren Projektverlauf eingehende behandelt:

- Es ist darauf zu achten, dass ausreichend Referenzpartikel im Bildfeld auswertbar sind. Um eine Affintransformation anzugeben sind mindestens 4 auswertbare Partikel notwendig, weitere sind erforderlich, um statistische Abschätzung zur Registrierengenauigkeit abzuleiten.
- Die Partikel müssen so gewählt werden, dass für beide Systeme eine hohe Lokalisierungsgenauigkeit sichergestellt ist. So konnten bessere Ergebnisse mit größeren Partikeln (ca. 100nm Polystyrol oder 80nm Kolloidgold) erzielt werden, da diese sowohl im LM, als auch im EM selektiv und mit hohem Verhältnis von Signal zu Rauschen dargestellt werden können. Die erzielbaren Lokalisierungsgenauigkeiten lagen bei diesem Ansatz bei ungefähr 5nm.
- Die Referenzpartikel müssen stabil auf den Gewebeschnitten immobilisiert sein, so dass es zu keinen Änderungen in den Partikelpositionen durch den Proben transfer kommt. Die Untersuchungen ergaben, dass dies für die Ultradünnschnitte auf den Trägersubstraten sehr gut gewährleistet ist.

Analog zum Alignierdemonstrator wurde die Bildverarbeitungsstrecke zur Registrierung mittels Matlab (MathWorks, Natick USA) umgesetzt und ist wie folgt aufgebaut. Jedes Referenzpartikel wird beschrieben durch den Abstand zu den nächsten Nachbarn. Mittels eines RANSAC Schemas (Fischler und Bolles, 1981) wird schnell und zuverlässig eine Lineartransformation abgeleitet, die das euklidische Abstandsmaß korrespondierender Partikelpaaren minimiert. Partikel, die nur in einer Bildmodalität vorliegen, werden damit zuverlässig identifiziert und von einer weiteren Verarbeitung ausgeschlossen. Schließlich werden Partikelpaare mit Abstandmaßen, die außerhalb einer sinnvollen statistischen Verteilung liegen, verworfen und nicht für die finale Berechnung der affinen Transformation berücksichtigt. Diese beschreibt die Registrierung der beiden Bildmodalitäten. Beispiele für Ausreißer die verworfen werden, sind z.B. Partikelpaare die zu nahe beieinander liegen und im LM nicht korrekt in ihrer Position dargestellt werden.

Um die Genauigkeit des Verfahrens zu testen wurden die Abstandmaße statistisch analysiert. Mittlerweile wurde der Arbeitsablauf soweit für Serienschnitte ausgearbeitet (siehe AP 2.4), dass

LM und SEM Bilder von Synapsen in Muskelgewebe systematisch mit einer Genauigkeit von ungefähr 20nm überlagert werden können.

AP 4.3. Erprobung der Datenverarbeitung an reduzierten Daten:

Die Notwendigkeit der Datenkomprimierung ist bei den großen aufgenommenen Datenmengen evident. Für eine relativ kleine NMJ mit der Dimension  $5 \times 20 \times 20 \mu\text{m}^3$  ergeben sich bei einer Voxelgröße von  $5 \times 5 \times 5 \text{ nm}^3$  bereits für das FIB-REM eine Datenmenge von 16 GByte. Weiterhin zeigt sich, dass die Verrechnung von Bildinformationen notwendig wird, die auf sehr unterschiedlichen Skalierungsgrößen basieren.

Im Projekt wurde daher versucht, die Daten auf eine Art zu komprimieren, die eine schnelle und genaue Verarbeitung ermöglicht. Dabei erwies sich der Ansatz zielführend, Bilddatensätze bei der Verarbeitung als eine Ansammlung von Merkmalselementen zu betrachten. Vorteilhaft dabei ist, dass

- die Komprimierung auf den jeweiligen Bildkontrast angepasst werden kann.
- die Komprimierung angepasst ist für die essentiellen Verarbeitungsanforderungen bezüglich Bildregistrierung und Alignierung.
- ermittelte Positionen skaleninvariant als Vektorelemente hinterlegt werden können.
- die Einbindung von Positionsinformationen zu Kalibrier- und Referenzmarkierungen konsistent ist.
- keine Einschränkungen bezüglich der Dimension der Datensätze besteht, in unserem Fall 2D oder 3D.
- die Datenreduktion insbesondere bei 3D Datensätze erheblich ist. So reduziert sich ein Bild mit einer Größe von mehreren MegaByte auf die Verwaltung von mehreren Hundert Bildmerkmalen, deren Bild-Koordinaten als Gleitkommazahlen hinterlegt werden.

Der Zeitaufwand zur Kompression, d.h. Extraktion der Position der Merkmalselemente variiert sehr stark. Positionen von Referenzpartikeln konnten sehr schnell und genau ermittelt werden, während morphologische Merkmale eine sehr aufwendige Verrechnung erfordern können. Der Zeitgewinn liegt insbesondere bei der weiteren Verrechnung zur Registrierung oder Alignierung, die auf diesen reduzierten Bildmerkmalen basiert und somit nur wenige Sekunden benötigt. Die Transformationsergebnisse lassen sich direkt wieder auf die vollständigen Rohdaten anwenden. Die Durchführung der Transformation ist sehr gut auf Grafikkhardware parallelisierbar und konnte daher sehr effizient (auch für große Datenmengen) durchgeführt werden.

## ANHANG

### Literaturverzeichnis

Agronskaia A. V., Valentijn J. A., van Driel L. F., Schneijdenberg C. T. W. M., Humbel B. M., van Bergen En Henegouwen P. M. P., Verkleij A. J., Koster, A. J. & Gerritsen, H. C.(2008) Integrated fluorescence and transmission electron microscopy. *J Struct Biol, Molecular Biophysics*, **164**: 183

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

Felts R.L., Narayan K., Estesb J.D., Shi D., Trubey C.M., Fu J., Hartnell L.M., Ruthel G.T., Schneider D.K., Nagashima K., Bess. J.W., Bavari. S., Lowekamp B.C., Bliss D., Lifson J.D, and Subramaniam S. (2010) 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. *Proc Natl Acad Sci.*, **107** (30): 13336.

Fischler M.A. & Bolles R.C. (1981) Random Sample Consensus: A Paradigm for Model Fitting with Applications to Image Analysis and Automated Cartography. *Commun. ACM* **24**: 381

Fuchs J., Wojek C., Röder I.V., Schröder R.R., and Dietrich C. (2014) 3D correlative superresolution light and electron microscopy based on serial sections. Conference: *Focus on Microscopy*; Sidney, April 12-16 Australien

Höhn K., Fuchs J., Fröber A., Kirmse R., Glass B., Anders-Össwein M., Walther P., Kräusslich H.-G., and Dietrich C. (2015) Preservation of protein fluorescence in embedded human dendritic cells for targeted 3D light and electron microscopy. *Journal of Microscopy* (accepted)

Kizilyaprak C., Daraspe J., Humbel B.M. (2014) Focused ion beam scanning electron microscopy in biology. *Journal of microscopy* **254** (3): 109

Kopek B.G, Shtengel G., Xu C.S., Clayton D.A., and Hess H.F.(2012) Correlative 3D superresolution fluorescence and electron microscopy reveal the relationship of mitochondrial nucleoids to membranes. *PNAS*, **109** (16): 6136

Kopek B.G., Shtengel G., Grimm J.B., Clayton D.A., and Hess, H.F.(2013) Correlative Photoactivated Localization and Scanning Electron Microscopy. *PLOS ONE* **8** (10): e77209

Micheva K.D. and Smith S. J. (2007) Array Tomography: A New Tool for Imaging the Molecular Architecture and Ultrastructure of Neural Circuits. *Neuron* **55**: 25

Nalan L., Zonneville C., Narvaez A.C., Efftig A. P. J, Voorneveld P.W., Lucas M.S., Hardwick J.C., Wepf R.A., Kruit P., Hoogenboom J.P. (2013) Simultaneous Correlative Scanning Electron and High-NA Fluorescence Microscopy. *PLOS ONE* **8** (2): e55707

Narayan K., Danielson C.M., Ken Lagarec K., Lowekamp B.C., Coffman P., Laquerre A., Phaneuf M.W., Hope T.J., and Subramaniam S. (2014) Multi-resolution correlative focused ion beam scanning electron microscopy. Applications to cell biology, *Journal of Structural Biology* **185**: 278

Paez-Segala M.G., Sun M.G., Shtengel G., Viswanathan S., Baird M.A., Macklin J.J., Ronak P.R., John R.A.J.R., Howe E.S., Piszczek G., Hess H.R., Davidson M.W., Wang Y., and Looger L.L. (2015) Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for CLEM. *Nature Methods Brief Communication*, 12. January 2015

Pfannmöller M., Röder I.V., Dietrich C., Fuchs J., Wojek C., Angert I., Béché A., Verbeeck J., Bals S., Mappes T., and Schröder R.R. (2015) Single-molecule multicolour correlative light and electron microscopy (to be submitted).

Villinger C., Gregorius H., Kranz C., Höhn K., Münzberg C., von Wichert G., Mizaikoff B., Wanner W., and Walther P. (2012) FIB/SEM tomography with TEM-like resolution for 3D imaging of high-pressure frozen cells. *Histochemistry and Cell Biology* , **138** (4): 549

Wiederspahn M. (2010) Shuttle & Find for Life Sciences. *Imaging & Microscopy*, **3**: 19

## Liste Abkürzungen

KLSM	konfokale Laserscanning Mikroskopie
EM	Elektronenmikroskop(ie)
FIB	Fokussierter Ionenstrahl
FIB-REM	Zweistrahlergerät basierend auf FIB und REM
FLM	Fluoreszenz-Lichtmikroskopie
LM	Lichtmikroskop(ie)
LSM	Laserscanning-Mikroskop
NMJ	neuromuskuläre Synapse (neruomuscular junction)
REM	Rasterelektronenmikroskop(ie)