

Hochschule Magdeburg-Stendal  
Fachbereich Wasser-und Kreislaufwirtschaft  
Studiengang Statistik  
Wintersemester 2012/13



# Bachelorarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades  
„Bachelor of Science“  
im Fach Statistik

Thema:

Anwendung des EM-Algorithmus zur Schätzung der  
Parameter von Fluoreszenzlebensdauerfunktionen

<b>vorgelegt von:</b>	Julia Geißler
<b>geboren am:</b>	30.11.1989
<b>in:</b>	Magdeburg
<b>Matrikelnummer:</b>	20082055
<b>Betreuer:</b>	Prof. Jürgen Köhler (HS Magdeburg-Stendal) Dr.-Ing. Yury Prokazov (Leibniz-Institut für Neurobiologie) Dr.-Ing. Andreas Herzog (Fraunhofer - IFF Magdeburg)
<b>Abgabetermin:</b>	25.03.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
1.1	Motivation der Arbeit . . . . .	3
1.2	Aufbau . . . . .	4
<b>2</b>	<b>Einführung</b>	<b>5</b>
2.1	Fluoreszenz . . . . .	5
2.2	Messungen im Zeit-und Frequenzbereich . . . . .	7
2.3	Messung der Fluoreszenzlebensdauer . . . . .	8
2.3.1	Überblick . . . . .	8
2.3.2	Funktionsweise des Detektors und Messprinzip . . . . .	8
2.4	Das Modell . . . . .	11
2.4.1	Herleitung . . . . .	11
2.4.2	Distributivität der Faltung . . . . .	15
2.4.3	Iterative Berechnung des Faltungsintegrals . . . . .	16
<b>3</b>	<b>Expectation-Maximization-Algorithmus</b>	<b>17</b>
3.1	Motivation . . . . .	17
3.2	Funktionsweise . . . . .	17
3.2.1	Allgemeines . . . . .	17
3.2.2	Exkurs: bedingter Erwartungswert . . . . .	18
3.2.3	Algorithmus . . . . .	19
3.3	konkrete Anwendung . . . . .	20
<b>4</b>	<b>Implementierung</b>	<b>25</b>
4.1	Simulation der Daten . . . . .	25
4.1.1	Apparatefunktion . . . . .	25
4.1.2	Referenzkomponente . . . . .	26
4.1.3	Fluoreszenzlebensdauerfunktion . . . . .	27
4.1.4	Faltung der Zufallsgrößen . . . . .	29
4.1.5	Pixelbasierte Simulation . . . . .	30

4.2	Vorüberlegungen zur Simplex-Methode . . . . .	32
4.3	Schätzung der Parameter . . . . .	33
4.3.1	Simulierte Daten . . . . .	33
4.3.2	Gemessene Daten . . . . .	37
<b>5</b>	<b>Auswertung</b>	<b>42</b>
5.1	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	42
5.2	Kritische Wertung . . . . .	43
5.3	Ausblick . . . . .	44
<b>6</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>45</b>
	<b>Nomenklatur</b>	<b>46</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>48</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>49</b>

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Motivation der Arbeit

Einer der Schwerpunkte des Speziallabors für Elektronen- und Laserscannmikroskopie des Leibniz-Instituts für Neurobiologie in Magdeburg ist die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) mit Einzelphotonenzählung, wobei unter anderem die Zeit von der Anregung der Probe bis zur Emission eines Photons sowie die Position innerhalb des Gesamtbildes gemessen wird. Mithilfe dieser Informationen können beispielsweise Interaktionen von fluoreszierenden Proteinen in lebenden Zellen untersucht und somit die Zusammensetzung einer Probe ermittelt werden. Dabei können Stoffe, die nicht selbst fluoreszieren (also nicht autofluoreszent sind), auch durch spezifische Fluoreszenzfarbstoffe eingefärbt werden.[4]

Das Prinzip der Einzelphotonenzählung (SPC - „Single Photon Counting“) ist, dass die betreffenden Moleküle einen Anregungsimpuls mittels eines gepulsten Lasers bekommen, um ihre Fluoreszenzlebensdauer, d.h. die Abklingzeit der Fluoreszenz, zu messen. Das Ergebnis ist ein Histogramm, welches in jedem Intervall die Anzahl der gemessenen emittierten Photonen enthält.

Von Interesse sind dabei die tatsächlichen Parameter der Lebenszeit, die mittels Anpassung der Daten an ein Modell ermittelt werden können. Dieses Modell stellt eine Faltung aus der Funktion für die Lebensdauer und der Apparatefunktion (von engl. „Instrument Response Function“ - Abk. IRF), die als bekannt angenommen werden kann (d.h. messbar ist), dar. Um die Parameter der Fluoreszenzlebensdauer zu extrahieren, muss das Modell auf irgendeine Weise wieder „entfaltet“ werden.

Erschwert wird dies auch dadurch, dass es in den meisten Fällen mehr als eine fluoreszierende Komponente gibt, die unterschiedliche Lebensdauern haben. Hinzu kommt außerdem ein zeitunabhängiges Hintergrundrauschen. Die Intensität zu einem bestimmten Zeitpunkt sowie die Gestalt des Modells sind zwar bekannt, jedoch weiß man nicht, welches gemessene Photon welcher Komponente eines Stoffes zugeordnet werden kann, respektive wieviele der gemessenen Photonen im jeweiligen Intervall

zur Komponente  $i$  gehören. Somit fehlen Informationen, ohne die herkömmliche Schätzmethoden wie die Maximum-Likelihood-Methode zu Verzerrung neigen.

Der „Expectation-Maximization“-Algorithmus als iterative Methode ermöglicht die Berechnung von diesen Maximum-Likelihood-Schätzern auch bei fehlenden oder nicht komplett beobachtbaren Daten. Die Idee besteht darin, die wahrscheinlichsten Werte für die fehlenden einzusetzen und mit diesen weiterzurechnen, um für den nächsten Schritt noch besser passende Werte zu erhalten.

Dabei soll die Schätzung der Parameter zunächst global mit einer ableitungsfreien Simplex-Methode erfolgen, um im Anschluss den EM-Algorithmus für die lokale Schätzung der sogenannten Beitragsfaktoren  $\alpha$  der Komponenten anzuwenden. Die Parameter für die Lebensdauer bleiben gleich, die Komponenten sind nur in unterschiedlichen Verhältnissen in der Probe gemischt - somit benötigt man für jedes Pixel eines Bildes eine Schätzung dieses Verhältnisses.

Die Effizienz des Algorithmus wird zunächst an simulierten Daten getestet, im Anschluss erfolgt die Anwendung auf gemessene Daten. Bei der untersuchten Probe handelt es sich um Hefezellen, deren Fluoreszenz vor und nach der Stimulation, bei der ein fluoreszierendes Koenzym freigesetzt wird, gemessen wird.

## 1.2 Aufbau

In Kapitel 2 werden zunächst die grundlegenden Begriffe und Methoden sowie die Herleitung des Modells erklärt. Das dritte Kapitel beschäftigt sich mit der Theorie, die dem EM-Algorithmus zugrundeliegt, um das Fundament für die spätere Anwendung zu legen. Dabei wird neben der Darstellung der einzelnen Schritte auch die Berechnung der Log-Likelihood-Funktion und die Herleitung eines iterativen Schätzers mithilfe von bedingten Erwartungswerten beschrieben. Im darauffolgenden Kapitel geht es um die Implementierung des Algorithmus. Zunächst soll gezeigt werden, wie die Daten simuliert werden, um den Algorithmus auf diese simulierten Daten anzuwenden. Nach der Darstellung der Ergebnisse beschäftigt sich das Kapitel schließlich noch mit der Schätzung der Parameter für reale Daten. Das letzte Kapitel befasst sich mit den Schlussfolgerungen zum Thema. Die Ergebnisse werden diskutiert und kritisch bewertet, um danach auf weitere Möglichkeiten für Analysen auf diesem Gebiet einzugehen.

## 2 Einführung

Dieses Kapitel soll einen Überblick über die für diese Arbeit relevanten Begriffe und Methoden darstellen. Zunächst werden allgemeine Begriffe, die für das weitere Verständnis von Bedeutung sind, erklärt, um im nächsten Teil kurz auf die Methode zur Messung der Fluoreszenzlebensdauer einzugehen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Herleitung des Modells unter Berücksichtigung aller möglichen Variablen.

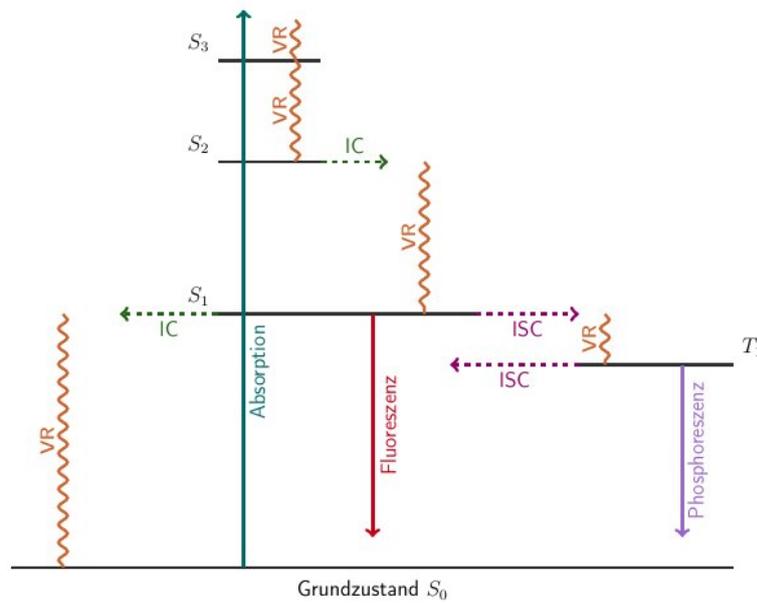
### 2.1 Fluoreszenz

Wenn bestimmte Moleküle Licht absorbieren (man sagt, sie werden „angeregt“), kann man eine gleichzeitige Emission von Licht mit größerer Wellenlänge beobachten. Dieses Verhalten - die spontane Emission von Licht nach Anregung - wird als Fluoreszenz bezeichnet; die Stoffe, bei denen diese Fluoreszenz auftritt, nennt man Fluorophore. [1]

Nun kann das Licht immer nur in einer bestimmten Dosis von Materie aufgenommen oder abgegeben werden. Beispielsweise wird Licht, das man auf eine Glasplatte fallen lässt, nur zu einem Teil durchgelassen, der Rest wird reflektiert - wenn dieses Licht jedoch sehr schwach ist, wird entweder gleich die ganze „Portion“ durchgelassen oder nichts. Diese Portionen werden Photonen oder auch Lichtteilchen genannt. [2]

Bei der Fluoreszenz absorbieren die Fluorophore diese Photonen und gelangen dadurch auf ein höheres Energieniveau. Allerdings können sie diesen instabilen Zustand nicht halten und setzen die aufgenommene Energie wieder frei, wodurch es zur Emission des Fluoreszenzlichts kommt. Die Energie des emittierten Photons ist meist geringer als die des absorbierten, womit die höhere Wellenlänge zu erklären ist. [3]

Grafisch kann der gesamte Vorgang auch mithilfe eines Jablonski-Diagramms (Abbildung 2.1) dargestellt werden [5]. Durch das Anregungsphoton wechselt ein Elektron vom Grundzustand  $S_0$  in den Zustand  $S_1$  oder einen höheren angeregten Zustand - diese Zustände werden auch Singulettzustände genannt. Danach erfolgt



- IC „Internal Conversion“,  $S_i \rightarrow S_j$
- ISC „Inter System Crossing“,  $S_i \rightarrow T_j$
- VR „Vibrational Relaxation“

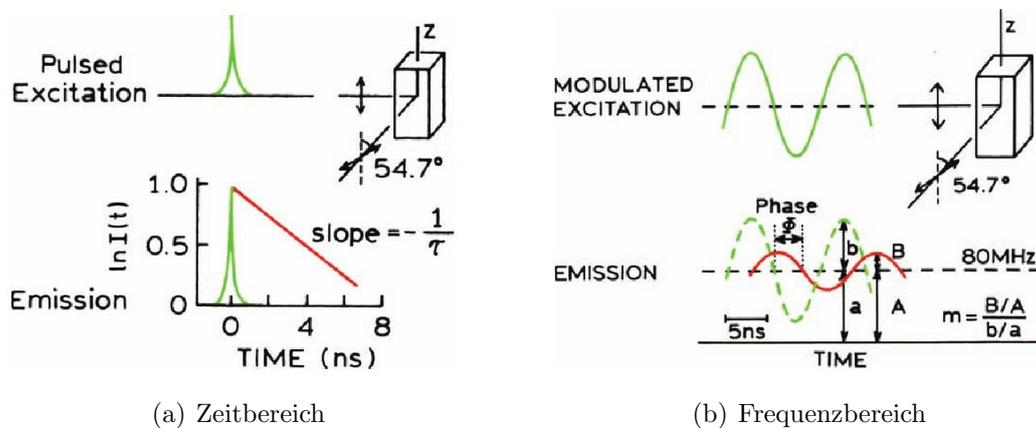
**Abbildung 2.1:** Darstellung der Energieniveaus des Grundzustandes  $S_0$  und der Singulettzustände  $S_1$  bis  $S_3$  und des Triplett-Zustandes  $T_1$  sowie des Prinzips von Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Durch Absorption eines Photons erfolgt der Übergang vom Grundzustand in einen der angeregten Zustände. (IC) innere Umwandlung. (ISC) Übergang zwischen Singulett- und Triplettzuständen. (VR) Schwingungsrelaxation - strahlungsloser Übergang zum niedrigsten Zustand.

zunächst ein Übergang in den niedrigsten angeregten Zustand unter Freisetzung von Wärmeenergie. Aus dem Zustand  $S_1$  wechselt das Elektron nun wieder in den Grundzustand, wobei das Fluoreszenzlicht entsteht.[5]

Weiterhin kann ein Übergang zwischen dem ersten Singulett- und Triplettzustand erfolgen. In diesem Fall bezeichnet man die Abgabe von Licht beim Übergang von  $T_1$  in den Grundzustand  $S_0$  als Phosphoreszenz, für den eine Spinumkehr notwendig ist. Im Gegensatz zur Fluoreszenz tritt bei der Phosphoreszenz außerdem ein Nachleuchten auf, wenn das Anregungslicht abgeschaltet wird. [6] Üblicherweise variiert die Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand  $S_1$  verbleibt, zwischen Picosekunden und mehreren Nanosekunden, wohingegen der Zustand  $T_1$  für mehrere Sekunden und sogar Minuten anhält.[5]

## 2.2 Messungen im Zeit- und Frequenzbereich

Gängige Methoden zur Messung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit stellen die Messung im Zeit- sowie Frequenzbereich dar [9]. Für Messungen im Zeitbereich wird die Probe mit einem sehr kurzen Lichtimpuls angeregt, um die zeitabhängige Intensität nach der Anregung zu messen. In Abbildung 2.2(a) ist die Form des Anregungsimpulses und der daraus resultierende Abfall der Kurve für die Lebenszeit grafisch dargestellt.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung der Gestalt von Anregungsimpuls (grün) und Ausgangssignal (rot) bei Messungen im Zeitbereich (a) und im Frequenzbereich (b).

Um Messungen im Frequenzbereich zu erhalten, wird die Probe mit einem intensitäts-modulierten Licht angeregt, was grafisch durch eine sinusförmige Kurve darstellbar ist. Die anschließende Emission ist danach wieder als Sinuskurve darstellbar, es erfolgt jedoch eine Phasenverschiebung und die Intensität des Emissionslichts verringert sich (Abbildung 2.2(b)) [9]. Diese Methode zur Messung ist jedoch nicht sehr genau und stellt weniger Informationen zur Verfügung als die Einzelphotonenzählung im Zeitbereich.

Die Analysen, die im Laufe dieser Arbeit erfolgen, beziehen sich deshalb grundsätzlich auf Messungen im Zeitbereich. Bisher wurden die Parameter der Fluoreszenzlebensdauerfunktion überwiegend mithilfe der nichtlinearen Kleinste-Quadrate-Schätzung oder der Momentenmethode angepasst [9]. Diese Anpassung erfolgt dabei weiterhin zwischen den gemessenen Daten und den Daten, die aus dem angenommenen Modell resultieren. Im Endeffekt sollten die Abweichungen zwischen den gemessenen und berechneten Daten zufällig sein, jedoch wird die Schätzung in den meisten Fällen durch zahlreiche „Störgrößen“ verzerrt.

## 2.3 Messung der Fluoreszenzlebensdauer

### 2.3.1 Überblick

Die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (engl. FLIM - „Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy“) ermöglicht eine direkte Messung der Fluoreszenzlebensdauer der angeregten Moleküle. Eine gängige Methode, um Informationen über diese Fluoreszenzlebensdauer zu bekommen, nennt sich *zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung* (TCSPC - Time-Correlated Single Photon Counting).

Bei dieser Methode erfolgen sehr viele Anregungsimpulse hintereinander, da pro Laserimpuls weniger als ein Photon gemessen wird [9]. Wenn ein Photon „entdeckt“ wird, misst man die Zeit (meist in Pico-/Nanosekunden), die zwischen der Anregung und der Emission vergangen ist. Das ganze Zeitspektrum wird in Intervalle unterteilt und jedes emittierte Photon bezüglich seiner zugehörigen Zeit in eines der Intervalle einsortiert. Durch die Erstellung eines Histogramms kann dies visualisiert werden, wodurch man einen Überblick über die Verteilung der Photonen innerhalb der einzelnen Intervalle bekommt.[7]

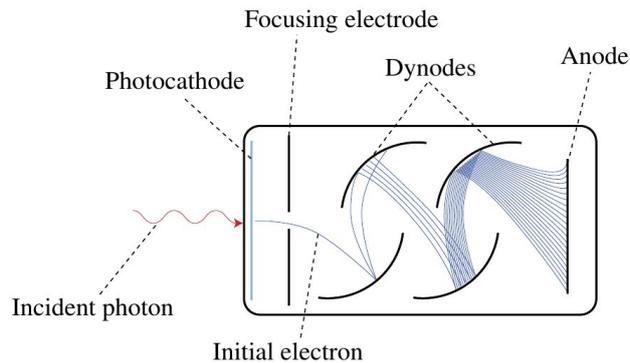
Weiterhin kann die TCSPC-Methode durch die Bestimmung der Position innerhalb des Bildes (Pixel) zur TPCSPC-Methode (TPCSPC - Time- and Position Correlated Single Photon Counting) erweitert werden. [10]

### 2.3.2 Funktionsweise des Detektors und Messprinzip

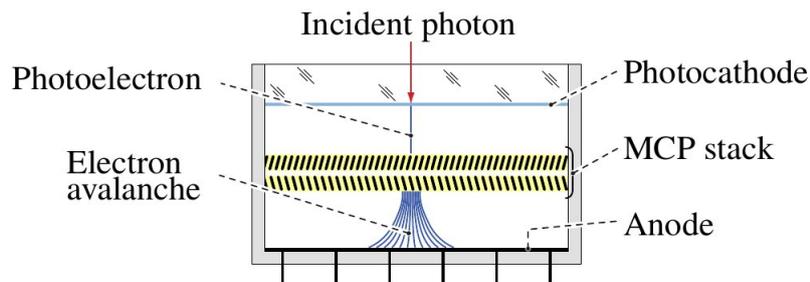
#### Detektor

Als Detektor für die positionsaufgelöste Einzelphotonenzählung dient eine Mikrokanalplatten-basierte Photomultiplerröhre (MCP-PMT). Allgemein ist die Aufgabe von Photomultiplerröhren, die Photonen zu detektieren und in ein elektrisches Signal umzuwandeln. Ihr schematischer Aufbau ist in Abbildung 2.3 zu sehen. [10]

Eine Mikrokanalplatte (abgekürzt MCP) ist ein Sekundärelektronenvervielfacher, also eine Art Verstärker für schwache Signale (in diesem Fall Photonen). Wenn die Photonen auf die Platte treffen, werden dort Sekundärelektronen erzeugt, die besser „erkennbar“ sind [8]. Die Abbildung 2.4 zeigt eine Photomultiplerröhre, die auf einer solchen Mikrokanalplatte basiert.[10]



**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung einer gebräuchlichen Photomultiplerröhre. Ein Photon fällt auf die Oberfläche der Photokathode und setzt ein Photoelektron frei, das einem elektrischen Feld durch ein Dynodensystem folgt, wodurch der Elektronenstrom verstärkt wird. Eine Anode nimmt diese Elektronen auf und misst das Signal.

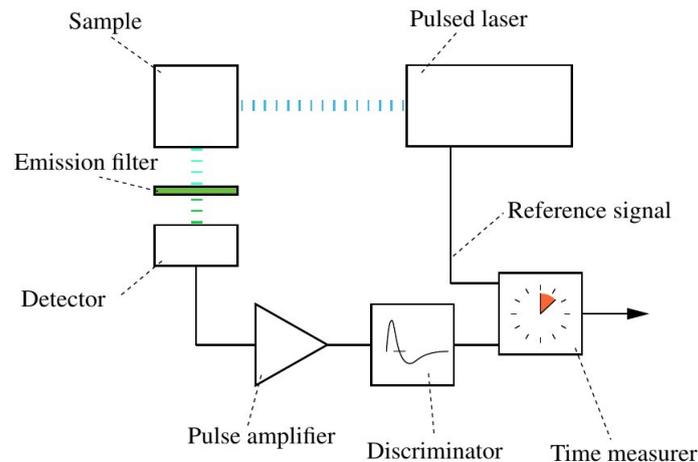


**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung einer MCP-basierten Photomultiplerröhre. Die Photokathode wandelt ein einfallendes Photon in ein Photoelektron um. Ein Block mit zwei Mikrokanalplatten vervielfacht dieses Photoelektron und eine positionsempfindliche Anode nimmt die Elektronen auf.

### Einzelphotonenzählung

Das allgemeine System für die Messung der Fluoreszenzlebensdauer mithilfe der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung besteht aus einem gepulsten Laser, Emissionsfiltern, dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Detektor und den Instrumenten, die für die Messung der Zeit notwendig sind. In Abbildung 2.5 ist dieser Aufbau dargestellt und beschrieben. Für die zeit- und positionskorrelierte Einzelphotonenzählung würde man noch einen zweiten Bereich hinzufügen, der parallel zur Zeitmessung abläuft und für die Auslesung der Position sowie für die Bestimmung der Gestalt der Probe verantwortlich ist. [10]

Wie bereits in Abschnitt 2.3.1 erwähnt, wird die Probe mit periodisch wiederkehrenden ultrakurzen Lichtimpulsen angeregt. Die Zeit, die bis zum nächsten Laserimpuls



**Abbildung 2.5:** Aufbau für die Einzelphotonenzählung. Die Probe wird mit den Laserimpulsen (blau) angeregt und passiert die Emissionsfilter, die die Wellenlänge des Anregungsimpulses herausfiltern. Der Detektor generiert ein elektrisches Signal für jedes Photon, das im Impulsverstärker (Pulse Amplifier) vervielfacht und im Diskriminator ausgewertet wird. Dann wird die Zeitdifferenz zwischen Anregungsimpuls und Erfassung des Photons gemessen.

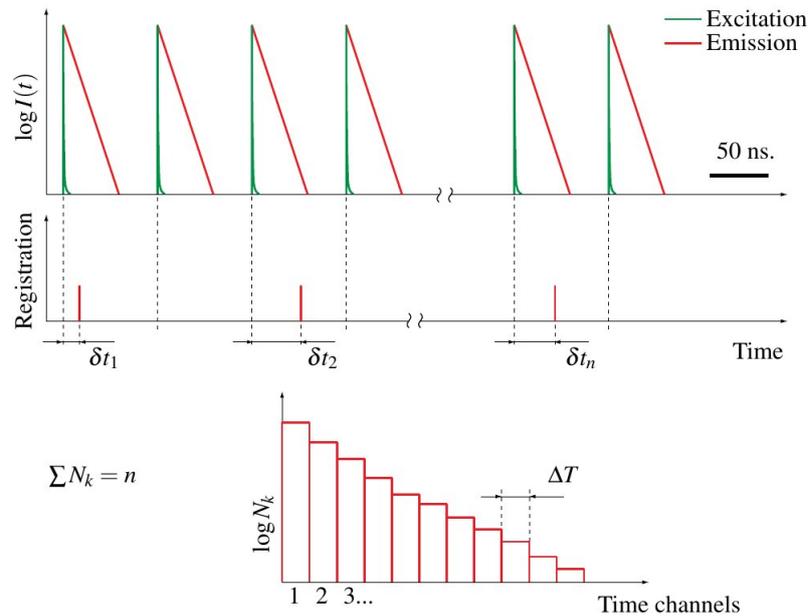
verstreicht, ist festgelegt.

Innerhalb einer Periode ist bereits die Wahrscheinlichkeit, überhaupt ein Photon zu entdecken, wegen der geringen Lichtintensität sehr klein, sodass es auch vorkommen kann, dass gar kein Photon detektiert wird. Jedoch besteht auch die Möglichkeit, mehr als ein Photon zu messen. Dies passiert sehr selten, aber da bei der Einzelphotonenzählung sehr viele Anregungsimpulse hintereinander erfolgen, muss auch dieser Fall beachtet werden. [13]

Wenn innerhalb einer Periode zwei Ereignisse stattfinden, wird das erste Ereignis priorisiert und alle darauffolgenden Ereignisse übergangen.

Somit besteht die Gefahr eines sogenannten „Pile-up-Effekts“, also einer Anhäufung von Messungen mit kürzerer Lebenszeit. Um eine solche Verzerrung zu vermeiden, werden alle Ereignisse innerhalb der Periode ignoriert und diese so behandelt, als ob kein Photon erfasst wurde.[11]

Das Prinzip der Einzelphotonenzählung ist zur Veranschaulichung noch einmal in Abbildung 2.6 grafisch dargestellt. In dieser Abbildung kann man die nacheinander erfolgenden Anregungsimpulse erkennen, die solange durchgeführt werden, bis insgesamt  $n$  Photonen detektiert wurden. [9]



**Abbildung 2.6:** Messung der Fluoreszenzlebensdauer mit der SPC-Methode. Die Ankunftszeiten  $\delta t_i$  nach Anregung werden für jedes einzelne Photon aufgezeichnet und es wird ein Histogramm mit der Intervallbreite  $\Delta T$  erstellt.

## 2.4 Das Modell

### 2.4.1 Herleitung

Es existiert eine „Anfangspopulation“  $n_0$  von Fluorophoren im angeregten Zustand, die mit der Rate  $\lambda$  zerfällt [9], d.h.

$$dn(t) = -\lambda \cdot n(t)dt$$

wobei  $n(t)$  die Anzahl der angeregten Moleküle zur Zeit  $t$  nach Anregung darstellt. Die Emission kann als ein zufälliges Ereignis betrachtet werden, denn jedes angeregte Fluorophor hat die gleiche Wahrscheinlichkeit, innerhalb einer gegebenen Zeitperiode zu emittieren und besitzt zudem kein Gedächtnis, weshalb die Rate  $\lambda$  eine Konstante ist. Daraus leitet sich die Formel

$$n(t) = n_0 e^{-\lambda t}$$

ab, die Grundgesamtheit besitzt also eine exponentielle Lebenszeit. Im Experiment wird jedoch nicht die Anzahl der angeregten Moleküle gemessen, sondern die Fluoreszenzintensität, die über die Zeit abnimmt. Diese ist proportional zu  $n(t)$ , so

dass

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

mit der Intensität zur Zeit Null,  $I_0$ . [9]

Weiterhin kann man jetzt  $\lambda$  als die Inverse der Lebenszeit  $\tau$  definieren:

$$\tau \equiv \lambda^{-1}.$$

Die Lebenszeit kann als die durchschnittliche Zeit verstanden werden, mit der ein Fluorophor im angeregten Zustand verbleibt.

Nun benötigt man eine stetige Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion, da man nicht ohne weiteres mit den Intensitäten rechnen kann. Diese hat die Form

$$f(t) = \begin{cases} \frac{1}{\tau} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} & t \geq 0 \\ 0 & t < 0 \end{cases} \quad (2.1)$$

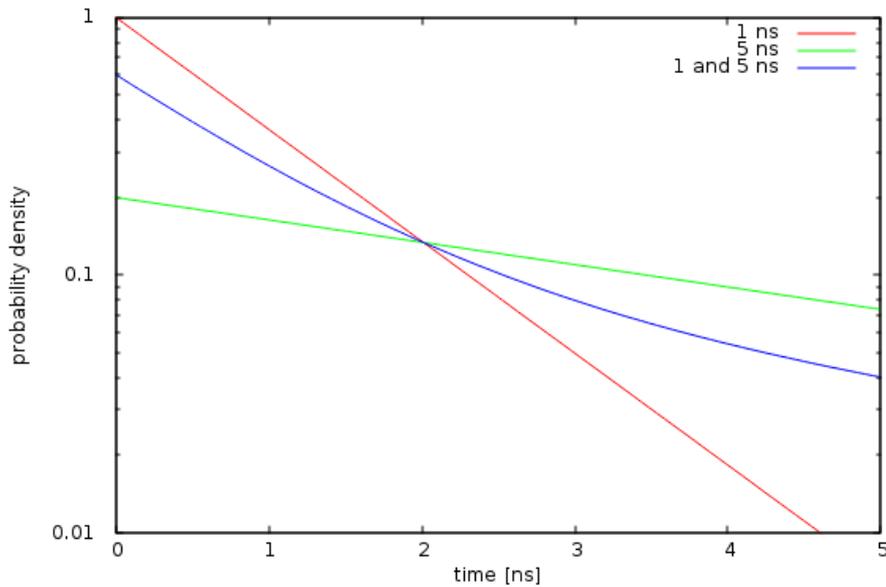
Die Fläche unter dieser Dichtefunktion soll den Inhalt 1 haben, d.h. mit zunehmendem  $t$  steigt die Wahrscheinlichkeit für den Eintritt eines Ereignisses.

$$\begin{aligned} F(t) &= \int_0^\infty \frac{1}{\tau} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \\ &= -e^{-\frac{t}{\tau}} \Big|_0^\infty \\ &= 1. \end{aligned}$$

Die Fluoreszenzlebensdauer kann aus der grafischen Darstellung des funktionellen Zusammenhangs von  $t$  und  $\log I(t)$  bzw.  $\log f(t)$  abgelesen werden, allerdings ist es üblicher, sie durch Anpassung der Daten an das theoretische Modell zu bestimmen [9].

Aus dem Abfall der Kurve kann man aber oft weitere Schlüsse über die Form der Verteilung machen - bis jetzt war der Ausgangspunkt immer ein Modell mit nur einem exponentiellen Bestandteil, jedoch gibt es bei den wenigsten Fluorophoren nur diese eine Komponente, sodass man meist von einer multiexponentiellen Verteilung ausgehen muss. Wenn die grafische Darstellung bei einer logarithmierten Skala nun einen linearen Verlauf aufzeigt, indiziert das im häufigsten Fall ein einfaches exponentielles Modell, das aus der Definition der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion in Gleichung 2.1 resultiert.

An Abbildung 2.7 sieht man, wie sich die Lebensdauer bei zwei Komponenten verändert. Die Funktion mit einer Lebenszeit von einer bzw. fünf Nanosekunden



**Abbildung 2.7:** Fluoreszenzlebensdauer eines Proteins mit zwei Komponenten (grün) und Darstellung der Fluoreszenzlebensdauer der einzelnen Komponenten auf einer logarithmierten Skala.

verläuft linear und man sieht deutlich, dass die Funktion mit der kürzeren Lebenszeit stärker abfällt. Wenn man nun die Summe beider Funktionen nimmt und diese auf der gleichen Skala darstellt, hat man jedoch keinen linearen Verlauf mehr. Dieser Umstand zeigt, dass das Ergebnis bei der Aufsummierung von Exponentialverteilungen eine viel komplexere Funktion ist und nicht etwa wieder eine Exponentialverteilung. [9]

Allgemein kann man nun das multiexponentielle Modell formulieren als

$$f(t) = \sum_i \frac{\alpha_i}{\tau_i} e^{-\frac{t}{\tau_i}},$$

wobei die  $\alpha_i$  den Beitrag einer Komponente zur Fluoreszenzlebensdauer und die  $\tau_i$  die Lebenszeit der jeweiligen Komponente darstellen. Durch die Division mit  $\tau_i$  erfolgt eine Normalisierung.

Da neben dem Parameter  $\tau$  auch der Parameter  $\alpha$  einen wichtigen Aspekt für das Modell darstellt, muss dessen Bedeutung etwas detaillierter beschrieben werden: Die  $\alpha_i$  drücken das Verhältnis der Anzahl der Photonen einer Komponente zur Gesamtzahl der gemessenen Photonen aus, sie repräsentieren demnach eine Wahrscheinlichkeit. Beispielsweise ist es möglich, dass die Wahrscheinlichkeit, ein Photon der ersten Komponente zu „entdecken“, generell höher ist als die Wahrscheinlichkeit für die zweite Komponente.

Aus dieser Überlegung folgt

$$\sum_i \alpha_i = 1$$

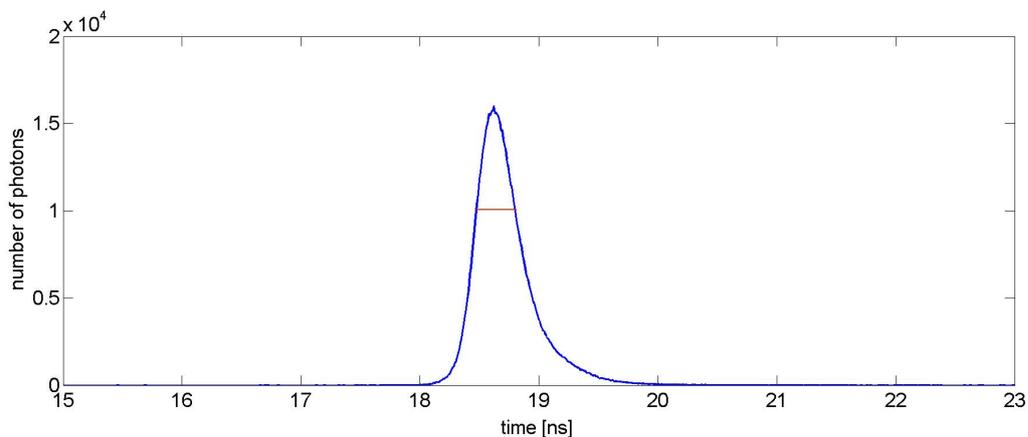
Eine weitere Problematik ist, dass bei der Messung nicht nur die wahre Lebensdauer aufgenommen wird, sondern diese durch eine sogenannte „Instrument Response Function“ (Abk. *IRF*)  $g(t)$ , zu deutsch Apparatefunktion, verzerrt wird. Sie ist das Antwortsignal, was man erhält, wenn eine das Anregungslicht streuende, aber nicht fluoreszierende Probe eingesetzt wird.

Diese Funktion ist messbar und kann hier im Modell als die Summe zweier Normalverteilungen angenommen werden.

$$g(t) = \sum_{i=1}^2 \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_i} e^{-\frac{(t-\mu_i)^2}{2\sigma_i^2}} \quad (2.2)$$

Allerdings hängt es auch immer vom Messgerät und der Probe ab, welche Form die Apparatefunktion annimmt. Aus diesem Grund ist es wichtig, sich ihr Aussehen vor der Modellierung zu vergegenwärtigen.

Abbildung 2.8 zeigt eine solche Apparatefunktion, die aus gemessenen Daten entstanden ist. In dieser Grafik ist die Halbwertsbreite (FWHM) in rot dargestellt, diese hat eine Breite von ungefähr 40 Intervallen bzw. „Kanälen“.



**Abbildung 2.8:** Apparatefunktion aus gemessenen Daten und Darstellung der Halbwertsbreite (rot), deren Breite ca. 40 Intervallen entspricht, die Intervallbreite beträgt also ca. 1.3 Picosekunden.

Die gemessenen Intensitäten stellen demzufolge eine Überlagerung der Fluoreszenzlebensdauerfunktion und der IRF dar. Diese Überlagerung wird mathematisch durch eine Faltung - oder auch Konvolution - erreicht. Mit dem Faltungsoperator  $\star$  ergibt sich nun das endgültige Modell

$$m(t) = f(t) \star g(t) \quad (2.3)$$

$$= \left( \sum_i \frac{\alpha_i}{\tau_i} e^{-\frac{t}{\tau_i}} \right) \star \left( \sum_{j=1}^2 \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_j} e^{-\frac{(t-\mu_j)^2}{2\sigma_j^2}} \right) \quad (2.4)$$

$$= \int_0^\infty f(\Theta)g(t - \Theta)d\Theta. \quad (2.5)$$

Die Auflösung der Gleichung resultiert für  $i \geq 2$  in einer sehr komplexen Funktion, womit das gegebene Problem schwer analytisch lösbar wird. Außerdem gilt es zu beachten, dass die Messergebnisse durch die Anzahl der gezählten Photonen in jedem Intervall charakterisiert - und somit diskret - sind, das Modell aber stetig ist. Für die Diskretisierung müsste man demnach noch einmal über die Intervalle integrieren.

Ein möglicher Lösungsansatz, der getestet werden soll, ist die Ausnutzung der Distributionseigenschaft der Faltung zusammen mit einem Ansatz für die iterative Berechnung des Faltungsintegrals nach A. Grinvald und I. Steinberg [12]. Die folgenden Abschnitte liefern eine kurze Beschreibung dieser beiden Methoden.

### 2.4.2 Distributivität der Faltung

Für die Anwendung der Distributivitätseigenschaft [15]

$$g \star (f_1 + f_2) = (g \star f_1) + (g \star f_2)$$

wird zuerst das Modell in eine andere Form überführt, die später bei der Umsetzung des EM-Algorithmus eingesetzt wird. Im Folgenden ist

$$f_i(t) = \frac{1}{\tau_i} e^{-\frac{t}{\tau_i}}.$$

und  $g(t)$  steht für die Apparatefunktion an der Stelle  $t$ . Für das Modell ergibt sich jetzt die nachstehende Formel:

$$m(t) = \sum_i \alpha_i \cdot (f_i(t) \star g(t))$$

### 2.4.3 Iterative Berechnung des Faltungsintegrals

Die Berechnung eines Faltungsintegrals kann in einigen Fällen schwierig analytisch lösbar und mit einem sehr großen Rechenaufwand verbunden sein. Deswegen soll in diesem Abschnitt eine Technik zur iterativen Berechnung vorgestellt werden, die Amiram Grinvald und Izchak Z. Steinberg 1973 in ihrem Paper „On the Analysis of Fluorescence Decay Kinetics by the Method of Least-Squares“ [12] beschrieben haben.

Darin wird davon ausgegangen, dass die Fluoreszenzlebensdauerfunktion durch die Summe von Exponentialverteilungen dargestellt werden kann und die Apparatefunktion bekannt ist, sie treffen also die gleichen Annahmen, die auch dieser Arbeit zugrundeliegen.

Im folgenden ist  $F_c(t_i)$  bzw. kurz  $F_i$  das berechnete Faltungsintegral im  $i$ -ten Intervall und  $G(t_i)$  oder auch  $G_i$  die zugehörige Apparatefunktion. Da die experimentell erhobenen Daten in diskreten Kanälen zusammengetragen sind, kann man das Faltungsintegral umformen zu

$$F_i = \epsilon \sum_{j=1}^i G_j \sum_{k=1}^p \alpha_k \cdot e^{-\frac{(i-j)\epsilon}{\tau_k}}$$

mit der Intervallbreite  $\epsilon$  und  $i = 1, \dots, n$ . Jetzt wird das  $F_i$  noch bezüglich seiner Komponenten aufgespalten, sodass man  $F_i^k$  erhält, die das Faltungsintegral im  $i$ -ten Intervall für eine der Komponenten  $k$  repräsentieren. Es gilt also

$$F_i = \sum_{k=1}^p F_i^k$$

Durch Anwendung der Trapezregel bekommt man für die  $F_i^k$  nun

$$F_i^k = \epsilon \alpha_k \cdot \left( \sum_{j=1}^{i-1} G_j e^{-\frac{(i-j)\epsilon}{\tau_k}} + 0.5 G_i \right).$$

Um die Rechenzeit beträchtlich zu reduzieren, kann man daraus die folgende rekursive Formel ableiten:

$$F_{i+1}^k = (F_i^k + 0.5\epsilon\alpha_k G_i) \cdot e^{-\frac{\epsilon}{\tau_k}} + 0.5\epsilon\alpha_k G_{i+1}.$$

## 3 Expectation-Maximization-Algorithmus

### 3.1 Motivation

Ziel dieser Arbeit ist es, die Parameter der Mischverteilung unter Anwendung des Expectation-Maximization-Algorithmus zu schätzen. Das bedeutet, dass das Modell - im übertragenen Sinne - wieder entfaltet werden muss (Dekonvolution). Bekannt sind in diesem Fall die Anzahl der Photonen in jedem Intervall sowie die Anzahl der Fluorophore und die Instrument Response Function, jedoch fehlen auch Informationen, auf deren Art in Abschnitt 3.3 eingegangen wird und die beispielsweise die Anwendung der Maximum-Likelihood-Methode erschweren.

Die Schätzung der Parameter erfolgt dabei durch Kombination der Nelder-Mead-Methode und EM-Algorithmus. Bei zeit- und positionsaufgelösten Messungen kann man zwar die globalen Beitragsfaktoren  $\alpha_i$  schätzen, aber diese Information trägt nicht viel zur Erkenntnis über die Zusammensetzung der Probe bei. Das Ziel ist es, die  $\alpha_i$  für jedes Pixel eines Bildes zu erhalten, um erkennen zu können, an welchen Positionen sich die Komponenten konzentrieren. Die Parameter  $\tau_i$ , die für jede Komponente gleich bleiben, werden aus diesem Grund mit der Nelder-Mead-Methode geschätzt. Im Anschluss übernimmt der EM-Algorithmus die Schätzung der  $\alpha_i$ , da er sehr robust ist. Diese Vorgangsweise wird globale Analysis genannt.

### 3.2 Funktionsweise

#### 3.2.1 Allgemeines

Der EM-Algorithmus wurde erstmals 1977 von Dempster, Laird und Rubin vorgestellt [16]. Die Methode basiert auf der iterativen Berechnung von Maximum-Likelihood-Schätzern, die bei unvollständigen Daten nicht berechnet werden können.

Jeder Iterationsschritt besteht aus einem Expectation-Schritt und einem Maximiza-

tion-Schritt, woraus sich auch der Name ableitet. Im E-Schritt werden die fehlenden Daten anhand der beobachteten Daten und den momentanen Schätzern der Modellparameter geschätzt. Dafür werden bedingte Erwartungswerte genutzt. Im anschließenden M-Schritt wird die Likelihood-Funktion der kompletten Daten - d.h. der beobachteten Daten und der im E-Schritt berechneten Erwartungswerte für die fehlenden Daten - maximiert.[18]

### 3.2.2 Exkurs: bedingter Erwartungswert

Bedingte Erwartungswerte stellen eine Art Verallgemeinerung des Begriffes *bedingte Wahrscheinlichkeit* dar.

Sei  $(\Omega, \mathfrak{A}, \mathcal{P})$  ein Wahrscheinlichkeitsraum und  $A, B \in \mathfrak{A}$  zwei Ereignisse mit  $P(B) > 0$ . Dann ist die bedingte Wahrscheinlichkeit von A unter der Bedingung B definiert durch

$$P(A|B) = \frac{P(A \cap B)}{P(B)}.$$

Bei Unabhängigkeit der beiden Ereignisse gilt  $P(A|B) = P(A)$ . Für den bedingten Erwartungswert betrachtet man nun statt des Ereignisses A eine Zufallsvariable X. Der bedingte Erwartungswert von X gegeben B sei definiert durch

$$E(X|B) = \frac{E(X \cdot \mathbf{1}_B)}{P(B)} = \frac{\int_B X dP}{P(B)},$$

wobei  $\mathbf{1}_B$  die Indikatorfunktion der Ereignisse B darstellt.

Je nachdem, ob X eine diskrete oder stetige Zufallsvariable ist, kann man die Gleichung für den bedingten Erwartungswert weiter spezifizieren.

Wenn X eine diskrete Zufallsvariable mit  $P(X = x_i) = p_i$  (wobei  $i \in I$  -Indexmenge und  $\sum p_i = 1$ ) ist, dann gilt

$$\begin{aligned} E(X|B) &= \sum_{k \in I} x_k P(x = x_k | B) \\ &= \frac{1}{P(B)} \cdot \sum_{k \in I} x_k P(\{x = x_k\} \cap B) \end{aligned}$$

und wenn die Zufallsvariable eine Dichte  $f_X$  besitzt, kann der bedingte Erwartungswert geschrieben werden als

$$E(X|B) = \frac{1}{P(B)} \cdot \int_B x f_X(x) dx.$$

Darüber hinaus kann auch die „Bedingung“, unter der der Erwartungswert von  $X$  berechnet wird, die Gestalt einer Zufallsvariable  $Y$  annehmen.

Die Grundlage dafür bildet die Annahme

$$A_i = \{\omega \in \Omega : Y(\omega) = y_i\}.$$

Dabei gilt für die  $A_i$ , dass die Schnittmenge  $A_i \cap A_j = \emptyset$  ist, wenn  $y_i \neq y_j$  für  $i \neq j$ . Weiterhin ergibt die Vereinigung aller  $A_i$  die Grundmenge  $\Omega$ :

$$\bigcup_{i \in I} A_i = \Omega.$$

Nun hängt das Erscheinungsbild des bedingten Erwartungswertes davon ab, welches der  $A_i$  eintritt, d.h. für alle  $\omega \in A_i$  bekommt man

$$E(X|A_i)(\omega) = \frac{1}{P(A_i)} \cdot \sum_{k \in I} x_k P(\{x = x_k\} \cap A_i)(\omega) \quad (3.1)$$

$$\text{bzw. } E(X|A_i)(\omega) = \frac{1}{P(A_i)} \cdot \int_{A_i} X dP. \quad (3.2)$$

Daraus folgt, dass der bedingte Erwartungswert  $E(X|A_i)(\omega)$  ebenfalls als eine Zufallsvariable aufgefasst werden kann.

Allgemeiner gilt

$$E(X|Y)(\omega) = \begin{cases} E(X|A_1)(\omega) & \omega \in A_1 \\ E(X|A_2)(\omega) & \omega \in A_2 \\ \vdots & \vdots \end{cases}$$

[17]

### 3.2.3 Algorithmus

Zur Vorbereitung des Expectation-Schritts werden zunächst die unvollständigen Daten  $y$  durch die fehlenden Daten  $z$  erweitert, sodass die kompletten Daten darstellbar sind als

$$x = (y, z).$$

Weiterhin ist es nötig, einen passenden Startparametervektor  $\theta_0$  zu wählen, der alle zu schätzenden Parameter enthält. Idealerweise sollte dieser so gewählt werden, dass er wenigstens in der Nähe des realen Parametervektors liegt, denn der EM-

Algorithmus ist charakterisiert durch eine relativ langsame lineare Konvergenzrate und kann auch in lokalen Maxima hängenbleiben.

Die folgenden Iterationsschritte werden dann bis zur Konvergenz, also bis sich die zu schätzenden Parameter kaum noch ändern, ausgeführt:

**1. Expectation-Schritt:**

Berechnen des bedingten Erwartungswertes

$$Q(\theta) = Q(\theta|\theta^{(i)}) = E(l(\theta, x)|y, \theta^{(i)})$$

**2. Maximization-Schritt:**

$Q(\theta)$  bzgl.  $\theta$  maximieren

→ neuer Schätzwert

$$\theta^{(i+1)} = \operatorname{argmax}_{\theta} Q(\theta|\theta^{(i)})$$

und weiter mit Expectation-Schritt.

[18]

### 3.3 konkrete Anwendung

Für das dieser Arbeit zugrundeliegende Problem ist es notwendig, sich zu überlegen, von welcher Art die „fehlenden Daten“ sind. Die Intensität in jedem Intervall ist zwar gegeben, jedoch weiß man damit nicht automatisch, wieviele Photonen in einem Intervall zu einer Komponente mit den Parametern  $\alpha_i$  und  $\tau_i$  gehören. Die Idee ist es, zuerst mit dem Nelder-Mead-Simplex-Verfahren, dessen zugrundeliegende Theorie in Kapitel 4 noch näher erklärt wird, die Parameter  $\tau_i$  zu schätzen, um dann den EM-Algorithmus für die Optimierung der  $\alpha_i$  anzuwenden. Für diesen werden die unvollständigen Daten erweitert mit dem Vektor  $z = (n_{ij}^*)$ , sodass die vollständigen Daten die Form

$$x = (y, z)$$

annehmen. Dabei ist  $n_{ij}^*$  die Anzahl der Beobachtungen, die zur Komponente  $j$  gehören und in das  $i$ -te Intervall fallen. [19]

Bevor der Erwartungswert-Schritt ausgeführt werden kann, benötigt man zunächst die Log-Likelihood-Funktion der kompletten Daten. Dafür wird das in Abschnitt 2.5 beschriebene Modell verwendet, das durch die Distributivitätseigenschaft der Faltung in eine andere Form überführt wurde.

Die Likelihood der kompletten Daten ergibt sich aus

$$\begin{aligned} L_c(\theta, x) &= \prod_{i=1}^m \prod_{j=1}^k f_j(y_i, z_i) \\ &= \prod_{i=1}^m \prod_{j=1}^k f_j(y_i|z_i) \cdot f(z_i) \end{aligned}$$

Der Vektor  $\theta$  enthält im Allgemeinen alle zu schätzenden Parameter, da jedoch in diesem Fall die Schätzung auf zwei Methoden aufgeteilt wird, geht es nur um die Parameter  $\alpha_i$ . Das doppelte Produkt kommt hier zustande, weil es sowohl die einzelnen Intervalle als auch die beiden Komponenten zu beachten gilt. Nun muss die Gleichung noch aufgelöst werden:

$$\begin{aligned} L_c(\theta, x) &= \prod_{i=1}^m \prod_{j=1}^k f_j(y_i|n_{ij}^*) \cdot f(n_{ij}^*) \\ &= \prod_{i=1}^m \prod_{j=1}^k (P_{ij}(\tau_j) \cdot \alpha_j)^{n_{ij}^*} \end{aligned}$$

Darin ist  $P_{ij}(\tau_j)$  die Wahrscheinlichkeit, dass eine einzelne Beobachtung der  $j$ -ten Komponente in das  $i$ -te Intervall fällt [22]. Diese wird berechnet aus

$$P_{ij}(\tau_j) = \int_{a_{i-1}}^{a_i} (f_j(t) \star g(t)) dt$$

Weil in einem Intervall  $i$  mit einer Komponente  $j$  in Wirklichkeit  $n_{ij}^*$ -mal voneinander unabhängige Ereignisse eintreten, wird der Term  $P_{ij}(\tau_j)$  mit jenem - eigentlich unbekanntem -  $n_{ij}^*$  potenziert.

Die Log-Likelihood der kompletten Daten wird dann zu

$$\log L_c(\theta, x) = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^k n_{ij}^* \log \alpha_j + \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^k n_{ij}^* \log P_{ij}(\tau_j)$$

Die „Q-Funktion“ des Expectation-Schritts ergibt sich aus

$$Q(\theta) = Q(\theta|\theta^{(l)}) = E(\log L_c(\theta, x)|y, \theta^{(l)}).$$

Nach Einsetzen der Log-Likelihood ist erkennbar, dass einige Terme vor den bedingten Erwartungswert gezogen werden können -  $\log \alpha_j$  und  $\log P_{ij}(\tau_j)$  sind vom

Aussehen der bekannten Daten unabhängig, sodass man nun  $Q(\theta)$  schreiben kann als

$$Q(\theta) = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^k E(n_{ij}^*|y) \cdot \log \alpha_j + \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^k E(n_{ij}^*|y) \cdot \log P_{ij}(\tau_j)$$

In der Formel für  $\log L_c(\theta, x)$  sollen jetzt also nur die unbekanntes  $n_{ij}^*$  durch ihren Erwartungswert unter der Bedingung, dass die Anzahl der gemessenen Photonen im jeweiligen Intervall bekannt sind, ersetzt werden.

Mit Gleichung 3.2 ergibt sich für den bedingten Erwartungswert

$$\begin{aligned} E(Z_{ij}|Y = n_i) &= \frac{1}{P(Y = n_i)} \cdot \int_Y Z_{ij} dP \\ &= \frac{1}{P_i(\tau_j^{(t)})} \cdot n_i \cdot \alpha_j P_{ij}(\tau_j^{(t)}) \\ &= \frac{\alpha_j n_i P_{ij}(\tau_j^{(t)})}{P_i(\tau_j^{(t)})} \\ &:= e_{ij}^{(t)} \end{aligned}$$

In diesem Fall bezeichnet  $t$  die  $t$ -te Iteration und

$$P_i(\tau_j^{(t)}) = \sum_{j=1}^k P_{ij}(\tau_j^{(t)}).$$

Natürlich stellt sich die Frage nach der Gestalt der  $P_{ij}(\tau_j)$ , für deren Beantwortung nun auf die Zerlegung der Modellfunktion in Kapitel 2.4 zurückgegriffen wird. Nimmt man für die Apparatefunktion  $g(t)$  eine einfache Normalverteilung mit Mittelwert  $\mu$  und Standardabweichung  $\sigma$  an, bekommt die Faltung mit  $f_j(t)$ , also der Fluoreszenzlebensdauerfunktion für eine der Komponenten, die folgende Form:

$$f_j(t) \star g(t) = \frac{e^{\frac{2\mu\tau_j + \sigma^2 - 2\tau_j t}{2\tau_j^2}}}{\sqrt{\frac{1}{\sigma^2} \sigma \tau_j}}$$

Nach Integration über das jeweilige Intervall  $[a_{i-1}, a_i]$  ergibt sich jetzt

$$P_{ij}(\tau_j) = \int_{a_{i-1}}^{a_i} (f_j(t) \star g(t)) dt \quad (3.3)$$

$$= \int_{a_{i-1}}^{a_i} \frac{e^{\frac{2\mu\tau_j + \sigma^2 - 2\tau_j t}{2\tau_j^2}}}{\sqrt{\frac{1}{\sigma^2} \sigma \tau_j}} dt \quad (3.4)$$

$$= \sqrt{\frac{1}{\sigma^2}} \sigma \left( e^{-\frac{a_{i-1}}{\tau_j}} - e^{-\frac{a_i}{\tau_j}} \right) e^{\frac{2\mu\tau_j + \sigma^2}{2\tau_j^2}} \quad (3.5)$$

Die Gleichung 3.5 ist vergleichsweise simpel, wenn man bedenkt, dass diese nur eine der Komponenten und nicht etwa mehrere abdeckt. Deswegen ist die Zerlegung der Faltung in kleinere Stücke sinnvoll - schon aus Gründen der Übersichtlichkeit. Jedoch kann man sich leicht vorstellen, wie umfangreich schon dieser kleine Teil wird, wenn man die Apparatefunktion als Summe von Normalverteilungen annimmt.

Die  $P_{ij}(\tau_j)$  hängen nicht vom gesuchten Parametervektor  $\alpha$  ab, deshalb ist in diesem Fall die Ableitung der Q-Funktion nach  $\alpha_j$  analytisch lösbar.

Die Q-Funktion soll unter der Nebenbedingung

$$\sum_j \alpha_j = 1$$

maximiert werden. Dafür wird die Lagrange-Multiplikatorenregel verwendet und die folgende Lagrange-Funktion definiert:

$$\Lambda(\alpha_1, \alpha_2, \lambda) = Q(\alpha_1, \alpha_2) + \lambda \cdot (b(\alpha_1, \alpha_2) - c)$$

In dieser Gleichung ist  $\lambda$  der Lagrange-Multiplikator,  $c = 1$  und

$$b(\alpha_1, \alpha_2) = \alpha_1 + \alpha_2.$$

Die Lösung des Maximierungsproblems mit einer Nebenbedingung entspricht nun dem lokalen Maximum der Lagrangefunktion, das wie folgt berechnet wird:

$$\nabla_{\alpha_1, \alpha_2, \lambda} \Lambda(\alpha_1, \alpha_2, \lambda) = 0$$

Durch Nullsetzen der partiellen Ableitungen ergeben sich drei Gleichungen.

$$\begin{aligned}\sum_i \frac{e_{i1}^{(t)}}{\alpha_1} &= 0 \\ \sum_i \frac{e_{i2}^{(t)}}{\alpha_2} &= 0 \\ \alpha_1 + \alpha_2 - 1 &= 0\end{aligned}$$

Nun werden die ersten beiden Gleichungen nach  $\alpha_1$  bzw.  $\alpha_2$  aufgelöst und in die dritte Gleichung eingesetzt.

$$\begin{aligned}\alpha_1 &= \sum_i \frac{e_{i1}^{(t)}}{-\lambda} \\ \alpha_2 &= \sum_i \frac{e_{i2}^{(t)}}{-\lambda} \\ \rightarrow 1 &= \frac{\sum_i e_{i1}^{(t)} + \sum_i e_{i2}^{(t)}}{-\lambda} \\ \rightarrow \lambda &= -\left(\sum_i e_{i1}^{(t)} + \sum_i e_{i2}^{(t)}\right)\end{aligned}$$

Der iterative Schätzer für die  $\alpha$  wird dann zu

$$\alpha_j^{(t+1)} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^m e_{ij}^{(t)}. \tag{3.6}$$

## 4 Implementierung

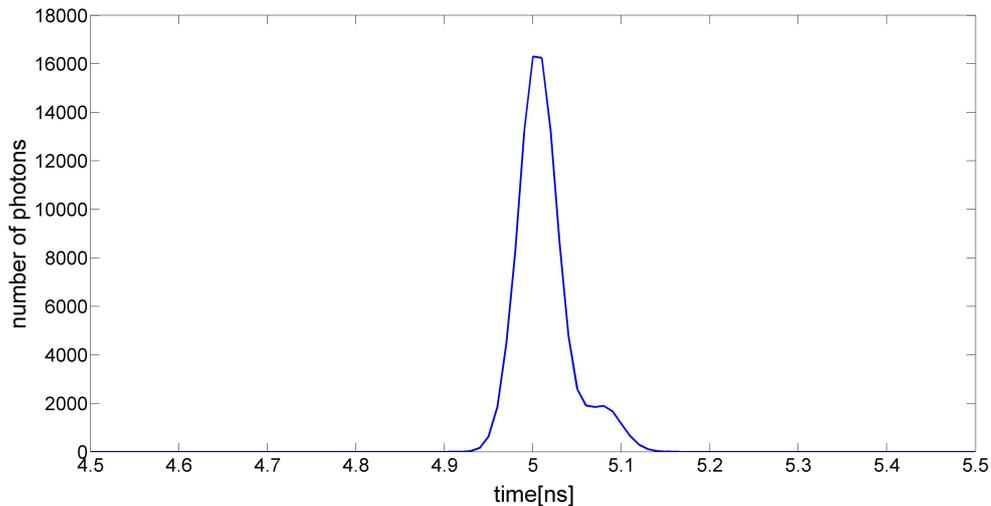
### 4.1 Simulation der Daten

Um die Effizienz des Algorithmus überprüfen zu können, bietet es sich an, die Daten zunächst mit festgelegten Parametern zu simulieren. Aus diesen Daten können dann mithilfe des Algorithmus die benötigten Parameter extrahiert und mit den Anfangswerten verglichen werden. Die folgenden Abschnitte beschreiben zunächst, wie die Apparatefunktion und Fluoreszenzlebensdauerfunktion im Einzelnen simuliert werden, um eine Vorstellung von deren Aussehen zu bekommen. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse der Simulationen darüber hinaus auch grafisch dargestellt. Im Anschluss wird beschrieben, wie die simulierten Daten für die Apparate- und Fluoreszenzlebensdauerfunktion so verknüpft werden können, dass diese Verknüpfung die Faltung der Funktionen repräsentiert. Mit diesem Wissen können die Daten dann für jedes Pixel eines Bildes simuliert werden.

#### 4.1.1 Apparatefunktion

Für die Simulation der Apparatefunktion wurde die Matlab-Funktion *randn* verwendet. Diese erzeugt standardnormalverteilte Zufallszahlen im Intervall  $[0, 1]$ . Um die gewünschte Verteilung zu bekommen, werden die Zufallszahlen mit der Standardabweichung multipliziert, der Mittelwert wird addiert. Dabei ergibt sich die Standardabweichung definitionsgemäß aus der Division der Halbwertsbreite mit der Zahl 2,35482. Diese Halbwertsbreite ist die Differenz der Werte auf der Abszissenachse, bei denen die Funktion auf die Hälfte ihres Maximums abgesunken ist. [20] In der Praxis wird die Halbwertsbreite der Apparatefunktion meist als ungefähr 50 Picosekunden angenommen, was zum Beispiel bei insgesamt 4000 Intervallen mit einer Breite von 10 Picosekunden ungefähr 5 Intervallen entspricht.

Damit die simulierten Daten eine Summe zweier Normalverteilungen repräsentieren, nimmt man für die erste Normalverteilung ca. 90-95% der Zufallszahlen. Die Verschiebung der zweiten Normalverteilung erfolgt um eine Halbwertsbreite. Im Anschluss werden die Pseudozufallszahlen in Intervalle einsortiert.



**Abbildung 4.1:** Simulierte Apparatefunktion aus 100.000 Zufallszahlen mit einer Halbwertsbreite von 50 ps und  $\mu = 5$  ns.

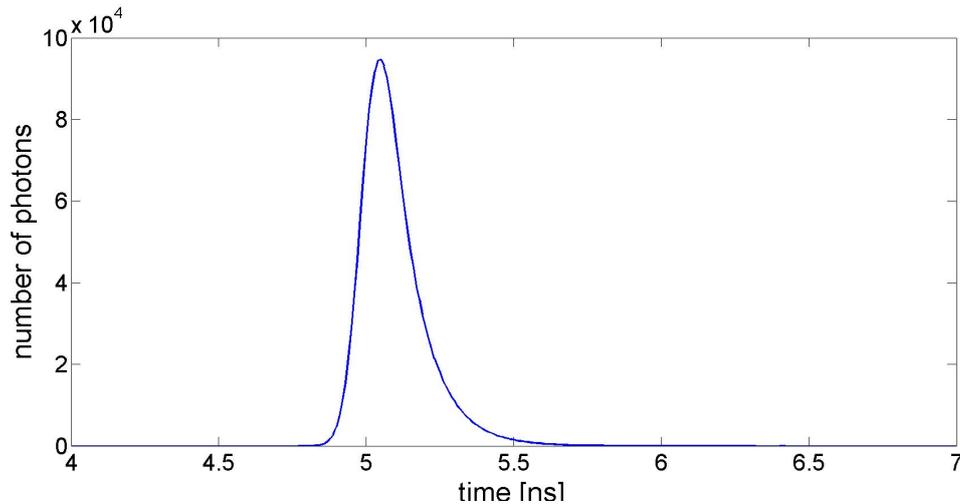
Die Grafik 4.1 zeigt die Form einer solchen Apparatefunktion mit einer Halbwertsbreite von 50 Picosekunden und einem Mittelwert von 5 Nanosekunden, die aus 100.000 Zufallszahlen generiert wurde. Darin sind für jedes der Zeitintervalle die Anzahl der Zufallszahlen, die in ein Intervall fallen, auf der y-Achse abgetragen - in diesem Fall wären das die Anzahl der gezählten Photonen.

Außerdem ist in dieser Abbildung der zweite „Peak“ leicht zu erkennen. Die simulierten Daten, die der ersten Normalverteilung entstammen, sehen aus wie ein Teil einer Glockenkurve, aber zum Ende hin sieht es aus, als würde diese noch einmal „ausgeschlagen“, was durch die Zufallszahlen der zweiten Verteilung verursacht wird.

#### 4.1.2 Referenzkomponente

Oft wird für die Simulation der Apparatefunktion eine sogenannte Referenzkomponente verwendet. Der Grund dafür ist, dass in der Praxis die Probe bei einer anderen Wellenlänge als bei der Anregung fluoresziert. Für das Modell benötigt man die Apparatefunktion, die bei der Anregungswellenlänge gemessen wurde, welche im Allgemeinen nicht mit der Apparatefunktion bei der Emissionswellenlänge übereinstimmt. Um dies zu korrigieren, führt man eine Referenzkomponente ein, die das Licht bei der gleichen Wellenlänge wie die Probe absorbiert und auch bei der gleichen Wellenlänge fluoresziert, also auch wieder exponentialverteilt ist. Diese Referenzkomponente ist durch einen sehr schnellen Zerfall charakterisiert. [24]

Die Verknüpfung der IRF mit der Fluoreszenzlebensdauerfunktion für die Referenzkomponente erfolgt ebenfalls durch Faltung.



**Abbildung 4.2:** Simulation der Apparatefunktion mit Referenzkomponente

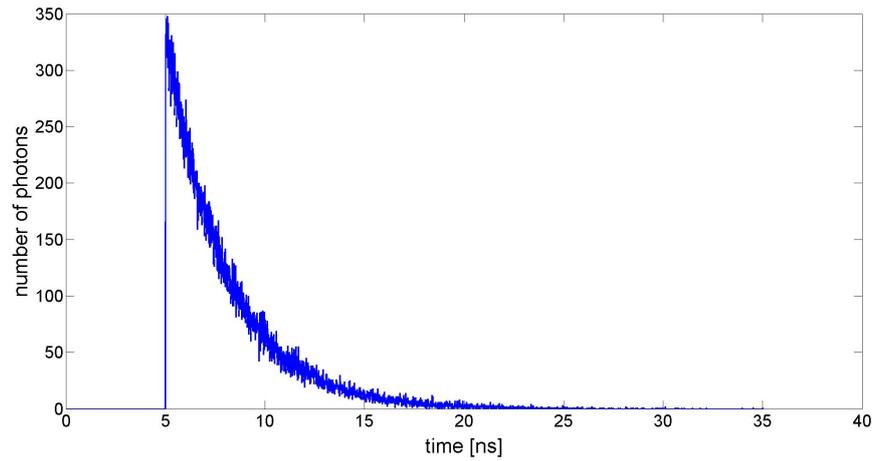
Abbildung 4.2 zeigt eine mit der Fluoreszenzlebensdauer gefaltete IRF. Die Referenzkomponente zerfällt im Mittel innerhalb von 10 Picosekunden. Wenn man die Apparatefunktion in Abbildung 2.8 mit dieser vergleicht, fällt auf, dass sie sich sehr ähnlich sind.

### 4.1.3 Fluoreszenzlebensdauerfunktion

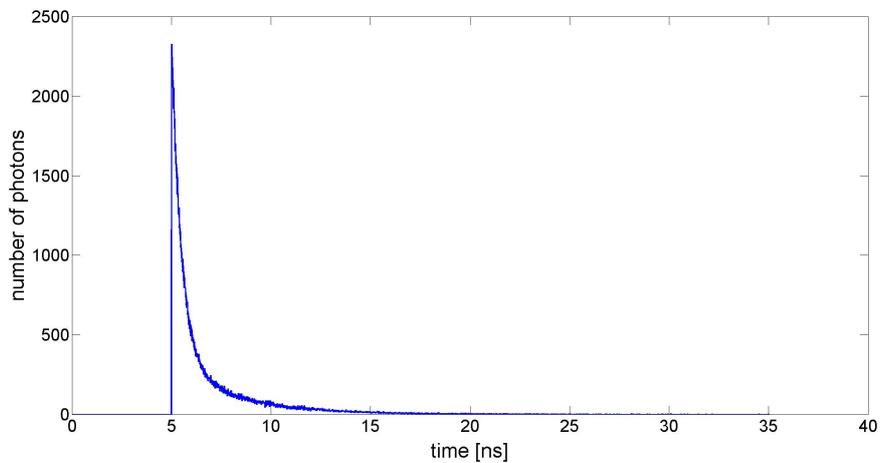
Die Fluoreszenzlebensdauer wird mit exponentialverteilten Pseudozufallszahlen simuliert, wofür in Matlab die Funktion `exprnd` zur Verfügung steht. Diese erzeugt  $n$  exponentialverteilte Zufallszahlen mit dem Erwartungswert  $\tau$ , also für eine Komponente. Wie bei der Simulation der Apparatefunktion werden diese Zufallszahlen in Intervalle einsortiert und geplottet. Abbildung 4.3(a) zeigt  $n = 100.000$  sortierte exponentialverteilte Zufallszahlen mit  $\tau = 3ns$ .

Die Vorgehensweise bei der Simulation der Fluoreszenzlebensdauerfunktion mit zwei Komponenten ist ähnlich wie bei der Simulation der IRF als Summe von Normalverteilungen. Ein vorher festgelegter Teil der Zufallszahlen werden für die erste Komponente simuliert und in die Intervalle einsortiert, dann wird der restliche Anteil der Zufallszahlen für die andere Komponente simuliert, wieder in die Intervalle sortiert und zu den „Counts“ der ersten Komponente addiert. Dieser Anteil an der Gesamtzahl der Photonen entspricht dem Parameter  $\alpha$ .

In Abbildung 4.3(b) sieht man eine solche simulierte Fluoreszenzlebensdauerfunktion mit zwei Komponenten. Die erste Komponente weist mit  $0.5ns$  einen schnellen Zerfall auf, weswegen die Kurve zunächst sehr steil abfällt. Bei ca.  $7ns$  wird sie dann flacher, was durch die Komponente mit einer höheren Lebensdauer von  $3ns$



(a) Exponentialverteilte Zufallszahlen mit  $\tau = 3ns$



(b) Exponentialverteilte Zufallszahlen mit  $\tau_1 = 0.5ns$  und  $\tau_2 = 3ns$

**Abbildung 4.3:** Simulation der Fluoreszenzlebensdauerfunktion mit (a) einer Komponente  $\tau = 3 ns$  mit 100.000 Zufallszahlen und (b) zwei Komponenten  $\tau_1 = 0.5 ns$ ,  $\tau_2 = 3 ns$  mit 1.000.000 Zufallszahlen.

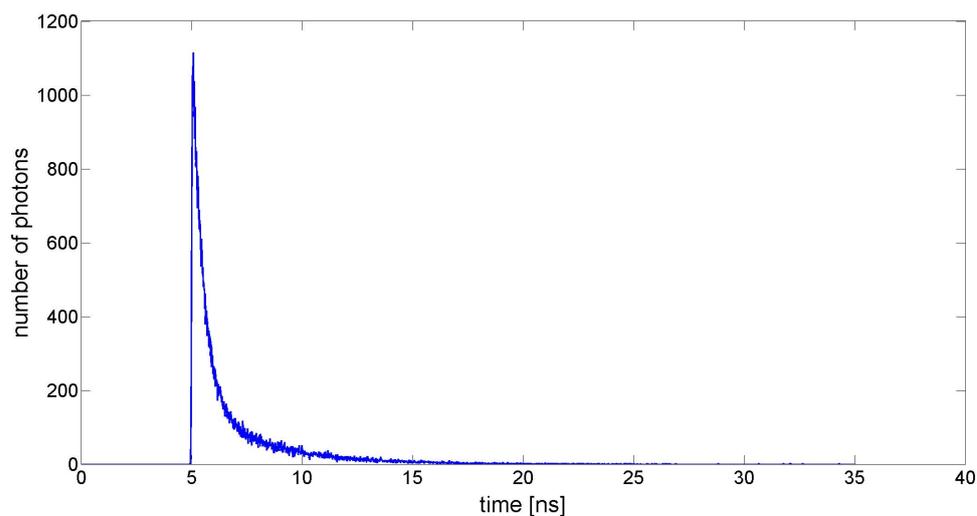
verursacht wird. Weiterhin sieht man beim Vergleich der beiden Abbildungen, dass die Fluoreszenzlebensdauerfunktion bei einer Komponente mit weniger Zufallszahlen simuliert wurde, die Funktion mit zwei Komponenten und einer höheren Anzahl von Photonen ist weniger verrauscht.

#### 4.1.4 Faltung der Zufallsgrößen

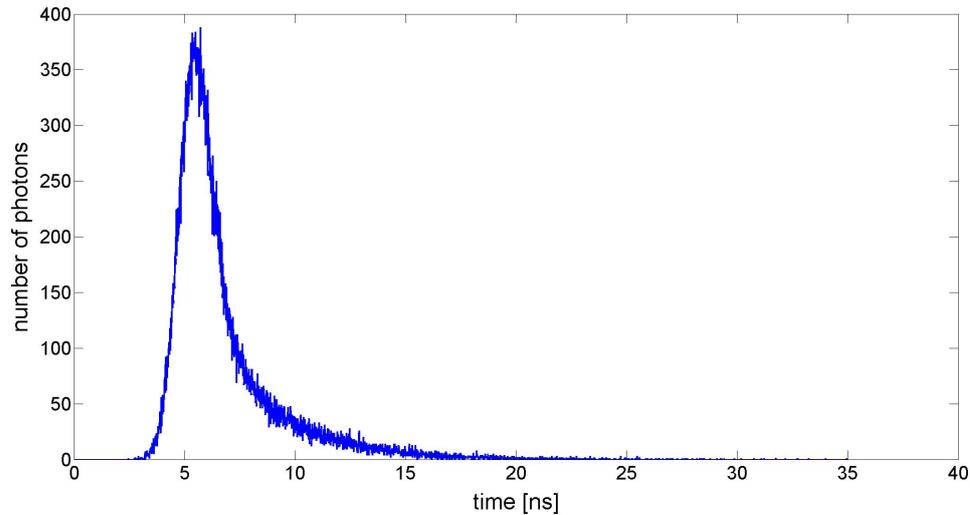
Um die Simulation der Apparate- und Fluoreszenzlebensdauerfunktion durch die Faltung miteinander zu verknüpfen, kann man sich zunutze machen, dass die erzeugten Zufallszahlen auch als unabhängige und stetige Zufallsgrößen aufgefasst werden können.

Allgemein gilt für zwei Zufallsgrößen  $X_1$  und  $X_2$  mit den Dichtefunktionen  $f_1(x)$  und  $f_2(x)$ , dass die Dichtefunktion  $f_y(x)$  der Summe  $Y = X_1 + X_2$  durch die Faltung der beiden Dichten bestimmt ist. Demzufolge müssen diese beiden Zufallsgrößen nur addiert werden, um eine neue Zufallsgröße zu erhalten - also Zufallszahlen, die nach dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell verteilt sind.

Es werden also zuerst alle Zufallszahlen simuliert, dann werden sie addiert und anschließend in die Zeitintervalle einsortiert. Wenn man die simulierten Daten für Fluoreszenzlebensdauer und Apparatefunktion auf diese Weise verknüpft, bekommt man die in Abbildung 4.4 erkennbare Funktion. Zunächst fällt auf, dass die Form dieser Kurve sich nicht wirklich von der Kurve in Abbildung 4.3(b) unterscheidet.



**Abbildung 4.4:** Ergebnis der Faltung von Apparate- und Fluoreszenzlebensdauerfunktion mit zwei Komponenten.



**Abbildung 4.5:** Faltung der Fluoreszenzlebensdauerfunktion mit breiter Apparatfunktion

Der Grund ist die sehr schmale Apparatfunktion. Wenn man die Apparatfunktion nun etwas breiter macht, bekommt man die Kurve in Abbildung 4.5. Darin kann man die Form der IRF erkennen.

Auch wenn die schmalere Apparatfunktion scheinbar keine Veränderung bewirkt, kann man sie also nicht einfach außer Acht lassen.

#### 4.1.5 Pixelbasierte Simulation

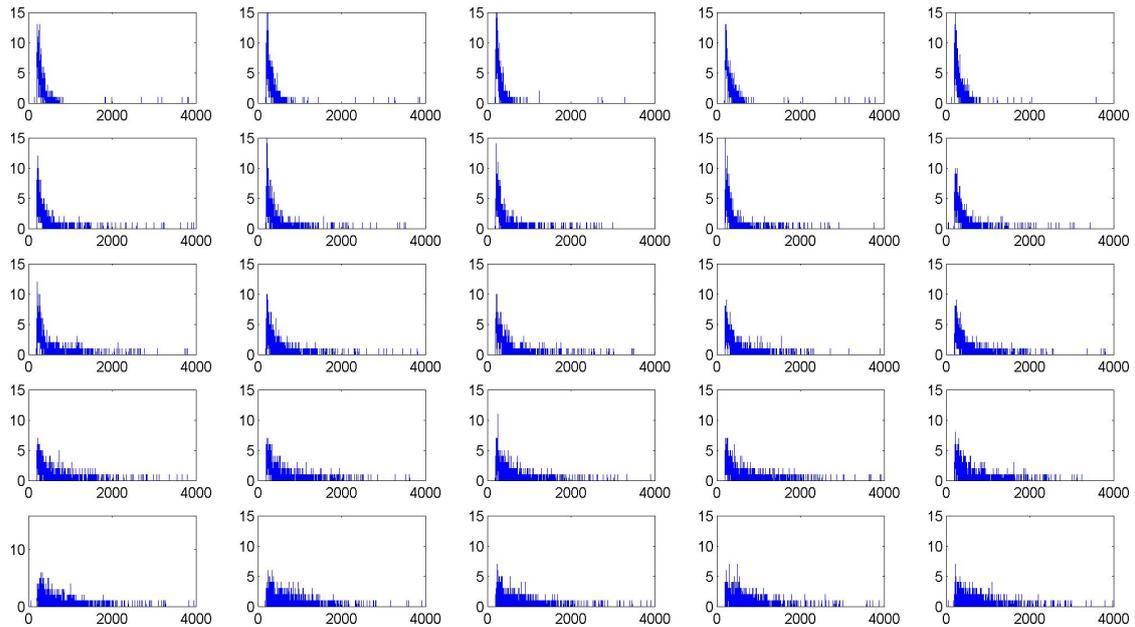
Jetzt soll die Simulation der Daten für jedes Pixel eines Bildes erfolgen. Das Prinzip besteht darin, die simulierten Daten in einem Array zu speichern. Der Zugriff auf die einzelnen „Pixel“ ist dann über den jeweiligen Eintrag des Arrays möglich, der die simulierten gefalteten Daten sowie die Apparatfunktion enthält.

Dieser Array wird so konstruiert, dass  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  in jeder Zeile gleich sind. Man fängt beispielsweise mit  $\alpha_1 = 1$  und  $\alpha_2 = 0$  an und subtrahiert bzw. addiert in jeder der nächsten Zeilen die Zahl  $\frac{1}{s-1}$ , wobei  $s$  die Anzahl der Zeilen ist. Somit ist in der letzten Zeile  $\alpha_1 = 0$  und  $\alpha_2 = 1$ .

Man beginnt also nur mit der ersten Komponente und verändert die  $\alpha$  schrittweise, bis in der letzten Zeile nur noch die zweite Komponente vorhanden ist.

Die Abbildung 4.6 zeigt simulierte Daten für  $5 \times 5$  Pixel mit 1000 Photonen pro Pixel. Die erste Komponente hat eine Lebenszeit von  $1\text{ ns}$ , die zweite zerfällt durchschnittlich

tlich nach  $5ns$ . Es ist erkennbar, dass die Funktionen in jeder Zeile flacher werden, in der Mitte sind beide  $\alpha$  gleich 0,5. Die maximale Anzahl der Photonen liegt dabei nicht über 15. Um die Simulationen etwas praxisnaher zu gestalten, wird für jeden Eintrag des Arrays eine separate IRF mit der Referenzkomponente  $\tau_{ref} = 10ps$  simuliert, denn bei den gemessenen Daten unterscheiden sich die Apparatefunktionen wegen der endlichen Lichtgeschwindigkeit je nach Position. Dafür kann man zudem einen weiteren Parameter einführen, der für die zeitliche Verschiebung der IRF verantwortlich ist und mithilfe der Nelder-Mead-Methode zusammen mit den Parametern  $\tau$  geschätzt werden kann. Weiterhin gilt es zu beachten, dass meistens auch ein zeitunabhängiges Hintergrundrauschen gemessen wird, d.h. es müssten auch im Modell eine bestimmte Anzahl Photonen hinzugefügt werden. Für die pixelbasierte Schätzung kann man dies jedoch vernachlässigen, da dadurch nur wenige Photonen pro Pixel gemessen werden.



**Abbildung 4.6:** Simulierte Daten für  $5 \times 5$  Pixel mit 1000 Photonen pro Pixel.  $\alpha_1$  beginnt bei 1 und nimmt von oben nach unten schrittweise ab, bis die zugehörige Komponente in der letzten Zeile nicht mehr in die Verteilung einfließt.

## 4.2 Vorüberlegungen zur Simplex-Methode

Für die Schätzung der Parameter  $\tau_i$  soll ein anderer Ansatz verfolgt werden. Mithilfe der ableitungsfreien Simplex-Methode zur Optimierung nichtlinearer Funktionen nach John Nelder und Roger Mead, oft auch Downhill-Simplex-Verfahren oder Nelder-Mead-Algorithmus genannt, wird die im folgenden beschriebene Log-Likelihood-Funktion minimiert.

Seien  $n_1, \dots, n_k$  die Anzahl der gemessenen Photonen in jedem von  $k$  Intervallen und  $g_1(x), \dots, g_k(x)$  die zugehörigen „Erwartungswerte“, die von dem gesuchten Parametervektor  $x$  abhängig sind. Die  $g_i(x)$  ergeben sich aus der Formulierung des Modells - ihre Berechnung erfolgt durch eine iterative Methode, auf die im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

Man betrachtet jetzt die Verteilung der Fehler in jedem Intervall, die gemeinhin als Poisson- oder in diesem Fall multinomialverteilt angenommen werden.

Voraussetzung für die Annahme einer Multinomialverteilung ist dabei, dass die Gesamtanzahl  $N$  der gemessenen Photonen, die sich aus der Summe aller  $n_i$  ergibt, bekannt ist.

Die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion wird dann zu

$$w(n_i, g_i(x)) = (N!)^{\frac{1}{k}} \cdot \frac{g_i(x)^{n_i}}{N^{n_i} n_i!}.$$

Daraus wird zuerst die Likelihood-Funktion bestimmt:

$$L(n, g(x)) = \prod_{i=1}^k w(n_i, g_i(x))$$

Die zu minimierende Log-Likelihood-Funktion nimmt schließlich die folgende Form an

$$\log L(n, g(x)) = \sum_{i=1}^k n_i \cdot \ln \frac{n_i}{g_i(x)}.$$

Mit den  $n_i$  und  $g_i(x)$  kann man nun die gewichteten Residuen berechnen:

$$r_i = \frac{g_i(x) - n_i}{\sqrt{n_i}}.$$

[10]

## 4.3 Schätzung der Parameter

### 4.3.1 Simulierte Daten

#### Schätzung der Parameter $\tau$

Die Schätzung des Parametervektors  $\tau$  geht mit der Matlab-Prozedur *fminsearch* vorstatten [14]. Der Code ist in verschiedene Funktionen aufgeteilt, die von der Hauptfunktion aufgerufen werden oder untereinander kommunizieren. Die Eingabvariablen für die Funktion sind die simulierten gefalteten Daten, die Apparatfunktion, ein Wert für die Referenzkomponente  $\tau_{ref}$  und die Startparameter für  $\alpha$ ,  $\tau$  sowie für die Verschiebung der IRF und den Hintergrund. Für diese Startparameter, die in der Variable  $x_0$  zusammengefasst werden, soll die Funktion entsprechende Rückgabewerte liefern.

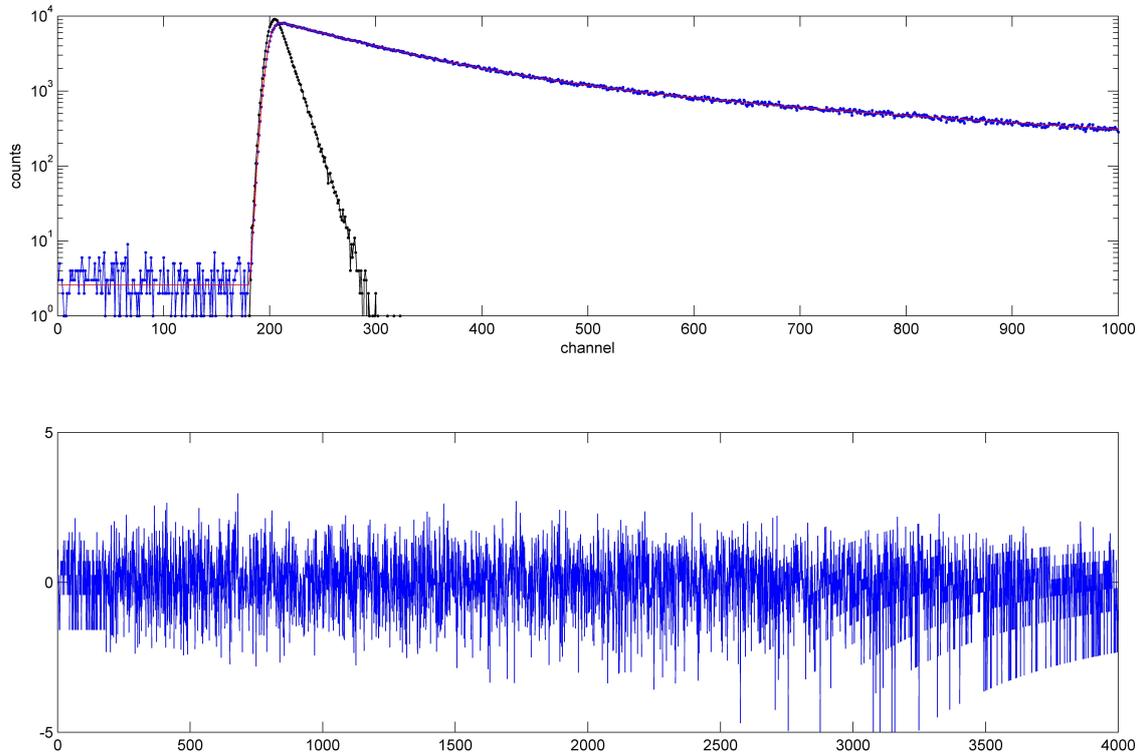
Nach der Definition von  $x_0$  wird die erwähnte Prozedur *fminsearch* aufgerufen, die die Log-Likelihood-Funktion bezüglich  $x$  minimieren soll. Für die Berechnung der Log-Likelihood-Funktion braucht man vorher noch die „erwarteten Werte“ in jedem Kanal, die durch die in Abschnitt 2.4.3 vorgestellte iterative Methode berechnet werden. Dann wird mit den neuen Parametern das Modell nochmals berechnet. Dieses Modell wird somit an die simulierten Daten angepasst, sodass diese in einer Grafik zusammen mit der Apparatfunktion geplottet werden können (siehe Abbildung 4.7). Weiterhin werden die gewichteten Residuen berechnet, die in einer separaten Grafik direkt darunter dargestellt werden. Diese Residuen scheinen in den ersten ungefähr 800 Kanälen relativ zufällig zu sein, danach ist jedoch ein systematischer Fehler zu entdecken, der vermutlich etwas mit dem Hintergrundrauschen zu tun hat. Dennoch werden die Parameter *tau* mit dieser Methode sehr genau geschätzt. Die Daten wurden mitunter mit  $\tau_1 = 1ns$  und  $\tau_2 = 5ns$  simuliert - die Prozedur *fminsearch* liefert eine Schätzung mit  $\hat{\tau}_1 = 0.997 ns$  und  $\hat{\tau}_2 = 4.99 ns$ .

#### Schätzung der Parameter $\alpha$

Die im vorigen Abschnitt geschätzten Parameter werden nun an die Funktion weitergegeben, die die Parameter  $\alpha$  mithilfe des in Kapitel 3.3 vorgestellten Schätzers bestimmt.

Zu Anfang wird das Modell mit der iterativen Methode für die einzelnen Komponenten berechnet, da es für den Schätzer benötigt wird.

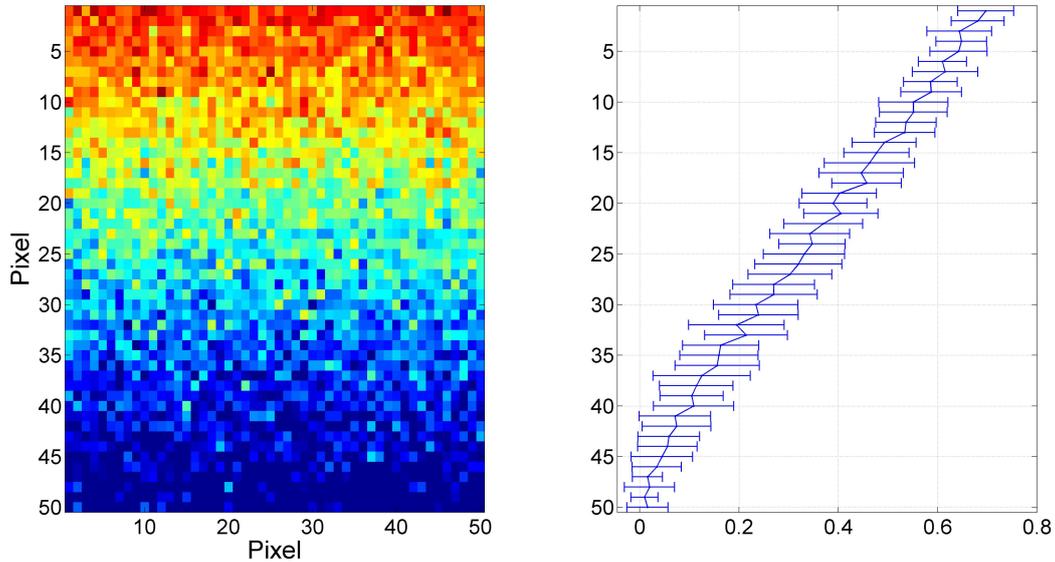
Außerdem muss ein Abbruchkriterium gesetzt werden - der Abbruch kann entweder nach einer bestimmten Anzahl von Iterationsschritten erfolgen oder wenn sich die



**Abbildung 4.7:** Globale Schätzung der Parameter und Anpassung des Modells an die Daten. Die obere Grafik zeigt die Apparatefunktion (schwarz), die simulierten Daten mit Rauschen (blau) und das Modell (rot). In der unteren Grafik sind die gewichteten Residuen für jeden der Kanäle dargestellt.

Parameter im Vergleich zum vorigen Schritt kaum noch ändern. Eine for-Schleife arbeitet alle Einträge des Arrays ab, und für jeden dieser Einträge werden die geschätzten Parameter  $\alpha$  zum Array hinzugefügt.

Natürlich kann man sich nun die Parameter ausgeben lassen, aber bei sehr vielen Pixeln wird es sehr schnell unübersichtlich. Deshalb ist es besser, sich diese grafisch zu veranschaulichen. Dafür nimmt man sich beispielsweise  $\alpha_1$  und erstellt ein Bild mithilfe der Matlab-Funktion *imagesc*. Weiterhin wird für jede Zeile des Bildes der Mittelwert und die Standardabweichung von  $\alpha_1$  berechnet und in einem Diagramm dargestellt, sodass man im Idealfall - also wenn alle  $\alpha_1$  so bestimmt werden, dass sie den bei der Simulation verwendeten  $\alpha_1$  entsprechen - eine Gerade bekommt. Da es jedoch Abweichungen gibt, werden diese in Form von Fehlerbalken dargestellt.



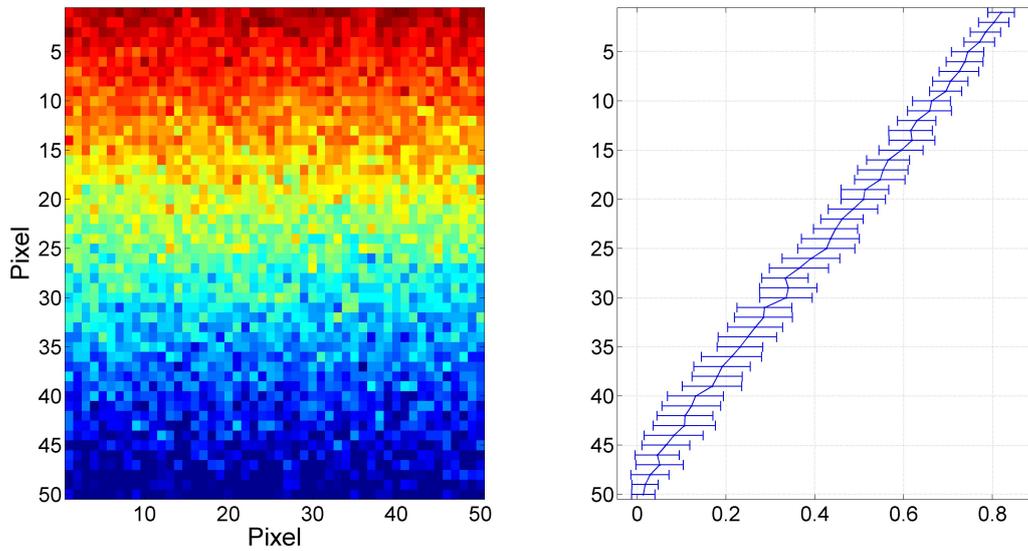
**Abbildung 4.8:** Grafische Darstellung der Schätzung bei  $50 \times 50$  Pixeln und 50 Photonen pro Pixel. Links: Rot bedeutet, dass  $\alpha_1$  nahe bei 1 liegt, im blauen Bereich nähert sich  $\alpha_2$  einem Wert von 1. Rechts: Mittelwert und Standardabweichung für jede Zeile des Bildes. Die Werte von  $\alpha_1$  nahe 1 werden unterschätzt.

Die Abbildung 4.8 zeigt das Bild sowie Mittelwert und Standardabweichung für einen Array der Größe  $50 \times 50$  mit 50 Photonen pro Pixel. Insgesamt sind es also 125000 Photonen im ganzen Bild. Der rote Bereich steht für eine hohe Konzentration der ersten Komponente, blau bedeutet, dass  $\alpha_1$  sehr klein ist. Bei den Mittelwerten gibt es kaum Ausreißer und auch die Standardabweichung ist relativ klein. Allerdings wird  $\alpha_1$  im oberen Bereich des Bildes stark unterschätzt: dort, wo der Parameter eigentlich 1 sein sollte, beträgt der Mittelwert nur ungefähr 0,7.

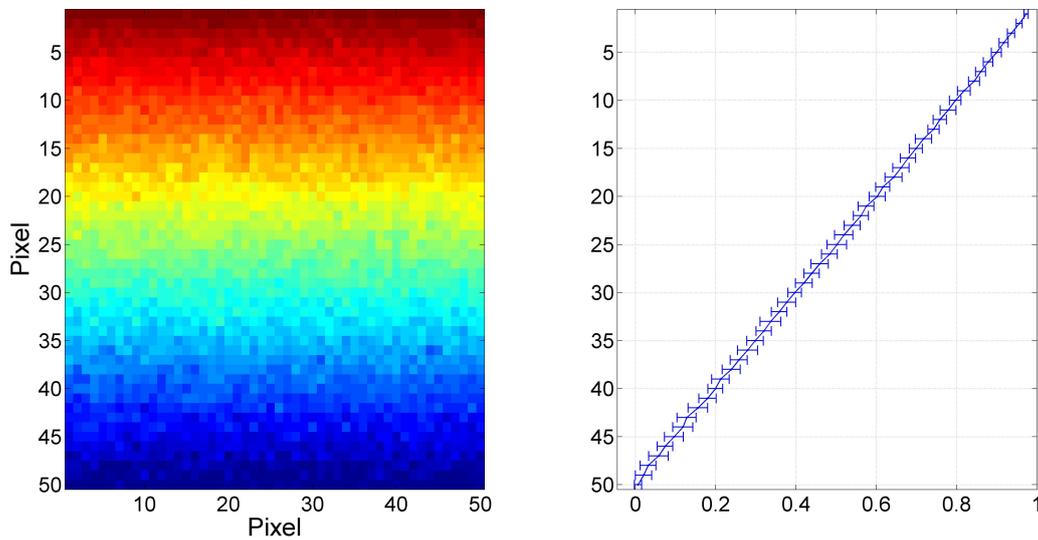
Um herauszufinden, wie es sich bei einer größeren Anzahl von Photonen verhält, ist in die gleiche Grafik in Abbildung 4.9 mit 100 statt 50 Photonen pro Pixel dargestellt. Darin erkennt man, dass im oberen Bereich mehr rot als in der vorigen Grafik enthalten ist, der Mittelwert für die ersten Zeilen ist mit ca. 0.8 etwas höher als mit nur 50 Photonen, die Schätzung hat sich demzufolge verbessert.

Die Grafik 4.10 zeigt schließlich, wie sich die Schätzung der Parameter bei 1000 Photonen pro Pixel verhält. Die Farben des Bildes sind klarer voneinander abgegrenzt und auch die Mittelwerte der  $\alpha_1$  im oberen Teil sind liegen bei 1.

Wenn man die drei Abbildungen vergleicht, fällt außerdem auf, dass die Fehlerbalken immer kleiner werden und die Darstellung der Mittelwerte in der letzten Grafik fast linear verläuft.



**Abbildung 4.9:** Grafische Darstellung der Schätzung bei  $50 \times 50$  Pixeln und 100 Photonen pro Pixel. Links: Rot bedeutet, dass  $\alpha_1$  nahe bei 1 liegt, im blauen Bereich nähert sich  $\alpha_2$  einem Wert von 1. Rechts: Mittelwert und Standardabweichung für jede Zeile des Bildes. Die Schätzung der  $\alpha_1$  hat sich etwas verbessert, auch die Fehlerbalken sind schmaler geworden.



**Abbildung 4.10:** Grafische Darstellung der Schätzung bei  $50 \times 50$  Pixeln und 1000 Photonen pro Pixel. Links: Rot bedeutet, dass  $\alpha_1$  nahe bei 1 liegt, im blauen Bereich nähert sich  $\alpha_2$  einem Wert von 1. Rechts: Mittelwert und Standardabweichung für jede Zeile des Bildes. Fast perfekte Abgrenzung der  $\alpha_i$ ;  $\alpha_1$  wird nicht mehr unterschätzt.

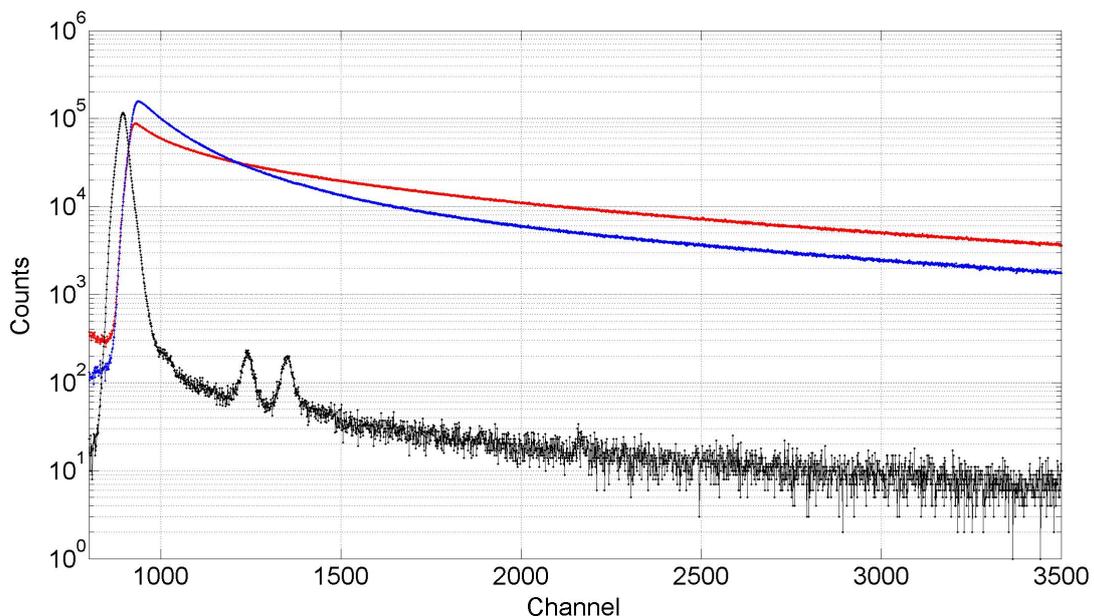
### 4.3.2 Gemessene Daten

Bei der Probe, für die die gemessenen Daten vorliegen, handelt es sich um Hefezellen. Die Messung erfolgt vor und nach der Zugabe von Kalium-Cyanid, das die Mitochondrien in den Zellen blockiert und somit für einen Aufstau von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid ( $\text{NAD}^+$  bzw.  $\text{NADH}$ ), einem Koenzym, das bei verschiedenen Redoxreaktionen im Stoffwechsel eine Rolle spielt, sorgt. Dieses  $\text{NADH}$  wird freigesetzt, weil die blockierten Mitochondrien es nicht mehr abbauen können.

Allgemein kommen in lebenden Zellen sowohl die oxidierte Form  $\text{NAD}^+$  als auch die reduzierte Form  $\text{NADH}$  vor. Dabei fluoresziert nur die reduzierte Form  $\text{NADH}$ .

Die Probe wird mit einer Wellenlänge von 355 nm durch einen gepulsten Laser mit UV-Licht angeregt, die Emissionswellenlänge beträgt ca. 440-480 nm. Die Fluoreszenzlebensdauer des  $\text{NADH}$  hängt von seiner Umgebung ab, woraus sich durchaus Schwankungen zwischen 50 und 100 Picosekunden ergeben können.

Außerdem verändert sich die Abklingzeit der Fluoreszenz, wenn  $\text{NADH}$  an Enzyme gebunden ist. Freies  $\text{NADH}$  ist durch eine sehr kurze Fluoreszenzlebensdauer zwischen 300 und 500 Picosekunden charakterisiert, die Fluoreszenz von enzymgebundenen  $\text{NADH}$  klingt durchschnittlich innerhalb von 1 bis 5 Nanosekunden ab. Nach der Stimulation gibt es mehr freies  $\text{NADH}$ , deshalb besitzt die Probe eine kürzere Fluoreszenzlebensdauer. [23]

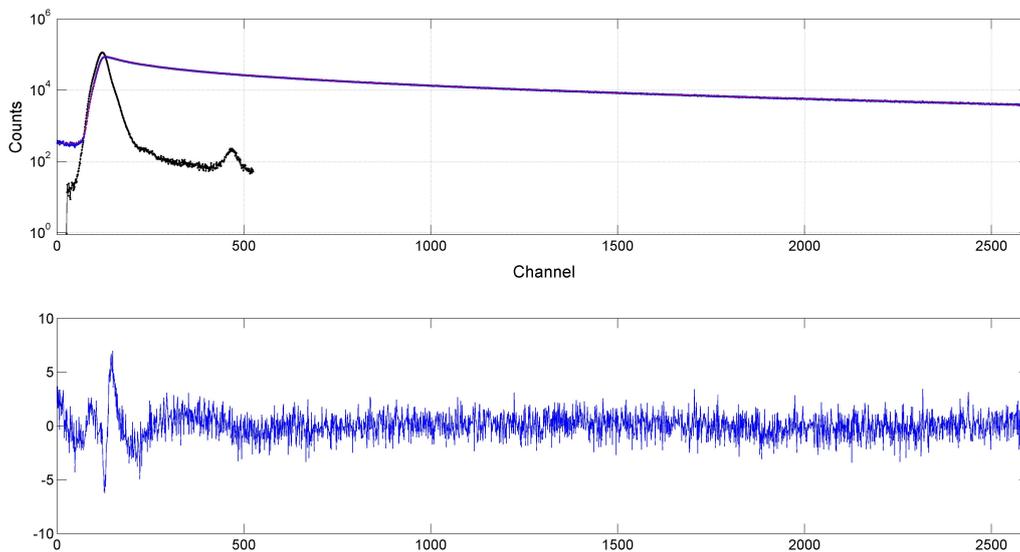


**Abbildung 4.11:** Fluoreszenzlebensdauer vor (rot) und nach (blau) Stimulation der Hefezellen und Apparatfunktion (schwarz) mit Hintergrundrauschen.

Eine grafische Darstellung der Daten ist in Abbildung 4.11 zu sehen. Die rote Kurve repräsentiert die Fluoreszenzlebensdauer vor der Stimulation, die blaue danach. Die gemessenen Photonen für die IRF und das Hintergrundrauschen sind in schwarz dargestellt.

In den Zellen sind weiterhin verschiedene Enzyme vorhanden, an die das NADH gebunden werden kann. Daher ist es von Interesse herauszufinden welches Enzym am aktivsten ist. Für die Anpassung der Daten an das Modell wurden drei Komponenten angenommen, da die Residuen damit minimal werden. Das Rauschen am Ende der Apparatefunktion wird entfernt, da es sonst zu Verzerrungen bei der Berechnung des Modells kommen kann.

Nun werden die Parameter global mit dem Nelder-Mead-Verfahren geschätzt. Das Ergebnis dieser Schätzung ist in der Abbildung 4.12 zu erkennen. Die rote Modellkurve folgt den Daten und die IRF wurde etwas verschoben, jedoch sieht man an den Residuen, dass die Anpassung an dieser Stelle nicht sehr gut ist. Die Schätzung der Parameter  $\tau$  ergibt  $\tau_1 = 0.258ns$ ,  $\tau_2 = 1.091ns$  und  $\tau_3 = 4.552ns$ . Die sehr kurze Fluoreszenzlebensdauer repräsentiert dabei das freie NADH, bei den anderen ist das NADH enzymgebunden.

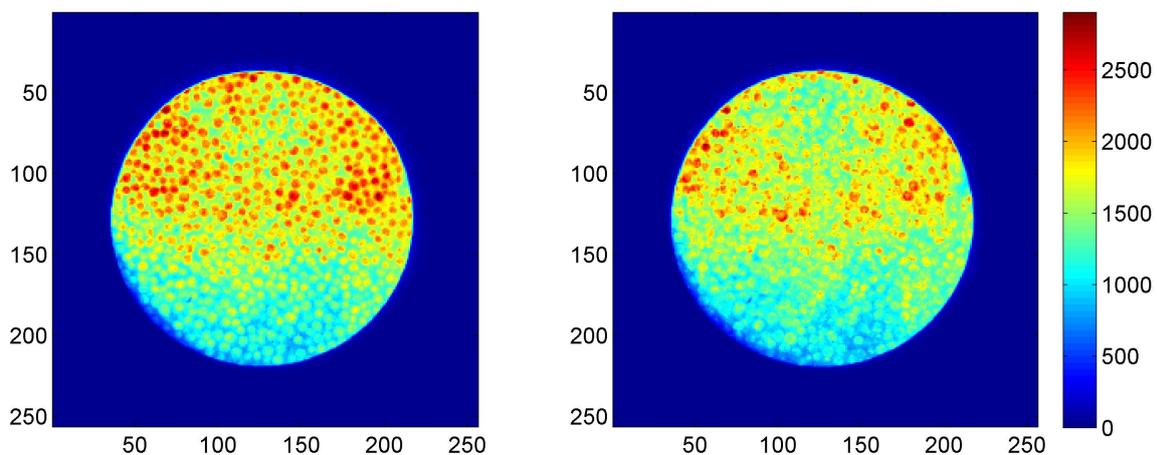


**Abbildung 4.12:** Globale Schätzung der Parameter und Anpassung des Modells an die Daten mit drei Komponenten, für die sich  $\tau_1 = 0.258ns$ ,  $\tau_2 = 1.091ns$  und  $\tau_3 = 4.552ns$  ergeben.

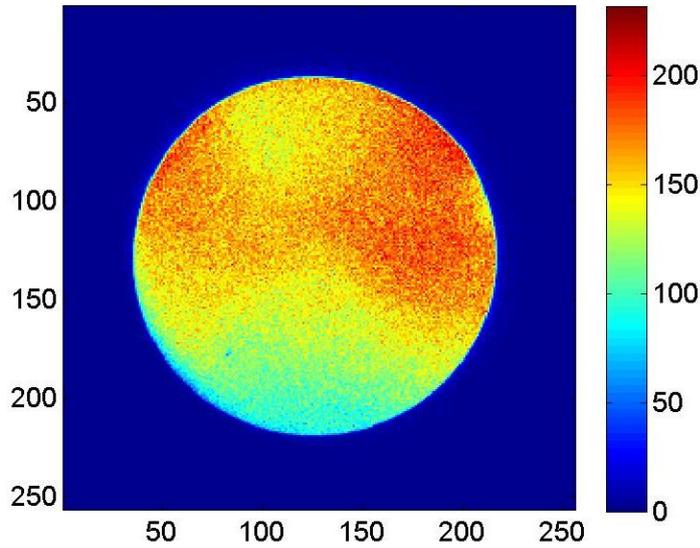
Da die globalen Parameter jetzt vorliegen, kann man sich als nächstes mit den einzelnen Bildpunkten beschäftigen. Die Daten wurden wie bei der Simulation in einem Array gespeichert, hier werden jedoch statt nur  $50 \times 50$  Pixeln sogar  $256 \times 256$  Pixel betrachtet, was aber durchaus üblich ist.

Zunächst werden zur Veranschaulichung der Daten nur Bilder mit den gemessenen Intensitäten dargestellt (Abbildung 4.13). Die Bilder zeigen die Intensitäten vor und nach Stimulation. Nach der Stimulation sind weniger rote Flächen zu erkennen, was für eine schnellere Abklingzeit der Fluoreszenz spricht.

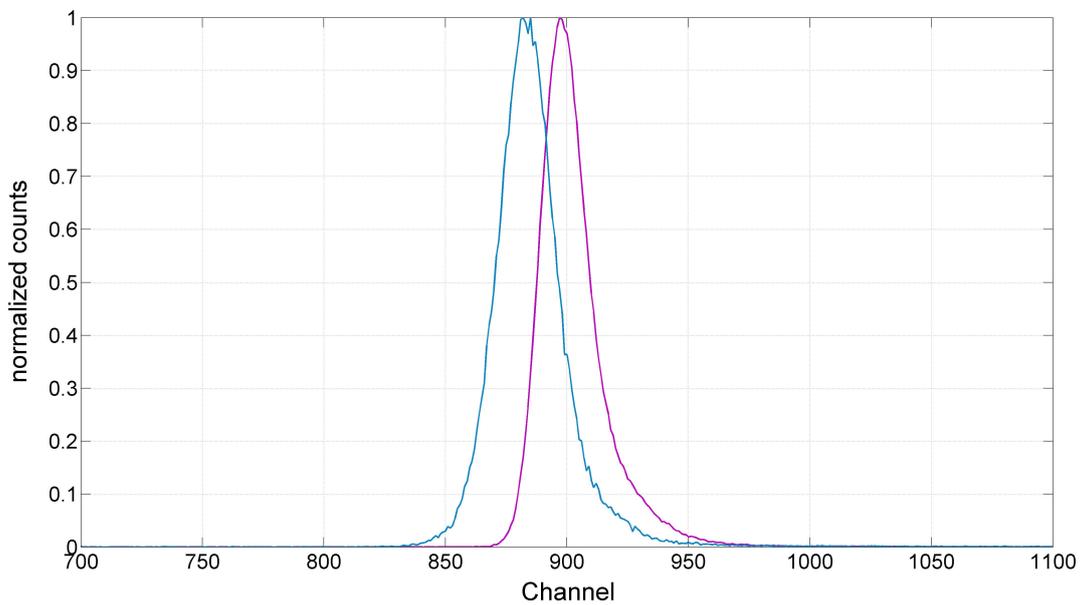
Auch für die Apparatefunktion lässt sich ein solches Bild mit Intensitäten erstellen, jedoch ist die Anzahl der gezählten Photonen pro Pixel generell geringer als bei den Intensitäten für die Fluoreszenzlebensdauer, sodass man bei der gleichen Farbskala nicht mehr viel davon sehen würde. An dem Bild für die Intensitäten der Apparatefunktion kann man gut erkennen, dass diese nicht überall gleich ist. Dieser Umstand kann auch gezeigt werden, indem man zwei verschiedene Ausschnitte des Bildes nimmt und die Intensitäten gegeneinander plottet. Abbildung 4.15 zeigt zwei Apparatefunktionen - eine davon aus dem unteren Bereich des Bildes, die andere aus dem oberen. Es ist eine deutliche Verschiebung zu erkennen, die vermutlich daraus resultiert, dass das Signal die Probe nicht immer zur gleichen Zeit erreicht.



**Abbildung 4.13:** grafische Darstellung der Intensität vor (linkes Bild) und nach (rechtes Bild) Stimulation der Hefezellen. Nach der Stimulation sind deutlich weniger rote Punkte zu erkennen.

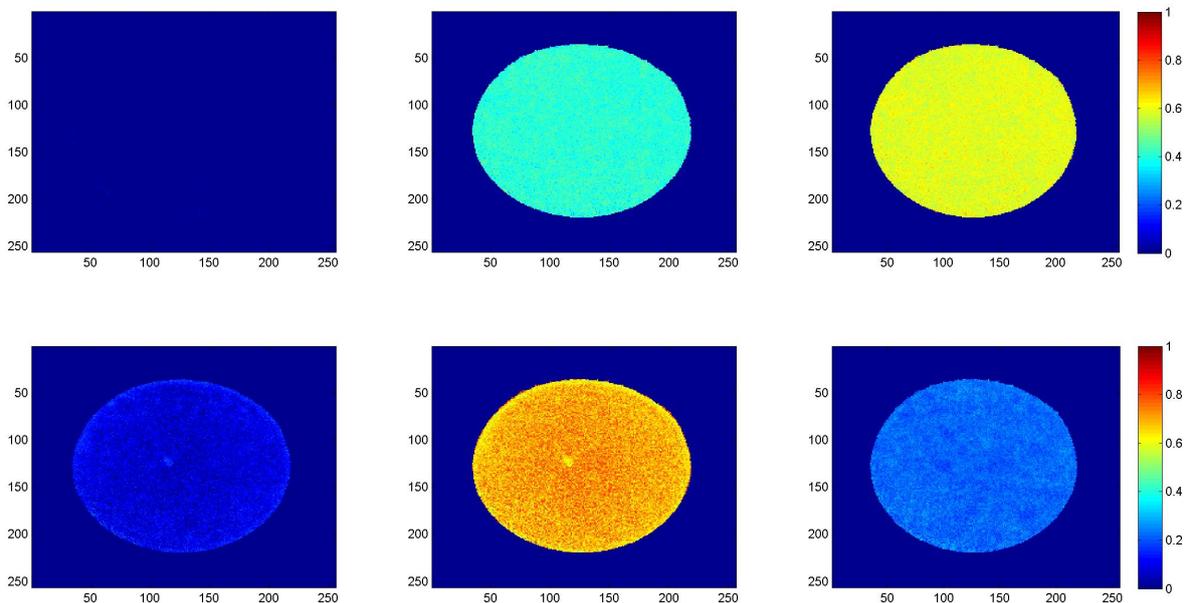


**Abbildung 4.14:** grafische Darstellung der Intensität der Apparatefunktion. Gut zu erkennen ist, dass die Apparatefunktion nicht für jedes Pixel gleich und offenbar auch abhängig von der Position ist.



**Abbildung 4.15:** Verschiebung der Apparatefunktion je nach Position in der Probe, die aus der endlichen Lichtgeschwindigkeit resultiert. Weiterhin gibt es einen kleinen Unterschied in der Breite der beiden dargestellten Funktionen.

Schließlich sollen wieder die Parameter  $\alpha$  geschätzt werden. Dies geschieht auf die gleiche Weise wie bei den simulierten Daten, und genauso können auch die Bilder für die Beiträge einer Komponente erstellt werden. In diesem Fall werden für jedes der  $\alpha$  zwei Bilder ausgegeben - eines vor der Stimulation und eines danach. Damit ist es möglich, eine Veränderung in den Beiträgen von bestimmten Komponenten sichtbar zu machen, wie es in Abbildung 4.16 zu sehen ist. Wenn man zuerst nur  $\alpha_1$  betrachtet, kann man vor der Stimulation so gut wie nichts erkennen, da es die Komponente mit freiem NADH repräsentiert - was zu diesem Zeitpunkt kaum vorhanden ist. Nach der Blockierung der Mitochondrien wird es freigesetzt und somit steigt der Anteil dieser Komponente.  $\alpha_2$  ist vor der Stimulation etwa 0,3, danach steigt es auf 0,7 an. Dieses Enzym setzt also sehr viel NADH frei. Die dritte Komponente trägt jedoch anfangs ca. 60% zur Fluoreszenzlebensdauerfunktion bei, nach der Stimulation sind es nur noch 20%. Dies könnte durch einen sogenannten Malat-Aspartat-Shuttle - einem System, das NADH indirekt in die Mitochondrien schleust - erklärbar sein.



**Abbildung 4.16:** Ergebnis der Schätzung für die Beitragsfaktoren. Bilder oben:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  vor der Stimulation. Bilder unten:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  nach der Stimulation.

## 5 Auswertung

### 5.1 Diskussion der Ergebnisse

Bei den simulierten Daten wurde der Beitrag der Komponente mit der kürzeren Lebenszeit bei 50 und 100 Photonen pro Pixel stark unterschätzt. Da diese Abweichung nicht bei der langsameren Zerfallszeit zu beobachten war und sich die Schätzung der Parameter mit steigender Photonenzahl verbessert hat, könnte das Problem bei der verwendeten Methode für die Faltung liegen, denn die Apparatefunktion hat Einfluss auf einen größeren Teil der Fluoreszenzlebensdauer für die „schnellere“ Komponente.

Im Allgemeinen hat sich der Algorithmus bei den simulierten Daten gut bewährt und die verschiedenen Kombinationen der  $\alpha$  sehr gut voneinander abgegrenzt.

Auch die Standardabweichungen waren von Anfang an relativ klein, selbst bei sehr wenigen Photonen, wo schon die grafische Darstellung nicht sehr aussagekräftig war, weil beispielsweise in einigen Kanälen überhaupt keine Photonen gezählt wurden und das Maximum der gezählten Photonen innerhalb eines Pixels somit auch sehr klein ist. Außerdem muss betont werden, dass diese Ergebnisse mit für jedes Pixel separat simulierten Apparatefunktionen erzielt wurden. Es ist möglich, dass diese eventuell nicht mit der im Modell genutzten Apparatefunktion übereinstimmen, wodurch es zu weiteren Verzerrungen kommen kann. Die Frage dabei ist, ob dieser Umstand vermeidbar ist, denn auch bei den richtigen Daten unterscheiden sich die Apparatefunktionen.

Mit dem Wissen, dass bei den simulierten Daten die Beiträge für schnellere Komponenten unterschätzt wurden, könnte man auch zumindest für die erste Komponente der richtigen Daten vermuten, dass das zugehörige  $\alpha$  größer ist als in Wirklichkeit. Das trifft sowohl auf die Fluoreszenzlebensdauer vor als auch auf die nach der Stimulation zu. Es wäre möglich, dass schon zu Beginn der Messungen mehr freies NADH vorhanden war. Allerdings könnte man diese Zweifel an der Schätzung ausräumen, indem man genügend Messungen vornimmt, sodass man mindestens 200 Photonen pro Pixel hat.

Die Nelder-Mead-Methode hat sich für die Schätzung der Lebenszeiten als ausreichend erwiesen, obwohl es bei der gleichzeitigen Schätzung vieler Parameter auch vorkam, dass das Modell sich mit fortlaufender Intervallnummer von den Daten entfernt hat, weil es von einer Störgröße angezogen wurde. Der Vorteil des Simplexverfahrens lag darin, dass keine Ableitungen berechnet werden mussten und es nicht schlechter war als gradientenbasierte Verfahren, mit denen der Rechenaufwand noch einmal angestiegen wäre.

Trotzdem gab es durch dieses Vorgehen die Möglichkeit, auch andere Parameter wie die Verschiebung der Apparatefunktion oder das Hintergrundrauschen simultan und global zu schätzen.

Sicher wäre es auch denkbar gewesen, alle diese Variablen in das Modell zu nehmen und nur den EM-Algorithmus anzuwenden, jedoch wäre es sehr aufwändig, für alle Parameter einen iterativen Schätzer zu bestimmen. Zudem ist der Zweck des EM-Algorithmus, mit fehlenden und nicht beobachtbaren Daten, die nicht mit den herkömmlichen Methoden konsistent geschätzt werden können, umzugehen. Dies traf hier nur auf den Parametervektor  $\alpha$  zu. Wenn man allerdings weiß, dass das Hintergrundrauschen sehr stark und innerhalb der Pixel nicht mehr vernachlässigbar ist, gibt es die Möglichkeit, es wie einen Beitrag für eine weitere Komponente zu behandeln, sodass das Rauschen besser ausgesondert werden kann.

Weiterhin war auch eine sehr schlechte Wahl der Startparameter für die Anwendung des EM-Algorithmus die hier verwendete Mischverteilung kein Problem, was aber im Allgemeinen nicht der Fall ist. Die Konvergenz erwies sich als sehr langsam - meist war das Abbruchkriterium, je nach Größe, erst nach 40-50 oder sogar noch mehr Iterationsschritten erfüllt.

## 5.2 Kritische Wertung

Bei der Anwendung der vorgestellten Methoden zur Schätzung der Parameter einer Fluoreszenzlebensdauerfunktion sollte man vorher versuchen, die Anzahl der Komponenten mithilfe eines geeigneten Verfahrens herauszufinden. Die Nutzung von drei Komponenten für die Analyse der Fluoreszenzlebensdauer von NADH in Hefezellen lässt sich logisch nachvollziehen, zudem bekommt man eine gute Anpassung. Trotzdem ist es möglich, dass es eigentlich mehr Komponenten sind, die aber einfach nicht erkannt bzw. diskriminiert werden. Für die hier verwendeten Daten waren die Residuen für eine Anpassung mit drei Komponenten die beste Möglichkeit, auch wenn diese in den Intervallen, in denen auch Photonen für die IRF gemessen wurden, sehr stark schwanken und alles andere als zufällig sind.

Zudem sollte die Methode zur Faltung der Apparate- und Fluoreszenzlebensdauerfunktion überdacht werden. Bei mehr als 1000 Photonen pro Pixel werden die Parameter zwar sehr genau geschätzt, aber das ist in der Praxis nicht realistisch. Für ein Bild mit einer gebräuchlichen Auflösung von  $256 \times 256$  Pixeln müssten ungefähr 65 Mio. Photonen gemessen und die Daten auch abgespeichert werden.

Auch wäre eine stückweise Auswertung wegen der Größenordnung der Daten sinnvoll. Für die Berechnung der  $\alpha$  für jedes Pixel bei den Hefezellen benötigte Matlab ca. 25 Minuten.

### **5.3 Ausblick**

Die Kombination der Nelder-Mead-Methode mit dem EM-Algorithmus kann für die Auswertung von Daten zahlreicher Proben angewandt werden. Daher wäre eine automatisierte und vor allem allgemeingültigere Durchführung des Algorithmus von Nutzen, nicht nur für das hier vorgestellte Modell. Außerdem wäre es eben wegen der Probleme mit der iterativen Faltungsmethode interessant, verschiedene Möglichkeiten zur Faltung zu vergleichen. Sicher gibt es keine perfekte Methode, aber die Genauigkeit könnte noch weiter verbessert werden.

In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass die Kombination von Nelder-Mead-Verfahren und EM-Algorithmus für die globale Analyse von FLIM-Daten sehr gut funktioniert. Für weitere Verbesserungen der Rechenzeit könnte dieser Algorithmus auch mit einer GPU-basierten Programmierung umgesetzt werden.

## **6 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit in allen Teilen selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Julia Geißler

# Nomenklatur

## Abkürzungen

FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie
FWHM	Halbwertsbreite
IRF	Apparatefunktion
MCP	Mikrokanalplatte
NAD <sup>+</sup> / NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid yd
ns	Nanosekunden
PMT	Photomultiplier Tube
ps	Picosekunden
SPC	Einzelphotonenzählung
TCSPC	Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung
TPCSPC	Zeit- und Positionskorrelierte Einzelphotonenzählung

## Symbole

$\alpha$	Beitrag der Komponenten zur Fluoreszenzlebensdauer
$\lambda$	(konstante) Zerfallsrate
$\mu$	Erwartungswert der Normalverteilung
$\sigma$	Standardabweichung der Normalverteilung
$\star$	Faltungsoperator
$\tau$	Fluoreszenzlebensdauer
$\theta_0$	Startparametervektor
$f(t)$	Wahrscheinlichkeitsdichte der Fluoreszenzlebensdauerfunktion
$g(t)$	Apparatefunktion an der Stelle $t$
$g_i(x)$	Erwartungswerte aus dem Modell
$L_c(\theta, x)$	Likelihood der vollständigen Daten
$l_c(\theta, x)$	Log-Likelihood der vollständigen Daten
$m(t)$	Modellfunktion (stetig) an der Stelle $t$
$n$	Gesamtzahl der gemessenen Photonen
$n(t)$	Anzahl angeregter Moleküle zur Zeit $t$

## Nomenklatur

---

$n_0$	Anfangpopulation angeregter Fluorophore
$n_i$	Anzahl der gemessenen Photonen im Intervall $i$
$n_{ij}^*$	tatsächliche Anzahl der Photonen, die im Intervall $i$ zur Komponente $j$ gehören
$P_{ij}(\tau_j)$	Wahrscheinlichkeit, dass Beobachtung der Komponente $j$ in das $i$ -te Intervall fällt
$t$	Zeit
$w(n_i, g_i(x))$	Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion
$y$	unvollständige Daten
$I(t)$	Fluoreszenzintensität

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Jablonski-Diagramm . . . . .	6
2.2	Gestalt von Anregungsimpuls und Ausgangssignal . . . . .	7
2.3	Schematische Darstellung einer PMT . . . . .	9
2.4	Schematische Darstellung einer MCP-basierten PMT . . . . .	9
2.5	Aufbau für die Einzelphotonenzählung . . . . .	10
2.6	Prinzip der Datenerhebung mit der SPC-Methode . . . . .	11
2.7	Fluoreszenzlebensdauer bei zwei Komponenten . . . . .	13
2.8	Apparatefunktion aus gemessenen Daten . . . . .	14
4.1	Simulierte Apparatefunktion . . . . .	26
4.2	Apparatefunktion mit Referenzkomponente . . . . .	27
4.3	Simulation der Fluoreszenzlebensdauerfunktion . . . . .	28
4.4	Faltung der Fluoreszenzlebensdauerfunktion mit der IRF . . . . .	29
4.5	Faltung der Fluoreszenzlebensdauerfunktion mit breiterer IRF . . . . .	30
4.6	Simulierte Daten für $5 \times 5$ Pixel mit 1000 Photonen pro Pixel . . . . .	31
4.7	Globale Schätzung der Parameter und gewichtete Residuen . . . . .	34
4.8	Grafische Darstellung der Schätzung bei $50 \times 50$ Pixeln und 50 Photonen pro Pixel . . . . .	35
4.9	Grafische Darstellung der Schätzung bei $50 \times 50$ Pixeln und 100 Photonen pro Pixel . . . . .	36
4.10	Grafische Darstellung der Schätzung bei $50 \times 50$ Pixeln und 1000 Photonen pro Pixel . . . . .	36
4.11	Fluoreszenzlebensdauer vor und nach Stimulation der Hefezellen . . . . .	37
4.12	Anpassung des Modells an experimentelle Daten . . . . .	38
4.13	Intensität vor und nach Stimulation . . . . .	39
4.14	Intensität der Apparatefunktion . . . . .	40
4.15	Unterschiede zwischen Apparatefunktionen an verschiedenen Positionen . . . . .	40
4.16	Ergebnis der Schätzung für die Beitragsfaktoren . . . . .	41

## Literaturverzeichnis

- [1] Christian Linkenheld [2011]  
*Basiswissen rund um die Fluoreszenz.*  
<http://www.mikroskopie.de/kurse/fluoreszenz/elektron.html>
- [2] Duden:  
*Abiturwissen Physik.*  
Paetec Verlag für Bildungsmedien, Berlin, Frankfurt a.M., 2004.
- [3] Jutta Andres, Benedikt Beel [WS 2006/2007]  
Profilmodul „Einführung in die konfokale Laserscannmikroskopie “  
(Philipps-Universität Marburg)  
*Fluoreszenz und Fluorochrome.*
- [4] Dr. Dieter Weiß - Friedrich-Schiller-Universität Jena  
*Fluoreszenz.*  
<http://www.chemie.uni-jena.de/institute/oc/weiss/fluoreszenz.htm>
- [5] Johannes Bröckel - Didaktik der Chemie, Universität Bayreuth [2010]  
*Fluoreszenz.*  
<http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/fluoreszenz/fluoreszenz.htm>
- [6] Chemiedidaktik, Universität Wuppertal [1999]  
*Jablonski-Diagramm - Erläuterungen zur Folie.*  
[http://www.chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/alte\\_seite\\_du/material/farbe/jablonsk/jablinfo.html](http://www.chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/alte_seite_du/material/farbe/jablonsk/jablinfo.html)
- [7] Wikipedia - die freie Enzyklopädie [2010]  
*Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung.*  
[http://de.wikipedia.org/wiki/Zeitkorrelierte\\_Einzelphotonenzählung](http://de.wikipedia.org/wiki/Zeitkorrelierte_Einzelphotonenzählung)

- [8] Chemie.de, Universität Wuppertal [2013]  
*Mikrokanalplatte.*  
<http://www.chemie.de/lexikon/Mikrokanalplatte.html>
- [9] Lakowicz, Joseph R.:  
*Principles of Fluorescence Spectroscopy.*  
Springer US, 2. Auflage, 1999.
- [10] Prokazov, Yury:  
*Improving position and timing resolution of a microchannel plate based position sensitive photomultiplier.*  
Dissertation 2011.
- [11] C.C. Davis, T.A. King:  
*Correction methods for photon pile-up in lifetime determination by single-photon counting.*  
Journal of Physics A: General Physics, 1970
- [12] Amiram Grinvald, Izchak Z. Steinberg:  
*On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares.*  
Analytical Biochemistry, 1974.
- [13] Dr. Michael Möller [2008]  
*Aktuelle Verfahren der biomedizinischen Optik - Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung.*  
[www.htw-saarland.de/Members/michael.moeller/.../tcspc](http://www.htw-saarland.de/Members/michael.moeller/.../tcspc)
- [14] Lagarias, J.C., J. A. Reeds, M. H. Wright, und P. E. Wright:  
*„Convergence Properties of the Nelder-Mead Simplex Method in Low Dimensions“.*  
SIAM Journal of Optimization, Vol. 9 Number 1, pp. 112-147, 1998.
- [15] Wikipedia - die freie Enzyklopädie [2010]  
*Faltung.*  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Faltung>
- [16] A. P. Dempster , N. M. Laird , D. B. Rubin:  
*Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm.*  
Journal of the royal statistical society, Series B, 1977.

- [17] Prof. Dr. Gerd Christoph, OvGU Magdeburg:  
*Skript zur Veranstaltung „Weiterführende Wahrscheinlichkeitstheorie“.* Kapitel 3 - Bedingte Erwartung.
- [18] Gero Walter:  
*Der EM-Algorithmus.*  
Computerintensive Methoden Miniprojekt, WS 05/06
- [19] Joanna Wengrzik, Jürgen Timm:  
*Comparing several methods to fit finite mixture models to grouped data by the EM-Algorithm.*  
Proceedings of the world Congress in Engineering, WCE 2011.
- [20] Phillip L. Ansleigh:  
*A tutorial on EM-based density estimation with histogram intensity data.*  
NUWC-NPT Technical Report, 2009
- [21] McLachlan, G.J., T. Krishnan:  
*The EM Algorithm and Extensions.*  
New York, John Wiley and Sons, 1988.
- [22] McLachlan, G.J., D. Peel:  
*Finite Mixture Models.*  
New York, Wiley, 2000.
- [23] J.R. Lakowicz, H. Szmajcinski, K. Nowaczyk, M. L. Johnson:  
*Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH.*  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992.
- [24] M. Zuker, A.G. Szabo, L. Bramall, D. T. Krajcarski, B. Selinger:  
*Delta function convolution method for fluorescence experiments.*  
Review of Scientific Instruments, 1985.