

Bedienungsanleitung für das
Auswerteprogramm

GATTAnalysis

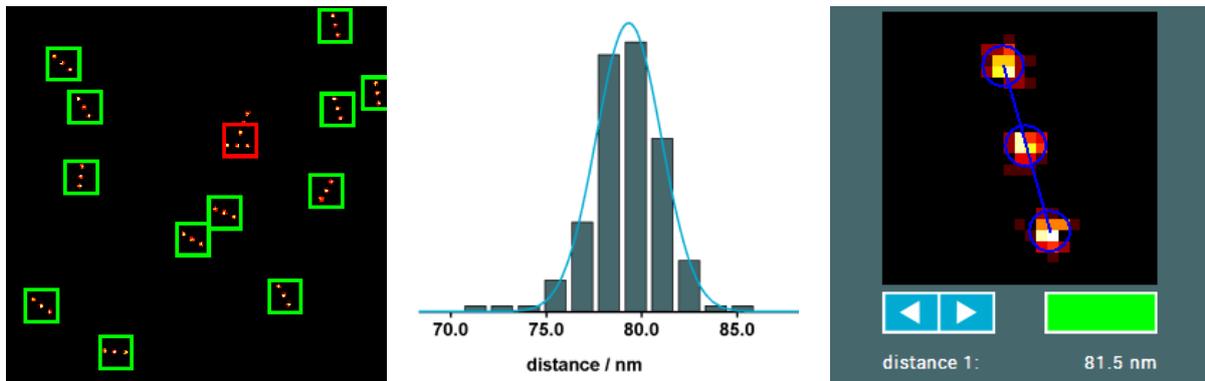


Inhalt

1. Über GATTAnalysis	3
2. Mikroskopie mit intrinsischem Binning.....	4
2.1 Öffnen einer Bilddatei	4
2.2 Öffnen eines bestehenden Projektes.....	4
2.3 Suchen nach Nanometerlinealen	4
2.4 Auswerten von Nanometerlinealen.....	5
2.5 Zugriff auf einzelne Nanometerlineale	6
2.6 Statistische Datenauswertung	7
2.7 Speichern und exportieren von Daten	8
3. Lokalisierungsbasierte Mikroskopie	10
3.1 Öffnen einer Datendatei	10
3.2 Öffnen eines bestehenden Projektes.....	13
3.3 Anpassen der Bilddarstellung	13
3.4 Suchen nach Nanometerlinealen	15
3.5 Drift-Korrektur	16
3.6 Auswerten von Nanometerlinealen.....	18
3.7 Zugriff auf einzelne Nanometerlineale	18
3.8 Statistische Datenauswertung	20
3.9 Speichern und exportieren von Daten	21

1. Über GATTAnalysis

Das Anwendungsprogramm GATTAnalysis von GATTAquant ermöglicht eine schnelle und unkomplizierte Auswertung der Mikroskopiedaten von Proben mit DNA-Origami-basierten Nanometerlinealen. Mit wenigen Klicks kann ein supraauflösendes Bild nach darin vorhandenen Nanometerlinealen durchsucht und die gefundenen Strukturen anschließend vermessen werden. Die erhaltenen Werte für den Markierungsabstand der Nanometerlineale werden im Anschluss statistisch ausgewertet und übersichtlich in einem Histogramm dargestellt. Abschließend können die erhaltenen Ergebnisse in verschiedenen Formen exportiert werden.



Die Auswertung von Daten aus der supraauflösenden Mikroskopie mit intrinsischem Binning (STED, SIM, ...) unterscheidet sich von der Analyse von Daten aus der lokalisierungsbasierten Superauflösung (STORM, PALM, DNA-PAINT, ...). Im Folgenden werden beide Mikroskopieklassen in unterschiedlichen Kapiteln unabhängig voneinander betrachtet.

2. Mikroskopie mit intrinsischem Binning

Lesen Sie dieses Kapitel, wenn Sie Nanometerlineale für supraauflösende Mikroskopie mit intrinsischem Binning (z.B. STED oder SIM) verwenden und diese auswerten möchten.

2.1 Öffnen einer Bilddatei



Klicken Sie auf die „Import Image“-Schaltfläche und wählen Sie die entsprechende Datei aus, um das Bild in GATTAnalysis zu laden. Hierfür können die Formate „BMP“, „PNG“, „JPEG“ und „TIFF“ verwendet werden. Das geladene Bild wird dann auf der Benutzeroberfläche angezeigt. Mithilfe des Mausekurses können Sie in dem angezeigten Bild zoomen und bei gedrückter linker Maustaste durch Mausekursorbewegung darin navigieren.

2.2 Öffnen eines bestehenden Projektes



Klicken Sie auf die „Open Project“-Schaltfläche und wählen Sie die entsprechende Projekt-Datei aus („gatta“). Damit wird die gespeicherte Sitzung mit allen Daten und Einstellungen wiederhergestellt.

2.3 Suchen nach Nanometerlinealen

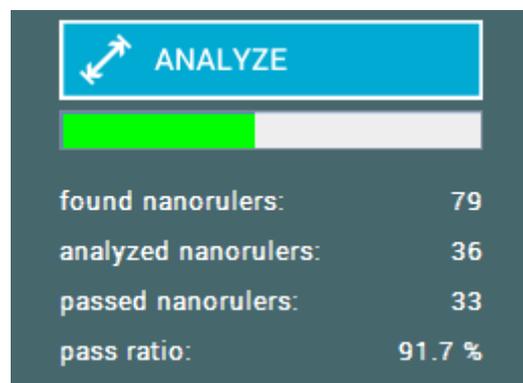


Klicken Sie auf die „Find Nanorulers“-Schaltfläche, um das Bild nach Nanometerlinealen zu durchsuchen. Die vom Spot-Finder gefundenen Strukturen werden dann durch die Umrandung mit einem weißen Quadrat markiert. Darüber hinaus wird die Anzahl der gefundenen Strukturen in „found nanorulers“ angezeigt. Falls nötig kann das automatische Suchergebnis auch manuell nachbearbeitet werden. Wurde beispielsweise ein Nanometerlineal von der automatischen Suche übersehen, kann dieses durch einen Klick auf die Struktur manuell hinzugefügt werden. Dabei ist aufgrund der automatischen Zentrierung kein genauer Klick erforderlich. Wurde dagegen Hintergrund vom Spot-Finder fälschlich als Nanometerlineal detektiert, kann dieses durch einen Klick in die weiße Markierung manuell entfernt werden. Da allerdings die gefundenen Nanometerlineale bei der

Auswertung (siehe nächsten Abschnitt) einen Filterprozess durchlaufen, ist eine manuelle Vorselektion in der Regel nicht notwendig.

2.4 Auswerten von Nanometerlinealen

 Ein Klick auf die „Analyze“-Schaltfläche startet die Auswertung, welche einige Sekunden dauern kann. Der Fortschritt wird in einem entsprechenden Fortschrittsbalken angezeigt. Darüber hinaus werden die Anzahl an bereits ausgewerteten Strukturen und der Anteil solcher, die die Filterung bestanden haben angezeigt.



Die Filter dienen dabei der Unterscheidung zwischen gut messbaren Nanometerlinealen und sonstigen Strukturen (beispielsweise Verunreinigungen). Nach Beendigung der Auswertung werden alle Markierungsquadrate nicht mehr weiß, sondern farbig dargestellt, wobei die Farbe das Filterresultat anzeigt (grün für bestanden und rot für nicht bestanden). Das Filterergebnis kann durch eine der folgenden Möglichkeiten manuell nachkorrigiert werden:

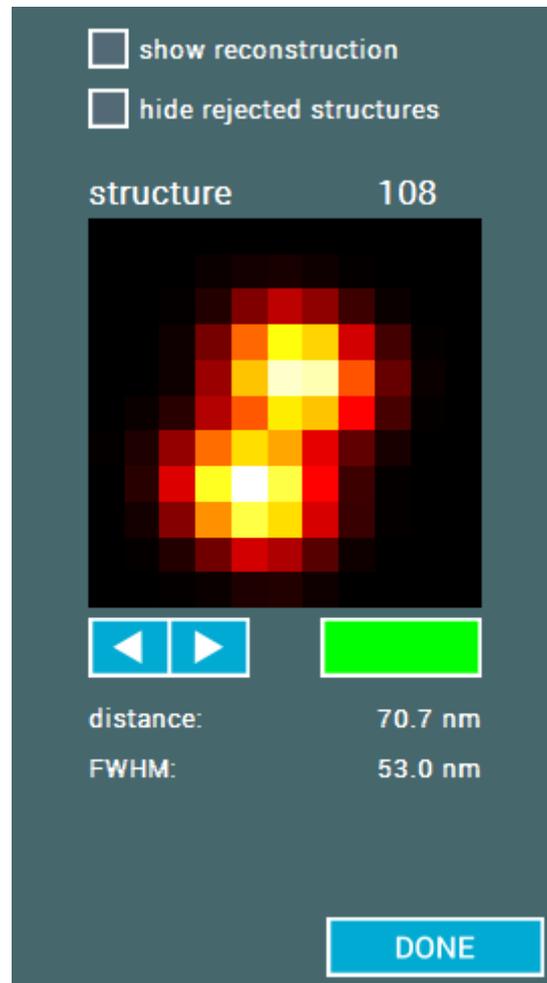
 Verwenden Sie die „Select All“-Schaltfläche, um alle gefundenen Nanometerlineale grün zu markieren.

 Verwenden Sie die „Deselect All“-Schaltfläche, um alle gefundenen Nanometerlineale rot zu markieren.

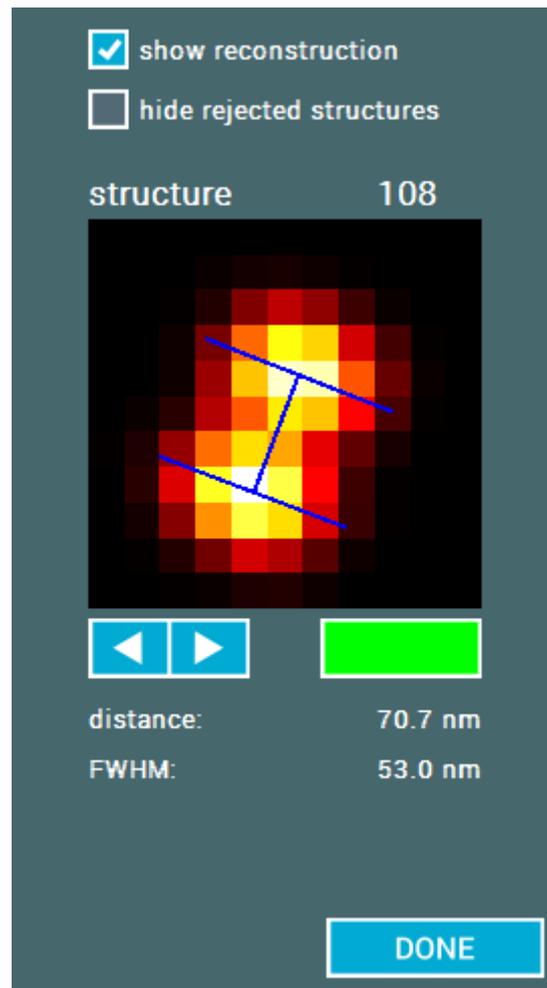
Ebenso können Sie das Filterergebnis für jede gefundene Struktur einzeln anpassen (mehr dazu im nächsten Abschnitt).

2.5 Zugriff auf einzelne Nanometerlineale

Nach der Beendigung der Auswertung können Sie durch einen Klick in die entsprechende Markierung einzelne Nanometerlineale auswählen, um weitere Informationen über die jeweilige Struktur zu erhalten. Diese werden rechts neben dem Hauptbild angezeigt.



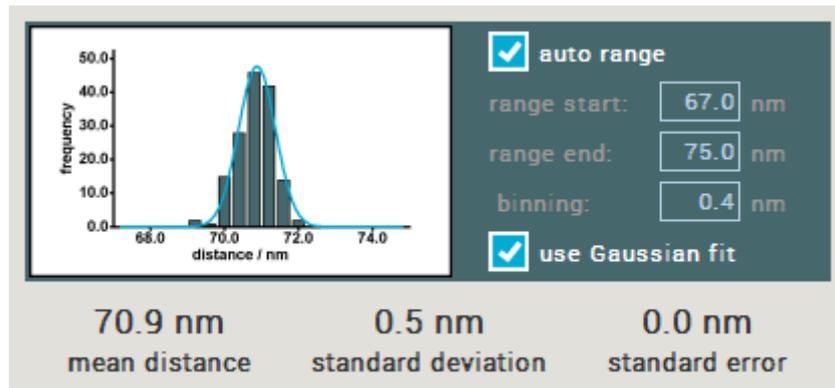
Hier wird ein vergrößerter Ausschnitt des ausgewählten Nanometerlineals sowie der Markierungsabstand und die Markierungsbreite (FWHM) angezeigt. Mithilfe der Pfeilschaltflächen oder der Pfeiltasten auf der Tastatur können die einzelnen Nanometerlineale durchgeklickt werden. Das Filterergebnis für die jeweilige Struktur wird dabei durch die farbige Schaltfläche rechts neben den Pfeilen angezeigt und kann durch ebendiese auch manuell eingestellt werden. Durch Aktivieren der Option „hide rejected structures“ können herausgefilterte Nanometerlineale beim Durchklicken übersprungen werden.



Verwenden Sie die Option „show reconstruction“, um die berechnete Rekonstruktion der Struktur anzeigen zu lassen.

2.6 Statistische Datenauswertung

Nach Beendigung der Auswertung erscheint ein Abstandshistogramm rechts neben dem Hauptbild.



In den Feldern „range start“ und „range end“ bzw. mit der Option „auto range“ kann der Darstellungsbereich des Histogramms festgelegt werden. Bei aktivierter Option „use Gaussian fit“ wird die Verteilung mit einer Gauß-Funktion angepasst und die Maximalposition der Funktion in „mean distance“ angezeigt. Andernfalls erscheint in diesem Feld der Mittelwert aller Abstandswerte innerhalb des oben festgelegten Bereichs.

Diese statistische Auswertung steht ebenso für die gemessenen Werte der Markierungsbreite zur Verfügung.

2.7 Speichern und exportieren von Daten



Durch einen Klick auf die „Save“-Schaltfläche kann die aktuelle Sitzung in eine „gatta“-Datei geschrieben werden. Darin werde sowohl die eingeladenen Daten als auch der aktuelle Zustand der Auswertung inklusive aller Einstellungen gespeichert. Die Datei kann auf die gleiche Weise wie eine Daten-Datei geöffnet werden.



Zusätzlich stellt die Software einige Optionen zum Export der Ergebnisse in andere Dateiformate zur Verfügung. Durch einen Klick auf die „Export“-Schaltfläche wird sich ein entsprechender Dialog öffnen, in dem Sie auswählen können, welche Daten Sie exportieren möchten.



Bei Auswahl der Option „export main image“ wird das Hauptbild als PNG-Datei exportiert. Die Optionen „export distance values“ und „export FWHM values“ ermöglichen den Export der entsprechenden Werte in eine Textdatei. Die Optionen „export distance histogram“ und „export FWHM histogram“ ermöglichen den Export des entsprechenden Histogramms als Bilddatei im PNG-Format.

3. Lokalisierungsbasierte Mikroskopie

Lesen Sie dieses Kapitel, wenn Sie Nanometerlineale für lokalisierungsbasierte Superauflösungsmikroskopie (z.B. STORM, PALM oder DNA-PAINT) verwenden und diese auswerten möchten.

3.1 Öffnen einer Datendatei

Die zu öffnenden Lokalisierungsdaten zur Auswertung in GATTAnalysis müssen als Spreadsheet-Datei (z.B. „.txt“) vorliegen. Des Weiteren muss die Datei so formatiert sein, dass jede Zeile die Daten eines Lokalisierungsereignisses enthält und jede Spalte einen bestimmten Parameter (z.B. x-Koordinaten, y-Koordinaten, Frame-Nummer, ...) enthält. Davon abgesehen ist GATTAnalysis relativ flexibel was das Format der Daten betrifft, wobei es natürlich vor dem Einladen der Daten definiert werden muss.



Klicken Sie auf die „Import Image“-Schaltfläche und wählen Sie die entsprechende Datei aus, um die Daten in GATTAnalysis zu laden. Anschließend öffnet sich ein Importdialog, in dem Sie die Konfiguration der Datei definieren können.

IMPORT SETTINGS

exclude first line (header)

delimiter

x values

y values

z values

width x

width y

frame numbers

photon counts

filter imported data

length unit nm

length unit (z) nm

binning nm

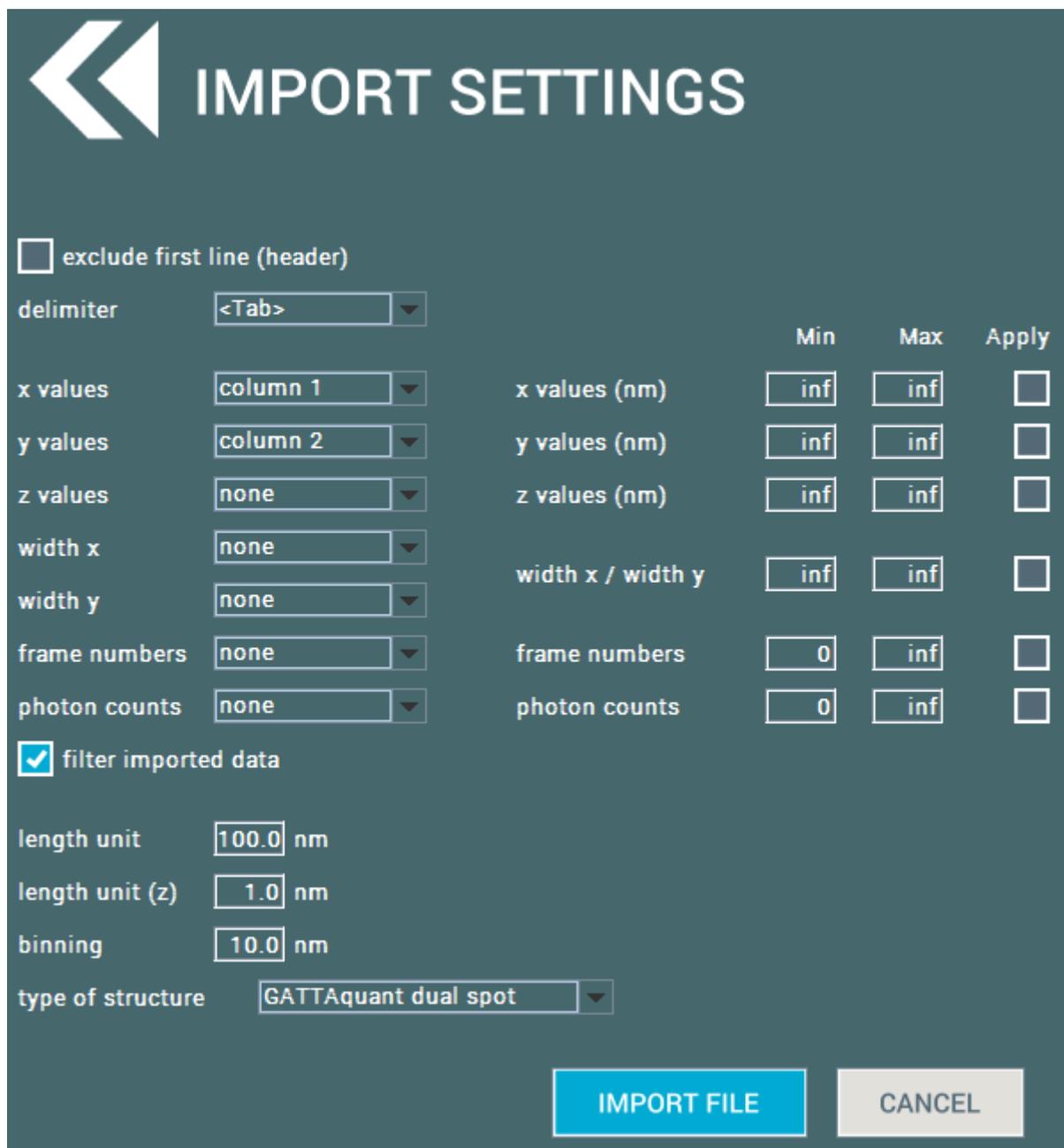
type of structure

IMPORT FILE **CANCEL**

Bei aktivierter Option „exclude first line (header)“ wird die erste Zeile beim Einlesen der Daten ignoriert. Als Trennzeichen zwischen den einzelnen Spalten („delimiter“) kann <Tab>, <Leerzeichen>, Komma oder Semikolon gewählt werden. Nachdem das Trennzeichen spezifiziert wurde, müssen die einzelnen Parameter den jeweiligen Spalten zugeordnet werden, in denen sie stehen. Dafür gibt es neben jedem Parameter ein entsprechendes Menü. Des Weiteren muss die verwendete Längeneinheit („length unit“) definiert werden (wenn beispielsweise alle Daten in Nanometern skaliert sind, muss dieses Feld den Wert 1 haben). Der Parameter „binning“ bestimmt die Größe eines Pixels des Bildes, in dem die Daten nach dem Einladen angezeigt werden.

Beachten Sie, dass ein niedriger Wert für das Binning zu einem hohen Arbeitsspeicherbedarf führen kann. Für das Ergebnis der Auswertung spielt der Wert des Binnings keine Rolle. Wichtig für die Datenauswertung ist ein korrekt ausgewählter „type of structure“, welcher die Optionen „GATTAquant dual spot“ (Nanometerlineal mit zwei fluoreszierenden Markierungen) und „GATTAquant triple spot“ (Nanometerlineal mit drei fluoreszierenden Markierungen) zur Verfügung stellt.

Bei aktivierter Option „filter imported data“ werden die Daten nach bestimmten Kriterien gefiltert. Diese Kriterien können in der rechts neben den Importeinstellungen erscheinenden Tabelle bearbeitet werden.



exclude first line (header)

delimiter

		Min	Max	Apply
x values	<input type="text" value="column 1"/>	<input type="text" value="inf"/>	<input type="text" value="inf"/>	<input type="checkbox"/>
y values	<input type="text" value="column 2"/>	<input type="text" value="inf"/>	<input type="text" value="inf"/>	<input type="checkbox"/>
z values	<input type="text" value="none"/>	<input type="text" value="inf"/>	<input type="text" value="inf"/>	<input type="checkbox"/>
width x	<input type="text" value="none"/>			
width y	<input type="text" value="none"/>			
width x / width y		<input type="text" value="inf"/>	<input type="text" value="inf"/>	<input type="checkbox"/>
frame numbers	<input type="text" value="none"/>	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="inf"/>	<input type="checkbox"/>
photon counts	<input type="text" value="none"/>	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="inf"/>	<input type="checkbox"/>

filter imported data

length unit nm

length unit (z) nm

binning nm

type of structure

Hier kann ein Akzeptanzbereich für jeden Parameter ausgewählt werden. Wenn die zugeordnete Option „Apply“ aktiviert ist, werden nur Datenpunkte geladen, bei denen der Wert des entsprechenden Parameters in dem angegebenen Bereich liegt.

3.2 Öffnen eines bestehenden Projektes



Klicken Sie auf die „Open Project“-Schaltfläche und wählen Sie die entsprechende Projekt-Datei aus („gatta“). Damit wird die gespeicherte Sitzung mit allen Daten und Einstellungen wiederhergestellt.

3.3 Anpassen der Bilddarstellung

Nach dem Laden der Daten werden diese als Bild auf der Benutzeroberfläche angezeigt. Mithilfe des Mausekzes können Sie in dem angezeigten Bild zoomen und bei gedrückter linker Maustaste durch Mausbewegung darin navigieren. Ein Rechtsklick auf eine beliebige Stelle des Bildes öffnet das „image settings“-Fenster, in dem weitere Einstellungen vorgenommen werden können.

binning nm

image mode ▼

autoscale

scale minimum nm

scale maximum nm

scale mode ▼

color 1

color 2

use cosmetic filter

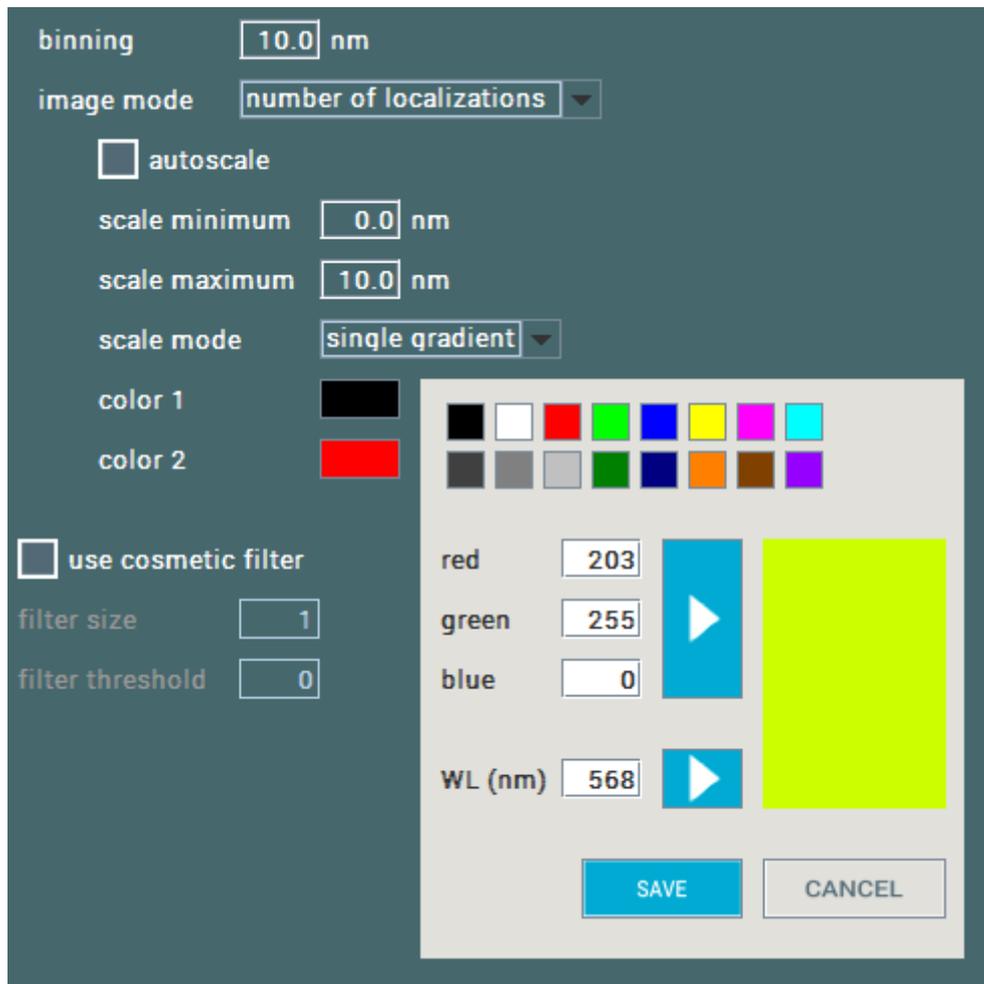
filter size

filter threshold

Mit dem Feld „binning“ kann die Pixelgröße des Bildes eingestellt werden. Der Darstellungstyp kann in „image mode“ spezifiziert werden. Hierbei stehen die drei Optionen „number of localizations“, „average z-value“ und „average frame number“ zur Verfügung. Im „number of localizations“-Modus basiert die Farbgebung jedes Pixels auf der Anzahl der darin befindlichen Lokalisierungen. Im „average z-value“- bzw. „average frame number“-Modus basiert sie dagegen auf dem mittleren Wert der z-Koordinate bzw. der Frame-Nummer aller in diesem Pixel befindlichen Lokalisierungen.

In jedem Modus kann die Skala entweder durch die Felder „scale minimum“ und „scale maximum“ oder mit der Option „autoscale“ justiert werden. Für die Farbgebung der Skala stehen die drei Modi „single gradient“ (Interpolation zwischen zwei benutzerdefinierten Farben), „temperature“ (Übergang von schwarz über rot und gelb nach weiß) und „rainbow“ (Übergang von rot über gelb, grün und blau nach violett) zur Verfügung. Die benutzerdefinierten Grenzfarben für den „single gradient“-Modus

können durch einen Klick auf die entsprechende farbige Schaltfläche eingestellt werden. Dieses öffnet ein Farbauswahlmenü:



Hier besteht die Möglichkeit, eine Standardfarbe zu wählen oder eine Farbe über ihren RGB-Code oder die ihr entsprechende Wellenlänge zu definieren.

3.4 Suchen nach Nanometerlinealen

 Klicken Sie auf die „Find Nanorulers“-Schaltfläche, um das Bild nach Nanometerlinealen zu durchsuchen. Die vom Spot-Finder gefundenen Strukturen werden dann durch die Umrandung mit einem weißen Quadrat markiert. Darüber hinaus wird die Anzahl der gefundenen Strukturen in „found nanorulers“ angezeigt. Falls nötig kann das automatische Suchergebnis auch manuell nachbearbeitet werden. Wurde beispielsweise ein Nanometerlineal von der automatischen Suche übersehen, kann dieses durch einen Klick auf die Struktur manuell hinzugefügt werden. Dabei ist aufgrund der automatischen Zentrierung kein

genauer Klick erforderlich. Wurde dagegen Hintergrund vom Spot-Finder fälschlich als Nanometerlineal detektiert, kann dieses durch einen Klick in die weiße Markierung manuell entfernt werden. Da allerdings die gefundenen Nanometerlineale bei der Auswertung (siehe Abschnitt 3.6) einen Filterprozess durchlaufen, ist eine manuelle Vorselektion in der Regel nicht notwendig.

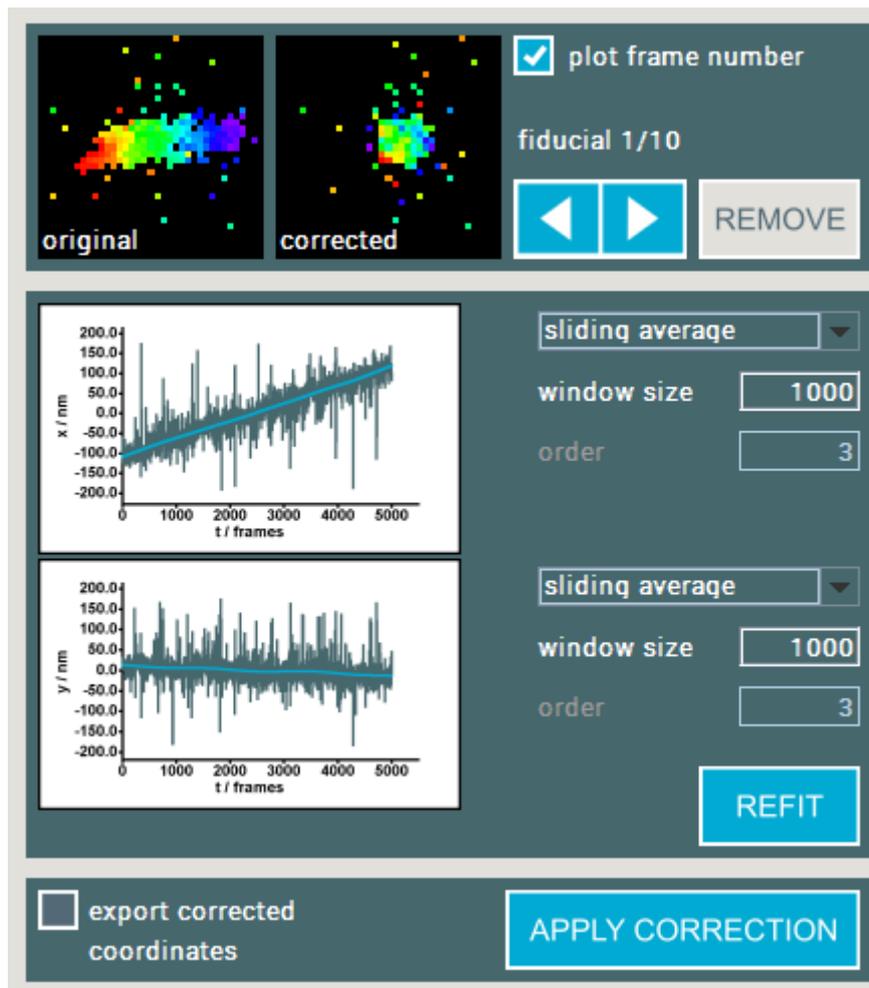
3.5 Drift-Korrektur

Ein häufiges Problem in der supraauflösenden Mikroskopie ist lateraler Drift, der zu einer „Verschmierung“ des erhaltenen Bildes und somit einer deutlichen Verschlechterung der Auflösung führt. Falls dieses Problem nicht besteht, kann direkt mit Abschnitt 3.6 fortgefahren werden.

GATTAanalysis bietet eine Funktion zur Korrektur dieser driftbedingten Bildverzerrung. Hierbei muss beachtet werden, dass diese nur zur Verfügung steht, wenn die importierten Lokalisierungen Zeitinformationen enthalten, d.h. dass beim Importieren dem Parameter „frame number“ die richtige Spalte der zu lesenden Datei zugewiesen wurde (siehe Abschnitt 3.1).

Zur Durchführung der Drift-Korrektur müssen zunächst Referenzstrukturen („fiducial markers“) im Bild definiert werden. Dies kann entweder automatisch mithilfe der „Find Fiducial Markers“-Schaltfläche oder manuell per Rechtsklick in ein weißes Markierungskästchen (siehe Abschnitt 3.4) geschehen. Ein erneuter Rechtsklick auf eine, als „Fiducial Marker“ definierte Struktur macht die Auswahl rückgängig.

Wurde mindestens ein Fiducial Marker definiert, erscheinen in der Box „Drift Correction“ auf der rechten Seite der Benutzeroberfläche weitere Bedienelemente zur Drift-Korrektur.



Hier werden in der oberen Teilbox die einzelnen Fiducial Marker (links) mit einer jeweiligen Korrekturvorschau (rechts) angezeigt. Mit den Pfeiltasten können die Marker separat angewählt und mit der „Remove“-Schaltfläche bei Bedarf entfernt werden.

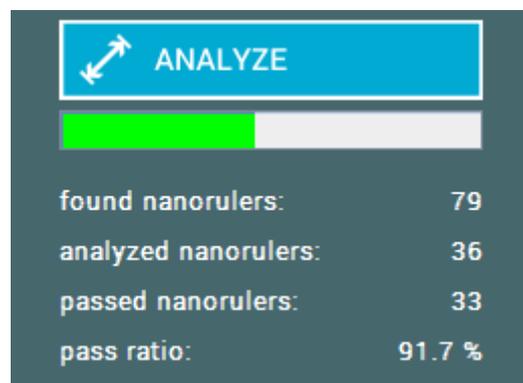
Die mittlere Box stellt den, über alle definierten Fiducials gemittelten zeitlichen Verlauf der x- und der y-Koordinate und die jeweils ermittelte Ausgleichsfunktion dar (blaue Kurve). Sollte die Ausgleichsfunktion daneben liegen, kann ihre Berechnung mithilfe der Bedienelemente rechts neben den Diagrammen optimiert werden. Dabei kann zwischen den beiden Berechnungsmodi „sliding average“ und „polynom fit“ gewählt werden, welche über die Parameter „window size“ bzw. „order“ konfiguriert werden können. Zur Neuberechnung der Ausgleichskurven muss die „Refit“-Schaltfläche betätigt werden.

Wenn alle Einstellungen passen, kann die ermittelte Korrekturfunktion durch Betätigen der „Apply Correction“-Schaltfläche auf das gesamte Bild angewendet werden. Falls

die Option „export corrected coordinates“ aktiviert ist, werden dabei die neu berechneten Koordinaten in eine Textdatei exportiert.

3.6 Auswerten von Nanometerlinealen

 Ein Klick auf die „Analyze“-Schaltfläche startet die Auswertung, welche einige Zeit (bis zu mehrere Minuten) in Anspruch nehmen kann. Der Fortschritt wird in einem entsprechenden Fortschrittsbalken angezeigt. Darüber hinaus werden die Anzahl an bereits ausgewerteten Strukturen und der Anteil solcher, die die Filterung bestanden haben angezeigt.



Die Filter dienen dabei der Unterscheidung zwischen gut messbaren Nanometerlinealen und sonstigen Strukturen (beispielsweise Verunreinigungen). Nach Beendigung der Auswertung werden alle Markierungsquadrate nicht mehr weiß, sondern farbig dargestellt, wobei die Farbe das Filterresultat anzeigt (grün für bestanden und rot für nicht bestanden). Das Filterergebnis kann durch eine der folgenden Möglichkeiten manuell nachkorrigiert werden:

 Verwenden Sie die „Select All“-Schaltfläche, um alle gefundenen Nanometerlineale grün zu markieren.

 Verwenden Sie die „Deselect All“-Schaltfläche, um alle gefundenen Nanometerlineale rot zu markieren.

Ebenso können Sie das Filterergebnis für jede gefundene Struktur einzeln anpassen (mehr dazu im nächsten Abschnitt).

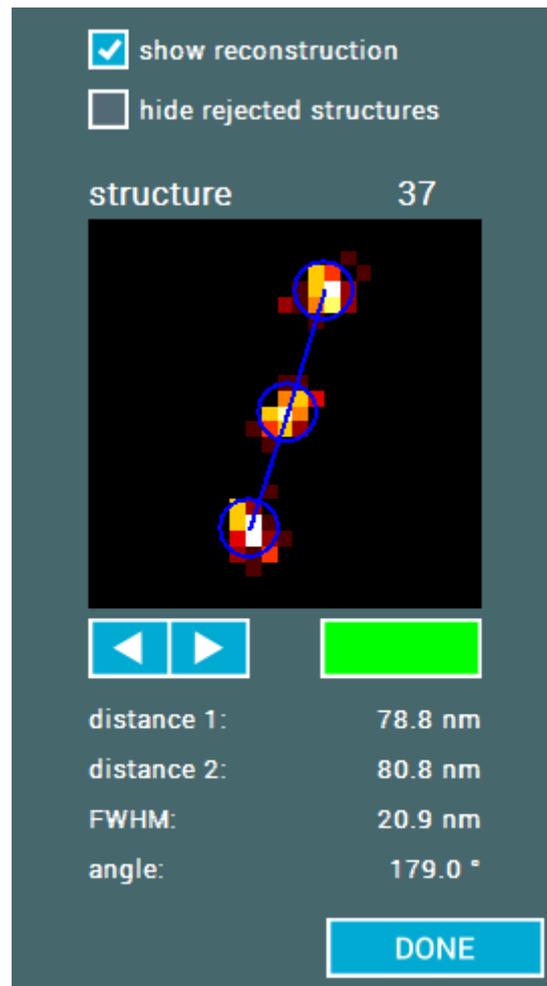
3.7 Zugriff auf einzelne Nanometerlineale

Nach der Beendigung der Auswertung können Sie durch einen Klick in die entsprechende Markierung einzelne Nanometerlineale auswählen, um weitere

Informationen über die jeweilige Struktur zu erhalten. Diese werden rechts neben dem Hauptbild angezeigt.



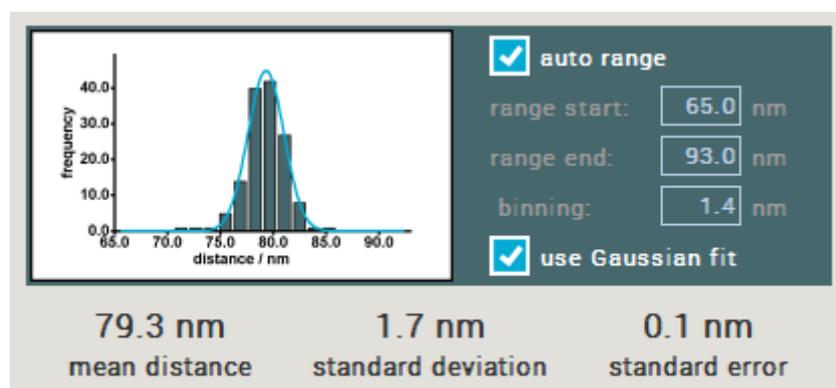
Hier wird ein vergrößerter Ausschnitt des ausgewählten Nanometerlineals sowie der Markierungsabstand und die Markierungsbreite (FWHM) angezeigt. Mithilfe der Pfeilschaltflächen oder der Pfeiltasten auf der Tastatur können die einzelnen Nanometerlineale durchgeklickt werden. Das Filterergebnis für die jeweilige Struktur wird dabei durch die farbige Schaltfläche rechts neben den Pfeilen angezeigt und kann durch ebendiese auch manuell eingestellt werden. Durch Aktivieren der Option „hide rejected structures“ können herausgefilterte Nanometerlineale beim Durchklicken übersprungen werden.



Verwenden Sie die Option „show reconstruction“, um die berechnete Rekonstruktion der Struktur anzeigen zu lassen.

3.8 Statistische Datenauswertung

Nach Beendigung der Auswertung erscheint ein Abstandshistogramm rechts neben dem Hauptbild.



In den Feldern „range start“ und „range end“ bzw. mit der Option „auto range“ kann der Darstellungsbereich des Histogramms festgelegt werden. Bei aktivierter Option „use Gaussian fit“ wird die Verteilung mit einer Gauß-Funktion angepasst und die Maximalposition der Funktion in „mean distance“ angezeigt. Andernfalls erscheint in diesem Feld der Mittelwert aller Abstandswerte innerhalb des oben festgelegten Bereichs.

Diese statistische Auswertung steht ebenso für die gemessenen Werte der Markierungsbreite zur Verfügung.

3.9 Speichern und exportieren von Daten



Durch einen Klick auf die „Save“-Schaltfläche kann die aktuelle Sitzung in eine „.gatta“-Datei geschrieben werden. Darin werden sowohl die eingeladenen Daten als auch der aktuelle Zustand der Auswertung inklusive aller Einstellungen gespeichert. Die Datei kann auf die gleiche Weise wie eine Daten-Datei geöffnet werden.



Zusätzlich stellt die Software einige Optionen zum Export der Ergebnisse in andere Dateiformate zur Verfügung. Durch einen Klick auf die „Export“-Schaltfläche wird sich ein entsprechender Dialog öffnen, in dem Sie auswählen können, welche Daten Sie exportieren möchten.



Bei Auswahl der Option „export main image“ wird das Hauptbild als PNG-Datei exportiert. Die Optionen „export distance values“ und „export FWHM values“ ermöglichen den Export der entsprechenden Werte in eine Textdatei. Die Optionen „export distance histogram“ und „export FWHM histogram“ ermöglichen den Export des entsprechenden Histogramms als Bilddatei im PNG-Format.