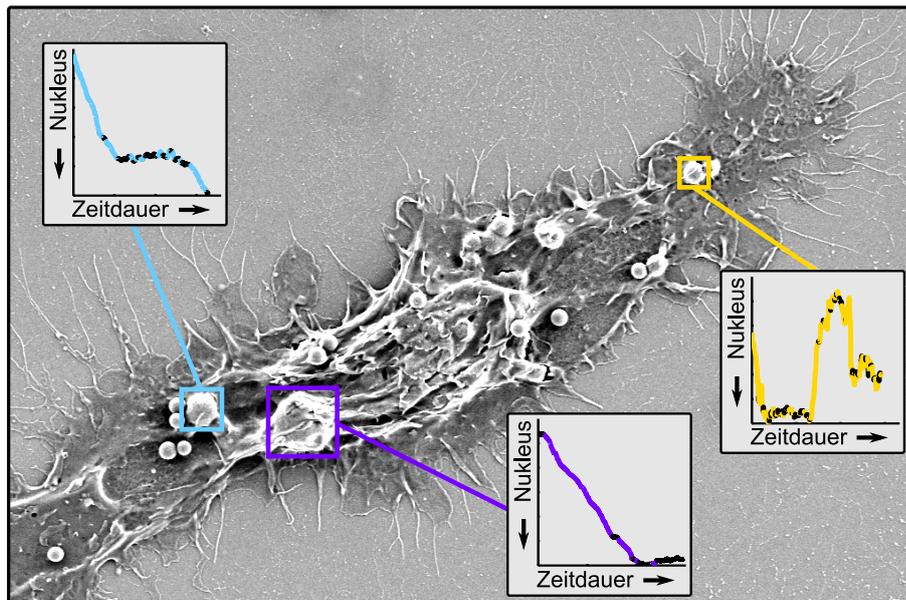

Dissertation
- Steve Keller -

Abhängigkeit des phagosomalen Transportes
von der Größe des Phagosomes



ABHÄNGIGKEIT DES PHAGOSOMALEN TRANSPORTES VON DER GRÖSSE DES PHAGOSOMES

Von der Universität Bayreuth
Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

von

Dipl.-Phys. Steve Keller

aus Rodewisch, Sachsen

Erster Gutachter: Prof. Dr. Holger Kress, Universität Bayreuth
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Gareth Wyn Griffiths, Universität Oslo

Tag der Einreichung: 24. Januar 2019
Tag des Kolloquiums: 24. Mai 2019

Summary

The internalization and intracellular degradation of pathogens by macrophages is an essential part of the mammalian immune response. The intracellular transport of the phagosome from cell periphery to the perinuclear region subsequent to their internalization is crucial for the phagosomal maturation and digestion. This process shows high phagosome-to-phagosome variations that are not fully understood. To date mainly biochemical modulations are known to influence the fate of phagosomes. In the present work it could be shown that the phagosomal transport behaviour is also strongly influenced by simple physical properties of the phagosome: its size. It was shown that large phagosomes are transported persistently and with a high efficiency to the nucleus with almost no centrifugal motion, whereas small phagosomes show strong bidirectional transport, resulting in a reduced transport efficiency. Additionally small phagosomes show strong centrifugal transport compared to intermediate and large phagosomes, indicating a missing endpoint of phagosomal transport. By investigating the molecular basis of intracellular organelle transport it could be shown that dynein motors and the distribution of microtubules have a high impact on the persistent, centripetal transport of large phagosomes. Furthermore it was shown that actin filament associated motor activity and the distribution of actin filaments highly influence the bidirectional transport behaviour of small phagosomes as well as supporting the transport of all phagosomes. The demonstrated results suggest a simple size-dependent intracellular sorting mechanism that supports transport from cell periphery to the perinuclear region of large phagocytosed bacteria for facilitating their digestion and that simultaneously supports transport back to the cell periphery of small bacterial fragments for antigen presentation or disposal processes.

Zusammenfassung

Die Aufnahme und der intrazelluläre Abbau von Pathogenen durch Makrophagen ist ein essentieller Teil der Immunantwort von Säugetieren. Der sich an die Internalisierung anschließende intrazelluläre Transport von Phagosomen von der Zellmembran in die perinukleare Region ist dabei von entscheidender Funktion für die phagosomale Reifung und den Verdauungsprozess. Der phagosomale Transport zeigt starke Schwankungen von Phagosom zu Phagosom, welche nur im Ansatz verstanden sind. Zum jetzigen Zeitpunkt der Forschungen sind vor allem biochemische Modulationen dafür bekannt, einen Einfluss auf das Schicksal der Phagosomen und den Ablauf der Phagozytose auszuüben. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das phagosomale Transportverhalten auch sehr stark von simplen physikalischen Eigenschaften des Phagosomes respektive ihrer Größe abhängig ist. Es wurde herausgefunden, dass große Phagosomen einen sehr persistenten und effizienten Transport zum Nukleus nahezu frei von zentrifugalen Transportanteilen hervorbrachten, wohingegen kleine Phagosomen starken bidirektionalen Transport zeigten, was in einer deutlich reduzierten Transporteffizienz resultierte. Auch wiesen kleine Phagosomen im Vergleich zu intermediären und großen Phagosomen starken zentrifugalen Transport nach Erreichen der perinuklearen Region auf, was auf ein Fehlen des Endpunktes des phagosomalen Transportes hinweist. Durch Untersuchungen der molekularen Basis für intrazellulären Organellentransport konnte nachgewiesen werden, dass Dynein Motoren und die Verteilung der Mikrotubuli eine wichtige Funktion für den persistenten zentrifugalen Transport großer Phagosomen haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Aktinfilament-assoziierte Motorenaktivität und die Verteilung von Aktinfilamenten einen großen Einfluss auf das bidirektionale Transportverhalten kleiner Phagosomen hat sowie eine unterstützende Wirkung für den Transport aller Phagosomen. Die vorgestellten Resultate führten zu der Hypothese eines einfachen, größenabhängigen intrazellulären Sortiermechanismus, welcher den Transport von der Zellperipherie zur perinuklearen Region großer phagozytierter Bakterien fördert, um eine bessere Verdauung und Zersetzung dieser zu gewährleisten, gleichzeitig aber auch den zentrifugalen Transport von kleinen bakteriellen Fragmenten zurück zur Zellperipherie zur Förderung von Entsorgungsprozessen oder Antigenpräsentation an der Zelloberfläche unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
Teil I - Theoretische Grundlagen	3
2. Phagozytose durch Makrophagen in Säugetierzellen	7
2.1. Immunantwort bei Säugetieren	8
2.2. Makrophagen	9
2.3. Phagozytose	11
2.4. Intrazellulärer Transport & zugrundeliegende Strukturen	24
2.5. Ausnutzung der Phagozytose durch Krankheitserreger	29
3. Einordnung der vorliegenden Arbeit in die aktuelle Forschung im Bereich der Phagozytose	33
4. Initiierung, Beobachtung & Manipulation phagosomaler Prozesse	35
4.1. Optische Mikroskopiemethoden	36
4.2. Elektronenmikroskopie	41
4.3. Optische Pinzetten	42
4.4. Polystyrolpartikel und Opsonisierung	45
4.5. Medikamente zur Manipulation intrazellulärer Prozesse	45
Teil II - Materialien & Methoden	46
5. Beobachtung & Analyse des phagosomalen Transportes	49
5.1. Aufbau & Komponenten einer holografischen optischen Pinzette	50
5.2. Justage einer holografischen optischen Pinzette	55
5.3. Kultivierung von Mausmakrophagen	57
5.4. Antikörper & Opsonisierung von Partikeln	57
5.5. Sedimentationszeiten, Phagozytosewahrscheinlichkeiten & Rezeptorenverteilung	58
5.6. Probenvorbereitung & initiierte Phagozytose	60
5.7. Nachweis einer erfolgreichen Phagozytose	62
5.8. Funktionsweise CC-Tracking Algorithmus	65
5.9. Kriterien für phagosomale Transporteigenschaften	70
6. Zytoskelett, intrazelluläre Transportmotoren & Inhibitoren	75
6.1. Spinning Disk Mikroskopie	76
6.2. Fixierung von Zellen & Immunfärbung	76

6.3. Zytoskelett & Motorprotein-Farbstoffe	77
6.4. Anfärbung von Aktinfilamenten	78
6.5. Analyse der Fluoreszenzaufnahmen	78
6.6. Manipulation zellulären Transportverhaltens	82
Teil III - Ergebnisse der Messungen	84
7. Größenabhängiger, phagosomaler Transport in unbehandelten Makrophagen	87
7.1. Opsonisierung von Zielobjekten	88
7.2. Partikelsedimentationszeiten	88
7.3. Verteilung Fc γ -Rezeptoren	90
7.4. Nachweis einer erfolgreichen Phagozytose	91
7.5. Phagozytosewahrscheinlichkeit	97
7.6. Partikelaufnahme	98
7.7. Allgemeines Transportverhalten	99
7.8. Starker zentrifugaler Transport von Phagosomen	101
7.9. Verteilung von Transportphasen	103
7.10. Geschwindigkeiten des Phagosomentransportes	104
7.11. Persistenz der Phagosomenbewegung	106
7.12. Stationäre Phasen während des Transportes	106
7.13. Parameterabhängigkeiten der Ergebnisse	107
7.14. Einfluss des Abstandes zwischen Phagosom & Nukleus	110
8. Zusammenspiel intrazellulärer Filamente & assoziierter Motorproteine	113
8.1. Mikrotubuli & MT-assoziierter Motoren-basierter Transport	114
8.2. Aktinfilamente & AF-assoziierter Motoren-basierter Transport	120
8.3. Vergleich MT- & AF-basierter Transport	128
8.4. Intrazelluläre Verteilung von Mikrotubuli	129
8.5. Intrazelluläre Verteilung von MT-assozierten Motoren	133
8.6. Intrazelluläre Verteilung von Aktinfilamenten	136
8.7. Intrazelluläre Verteilung von AF-assozierten Motoren	138
8.8. Einfluss des Abstandes zwischen Phagosom & Nukleus	140
Teil IV - Diskussion	143
9. Diskussion der experimentellen Grundlagen	147
9.1. Opsonisierung der Zielobjekte	148
9.2. Verteilung der Fc γ -Rezeptoren	148
9.3. Sedimentationszeiten der Partikel	149
9.4. Nachweis der erfolgreichen Phagozytose	149
9.5. Potenzielle Störungen der Zellfunktionen	150
9.6. Diskussion der eingeführten Analyseparameter	152
10. Größenabhängiger phagosomaler Transport	155
10.1. Diskussion des Transportverhaltens	156
10.2. Diskussion beteiligter Filamente und Motoren	157
10.3. Diskussion der intrazellulären Filamentanordnung und Motorenverteilung .	161
10.4. Diskussion des Einflusses der Phagosomenposition	166

10.5. Diskussion besonderer Transportcharakteristika	166
10.6. Zusammenfassung	168
10.7. Anwendungen und weiterführende Projekte	169

Teil V - Anhang **172**

A. Protokolle	XI
A.1. Passives Adsorptionsprotokoll	XII
A.2. Nachweis der Opsonisierung	XIII
A.3. Zellfixierung	XIV
A.4. Immun- & Partikelfärbung	XV

Literaturverzeichnis **XVII**

Abkürzungsverzeichnis

Übersicht über häufig verwendete Abkürzungen.

Abkürzung	korrekte Bezeichnung
AF	Aktinfilamente
ATP / ADP	Adenosintriphosphat / Adenosindiphosphat
CC-Tracker	Kreuzkorrelations- Überwachungs- Algorithmus (CrossCorrelation-tracking algorithmn)
DIC	Differentialinterferenzkontrast
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HOT	Holografische Optische Pinzette (Tweezer)
IgG	Immunglobulin (Antikörper) G
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MSD	Mittlere quadratische Verschiebung
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-Organisations-Centrum
NA	Numerische Apertur
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular pattern)
PFA	Paraformaldehyd (PFA, SIGMA-ALDRICH)
PRR	mustererkennende Rezeptoren (pattern recognition receptors)
REM	Rasterelektronenmikroskop
SEM	Scanning Electron Microscope
s.e.m.	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of mean</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TLR	Toll-ähnlichen Rezeptoren (toll-like receptor)

Einleitung

Es war einmal ... das Leben.

Bereits als Kind konnte man anhand renommierter Zeichentrickserien lernen, dass sich der Mensch nicht nur gegen offensichtliche Gefahren verteidigen muss, sondern auch in der Lage ist sich gegen mikroskopisch kleine Angreifer zu wehren [1]. Diese für das bloße Auge unsichtbaren Angreifer wie Bakterien oder Viren sind den Menschen dabei erst etwas mehr als hundert Jahren bekannt. Die Auswirkungen eines solchen als Infektion bezeichneten Angriffs jedoch kennt die Menschheit schon seit Langem. Zunächst wurden die Symptome von Krankheiten unbekannter Ursache als Einmischung höherer Mächte in das irdische Leben verstanden und häufig im Sinne einer Bestrafung für begangene Sünden gedeutet. Infolge dieser Fehlinterpretationen fehlte auch eine adäquate Untersuchung der Infektion und die Erschließung von wirksamen Gegenmaßnahmen. Aufgrund von strengeren Hygienemaßnahmen und strikter reguliertem Sexualverhalten konnte aber schon frühzeitig eine Verminderung von Infektionskrankheiten festgestellt werden. Im Laufe der weiteren Geschichte wurde herausgefunden, dass bestimmte Infektionen häufig in speziellen Gebieten akkumulierten und dass auch von der geatmeten Luft Gefahren für den Menschen ausgehen können. Daraus entwickelte sich die Lehre von den *Miasmen* (in der Luft enthaltene Giftstoffe), welche sich bis in das 19. Jahrhundert hinein verbreitete. Allerdings keimte seit dem 14. Jahrhundert auch die Idee von der direkten Übertragbarkeit von Infektionen, welche im 16. Jahrhundert von Fracastoro um die Existenz eines lebenden Ansteckungsstoffes erweitert wurde. Aber erst durch Beweise Louis Pasteurs Mitte des 19. Jahrhunderts, dass Leben nicht *de novo* entstehen kann, wurde dieses Konzept allgemein anerkannt. Infolgedessen postulierte Friedrich Jacob Henle, dass Parasiten die ursächlichen Erreger von Infektionskrankheiten sind. Einen wichtigen Durchbruch lieferte auch Antoni van Leeuwenhoek, welcher um 1670 mit Hilfe des ersten, selbstgebauten Mikroskops Mikroorganismen ("kleine Tierchen") beobachten konnte [2,3].

Basierend auf der Entdeckung van Leeuwenhoeks entwickelte sich parallel zu der medizinischen Infektiologie auch die biologische Sichtweise der Organismen weiter, was zu den Teilgebieten der Mikrobiologie und Immunologie führte. Auch für die Mikrobiologie spielte Pasteur eine wichtige Rolle, indem ihm die Kultivierung und Spezifizierung von Bakterien gelang. Robert Koch zeigte aufbauend auf den Arbeiten von Henle, dass sich Milzbrand von Haustieren mittels Bakterien verbreitet und es gelang ihm diese Bakterien *in vitro* zu kultivieren. Die dazu entwickelten Verfahrenstechniken legten einen wichtigen Grundstein für die Entstehung der Immunologie [3, 4]. Das körpereigene Immunsystem existiert dabei in den Grundzügen bereits seit 600 Millionen Jahren. Zunächst entwickelte sich nur das angeborene Immunsystem bis vor circa 400 Millionen Jahren plötzlich das adaptive Immunsystem bei kiefertragenden Fischen auftauchte [5]. Die Immunologie jedoch entwickelte sich erst Ende des 19. Jahrhunderts und zählt noch heute zu den modernsten Gebieten der Lebenswissenschaften [3–5]. Ein wichtiger Schritt war neben den Erforschungen von Infektionserregern auch die Entdeckung von Zellen, welche auf Fremdkörper reagieren und 1882 durch Ilya Mechnikov als Phagozyten beschrieben wurden [6]. Der russische Biologe Mechnikov beschrieb dabei auch die Aufnahme von Fremdobjekten durch Zellen und erkannte die Signifikanz dieses später als Phagozytose bezeichneten Prozesses für die zelluläre Immunantwort [7, 8]. Für seine herausragenden Arbeiten auf diesem Gebiet erhielt er 1908 zusammen mit Paul Ehrlich den Nobelpreis für Physiologie und Medizin [8].

Heutzutage ist die Phagozytose definiert als die durch Rezeptoren ausgelöste zelluläre Aufnahme von Objekten größer als 500 nm sowie die anschließende Eliminierung des Fremdkörpers insbesondere von Schadstoffen und somit der Schutz des Organismus vor Infektionserregern [8–10]. Sie bildet einen essentiellen Bestandteil des organismuseigenen Abwehrsystems als Schlüsselfunktion der angeborenen Immunantwort und als wichtiges Bindeglied zur Aktivierung der erworbenen Immunabwehr [11]. Trotz dieser grundlegenden Rolle der Phagozytose für das Immunsystem ist sie bis heute nicht vollständig verstanden und noch immer Gegenstand intensiver Forschungen. So ging im Jahr 2011 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin an die Forscher Bruce Beutler und Jules Hoffmann für die Entdeckung der Aktivierung der angeborenen Immunantwort sowie an Ralph Steinman für die Erforschung der dendritischen Zellen und ihrer Funktion während der erworbenen Immunabwehr [12]. Eine wichtige Grundlage für die Studien des Immunsystems waren auch relevante Entwicklungen im technischen Bereich, welche immer bessere Methoden zur Untersuchung der mikroskopischen Infektions- und Abwehrprozesse lieferten. So wurde das Auflösungsvermögen von Mikroskopen kontinuierlich verbessert, beginnend bei herkömmlichen Lichtmikroskopen, über Fluoreszenzmikroskopie, konfokale Mikroskopie und Elektronenmikroskopie (Ruska, 1986, anteilig Nobelpreis für Physik) bis hin zu höchstauflösenden Mikroskopieverfahren (Betzig, Hell, Moerner, Nobelpreis für Chemie 2014) kombiniert mit biologischen fluoreszenten Markern wie das grün fluoreszierende Protein (Shimomura, Chalfie, Tsien, Nobelpreis für Chemie 2008) [13]. Neben Verbesserungen zur Beobachtung der Zellen und Infektoren wurden auch neue Techniken entwickelt, mit deren Hilfe gezieltes Eingreifen in biologische Vorgänge ermöglicht wird, um diese zu initiieren, zu unterbrechen, zu verändern oder zu verhindern. Ein wichtiges Beispiel ist die optische Pinzette, welche die Möglichkeit bietet mit Hilfe von stark fokussierten Lichtstrahlen ein (lebendiges) Objekt präzise und hoch selektiv zu fassen, zu platzieren und Kräfte darauf auszuüben. Für ihre Entwicklung und Anwendung im Bereich biologischer Systeme erhielt der Experimentalphysiker Arthur Ashkin 2018 zur Hälfte den Nobelpreis in Physik [13]. Paradoxerweise wird der Prozess der Phagozytose trotz seiner essentiellen Funktion während der Immunantwort auch von einer Vielzahl von Infektoren genutzt, um in die Zellen des Organismus einzudringen und sich dort zu replizieren, teils mit pathologischem Aus-

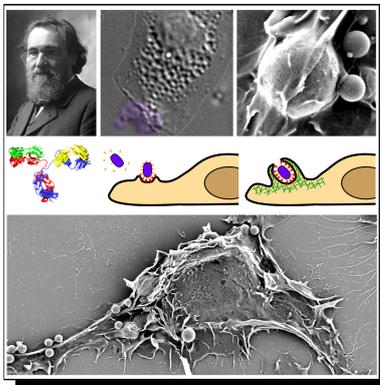
gang für den Wirt. Ein Repräsentant solcher Infektoren ist das bereits 1882 von Robert Koch entdeckte *Mycobacterium tuberculosis*, welches nach phagozytischer Aufnahme in der Lage ist die intrazelluläre phagosomale Reifung zu stoppen und in dem Phagozyt zu überleben [3, 11]. Um den Organismus bei einer Infektion solcher Erreger unterstützen oder den Angriff verhindern zu können, ist es wichtig die Wirkungsweise der Parasiten und ihre Interaktionen mit den intrazellulären Prozessen zu verstehen. Dies inkludiert auch die Notwendigkeit eines grundlegenden Verständnisses des phagosomalen Aufnahme- und Vernichtungsprozesses. Ein wichtiges Gebiet der aktuellen Forschung ist dabei die Untersuchung der biochemischen Regulation des Phagozytoseprozesses [7, 11, 14]. Aber es stellt sich die Frage, ob auch simple physikalische Eigenschaften der Infektoren die Effizienz und Durchführung der Phagozytose beeinflussen können. Analysiert wurden bereits die Zusammenhänge zwischen variierenden physikalischen Eigenschaften der Fremdobjekte wie Form oder Größe und der Aufnahme dieser durch die Zellen [15–21]. Deren Einfluss aber auf den darauffolgenden Teil des Phagozytoseprozesses, dem mit der phagosomalen Reifung korrelierten intrazellulären Phagosomentransport, blieb im Dunklen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem quantitativen und qualitativen Einfluss der physikalischen Größe von Fremdobjekten auf die Effizienz des phagosomalen Transportes als wichtige Basis für die Phagosomenreifung und Verdauung von aufgenommenen Infektoren. Für die Größe der Fremdobjekte als physikalische Eigenschaft wurde sich entschieden, da sie offensichtlich und gut dokumentiert ist, präzise im Experiment simulierbar war sowie für unterschiedliche Bakterien sehr stark variiert (im Bereich einiger Mikrometer).

Für die Untersuchungen dieser Fragestellung wurden zunächst Infektoren in der typischen Größenordnung von Bakterien mittels antikörperbeschichteten Polystyrolpartikeln modelliert. Anschließend wurde ihre Phagozytose durch spezielle Fresszellen initiiert und der phagosomale Transport aufgezeichnet und analysiert. Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Untersuchung und Darstellung der molekularen Grundlagen für den phagosomalen Transport im Zusammenspiel mit der Größe der aufgenommenen Fremdkörper. Dazu erfolgt zunächst in Kapitel 2 dieser Arbeit ein theoretischer Überblick über die biologischen Grundlagen des Immunsystems und der Phagozytose sowie eine Überblick über diverse Vorgehensweisen von Infektoren. Daran schließt sich die Motivation der vorliegenden Arbeit im Rahmen der aktuellen Forschung im Bereich der Phagozytose in Kapitel 3 an. Kapitel 4 gibt einen theoretischen Überblick über die Grundlagen der verwendeten Methoden, gefolgt von der Anwendungsbeschreibung dieser sowie der genutzten Analysemethoden, zunächst für den phagosomalen Transport in Kapitel 5 und anschließend für die Untersuchung der molekularen Transportgrundlagen in Kapitel 6. Die Ergebnisse der Transportanalyse sind in Kapitel 7 dargestellt und die der Analyse der molekularen Transportbasis in Kapitel 8. Den Abschluss der vorliegenden Arbeit bildet die Einordnung der Beobachtungen und Analysen in bereits bekannte Sachverhalte und aktuelle Studien sowie eine kritische Auseinandersetzung mit den Daten zunächst in Kapitel 9 bezüglich der experimentellen Vorgehensweisen und anschließend in Kapitel 10 bezüglich der phagosomalen Transportprozesse.

- Theoretische Grundlagen -

Phagozytose durch Makrophagen in Säugetierzellen



Dieses Kapitel gibt eine theoretische Einführung in den Aufbau und die Funktionsweise des Immunsystems von Säugetieren mit Hauptaugenmerk auf der Relevanz der Phagozytose bezüglich der Sicherstellung eines intakten Abwehrsystems eines Organismus gegenüber Fremdobjekten. Dazu wird zunächst ein genereller Überblick über die Immunantwort bei Säugetieren gegeben, bevor auf für die Verdauung von Fremdkörpern spezialisierte Zellen eingegangen wird. Anschließend folgt eine detaillierte Erläuterung des Prozesses der Phagozytose, beginnend bei der Erkennung von Fremdkörpern, deren Internalisierung,

über die Reifung der Phagosome, ihrer Fusion mit anderen Organellen und der Bildung von Phagolysosomen und schließlich der Zersetzung des phagosomalen Inhaltes und dem Abtransport und Recycling der Restprodukte. Ergänzend folgt eine Beschreibung der zellulären Grundlagen für den phagosomalen Reifungsprozess inklusive der intrazellulären Transportvorgänge während der Alterung. Abschließend werden beispielhaft diverse Bakterien und Krankheitserreger vorgestellt, welche den Prozess der Phagozytose für ihre eigenen Lebensprozesse missbrauchen, um das aktuelle Forschungsfeld der Phagozytose darzustellen und den thematischen Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit zu motivieren.

2.1. Immunantwort bei Säugetieren	8
2.2. Makrophagen	9
2.3. Phagozytose	11
2.4. Intrazellulärer Transport & zugrundeliegende Strukturen	24
2.5. Ausnutzung der Phagozytose durch Krankheitserreger	29

2.1 Immunantwort bei Säugetieren

Die im folgenden Abschnitt dargelegte Einführung in die Immunologie als essentielles Teilgebiet der Biologie der Lebewesen entspricht der zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit gängigen Lehrbuchmeinung beispielsweise nach [2, 9, 22, 23]. Sachverhalte, welche über etablierte Kenntnisse hinausgehen, sind explizit mit separaten Quellenangaben gekennzeichnet.

Die Immunantwort der Säugetiere ist ein System aus molekularen und zellulären Prozessen, die dem Schutz des Körpers vor körperfremden Substanzen und Pathogenen dient. Mögliche körperfremde Substanzen und Pathogene sind dabei Bakterien, Viren, Pilze, Toxine oder Parasiten. Eine fundierte Kenntnis über immunologische Prozesse und Zusammenhänge ist somit essentiell für die medizinische Prävention, Diagnostik und Therapie in Bezug auf Infektionskrankheiten.

Die Immunantwort basiert dabei auf zwei Arten von Immunsystemen: einem natürlichen, angeborenen Immunsystem, welches unspezifisch agiert und einem erworbenen, adaptiven Immunsystem, welches erregerspezifisch agiert. Bereits 1908 wurde an die Wissenschaftler Paul Ehrlich für seine Arbeit an der auf Lernen und Erinnerung basierenden adaptiven Immunität und Ilya Mechnikov für seine Forschung bezüglich der angeborenen Immunität der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen [12]. Charles A. Juneway Jr. publizierte circa 80 Jahre später, dass die unspezifische Reaktion des angeborenen Immunsystems auf den Rezeptoren primitiver Effektorzellen beruht, welche Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen associated molecular pattern*, PAMP) erkennen, die nicht in dem Wirtsorganismus selbst vorkommen [24, 25]. Darauf aufbauend bekamen 2011 die Wissenschaftler Jules Hoffmann & Bruce Beutler den Nobelpreis für Physiologie und Medizin für die Entdeckung der Aktivierung der angeborenen Immunantwort zusammen mit Ralph Steinman für seine Entdeckung und Analyse der Rolle von dendritischen Zellen während der adaptiven Immunreaktion [12].

Das angeborene Immunsystem bildet eine erste, zeitnahe, aber unspezifische Reaktion des Organismus auf infektiöse Erreger. Es handelt sich dabei um eine allgemeine, phylogenetisch alte Abwehrreaktion mit kurzer Reaktionszeit und ohne immunologisches Gedächtnis. Nach Identifikation der Erreger mittels Sensormechanismen findet lediglich eine Differenzierung zwischen körperfremden Substanzen und Pathogenen gegenüber körpereigenen Molekülen und Zellen sowie der Unterscheidung zwischen pathologischen und unschädlichen Eindringlingen statt. Erkannt werden dabei konservierte Muster auf den Oberflächen der Pathogene (PAMPs) mithilfe von relativ wenigen Rezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRR). Wesentliche Bestandteile der angeborenen Immunität sind dabei physikalische, chemische und natürliche Infektionsbarrieren. Physikalische Barrieren sind dabei beispielsweise Haut und Schleimhäute, chemische Barrieren beispielsweise Magensäure, Sekrete und toxische Moleküle und natürliche Barrieren beispielsweise Restriktionsfaktoren, wie Typ-1-Interferone, also intrazelluläre Proteine, welche die Ausbreitung von Viren eindämmen oder Zellen wie Phagozyten oder natürliche Killerzellen, welche Pathogene neutralisieren können. Die Entzündungsreaktion zur Vernichtung der Pathogene durch die entsprechenden Zellen kann dabei neben den PRRs auch durch Antikörper (Proteinstrukturen zur Markierung von mit Pathogenen assoziierten Antigenen) ausgelöst werden. Die Aufnahme und Zerstörung von Fremdobjekten durch spezialisierte Zellen, auch Phagozytose genannt, ist einer der Hauptmechanismen bei der angeborenen immunologischen Abwehrreaktion. Phagozytierende Zellen nutzen dabei diverse komplementäre Mechanismen zur Zersetzung der Erreger wie abbauende Enzyme, antimikrobielle Peptide und reaktive

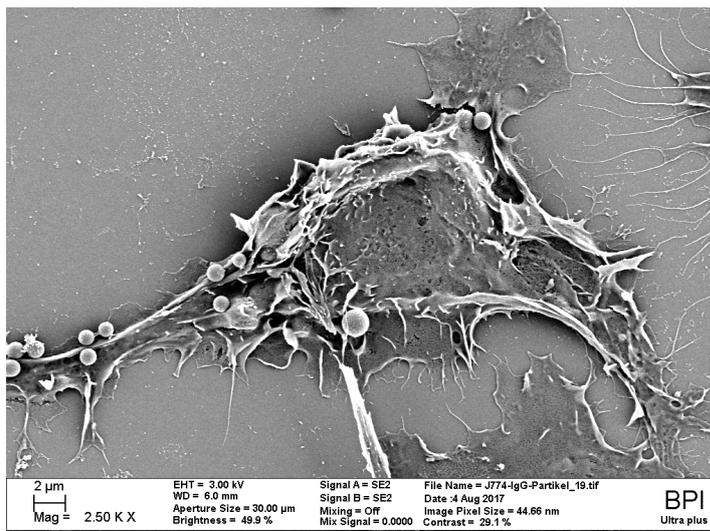
Sauerstoffspezies zur Zerstörung des Erregers. Im Zuge der Entzündungsreaktion und der damit verbundenen Freisetzung diverser Substanzen sowie der Präsentation von mikrobiellen Peptiden aus dem Abbau der Erreger an der Zelloberfläche erfolgt die Aktivierung der adaptiven Immunantwort.

Das erworbene Immunsystem ist eine gegenüber dem Erreger hochspezifische, phylogenetisch jüngere Reaktion des Organismus mit einer relativ langen Reaktionszeit und einem immunologischen Gedächtnis. Vor dem Auslösen der adaptiven Immunantwort erfolgt dabei zunächst immer eine angeborene Immunantwort, welche schneller und erregerunspezifisch reagiert und die weiterführende Immunantwort aktiviert. Die erworbene Immunität basiert auf der Identifikation von spezifischen Mustern oder Stoffen (sogenannte Antigene) auf der Oberfläche von Erregern mittels einer Vielzahl an spezifischen Rezeptoren. Im Vergleich zur angeborenen Immunantwort, welche am Ort der Infektion stattfindet, vollzieht sich die erworbene Immunantwort in den peripheren lymphatischen Organen. Wesentliche Bestandteile der adaptiven Immunität sind B- und T- Zellen (gehörig zu den Lymphozyten), welche körperfremde Moleküle erkennen, inaktivieren und markieren und zum immunologischen Gedächtnis beitragen. Diese Zellen bilden dabei einen Oberflächenrezeptor aus, welcher in der Lage ist an ein bestimmtes Antigen eines Pathogenes zu binden. Alle Oberflächenrezeptoren eines Lymphozyten sind dabei identisch, allerdings gibt es eine Vielzahl an Lymphozyten pro Organismus mit unterschiedlichen Bindungsstellen für fremde Moleküle (Antigene). Darüber hinaus produzieren B-Zellen lösliche Rezeptorproteine (Antikörper), welche anschließend zur Markierung und Opsonisierung von Erregern verwendet werden, wodurch diese zum einen leichter und schneller von Phagozyten erkannt und internalisiert werden und zum anderen die Oberflächenbindungsstellen der Erreger okkupiert werden. Während einer primären adaptiven Immunantwort proliferieren die Lymphozyten, welche spezifisch auf das Erregerantigen reagieren, wodurch bei einem erneuten Befall des gleichen Erregers bereits mehr von diesen spezifischen Lymphozyten existieren. Zusätzlich kommt es dabei zur Entwicklung von als Gedächtniszellen bezeichneten Lymphozyten. Das immunologische Gedächtnis beschreibt die Anpassungsmöglichkeit des Organismus an einen Erreger nach dessen Befall zur Erzeugung einer schnelleren, optimierten und verstärkten Reaktion auf einen erneuten Befall des gleichen Erregers. Berühmtes Beispiel hierfür ist die Beobachtung des Historikers Thukydides, der beobachtete, dass ein von der Pest genesener Mensch nicht ein zweites Mal tödlich befallen wurde.

2.2 Makrophagen

Makrophagen gehören zu den Phagozyten und sind somit als professionelle Fresszellen ein Teil des angeborenen Immunsystems. Die Abbildung 2.1 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer J774-Mausmakrophage im Zusammenspiel mit potenziellen Erregern. Entdeckt und beschrieben wurden sie während Experimenten mit einfachen wirbellosen Meerestieren erstmals 1882 von Ilya Mechnikov (Abbildung 2.3) als Phagozyten, welche auf Fremdkörper reagieren [6]. Der Begriff professionelle Phagozyten wurde hingegen erst deutlich später von Rabinovitch eingeführt [8]. Neben den Makrophagen als langlebige Gewebezellen sind dendritische Zellen, Neutrophile und Eosinophile weitere Vertreter der Phagozyten oder Fresszellen [2, 23]. Die Funktionen der Makrophagen sind dabei vielfältig und variieren zwischen lebensnotwendigen Aufgaben für den Organismus und destruktiven Gegenmaßnahmen bei der Infektion durch einen externen Erreger. Zu ersteren Aufgaben zählen trophische, regulatorische und reparierende Funktionen beispielsweise die Säuberung der Gewebe von Zellüberresten während der Gewebemöostase sowie generell nach

Abbildung 2.1. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer J774-Mausmakrophage im Zusammenspiel mit potenziellen Erregern. Die Abbildung zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer J774-Mausmakrophage. Weiterhin sind potenzielle Erreger in Form von sphärischen Fremdkörpern diverser Durchmesser zu erkennen, welche zum Teil von der Zelle erkannt und internalisiert wurden. Details zur Aufnahme befinden sich am unteren Bildrand.



erfolgter Apoptose [6, 26]. Die Abbildung 2.2 zeigt die Aufnahme von zellulären Überresten durch einen Mausemakrophagen. Den Gegenpol dazu bilden die Schutzmaßnahmen bei eindringenden Pathogenen, was sich auch durch ihre Schlüsselrolle bei der Immunantwort manifestiert. Während sie aufgrund ihrer phagozytischen und zytotoxischen Eigenschaften einen essentiellen Bestandteil des angeborenen Immunsystems darstellen, dienen sie gleichzeitig durch die Präsentation der aufgenommenen und prozessierten Antigene mit Hilfe von Haupthistokompatibilitätskomplexen (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) an der Zellmembran der Initiierung der adaptiven Immunantwort [2, 26].

Während der natürlichen Immunreaktion erkennen die Makrophagen die PAMPs an der Erregeroberfläche mittels PRR. Nach der Identifikation der Pathogene besteht die Möglichkeit der Aufnahme und Vernichtung der Erreger durch die Zellen. Alternativ kann es zur sekretorischen Freisetzung von proinflammatorischen Signalmolekülen wie Zytokinen und Chemokinen kommen, welche eine Entzündungsreaktion am Ort der Infektion auslösen, beispielsweise durch das Anlocken von Leukozyten. Hierbei ist eine Internalisierung der Erreger nicht zwingend notwendig [22, 26]. Die Absonderung von Zytokinen und Chemokinen wird von den sogenannten Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. *toll-like receptor*, TLR) getriggert. Die Aufnahme der Erreger durch die Makrophagen mittels Phagozytose hingegen ist durch PAMPs und PRRs gesteuert und Teil der angeborenen Immunität oder durch Antikörper und deren assoziierten Rezeptoren initiiert und zählt bereits als Teil der erworbenen Immunantwort [9, 26]. Anschließend kommt es zu einer Zersetzung des Erregers während seines Aufenthaltes in dem Makrophagen. Details zu diesem als Phagosomenreife bezeichneten Prozess befinden sich im folgenden Abschnitt 2.3. Das körperfremde Molekül auf der Erregeroberfläche, welches von den Lymphozyten oder Antikörpern als körperfremd erkannt wurde, wird als Antigen bezeichnet [23]. Nach erfolgreicher Degradation (intrazellulärer Abbau) des Pathogenes werden dessen Antigene mittels den MHCs der Makrophagen an der Zellmembranaußenseite den Lymphozyten (exakter den T-Zellen) präsentiert, wodurch der Ausbau des adaptiven Immunsystems unterstützt wird [2].

Die Zielobjekte, welche von Makrophagen internalisiert werden können, sind sehr vielfältig und reichen von Fremdkörpern über Mikroorganismen, Überresten der natürlichen Umgebung bis hin zu abgestorbenen Zellen. Dabei stehen den Makrophagen diverse Aufnahmemechanismen für die Zielobjekte, je nach deren Eigenschaften und Ausmaßen, zur Verfügung [26]. Dabei wird unter anderem unterschieden zwischen Endozytose, einem Aufnahmeprozess kleiner Moleküle ohne die Unterstützung durch Aktinfilamente (fadenför-

mige intrazelluläre Proteinstrukturen), Makropinozytose, der Aufnahme von umgebender Flüssigkeit mittels Ausstülpfen und Zuklappen von Membranlappen, Autophagie, der intrazellulären Aufnahme von zytosolischem Material, sinkender Phagozytose, einem Komplementrezeptoren initiierten Aufnahmeprozess durch Einsinken des Zielobjektes in die Zellmembran, und greifender Phagozytose, einem durch Fc-Rezeptoren ausgelösten Aufnahmeprozess großer Erreger mittels gezielter Membrananlagerung und Einschluss des Pathogenes [26]. Eine ausführliche Beschreibung der greifenden Phagozytose folgt im nächsten Abschnitt 2.3. Vor allem für die Prozesse der Phagozytose wird die Unterstützung der Erregerinternalisierung durch Aktinfilamente zunehmend relevant. Häufig werden in der Literatur alle Prozesse zur Herstellung zellinterner Membranen aus der Plasmamembran als Endozytose bezeichnet und Spezifizierungen der Aufnahmeprozesse ohne Unterstützung durch Aktinfilamente als Unterkategorien der Endozytose wie beispielsweise die Caveolare Endozytose vorgenommen [27].

Typische Vertreter der Säugetiermakrophagen mit hoher Motilität und der Fähigkeit zur Chemotaxis (Orientierung anhand von chemischen Reizen beispielsweise durch Chemokine) und zur Aufnahme und Degradation von Pathogenen sind J774-Mausmakrophagen, welche sich zusätzlich als besonders geeignet als Modellsysteme zur biophysikalischen Charakterisierung von Immunzellen herausgestellt haben [28].

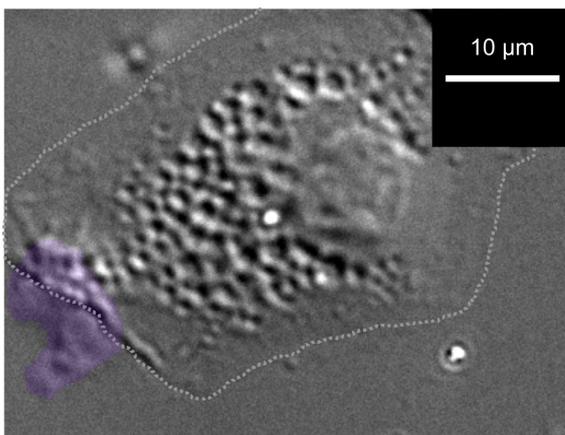


Abbildung 2.2. Hellfeldaufnahme eines J774-Mausmakrophagen während der Internalisierung von zellulären Überresten. Die Abbildung zeigt einen J774-Mausmakrophagen während der Ausführung einer seiner alternativen Aufgaben neben seiner Schlüsselrolle während der Immunantwort des Organismus. Zu sehen ist die Internalisierung von zellulären Überresten (violett eingefärbt) durch den Makrophagen (durch gestrichelte Linie von der Umgebung abgegrenzt) beispielsweise während der Gewebemöostase oder nach erfolgter Apoptose.

2.3 Phagozytose

Phagozytose ist ein durch Rezeptoren ausgelöster, auf Aktin basierender Aufnahmeprozess von Objekten größer als 500 nm, welcher der Aufnahme und Eliminierung von Schadstoffen und somit dem Schutz des Organismus dient, aber auch Zwecke der Ernährung und Säuberung der Umgebung erfüllt [8–10]. Dabei werden die Zielobjekte von einer Membranschicht umhüllt und anschließend innerhalb der Zelle verdaut und abgebaut und wenn nötig weitere Reaktionen des Organismus auf den Erreger initiiert [7,8,26]. Die Phagozytose ist unter anderem Bestandteil des angeborenen Immunsystems und kann bereits von einzelligen Organismen wie *Dictyostelium* durchgeführt werden [9]. Sie wurde in den 1880er Jahren durch Ilya Mechnikov (Abbildung 2.3) beschrieben, welcher auch erstmals ihre Signifikanz für die zelluläre Immunantwort erkannte [7,8]. Bei der Phagozytose kann in zwei Arten von Zielobjekten für die Internalisierung unterschieden werden: in apoptotische (durch natürlichen Zelltod entstandene) und nekrotische (durch unvorhergesehenen oder verletzungsbedingten Zelltod entstandene) Phagozytoseobjekte sowie mikrobiotische oder körperfremde Zielobjekte [9,29]. Die physiologischen und immunologischen Konsequenzen der Phagozytose sind abhängig vom Zelltyp der ausführenden Zelle, von den involvierten Rezeptoren

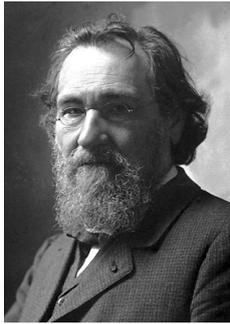


Abbildung 2.3. Ilya Mechnikov. Die Abbildung zeigt den russischen Biologen Ilya Mechnikov, welcher einen wichtigen Beitrag für das Verständnis der Immunologie leistete. Er beschrieb in den 1880er Jahren den Prozess der Aufnahme von Fremdobjekten durch Zellen, bezeichnet als Phagozytose, und erkannte die Relevanz dieses Prozesses für die Immunantwort des Organismus. Dafür erhielt er 1908 zusammen mit Paul Ehrlich den Nobelpreis für Physiologie und Medizin [8]. Die Abbildung ist gemeinfrei, publiziert 1909 in LES PRIX NOBEL, Seite 58.

zur Erkennung und Aufnahme des Erregers und der Natur sowie den Eigenschaften des Zielobjektes [8]. Die Zelle kann dabei differenzieren zwischen körpereigenen Auslösern und körperfremden Erregern sowie zwischen ungefährlichen und gefährlichen Zielobjekten und entsprechend eine tolerante oder eine entzündliche Reaktion auslösen [8–10]. Bei den Rezeptoren kann beispielsweise unterschieden werden zwischen PAMPs (nicht opsonischen) und opsonischen Rezeptoren. Die nicht opsonischen dienen dabei der direkten Erkennung von molekularen Gruppen auf der Pathogenoberfläche. Allerdings sei hier angemerkt, dass die PAMPs nicht zwangsweise eine Phagozytose hervorrufen. So erkennen TLR zwar Erreger, rufen meist aber keine Internalisierung direkt hervor, sondern kooperieren mit anderen nicht opsonischen Rezeptoren. Die opsonischen Rezeptoren hingegen erkennen Opsonine (zum Beispiel Antikörper), welche von dem Wirt selbst hergestellt werden und in der Lage sind spezifische Einheiten auf der Erregeroberfläche zu erkennen und an diese zu binden, um das Pathogen so für die Phagozytose zu markieren [29]. Eines der am besten untersuchten und charakterisierten Verhältnisse zwischen opsonischen Rezeptoren und Liganden besteht dabei zwischen sogenannten $Fc\gamma$ -Rezeptoren und Antikörpern G (IgG, *Immunoglobulin G*), auf welches im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird [10, 29]. Die Identifikation von Erregern ist dabei der Beginn des Phagozytoseprozesses (Abbildung 2.4(1), schematische Darstellung des Phagozytoseprozesses) gefolgt von der Aktivierung der Internalisierung (Abb. 2.4(2)) durch Auslösen diverser Signalkaskaden basierend auf den beteiligten Rezeptoren [29]. Das Grundprinzip der anschließenden phagozytischen Aufnahme ist eine räumliche und zeitlich koordinierte Signalgebung, eine Neuordnung des Zytoskelettes, vor allem von Aktin zur Ausstülpung der Zellmembran (Abb. 2.4(3)) und die Modellierung der Lipide innerhalb der Zellwand [7, 29]. Während der Erkennung und Anlagerung der Zellmembran an den Erreger testet die Zelle parallel die chemische Zusammensetzung des Pathogenes sowie seine physikalische Beschaffenheit [26]. Auf die Internalisierung des Zielobjektes und Ausbildung des Phagosomes (Einschluss des Erregers in eine Membranhülle, Abb. 2.4(4)) folgt die Reifung des Phagosomes gekoppelt mit intrazellulärem Transport (Abb. 2.4(5)) und Fusion mit diversen Zellorganellen (Abb. 2.4(6)) [10, 29]. Während der Reifung kommt es zum drastischen Umbau der Phagosomenmembran und zur progressiven Ansäuerung des phagosomalen Inhaltes, korreliert mit dessen Abbau und Zersetzung (Abb. 2.4(7)). Anschließend folgt die Exozytose (Stofftransport aus der Zelle heraus) der Abbauprodukte sowie des zu recycelnden Materials beispielsweise Antigene oder Rezeptoren (Abb. 2.4(8)) [10]. Die einzelnen Schritte des Phagozytoseprozesses werden im anschließenden Text detaillierter vorgestellt.

Neben dem konstruktiven Beitrag der Phagozytose zum Erhalt der Gesundheit des Organismus kann sie auch von diversen Krankheitserregern ausgenutzt und missbraucht werden, um den Wirt zu infizieren. Dazu nutzen die Pathogene die phagozytische Aufnahme, um in die Zellen zu gelangen und anschließend den Prozess der Phagosomenreifung zu unterbrechen und zu stoppen [10]. Eine detaillierte Erläuterung dieser Ausnutzung und

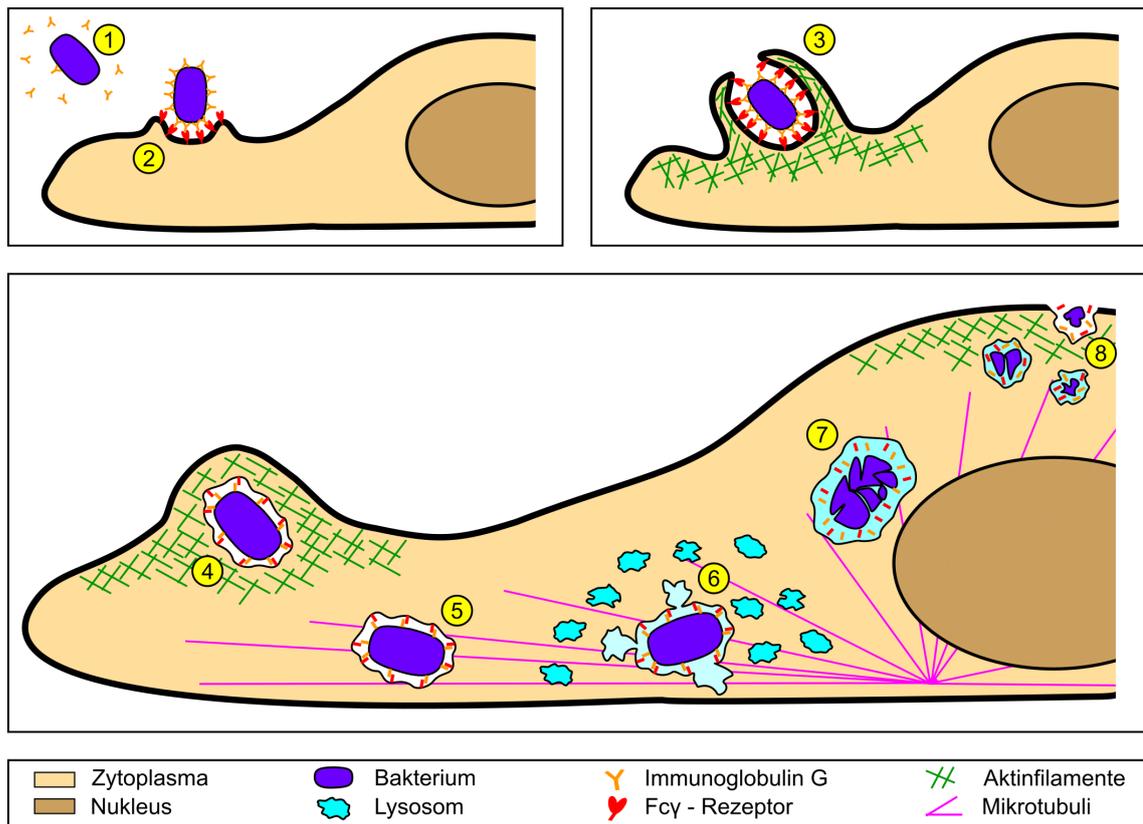


Abbildung 2.4. Schematische Darstellung der einzelnen Stadien der Phagozytose. Die Abbildung zeigt schematisch die Erkennung und Opsonisierung (1) eines Erregers (beispielsweise eines Bakteriums) mittels Antikörpern (hier IgG) und die Identifikation des so markierten Pathogenes durch $Fc\gamma$ -Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche (2). Aufgrund von rezeptorinitiierten Signalkaskaden kommt es zu einer lokalen Remodulierung der Lipide innerhalb der Zellmembran und zu einer Neuordnung des Zytoskelettes, woraus eine Aktin-getriebene Ausstülpung der Zelle und eine Anlagerung der Zellmembran an der Pathogenaußenseite resultiert (3). Nach vollständiger Schließung der Membrananlagerung entlang des Erregers bildet sich das Phagosom (4), ein von einer Membranhülle umschlossener Erreger, welches sich von der Zellmembran löst und kurzreichweitig mit Hilfe von Aktin-basiertem Transport und langreichweitig mit Hilfe von MT-basiertem Transport (5) innerhalb des Zytosplasma in Richtung Nucleus verschoben wird. Während dieses Transportes reift das Phagosom durch die Fusion mit diversen Zellorganellen (6) beispielsweise Endosomen oder Lysosomen. Infolge der Fusionen kommt es zu einer Ansäuerung des phagosomalen Inhaltes, wodurch dieser abgebaut und verdaut wird (7). Der Prozess der Rezeptor-basierten Erkennung und Signalgebung, Internalisierung, Reifung und Zerstörung eines Erregers wird dabei in seiner Gesamtheit als Phagozytose bezeichnet. Anschließend folgt die Exozytose der Abbauprodukte sowie eine Weiterverwendung des recycelten Materials (8).

beispielhafte Darstellungen diverser Mechanismen der Krankheitserreger findet sich im Abschnitt 2.5.

Erkennung von Fremdkörpern

Wie bereits beschrieben, existieren verschiedene Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche, welche direkt an körperfremde Moleküle binden können oder indirekt an Opsonine und dadurch eine Immunreaktion im Wirtsorganismus initiieren. Dabei kommen mehrere verschiedene Rezeptortypen auf der Oberfläche von Makrophagen vor, welche zum Zwecke der Erkennung und Bekämpfung der Erreger kooperieren [7, 29]. Eines der wichtigsten und am besten charakterisierten Liganden-Rezeptor-Paare ist das Opsonin Immunoglobulin G

und der $Fc\gamma$ -Rezeptor, welches nach erfolgreicher Identifikation eines Pathogenes und Kontakt zwischen Ligand und Rezeptor die Schlüsselfunktionen der Phagozytose hervorruft. Schlüsselfunktionen sind dabei beispielsweise die Bildung einer Membranausstülpung zur Internalisierung des Zielobjektes und anschließender Aufnahme sowie die umfangreiche Neuordnung des lokalen Aktinnetzwerkes [30]. Da die Bildung eines Phagosomes und vor allem der zum anschließenden phagosomalen Reifungsprozess gehörige Transport des Phagosomes essentieller Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit waren, wurde zur Initiierung der Fremdkörperaufnahme die $Fc\gamma$ vermittelte Phagozytose genutzt. Daher wird im Folgenden ausschließlich auf das Rezeptor-Ligandenpaar $Fc\gamma$ -R und IgG zur Erkennung von Pathogenen eingegangen.

Der als Ligand fungierende Antikörper G ist wie alle Antikörper (auch Immunoglobuline) ein aus einem B-Lymphozyten gelöstes Rezeptorprotein. Dabei sind alle Rezeptoren auf der Oberfläche eines (B- oder T-) Lymphozyten identisch und assoziiert mit genau einem körperfremden Molekül. Ein solches körperfremdes Molekül, welches von den Lymphozyten erkannt wird und eine Immunreaktion auslöst, wird als Antigen bezeichnet. Es gibt Millionen von Lymphozyten und somit auch Rezeptoren für Millionen von Antigenen [23]. Da das menschliche Genom nicht ausreichend Platz bietet diese zu codieren werden die Rezeptoren zufällig durch somatische Rekombination (Form der genetischen Variation) gebildet oder im Rahmen der adaptiven Immunantwort erlernt und sind somit Teil der erworbenen Immunabwehr [9, 22]. Der Unterschied eines Antikörpers zu einem Rezeptor der B- oder T-Zellen ist lediglich das Fehlen einer Transmembranregion und des zytoplasmatischen Bereichs [23].

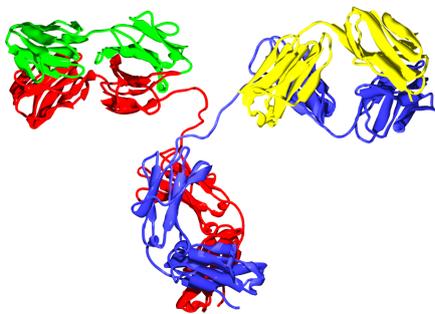


Abbildung 2.5. Strukturdarstellung eines Antikörpers.

Die Abbildung zeigt die Struktur des Antikörpers G2 (IgG2). Ein Antikörper besteht aus zwei identisch aufgebauten langen, schweren Ketten (rot & blau) und zwei identisch aufgebauten kurzen, leichten Ketten (gelb und grün), welche mittels Disulfidbrücken zu einer Y-förmigen Struktur verbunden sind. Der Y-Stiel besteht aus konstanten Regionen und dient der Erkennung der Immunoglobuline durch Fc-Rezeptoren. Die Kopfregionen bestehend aus je einer leichten und einem Teil einer schweren Kette enthalten an ihrem Vorderende (Spitze der Y-Struktur) variable Regionen, welche Bindungsstellen für Antigene bilden. Die Abbildung ist gemeinfrei, publiziert 2007 von TimVickers (en.wikipedia).

Der Antikörper hat bei Menschen und den meisten Säugetieren eine wie in Abbildung 2.5 dargestellte Y-förmige Struktur und besteht aus zwei identisch aufgebauten schweren und zwei identisch aufgebauten leichten Polypeptidketten, welche durch kovalente Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [23, 29]. Die schweren Ketten besitzen jeweils drei bis vier konstante Domänen, wovon ein Teil den Y-Stiel bildet und als Fc-Region bezeichnet wird. Diese Region wird von den Fc-Rezeptoren der Phagozyten erkannt und gebunden und entscheidet über die Funktion des Antikörpers wie beispielsweise die spezifische Rezeptorenaktivierung [22]. Die Y-Arme, auch als Fab-Region bezeichnet, werden jeweils durch einen Teil einer schweren Kette und einer leichten Kette gebildet und enthalten neben je einer konstanten Region auch jeweils eine variable Region pro Kette. Diese asymmetrische, variable Region variiert zwischen den Antikörpern und bildet die Bindungsstelle für das Antigen [9, 23]. Dabei sind die beiden Antigenbindungsstellen an den Armen einer Y-förmigen Struktur identisch, können aber bezüglich der Fc-Region variieren [22]. Die

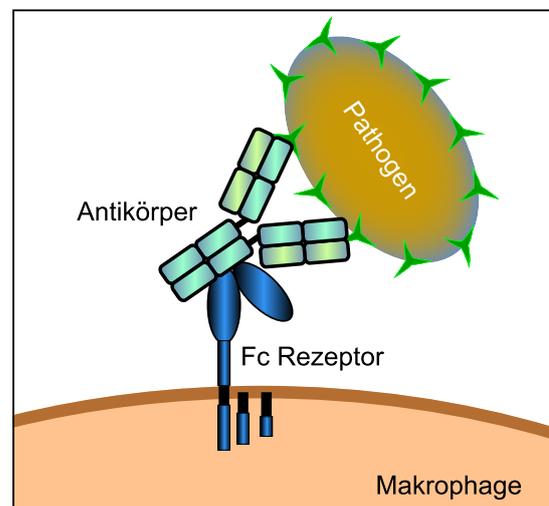
Gesamtheit aller Antikörper wird in fünf Antikörperklassen unterteilt, definiert über die 5 Basistypen der Fc-Regionen. Diese Klassen beinhalten neben Immunglobulin G IgA, IgD, IgE und IgM [9, 23].

Die Funktionen der Antikörper sind dabei vielfältig, so führen sie zu einer Neutralisierung der Pathogene durch Anlagerung an Oberflächenmoleküle der Erreger und unterbinden somit die Interaktion zwischen Erreger und Wirtszellen und blocken deren Infektionsfähigkeit. Des Weiteren können sie aufgrund zweier Antigenbindungsstellen pro Antikörper zu einer Aggregation der Erreger dienen und dadurch zur Förderung der Phagozytose. Essentiell ist auch ihre Erleichterung der Phagozytose durch die Markierung der Pathogene für die Phagozyten, insbesondere der Makrophagen, welche die Erreger mittels Fc-Rezeptoren schneller und effektiver identifizieren und binden können als nicht markierte Pathogene [23]. Die variable Bindungsaffinität zwischen Antikörper und Fc-Rezeptor kontrolliert dabei die Art und Intensität der Immunantwort, wobei eine produktive Immunantwort durch eine effektive Integration von positiven und negativen Signalen gekennzeichnet ist.

Der Fc γ -Rezeptor ist dabei der spezifische Rezeptor für das Immunglobulin G und ein Paradebeispiel für das simultane Auslösen von aktivierenden und inhibierenden Signalkaskaden, der notwendigen Überschreitung eines Schwellwertes zur Aktivierung der Effektorzellen (wie Makrophagen) und zur Generierung einer gut ausbalancierten Immunantwort, initiiert durch die Anbindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren [29, 31]. Basierend auf einem unterstützenden oder reduzierenden Motiv werden grundlegend zwei Klassen von Fc γ -Rezeptoren unterschieden: aktivierende Rezeptoren mit einem fördernden Motiv (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) und inhibierende Rezeptoren mit einem unterdrückenden Motiv (ITIM, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), welche aber alle multiple Signalwege aktivieren. Eine Makrophagenaktivierung zu unterdrücken kann beispielsweise sinnvoll sein, um eine unnötige Reaktion auf gelöste Antikörper ohne Anbindung an ein Pathogen zu verhindern [30, 31]. Es gibt vier Arten von Fc γ -Rezeptoren (drei aktivierende, ein inhibierender), welche alle in Mäusen nachgewiesen wurden, deren Affinität sich nach der IgG Subklasse des anbindenden Antikörpers richtet [29, 31].

Die Abbildung 2.6 zeigt eine schematische Darstellung des membrangebundenen Fc-Rezeptors mit einem Immunglobulin, welches ein Pathogen opsonisiert. Der Fc γ -Rezeptor ist ein transmembranes Glykoprotein mit zwei (bei niedrig affinen Rezeptoren) oder drei

Abbildung 2.6. Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Fc-Rezeptor und Antikörper. Die Abbildung zeigt die Anbindung eines Pathogenes, welches mittels Antikörper opsonisiert wurde, an einen membrangebundenen Fc-Rezeptor. Der Antikörper bindet dabei an die Antigene (grüne Sterne) auf der Pathogenoberfläche. Der Fc-Rezeptor ist ein transmembranes Glykoprotein inklusive extrazellulärer immunoglobulinähnlicher Antigenbindungsdomänen sowie einer γ -Kette, welche die Motive (aktivierend oder inhibierend) enthält und für die Signalübertragung unerlässlich ist. Die Abbildung ist gemeinfrei, publiziert auf en.wikipedia.



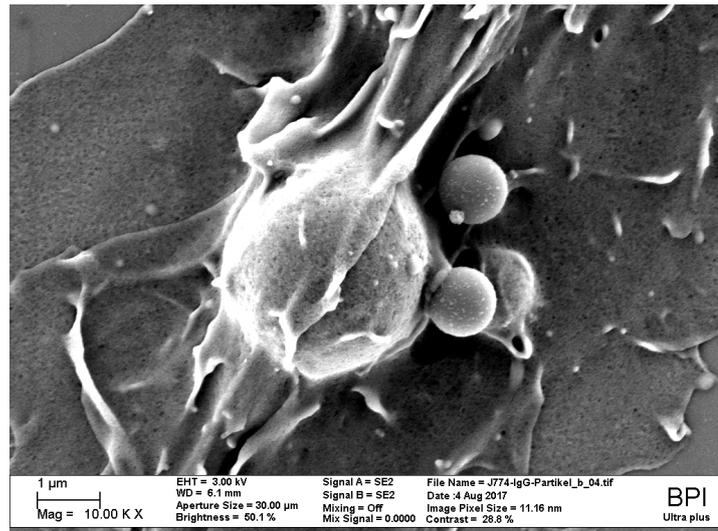
(bei hoch affinen Rezeptoren) extrazellulären immunoglobulinähnlichen Domänen, welche als Bindungsstellen für die Antikörper fungieren sowie einer γ -Kette, welche die Motive (aktivierend oder inhibierend) enthält und für die Signalübertragung unerlässlich ist [31, 32]. Neben ihrer essentiellen aktivierenden Funktion der Makrophagen spielen $Fc\gamma$ -Rezeptoren zusätzlich eine wichtige Rolle für die Präsentation der durch den Phagozyten aufgenommenen Antigene und für die Regulation der B-Zellen Aktivierung, das heißt sie kontrollieren unter anderem die Produktion und Spezifität ihrer Liganden. Sie sind somit mehrfach involviert in die Regulierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems und ein wichtiges Bindeglied zwischen diesen beiden [30, 31]. Dies macht die $Fc\gamma$ -Rezeptoren und die durch sie vermittelte Phagozytose zu einem attraktiven Ziel für potenzielle therapeutische Anwendungen [31]. Alternativen zu den Fc -Rezeptoren sind beispielsweise Komplementrezeptoren oder PRR, welche die PAMPs erkennen, aber für die in dieser Arbeit betrachtete $Fc\gamma$ -Rezeptor vermittelte Phagozytose keine Rolle spielen [29].

Internalisierung von Fremdkörpern & Bildung eines Phagosomes

Nach einer erfolgreichen Identifikation eines Erregers durch Antikörper und dessen Erkennung und Anbindung an Fc -Rezeptoren der Makrophagenoberfläche folgt eine Internalisierung des Fremdobjektes basierend auf einer umfangreichen Neustrukturierung des lokalen Aktin-Zytoskelettes (Details siehe Abschnitt 2.4) und einer Anpassung der Zellmembran. Auch hier ist vor allem die Reaktion auf eine IgG Ankopplung an $Fc\gamma$ -Rezeptoren gut verstanden und charakterisiert, welche die Grundlage für die Aufnahmeexperimente der vorliegenden Arbeit bildet. Nach Anbindung von Antikörper G an $Fc\gamma$ -Rezeptoren kommt es zu einer Akkumulation der Rezeptoren, was zum Auslösen aktivierender Signalkaskaden führt. Infolgedessen setzt eine Regulation des Aktin Zytoskelettes ein, woraufhin Membranlappen und Pseudopodien (Scheinfüßchen) entstehen, um noch mehr Rezeptoren eine Anbindung an Antikörpern auf der Erregeroberfläche zu ermöglichen. Anschließend werden Membranausstülpungen gebildet, welche sich entlang des Pathogenes anlagern. Innerhalb von wenigen Minuten umschließen die Membranausstülpungen das Pathogen vollständig und formieren ein neues Phagosom [7, 29]. Abbildung 2.7 zeigt eine Rasterelektronenmikroskopaufnahme eines durch geschlossene Membranausstülpungen neu gebildeten Phagosomes.

Die Regulation des Aktin-Zytoskelettes erfolgt dabei in drei Schritten. Erster Schritt ist die Zerstörung des membranassozierten kortikalen Zytoskelettes, was der Generierung zur freien Verfügung stehender Aktin-Moleküle dient und die Mobilität der in der Zellmembran verankerten, ligandungebundenen $Fc\gamma$ -Rezeptoren erhöht und somit die weitere Phagozytose fördert. Der zweite Schritt ist die lokale Nukleation und Polymerisation von F-Aktinfilamenten am Ort des Rezeptor-Erreger-Kontaktes und damit verbunden zu einer Neubildung und Erweiterung der Membranausstülpungen in der Umgebung des Zielobjektes führt. Dies geschieht im Falle der $Fc\gamma$ -Rezeptoren durch die Rekrutierung von Arp 2/3 Nukleationskomplexen (Proteinkomplexe, welche die Aktinpolymerisation fördern). Durch das kohärente Wachstum von Membranwölbungen entlang der Erregeraußenseite kommt es zur Ausbildung der sogenannten phagozytischen Kappe (siehe auch Abbildung 2.4(3. Stadium)). Je mehr Bindungen zwischen Rezeptoren und Antikörpern ausgebildet werden, desto mehr Membranausstülpungen können sich entlang der Oberfläche des Zielobjektes anheften, desto größer wird die phagozytische Kappe und desto mehr Aktinzweige werden ausgebildet [21, 29]. Die Ausbildung von neuen Bindungen zwischen Antikörpern und Rezeptoren erfolgt dabei iterativ durch die wiederholte Ausbildung von Pseudopodien und Membranwölbungen, welche noch freie Rezeptoren enthalten, wodurch diese Rezeptoren noch freie Antikörper entlang der Außenseite des Zielobjektes erreichen

Abbildung 2.7. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer geschlossenen Phagosomenkappe. Die Abbildung zeigt die Anlagerung von Membranauswölbungen entlang der Oberfläche des Zielobjektes und ihrem Zusammenschluss am distalen Ende. Durch die Bildung einer vollständigen Membranhülle um den Fremdkörper entsteht das sogenannte Phagosom. Die Details zur Abbildung finden sich am unteren Bildrand.



können, um an diese anzuheften. Dieser Mechanismus der kontinuierlichen Erzeugung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen und einer stetig wachsenden Anlagerung von Membranausstülpungen entlang der Erregeroberfläche wird auch als Reißverschlussverfahren (engl. *Zipper*) bezeichnet. Dabei kann eine erfolgreiche Aufnahme des Pathogenes mittels Phagozytose nur gewährleistet werden, wenn das Anbinden der Rezeptoren an Antikörper auf der kompletten Oberfläche der Erreger möglich ist [7]. Eine unvollständige Bedeckung der Erregeroberfläche mit Immunoglobulin führt zu einer unvollständigen Phagozytose, auch frustrierte Phagozytose [7, 21]. Es handelt sich bei der Internalisierung von Fremdkörpern also nicht um einen Alles oder Nichts Prozess, sondern um ein sukzessives Ansteigen der Ligand-Rezeptor-Interaktionen [21]. Auch Myosin Motoren sind während dieses zweiten Schrittes beteiligt. Sie befinden sich entlang der neugebildeten Aktinfilamente innerhalb der Membranausstülpungen und erhöhen durch ihre kontraktile Natur die Krümmung der Membranwölbung entlang des Zielobjektes. Außerdem bewirken sie im dritten Schritt der Aktin-Zytoskelett-Regulation einen Zusammenschluss der Membranausstülpungen am distalen Ende. Zusätzlich erfolgt während dieser Phase eine Depolymerisation von Aktinfilamenten an der Basis der phagozytischen Kappe, welche die anschließende Deformation des Zytoskelettes und ein Absinken des Zielobjektes in das Zytosol ermöglicht [7, 29]. Nach dem Schließen der phagozytischen Kappe und dem vollständigen Einschluss des Zielobjektes in einer Membranhülle wird diese Organelle fortan als Phagosom bezeichnet. Das Phagosom trennt sich anschließend von der äußeren Zellwand ab und es setzt die Reifung des Phagosomes ein [29].

Der Zipper-Mechanismus zur Ausbildung der phagozytischen Kappe ist dabei Gegenstand intensiver Forschungen. So konnte das Funktionsprinzip einer aktingetriebenen Anlagerung von Membran durch Ausbildung von Ligand-Rezeptor-Verknüpfungen 2010 von Tollis u.a. mit Hilfe des Modells von stochastischer Fluktuation detailliert erklärt werden [21]. Sie gehen davon aus, dass nicht die Aktinpolymerisation die treibende Kraft zur Ausbildung neuer Bindungsstellen ist, sondern dass es sich um eine Art Brownsche Ratsche handelt. Das bedeutet, per zufälligen Membranfluktuationen in der Umgebung des Zielobjektes kommt es zur Ausbildung neuer Bindungen zwischen Antikörpern und Rezeptoren. Die Aktinpolymerisation innerhalb der Membranauswölbungen garantiert anschließend die Irreversibilität der Bindung und verhindert ein Zurücksinken der Membran, indem freie Bereiche ausgefüllt werden. Dadurch kommt ein unidirektionales Anlagern der Membran an den Erreger zu Stande. Dies impliziert auch, dass theoretisch die Ausbildung einer

vollständigen phagozytischen Kappe ohne Aktin bei hinreichend langer Zeit möglich wäre, was jedoch nur bedingt (für kleine Zielobjekte) und teilweise beobachtet werden konnte [21]. Weiterhin wurde das Modell der Membrananlagerung an ein zu phagozytierendes Zielobjekt von Van Zon und Kollegen um eine zu überschreitende Schwelle ergänzt. Diese Schwelle wird durch die Bildung einer halben phagozytischen Kappe repräsentiert. Kommt es zu einer Überschreitung dieser Schwelle, d.h. umschließen die Membranwölbungen mehr als die Hälfte der Zielobjektoberfläche, erfolgt auch eine komplette Internalisierung. Eine frustrierte Phagozytose findet nur unterhalb dieser Schwelle statt [33]. Darauf aufbauend veröffentlichten Richards und Endres ein Zwei-Phasen-Modell für die Ausbildung der phagozytischen Kappe, wobei zunächst ein passives Stadium geprägt durch Rezeptordiffusion und Anbindung sowie anschließend ein aktives Stadium durchlaufen wird [34].

Die grundlegende Internalisierung eines Fremdobjektes hängt eher von den initiierten Signalkaskaden ab als vom Zelltyp [33]. Auch ist eine Aufnahme ohne das Zusammenspiel mit Aktin nicht möglich [7]. Jedoch haben neben biochemischen Regulatoren auch biophysikalische Faktoren einen großen Einfluss auf den Erfolg der Phagozytose. Ein wichtiger Parameter ist dabei die für die Ausbildung der phagozytischen Kappe zur Verfügung stehende Membran [21]. Diese stammt zunächst hauptsächlich aus der Plasmamembran der Effektorzelle, wird aber auch zusätzlich durch exozytierte intrazelluläre Kompartimente gewonnen. Je größer das zu phagozytierende Zielobjekt ist, desto wichtiger ist diese durch Exozytose gelieferte zusätzliche Membran [7]. Auch die Eigenschaften des Zielobjektes stellen einen essentiellen Parameter für die Internalisierung des Erregers dar [21]. Dabei kann unterschieden werden zwischen geometrischen Aspekten, Oberflächensammensetzung und mechanischen Eigenschaften des Fremdkörpers [35]. Bei den geometrischen Eigenschaften spielt zunächst die Größe der Objekte eine wichtige Rolle, wobei die optimale Aufnahme für Partikeldurchmesser zwischen 1 & 3 μm gemessen wurde, was auch mit der Größe vieler Bakterien übereinstimmt [16, 18]. Auch ist die Form und das Seitenverhältnis des Zielobjektes nicht unwesentlich, wobei die Orientierung länglicher Partikel zur Phagozytenoberfläche darüber entscheidet, ob Phagozytose initiiert wird, und die Größe des Objektes, ob sie vollständig stattfinden kann [15]. Dabei ist es von Vorteil, wenn die Spitze länglicher Objekte den ersten Ligand-Rezeptor-Kontakt erzeugt [21]. Außerdem können sphärische Partikel besser aufgenommen werden als elliptische (also mit hohem Seitenverhältnis), wobei auch die Positionierung des Fremdkörpers gegenüber den Membranauswölbungen und seine lokale Form an der Kontaktstelle eine Rolle spielen [17, 35]. Bezüglich der Oberflächensammensetzung der Zielobjekte konnte gezeigt werden, dass Erreger mit hydrophober sowie geladener Außenseite anfälliger für Phagozytose sind, wobei die Art der Ladung (kationisch oder anionisch) nicht relevant ist [35]. Eine ausgiebige Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Zielobjekte steht zum jetzigen Zeitpunkt noch aus, aber Beningo und Wang konnten bereits zeigen, dass die Aufnahmewahrscheinlichkeit mit zunehmender Steifigkeit des Erregers steigt [36].

Phagosomenreifung, Ansäuerung & Abbau des Fremdkörpers

Als Phagosomenreifung oder Alterung werden die strikt hierarchischen und sequentiellen Fusions- und Spaltungsprozesse bezeichnet, welche im Anschluss an die Internalisierung des Fremdkörpers und Bildung des Phagosomes stattfinden [7, 10, 20]. Das Ziel der Reifung ist dabei die Vernichtung und Verdauung des Erregers, womit dieser Prozess zwar den letzten im Rahmen der Phagozytose darstellt, aber gleichzeitig einen zentralen Mechanismus der angeborenen und erworbenen Immunantwort bildet [7, 14]. Es können dadurch Proteine, Lipide und Kohlenhydrate abgebaut werden [7]. Während der Phagosomenalterung kommt es zu einem zentrifugalen, Mikrotubuli(MT)- und Aktinfilament(AF)-basierten Transport

des Phagosomes verbunden mit einer massiven Modifizierung der Zusammensetzung der phagosomenlimitierenden Membran und des Phagosomenlumens (eingeschlossener Inhalt/ Inneres von Zellorganellen), was schließlich in der Konstruktion einer hybriden, mikrobioziden (keimtötenden) Organelle, dem Phagolysosom, resultiert [7, 10, 29, 37–39]. Ermöglicht wird dies durch den Austausch und den Zusammenschluss mit diversen Vakuolen des endozytischen Pfades (Lösungen, Transmembranproteine und membrangebundene Liganden enthaltende Zellorganellen), den frühen Endosomen, den späten Endosomen und den Lysosomen, wobei die Reihenfolge der Aufzählung gleichzeitig auch einer strikten chronologischen sowie sequentiellen Abfolge der Fusionsevents entspricht. Dabei ist die Reifung des Phagosomes kein passiver Prozess, sondern wird gezielt durch die Expression von Signalen, welche Elemente des endozytischen Pfades rekrutieren und eine Fusion mit diesen auslösen, durch die Phagosome selbst initiiert [7, 10, 29, 40]. Nach dem letzten Schritt, der Fusion zwischen Phagosomen und Lysosomen, wird von Phagolysosomen gesprochen. Das sind Organellen, welche basierend auf den vorausgegangenen Spaltungen und Fusionen über ein vielfältiges Repertoire an komplementären Möglichkeiten zum Abbau von Pathogenen, noch immer eingeschlossen vom Phagolysosom, verfügen (siehe auch Abb. 2.4(6)&(7)). Eine der wichtigsten Eigenschaften ist dabei ein sehr geringer pH-Wert des Lumens, weswegen auch von einer Ansäuerung der Phagosomen während ihrer Reifung gesprochen wird. Weitere Möglichkeiten zur Vernichtung der Erreger sind hydrolytische Enzyme zur Verdauung der Fremdkörper, Bakterizide (antimikrobielle Peptide zur Abwehr mikrobieller Erreger wie Defensine) sowie die Erzeugung von toxischen oxidativen Komponenten [10, 29]. Entwicklungsbiologisch ist es allerdings diversen Bakterien und anderen Krankheitserregern gelungen diese Maschinerie der Pathogenzersetzung und Verdauung mittels Phagosomenreifung zu stoppen und zu missbrauchen, um die ausführende Zelle zu infizieren. Daher ist es dringend notwendig die Einzelschritte der Phagosomenreifung grundlegend zu verstehen [7, 14, 20].

Der Ablauf des phagosomalen Reifungsprozesses ist vergleichbar mit dem Ablauf des endozytischen Pfades und beginnt zunächst mit der Fusion zwischen neu gebildetem Phagosom nach erfolgreicher und vollständiger Aufnahme des Erregers und einem zeitigen (engl. *early*) Endosom (auch sortierendes/ *sorting* Endosom). Dies dient der Erzeugung eines leicht sauren pH-Wertes ($\sim 6,0$) innerhalb des Phagosomenlumens und der Differenzierung und Organisation sowie Umleitung der internalisierten Moleküle. Dabei können ein zusätzlicher Austausch mit recycelnden Endosomen (Transporteure in Richtung der Zellmembran) sowie diverse Spaltungsprozesse stattfinden [10, 20]. Signalproteine auf den Phagosomen basierend auf dem phagosomalen Inhalt (nach bereits einsetzendem Entpacken) und den internalisierten Molekülen entscheiden, ob eine tolerogene (beispielsweise als Reaktion auf eine apoptotische Zelle) oder eine immunogene (beispielsweise als Reaktion auf Bakterien) Immunantwort eingeleitet wird [14]. Der Abbau des Fremdobjektes selbst setzt somit weitere Liganden frei, welche zunächst verborgen waren und welche durch intrazelluläre Detektion (Rezeptoren in der Phagosomenmembran oder im Zytosol) beispielsweise die Entzündungsantwort noch verstärken können [26]. Sind die Fremdobjekte im Inneren des Phagosomes für den intrazellulären Abbau und zur Vernichtung bestimmt, erfolgen im zweiten Schritt der Phagosomenreifung Fusionen mit späten (engl. *late*) Endosomen, korreliert mit einer weiteren Reduzierung des luminalen pH-Wertes (5,5–6,0) sowie der Anreicherung von hydrolytischen Enzymen im Phagosom [10]. Außerdem erfolgt eine Akkumulation von speziellen Effektorproteinen (RILP, *Rab-interacting lysosomal protein*), welche mit Dynein-Dynactin-Komplexen interagieren und somit eine Verbindung zu MT-basierter Mobilität herstellen und einen zentripetalen Transport der Phagosomen ermöglichen [7, 29]. (Für Erläuterungen und weitere Details zum phagosomalen Transport

siehe Abschnitt 2.4.) Im finalen Schritt fusioniert das Phagosom mit Lysosomen zu einem Phagolysosom, mit zahlreichen hydrolytischen Enzymen, Lipasen, aktiven Proteasen und einem pH-Wert kleiner als 5,5.

Die Ansäuerung selbst bewirkt dabei bereits eine Zersetzung des Fremdobjektes und verhindert mikrobielles Wachstum sowie Aktivität. Außerdem kontrolliert sie zusätzlich die luminal Enzymaktivität des jeweiligen Schrittes durch Aktivierung lysosomaler Hydrolasen wie Cathepsin, welche bei höherem pH-Wert inaktiv sind. Die relative Beteiligung der einzelnen Mechanismen hängt dabei stark vom ausführenden Zelltyp sowie dem Ziel des Abbaus (vollständige Vernichtung oder Recycling diverser Moleküle wie Antigene) ab [7]. Makrophagen senken ihren pH-Wert beispielsweise deutlich weiter als Dendritische Zellen [41]. Auch ist der pH-Wert nicht nur Konsequenz der Phagosomenalterung, sondern ein aktiver Regulator des Reifungsprozesses durch transmembrane Informationsweiterleitung von Signalen luminaler pH-Wert Sensoren an die Zelle [10]. Sie ist somit unerlässlich für die Prozessierung der Reifung [7]. Die Ansäuerung der Phagosomen läuft in zwei Stadien ab: einem frühen mit nur geringen Auswirkungen und einem späten mit Protonenpumpen vermitteltem starken Absinken des pH-Wertes [14]. Bei den Protonenpumpen handelt es sich dabei um V-ATPasen innerhalb der Phagosomenmembran, einem Proteinmultimerkomplex, welcher Protonen ins Lumen transportiert unter der Nutzung von zytosolischem Adenosintriphosphat (ATP, universeller zellulärer Energieträger) als Energiequelle [29]. Die Änderungen der Zusammensetzung der Phagosomenmembran wie die Anzahl an V-ATPasen und der Komponenten des Lumen wird realisiert durch den regen Austausch mit den endozytischen Vakuolen des jeweiligen phagosomalen Reifestadiums. Die Koordination dieser Fusionsprozesse und die Rekrutierung der korrekten Vakuolen obliegt dabei diversen Rab GTPasen (molekulare Schalter). So ist Rab5 relevant für die Fusion mit zeitigen Endosomen und Rab7 für die Fusion mit späten Endosomen [7, 14]. Neben der Lieferung von V-ATPasen, Proteasen, Hydrolasen oder GTPasen durch die Fusion von endozytischen Organellen mit Phagosomen werden auch MHC Klasse II in das Lumen des Phagosomes eingeschleust. Diese sind vor allem für die Präsentation von Antigenen nach erfolgreicher Zerstörung der Pathogene von großer Relevanz [14]. (Weitere Ausführungen zur Antigenpräsentation folgen im nächsten Abschnitt.)

Die Rekrutierung von endozytischen Organellen und ihre Fusion mit den Phagosomen sowie auftretende Recyclingprozesse sind dabei hoch selektiv und charakteristisch für das aktuelle Reifungsstadium des Phagosomes [10, 42]. So konnte gezeigt werden, dass frühe Phagosome (Reifungsdauer < 30 min) charakteristische Komponenten der Plasmamembran sowie Markierungen der zeitigen Endosomen aufweisen. Diese Komponenten und Markierungen werden während der weiteren Alterung des Phagosomes eliminiert, wodurch auch das Phagosom die Eigenschaften eines frühen Endosomes verliert [43, 44]. Im Ausgleich dafür enthalten sie durch die Fusion mit späten Endosomen nun deren Markierungen und Komponenten und auch ähnliche Eigenschaften wie späte Endosome. Das Phagosom ist bereits 10-30 min nach Entstehung wieder unempfindlich für zeitige Endosomen [45-47]. Diese aktive Rolle der Phagosomen bei ihrer Reifung durch die selektive Rekrutierung der endozytischen Vakuolen bleibt bis zum Ende des Prozesses erhalten. Dabei konnte bei *in vitro* Experimenten mit alten Phagosomen (1 h nach Formation) nachgewiesen werden, dass diese zwar sehr gut mit Lysosomen fusionieren, nicht aber mit zeitigen Endosomen [48, 49]. Neben den Fusionsprozessen spielen auch die Abspaltungen eine wichtige Rolle. So konnte dargelegt werden, dass diverse phagosomale Proteine zentrifugal (anterograd) in Richtung der Zellmembran zurück transportiert werden. Dies beweist, dass Recycling aus den Phagosomen während ihrer Reifung stattfindet, wahrscheinlich basierend auf identischen Mechanismen wie die die für das endozytische Recycling verwendet werden [10, 50].

Trotz vielfältiger Fusionsprozesse und Lieferungen an die Phagosome sowie Abspaltungen zu Zwecken des Recyclings wurde festgestellt, dass die Größe der Phagosomen und ihre Oberfläche während den Interaktionen mit den Vakuolen des endozytischen Pfades konstant bleiben [7, 10, 29]. Darauf Bezug nehmend ist auch nicht geklärt, ob es zwischen Endosomen und Phagosomen zu einer vollständigen Verschmelzung der beiden Organellen kommt oder ob lediglich ein zeitlich begrenzter Austausch zwischen beiden stattfindet [7]. Letzteres wurde 1995 von Desjardins als *kiss & run* Modell vorgestellt [42]. Er geht davon aus, dass es zwischen Phagosom und Endosom nur zu einem vorübergehenden, teilweisen Kontakt zum Austausch von ausgewählten Membrankomponenten und luminalen Inhalten kommt (*kiss*) und anschließend zu einer Trennung beider Organellen zur Vermeidung der kompletten Fusion und totalen Vermischung beider Kompartimente (*run*) [10, 42]. Unterstützt wird diese Hypothese durch diverse experimentelle Beobachtungen hinsichtlich der größenabhängigen Transportkinetik verschiedener Moleküle beim Austausch zwischen Phagosomen und Endosomen, welche ebenfalls auf eine limitierte Verbindung zwischen diesen beiden Organellen hindeuten anstatt auf eine umfassende Vermischung [10, 20]. Ungeachtet dieser Unklarheiten steht allerdings fest, dass die Maschinerie zur Sicherstellung der Fusion und Spaltung zwischen Phagosomen und Organellen des endozytischen Pfades einer der essentiellen und hauptsächlichen Bestandteile der Phagosomenreifung und somit der Phagozytose an sich darstellt [10].

Die Basis des Fusions- und Spaltungsapparates bietet dabei das zelluläre Zytoskelett, insbesondere AF und MT sowie deren assoziierte Motorproteine (siehe auch Abb. 2.4(4)&(5)) [10, 20]. Bereits die Anordnung und Lokalisation der endozytischen Organellen stützt sich auf die zentral organisierten, polaren MT-Strukturen. Darauf basierend sind die MT-assoziierten Motorproteine Kinesin und Dynein die Hauptbeteiligten für die Positionierung der Endosomen und Lysosomen [10]. So entscheidet die MT-basierte Lokalisation der Komponenten nicht nur über den Fortschritt, sondern auch über die Effizienz des endozytischen Pfades. Da Phagosomen vergleichbar an MT-Strukturen angekoppelt sind, wird auch hier ein ähnlicher Einfluss der MT-basierten Mobilität auf den Reifungsprozessfortschritt und die Effizienz erwartet [37–39]. Dabei konnte bereits nachgewiesen werden, dass die zentrifugale Bewegung der Phagosomen ohne funktionstüchtige MT unterbrochen wird [37]. Neben der MT-verbundenen Mobilität und ihrer essentiellen Funktion für die korrekte Reifung sowie der Assoziation und Dissoziation von diversen Molekülen im Rahmen der Interaktion und dem Kontakt zwischen Phagosomen und endozytischen Organellen sind AF ebenfalls in das Zusammenspiel zwischen Phagosomenalterung und dem endozytischen Pfad involviert [10, 20, 40, 42, 51]. Es konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung der AF sowie die Inhibierung von Myosin Motoren zu einer Beeinträchtigung des Phagozytoseprozesses führen [52]. Auch wurde nachgewiesen, dass Phagosomen Proteine enthalten, welche mit der MT-assoziierten und mit der AF-assoziierten Mobilität in Verbindung gebracht werden [42]. Die Abspaltungen von Endosomen und das Recycling von Proteinen aus den Phagosomen basiert ebenfalls auf durch MT induzierte Mobilität der Organellen [7]. Da der Transport der Phagosomen und die zugrunde liegenden intrazellulären Strukturen und ausführenden Motoren einen zentralen Aspekt der vorliegenden Arbeit darstellen, beschäftigt sich der nächste Abschnitt (2.4) nochmals separat und ausführlich mit diesem Themenkomplex.

Entsorgung der Verdauungsprodukte & Antikörperpräsentation

Eine essentielle Aufgabe der Phagozyten ist neben der Internalisierung und Verdauung von Pathogenen die Präsentation von den Pathogen-assoziierten Antigenen an der Zelloberfläche und somit die Verbindung der angeborenen und erworbenen Immunantwort [22, 53].

Die Phagozytose bildet eine der Hauptroutinen für die Aufnahme, Prozessierung und Darstellung von körperfremden Antigenen via MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex) [54]. Das besondere an Vertebraten ist, dass sie zusätzlich die Möglichkeit besitzen den Abbau und die Entsorgung von Verdauungsprodukten aus der Phagosomenreifung an die Maschinerie der Antigenausstellung anzugliedern und diese somit aus der Zelle auszuschleiden (siehe auch Abb. 2.4(8)) [53]. Das Recycling der Antigene involviert dabei mehrere Sortiermechanismen während der unterschiedlichen Stadien der Phagosomenalterung, wobei der Rücktransport von diversen Plasmamembran-Komponenten aus dem Phagosom zurück an die Zelloberfläche schon bei den zeitigen Phagosomen einsetzt [55]. Dadurch können beispielsweise auch relevante Rezeptoren direkt wiederverwertet und vor der intrazellulären Zersetzung geschützt werden. Die Balance zwischen Recycling und Verdauung wird dabei durch die Zelle mittels Kinesin-Motoren und der Lokalisation der zeitigen Endosomen in der Zellperipherie gezielt gesteuert [56]. An das Stadium der zeitigen Phagosomen anschließend folgen weitere Sortier- und Austauschvorgänge während den Stadien der späten Phagosomen und der Phagolysosomen. Eine signifikante Modulation des internalisierten Inhaltes zum Zwecke der Antigenprozessierung und Präsentation mittels MHC Klasse II (MHC II) kommt dabei nur in Phagosomen vor, welche TLR enthalten. Abschließend folgt auch hier ein Transport des MHC II inklusive des Antigens zurück zur Zelloberfläche [41]. Im Kontrast zu der Phagozytose pathogener Erreger kommt es bei der Aufnahme apoptotischer Zellen zu keiner Lieferung von Abbau- oder Recyclingprodukten an intrazelluläre Kompartimente oder vesikulärem Transport von der perinuklearen Region zurück zur Zellperipherie, sondern die Phagolysosomen gehen in Lysosomen über und es kommt zu einer vollständigen Zersetzung des phagosomalen Inhaltes [41, 55].

Im Verlauf der Reifung pathogenbeinhaltender Phagosomen und somit Verdauung der Erreger basiert die Prozessierung der internalisierten Antigene auf der proteolytischen (enzymatische Hydrolyse von Proteinen mittels Peptidasen) Herstellung kurzer Peptidketten, welche an die MHC binden können [20]. Mittels der MHC und der durch Spaltung der mikrobiellen Proteine erzeugten Peptidfragmente (sowie kostimulatorischer Proteine) erfolgt die Präsentation der Antigene entlang der Oberfläche der phagozytierenden Zelle [22]. Diese Zurschaustellung von Peptidfragmenten körperfremder Proteine dient der Aktivierung verschiedener T-Lymphozyten im Organismus und damit korreliert der Rückkopplung der Immunreaktion sowie der Einleitung und Stimulation weiterer Schritte der Immunantwort [22, 23]. Zellen, deren Funktion auf die Präsentation der Antigene spezialisiert ist, werden auch als professionelle antigenpräsentierende Zellen (beispielsweise Dendritische Zellen) bezeichnet, wobei auch alle anderen Phagozyten (beispielsweise Makrophagen, als nichtprofessionell bezeichnet) die Möglichkeit der Präsentation besitzen [22]. Antigenpräsentierende Zellen besitzen gegenüber anderen Zellen MHC II. Diese werden im inaktiven Zustand durch Vesikel des trans-Golgi-Netzwerkes oder mittels Fusion mit endozytischen Organellen zu dem entsprechenden, intrazellulären Kompartiment (hier Phagolysosom), welches das zu zeigende Antigen enthält, geliefert und vor Ort mit dem Peptidfragment pathogener Organismen beladen, um anschließend zur Plasmamembran der Zelle gebracht zu werden [20, 22]. Um einen MHC II an der Zelloberfläche zu kreieren, benötigt die Zelle dabei eine minimale Reaktionszeit von 20-30 min. Eine Alternative Darstellung der Antigene entlang der Zellmembran bieten die MHC der Klasse I (MHC I) [20, 53]. Der exakte Funktionsmechanismus, welcher zur Präsentation der Antigene mittels MHC I und einem Rücktransport phagosomalen Inhaltes an die Plasmamembran führt, konnte noch nicht vollständig geklärt werden [29]. Dabei kommen drei unterschiedliche Methoden in Betracht, wie eine Einbindung der Antigene externer Quellen in das MHC I-System von staten gehen kann (siehe Abbildung 2.8) [53]. Eine Möglichkeit ist die proteolytische Verdau-



Abbildung 2.8. Drei Mechanismen der exogenen Antigenpräsentation durch einen Phagozyten. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung dreier möglicher und unterschiedlicher Mechanismen der Antigenpräsentation mittels MHC I durch einen Phagozyten. Variante (1) ist die Exozytose von Peptiden entstanden durch proteolytische Verdauung und einem Anbinden dieser an bereits bestehende MHC I entlang der Zellmembran. Variante (2) ist eine Ausschüttung der Peptide vom Phagosomenlumen ins Zytosol, einer anschließenden Prozessierung dieser durch Proteasome und dem Eintritt der Peptide in den ER-Golgi-Plasmamembran-Pfad. Variante (3) ist eine direkte Beteiligung des ER an der Entwicklung der Phagosomen, wobei dadurch eine lokale Prozessierung der Peptide und Beladung der MHC I ermöglicht wird. Der anschließende Transport der Moleküle zur Zellmembran erfolgt vakuolar ohne Beteiligung des Golgi basierten Exozytosepfades. Abbildung aus [53].

ung der Erreger, die Exozytose (Ausscheidung mittels Vesikeltransport) der Peptide und ein anschließendes Anbinden dieser an bereits auf der Zellaußenseite vorhandene MHC I. Alternativ dazu ist auch eine Ausschüttung der Peptide aus dem Phagosom (oder Phagolysosom) in das Zytosol möglich, wo es zu einer Prozessierung der Peptide durch Proteasome (Proteinkomplexe zum Proteinabbau zu Fragmenten) kommt und diese Peptide anschließend in dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) - Golgi Apparat - Plasmamembran-Pfad eintreten. Eine dritte Variante ist schließlich eine Teilnahme des ER an der Phagozytose selbst, indem es Membran für das sich entwickelnde Phagosom zur Verfügung stellt. Eine solche hybride Organelle zeigt die Möglichkeiten zur lokalen Prozessierung der exogenen Peptide und eine Beladung der MHC I mit diesen [53]. Anschließend folgt ein Membranrecycling, vakuolarer Transportprozess dieser Moleküle zur Zellperipherie, welcher ohne Verbindung zum exozytischen Prozess via Golgi Apparat ist [57]. Die Zellen nutzen somit unterschiedliche Transport- und Präsentationsmechanismen für die internalisierten Antigene, je nach Zelltyp, genutztem MHC und Art des Antigens [54].

Aktuelle Studien zeigen, dass es sich bei der Internalisierung und Präsentation von Antigenen um einen sehr dynamischen Prozess mit vielen verschiedenen vesikulären Kompartimenten und Transportmechanismen handelt [54]. Diese basieren größtenteils auf MT-abhängiger Mobilität, wie bei der Visualisierung von dem Transport von GFP-MHC II Kombinationen von der perinuklearen Region zur Plasmamembran in lebenden Zellen gezeigt wurde [58]. Auch konnten bei der Phagozytose von nicht biologisch abbaubarem Material phagosomale Trajektorien von der perinuklearen Region zurück zur peripheren Membranregion beobachtet werden, welche im Zusammenhang mit der Entsorgung von Abbauprodukten, Verdauungsresten und pathogenassoziierten Antigenen zu stehen scheinen und durch AF-basierte Motilität gefördert werden [59]. Lipopolysaccharide (Membrankomponente gram-negativer Bakterien) zeigen ebenfalls ein Recycling in Phagozyten, nachdem sie bereits internalisiert wurden und in den Phagosomen reiften. Dabei verließen sie nach mehr als 24 h das Phagolysosom und wurden graduell zurück zur Zellperipherie transportiert [60].

Somit wird deutlich, dass auch das Recycling, die Entsorgung von Verdauungsprodukten und vor allem die Präsentation der Antigene pathogener Erreger einen wichtigen Bestandteil der Immunantwort in Verbindung mit der Phagozytose darstellt, welcher noch einige

Fragen aufwirft.

2.4 Intrazellulärer Transport & zugrundeliegende Strukturen

Für eine korrekte und effiziente Formation und Reifung eines Phagosomes ist der intrazelluläre Transport von Membran, Kompartimenten, diversen Molekülen und dem Phagosom selbst unerlässlich. Da diffusive Prozesse für Objekte größer als einige Nanometer nicht mehr für ausreichend Transport sorgen können, wird ein aktives Transportsystem benötigt. Dies wird mittels molekularen Motoren, welche auf einem komplexen System an zytoskelettalen Polymeren entlang laufen, realisiert [61]. Bei den zytoskelettalen Polymeren (Filamente) handelt es sich um Aktinfilamente und Mikrotubuli und bei den Motoren um die AF-assozierten Motoren Myosin und die MT-assozierten Motoren Kinesin und Dynein [61]. Die Motoren sind also spezifisch entsprechend des angekoppelten Filamentes und dessen Orientierung, welche maßgeblich die Bewegungsrichtung der Motoren beeinflusst [62]. Die drei Hauptakteure für den Transport von Kompartimenten innerhalb der Zellen wie beispielsweise Phagosomen oder Vesikel sind Myosin V, zytoplasmatisches Dynein und Kinesin-1. Dabei kommt es bei dem intrazellulären Transport einer Last meist zur Beteiligung mehrerer diverser Motorproteine, da nur eine Heterogenität der Motoren in der Lage ist die an den Transport gestellten Anforderungen (wie Richtungsvorgaben, vorhandene Basisfilamente oder Ausweichen von Hindernissen) zu erfüllen [54]. Außerdem sind Myosin II Motoren bei der Ausbildung der phagozytischen Kappe involviert, welche anschließend durch die Hilfe von Myosin Ic und Myosin X Motoren vervollständigt und geschlossen wird [55,63].

Die MT spielen eine essentielle Rolle in der Anordnung und Lokalisation von intrazellulären Organellen wie beispielsweise Komponenten des endozytischen Pfades (siehe Abschnitt 2.3) in spezifischen Domänen (Regionen innerhalb der Zelle). Sie beeinflussen dadurch auch die Effizienz der endosomalen Entwicklung da je nach Entwicklungsstadium Fusionen mit unterschiedlichen intrazellulären Organellen angestrebt werden [10]. Auch die Lokalisation und Prozessierung der Phagosomen ist in ähnlicher Weise an die MT-Strukturen gekoppelt. Eine Schlüsselfunktion nimmt dabei die polare Ausrichtung der MT ein, wodurch gerichtete intrazelluläre Gleise gebildet werden, entlang derer Motoren sich in Richtung Zellkern (retrograde oder zentripetale Bewegung) oder in Richtung der Zellperipherie (anterograde oder zentrifugale Richtung) bewegen können, wodurch wiederum die Organellen innerhalb der Zellen verschoben werden und die Organellenbewegung und Positionierung gesteuert wird [10,54]. Dazu zählt auch die Funktion der MT als Gleis für Membranlieferungen (in Form von Vesikeln) zur Zelloberfläche während der Bildung einer phagozytischen Kappe und dem Transport der Phagosomen von der Zellperipherie in Richtung der perinuklearen Region im Rahmen der Phagosomenreifung und der Gewährleistung der Interaktionen zwischen Phagosom und endozytischen Organellen [54]. Nach abgeschlossener Zersetzung des phagozytierten Erregers sichert die MT-basierte Mobilität den Vesikelverkehr zurück zur Zellmembran für die Antigenpräsentation [54]. Die von MT ausgehende Bewegung generiert vor allem langreichweitigen Transport zwischen Zellperipherie und perinuklearen Region. Zur Realisierung von lokalem, kurzreichweisigem Transport werden AF und assoziierte Motoren genutzt, wobei die genaue Einbringung der AF-basierten Mobilität noch nicht vollständig geklärt ist [10,61]. Bekannt ist, dass Myosine Bewegungen über kurze Strecken, vor allem in MT-armen Regionen, kontrollieren und anschließend die Phagosome an das MT-gestützte Transportsystem übergeben, da Myosin Inhibitoren neben Inhibitoren des MT-Systems ebenfalls einen Einfluss auf die Phagosomenbewegung zeigen [10,55,64]. Es kommt nach erfolgreicher Internalisierung eines Fremdkörpers zunächst

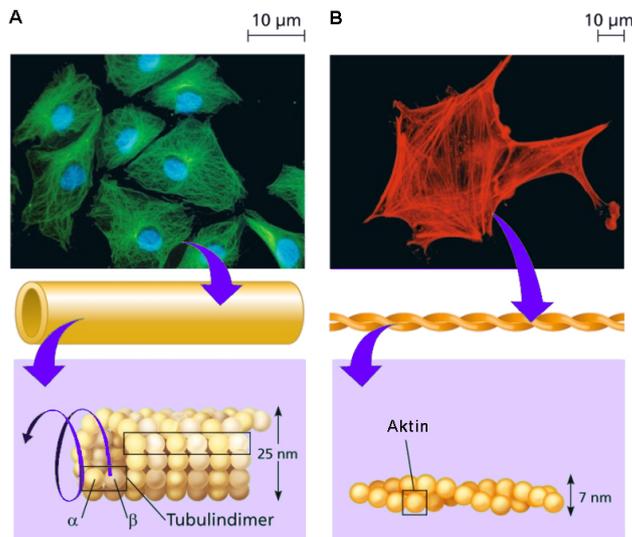


Abbildung 2.9. Relevante Polymerstrukturen des Zytoskelettes: Mikrotubuli & Aktinfilamente.

Die Abbildung zeigt für den Organellentransport relevante zytoskelettale Strukturen. Grafik (A) zeigt Mikrotubuli (grün dargestellt): zentralorganisierte, hohle Stäbe aus 13 Reihen von Tubulinmolekülen, welche wiederum aus Heterodimeren von α - und β -Tubulin aufgebaut sind. Grafik (B) zeigt Aktinfilamente (rot dargestellt): zufällig angeordnete verdrehte Doppelfasern aus Aktinmonomeren, welche Quervernetzungen ausbilden können und besonders zahlreich in den Randregionen der Zellen vorzufinden sind. Abbildung nach [23].

zu einer Reihe von Myosin-getriebener und AF-gestützter Bewegungen des Phagosomes, bevor dieses mittels MT-assoziiierter Motoren und den MT als Schienen in Richtung Zellinneres transportiert wird [62, 65]. Somit wird sowohl MT-basierte Mobilität als auch AF-basiertes Transportverhalten für eine vollständige und fehlerfreie Phagosomenformation und Reifung nach $Fc\gamma$ -Rezeptoren initiiert Phagozytose benötigt [10, 54]. Aufgrund dessen soll zunächst der Aufbau der Filamente und assoziierter Motorproteine kurz erläutert werden.

Das Zytoskelett besteht aus drei Hauptfasern: den Mikrotubuli, den Aktinfilamenten (auch Mikrofilamente) und den Intermediärfilamenten. MT sind längliche, hohle, zylinderförmige Strukturen mit einem Durchmesser von 25 nm, einem Hohlraum von 15 nm und einer Länge von 0,2-40 μm [23, 66]. Ihre Persistenzlänge beträgt $(1,4 \pm 0,3)$ μm [67]. Gebildet werden MT aus jeweils 13 Reihen von Tubulinheterodimeren, wobei ein Heterodimer aus einer nicht kovalenten Verbindung von globulärem α - und β -Tubulin besteht (siehe Abb. 2.9A). Es kommt somit zu einer Ausbildung eines Plus- und eines Minusendes der Filamentstruktur. MT dienen der Formgebung und Abstützung der Zellgestalt, gewährleisten die Zellmobilität und bilden die Schienen für den intrazellulären Organellentransport. Dazu sind die polaren MT zentral im Zentrosom der Zelle, auch als Mikrotubuli-Organisations-Centrum (MTOC) bezeichnet, organisiert, wobei die Minusenden der MT hier verbunden sind und die Plusenden in Richtung der Zellperipherie zeigen [23]. AF hingegen sind ausgefüllte stabähnliche Strukturen, aufgebaut als Helix aus globulären Aktinmonomeren, mit einem Durchmesser von 7 nm und einer Persistenzlänge von (17 ± 2) μm (siehe Abb. 2.9B) [23, 67]. Innerhalb der Zellen zeigen sie eine zufällige Anordnung, können aber Quervernetzungen ausbilden [23, 61]. Sie liegen somit meist als lineare Bündel, dreidimensionale Gele oder flächige Netze vor, wobei die Netze vor allem unterhalb der Plasmamembran entstehen, korreliert mit einer vergleichsweise hohen AF-Dichte, und als Aktinkortex bezeichnet werden [22, 23, 68]. Die AF dienen ebenfalls der Formgebung der Zelle, aber auch der Veränderung dieser und der Kompensation von Zugspannungen auf die Zelle und der Ermöglichung der Zellmobilität [23]. Die Intermediärfilamente bestehen aus Faserproteinen, welche zu kabelähnlichen Strukturen mit einem Durchmesser von 8-12 nm umeinandergewickelt sind [23]. Eine Beteiligung der Intermediärfilamente am Transport von Organellen oder eine Assoziation mit Transportmotoren wurde bisher nicht festgestellt.

Die für den Transport entlang der MT oder AF notwendigen Motorproteine bestehen je-

weils hauptsächlich aus Motor- oder Kopfdomänen und Schwanzdomänen (Fortsätzen). Die Kopfdomänen können durch die Hydrolyse von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) eine Konformationsänderung eines sogenannten Hebelarmes ausführen, wodurch es zu einer Krafterzeugung und Ausübung kommt. Die Schwanzdomänen hingegen ermöglichen die Anbindung an andere Strukturen oder Organellen [22, 54]. Während der Vorwärtsbewegung der Motoren bleibt dabei immer eine Kopfdomäne an das Filament gebunden, während sich eine andere vom Filament löst und an einer neuen Stelle wieder anbindet. Die Motoren setzen somit immer einen Fuß (eigentlich Kopf) vor den anderen, ohne dass es zu einem gleichzeitigen Abheben aller Füße/ Köpfe kommt [22]. Wie bereits erwähnt, sind zytoplasmatisches Dynein und Kinesin-1 MT-assoziierte Motoren und Myosin V ein AF-assoziiertes Motor und auf den Transport von Organellen innerhalb des Zytoplasmas spezialisiert. Aufgrund von ähnlichem Aufbau der Motordomänen von Kinesin-1 und Myosin V wird von ähnlichen Funktionen der beiden Motoren ausgegangen [62]. Sie zeigen eine feste Schrittweite (8 nm Kinesin-1 & 36 nm Myosin V) sowie unidirektionale, robuste Bewegung in Richtung des Plusendes des jeweiligen Filamentes, kaum durch Pausen oder Rückwärtsbewegung unterbrochen. Außerdem generieren beide relativ große Kräfte auf Lastobjekte (6 pN Kinesin-1 & 3 pN Myosin V) [62]. Im Vergleich zu anderen Myosin Motoren zeichnet sich Myosin V durch zwei Kopfdomänen und einer großen Schrittweite aus, wodurch eine effiziente und kontinuierlich fortschreitende Bewegung ohne Dissoziation vom AF ermöglicht wird. Dabei kann Myosin V eine große Last bewegen [22]. Im Gegensatz zu Kinesin-1 und Myosin V ist Dynein deutlich komplexer aufgebaut und verfügt über größere Kopfgruppen, bestehend aus einer einmaligen Ringkonstruktion multipler globulärer Domänen, welche zeitgleich bis zu vier ATP-Nukleotide pro Kopf binden können. Auch ist der Dynein Motor deutlich schwächer, was die Unterstützung des Motors durch zusätzliche Faktoren wie beispielsweise Dynactin zur Sicherstellung einer dauerhaften Anbindung des Motors an ein MT während der Bewegung und Hilfestellung für das Voranschreiten des Motors unabdingbar macht [62]. Dennoch ist Dynein mit ein bis drei solcher großen Kopfgruppen einer der größten und schnellsten Motorproteine [22]. Die Laufrichtung geht dabei zum Minusende der MT. Aufgrund der polaren Anordnung der MT im MTOC spricht man daher bei Dynein von zentripetalem, retrogradem Transport und im Vergleich dazu bei Kinesin von zentrifugalem, anterogradem Transport [10, 54].

Über das detaillierte und komplexe Zusammenspiel MT-basierter Mobilität und AF-gestützter Transportvorgänge während der Phagozytose und insbesondere der Phagosomenreifung ist dabei allerdings bis auf die Verteilung zwischen langreichweitigem und lokalem Transport noch relativ wenig bekannt [10]. Auch liegen kaum Kenntnisse über diverse Transportvariablen und deren relativen Einfluss auf das phagosomale Transportverhalten vor [61].

Bei einer Vielzahl von Untersuchungen des intrazellulären Transportes diverser Organellen, von Melanosomen (membranhüllter Pigmentspeicher) über Endosomen bis Phagosomen, konnten verschiedene Arten des Transportes vor allem häufig bidirektionaler Transport und auch Unterbrechungen des Transportes durch Pausenphasen beobachtet werden [37, 64, 65, 69, 70]. Dies lässt den Schluss zu, dass es bei dem endozytischen Pfad (und somit auch während der Phagosomenreifung) sowie auch dem sekretorischen Pfad ein Zusammenwirken antagonistischer Motorproteine sowie einen notwendigen Wechsel zwischen MT- und AF-basierten Transportsystemen gibt [55, 71]. Zur Manifestation dieser These wurden die Transportvorgänge in Zellen unter Einfluss von Inhibitoren der Filamentpolymerisation oder der Motorenaktivität (alternativ auch in Zellen, welche die Motoren nicht exprimieren) gemessen und es konnte gezeigt werden, dass bei Depolymerisation der MT der langreichweitige Organellentransport, die Aggregation der Vesikel in der perinuklea-

ren Region und die Fusionen zwischen Phagosomen und endozytischen Vesikeln eingestellt wird [37,38,65,72,73]. Einige dieser Arbeiten zeigten allerdings auch, dass ohne intakte intrazelluläre MT noch bidirektionaler, axonaler Organellentransport stattfindet, allerdings deutlich langsamer, und dieser erst zum Erliegen kommt, wenn zusätzlich Myosin V Motoren fehlen [64]. Bei einer grundlegenden Zerstörung des Aktinskelettes (oder Fehlen von Myosin V) vermindert sich zwar die Reifung der Phagosomen sowie der kurzreichweitige Transport aber der generelle phagosomale Transport bleibt erhalten [65]. Wobei durch die Zerstörung der AF-Strukturen die Fusion zwischen endozytischen und phagozytischen Organellen analog zur Depolymerisation der MT negativ beeinflusst wird [65]. Alternativ konnten Toyohara und Inaba zeigen, dass eine Zerstörung der MT die Akkumulation kleiner Partikel (Durchmesser 0,9 μm) verhindert, wobei der Transport großer Phagosomen (Durchmesser 3 μm) unbeeinflusst blieb und bei einer Zerstörung des Aktinskelettes durch Cytochalasin B nur der Transport großer Phagosomen unterbunden wurde. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese zweier verschiedener Transportsysteme in Abhängigkeit der Phagosomengröße [39]. Zhang u.a. vermuteten hingegen, dass AF-basierte Motilität der Organellen eine fundamentale Eigenschaft aller Phagosomen ist, da sie ihrer Ansicht nach eine wichtige Rolle für den zentrifugalen Transport zur Ausscheidung von zellulären Verdauungsresten und zur Antigenpräsentation spielt [59].

Bei der Betrachtung der intrazellulären Verteilung von *Xenopus* (Krallenfrosch) Melanosomen konnten Gross und Kollegen herausfinden, dass alle drei genannten Motoren (Kinesin, zytoplasmatisches Dynein und Myosin V) beteiligt sind. Beim Übergang von der Dispersion der Melanosome zur Aggregation in der perinuklearen Region erhöht sich die Aktivität der Dyneine, während die der Myosine reduziert wird und die der Kinesine konstant bleibt [74]. Die Reduzierung der Myosin-Aktivität ist dabei notwendig, da das Myosin wie eine molekulare Ratsche wirkt, welche Bewegung in Richtung der Zellperipherie zulässt, aber in Dynein-getriebene Bewegung in Richtung des Zellinneren unterbindet [74]. Daraus folgt auch, dass bei einer Blockade der Myosin V-basierten Krafterzeugung auf das zu transportierende Organell, der MT-assoziierte Transport (in Minus- und Plusrichtung) deutlich beschleunigt wird [63,65,70,74]. Da aber eine wichtige Aufgabe der Myosin Motoren auch die Hilfestellung beim Ausweichen von intrazellulären Hindernissen (wie Organellen oder Filamente) und Überwinden von Filamentkreuzungen (beispielsweise des Aktinnetzes, siehe oben) ist, kommt es zu einer Erhöhung der Transportunterbrechungen und Pausenphasen [10,71,72,74,75]. Neben der Verzögerung des MT-basierten Transportes sowie dessen Unterstützung an Kreuzungen und Hindernissen gewährleisten Myosin V Motoren (sowie AF-Strukturen) auch eine Verankerung der betrachteten Kompartimente in der Zellperipherie, was vor allem auch für den sekretorischen Pfad eine wichtige Rolle spielt (nach der Anlieferung der auszuscheidenden Vesikel, basiert auf MT-Transport) [55,70,74]. Ob Myosin dabei grundlegend für einen Rücktransport von der perinuklearen Region in die Zellperipherie benötigt wird, wird in der Literatur weiterhin diskutiert [70,74]. Unabhängig davon ist aufgrund zufälliger Orientierung der AF innerhalb der Zelle eine Bewegung der Myosin Motoren in alle Richtungen möglich [70]. Eine Blockade der Kinesin Motoren führt zu einer Akkumulation von zeitigen Endosomen in der perinuklearen Region, einem schnelleren Abbau des aufgenommenen Inhaltes und einem Verlust des Rezeptorenrecyclings zur Plasmamembran. Die Funktion der Kinesine ist somit nicht nur der Transport von Vesikeln aus der perinuklearen Region in die Zellperipherie, sondern auch die Regulation der Balance zwischen Rezeptorrecycling und Verdauung während der Phagosomenreifung [55,56]. Eine Verzögerung des zentripetalen Transportes (mittels Myosin V oder Kinesin) dient somit der Förderung der Interaktion zwischen Phagosomen und endozytischen Organellen [65]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MT assoziierte Moto-

ren und insbesondere Dynein eine primäre Transportfunktion zeigen, während Myosin V den Transport durch Hilfestellung beim Überwinden von Hindernissen und Kreuzungen unterstützt, aber auch Pausen und Verzögerungen initiiert. Der Verlust von anderen Myosin Motoren, beispielsweise II, VI, VIIa, hat dabei keinen signifikanten Einfluss auf den vesikulären Transport [63]. Im Vergleich dazu hat Myosin V keine Funktion bei der phagozytischen Aufnahme von Fremdkörpern an sich [65].

Deutlich wird dabei, dass bei dem Transport eines Vesikels innerhalb einer Zelle sowohl MT-assoziierte als auch AF-assoziierte Motoren an die Organelle gebunden sind und den Transport ermöglichen, aber auch beeinflussen. Die durch die Motoren erzeugte Kraft skaliert mit der Anzahl der aktiv an der Bewegung beteiligten AF- und MT-assoziierten Motoren, wobei die generelle Anzahl der MT-assoziierten Motoren auf der Organelle konstant ist [71, 74]. Auch wurden für bidirektionale Bewegungen von Melanosomen gleiche Geschwindigkeiten in beide Richtungen gemessen sowie die Ausübung eines Drehmomentes und Rotation der zu transportierenden Organellen, wenn es an Kreuzungen zu einer Transportunterstützung kam [70, 71, 75]. Die beteiligten, teilweise antagonistischen Motoren Dynein, Kinesin und Myosin scheinen alle fest mit dem Transportorganell verbunden zu sein und sich in einer Art Tauziehen zu befinden, welches die Gruppe von Motoren für sich entscheiden kann, die die größere kollektive Kraft erzeugen kann und welche somit die Transportrichtung des Organells und die Nutzung des assoziierten Systems (MT- oder AF-basiert) vorgibt [69, 71, 74, 76]. Im Verlaufe des Transportes kann dabei durch Filamentassoziation/ -dissoziation der Motoren das dominante Team wechseln, wodurch es zu Pausen oder einem bidirektionalen Transport kommen kann [75, 76]. Zusätzlich können auch lastabhängige Transportparameter individueller Motoren das Kräfteverhältnis beeinflussen [69]. Voraussetzung für ein solches Tauziehen ist die gleichzeitige Aktivität der Motoren [74]. Alternativ dazu wäre auch eine gezielte Aktivierung/ Inaktivierung der Motoren als Ursache für bidirektionalen Transport denkbar [55]. Betrachtet man neben der bidirektionalen Bewegung die Rotationen der Lasten während ihrer Pausenphasen an Filamentkreuzungen näher, fällt auf, dass es sich bei der Rotation nicht um eine zufällige Bewegung handelt, sondern um eine aktive Drehung. Eine zufällig Bewegung würde auf eine Dissoziation der an die Last gekoppelten Transportmotoren von den MT hindeuten, eine aktive Bewegung hingegen kann nur durch die Beteiligung von Motorproteinen auch während der Pausenphasen realisiert werden [75].

Kraftmessung an aus *Dictyostelium* isolierten Endosomen ergaben die wahrscheinliche Beteiligung von einem Kinesin und vier bis acht Dyneinen [77]. Außerdem wurde festgestellt, dass häufig vermeintlich schwache Dynein Motoren über kräftigere Kinesin Motoren dominieren [76, 78]. Vorrangig fanden Untersuchungen diverser Motoren *in vitro* statt, was eine gute Grundlage für die Funktionen der Motoren liefern kann, allerdings häufig auch Abweichungen zu dem Verhalten der Motoren *in vivo* zeigt, also in ihrer natürlichen Umgebung innerhalb der Zellen [62, 72]. So hat das zelluläre Umfeld beispielsweise kaum Einfluss auf die Krafterzeugung eines individuellen Motors, aber durch die viskoelastische Umgebung innerhalb der Zelle und des Zytoskelettes können bei simultaner Motoraktivität unterschiedlich stark ausgeprägte Interaktionen mit den motorassoziierten Filamenten zustande kommen. Die Anzahl der beteiligten Motoren kann dabei variieren, woraus abweichende effektive Kräfte resultieren [72]. Außerdem kommt es *in vivo* häufig auch zu homogenen oder heterogenen Interaktionen mehrerer Motoren und Komposition mit anderen Arten von Motorproteinen, beispielsweise AF- und MT-basierte Transporteure (wobei auch negative Kooperationen möglich sind) [62, 76]. So können Dyneine während des Lasttransportes untereinander kooperieren und sind in der Gruppe stärker als einzeln, was für Kinesine nicht beobachtet wird [62, 76, 78, 79]. *In vitro* Experimente mit Dynein Motoren zeigten eine

Korrelation und Verkürzung der Dynein-Schritte bei sehr großen Lasten (Zugkräften am Motor), was in einer Erhöhung der durch den Motor ausgeübten Kraft resultierte [72, 80]. Auch konnte mittels eines theoretischen Modells der Dynein-Funktion und Monte Carlo Simulationen dargestellt werden, dass die Geschwindigkeit der Dyneine stärker durch die Last beeinflusst wird als die der Kinesine [81]. Zusätzlich besitzt Dynein einen Zustand mit nur loser Anbindung an MT, was einen deutlich vergrößerten Bewegungsradius ohne Kraftausübung ermöglicht, welcher genutzt werden kann, um entgegenkommenden, belasteten Motoren auszuweichen und Stausituationen entlang des MT zu vermeiden [62].

Während der Betrachtung des phagosomalen Transportes fiel Rai und Kollegen auf, dass sich zeitige Phagosomen (circa 5-10 min nach Bildung) vorrangig bidirektional und späte Phagosomen (min. 30 min nach Entstehung) eher unidirektional bewegen und trotz gleicher Geschwindigkeiten späte Phagosomen längere zusammenhängende Strecken in Richtung Minusende der MT zurücklegten. Die Transportkräfte in Richtung des Plusendes der MT waren bei zeitigen und späten Phagosomen identisch, bezüglich des Minusendes aber für späte Phagosomen größer als für zeitige, was auf eine Sensitivität der Dynein Motoren bezüglich der Phagosomenreifung schließen lässt. Die molekularen Eigenschaften beider Phagosomenstadien waren ebenfalls identisch, lediglich die Verteilung der Motoren war bei zeitigen Phagosomen uniform entlang der Oberfläche und zeigte bezüglich Dynein bei späten Phagosomen Flecken hoher Dynein-Dichte oder Dynein-Cluster. Diese Cluster erlauben vielen Dyneinen gleichzeitig an MT zu binden, auch wenn die Wahrscheinlichkeit für ein einzelnes Motorprotein mit einem MT zu interagieren eher gering ist. Mit steigender Phagosomenoberfläche nimmt diese Wahrscheinlichkeit noch ab, wodurch eine ungleichmäßige Dynein-Verteilung auf der Oberfläche an Relevanz zunimmt. Die zusammengeschlossenen Dynein Motoren besitzen die Möglichkeit zu kooperieren und große kollektive Kräfte zu erzeugen, welche durch eine konstante Anbindung der Motoren an MT unterstützt werden. Diese Kräfte steigen mit der Anzahl an Dynein Motoren weiter an und sind die Ursache für den Übergang bidirektionaler Bewegung bei zeitigen Phagosomen durch gleichberechtigte Dynein-/ Kinesin-Kräfte zu unidirektionalem Transport später Phagosomen, basierend auf der Dominanz kollektiver Dynein-Kräfte [76, 78, 79].

Neben den Auswirkungen von MT und AF sowie den dazugehörigen Motorproteinen auf das phagosomale Transportverhalten konnte auch gezeigt werden, dass der cytosolische pH-Wert die Motoren und somit die Transportrichtung beeinflusst [37, 63, 73]. Auch fiel auf, dass teilweise die Inhibierung eines Motors, d.h. die Blockade des Transportes in eine Richtung, gleichzeitig zum Verschwinden des Transportes in die entgegengesetzte Richtung führte, was die Vermutung aufkommen lässt, dass auch der intrazelluläre Ab- und Wiederaufbau der MT einen großen Einfluss auf das Transportverhalten haben könnte und somit kein klassischer Organellentransport entlang fixer Schienen existiert [82].

Eine gänzliche Vereinigung aller Beobachtungen und der aufgestellten Hypothesen ist leider nicht möglich. Der phagosomale Transport und die damit verbundene Nutzung des MT-basierten und AF-basierten Transportsystems bedarf daher noch weitergehender Untersuchungen.

2.5 Ausnutzung der Phagozytose durch Krankheitserreger

Obwohl die phagosomale Aufnahme und anschließende Reifung des Phagosomes zur Vernichtung eines internalisierten Pathogenes essentielle Bestandteile des organismuseigenen Abwehrsystems und Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunantwort sind, sind sie paradoxerweise auch ein präferiertes Ziel pathogener Invasionen. So nutzen einige Erreger das phagosomale System, um in die Wirtszelle zu gelangen und sich dort

zu replizieren, teils mit pathologischem Ausgang für die Wirtszelle und dem dazugehörigen Organismus. Dabei interagieren die Pathogene mit einem oder mehreren Schritten der Phagozytosemaschinerie, indem sie beispielsweise ihre phagosomale Reifung anhalten oder dem Phagosom entkommen [11, 20, 83]. Beispiele solch invasiver Bakterien sind *Brucella abortus*, *Chlamydia* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium* spp. oder *Salmonella* spp. [7, 11, 14, 83]. Um die Wirkungsweise solcher Pathogene zu verstehen und im Idealfall mittels Medikamenten unterbinden oder gar die Erreger vernichten zu können, ist es unerlässlich die Grundlagen der Phagosomenreifung und die Interaktion der intrazellulären Parasiten mit dem phagosomalen System detailliert zu kennen [83].

Um das phagosomale System zum eigenen Vorteil zu nutzen, aber einer Vernichtung durch die ausführende Zelle zu entgehen, haben die Erreger diverse Überlebensstrategien entwickelt. Eine Möglichkeit ist, bereits die Markierung durch Antikörper und die Internalisierung durch Phagozyten zu inhibieren. Soll aber zunächst eine Aufnahme der Parasiten stattfinden, damit diese in die Wirtszelle eindringen können, schaffen es einige von ihnen die der Internalisierung folgende Phagosomenreifung anzuhalten und abzubrechen. Dabei unterbinden sie den Austausch mit sekretorischen Vesikeln und Organellen des endozytischen Pfades, wodurch die damit korrelierten Recyclingprozesse oder Ansäuerung des phagosomalen Lumens blockiert werden [11, 20, 83]. Beispiele hierfür sind *Mycobacterium* spp. (meist kokkenförmige Krankheitserreger des Menschen & von Tieren, wie Tuberkulose oder Lepra), welches im Stadium eines zeitigen Phagosomes verbleibt, *Salmonella* spp. (gramnegative Stäbchenbakterien, Auslöser von Salmonellose), welches die Reifung erst zum Zeitpunkt der Entwicklung später Phagosome unterbricht, um eine Transition zum Phagolysosom zu verhindern oder auch *Leishmania* spp. (geißeltragende Protozoen, Erreger der Leishmaniose) [7, 11, 14, 83]. Solche Erreger werden anschließend auch von anderen immunologischen Schutzmechanismen nicht mehr detektiert und die Parasiten können teilweise bis zu mehreren Jahren in der Wirtszellen verbleiben und überleben [83]. Manche Pathogene können die phagosomale Reifung nicht nur unterbrechen, sondern ihrem eigenen Phagosom entkommen, beispielsweise durch Lysis der phagosomalen Membran und dadurch ins Zytosol gelangen. Repräsentative Vertreter solcher Erreger sind *Shigella flexneri* (gramnegative Stäbchenbakterien, u.a. Infektionskeim der Bakterienruhr), *Rickettsia prowazekii* (gramnegative Stäbchenbakterien, Überträger von Rickettsiosen, wie Fleckfieber) oder *Listeria monocytogenes* (grampositives Stäbchenbakterium, Auslöser von Listeriosen) [7, 11, 20, 83]. Eine alternative Überlebensstrategie ist die Umwandlung des erregerinkludierenden Phagosomes in eine nicht phagosomale Organelle beispielsweise durch Rekrutierung anderer Organellen und somit ein Verlassen des phagozytischen Pfades. Solche Pathogene sind beispielsweise *Legionella pneumophila* (gramnegatives Stäbchenbakterium, induziert Legionärskrankheit oder Pontiac-Fieber), welche das Phagosom durch Änderung der Membranzusammensetzung in ein dem Endoplasmatischen Retikulum ähnliches Organell zum Schutz und zur Vermehrung verwandeln oder *Chlamydia trachomatis* (parasitäres gramnegatives Bakterium, Überträger von Chlamydien), welche aus ihrem Phagosom ein einzigartiges, nicht im Wirt vorkommendes Zellkompartiment zur eigenen Replikation erstellen. Dazu zählen aber auch *Toxoplasma gondii* (bogenförmige Protozoone, Verursacher von Toxoplasmose bei Katzen), welche ebenfalls eine neue, nicht ansäuernde Organelle mit der Wirtszellenmembran ähnlichen Charakteristik bilden oder *Brucella abortus* (gramnegatives Stäbchenbakterium, Erreger der Rinderbrucellose), welche ihr Phagosom in ein Autophagosom konvertieren lässt und somit einer invasiven Immunantwort zuvorkommt und sich in der perinuklearen Region anlagert [7, 14, 83, 84]. Manche dieser Erreger können auch die Abläufe und Funktionen der Wirtszelle zu ihren eigenen Gunsten verändern und umprogrammieren. Beispielsweise blockiert *Cryptococcus neoformans* (hefeähnlicher

Pilz, Auslöser von Kryptokokkose) die Phagosomenreifung, verbleibt zunächst im Wirt, ohne Alterung oder Ansäuerung aufgrund einer defekten Membranzusammensetzung und induziert schließlich die Ausscheidung des Phagosomes aus der Wirtszelle, möglicherweise durch Konvertierung des Phagosomes in ein exozytisches Vesikel [14, 85]. Diese Sekretion des Pathogenes kann noch mehrere Stunden nach dessen Phagozytose auftreten und findet statt ohne die Wirtszelle zu eliminieren, wobei der exakte, zugrundeliegende Mechanismus unbekannt ist [86, 87]. Eine weitere Möglichkeit die phagosomale Reifung unbeschadet zu durchlaufen, ist das Überleben in einer stark sauren Umgebung innerhalb des Phagolysosomes und dem enzymatischen Unterbinden der Formation von toxischen Sauerstoffmetaboliten, die zu einer Zerstörung des Parasiten führen würden. So können sich beispielsweise *Coxiella burnetii* (gramnegatives Stäbchenbakterium, Erreger des Q-Fiebers) in den Phagolysosomen replizieren, ohne selbst verdaut zu werden [7, 11, 20].

Bereits diese Beispiele für vielfältige bakterielle Möglichkeiten den Prozess der Phagosomenreifung für eigene Zwecke auszunutzen, machen deutlich wie unerlässlich ein grundlegendes Verständnis dieses phagosomalen Reifungsprozesses ist, wobei die vorliegende Arbeit einen Beitrag zu diesem Verständnis erarbeitet.

Einordnung der vorliegenden Arbeit in die aktuelle Forschung im Bereich der Phagozytose

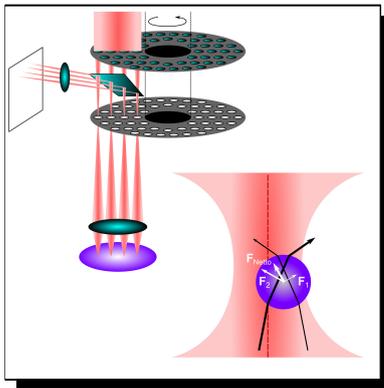
Wie in den letzten Abschnitten dargelegt wurde, ist die Erkennung, Internalisierung und Vernichtung von Fremdkörpern und Pathogenen mittels Phagozytose ein essentieller Bestandteil des Selbstschutzes von Organismen und ein wichtiges Verbindungsglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Es wurde aufgezeigt, dass unzählige Bakterien und andere Parasiten in der Lage sind das phagozytische System zu missbrauchen, um in die Wirtszelle einzudringen und anschließend die Phagosomenreifung zu stoppen oder gar das Phagosom zu verlassen und die eigene Replikation innerhalb der Wirtszelle zu realisieren. Um einen notwendigen und effektiven Schutz der Organismen vor solchen Erregern zu gewährleisten, ist es daher unerlässlich die Grundlagen und molekularen Mechanismen der bakteriellen Überlebensstrategien, ihre Adaption der Phagosomenbewegung und der phagosomalen Reifung an sich detailliert zu analysieren und zu verstehen [14, 83]. Ein essentieller Teil dieses phagosomalen Reifungsprozesses ist dabei der zentripetale Transport phagozytischer Vesikel innerhalb der Wirtszelle von der Zellperipherie zur perinuklearen Region, um diverse Fusionsprozesse mit intrazellulären endo- und exozytischen Organellen zu gewährleisten [35, 39, 42, 54, 65]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Transport als funktionell relevante Basis für die Phagosomenreifung quantitativ und qualitativ untersucht.

Die auftretenden, meist pathogeninitiierten Variationen des phagosomalen Reifungsprozesses und Abweichungen vom erwarteten Ablauf der Phagosomenalterung werden häufig auf biochemische Modulationen, ausgelöst durch internalisierte Erreger, zurückgeführt, welche die Expression von Effektorproteinen, Änderungen der Membranzusammensetzungen oder enzymatische Einflussnahme bewirken [7, 11, 14]. In dieser Arbeit sollte nun der Einfluss eines einfachen, aber fundamentalen und experimentell sehr exakt und kontinuierlich kontrollierbaren physikalischen Parameters untersucht werden, die Größe des zu internalisierenden und zu vernichtenden Erregers. Viele internationale Arbeitsgruppen beschäftigten sich dabei bereits mit dem essentiellen Einfluss der Größe, der Form und weiterer Eigenschaften des Zielobjektes auf die Erkennung und Aufnahme des Fremdkörpers durch Zellen [15–21]. Über den Einfluss der Größe des Phagosomes, definiert durch die Größe des internalisierten Pathogenes, auf den anschließenden phagosomalen Transport im Rahmen der Reifung ist bis auf die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Phagosomendimensionen und der Fusion mit Lysosomen weitgehend nur sehr wenig bekannt [15, 18]. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass Fibroblasten (bewegliche Bindegewebezellen) einen intrazellulären Sortiermechanismus ausbilden, welcher dafür sorgt, dass bei einer sehr umfangreichen Aufnahme von Fremdkörpern unterschiedlicher Abmessungen große Phagosome in der perinuklearen Region angelagert werden und kleine Phagosomen in der Zellperipherie [88]. Bezüglich der untersuchten Phagosomen wurde sich in dieser Arbeit an den typischen, charakteristischen Dimensionen weit verbreiteter bakterieller Erreger orientiert [17, 35]. Die Größe repräsentativer Bakterien variiert dabei zwischen sehr kleinen Pathogenen wie beispielsweise *Brucella abortus* mit einer Ausdehnung von 1-2 μm und sehr großen Pathogenen wie beispielsweise *Cryptococcus neoformans* mit Abmessungen größer als 4 μm [89, 90]. Außerdem ist bereits bekannt, dass Bakterien mit einer maximalen Ausdehnung von 1-3 μm zu einer optimalen Anbindungs- und Internalisierungsrate führen [16–18, 35]. Der Größenbereich von 1-3 μm wurde infolgedessen als relevantes Spektrum der Erregerdimension für die Betrachtungen in dieser Arbeit festgelegt.

Auch bezüglich des Zusammenhanges zwischen Phagosomengröße und der dem phagosomalen Transport zugrundeliegenden molekularen Transportsysteme gibt es nur lückenhafte und wenig zufriedenstellende Erkenntnisse. Bereits seit 1989 gibt es Hinweise darauf, dass der genutzte Transportmechanismus nicht unabhängig von der Größe der Phagosomen selektiert wird, wobei aber noch viele Fragen offen blieben [10, 39]. Auch das Zusammenspiel MT- oder AF-basierter Motilität sowie die Übergänge zwischen den Transportsystemen oder Einflüsse externer Faktoren oder anderer Transportvariablen sind noch weitgehend unklar [10, 61]. Analog dazu ist bekannt, dass Recycling und Rücktransport von Antigenen aus dem phagosomalen Lumen zurück in Richtung der Zellperipherie stattfindet und durch AF-basierte Motilität gefördert wird. Aber die Adaption solch exozytischer Pfade während des phagosomalen Reifungsprozesses sowie die Transportwege für Antigen-MHC-Verbindungen (vor allem für MHC I) zurück an die Membranoberfläche sind nur teilweise verstanden [7, 10, 29, 59, 70, 74].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich dahingehend mit offenen Fragen bezüglich des Einflusses einer simplen, experimentell selektiv kontrollierbaren, physikalischen Eigenschaft der Phagosomen auf die phagosomalen Transporteigenschaften während der Phagosomenreifung. Als essentielle physikalische Eigenschaft aller Phagosomen wurde in dieser Arbeit die Phagosomengröße untersucht, welche im Rahmen typischer Bakteriendimensionen variiert wurde. Neben der Charakterisierung repräsentativer Transporteigenschaften wurden auch die zugrundeliegenden molekularen Transportsysteme studiert, um Ursachen und Wirkungen der Phagosomengröße auf den Phagozytosemechanismus darlegen und verstehen zu können.

Möglichkeiten & Methoden zur Initiierung, Beobachtung & Manipulation phagosomaler Prozesse in Makrophagen



Dieses Kapitel erläutert die theoretischen Grundlagen der in dieser Arbeit verwendeten Messmethoden sowie diverse Möglichkeiten der Visualisierung der Zellen bzw. intrazellulärer Strukturen und einige Optionen zur Manipulation der zu beobachtenden Objekte und Prozesse. Dazu erfolgt zunächst eine Einführung in eine Auswahl der vielfältigen Methoden der optischen Mikroskopie inklusive der Fluoreszenzmikroskopie sowie die Vorstellung zweier spezieller Arten von Mikroskopaufbauten. Anschließend wird die Visualisierung der Zellen um die Option der Elektronenmikroskopie erweitert. Im darauf folgenden

Teil werden die genutzten Methoden genauer charakterisiert, beginnend mit der Funktionsweise einer optischen Falle, über Möglichkeiten der Phagozytoseinitiierung mittels Latexpartikeln und Opsonisierung dieser bis hin zur Manipulation intrazellulärer Prozesse durch die Zugabe diverser Medikamente.

4.1. Optische Mikroskopiemethoden	36
4.2. Elektronenmikroskopie	41
4.3. Optische Pinzetten	42
4.4. Polystyrolpartikel und Opsonisierung	45
4.5. Medikamente zur Manipulation intrazellulärer Prozesse	45

Die im folgenden Abschnitt dargelegte Beschreibung diverser optischer Mikroskopiemethoden bietet lediglich eine Auswahl und beschränkt sich auf in dieser Arbeit verwendete Techniken. Die bereits etablierten theoretischen Grundlagen entsprechen den zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit gängigen Lehrbuchmeinungen beispielsweise nach [91–93].

4.1 Optische Mikroskopiemethoden

Aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens des menschlichen Auges ist die Mikroskopie ein essentiell notwendiger Bestandteil bei der Untersuchung von zellulären biologischen Proben. Die optische Mikroskopie ermöglicht die Projektion einer vergrößerten Abbildung eines Objektes auf das menschliche Auge oder eine Kamera, welche mittels geschickter Anordnung diverser Linsensysteme erzeugt wird. Im einfachsten Fall handelt es sich dabei um zwei Sammellinsen, einer objektnahen Linse, dem Objektiv, und einer dem Auge oder Kamera zugewandten Linse, dem Okular. Das Objektiv erzeugt ein möglichst stark vergrößertes, reelles, umgedrehtes Zwischenbild im ersten Brennpunkt des Okulars, welches daraufhin mittels parallel austretender Lichtstrahlen vom Okular als im Unendlichen befindlich abgebildet wird [91, 92]. Alternativen zur optischen Mikroskopie bilden die Elektronenmikroskopie, bei welcher eine Steigerung des Auflösungsvermögens durch die geringere Wellenlänge der Elektronenstrahlung gegenüber dem Licht erreicht wird, und die Rastersondenmikroskopie, bei welcher die Bildgebung durch Wechselwirkung zwischen einer Sonde und der Probe erzeugt wird [94, 95].

Hellfeldmikroskopie. Bei dieser Mikroskopietechnik handelt es sich um die vermeintlich einfachste Form der optischen Mikroskopie, bei welcher das Präparat von einer geeigneten Lichtquelle durchleuchtet wird. Im Allgemeinen würde eine Verkürzung des Abstandes zwischen abzubildendem Objekt und Brennebene des Objektivs zu einer Verbesserung der Vergrößerung führen. Neben einer technischen Begrenzung durch die damit verbundene Reduzierung der Lichtintensität, einer relativ großen Tubuslänge des Mikroskops (Abstand zweiter Brennpunkt Objektiv und erster Brennpunkt Okular) sowie einem Anwachsen diverser Abbildungsfehler erfolgt auch eine Begrenzung der möglichen Vergrößerung durch das Auflösungsvermögen des Mikroskops, auch bezeichnet als Abbe-Limit [91, 92, 96]. Aufgrund der Welleneigenschaften des Lichtes und dem damit verbundenen Auftreten von Beugungseffekten erzeugt ein leuchtender Objektpunkt (bei Beugung an einer kreisrunden Apertur) in der Bildebene eine Beugungsfigur in Form von Scheibchen. Diese Beugungsfigur entspricht der Airy-Funktion, der durch die Linsen bedingten Fouriertransformation der Aperturfunktion. Grundlegend wird diese Funktion (bei einer beliebigen Lichtquelle) durch die sogenannte Punkt-Spreizfunktion (engl. *point-spread-function*) beschrieben. Bei zwei Punktlichtquellen statt einer können ihre Abbildungen separiert werden, wenn ihre Beugungsfiguren nicht vollständig verschmelzen. Nach Rayleigh lässt sich zur Definition einer Grenze für den möglichen Grad der Verschmelzung ein kritischer Winkel definieren, unter welchem das zentrale Beugungsmaximum der ersten Quelle mit dem ersten Beugungsminimum der zweiten Quelle zusammenfällt und beide Quellen noch differenziert werden können [91–93]. Darauf basierend versteht man unter dem Auflösungsvermögen den minimalen Abstand den zwei Lichtquellen haben können, um noch als Einzelobjekte abgebildet zu werden. Das Auflösungsvermögen wird angegeben als $x_{\min} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA}$, wobei $NA = n \cdot \sin \alpha$ als die Numerische Apertur des Objektivs (Vermögen Licht zu fokussieren) definiert ist und α dem halben Öffnungswinkel des Objektivs, n dem Brechungsindex und λ der Lichtwellenlänge entspricht [91]. Daraus folgt, dass das Auflösungsvermögen durch

die Verwendung einer höheren NA , eines Immersionsmediums oder einer geringeren Wellenlänge verbessert werden kann.

Handelt es sich statt der Abbildung von Lichtquellen um kohärent beleuchtete Objektpunkte (wobei jeder Objektpunkt Quelle einer kugelförmigen Huygens-Sekundärwelle als Streuwelle ist), muss von dem Beugungsmuster ihrer Streuwellen neben dem Maximum 0. Ordnung mindestens auch das 1. Minimum vom Objektiv erfasst werden, um die beiden Lichtquellen differenzieren zu können (Abbe Theorie) [91, 92]. Das daraus resultierende Auflösungsvermögen ergibt sich zu $x_{\min} = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$ für den minimalen Abstand x_{\min} der beiden beleuchteten Objekte [92].

Ein häufig bei biologischen Proben auftretendes Problem ist allerdings nicht das zu geringe Auflösungsvermögen des Mikroskops, sondern ein zu geringer Kontrast diverser Strukturen der Probe. Zur Verbesserung des Kontrastes wird die Hellfeldmikroskopie teils mit gefärbten Präparaten durchgeführt, wobei die Anfärbung häufig eine Fixierung der Zellen erfordert und somit die Beobachtung lebender Organismen ausschließt [92].

DIC-Mikroskopie. Die Differential- Interferenz- Kontrastmikroskopie (DIC) bietet eine Möglichkeit auch lebende Zellen mit einer hohen Kontrastgebung zu visualisieren. Es handelt sich dabei um eine Mikroskopietechnik, welche die Phasenverschiebung des Lichtes durch das Objekt (basierend auf Brechungseffekten) ausnutzt. Das grundlegende Prinzip dabei ist mittels Interferenz die Differenz der optischen Weglänge zweier benachbarter Strahlen (Versatz beider Lichtstrahlen unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops) zu ermitteln und zu visualisieren. Dazu wird das einfallende Licht zunächst linear polarisiert, anschließend auf zwei senkrecht zueinander polarisierte Teilstrahlen aufgespalten und auf das Objekt fokussiert. Beim Durchlaufen des Objektes kommt es zu einer Phasenverschiebung des gebeugten Lichtes. Anschließend erfolgt eine Rekombination beider Teilstrahlen, Angleichung der beiden Polarisationsrichtungen und Entstehung der Interferenzen. Dadurch werden auftretende Phasendifferenzen in eine Modulation der Amplituden umgewandelt und unterschiedliche optische Weglängen resultieren in Helligkeitsunterschieden und somit in einer kontrastreichen Bildgebung. Mögliche Ursachen optischer Weglängenunterschiede können dabei variierende Dicken des Objektes oder aber auch Veränderungen des Brechungsindex sein [97].

Eine alternative Methode zur Erhöhung des Kontrastes bietet die Phasenkontrastmikroskopie, eine Methode, welche ebenfalls die Phasenverschiebung optischer Wellen beim Durchgang durch Medium in Abhängigkeit von dessen Brechungsindex ausnutzt. Sie wandelt durch Manipulation in der ersten Fourierebene der Abbildung beugungsinduzierte Phasenverschiebungen in Amplitudendifferenzen um [92, 97].

Fluoreszenzmikroskopie. Auch mittels Fluoreszenzmikroskopie ist eine Verbesserung des Kontrastes zur gezielten Visualisierung konkreter Objektstrukturen möglich. Im Vergleich zur herkömmlichen Mikroskopie, welche auf der Detektion transmittierten, gebeugten, gestreuten oder reflektierten Lichtes einer externen Lichtquelle basiert, werden bei der Fluoreszenzmikroskopie Objektstrukturen selbst als Lichtquelle genutzt [97].

Fluoreszenz ist dabei ein photophysikalischer Prozess und bezeichnet den strahlenden Übergang von vibronischen Niveaus eines elektronischen Anregungszustandes eines Moleküls in die vibronischen Niveaus des Grundzustandes unter Erhaltung der Multiplizität (Übergänge zwischen Zuständen identischer Spinquantenzahlen der Elektronen). Die Zufuhr der Energie zum Erreichen des elektronischen Anregungszustandes erfolgt zunächst durch Absorption eines Photons. Dabei wird ein von der Frequenz des eingestrahlteten Lichtes abhängiger Übergang zwischen zwei elektronischen Zuständen eines Moleküls inklusive

der zugehörigen Schwingungs- und Rotationszustände induziert, welcher dem Lambert-Beerschen Gesetz folgt (Absorption von Licht in Molekülen). Diese Übergänge basieren dabei auf dem Franck-Condon Prinzip, d.h. vibronische Übergänge zwischen Elektronenzuständen, bei denen sich der Kernabstand nicht ändert, sind wahrscheinlicher als andere Übergänge unter der Annahme, dass der Übergang der Elektronen schneller stattfindet als Änderungen des Kernabstandes während der Anregung. Nach der Anregung erfolgen zunächst im allgemeinen Prozesse der inneren Umwandlung (engl. *internal conversion*), strahlungslose Prozesse, bei welchen Teile der Anregungsenergie mittels Schwingungs- oder Rotationsquanten an die Umgebung abgegeben werden. Das Elektron sinkt dabei in den tiefsten elektronischen Anregungszustand ab. Das anschließende Absinken des Elektrons aus dem tiefsten Anregungszustand in den Grundzustand erfolgt mittels strahlendem Übergang, d.h. der Abgabe der Anregungsenergie an die Umgebung durch Emission eines Photons und gehorcht dabei ebenfalls dem Franck-Condon Prinzip sowie den Kasha-Regeln (Photonenemission eines Moleküls in kondensierter Phase im Allgemeinen nur aus dem tiefsten Anregungszustand heraus, unabhängig der Anregungswellenlänge). Eine Folge dessen ist die sogenannte Stokes-Verschiebung der Anregungswellenlänge hin zu einer größeren Wellenlänge (also geringerer Energie) der Emission. Aufgrund der Aufteilung des Grundzustandes und des Anregungszustandes in diverse Unterzustände können nicht nur konkrete Photonenenergien absorbiert und emittiert werden, sondern als Absorptions- und Emissionsspektren bezeichnete, limitierte Bandbreiten ähnlicher Energiegehalte. Da es sich bei der Fluoreszenz um einen erlaubten quantenmechanischen Prozess handelt (keine Spinumkehr während des Überganges), ist seine Lebensdauer meist auf wenige Nanosekunden beschränkt. Die Effektivität der Fluoreszenz wird durch die Quantenausbeute, dem Verhältnis von absorbierten Quanten zu emittierten Quanten, charakterisiert. Ein anderer Prozess, bei welchem es zur Emission von Photonen kommt, mit einer längeren Abklingdauer und einer deutlich reduzierten Wahrscheinlichkeit ist die Phosphoreszenz, basierend auf dem Verbot von Spin-Umklappvorgängen bei optischen Übergängen und deren Realisierung durch Interkombination (in der Molekülphysik auch engl. *Intersystem Crossing*) [94, 95].

Im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie unterscheidet man in Objekte, welche in der Lage sind aufgrund von Anregung durch ein konkretes Spektrum Photonen zu emittieren, auch als autofluoreszent bezeichnet, und in Objekte, bei denen das zusätzliche Einbringen von Farbstoffen (Fluorochrome oder Fluorophore) notwendig ist, welche zur Emission von Photonen in der Lage sind. Da diese Farbstoffe ein spezifisches Anregungs- und Emissionsspektrum aufweisen, ist das Einbringen mehrerer, diverser Farbstoffe mit unterschiedlicher Zielstrukturaffinität in ein Objekt möglich, was eine essentielle Rolle bei der Nutzung der Fluoreszenzmikroskopie spielt. Generelle Voraussetzungen für das Einbringen von Farbstoffen in eine biologische Probe sind dabei die spezifische Bindungsaffinität der Fluorochrome bezüglich diverser biologischer Zielstrukturen und ihr Einfluss auf deren Funktionalität. Beispielsweise sollte die Ankopplung eines Farbstoffmoleküls an intrazelluläre Filamente oder Motoren keinen Einfluss auf die Funktion und Agilität der Zielstruktur nehmen. Auch spielen die photophysikalischen Eigenschaften der Fluorochrome eine grundlegende Rolle, wobei eine hohe Quantenausbeute in Kombination mit einer geringen Phototoxizität zu bevorzugen ist. Die Anregung der Probe und Detektion des von der Probe emittierten Lichtes erfolgt bei einem Fluoreszenzmikroskop in der Regel in identischer Richtung. Die Trennung zwischen Anregungs- und Emissionsspektrum erfolgt mittels dichroitischen Spiegel und für beide Spektren spezifischen Filtern unter Ausnutzung der Stokes-Verschiebung zwischen Anregungs- und Emissionswellenlängen [98].

Konfokale Mikroskopie. Ein konfokales Mikroskop verbindet die sehr gute Auflösung in der x-y-Ebene der Probe eines Weitfeldmikroskops (*klassisches* Mikroskop, mit gleichzeitiger Beleuchtung aller Punkte) mit einer ebenfalls hohen Auflösung in z-Richtung der Probe. Vor allem im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie ist eine optimierte Auflösung in z-Richtung notwendig, da es zu einer Anregung aller im Strahlenverlauf des Anregungslichtes befindlichen Fluorochrome kommt. Dies resultiert in einer Überlagerung des emittierten Lichtes aus der Objektebene, auf welche fokussiert wird, mit emittiertem Licht aus den außerfokalen Objektebenen, welche anschließend bei herkömmlichen Mikroskopen ebenfalls detektiert wird. Diese Überlagerung und der damit inkludierten Erhöhung der Streulichtdetektion führt zu einem Verrauschen der Fluoreszenzaufnahme und somit zu einer Abnahme des Bildkontrastes. Bei einem konfokalen Mikroskop erfolgt eine Unterdrückung der Bildinformation aus Ebenen, die außerhalb des gewünschten Fokus liegen und somit eine Verbesserung des Kontrastes sowie der Tiefendiskriminierung [91, 97].

Eine technische Realisierung der Diskriminierung von Licht, welches von außerhalb der gewünschten Fokusebene emittiert wird, erfolgt durch Einbringen einer Lochblende in den Detektionsstrahlengang, siehe hierzu auch Abbildung 4.1A. Bei den meisten konfokalen Mikroskopen handelt es sich um Auflichtmikroskope, d.h. Anregung und Detektion erfolgen über das Objektiv und Teile beider Strahlengänge sind identisch. Das zur Anregung genutzte Licht entstammt aufgrund hoher benötigter Intensität meist einem Laser und wird zunächst auf eine Lochblende (engl. *pinhole*) zur Erzeugung einer punktförmigen Lichtquelle und anschließend mittels Objektiv auf ein Volumen innerhalb des zu betrachtenden Objektes fokussiert. Das aus diesem fokalen Volumen zurückgestreute oder emittierte Licht wird mittels Objektiv auf eine zweite Lochblende innerhalb des mittels dichroitischem Spiegel vom Emissionsstrahlengang getrennten Detektionsstrahlenganges fokussiert. Mittelpunkt der Lochblende und Beleuchtungspunkt innerhalb des Objektes sind gleichzeitig im Fokus und somit konfokal zueinander. Das Licht, welches die zweite Lochblende passiert, wird anschließend von einem Detektor registriert. Licht, welches von Regionen außerhalb des fokussierten Objektvolumens stammt, wird nicht auf die zweite Lochblende fokussiert. Somit erreicht nur eine geringe Lichtintensität aus diesen Regionen den Detektor, was in einer Abschirmung dieser Regionen bei der Detektion resultiert. Dies ermöglicht neben der Beleuchtung einzelner konfokaler Volumina des Objektes und somit einer schonenden Anregung fluoreszenter Proben auch eine selektive Ebenendetektion in z-Richtung der zu betrachtenden Objekte in Kombination mit postprozessiven Erstellungen dreidimensionaler Abbildungen der Präparate. Ein Abtasten oder -rastern der Probe, d.h. eine aufeinanderfolgende Beleuchtung konfokaler Volumina zur Erstellung eines vollständigen Abbildes des Objektes, erfolgt in z-Richtung durch Verschiebung des Objektes sowie in x-y-Richtung ebenfalls durch Verschiebung des Objektes oder Variation des Fokus der anregenden Punktlichtquelle mittels rotierendem Spiegel. Das konfokale Volumen kann durch eine Verringerung des Durchmessers der Lochblende reduziert werden, ist jedoch durch Beugungseffekte limitiert [91, 97, 99].

Drehscheibenmikroskopie. Die Drehscheibenmikroskopie (engl. *Spinning Disk Confocal Microscopy*) ist eine Erweiterung der konfokalen Mikroskopie, welche eine gleichzeitige Beleuchtung mehrerer Fokusvolumen in einer x-y-Ebene ermöglicht. Als Lichtquelle dient dazu der aufgeweitete Strahl eines Lasers, welcher statt fokussiert auf eine Lochblende auf eine Lochmaske gelenkt wird, einer spiralförmigen Anordnung mehrerer kleiner Löcher in einer Ebene, wodurch mehrere parallele Punktlichtquellen (oder auch konfokale Ministrahlen) erzeugt werden. Auch die Lochblende im Detektionsstrahlengang muss entsprechend durch eine identische Lochmaske oder durch einzelne Pixel einer Kamera ersetzt werden.

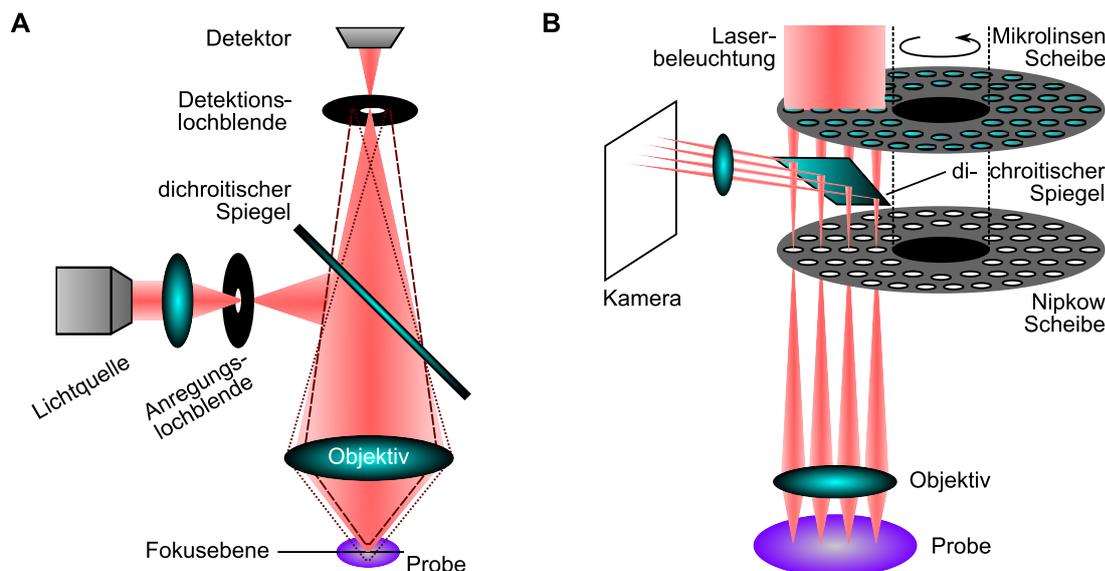


Abbildung 4.1. Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskops und dessen Erweiterung zu einem Drehscheibenmikroskop. Die Abbildung (A) zeigt den schematischen Aufbau eines konfokalen Mikroskops. Das von einer Lichtquelle emittierte Licht wird zunächst auf eine Lochblende im Anregungsstrahlengang und anschließend mittels Objektiv auf die Probe fokussiert. Aus diesem Fokusvolumen emittiertes Licht wird mittels Objektiv auf eine zweite Lochblende im Detektionsstrahlengang fokussiert. Anregungs- und Detektionsstrahlengang sind durch einen dichroitischen Spiegel entkoppelt. Nur Licht aus dem fokalen Volumen des Objektes gelangt durch die Detektionslochblende auf den Detektor. Licht, welches außerfokalen Objektebenen entstammt, kann die zweite Lochblende nicht passieren. Grafik (B) zeigt eine Variante des konfokalen Mikroskops, bei dem mehrere Lochblenden spiralförmig auf einer rotierenden Scheibe (Nipkow Scheibe) angeordnet sind und gleichzeitig beleuchtet werden. Dadurch können mehrere Objektpunkte simultan beleuchtet werden. Als Detektionslochblende dient die gleiche Scheibe. Um Verluste der Beleuchtungsintensität an der Nipkow Scheibe zu reduzieren, erfolgt eine Fokussierung des einfallenden Lichtes auf die Lochblenden mittels analoger Scheibe mit eingesetzten Mikrolinsen anstelle der Lochblenden, welche simultan rotiert. Diese Mikroskopvariante wird auch als Drehscheiben- oder *Spinning Disk* Mikroskop bezeichnet. Abbildung nach [98,99].

Dies ist dargestellt in Abbildung 4.1B. Um eine vollständige Abrasterung der Probe zu gewährleisten, hat sich eine Lochmaske in Form einer rotierbaren Scheibe (mit spiralförmig angeordneten Löchern), auch Nipkow Scheibe genannt, bewährt. Um die geringe transmittierte Intensität des Anregungslichtes nach der Scheibe zu kompensieren, erweiterte die Firma Yokogawa die Anordnung um eine mit Mikrolinsen besetzte Scheibe im Anregungsstrahlengang vor der Nipkow Scheibe, wobei die Rotation beider Scheiben synchron erfolgt. Diese linsenbesetzte Scheibe fokussiert das einfallende Licht auf die Löcher der Nipkow Scheibe und steigert somit die Transmission des Lichtes, während ein signifikanter Abstand zwischen den einzelnen Löchern erhalten bleibt, welcher der Vermeidung von Interaktionen der einzelnen Minustrahlen miteinander dient. Als Lochmaske im Detektionsstrahlengang wird die gleiche Nipkow Scheibe genutzt. Bei der Verwendung dieser Anordnung für die Fluoreszenzmikroskopie erfolgt die Auskopplung des Detektionsstrahlenganges mittels dichroitischem Spiegel zwischen Mikrolinsenscheibe und Nipkow Scheibe. Die parallele Beleuchtung mehrerer Objektregionen ermöglicht eine präparatschonende und zeitoptimierte Abbildung des Objektes, was bei biologischen Proben und insbesondere bei *in-vivo* Messungen von großem Nutzen ist [98,99].

4.2 Elektronenmikroskopie

Neben der optischen Mikroskopie und der Verwendung von Photonen zur Analyse von Objektstrukturen können auch beschleunigte, geladene Teilchen zur Untersuchung von Materie verwendet werden, beispielsweise Elektronen. Bereits Louis de Broglie konnte zeigen, dass jedem Teilchen der Masse m und der Geschwindigkeit v eine Welle mit der Wellenlänge $\lambda = \frac{h}{mv}$ zugeordnet werden kann [100]. Die Verwendung von Elektronen führt aufgrund der deutlich geringeren Wellenlänge von Elektronen ($1 \cdot 10^{-3}$ bis $3 \cdot 10^{-3}$ nm) im Vergleich zu Photonen im Bereich des sichtbaren Lichtes (400 bis 700 nm) zu einer signifikanten Verbesserung des Auflösungsvermögens, welches sich, wie in Kapitel 4.1 dargelegt, in der Größenordnung der Wellenlänge bewegt. Die konkrete Wellenlänge der für die Elektronenmikroskopie verwendeten Elektronen hängt von der angelegten Beschleunigungsspannung (typischerweise in der Größenordnung ~ 100 keV) ab, wobei die Elektronengeschwindigkeit Werte erreicht, bei denen bereits eine relativistische Beschreibung der Geschwindigkeit erfolgt. Die erreichte Auflösung liegt im Subnanometerbereich und wird durch auftretende Aberrationen der elektronenoptischen Bauteile limitiert anstatt wie bei optischen Mikroskopen durch die Beugung des einfallenden Lichtes [93,94,100]. Einer der Pioniere auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie war Ernst Ruska, welchem 1986 anteilig der Nobelpreis für Physik aufgrund seiner Erforschung der Grundlagen der Elektronenoptik und dem Design des ersten Elektronenmikroskops verliehen wurde [94,101].

Die Basis eines typischen Elektronenmikroskops bildet eine Elektronenquelle oder -kanone in Form eines beheizten Metallfadens. Aufgrund der starken Wechselwirkung zwischen Elektronen und Materie ist eine freie Ausbreitung der Elektronen nur im Vakuum möglich. Emittierte Elektronen werden anschließend mittels Potenzialdifferenz stark beschleunigt und mit der Hilfe von elektromagnetischen Feldern zu einem Strahl gebündelt, parallel ausgerichtet, abgelenkt oder fokussiert, ähnlich wie dies bei einem Lichtmikroskop mit Photonen durch optische Linsen realisiert wird. Anschließend erfolgt eine Bestrahlung des Zielobjektes und eine Detektion der Elektronen. Die Bildentstehung basiert dabei auf der Wechselwirkung der beschleunigten, einfallenden Elektronen mit den lokalisierten Ladungen der Atomkerne und ihren Elektronenhüllen entsprechend den vorherrschenden Coulombkräften. Daraus resultiert eine Ablenkung oder ein Abbremsen der hochenergetischen Primärelektronen durch elastischer, auf Wechselwirkung mit den Elektronen basierender, oder unelastischer, auf Wechselwirkung mit dem Kern basierender, Streuprozesse, wobei nur bei ersterem ein Energietransfer stattfindet [93,94].

Es wird grundlegend unterschieden in Elektronenmikroskope, welche auf Reflexionsgeometrien basieren und mit Signalen von der Oberfläche der Zielobjekte arbeiten, oder Mikroskope, welche dünne Schichten der Zielobjekte bestrahlen und transmittierte Elektronen detektieren. Eine weitere Unterscheidung von Elektronenmikroskopen erfolgt in konventionelle Mikroskope und Rasterelektronenmikroskope. Konventionelle Mikroskope basieren auf einem festen Strahl und der Anordnung der Detektionsoptiken nach der Probe, was die simultane Betrachtung großer Objektbereiche ermöglicht. Rasterelektronenmikroskope werden realisiert durch einen fokussierten, beweglichen Elektronenstrahl, der die Probe abtastet. Häufig praktisch genutzte Arten von Elektronenmikroskopen sind darauf aufbauend das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) und das Rasterelektronenmikroskop (REM, oder engl. *scanning electron microscope*, SEM). Bei dem TEM erfolgt die Detektion von Primärelektronen, welche dünne Objektschichten passiert haben. Bei dem REM hingegen werden neben stark gestreuten Primärelektronen (Rückstreuelektronen) auch durch einen fokussierten Elektronenstrahl an der Objektoberfläche (oder einer dünnen Schicht darunter) herausgelöste Sekundärelektronen detektiert. Rückstreuelektronen enthalten dabei Informationen über die

Materialzusammensetzung des Objektes, wohingegen Sekundärelektronen Auskunft über die Oberflächentopographie der Probe geben, basierend auf dem kausalen Zusammenhang zwischen der Entstehungswahrscheinlichkeit der Sekundärelektronen und der Orientierung ihrer Austrittsfläche zur Richtung des einfallenden Elektronenstrahles. Mittels REM können also die Oberflächenstrukturen und Zusammensetzungen größerer Objekte analysiert werden. Im Vergleich zur optischen Mikroskopie ist für die Nutzung des Elektronenmikroskops eine vorausgehende Probenpräparation notwendig. Je nach verwendeter Mikroskopieart muss das Zielobjekt zunächst mit einer leitfähigen Schicht überzogen oder in dünne Schnitte gebracht werden und sollte in einer materiefreien Umgebung keine irreversiblen Schädigungen davontragen [93, 94, 97, 100, 101].

4.3 Optische Pinzetten

Basierend auf dem Strahlungsdruck des Lichtes stellten 1986 Askin und Kollegen die erste optische Falle für dielektrische Partikel mittels eines Lichtstrahles vor [102, 103]. Sie entwickelte sich im Laufe der Jahre zu einem essentiellen Werkzeug für die gezielte Manipulation biologischer Proben und es etablierten sich eine Vielzahl diverser Anwendungsmöglichkeiten [104]. Eine optische Falle ermöglicht ein Objekt mittels stark fokussiertem Licht präzise und hoch selektiv ortsfest zu halten, ähnlich einer mechanischen Pinzette, dieses zu manövrieren und Kräfte darauf auszuüben. Dabei können neben dielektrischen Partikeln auch lebende Bakterien oder Viren als Objekte dienen [103, 105]. Die Auflösung der Kräfte liegt dabei im Piconewtonbereich, die Größenordnung der zu fangenden Objekte liegt im Mikrometerbereich und die Präzision der Positionsbestimmung der Objekte ließ sich auf Subnanometer reduzieren [103, 106]. Die Positionierung der Objekte ist in allen drei Raumrichtungen möglich und lässt sich in diversen, wasserähnlichen Medien sowie in Luft durchführen. Für kleine Auslenkungen sphärischer Partikel aus der Ruhe- oder Fangposition der optischen Falle folgt die auf das Objekt wirkende, rückstellende Kraft dem Hookschen Gesetz ($F_{\text{Falle}} = \kappa_{\text{Falle}} \cdot x$, mit der charakteristischen Fallensteifigkeit κ_{Falle}), d.h. sie ist proportional zur Auslenkung x , wodurch eine Nutzung der optischen Pinzette zur optischen Kraftspektroskopie ermöglicht wird.

Die Grundlage für eine optische Falle bietet ein stark fokussierter Laserstrahl, meist erreicht durch ein Mikroskopobjektiv mit hoher Numerischer Apertur [97, 103]. Durch die Fokussierung entsteht ein Maximum des zeitlich gemittelten elektrischen Feldes in Kombination mit einem sehr hohen Feldgradienten innerhalb der Strahltaille bzw. des Brennpunktes [97]. Aufgrund der Impulsübertragung bei der Absorption und Streuung einfallender Photonen an einem dielektrischen Partikel in Fokuspnähe erfährt das Partikel eine Kräfteinwirkung. Vereinfacht lässt sich diese Kraft in zwei Komponenten separieren: eine Streukraft in Ausbreitungsrichtung des einfallenden Lichtes und eine Gradientenkraft in Richtung des räumlichen Intensitätsgradienten, wobei beide Kraftkomponenten auf identischen physikalischen Grundlagen basieren [103, 105]. In den meisten Fällen dominiert die Streukraft oder auch Strahlungsdruck (basierend auf der Impulsübertragung und -erhaltung), welche das zu fangende Objekt (meist sphärische Partikel) in Ausbreitungsrichtung des Lichtes drückt. Bei einem stark fokussierten Laserstrahl kann allerdings im Bereich des beugungslimitierten fokalen Volumens die Gradientenkraft die Streukraft ausgleichen und eine stabile Fangposition eines dielektrischen Partikels erreicht werden [103]. Die Gradientenkraft basiert dabei auf laserinduzierten, fluktuierenden Dipolen innerhalb des dielektrischen Partikels, entstanden durch Interaktion mit dem inhomogenen elektrischen Feld des einfallenden Lichtes. Die exakte theoretische Charakterisierung einer optischen Falle ist umfangreich, kann aber anhand zweier Grenzfälle vereinfacht dargelegt

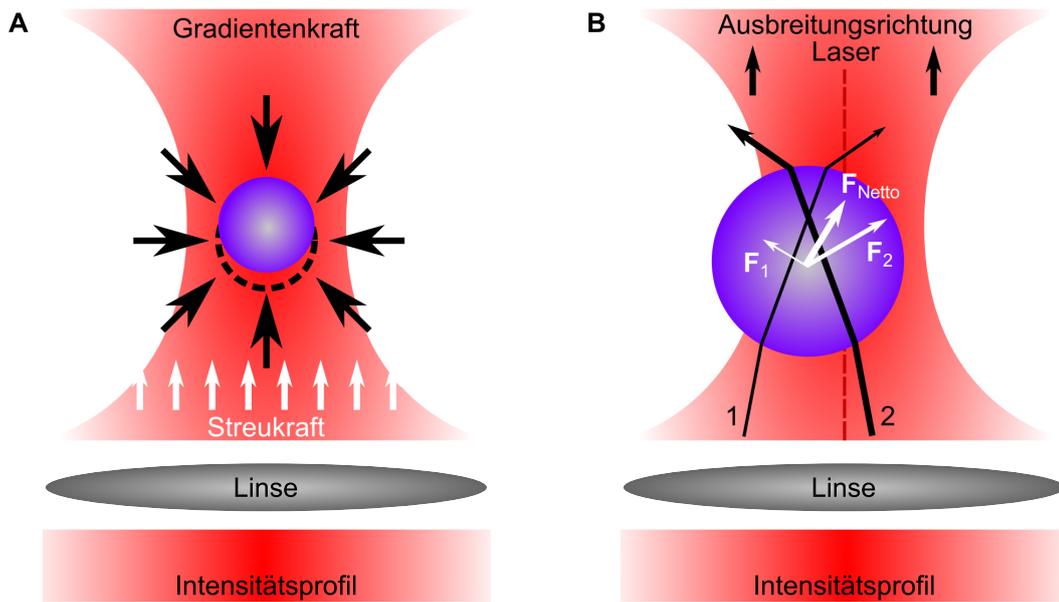


Abbildung 4.2. Wirkende Kräfte auf ein sphärisches Partikel in einer optischen Falle. Die Abbildung zeigt die wirkenden Kräfte auf ein sphärisches Partikel (violett), welches mittels optischer Pinzette (fokussierter Laserstrahl, rot) gehalten wird, in Abhängigkeit des für die Herleitung der Kräfte genutzten Regimes. Grafik (A) zeigt den Grenzfall, dass der Partikelradius deutlich kleiner ist als die Wellenlänge des zur Erzeugung der Falle verwendeten Laserlichtes und das Partikel als Punktdipol in einem inhomogenen elektrischen Feld angenommen werden kann. Zwei wesentliche Kräfte beeinflussen die Position des Partikels: die Streukraft, wirkend in Ausbreitungsrichtung des Lichtes, und die Gradientenkraft, proportional zur Polarisierbarkeit des dielektrischen Partikels und dem optischen Intensitätsgradienten. Kann die Gradientenkraft die Streukraft ausgleichen, liegt eine stabile Fangposition für das Partikel vor, welche aufgrund der Wirkungsrichtung der Streukraft leicht in Ausbreitungsrichtung des Laserstrahls gegenüber dem Fokuspunkt verschoben ist. Grafik (B) zeigt den Grenzfall, dass der Partikelradius signifikant größer ist als die Wellenlänge des Fallenlasers, wodurch sich die wirkenden Kräfte anhand der klassischen Strahlenoptik verdeutlichen lassen. Die Basis der Kräfte (F_1 & F_2) bilden Impulsänderungen aufgrund der Brechung des einfallenden Lichtes (exemplarische Strahlen 1 & 2) bei der Transmission des Partikels. Dabei induzieren intensivere Strahlen (dicker Pfeil, Strahl 2) eine stärkere Impulsänderung und daraus folgend eine größere Kraft (F_2), welche der Impulsänderung entgegen gerichtet ist. Befindet sich das Partikel außerhalb des Laserfokus können sich die auftretenden Kräfte nicht ausgleichen und es tritt eine Nettokraft auf (F_{Netto}), welche zum Fokus hin gerichtet ist. Bei Kräftegleichgewicht ist eine stabile Fangposition erreicht. Abbildung nach [103, 107].

werden [102, 103, 105].

Für den Fall, dass das gefangene dielektrische Partikel deutlich kleiner ist als die Wellenlänge des zur Erzeugung der optischen Falle verwendeten Lichtes, kann die auf das Partikel erzeugte Kraft mittels elektrischer Dipolnäherung beschrieben werden. Es werden die Bedingungen für die Rayleigh Streuung erfüllt und das Partikel kann als Punktdipol in einem inhomogenen elektrischen Feld angenommen werden [102, 103]. Die Kraft auf eine einzelne Ladung in einem elektromagnetischen Feld ist beschrieben durch die Lorentz Kraft und kann hier durch Einsetzen zweier Terme für das elektrische Feld, eines für jede Ladung (identischer Betrag der Ladungen aber entgegengesetzte Vorzeichen), und der Polarisation des Dipols \mathbf{p} ergänzt werden. Daraus folgt für die auf das Partikel wirkende Kraft:

$$\mathbf{F} = (\mathbf{p} \cdot \nabla)\mathbf{E} + \frac{\partial \mathbf{p}}{\partial t} \times \mathbf{B}$$

mit dem elektrischen Feld \mathbf{E} und dem magnetischen Feld \mathbf{B} [107]. Darauf aufbauend und unter Verwendung der Maxwell Gleichung ($\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial}{\partial t} \mathbf{B}$), dem Verhältnis $m = n_p/n_m$ der Brechungsindizes des Partikels n_p und des umgebenden Mediums n_m , der Lichtgeschwindigkeit c , dem Radius des Partikels r , der Wellenlänge λ sowie der Intensität des eingestrahlten Lichtes I_0 kann die Streukraft beschrieben werden als

$$F_{\text{Streu}} = \frac{I_0 \sigma n_m}{c}.$$

Dabei wurde der Streuquerschnitt σ definiert als

$$\sigma = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2.$$

Die Gradientenkraft hingegen ergibt sich zu

$$F_{\text{Grad}} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \nabla I_0$$

mit der Polarisierbarkeit des Partikels α definiert als

$$\alpha = n_m^2 r^3 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)$$

[102, 103]. Die Gradientenkraft ist somit proportional zur Polarisierbarkeit des dielektrischen Partikels und dem optischen Intensitätsgradienten. Eine Darstellung der beiden wirkenden Kraftkomponenten auf ein Partikel, welches in einer optischen Falle gefangen ist, findet sich in Abbildung 4.2A.

Der zweite Grenzfall ergibt sich durch die Betrachtung eines wesentlich größeren Partikels verglichen mit der Wellenlänge des Fallenlasers, wodurch die optischen Kräfte anhand der klassischen Strahlenoptik hergeleitet werden können [102, 103]. Vergleiche hierzu Abbildung 4.2B. Die Brechung einzelner Lichtstrahlen bei Ein- und Austritt an einem dielektrischen Partikel führt neben einer Richtungsänderung der Strahlen auch zu einer Änderung ihres Impulses. Entsprechend des dritten Newtonschen Gesetztes ist dadurch auch eine identische aber entgegengesetzte Impulsänderung bezüglich des Partikels induziert [102, 103]. Die so hervorgerufene Kraftwirkung auf das Partikel ist dabei proportional zur Intensität des einfallenden Lichtes. Diese durch Brechung induzierte Kraft wirkt in Richtung des Intensitätsgradienten, wenn der Brechungsindex des dielektrischen Partikels größer ist als der des umgebenden Mediums ($m > 1$) [102, 103, 105]. Für ein Partikel im Brennpunkt eines fokussierten Lichtstrahles sind die auf das Partikel wirkenden Impulsänderungen symmetrisch und die lateralen Kräfte gleichen sich aus wodurch keine Nettokraft auf das gefangene Teilchen wirkt. Lediglich der zusätzlich auftretende Streudruck des Strahles verschiebt ein Partikel in einer optischen Falle leicht aus dem Brennpunkt des Strahles in axialer Richtung an den Punkt, an dem sich die auftretenden axialen Kräfte im Gleichgewicht mit der Streukraft befinden [103]. Wird das gefangene sphärische Partikel allerdings leicht aus dem Fokuspunkt ausgelenkt, ist die Impulsänderung auf einer Hemisphäre des Partikels aufgrund der asymmetrischen Lichtintensität größer als auf der anderen. Dabei resultieren intensivere Strahlen auch in einer stärkeren Impulsänderung. Es entsteht eine Nettokraft auf das Partikel, welches dieses in Richtung der größeren Intensität drückt und somit das Partikel zurück in das fokale Volumen des Lichtstrahles repositioniert [102, 103, 105].

Zusätzlich wurden die ersten optischen Einzelstrahlfallen so montiert, dass auch die Ge-

wichtskraft des Partikels entgegen der Streukraft wirkte [102]. Trotz aufwendiger theoretischer Beschreibung der optischen Pinzette ist sie sehr präzise kalibrierbar und erreicht eine hohe zeitliche Auflösung durch Detektion des am Partikel gestreuten Laserlichtes und eignet sich somit hervorragend für empfindliche Messungen an mikroskopischen, biologischen Proben [97, 103].

4.4 Polystyrolpartikel und Opsonisierung

Wie im vorigen Abschnitt erläutert, bietet die optische Pinzette eine Vielzahl an Optionen für Untersuchungen biologischer Proben. Neben der Verwendung im Rahmen optischer Kraftspektroskopie, beispielsweise zur Charakterisierung von Rezeptor Ligand Bindungen wie Immunglobulin G und Fc γ -Rezeptoren, kann sie auch genutzt werden, um die Phagozytose eines ausgewählten Zielobjektes mit exaktem Startzeitpunkt und präzisiertem Internalisierungsort zu initiieren. Als Zielobjekte bieten sich dabei vor allem Latex- bzw. Polystyrolpartikel (Polymerpartikel) an. Ein Vorteil von sphärischen Objekten aus Polystyrol anstatt aus Glas ist ihre geringere Dichte als die der Glaspartikel bei gleichzeitigem großen Brechungsindex verglichen mit dem Brechungsindex wässriger Lösungen. Das bedeutet, sie sind sehr gut mit einer optischen Pinzette greifbar, sinken in wässriger Umgebung aber nicht so schnell ab wie Glaspartikel. In Bezug auf die Internalisierung in Phagosome durch Zellen ergibt sich für Polystyrolpartikel ein weiterer positiver Effekt. Im Vergleich zu aufgenommenen Mikroorganismen oder ähnlichen Objekten entstehen bei einer Phagozytoseinitiierung durch Polystyrolpartikel sehr reine Phagosomen mit bekanntem Inhalt [108]. Polystyrolpartikel eignen sich durch ihre sehr gute Sichtbarkeit unter dem Lichtmikroskop für *in vivo* Untersuchungen wie auch für *in vitro* Experimente, da sich polystyrolenthaltende Phagosomen erfolgreich isolieren lassen [108]. Zusätzlich ist eine Opsonisierung, also eine Oberflächenbeschichtung, der Polystyrolpartikel mit Proteinen sowie spezifischen Liganden möglich, um eine gezielte Ansteuerung diverser Oberflächenrezeptoren der Zellen zu gewährleisten [108]. Für eine solche Opsonisierung werden beispielsweise Immunglobuline verwendet, welche durch passiv aktivierte Bindungskräfte zwischen den Antikörpern und in die Oberfläche der Polystyrolpartikel integrierte Amino- oder Carboxylgruppen oder mittels aktiver Anbindung der Antikörper an diese Gruppen unter Zuhilfenahme chemischer Vernetzer (engl. *Crosslinker*) auf den Partikeln angebracht werden.

4.5 Medikamente zur Manipulation intrazellulärer Prozesse

Medikamente zur Manipulation intrazellulärer Prozesse sind meist kleine Moleküle, welche unter anderem mit intrazellulären Strukturen (zytoskelettale Medikamente) oder intrazellulären Motoren (motorspezifische Medikamente) interagieren. Zytoskelettale Medikamente können die zellulären Filamente stabilisieren, ihren Aufbau verhindern oder ihren Abbau gezielt initiieren, wohingegen motorspezifische Medikamente die Motoren deaktivieren oder ihre Anbindung an assoziierte Filamente unterbinden. Es erfolgt dabei allerdings keine vollständige Vernichtung und Löschung der Zielstrukturen oder ihrer Untereinheiten aus den behandelten Zellen wie dies bei Experimenten unter Verwendung gentechnischer Methoden, beispielsweise durch Nutzung von siRNA, der Fall ist, wo die Zellen die Zielstruktur nicht mehr enthalten, beispielsweise bestimmte Motorproteine. Manipulative Medikamente auf zellulärer Ebene erwiesen sich als sehr nützliche Werkzeuge zur Entschlüsselung komplexer mikroskopischer, biologischer Vorgänge und führten bereits zur Entwicklung diverser Chemotherapeutika [109]. Anhand der in dieser Arbeit verwendeten

Medikamente werden im Folgenden beispielhaft unterschiedliche Wirkungsmechanismen der Medikamente erläutert.

Das zytoskelettale Medikament **Cytochalasin** ist ein natürlich vorkommender, membranpermeabler Pilzmetabolit, welches den Kappenproteinen von Aktinfilamenten ähnelt und sich analog zu diesen auch an den Enden der AF anlagert und eine Fortsetzung der Filamentpolymerisation unterbindet. Die verhinderte Assoziation und Dissoziation resultiert in einer allgemeinen Verkürzung der AF der gesamten Zelle im Vergleich zu AF in unbehandelten Zellen. Die unter dem Mikroskop sichtbaren Auswirkungen dieses Medikamentes auf die Zielzellen sind die fehlende Ausbildung von Zellmembranausstülpungen und Oberflächenfalten, die Reduktion der Zelltranslokation, eine Veränderung der Zellmorphologie durch Abrunden der Zellen und eine Reduzierung der Zellsteifigkeit [110].

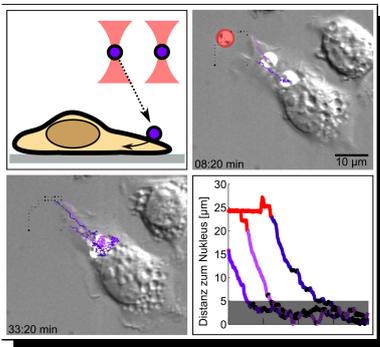
Ein zytoskelettales Medikament, welches gezielt auf die mikrotubulären Strukturen der Zelle einwirkt, ist die synthetische Droge **Nocodazol**. Sie bewirkt allerdings keine direkte Depolymerisation der MT, sondern bindet an Tubulindimere oder dessen polymerisierte Form und blockiert dieses somit bezüglich der Anlagerung weiterer Tubulinuntereinheiten. Dadurch wird die Erweiterung von MT sowie auch der Wiederaufbau von MT nach deren ständig ablaufenden, zellinduzierten Depolymerisationsprozessen verhindert und es kommt zu einem allmählichen Verschwinden des intrazellulären MT Netzwerkes. Damit korreliert, erfolgt ein Abrunden der Zellen und der Verlust der perinuklearen Zellorganisation, resultierend in antitumorale und antimittotische Aktivität dieses Medikamentes [111].

Ciliobrevin ist ebenfalls ein membranpermeables Molekül und wirkt als motorspezifisches Medikament gezielt auf die Aktivität von Dynein Motoren. Es handelt sich dabei um eine Art ATP Konkurrent, welcher die Aktivität der Dynein ATPase inhibiert, in dem es an die ATPase Domäne des Dynein Motors bindet. Dadurch wird die Motorrotation und eine Streckung des Dyneins in Richtung des MT Minusendes blockiert und die Vorwärtsbewegung des Motors unterbunden. Auch die Hydrolyse von ATP zu ADP durch den Motor ist nicht mehr möglich [112, 113].

Ein weiteres motorspezifisches Medikament ist **MyoVin-1**, welches selektiv mit dem Motorprotein Myosin V interagiert. Es reduziert die Rate der ADP Dissoziation vom Aktin-Myosin-Komplex des Motors und vermindert somit die Motorenaktivität drastisch [109].

- Materialien & Methoden -

Beobachtung & Analyse des phagosomalen Transportes



Dieses Kapitel beschreibt die Grundlagen für die Beobachtung des intrazellulären phagosomalen Transportes sowie für dessen qualitative und quantitative Analyse. Den Beginn bilden die technischen Voraussetzungen, um eine gezielte Phagozytose herbeizuführen. Anschließend werden Details zu den biologischen Proben, deren Kultivierung und Vorbereitung für die Experimente sowie die Herstellung und den Einsatz von Zielobjekten für die Phagozytose besprochen. Des Weiteren werden die experimentellen und biologischen Rahmenbedingungen betrachtet.

Es folgen Erläuterungen zu der qualitativen und quantitativen Analyse der Phagozytose mit Schwerpunkt des darauf folgenden phagosomalen Transportes sowie die Beschreibung der genutzten Kriterien zur Charakterisierung der Transporteigenschaften.

5.1. Aufbau & Komponenten einer holografischen optischen Pinzette	50
5.2. Justage einer holografischen optischen Pinzette	55
5.3. Kultivierung von Mausmakrophagen	57
5.4. Antikörper & Opsonisierung von Partikeln	57
5.5. Sedimentationszeiten, Phagozytosewahrscheinlichkeiten & Rezeptorenverteilung	58
5.6. Probenvorbereitung & initiierte Phagozytose	60
5.7. Nachweis einer erfolgreichen Phagozytose	62
5.8. Funktionsweise CC-Tracking Algorithmus	65
5.9. Kriterien für phagosomale Transporteigenschaften	70

5.1 Aufbau & Komponenten einer holografischen optischen Pinzette

Eine holografische optische Pinzette bietet die Möglichkeit einen einzelnen Laserstrahl, welcher eine optische Falle in einem kommerziellen Durchlichtmikroskop erzeugt, mittels eines Flüssigkristalldisplays auf mehrere Fallen aufzusplitten. Diese Fallen können im Bereich von einigen Millisekunden in allen drei Raumrichtungen repositioniert werden, ohne die Justage oder den Strahlenverlauf des ursprünglichen Lasers zu verändern [114–116].

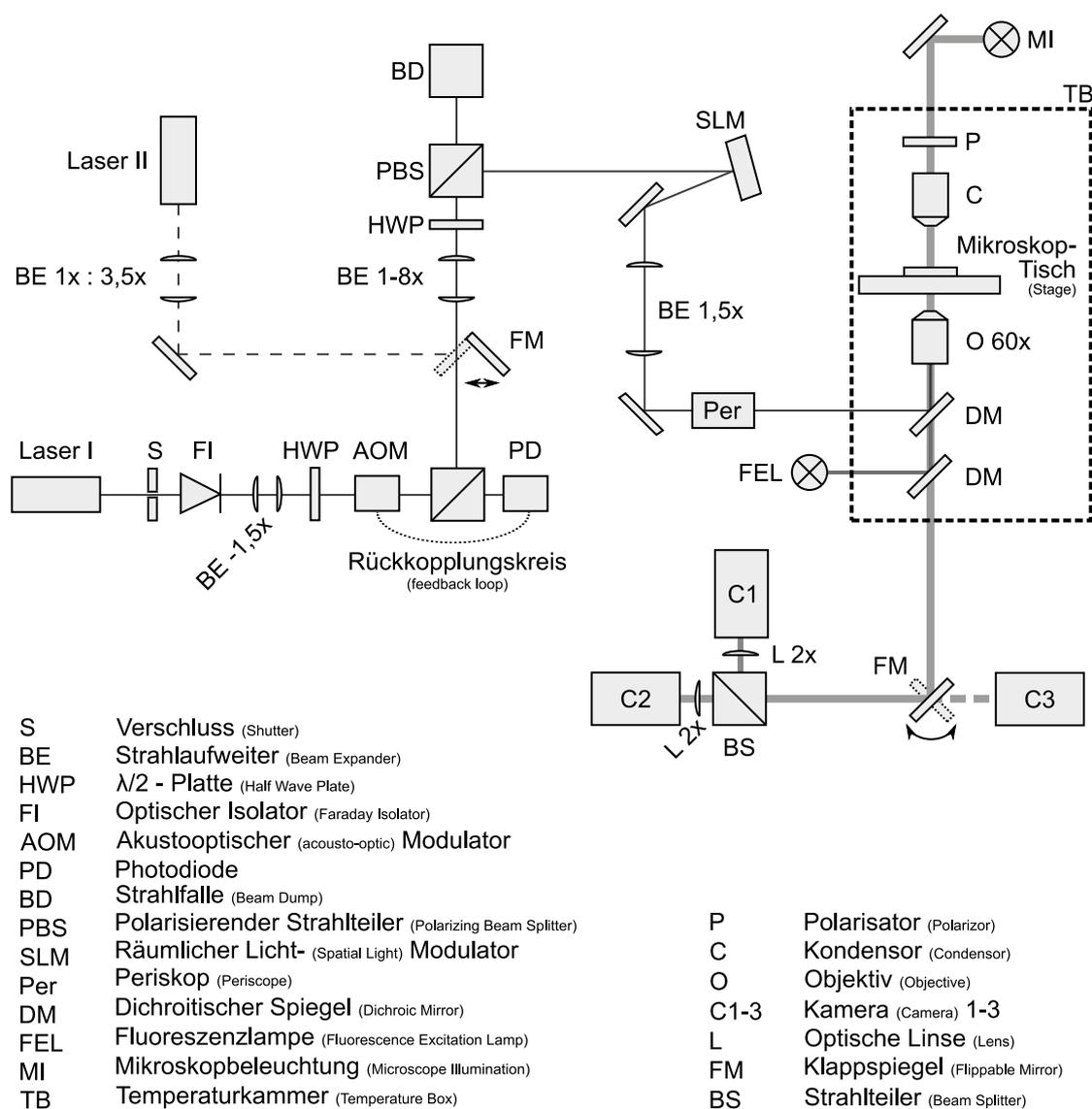


Abbildung 5.1. Schematischer Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten holografischen optischen Pinzette (HOT) mit detaillierter Auflistung aller enthaltenen Komponenten. Wichtige Merkmale der HOT sind die Einkopplung zweier Laserquellen, der Rückkopplungskreis zur Kompensation von Intensitätsschwankungen, der räumliche Lichtmodulator zur Modulation des Strahlenprofils und Erzeugung mehrerer Fallen sowie die Einkopplung in ein kommerzielles Lichtmikroskop mit präziser Kontrolle der Umgebungstemperatur.

Um eine solch variable Falle zu erzeugen, ist es notwendig, die Intensität des eingekoppelten Laserstrahles sowie sein Strahlenprofil konstant zu kontrollieren und zu modulieren. Eine schematische Übersicht und Skizze der Anordnung aller dafür notwendigen Komponenten der in dieser Arbeit verwendeten holografischen optischen Pinzette (HOT) befindet sich in der Abbildung 5.1. Der reale Aufbau ist zur besseren Veranschaulichung und Darstellung der praktischen Umsetzung der Komponentenanordnung in Abbildung 5.2 dargestellt.

HOT Laser und Rückkopplungskreis

Zur Generation multipler optischer Fallen wurde ein leistungsstarker Infrarotlaser verwendet, hier ein 1064 nm Faserlaser (YLM-5-LP-SC, IPG PHOTONICS, Oxford,

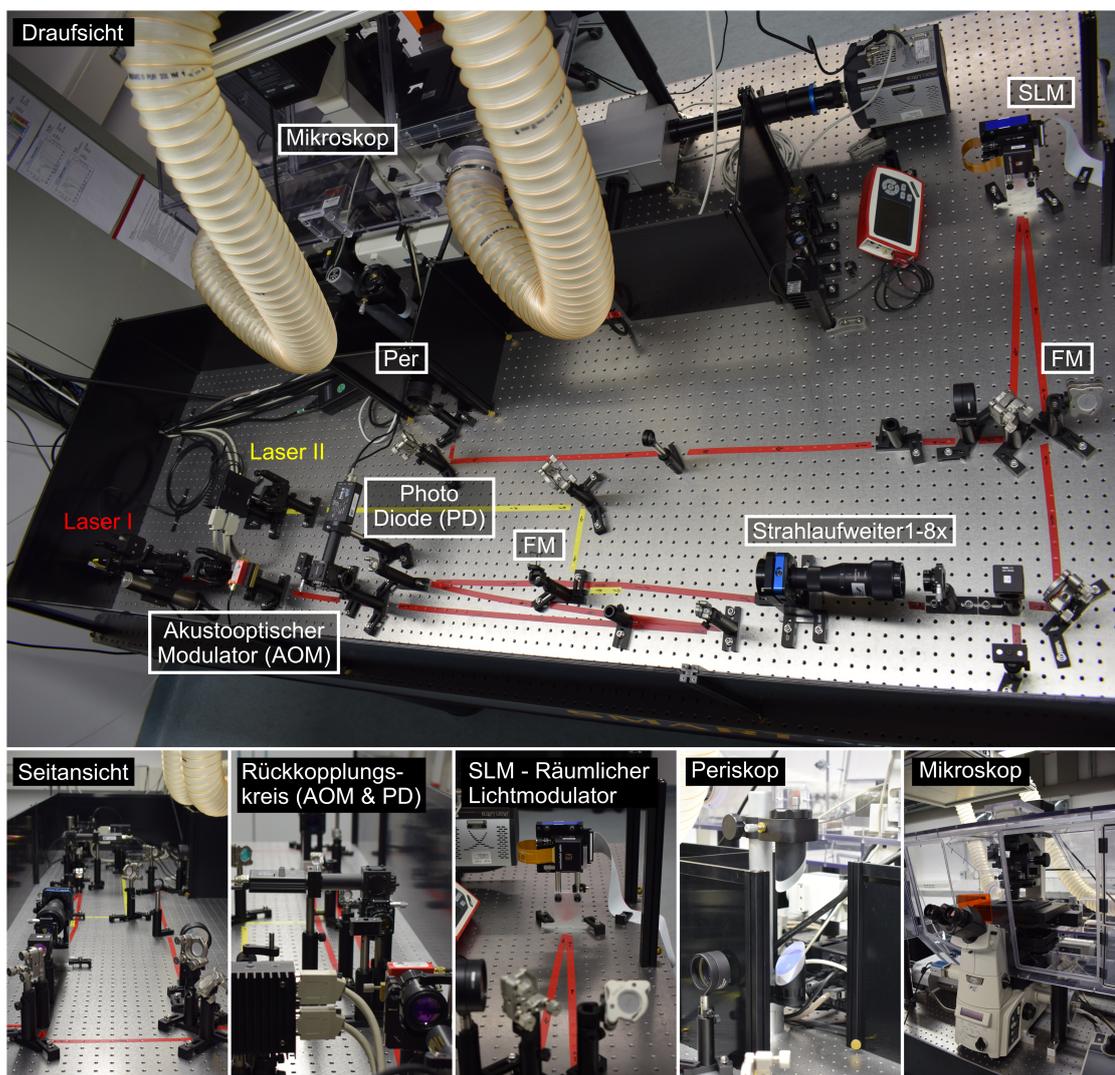


Abbildung 5.2. Aufbau der in dieser Arbeit verwendeten holografischen optischen Pinzette (HOT) mit expliziter Darstellung relevanter Komponenten. Die Grafik zeigt die Draufsicht sowie die Seitenansicht der in dieser Arbeit aufgebauten und justierten HOT. Relevante Komponenten sind explizit beschriftet. Der Rückkopplungskreis, der räumliche Lichtmodulator (SLM), das Periskop (Per) und das kommerzielle Mikroskop mit eigen angefertigter Temperaturbox sind vergrößert dargestellt. Die Kennzeichnung der Klappspiegel (FM) markieren die Ein- und Auskoppelpunkte alternativer Strahlengänge.

Massachusetts), mit einer Ausgangsleistung von maximal 5,9 W (nominell 5,0 W, $\Delta\lambda_{5W} = 0,570$ nm) und einem Strahlendurchmesser von 1,6 mm. Die Wellenlänge des Lasers wurde dabei so gewählt, dass sie in der gleichen Größenordnung wie die zu fangenden Objekte lag (vgl. 4.3) sowie außerhalb der Wellenlängenbereiche mit großem Zerstörungspotenzial gegenüber biologischen Proben [103]. Nach der Auskopplung aus der Faser passierte der Laserstrahl zunächst einen mechanischen Verschluss, der die Sicherheit beim Arbeiten am Mikroskop erhöhen sollte, wenn der Fallenlaser nicht benötigt wurde, und ein mechanisches Ausschalten der Fallen ermöglichte. Anschließend folgte ein optischer Isolator (auch Faraday Isolator, IO-10-1064, THORLABS, Newton, New Jersey), welcher Rückreflexionen aus der Fallenapparatur in den Laser verhinderte und somit eine Veränderung der Laserleistung durch Rückkopplung vermied. Dazu setzt sich der Isolator aus einem Eingangspolarisationsfilter, welcher eine konkrete Polarisationsrichtung des Laserstrahles durchlässt, einem Faraday-Rotator, welcher mit Hilfe eines optisch aktiven Mediums und anliegendem Magnetfeld die Polarisationssebene basierend auf dem Faraday-Effekt um 45° dreht, und einem Ausgangspolarisationsfilter zusammen. Die Achse des Ausgangsfilters ist um 45° verkippt im Vergleich zu dem Eingangsfilter, wodurch der optische Isolator wie eine elektrische Diode funktioniert. In Ausbreitungsrichtung einfallendes Laserlicht wird polarisiert und die Polarisationssebene um 45° verkippt. In entgegengesetzter Richtung einfallendes Licht wird am Ausgangsfilter in einer Ebene von 45° polarisiert und mittels Rotator nochmals um weitere 45° rotiert. Somit erreicht es den Eingangsfilter mit einer um 90° rotierten Polarisationssebene und wird reflektiert oder absorbiert.

Anschließend passierte der Laserstrahl einen Strahlenaufweiter mit negativer Aufweitung, welcher den Strahlendurchmesser auf den Eingangsdurchmesser des akustooptischen Modulators (AOM, AA OPTOELECTRONIC, Orsay, Frankreich) reduzieren sollte, um einen unnötigen Leistungsverlust zu vermeiden, und eine $\frac{\lambda}{2}$ -Platte, um die Polarisationsrichtung des Strahles an den AOM Eingang anzupassen. Der AOM ist das in Ausbreitungsrichtung folgende Bauteil und gehört zu dem Rückkopplungskreis (engl. *feedback loop*), welcher außerdem aus einem speziellen Strahlenteiler, einer Photodiode und einem Rausch-Minimierer (engl. *NoiseEater*, TEM MESSTECHNIK, Hannover, Deutschland) besteht und Schwankungen in der Laserleistung minimiert. Dazu wurde nach Durchgang des AOM ein geringer Prozentsatz der Laserleistung abgespalten und auf die Photodiode projiziert. Diese registrierte die Eingangsleistung, verstärkte sie und sendete sie an den *NoiseEater*, einer PID-Regel Elektronik (engl. *proportional-integral-derivative controller*), zur Stabilisierung der Leistung und Kontrolle der Ausgangsleistung. Der *NoiseEater* steuerte anschließend nach Abgleich des Photodetektorsignals mit einem festen oder automatischen Sollwert den Aktuator an. Der AOM besteht aus einem Kristall, an dessen einem Ende sich ein Piezoschwinger zur Erzeugung von Schallwellen befindet, ein Bauteil, welches den inversen Piezoeffekt zur Ausführung einer mechanischen Bewegung ausnutzt. Die Schallwelle bewirkt eine periodische Dichteänderung in dem Kristall und damit eine Modulation des Brechungsindex. Dadurch kann die Beugung des durchlaufenden Laserstrahles am Kristall variiert werden. Die Stabilisierung der Laserleistung erfolgte somit mittels konstruktiven oder destruktiven Interferenzerscheinungen. Die korrekte Einstellung der Piezobewegung obliegt dem *NoiseEater*.

Räumliche-Licht-Modulation

Nach dem Rückkopplungskreis durchlief der Laserstrahl einen weiteren Strahlenaufweiter, um später den Bildschirm des räumlichen Lichtmodulators (engl. *spatial light modulator*,

SLM, XY Phase Series, BOULDER NONLINEAR SYSTEMS, Lafayette, Colorado) vollständig ausleuchten zu können. Dem Strahlenaufweiter folgte eine $\frac{\lambda}{2}$ -Platte mit variabler Orientierung und ein polarisierender Strahlenteiler, welcher die senkrecht zum optischen Tisch polarisierte Komponente des Lichtes passieren lies, wohingegen die parallel zur Tischenebene polarisierte Komponente auf eine Strahlenfalle reflektiert wurde. Die Orientierung der $\frac{\lambda}{2}$ -Platte regulierte somit die Laserintensität des transmittierten Strahles ohne die Ausgangsleistung der Lasereinheit zu verändern. Diese Art der Laserintensitätsregulierung verhinderte unnötige Schwankungen in der Ausgangsleistung. Des Weiteren sollte der Rückkopplungskreis auf eine feste Laserintensität (hier 3 W) justiert werden.

Der SLM modulierte das einfallende Licht basierend auf Reflexion und Beugung an einem Flüssigkeitskristalldisplay mit einer räumlichen Auflösung von 512x512 px und einer zeitlichen Auflösung ≥ 60 Hz. Die dafür notwendige Phasenmodulation des Laserlichtes per Orientierung der Flüssigkeitskristalle wurde mittels eines handgeschriebenen MATLAB (MATHWORKS, Natick, Massachusetts) und LABVIEW (NATIONAL INSTRUMENTS, Austin, Texas) Programms gesteuert. Dieses generierte ein Computer-basiertes Hologramm, berechnet aus der Addition von Fresnellinsen und Blazegittern, welches auf dem SLM wiedergegeben wurde. Ein Blazegitter ist ein spezielles optisches Gitter, welches die Beugungseffizienz für eine bestimmte Beugungsordnung maximiert. Die Berechnung eines Hologramms erfolgt im 200 Millisekundenbereich und bildete somit den limitierenden Faktor für die Neuorientierung und Bewegungen multipler Laserfoki und daraus folgend der einzelnen optischen Fallen. Um mehrere Fallen zu erzeugen, musste die Fourierebene des phasenmodulierten Laserstrahles auf dem SLM Bildschirm exakt auf die rückseitige Fokusebene des Mikroskopobjektivs projiziert werden [117–119].

War der SLM in ausgeschaltetem Zustand, entsprach er der Wirkungsweise eines einfachen Spiegels mit einer Reflexion von bis zu 95 %. Des Weiteren bestand im Aufbau die Möglichkeit mittels zweier Klappspiegel den Strahlengang am SLM vorbei zu führen, was für die Anwendungen in dieser Arbeit nicht notwendig gewesen ist. (Nicht dargestellt in Abbildung 5.1.)

Anschließend an den SLM passierte das Licht einen weiteren Strahlenaufweiter, bestehend aus zwei separaten Linsen mit Brennweiten von 500 mm und 750 mm in brennweitenentsprechendem Abstand (Vergrößerung 1,5), um eine Projektion der SLM-Ebene auf die rückseitige Fokusebene des Mikroskopobjektivs und eine (nahezu) vollständige Ausleuchtung der Objektivöffnung für eine optimale Fokussierung des Laserstrahles zu gewährleisten [104, 120]. Der zweiten Linse folgte ein Periskop, welches den Höhenunterschied zwischen Strahlenverlauf auf dem optischen Tisch ($h_{\text{Strahlenverlauf}} = 145$ mm) und der Einkopplungsöffnung am Mikroskop ($h_{\text{Einkopplung}} \sim 275$ mm) überbrückte, den Laserstrahl aber unverändert lies.

Bis zum Erreichen des Periskops war der Verlauf des Laserstrahles von variablen Wänden aus 3 mm starkem Polyethylen umgeben, auf denen sich eine geschlossene Abdeckung befand. Diese Ummantelung des Strahlenganges diente dem Schutz der im Raum befindlichen Personen vor möglichen Laserreflexionen an optischen Apparaturen und Streulicht sowie der Reduzierung von Schwankungen des Laserlichtes durch Luftzirkulationen.

Erzeugung einer einzelnen Falle per Diodenlaser

Um eine optische Pinzette auch bei Ausfall des Faserlasers gewährleisten zu können, wurde ein zusätzlicher Diodenlaser (M9-A64-0300, THORLABS; vgl. Abbildung 5.1, Laser II) mit teils separatem Strahlengang installiert, welcher ebenfalls in das Mikroskop eingekoppelt werden konnte. Das von der Diode ausgehende Licht hatte eine Wellenlänge von 1064 nm mit einer Leistung von 300 mW bei einer Temperatur von $T_C = 25$ °C. Die Diode wur-

de in einem Halter mit integrierter Temperaturregulierung (TCLD M9, THORLABS, 5-70 °C) installiert. Das emittierte Licht wurde mittels Linse (C 230 TME-C, 1050-1550 nm, THORLABS) kollimiert. Da es sich bei der Diode um einen Kantenemitter handelte, wurde der dadurch entstandene Astigmatismus des Strahles durch ein 3,5-faches anamorphisches Prisma (PS881-B, THORLABS) korrigiert. Danach wurde der Strahl mittels Klappspiegel in den Strahlengang des Lasers I eingekoppelt, vergleiche hierzu Abbildung 5.1 und Abschnitt 5.2.

Die Ansteuerung der Laserdiode erfolgte über die Energieversorgungseinheit LDC 205C (THORLABS) und die kontinuierliche Regulierung der Temperatur über die Einheit TED 200C (THORLABS), wobei die Temperatur mittels AD592 10 k Ω Thermistor registriert wurde.

Einkopplung in das Mikroskop & Komponenten des Mikroskops

Bei dem für die optische Falle verwendeten Mikroskop handelte es sich um ein kommerzielles invertiertes Durchlichtmikroskop von Nikon (Nikon Eclipse Ti, NIKON Tokyo, Japan) mit zwei Wasserimmersionsobjektiven mit sehr hoher Numerische Apertur (NA) (Lambda-S Serie, Nikon, CFI Apo LWD 40x: NA = 1,15; CFI Plan Apo IR 60x: NA = 1,27), um eine hohe Fangeffizienz zu ermöglichen [104]. Besonderheit des Mikroskops war ein zweiter Filterrevolver oberhalb des Standardrevolvers. In dem zusätzlichen Revolver befand sich ein dichroitischer Spiegel, welcher Infrarotlicht reflektierte, Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich aber transmittierte (Abbildung 5.1). Auf identischer Höhe mit dem Filterrevolver befand sich eine Mikroskopöffnung, die es ermöglichte den Fallenlaser auf den dichroitischen Spiegel zu lenken, welcher den Strahl in das Objektiv reflektierte zur Fokussierung und Erzeugung der optischen Fallen.

Das Mikroskop bot die Möglichkeit Hellfeld- (engl. *bright field* (BF)), Differentialinterferenzkontrast (DIC) und Fluoreszenzaufnahmen zu erstellen. Die Beleuchtung für BF- und DIC-Aufnahmen wurde mittels handelsüblichen Halogenlampe (12 V, 1000 W, diverse Hersteller) gewährleistet. Zur Erzeugung von Fluoreszenzlicht stand eine Quecksilberdampflampe (Intensilight C-HGFI, NIKON) zur Verfügung sowie je ein DAPI, GFP-L, YFP-HQ, TexRed und G-2A Filterwürfel, welche sich in dem Standardfilterrevolver befanden.

Zur Bildaufnahme wurden eine EM-CCD Kamera (iXon Ultra 897, ANDOR, Belfast, Nordirland) und eine Hochgeschwindigkeitskamera (IDT Nx4-S2, IMAGING SOLUTIONS GmbH, Eningen u. Achalm, Deutschland), welche über einen dualen Kameraadapter mit inkludierter zusätzlicher zweifacher Vergrößerungslinse an das Mikroskop angeschlossen waren, und eine weitere EM-CCD Kamera (Luca-R, ANDOR, separat angeschlossen) verwendet. Die Kamera iXon Ultra 897 bot zusätzlich die Möglichkeit das Belichtungsfeld der Kamera mittels vier Metallschiebern (Optomask, ANDOR) mechanisch einzuschränken.

Für Messungen von mehreren Minuten bis hin zu Stunden bot das Mikroskop ein automatisiertes Fokussystem (*perfect-focus*), welches mittels integriertem Laser und dessen Reflexion am Deckglas einen konstanten Arbeitsabstand zwischen Objektiv und Deckglas realisierte. Die Abbildung dieses Lasers auf die Kameras wurde per Filter unterbunden, welcher eine Transmission für Wellenlängen von 340 nm bis 800 nm aufwies. Aufgrund dieses infraroten Langpassfilters wurde auch die Intensität des Fallenlasers um mehr als 70 % gegenüber einer Falle ohne automatisiertem Fokussystem gemindert.

Eine stabile Proben temperatur, vor allem für die Messungen an lebenden biologischen Proben, wurde durch eine von der Arbeitsgruppe (insbesondere Wolfgang Gross und Lisa Gebhardt) entworfene und maßgefertigte Temperaturkammer gewährleistet, welche den Mikroskoptisch, die Objektive und Teile des Mikroskopkopfes umschloss. Das Volumen der

Temperaturkammer ($\sim 0,2\text{ m}^3$) wurde mittels Heizspule (NK-100-0,8-1, VENTS, Litvinov, Tschechische Republik) und Ventilator (KSA100-2E, VENTS) erwärmt. Die externen Bauteile der Kammer waren mechanisch vom Mikroskoptisch entkoppelt, um Schwingungen der optischen Falle zu reduzieren. Die Temperatur in der Kammer wurde über einen PID-Rückkopplungskreis (CN7500, NEWPORT ELECTRONICS, Santa Ana, Kalifornien) und am Mikroskoptisch gemessener Referenztemperatur (P100 Widerstand) gesteuert und auf $0,2^\circ\text{C}$ konstant gehalten.

5.2 Justage einer holografischen optischen Pinzette

Die gesamte optische Apparatur befand sich auf einem luftdruckgedämpften, optischen Tisch um eine horizontale Ausrichtung zu gewährleisten. Der optische Tisch wurde so eingestellt, dass an jedem Fuß maximal 1 kg cm^{-2} Luftdruck anlagen und per Wasserwaage auf eine exakte horizontale Ausrichtung justiert.

Alle im Anschluss beschriebenen Messungen der Laserleistung und des Strahlenprofils erfolgten mit einem Leistungsmesser (Power Meter PM100D, THORLABS) oder einem Strahlenlagonitor (Beam Profiler BP209-IR, THORLABS).

Die Laserfaser des Lasers I wurde mittels spezieller Halteklemme so auf dem optischen Tisch befestigt, dass der austretende Laserstrahl parallel zum Tisch verlief mit einer Polarisationsrichtung in einem 45° Winkel gegenüber der Tischebene. Die Höhe des Strahles über dem Tisch wurde auf 145 mm eingestellt. Der optische Isolator wurde so justiert, dass sich der Eingangspolarisator in identischer Orientierung wie die Polarisationsrichtung des Laserstrahles befand. Die Ausgangspolarisation wurde parallel zur Tischebene gewählt und entsprach der Eingangspolarisationsrichtung des AOM. Diese Eingangspolarisationsrichtung wurde mittels $\frac{\lambda}{2}$ -Platte auf maximale Ausgangsleistung des AOM feinjustiert. Wird der Einfallswinkel des Lasers auf den Bragg-Winkel des AOM abgestimmt, wird der durchquerende Laserstrahl in eine singuläre erste Ordnung gebeugt, welche mittels variabler Hochfrequenz moduliert werden kann. Zur Anpassung des Einfallswinkels wurde die horizontale Orientierung des AOM auf maximale Durchgangsleistung des Lasers in der ersten Ordnung justiert. Dies erfolgte mittels drehbarer Lagerung des AOM auf dem sogenannten *Bragg Hole*. Nach dem AOM war die Polarisation des Strahles bei anisotropischer Interaktion (Modulation des Laserstrahles durch den AOM) gedreht. Der direkt durchgehende Strahlenanteil (0. Ordnung) wurde nach dem AOM geblockt. Die erste Ordnung wurde senkrecht auf die Eingangsapertur des zum *feedback loop* gehörenden speziellen Strahlenteilers geführt. Dieser Strahlenteiler bestand aus einem Doppelkeil, welcher einen kleinen Teil des Laserlichtes abspaltete (Detektionsstrahl) und diesen ohne Interferenzeffekte und unabhängig der Polarisation auf einen Detektor leitete, hier der Photodiode. Zur Zentrierung des Detektionsstrahles auf der Photodiode wurde die Orientierung der Keile entsprechend angepasst und die Strahlenposition mittels Fadenkreuz verifiziert. Der Durchgangsstrahl (Hauptanteil) wurde durch den ersten Keil um $\sim 2^\circ$ in horizontaler Richtung verkippt und anschließend mittels zweier Spiegel wieder parallel zum optischen Tisch orientiert. Die Photodiode wurde auf eine primäre Ausgangslaserleistung von 3 W justiert und die eingestellte Verstärkung des Detektionssignals wurde entsprechend auf $1 \cdot 10^5\text{ V A}^{-1}$ & $20\text{ percent var. gain}$ festgelegt. Das Diodensignal wurde anschließend an den *NoiseEater* geleitet und konnte hier bei geringer Ausgangsleistung zusätzlich verstärkt werden (Kontrolle der korrekten Verstärkung des Eingangssignals mittels grüner *PD gain-LED*). Zur Justage der PID-Regler des *NoiseEater* wurde mittels Frequenzgenerator eine externe Rechteckspannung mit einer Frequenz von 1 kHz und einer Amplitude von 200 mV angelegt, mit welcher der Laserstrahl moduliert werden sollte. Das Diodensignal wurde

mittels Oszilloskop mit dem externen Spannungssignal abgeglichen. Der *NoiseEater* wurde in dem Intensität-Regulations-Modus (*reg*) betrieben und der Sollwert (*setpoint*) wurde auf ein Mittelmaß gesetzt (Einstellung *man*, Drehknopf in mittlerer Position). Der Sollwert konnte kontinuierlich verschoben werden und änderte die Stärke des Ausgangssignals und somit auch der Laserintensität. Der Sollwert musste dabei kleiner als das anliegende Rechtecksignal gehalten werden. Nach jeder Signaländerung der anliegenden Rechteckspannung passte der PID-Regler das Ausgangssignal an. Somit wurden Reaktionszeiten, Dämpfungen und Überschwingungen des nachregulierten Signals am Oszilloskop sichtbar. Das P, I & D-Element wurden auf eine schnelle Antwort ohne Überschwingung mit einer Reaktionszeit von $\sim 4 \mu\text{s}$ optimiert.

Die Einstellungen für den Normalbetrieb des AOM waren ein internes Signal (*cw*), der Regulationsmodus (*reg*) am *NoiseEater* sowie ein manueller Sollwert (*man*), welcher stets kleiner eingestellt wurde als 100% des Lasersignals. Der *reg*-Modus sorgte für ein konstantes Signal entsprechend des Sollwertes. Der alternative Modus (Intensität-Modulations-Modus, *adj*) ermöglichte eine Modulation des Intensitätssignals mit einer externen Vorgabe. Ein korrektes Ausgangssignal wurde mittels grüner *NoiseEater*-LED visualisiert. Der Sollwert wurde während den Messungen nicht variiert, da dies zu Leistungsinstabilitäten hätte führen können.

Die Laserdiode (Laser II) wurde in die Halterung (Kühleinheit) nach Herstellerangaben montiert und die Kollimatorlinse direkt an der Halterung befestigt. Nach dem Vermessen des emittierten Strahlenprofils wurde das Prisma entsprechend der kleineren Halbachse orientiert. Die Vergrößerung des Prismas für die kleine Halbachse ergab sich aus der Brennweite der Kollimatorlinse ($f = 4,51 \text{ mm}$), der Divergenz der kleinen Halbachse $\theta_{\parallel} = 8^{\circ}$ und der Divergenz der großen Halbachse $\theta_{\perp} = 28^{\circ}$. Für die Brennweite galt

$$f = \frac{\frac{\varnothing_{\parallel}}{2}}{\tan\left(\frac{\theta_{\parallel}}{2}\right)} = \frac{\frac{\varnothing_{\perp}}{2}}{\tan\left(\frac{\theta_{\perp}}{2}\right)} .$$

Daraus folgte für die parallelen \varnothing_{\parallel} und senkrechten \varnothing_{\perp} Anteile am Strahlendurchmesser $\varnothing_{\parallel} = 2,249 \text{ mm}$, $\varnothing_{\perp} = 0,631 \text{ mm}$ und für das Verhältnis $\frac{\varnothing_{\parallel}}{\varnothing_{\perp}} = 3,565$. Entsprechend wurde ein 3,5-faches anamorphisches Prisma gewählt. Anschließend wurde der weitere Strahlenverlauf so justiert, dass er mittels klappbarem Spiegel einem exakt überlagerten Weg folgte wie der Strahl des Lasers I. Die Einkopplung auf den Strahlengang des Lasers I erfolgte nach dem Rückkopplungskreis, vergleiche Abbildung 5.1. Eine gleichzeitige Nutzung beider Laser war aufgrund des Klappspiegels ausgeschlossen. Eine Einbindung des SLM war aufgrund der geringen Ausgangsleistung nicht möglich. Die Einstellungen für den PID-Regler der Dioden-Steuereinheit und die Festlegung der Regeltemperatur der Temperatursteuerung wurden entsprechend der Herstellerempfehlungen gewählt.

Die Justage der Laser wurde auf geringe Leistungsverluste und hohe Laserstabilität optimiert. Der Abfall der Laserleistung betrug für den Laser I 11 % am optischen Isolator und 14 % insgesamt an dem negativen Strahlenaufweiter, dem AOM, der $\frac{\lambda}{2}$ -Platte und der Abspaltung eines Strahlenteiles zur Intensitätsmessung durch die Photodiode. Weitere Verluste traten durch Transmission & Reflexion an allen optischen Bauteilen auf. Ohne Beleuchtung des SLM erreichen 65 % der ursprünglichen Laserleistung die Probenebene im Mikroskop. Wurde während des Versuches die mikroskopinterne *perfect-focus*-Funktion genutzt, reduziert sich die Intensität auf 18 %. Für den Strahlengang des Lasers II (Diodenlaser) entfielen einige Bauteile wie der Rückkopplungskreis, wodurch die Laserleistung in der Probenebene 80 % betrug (mit *perfect-focus* 16 %).

5.3 Kultivierung von Mausmakrophagen

Mausmakrophagen der Zelllinie J774-A.1 (teilweise ein Geschenk von Maximiliano Gutierrez, Francis Crick Institut London, Großbritannien, teilweise käuflich erworben von DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurden in *Kulturmedium* gezüchtet. Hauptbestandteil des Kulturmediums war Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, inklusive 5 % 5 mM Glukose, GIBCO, Carlsbad, Kalifornien) ergänzt mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum (BIOCHROM, Berlin, Deutschland) und 5 % 2 mM L-Glutamine (THERMO SCIENTIFIC, Braunschweig, Deutschland). Auf Penicillin-Streptomycin im Kulturmedium wurde zum Schutz der Zellen verzichtet. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen von 37 °C und 5 % CO₂ bei befeuchteter Umgebung in T-25 Kulturflaschen (CORNING, Corning, New York) kultiviert. Die Zellen wurden bei 90-100 % Konfluenz dreimal wöchentlich im Verhältnis zwischen 1:5 und 1:10 umgesetzt. Zum Umsetzen der Zellen wurden diese mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, GIBCO) gespült, mittels Schaber vom Boden der T-25 Kulturflaschen gelöst und per Zentrifugation (200 g, 2 min, 20 °C) restlos von dem Fluid getrennt. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet wurde in 5 ml Kulturmedium gelöst. Entsprechend des gewünschten Verhältnisses für die Passagierung der Zellen wurde eine Verdünnung von Zelllösung und frischem Kulturmedium mit einem Gesamtvolumen von 10 ml in eine neue T-25 Flasche gegeben.

Für mikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen für 24-48 h unter Standardbedingungen auf Mikroskopdeckgläsern (Durchmesser: 18 mm, # 1, MENZEL GLÄSER, Braunschweig, Deutschland) in Zwölflochplatten (Cellstar, GREINER BIO-ONE, Frickenhausen, Deutschland) mit je 50-75 µl Zelllösung und 1 ml Kulturmedium ausgesät.

5.4 Antikörper & Opsonisierung von Partikeln

Als Zielobjekte zur Initiierung des Phagozytoseprozesses wurden weiße carboxylierte Mikropartikel (COOH) aus Polystyrol (MICROMOD, Rostock, Deutschland) mit einem Durchmesser von 1 µm, 2 µm und 3 µm sowie aus Glas (MICROMOD) mit einem Durchmesser von 1 µm verwendet. Mittels passivem Adsorptionsprotokoll (detailliertes Protokoll siehe Anhang) wurden die Partikel mit angeborenen primären Maus-Antikörpern G (Immunoglobulin G, IgG, MERCK MILLIPORE, Darmstadt, Deutschland) opsonisiert. Dazu wurden die Mikropartikel zunächst dreimal mit MES Puffer (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, 25 mM, pH 6, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri) gewaschen und über Nacht in 1 ml MES Puffer mit 0,5 mg ml⁻¹ Maus-IgG inkubiert, um eine passive Beschichtung der Partikel zu gewährleisten. Das Verhältnis zwischen Partikelanzahl und Antikörper wurde so gewählt, dass unter Annahme einer maximal dichten Anlagerung der Antikörper auf der Partikeloberfläche eine 200 %-ige Oberflächenbeschichtung der Mikropartikel möglich war. Um überschüssiges, ungebundenes IgG anschließend zu entfernen, wurden die Partikel dreimal zentrifugiert (3500 g, 30 min, 20 °C bei 1 µm Durchmesser und 2000 g, 20 min, 20 °C bei 2 µm und 3 µm Durchmesser), der Überstand entfernt und das Pellet in DPBS suspendiert. Nach der dritten Waschung wurde das Pellet statt in DPBS in PBS (0,1 M, pH 7,2, LONZA, Basel, Schweiz, darin enthalten: 0,1% Glycin) zur Aufbewahrung der Partikel gelöst. Exaktes Protokoll siehe Anhang A.1.

Eine erfolgreiche Antikörperopsonisierung der Partikel wurde mit Hilfe eines Maus-IgG spezifischen, fluoreszenten sekundären Antikörpers (goat anti-Mouse IgG cross-absorbed, Dy-Light 488, THERMO SCIENTIFIC) mittels sogenannter Antikörper-Antikörper-Färbung verifiziert. Dabei band der sekundäre Antikörper an die primären Antikörper auf der Partikeloberfläche und markierte diese somit unter Fluoreszenzbeleuchtung (ver-

gleiche Abb. 7.1). Alternativ wurde die IgG-Beschichtung nicht phagozytierter Partikel in Zellproben mit einem Elektronenmikroskop visualisiert, siehe hierzu Abschnitt 5.7, 7.1 und Abb. 7.2. Exaktes Protokoll siehe Anhang A.2.

Für Phagozytoseexperimente an Zellen wurden die beschichteten Partikel in gewünschter Konzentration in *Image-Medium* gelöst. Der Hauptbestandteil des Image-Mediums war Minimum Essential Medium (MEM, GIBCO) erweitert um 5% 1 M HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, GIBCO) zur pH-Wert Regulation trotz Änderungen in der CO₂-Konzentration durch zelluläre Atmung während der Versuchsdurchführung und 1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO), um auch bei häufigem Gebrauch eine Bakterienkontamination zu unterbinden.

Berechnung der notwendigen Menge an Antikörpern

Um eine homogene Oponisierung der Zielpartikel mit IgG zu garantieren, wurde die Mindestmenge an benötigtem IgG in Abhängigkeit der Partikelgröße und Konzentration sowie der IgG Konzentration abgeschätzt. Dabei wurde ein IgG als sphärisches Objekt mit Radius R_{IgG} simplifiziert, welches sich unter der Packungsdichte der hexagonal dichtesten Kugelpackung auf der Oberfläche des Zielobjektes anlagert. Somit ergab sich die für die Antikörper zur Verfügung stehende Fläche zu:

$$A_{\text{verfügbar}} = A_{\text{Partikel}} \cdot \frac{\pi}{3 \cdot \sqrt{2}} = 4 \cdot \pi \cdot (R_{\text{Partikel}} + R_{\text{IgG}})^2 \cdot \frac{\pi}{3 \cdot \sqrt{2}}.$$

Der eigentliche Partikelradius wurde um den Radius des Antikörpers erweitert, da der zur Verfügung stehende Platz auf einer theoretischen Ebene durch die Mittelpunkte der angelagerten Antikörper (maximale Ausdehnung der Antikörper an dieser Stelle) abgeschätzt werden sollte. Der anschließend benötigte Platz pro Antikörper entsprach einer Kugelschicht mit infinitesimaler Höhe und mit dem Radius des Antikörpers:

$$A_{\text{benötigt}} = \pi \cdot R_{\text{IgG}}^2.$$

Da $R_{\text{Partikel}} \gg R_{\text{IgG}}$ galt, wurde die Krümmung der Partikeloberfläche vernachlässigt. Entsprechend der Anzahl an Antikörpern pro Partikel und der vorhandenen Partikelkonzentration, ergab sich die benötigte Menge an Antikörperlösung zu:

$$V_{\text{IgG-benötigt}} = \frac{\text{Anzahl}_{\text{IgG-pro-Partikel}} \cdot \varrho_{\text{Partikel}}}{\text{Anzahl}_{\text{IgG-pro-ml}}} = \frac{A_{\text{verfügbar}}}{A_{\text{benötigt}}} \cdot \varrho_{\text{Partikel}} \cdot \frac{m_{\text{IgG}}}{\varrho_{\text{IgG}}},$$

wobei m die Masse des Stoffes und ϱ die zugrundeliegende Konzentration der jeweiligen Lösung ist. Zum prophylaktischen Ausgleich etwaiger Antikörperverluste während des Oponisierungsprozesses wurde die zwei- bis dreifache fache Menge an IgG für eine 200 %-ige Beschichtung genutzt.

5.5 Bestimmung von Partikelsedimentationszeiten, Phagozytosewahrscheinlichkeiten & Verteilungen von Fc γ -Rezeptoren

Die Bestimmung der Partikelsedimentationszeiten in einem bekannten Probenvolumen in Abhängigkeit der Ausgangskonzentration, die Ermittlung der Phagozytosewahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Partikelbeschichtung und die Visualisierung der Fc γ -Rezeptoren auf der Makrophagenmembran bildeten die Rahmenbedingungen für die Durchführung der Experimente zur Untersuchung des phagosomalen Transportes und gezielt initiiertes

Phagozytose, wie in Abschnitt 5.6 beschrieben.

Partikelsedimentationszeiten

Um eine reproduzierbare bekannte Partikelkonzentration in den Proben unabhängig von Partikelgröße und -material zu garantieren, wurden die Partikelsedimentationszeiten bestimmt. Dazu wurden 500 μl der Partikellösung (COOH- oder COOH-IgG-Partikel aus Polystyrol oder Silikat mit Durchmesser von 1 μm , 2 μm & 3 μm gelöst in Image-Medium) in analoger Konzentration wie für die initiierten Phagozytoseexperimente (Abschnitt 5.6) in eine Zwölflochplatte gegeben. Anschließend wurde bei einer Temperatur von 37 °C alle 30 s bis 1 min ein mit der Andor Luca-R Kamera erstelltes Hellfeldbild von der innerseitigen Bodenebene der Zwölflochplatte aufgenommen (Verwendung 20x Objektiv, CFI S Plan Fluor ELWD ADM, NIKON). Die Auszählung der bereits sedimentierten Partikel pro Aufnahme erfolgte mittels MATLAB implementierten Zentroid- und Lokal-Maximalwert-Detektionsalgorithmus [121]. Siehe auch Kapitel 7.2 und Abb. 7.3.

Nach Erreichen der Sedimentationszeit blieb die Partikelanzahl auf der Bodenebene konstant und stieg nicht weiter an. Anhand dieser Partikelanzahl (n_{FOV}) in dem aufgenommenen Kameraausschnitt (engl. *Field of View*, FOV) und der bekannten Größe des Kamerabildes ($FOV_{\text{Luca-R}}$ in μm^2 , als Quotient aus Sensorgröße [px] und Vergrößerung) wurde die Partikelkonzentration in den zugegebenen 500 μl der Partikellösung (in Partikel/ μl) rekonstruiert zu

$$\varrho_{\text{Partikel}} = \frac{n_{\text{Partikel Bodenebene}}}{V_{\text{Partikellösung}}} = \frac{A_{\text{Bodenebene}} \cdot n_{\text{FOV}} / FOV_{\text{Luca-R}}}{500}.$$

Die Fläche der Bodenebene einer Vertiefung betrug bei den verwendeten Zwölflochplatten 3,9 cm^2 .

Die Aufnahmen und dazugehörigen Auswertungen wurden zum Teil von Pamela Anger (technische Assistentin, Arbeitsgruppe Biologische Physik, Universität Bayreuth) unter Verwendung einer Orca-Flash 4.0 Kamera (HAMAMATSU PHOTONICS, Hamamatsu, Japan) erstellt.

Bestimmung der Phagozytosewahrscheinlichkeit

Getestet wurde die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Phagozytose für 3 μm Polystyrolpartikel in Abhängigkeit ihrer Oberflächenbeschichtung. Dazu wurden die Zellen für 24-48 h auf Deckgläsern kultiviert und anschließend carboxylierte (unbeschichtete) und IgG-beschichtete Partikellösungen in gewünschter Konzentration dazugegeben. Die Phagozytose wurde per Sedimentation initiiert, wie im nächsten Abschnitt (5.6) beschreiben. Anschließend wurden die Zellen 15 min, 30 min und 60 min, nachdem die Partikel in Kontakt mit der Zellmembran gebracht wurden (~ 15 min zusätzliche Sedimentationszeit), fixiert. Auf eine Lagerung der Zellen während der Partikelsedimentation auf Eis konnte verzichtet werden, da die Sedimentationszeit nicht von der Partikelbeschichtung abhing und somit für alle Versuchsreihen identisch war.

Für die Beschichtung der Partikel mit IgG konnte eine erfolgreiche Phagozytose mit einem sekundären Anti-IgG Antikörper nachgewiesen werden, welcher die frei liegende IgG-Beschichtung fluoreszent markierte. Details zur Fixierung und Anfärbung siehe Abschnitt 5.7. Von jedem Zeitpunkt wurden von den potenziellen Phagosomen DIC- und Fluoreszenzaufnahmen (GFP-L Filter, ND2-Filter) mit 40-facher Vergrößerung unter Verwendung der Andor Luca-R Kamera angefertigt. Per Auge wurde bestimmt, ob Partikel, welche Kontakt zu den Makrophagen hatten, ein Fluoreszenzsignal aufwiesen.

Für unbeschichtete Partikel war ein exakter Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht möglich. Erfolgreiche Phagozytose der Partikel wurde anhand der Position der Partikel innerhalb der Zelle abgeschätzt. Kriterien waren dabei die Lage des kompletten Partikels innerhalb der Zellfläche, Kontaktfläche zwischen Partikelumriss und Zellmembran, die Verschiebung zwischen Fokusebene der Zelle und Partikelfokusebene sowie die Position zum Zellkern. Eine möglichst geringe Verschiebung zwischen den Fokusebenen, kein Kontakt zwischen Partikel und Zellmembran und minimaler Abstand zum Nukleus wurden dabei vorrangig als positive Phagozytoseanzeichen angesehen. Von jedem Zeitpunkt wurden von den potenziellen Phagosomen DIC-Aufnahmen mit 40-facher Vergrößerung (Kamera: Andor Luca-R) angefertigt. Per Auge wurde bestimmt, ob Partikel, welche Kontakt zu den Makrophagen hatten, Anzeichen für eine erfolgreiche Phagozytose aufwiesen (vergleiche Kapitel 7.5).

Visualisierung der $Fc\gamma$ Rezeptorverteilung

Die Visualisierung der $Fc\gamma$ -Rezeptoren auf den Membranaußenseiten der Makrophagen erfolgte durch Rezeptorfärbung mit einem primären Antikörper nach der Kultivierung auf Deckgläsern und Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, SIGMA-ALDRICH) wie in Abschnitt 5.7 beschrieben. Zunächst wurde die PFA-Lösung entfernt, die Zellen mit DPBS gespült und anschließend für 1 h in *Blocking Buffer* (94,7 % DPBS, 0,3 % Triton X-100, SIGMA-ALDRICH und 5 % Ziegenserum, CELL SIGNALING TECHNOLOGY, Danvers, Massachusetts) inkubiert. Der Blocking Buffer diente der Blockade von möglichen, unspezifischen Antikörperbindungsstellen und erhöhte die Qualität der Färbung, weshalb er nicht ausgewaschen wurde. Die Zellen wurden anschließend 1 h oder 24 h in Antikörperlösung, bestehend aus 1 % primärer IgG Fc-Fragment Ia CD64 Antikörper (Alexa Fluor 488, ANTIKÖRPER-ONLINE.DE GmbH, Aachen, Deutschland) und 99 % *Dilution Buffer* (98,7 % DPBS, 0,3 % Triton X-100, 1 % Bovines Serumalbumin (BSA, BIOCHROM)), inkubiert.

Die Aufnahmen von fluoreszenten Bilderstapeln von Zellen mit gefärbten $Fc\gamma$ -Rezeptoren erfolgte an dem Spinning-Disk-Mikroskop (siehe Abschnitt 6.1). Erstellt wurden DIC- und Fluoreszenzaufnahmen in einem Abstand von 0,25 μm in z-Richtung, mit einer 120-fachen Vergrößerung (100x Ölimmersionsobjektiv, 1.2x Kameralinse), einer Scheibengeschwindigkeit von 5000 upm und 50 % Intensität des 488 nm-Lasers, siehe Kapitel 7.3 sowie Abb. 7.4.

5.6 Probenvorbereitung & initiierte Phagozytose

Für mikroskopische Untersuchungen an lebenden Makrophagen wurden Deckgläser mit adhären Zellen in selbst designten und maßgefertigten Aluminiumobjektträgern mit entsprechender Aussparung montiert und mit Vakuumfett (KURT OBERMEIER GmbH & CO.KG, Bad Berleburg, Deutschland) fixiert. Die Aufnahme der Zellen erfolgten unter Standardbedingungen von 37 °C und kontrolliertem pH-Wert des umgebenden Mediums. Die Aufnahme von antikörperbeschichteten Mikropartikeln im Rahmen der Phagozytose konnte mittels Partikelsedimentation auf die Zelloberfläche initiiert werden oder mittels kontrolliertem Anbinden der Partikel an die Zellmembran mit Hilfe der holografischen optischen Pinzette [115]. Für beide Varianten wurden 80-90 μl Image-Medium inklusive der gewünschten Partikelkonzentration ($\sim 10^8$ Partikel/ml) und -größe auf die Zellen in die dafür vorgesehene Vertiefung der Aluminiumobjektträger gegeben. Zum Schutz vor Fremdkörpern und zur Verminderung von Verdunstungseffekten wurden Zellen und Image-Medium mit einem weiteren Deckglas abgedeckt, welches zusätzlich die Bildgebung in der

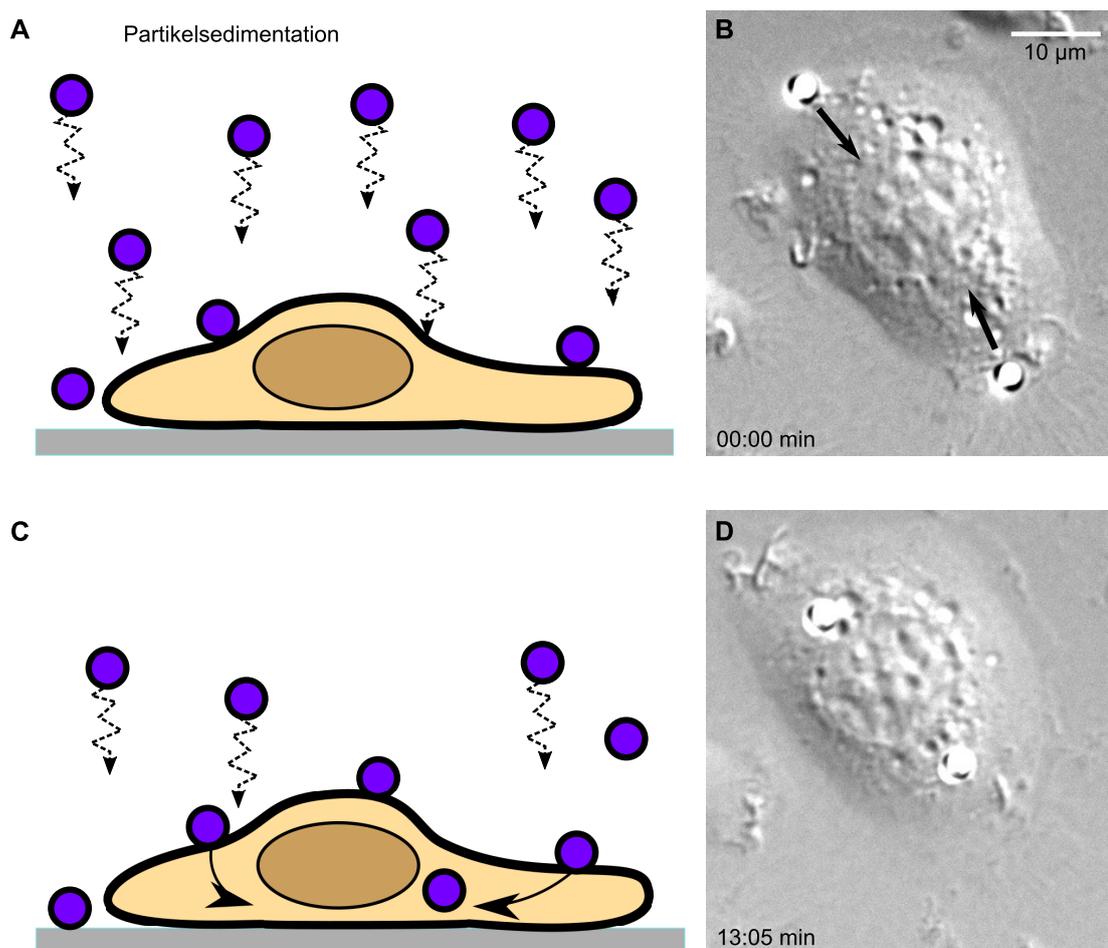


Abbildung 5.3. Die Abbildung zeigt die Einleitung der Phagozytose durch Partikelsedimentation. Teilgrafik (A) zeigt die seitliche, schematische Darstellung einer auf einem Deckglas adhären Zelle und Partikeln in einer Lösung, welche auf die Zelloberfläche sedimentieren. Grafik (B) stellt die gleichen Bedingungen innerhalb eines Experimentes in Draufsicht dar. Gezeigt ist eine Mausmakrophage, aufgenommen in DIC, und zwei sedimentierte 2 µm Polystyrolpartikel mit IgG-Beschichtung, welche bereits die Zellmembran erreicht haben. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Aufnahme und Analyse des Phagozytoseprozesses begonnen ($t = 0$ min). Grafik (C) zeigt dieselbe Zelle wie Grafik (A) zu einem späteren Zeitpunkt in der Seitenansicht. Partikel, welche bereits die Zellmembran erreicht hatten, wurden phagozytiert und innerhalb der Zelle Richtung Nucleus transportiert. Grafik (D) zeigt den gleichen Zeitpunkt im Experiment in der Draufsicht und in DIC. Die Partikel, welche in Grafik (B) bereits die Membran erreicht hatten, wurden bis zu diesem Zeitpunkt ($t = 13$ min) phagozytiert und transportiert.

Probe verbesserte.

Bei der Phagozytoseeinleitung durch Partikelsedimentation erreichten die Partikel in Abhängigkeit ihrer Größe und ihres Materials die Zelloberfläche innerhalb weniger Minuten bis hin zu mehreren Stunden (siehe Kapitel 7.2 und Abb. 5.3). Wurde ein wohldefinierter Startzeitpunkt der Phagozytose benötigt, wurde die Sedimentation der Partikel bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C durchgeführt (alternativ bei einer Lagerung der Deckgläser mit adhären Zellen auf Eis). Dies war der Fall bei den Experimenten zur Bestimmung der Phagosomenposition innerhalb der Zellen in Abhängigkeit der Phagozytosedauer. Die Phagozytose begann bei anschließender Erwärmung der Zellen mit einem Phagozytosemaximum bei ihrer physiologischen Temperatur [122]. Die Aufnahme der Pha-

gozytose und des anschließenden phagosomalen Transportes erfolgte mit einer Bildrate von 0,5-2 Hz bei einer Gesamtmessdauer von bis zu 2 h. Aufgrund der starken Fluktuationen kleiner Partikel in z-Richtung und somit Bewegungen aus der Fokusebene heraus wurde bei 1 μm Phagosomen jeweils eine weitere Ebene 1 μm ober- und unterhalb der Fokusebene aufgenommen, um diese Bewegung zu kompensieren (Reduzierung der Bildrate auf 0,2 Hz). Bei der Phagozytoseeinleitung mittels holografischer optischer Pinzette wurden bis zu 6 Fallen erzeugt (Gesamtlaserleistung: $P_{\text{Laser}} = 1 \text{ W}$) und im Probenmedium frei bewegliche Partikel gefangen. Diese wurden wenige Mikrometer ($\sim r_{\text{Partikel}} + 3 \mu\text{m}$) oberhalb des Deckglases platziert und einzeln an die Zellmembran durch Bewegung des jeweiligen HOT-Fokuspunktes in x-, y- und z-Richtung herangeführt. Nach Erreichen der Zellmembran wurde die entsprechende Falle abgeschaltet (vgl. Abb. 5.4). Der Phagozytoseprozess wurde mit einer Bildrate von 0,5-2 Hz aufgezeichnet bei einer Gesamtmessdauer von bis zu 2 h. Das Fangen von Polystyrolpartikeln mit 1 μm Durchmesser war aufgrund zu geringer Gradientenkräfte innerhalb des Partikels nicht möglich, daher musste hier auf Partikel aus Glas ausgewichen werden.

5.7 Nachweis einer erfolgreichen Phagozytose

Eindeutiges Merkmal einer erfolgreichen Aufnahme von extrazellulären Partikeln durch eine Makrophage war die vollständige Umschließung des Partikels mit Zellmembran. Diese Membran kann mittels eines fluoreszenten Membranfarbstoffes oder mittels Rasterelektronenmikroskopie direkt sichtbar gemacht werden. Alternativ kann die frei liegende Oberfläche von IgG-beschichteten Partikeln mittels eines sekundären Anti-IgG-Antikörpers visualisiert werden. Eine indirekte Nachweismethode war die Aufnahme und Charakterisierung der Phagosomenreifung, welche nach der Aufnahme des Partikels einsetzte. Für eine exemplarische Darstellung der diversen Nachweismethoden siehe Kapitel 7.4.

Visualisierung der Zellmembran mittels fluoreszentem Membranfarbstoff

Zur Visualisierung der Zellmembran wurde der Farbstoff FM 4-64 (MOLECULAR PROBES, Eugene, Oregon) verwendet. Dabei handelte es sich um eine lipophile Styrylverbindung, welche in wässriger Umgebung nicht zu sehen war, sich aber bei Einlagerung in die äußere Membranschicht der Zelle intensiv fluoreszent zeigte. Der Farbstoff (Anregung/Emission: 558/734 nm) wurde in Kombination mit dem G-2A Filter angeregt. Der Farbstoff ist laut Herstellerangabe nicht toxisch, erzeugte aber bei hoher Konzentration und länger anhaltender Beleuchtung ($t_{\text{Messung}} > 30 \text{ min}$) phototoxische Reaktionen der Makrophagen. Des Weiteren kam es bereits bei dem ersten Kontakt zwischen Zelle und FM 4-64 zur Endozytose des Farbstoffes, was in einer Zunahme der Fluoreszenz der gesamten Makrophage anstatt selektiver Fluoreszenz der Zellmembran resultierte (Abb. 7.5).

Für die Stammlösung wurden 1 mg FM 4-64 in 1 ml destilliertem Wasser gelöst, aliquotiert und bei -20° gelagert. Für die Arbeitslösung wurde die Stammlösung auf $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ mit Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, THERMO FISHER SCIENTIFIC) verdünnt (Verhältnis 1:20). Die gewünschte Menge an IgG-opsonierten Partikeln ($\sim 10^8$ Partikel/ml) wurde zur Arbeitslösung hinzugefügt. Anschließend wurden 85 μl auf die auf Deckgläsern ausgesäten und im Objektträger montierten Zellen (Wachstumszeit der Zellen mindestens 24 h) gegeben. Die Visualisierung der Zellen erfolgte direkt im Anschluss ohne zusätzliche Inkubationszeit oder Auswaschen des Farbstoffes.

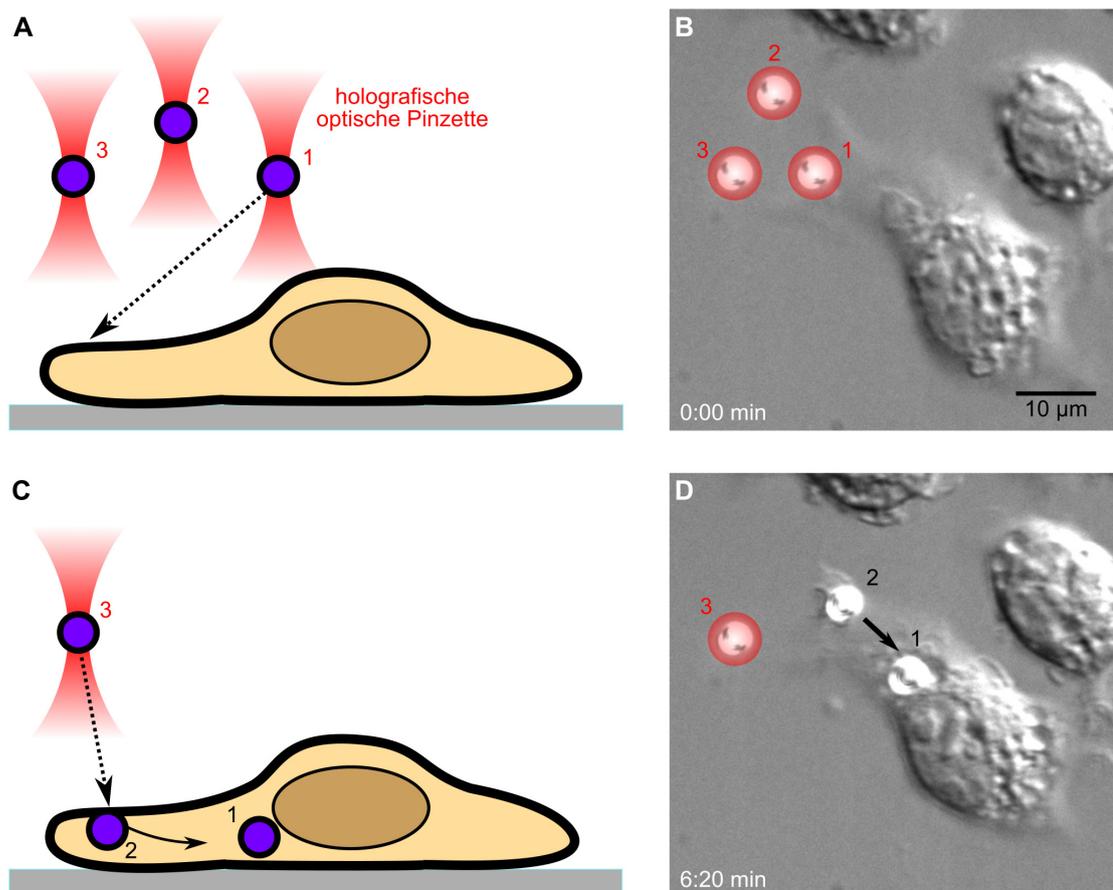


Abbildung 5.4. Die Abbildung zeigt die Einleitung der Phagozytose mittels holografischer optischer Pinzette (HOT). Grafik (A) zeigt die Seitenansicht einer auf einem Deckglas adhären-ten Zelle und drei Partikel, welche mittels HOT gefangen wurden (drei Laserfoki). Dies entspricht dem Startzeitpunkt der Messung und somit dem Beginn der Aufzeichnung und Analyse der Phago-zytose. Anschließend wurden die Partikel mittels Verschiebung der Laserfoki durch die HOT einzeln an die Zellmembran herangefahren (Pfeil) und die Falle abgeschaltet. Grafik (B) zeigt eine Mausmakrophage im Experiment zum Zeitpunkt $t = 0$ min (Startzeitpunkt) in Draufsicht in DIC. Des Weiteren sind drei $3 \mu\text{m}$ Polystyrolpartikel mit IgG-Beschichtung (1 bis 3) zu sehen, welche sich in den optischen Fallen befanden. (Die Einzelfallen der HOT sind durch rote Laserfoki gekenn-zeichnet.) Grafik (C) zeigt dieselbe Zelle wie Grafik (A) zu einem späteren Zeitpunkt, ebenfalls in schematischer Seitendarstellung. Die Partikel, welche bereits Kontakt zur Zellmembran hatten (1), wurden phagozytiert und in Richtung Nucleus transportiert. Wurde ein Partikel erfolgreich phago-zytiert (1 & 2), wurde das nächste gefangene Partikel (3) in Kontakt zur Zellmembran gebracht. Grafik (D) zeigt dieselbe Zelle wie Grafik (B), in Draufsicht & DIC, zu einem späteren Zeitpunkt ($t = 6$ min). Partikel (1) wurde bereits erfolgreich phagozytiert und zum Nucleus transportiert. Partikel (2) wurde in Kontakt mit der Zellmembran gebracht und die Falle wurde infolgedessen abgeschaltet. Dieses Partikel zeigte beginnenden Transport und wurde wahrscheinlich bereits phago-zytiert. Partikel (3) verbleibt in der Falle bis Partikel (2) den Nucleus erreichte und wurde dann ebenfalls an die Zellmembran herangefahren.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von den Zellen

Für die Betrachtung der Phagozytose an einem Rasterelektronenmikroskop wurden die Makrophagen für 24 h auf Deckgläsern in Zwölflochplatten kultiviert. Die IgG-beschichteten Partikel mit $1 \mu\text{m}$, $2 \mu\text{m}$ und $3 \mu\text{m}$ Durchmesser, wurden zweimal gespült (Zentrifugation der Partikellösung bei 20°C , 3500 g für 30 min; Lösen des Partikelpellets in DPBS), um überschüssige Antikörper aus der Lösung zu entfernen und eine Aktivierung

der Makrophagen durch nicht gebundenes IgG zu vermeiden. Anschließend wurden die Partikel in Image-Medium gelöst und in gewünschter Konzentration ($\sim 10^8$ Partikel/ml) den Zellen zugegeben. $1\ \mu\text{m}$ Partikel wurden 2,5 h, $2\ \mu\text{m}$ und $3\ \mu\text{m}$ Partikel 1,5 h bei 37°C inkubiert, um die Partikelsedimentation und die Phagozytose zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit DPBS gespült, um nicht phagozytierte Partikel zu entfernen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Entfernung des DPBS und Zugabe von $500\ \mu\text{l}$ Image-Medium inklusive 8% PFA und 2% Glutaraldehyd (SIGMA-ALDRICH). Nach 18 h bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut mit DPBS gespült, um das Fixiermedium zu entfernen. Anschließend wurden die Deckgläser hochkant und mit wohldefinierter Orientierung in einen Mehrfachdeckglashalter umgelagert. Dieser Halter einschließlich der Deckgläser wurde jeweils für 30 min mit aufsteigender Reihenfolge in 20%, 40%, 60%, 80%, 90% und dreimalig 100%-igen Ethanol inkubiert, um das Wasser in den Zellen durch Ethanol zu ersetzen. Die Herstellung von 100%-igem Ethanol erfolgte durch Aufreinigung und Entwässerung des kommerziellen Ethanols per Mikrofilter (GRÜSSING GmbH, Filsum, Deutschland). Die Dehydrierung der Zellen war notwendig, um Messungen im Vakuum und die Oberflächenbeschichtung der Zellen zu ermöglichen. Die Verwendung von Aceton zur Dehydrierung wurde im Rahmen der Masterarbeit von Adal Sabri ausgeschlossen, da diese Chemikalie die Polystyrolpartikel auflöste [123].

Nach der Dehydrierung wurden die Zellen getrocknet. Um dabei die Morphologie der Zellen zu erhalten und die Zellmembran nicht zu beschädigen, ist es üblich das überkritische Trocknungsverfahren zu nutzen. Dabei wird das intra- und extrazelluläre Ethanol durch flüssiges Kohlenstoffdioxid (CO_2) ersetzt, welches bei geeigneten Druck- und Temperaturbedingungen ohne Phasenumwandlung als überkritisches Fluid in den gasförmigen Zustand überführt werden kann (Kritischer Punkt CO_2 : 31°C , $73,8\ \text{hPa}$). Durch die Vermeidung des Phasenüberganges beim Verdampfen können Erhöhungen der Oberflächenspannung und dadurch die Zerstörungen mikroskopischer Strukturen minimiert werden. Durch technische Probleme mit der CO_2 -Zufuhr musste auf die überkritische Trocknung verzichtet werden, da der Ethanol nicht ersetzt werden konnte und die technischen Möglichkeiten nicht ausreichten, um den kritischen Punkt von Ethanol (215°C , $65,6\ \text{hPa}$) zu erreichen. Der Ethanol wurde infolgedessen bei Raumtemperatur verdampft, wobei sich dadurch entstandene Schädigungen der Zellmorphologie durch Risse in der Zellmembran äußern würden. Solche Oberflächenartefakte wurden kaum beobachtet (siehe Kapitel 7.4), was eine überkritische Trocknung für die Probenvorbereitung obsolet machte. Hilfestellung bei dem Versuch der überkritischen Trocknung leistete Rita Grotjahn (technische Assistentin, Zellbiologie und Elektronenmikroskopie, Universität Bayreuth). Die Lagerung der trockenen Zellen erfolgte ausschließlich im Vakuum, um eine erneute Hydrierung zu unterbinden.

Da das REM auf dem Heraustrennen von Elektronen aus einer festen Oberfläche mittels energiereicher Teilchen basiert, war nach der Trocknung der Zellen eine Beschichtung der Oberfläche mit einem leitenden Material notwendig. Als Beschichtung wurde Platin gewählt, welches mittels Sputterdeposition (Zerstäuben eines Materials unter Hochvakuum, welches sich anschließend auf dem Substrat ablagert) aufgebracht wurde. Dieser Arbeitsschritt wurde vollständig von Martina Heider (technische Assistentin, Makromolekulare Chemie I, Universität Bayreuth) durchgeführt. Der Probeneinbau sowie die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte ebenfalls durch Frau Heider an einem kommerziellen REM (Ultra plus FE-SEM, ZEISS, Oberkochen, Deutschland). Die Emission der Elektronen erfolgte per Feldemissionskathode, die Detektion per Inlens-SE-Detektor und Everhardt Thornley Kammer-SE-Detektor. Für diverse Aufnahmen siehe Abb. 7.6.

Sekundäre Antikörper Methode

Der Nachweis mittels sekundärem Antikörper erfolgte an fixierten Zellen. Dazu wurden die Zellen für 24-48 h auf Deckgläser in Zwölflochplatten kultiviert. Anschließend wurde die gewünschte Konzentration IgG beschichteter Partikel ($\sim 10^8$ Partikel/ml) hinzugefügt. Nach der gewünschten Phagozytosedauer (0-2 h) bei 37° wurde das Kulturmedium entfernt und die Probe dreimal mit je 1 ml DPBS pro Vertiefung gewaschen, um Mediumreste und nicht phagozytierte Partikel zu entfernen. Die Zellen wurden daraufhin mit je 500 μ l pro Vertiefung einer DPBS-PFA-Lösung mit 4% PFA für 15-20 min auf Eis fixiert. Um danach das PFA restlos zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit DPBS gespült. Anschließend wurden die Zellen für 60 min abgedunkelt und bei Raumtemperatur in 500 μ l DPBS und 5 μ l sekundärem Antikörper (goat anti-mouse cross-absorbed, AlexaFluor 350 & Dy-Light 488, THERMO SCIENTIFIC) inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen danach dreimal mit DPBS gespült. Abschließend wurde pro Vertiefung 500 μ l destilliertes Wasser zugegeben und die Deckgläser wurden mit 7 μ l Fluoromount-G (SOUTHERBIOTHECH, Birmingham, Alabama) auf Glasobjektträgern (SERVOPRAX, Wesel, Deutschland) fixiert. Nach einer Trocknungszeit von 24 h bei Raumtemperatur konnten die Proben für Bildaufnahmen genutzt werden (siehe Abb. 7.7). Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4°C . Exakte Protokolle siehe Anhänge A.3 & A.4.

Beobachtung des weiteren Phagosomenreifungsprozesses

Nach einer erfolgreichen Aufnahme von Fremdkörpern in ein Phagosom durch Makrophagen schlossen sich intrazelluläre Reifungsprozesse des Phagosomes an, welche mit einem Transport des Phagosomes von der Zellmembran zur perinuklearen Region korreliert waren. Trotz phagosomengrößenabhängiger Unterschiede in den Transporteigenschaften war diese zentripetale Bewegung der Phagosomen für alle Partikeldurchmesser beobachtbar und wurde als Anzeichen für eine erfolgreiche Phagozytose herangezogen. Im Gegensatz zur Beobachtung der Transportvorgänge konnten die oben genannten Nachweismethoden nur exemplarisch durchgeführt werden, nicht aber für die Gesamtheit aller in dieser Arbeit ausgewerteten Phagozytoseprozesse.

5.8 Aufbau & Funktionsweise des CrossCorrelation-Tracking Algorithmus

Nach erfolgreicher Phagozytose wurde die intrazelluläre Bewegung der Partikel mittels CrossCorrelation(CC)-Tracker (Kreuzkorrelations-Verfolgungs-Algorithmus) automatisiert aufgezeichnet. Der CC-Tracker basierte auf einem handgeschriebenen MATLAB Programm und lieferte eine subpixelpräzise Auflösung der Bewegung mit einer Genauigkeit von mehr als 0,05 px. Die Idee und die Basis des Algorithmus wurden von Holger Kress (2008, Yale University) programmiert, zur Verfügung gestellt und im Rahmen dieser Arbeit optimiert, angepasst und in eine grafische Benutzeroberfläche eingebunden. Abbildung 5.5 zeigt eine DIC-Zeitserie mit drei gefangenen Partikeln, welche nacheinander an die Zellmembran herangefahren wurden. Anschließend wurden die Fallen abgeschaltet und der Transportprozess der Partikel im Phagosom mit Hilfe des CC-Trackers nachverfolgt (farbige Punkte in den DIC-Aufnahmen A-F; schwarze Punkte solange die Falle an ist, violette Punkte nach Abschalten der Falle). Die von dem CC-Tracker errechneten Absolutkoordinaten wurden in Polarkoordinaten transferiert, wobei der Koordinatenursprung in die Mitte des Zellkernes gesetzt wurde. Dabei wurde der Zellkern in den aufgenommenen

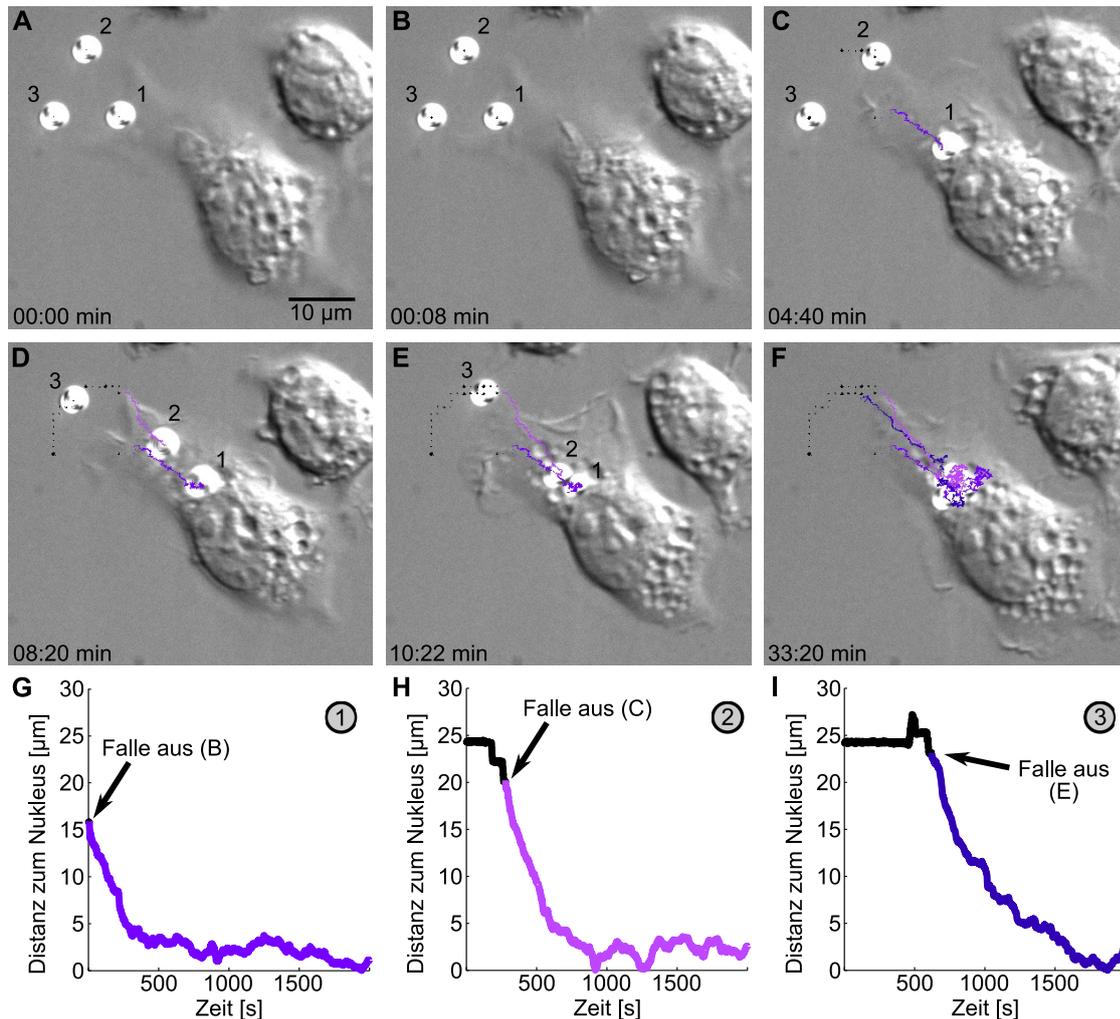


Abbildung 5.5. Verfolgung der intrazellulären Partikelverschiebung mittels Kreuz-Korrelations-Verfolgungs-Algorithmus (CC-Tracker) und Darstellung der resultierenden Bewegungstrajektorie. Die Grafiken (A)-(F) zeigen DIC-Aufnahmen einer Mausemakrophage zu verschiedenen Zeitpunkten. In dieser Makrophage wurde mittels HOTS die Phagozytose von drei IgG opsonisierten 3 µm Polystyrolpartikeln (1-3) initiiert (Details zum Ablauf siehe Abb. 5.4). Das aufeinanderfolgende Heranfahren der Partikel mittels optischer Falle, das Ausschalten der Fallen nach Partikel-Zellmembran-Kontakt und der anschließende intrazelluläre zentripetale Partikeltransport konnten mittels des CC-Trackers mit Subpixelgenauigkeit protokolliert und nachvollzogen werden. Die resultierenden Partikeltrajektorien wurden mittels farbiger Pixel in die DIC-Aufnahmen (A)-(F) projiziert. Dabei zeigen schwarze Pixel Zeitpunkte mit angeschalteter Falle und violette Pixel Zeitpunkte ohne Einfluss auf das Partikel von außen. Die Grafiken (G)-(I) zeigen die berechneten Partikelpositionen im zeitlichen Verlauf mit identischer Farbkodierung als Funktion des Abstandes zur Nukleusmembran. Das zeitlich versetzte Heranfahren der Partikel zur Herstellung des Partikel-Zellmembran-Kontaktes erfolgte in der Reihenfolge der Partikelnummerierung. Das Abschalten der Falle nach erfolgreichem Kontakt ist in den Grafiken mittels schwarzem Pfeil gekennzeichnet. Grafik (G) zeigt Partikel (1), Grafik (H) Partikel (2) und Grafik (I) Partikel (3). Der Abschaltzeitpunkt der Falle von Partikel (1) entspricht dem in Grafik (B) dargestellten Zeitpunkt, der von Partikel (2) dem in Grafik (C) dargestellten und der von Partikel (3) dem in Grafik (E) dargestellten. Deutlich erkennbar anhand der Trajektorien war ein Partikeltransport in Richtung Zellkern, wo die Bewegung endete, siehe Grafik (F).

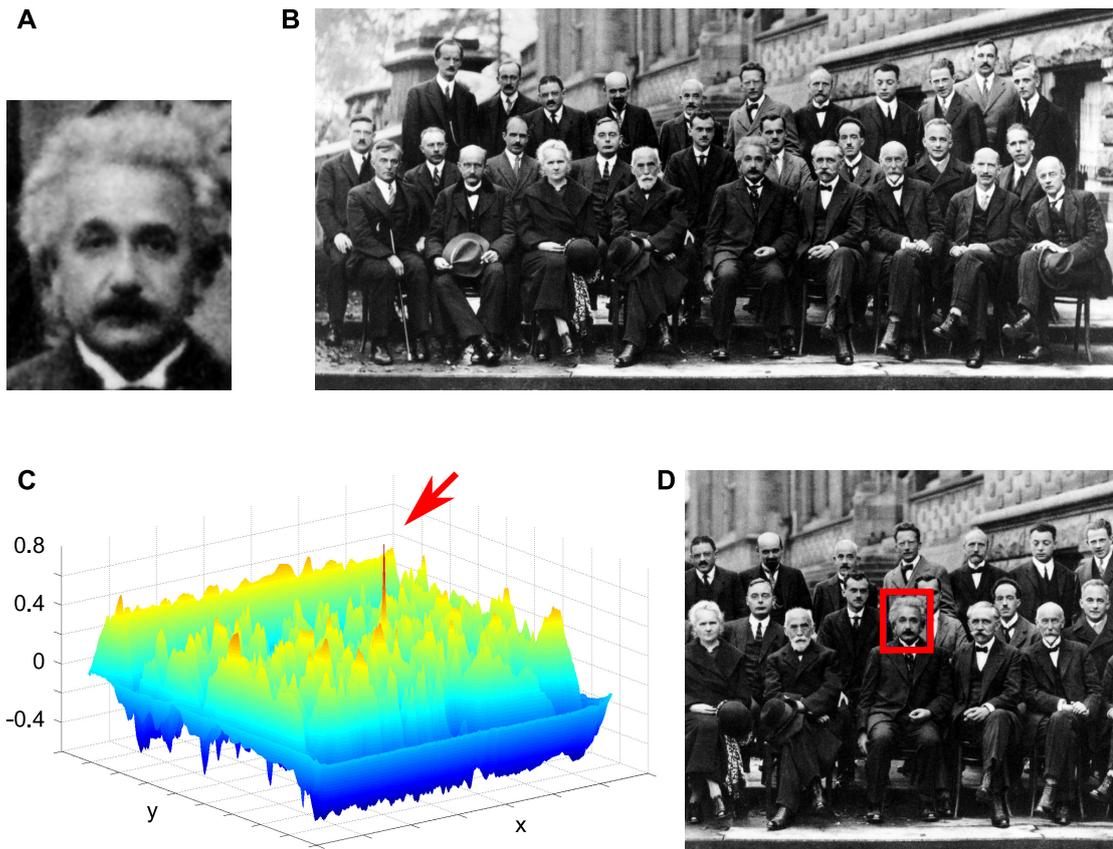


Abbildung 5.6. Die Abbildung zeigt die grundlegende Funktionsweise des CC-Trackers an einem allgemeinen Beispiel. Das Konterfei von Albert Einstein aus Grafik (A) soll innerhalb eines Gruppenbildes der V. Solvay-Konferenz (Zielbild) Grafik (B) detektiert werden, um die Position der Person zu bestimmen. Dazu wurde mittels MATLAB die Korrelationsmatrix der beiden Bilder berechnet, dargestellt als Oberflächenplot in Grafik (C). Der mittels rotem Pfeil markierte singuläre Peak in der Matrix gab die wahrscheinlichste (in dem hier dargestellten Spezialfall ferner die exakte) Position des Bildes aus (A) innerhalb des Bildes (B) an. Grafik (D) zeigt die Übertragung dieser Position in das Teilnehmerfoto (roter Rahmen). Die Position der Zielperson konnte erfolgreich bestimmt werden. Dieses Prinzip funktioniert analog für nicht menschenähnliche Strukturen, welche einmalig im Zielbild vorkommen und deutlich von der Umgebung abgegrenzt werden können. Das Bild der Konferenzteilnehmer wurde im Januar 1927 von Benjamin Couprie aufgenommen und vom Institut International de Physique de Solvay veröffentlicht (gemeinfrei).

Bildserien alle 5 min per Hand ausgewählt und seine Mittelpunktswegung in diesem Zeitintervall linear angenähert. Von den daraus resultierenden Bewegungskoodinaten wurde der jeweilige Partikelradius sowie der Radius des Nukleus subtrahiert, da sich so die Darstellung der Bewegung intuitiver gestaltet. Die finalen Transporttrajektorien der Partikel sind exemplarisch in Abbildung 5.5 *G-I* dargestellt.

Allgemeines Die grundlegende Idee des CC-Trackers war ein Referenzbild mit einem Zielbild zu korrelieren und anhand der Korrelationsmatrix die wahrscheinlichste Position des Referenzbildes innerhalb des Zielbildes zu bestimmen. Zur Veranschaulichung dieses Verfahrens dient Abbildung 5.6. Der Algorithmus sollte anhand eines Passbildes von Albert Einstein (Referenzbild, Teilabbildung 5.6A) seine Position innerhalb eines Gruppenbildes der Teilnehmer der V. Solvay-Konferenz über Elektronen und Photonen (Zielbild, Abb. 5.6B) bestimmen. Die Korrelationsmatrix der beiden Bilder ist in Abb. 5.6C dargestellt

und zeigte einen deutlichen, singulären Peak (roter Pfeil). Durch eine Übertragung der Peakposition in das Zielbild (Abb. 5.6D) konnte Albert Einstein (rotes Rechteck) erfolgreich identifiziert werden.

Voraussetzungen Anhand des einleitenden Beispiels werden die Voraussetzungen und Limitationen des CC-Trackers deutlich. Voraussetzung war eine Kontur, welche einmalig innerhalb des Zielbildes vorkam und deutlich von der Umgebung differenziert werden konnte. Geeignet waren beispielsweise Hellfeldaufnahmen von geometrischen Strukturen mit lokalem Intensitätsmaximum und konkreter Abgrenzung zur Umgebung, welche ihre Morphologie im Verlauf der Aufnahmen nicht änderten. Die Gründe hierfür werden in der detaillierten Beschreibung der Funktionsweise erläutert. Ideal waren daher kreisförmige Partikelprojektionen mit heller Mitte und dunklem Rand. Vergleiche Abbildung 5.7. Eine Überbeleuchtung oder eine Lokalisation des Partikels am Rand des Bildes musste für eine reibungsfreie Prozessierung der Aufnahmen vermieden werden. Eine Vorverarbeitung der Aufnahmen durch Anwendung von Filterfunktionen oder Ähnlichem war nicht notwendig.

Funktionsweise Ausgangspunkt für die Verwendung des CC-Trackers war eine Zeitserie von Hellfeldaufnahmen, wobei das phagozytierte Partikel so fokussiert wurde, dass es ein Intensitätsmaximum im Mittelpunkt umgeben von einem dunklen Ring zeigte. Diese einfache geometrische Struktur wurde anschließend mittels des Algorithmus in jeder Aufnahme der Zeitserie identifiziert und lokalisiert (Abbildung 5.7). Zur Festlegung eines Referenzbildes wurde zunächst die Aufnahme geladen, bei welcher die Nachverfolgung der Phagosomenbewegung starten sollte (Abb. 5.7A) und der Partikelmittelpunkt per Mausclick ausgewählt. Anhand dieses Mittelpunktes wurde das Referenzbild mit geringfügig größeren Abmessungen als die Partikelausdehnung aus der Aufnahme ausgeschnitten (Abb. 5.7A, violette, durchgezogenes Rechteck und im Detail 5.7B). Des Weiteren wurde eine *Scan-Region* mit identischem Mittelpunkt aber größeren Abmessungen als das Referenzbild (Abb. 5.7A, violette, gestricheltes Rechteck und im Detail 5.7C) festgelegt. Zur Reduzierung von Rechenleistung und -dauer wurde die Korrelation von Referenzbild und Zielbild nur innerhalb der *Scan-Region* des Zielbildes durchgeführt.

Die Berechnung der Korrelationsmatrix erfolgte mittels MATLAB-integriertem Befehl `normxcorr2`. Dieser Befehl nutzte die Funktion:

$$\gamma(u, \nu) = \frac{\sum_{x,y} [f(x, y) - \bar{f}_{u,\nu}] [t(x - u, y - \nu) - \bar{t}]}{\left\{ \sum_{x,y} [f(x, y) - \bar{f}_{u,\nu}]^2 \sum_{x,y} [t(x - u, y - \nu) - \bar{t}]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}},$$

wobei f die *Scan-Region*, \bar{t} der Mittelwert des Referenzbildes und $\bar{f}_{u,\nu}$ der Mittelwert von $f(x, y)$ innerhalb der Region des Referenzbildes in der *Scan-Region* war [124]. Die Funktion erstellte somit die normalisierte Kreuzkorrelation aus Referenzbild und Zielbild, wobei das Zielbild größer sein musste und die einzelnen Pixelwerte des Referenzbildes nicht identisch sein durften. Aus diesen Gründen durfte das Partikel sich nicht am Bildrand befinden oder überbeleuchtet sein. Die Ausgabematrix enthielt die Werte der Korrelationskoeffizienten zwischen -1 und 1 und ist in Abb. 5.7D in 3D dargestellt, wobei die Partikelposition deutlich als Peak erkennbar ist. Diese Maximalwerte der Korrelationsmatrix kennzeichneten die Partikelposition im Zielbild mit Pixelgenauigkeit.

Bei der Darstellung der Korrelationsmatrix in 2D (Abb. 5.7E) wird deutlich, dass die exakte Partikelposition sich meist im Zwischenraum einzelner Pixel befand. Um eine subpixel-präzise Auflösung der Position zu erhalten, wurde die Korrelationsmatrix entlang je einer

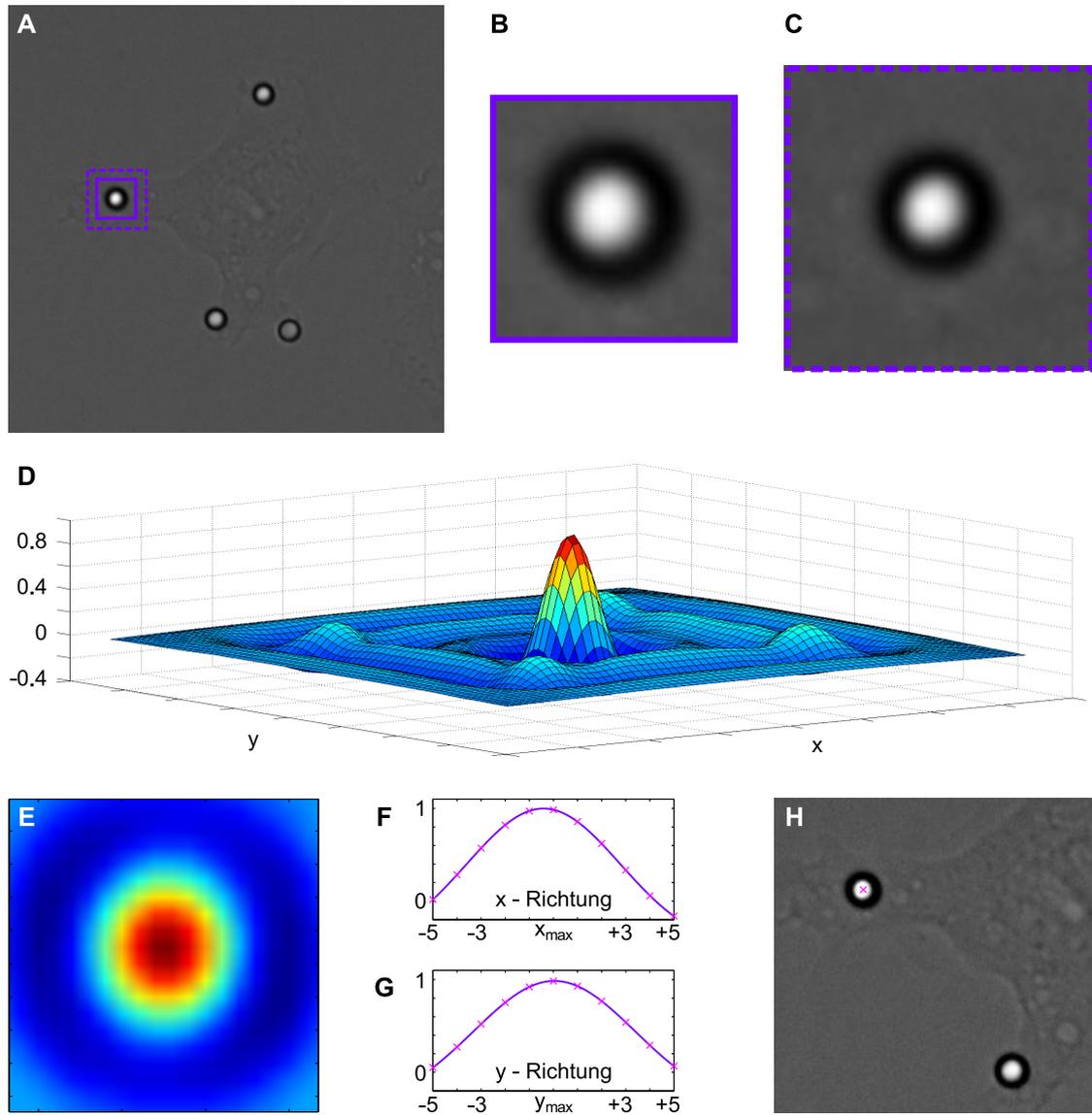


Abbildung 5.7. Die Abbildung zeigt die Detektion eines ausgewählten Partikels innerhalb eines Zielbildes zu einem beliebigen Zeitpunkt. Grafik (A) zeigt eine Hellfeldaufnahme einer Mausmakrophage zum Startzeitpunkt der initiierten Phagozytose von $3\ \mu\text{m}$ IgG-opsonierten Polystyrolpartikeln. Das nachzuverfolgende Partikel wurde mit einem Intensitätsmaximum im Partikelinneren abgebildet. Dieser Partikelmittelpunkt wurde per Mausklick angewählt. Als Referenzbild für den CC-Tracker wurde ein Bildausschnitt mit geringfügig längeren Kanten als der Partikeldurchmesser erstellt, dargestellt in Grafik (A) als durchgezogenes violettes Quadrat & vergrößert in Grafik (B). Zur Optimierung von Rechenleistung wurde eine *Scan-Region* innerhalb des Zielbildes erstellt, welche deutlich kleiner war als das Zielbild selbst, aber größer als das Referenzbild, dargestellt in Grafik (A) als gestricheltes violettes Quadrat & vergrößert in Grafik (C). Grafik (D) zeigt die errechnete Korrelationsmatrix aus Referenzbild und *Scan-Region* in 3D und Grafik (E) in 2D. Die pixelgenaue Partikelposition ist durch den roten Peak gekennzeichnet. Anhand der 2D-Darstellung wurde deutlich, dass die exakte Partikelposition innerhalb eines Pixels lag. Zur optimierten Positionsbestimmung wurde entlang einer Geraden in x- sowie y-Richtung durch das Maximum der Korrelationsmatrix eine Gaußkurve gefittet, Grafik (F) & (G). Das Fitmaximum ermöglichte eine subpixelexakte finale Partikelpositionsbestimmung, welche in Grafik (H) mittels **X** gekennzeichnet ist.

Linie in x- und y-Richtung (inklusive des jeweiligen Maximalwertes) mit einer Gaußfunktion ($f(x)_{gau} = a + b \cdot \exp[-(\frac{x-c}{d})^2]$) gefittet (dargestellt in Abb. 5.7F x-Richtung und Abb. 5.7G y-Richtung). Das Maximum der Fitkurven bestimmte somit die exakte Position des Partikels im Zielbild. Das Programm zur Durchführung der x- und y-Linienextrahierung sowie dem Fit der Werte mittels Gaußfunktion wurde von Holger Kress (2008, Yale University) programmiert und zur Verfügung gestellt und unverändert verwendet.

Die subpixelpräzisen Partikelpositionen wurden in Kombination mit dem Zielbild zur Kontrolle ausgegeben (Abb. 5.7H), gespeichert und für alle Zeitpunkte der Aufnahmenserie kalkuliert. Nach der erfolgreichen Bestimmung der Position wurde zu jedem Zeitpunkt der Mittelpunkt der *Scan-Region* an den aktuellen Partikelmittelpunkt angepasst, wodurch Bewegungen des Partikels ausgeglichen werden konnten. Auf eine Anpassung des Referenzbildes an den aktuellen Zeitpunkt wurde verzichtet, um mögliche Fehlerquellen zu minimieren. Stattdessen wurde, soweit möglich, stets die Korrelation mit dem Referenzbild zum Zeitpunkt $t = 0$ kalkuliert. Dies setzte allerdings voraus, dass die Morphologie und die Fokusebene des Phagosomes über die Zeit konstant waren.

Parameter Die zur Nutzung des CC-Tracker-Algorithmus notwendigen Parameter waren die Größe des Referenzbildes, welche an die Partikelausdehnung angepasst wurde, und die Größe der *Scan-Region*, welche größer als die Abmessungen des Referenzbildes sein musste und hinsichtlich der Laufzeit des Algorithmus optimiert wurde. Dabei wurde die *Scan-Region* noch hinreichend groß gewählt, um die Partikelbewegung zwischen den Zeitschritten der Aufnahmen kompensieren zu können. Des Weiteren konnte die Anzahl der Punkte, welche für den Gaußfit aus der Korrelationsmatrix extrahiert wurden, festgelegt werden. Außerdem wurde Start- und Endzeitpunkt der Partikelnachverfolgung durch Eingabe der zu analysierenden Aufnahmen spezifiziert. Für anschließende Darstellungen der Partikelpositionen in Mikrometern als Funktion der Aufnahmezeitpunkte (vgl. Abb. 5.5) waren die Vergrößerung des Mikroskops, die Pixelgröße der Kamera und die Bildaufnahme rate als Parameter anzugeben.

Zusätzlich konnte festgelegt werden, ob das Referenzbild zu jedem Zeitpunkt angepasst werden sollte, wobei diese Funktion nicht genutzt wurde. Eine Anpassung des Referenzbildes erfolgte ausschließlich per Hand nach einer Fehlermeldung oder Veränderung der Phagosomenfokusebene. Sollte eine automatisierte Erkennung der Partikelposition in Einzelfällen nicht möglich gewesen sein, bestand die Möglichkeit die Partikelposition per Hand festzulegen, was die Präzision der Positionsbestimmung allerdings auf Pixelgenauigkeit reduzierte.

Fehlermeldungen & Ergänzungen Der CC-Tracker erkannte selbstständig Partikelpositionen außerhalb der *Scan-Region* sowie Positionen am Bildrand. Des Weiteren wurden die errechneten Positionen auf ihre Lage innerhalb der angegebenen Grenzen und die Möglichkeit zur Durchführung eines Gaußfittes überprüft.

Verbesserungen des Programms ergaben sich durch eine Gaußfitfunktion in 2D anstatt ausschließlich entlang einer Linie je in x- und y-Richtung sowie eine Verfolgung der Partikel in z-Richtung. Diese Möglichkeiten wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet.

5.9 Kriterien für phagosomale Transporteigenschaften

Für Experimente, in denen die Phagozytose mittels Sedimentation initiiert wurde, startete die Nachverfolgung der Partikel, sobald diese die Fokusebene der zugehörigen Zelle erreicht hatten und auf die Zellmembran abgesunken waren. Für Experimente, in denen die Phago-

zytose mittels HOT initiiert wurde, startete die Nachverfolgung der Partikel, sobald diese in Kontakt mit der Zellmembran gebracht und die dazugehörige Falle ausgeschaltet wurde. Vergleiche Abbildung 5.5. Repräsentative Trajektorien von Partikeln mit 1 μm , 2 μm und 3 μm Durchmesser sind in Abbildung 7.11 dargestellt, auch hier in Form von Polarkoordinaten, Details hierzu siehe Abschnitt 5.8. Die Zeitserien der resultierenden Partikeltrajektorien wurden in Segmente von 30 s unterteilt (Intervalldauer angelehnt an [74]), was eine typische Größenordnung von intrazellulären Transportprozessen darstellt, aber gleichzeitig bei einer Bildaufnahmerate von 0,2 bis 2 Hz eine zu starke Gewichtung diverser Fluktuationen verhindern sollte. Jedes dieser Segmente wurde als aktiver ballistischer intrazellulärer Phagosomentransport klassifiziert, wenn die innerhalb der 30 s zurückgelegte absolute Distanz den Schwellwert von 400 nm (angelehnt an [74]) überschritt. Dabei war die Richtung des Transportes (zum Zellkern oder zur Zellperipherie) irrelevant. Wurde der Schwellwert aufgrund von einer stationären Partikelposition oder häufigen Fluktuationen der Transportrichtung verbunden mit kurzreichweitigen Bewegungen nicht erreicht, erfolgte eine Segmentklassifizierung als passive Phase. Eine Variation des Schwellwertes bis 75 % zeigte nur vernachlässigbare Effekte auf die Analyse der phagosomalen Transporteigenschaften. Vergleiche hierzu Abbildung 7.16.

Eine detaillierte, quantitative Analyse der Trajektorien erfolgte basierend auf folgenden Kriterien:

i - Prozentsatz an Trajektorien, mit starkem zentrifugalen Transport (Rücktransport)

Der Prozentsatz an Trajektorien p_{back} , welche einen starken Rücktransport in die Zellperipherie zeigten, berechnete sich aus dem Anteil der Trajektorien von Phagosomen, die nach Erreichen des Nukleus (Kontakt von Nukleusmembran und Partikeloberfläche) die perinukleare Region wieder verließen und Richtung Zellmembran transportiert wurden. Die perinukleare Region wurde dabei als ein 5 μm ausgedehnter Bereich angenommen, welcher sich direkt an den Nukleus anschließt [65]. Zum Verlassen der perinuklearen Region musste die Distanz zwischen Nukleusmembran und der Partikeloberfläche somit auf mehr als 5 μm ansteigen. Exemplarisch dargestellt ist dies in Abbildung 7.11 A.

ii - Relativer Anteil der Transportphasen Die möglichen Transportphasen untergliederten sich in den Prozentsatz von aktivem phagosomalen Transport in Richtung des Zellkerns (zentripetal) p_{nuc} , den Prozentsatz von aktivem Transport in Richtung der Zellperipherie (zentrifugal) p_{per} und den Prozentsatz von passiven Phasen p_{pass} . Der Prozentsatz von aktivem Transport wurde anhand der zurückgelegten Distanz der aktiven Transportsegmente berechnet. Eine negative Transportdistanz bedeutete ein Segment mit zentripetalem Transport und eine positive Transportbilanz zentrifugalen Transport. Der Anteil an passiven Phasen wurde direkt aus den anderen Prozentsätzen bestimmt $p_{\text{pass}} = 1 - p_{\text{nuc}} - p_{\text{per}}$. Abbildung 7.11 C zeigt eine Trajektorie mit einem hohen Anteil an aktivem zentripetalem Transport und passiven Phasen nach Erreichen der perinuklearen Region.

iii - Instantane Transportgeschwindigkeit Für die instantane Transportgeschwindigkeit v_{inst} wurde die Partikelbewegung in jedem aktiven Segment mittels linearem Fit angenähert. Aus der Steigung der Fitfunktion konnte die Geschwindigkeit direkt bestimmt werden. Die Geschwindigkeit wurde als positiv definiert bei zentripetaler Bewegung (negative Nettodistanz des aktiven Segments) und als negativ bei zentrifugaler Bewegung (positive Nettodistanz).

iv - Distanz des aktiven Transportes Die aktiv zurückgelegte Transportdistanz d_{tot} war die Summe aller zurückgelegten Distanzen der aktiven Transportsegmente unter Beachtung der jeweiligen Transportrichtung (positives/ negatives Vorzeichen).

v - Gesamtdauer des aktiven Transportes Die Gesamtdauer des aktiven Transportes t_{tot} war das Produkt aus der Anzahl der aktiven Transportsegmente unabhängig ihrer Transportrichtung und der Dauer eines Einzelsegmentes (30 s).

vi - Effektive Transportgeschwindigkeit Die effektive Geschwindigkeit des aktiven Transportes v_{eff} war der Quotient aus der aktiv zurückgelegten Transportdistanz (iv) und der dafür benötigten Gesamtzeit (v), $v_{\text{eff}} = d_{\text{tot}}/t_{\text{tot}}$. Analog zur instantanen Geschwindigkeit wurde eine positive Geschwindigkeit auch hier als Bewegung in Richtung der perinuklearen Region definiert.

vii - Persistenz der Bewegung Die Persistenz der Bewegung p war ein Maß für die Häufigkeit der Änderungen der Transportrichtungen. Dazu wurde von jedem aktiven Segment der Prozentsatz bestimmt, mit dem zwei aufeinanderfolgende Transportschritte in die gleiche Richtung erfolgen. Anschließend wurden die Prozentsätze aller aktiven Segmente eines Transportvorganges gemittelt, um die Persistenz p der dazugehörigen Trajektorie zu bestimmen.

viii - Prozentsatz ausgedehnter Pausenphasen Der Prozentsatz ausgedehnter (engl. *extended*) Pausenphasen, $p_{\text{ext-pause}}$, wurde nur für den Transportbereich angegeben, bevor das Phagosom das erste Mal den Nukleus erreichte. Wurde in drei aufeinanderfolgenden Transportsegmenten unabhängig ihrer Klassifizierung nach Paragraph (ii) der Schwellwert für aktiven Transport ($TH_{\text{aktiver-Transport}} = 800 \text{ nm min}^{-1}$, d.h. für 3 Segmente a 30 s, $TH_{\text{Distanz}} = 1,2 \mu\text{m}$) unterschritten, galten sie als ausgedehnte Pausenphase. Der Prozentsatz der ausgedehnten Pausen bezog sich auf alle solcher Kombinationen aufeinander folgender Segmente einer Trajektorie bis Erreichen des Kerns. Abbildung 7.11B zeigt ein Beispiel für eine ausgedehnte Pausenphase innerhalb des ersten Trajektorienabschnittes für ein Phagosom mit $2 \mu\text{m}$ Durchmesser.

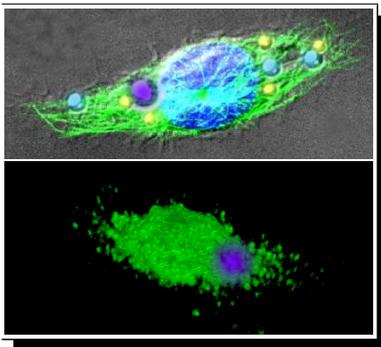
Um die anfängliche Phagosomenreife besser charakterisieren zu können, wurden die Kriterien (ii) und (viii) nur für den Transport des Phagosomes bis zum Erreichen der Nukleusmembran berechnet. Für alle anderen Parameter war die Dauer des analysierten Transporters abhängig von den Eigenschaften der Trajektorie. Zeigte die analysierte Trajektorie keinen starken zentrifugalen Transport ((i), kein Verlassen der perinuklearen Region) wurden für diesen Transportvorgang alle oben aufgeführten Kriterien nur für den Transport bis zum ersten Kontakt mit dem Nukleus berechnet. Der Kontaktzeitpunkt wurde somit als Endzeitpunkt des Phagosomentransportes t_{end} definiert. Abbildung 7.11C zeigt ein Beispiel einer Trajektorie ohne starken zentrifugalen Transport. Der Endzeitpunkt des Transportes war hier bei $t_{\text{end}} = 1084 \text{ s}$. Wies die Trajektorie hingegen einen starken Rücktransport auf (Verlassen der perinuklearen Region) wurde die Zeitdauer der Analyse der Trajektorie erweitert. Der Endpunkt t_{end} wurde 10 min nach dem Zeitpunkt, an dem die perinukleare Region zum ersten Mal wieder verlassen wurde $t_{\text{TH-Rücktransport}}$, definiert. Ein Beispiel für eine Trajektorie mit starkem zentrifugalen Transport ist in Abbildung 7.11A zu sehen. Der Zeitpunkt, zu dem die perinukleare Region das erste Mal verlassen wurde, war $t_{\text{TH-Rücktransport}} = 2085 \text{ s}$. Dieser Zeitpunkt konnte dabei nie vor dem ersten

Kontakt zwischen Phagosom und Nukleus erreicht werden. Der Endpunkt für die Trajektorienanalyse war somit 10 min später, $t_{\text{end}} = t_{\text{TH-Rücktransport}} + 10 \text{ min} = 2685 \text{ s}$. Der additive Wert von 10 min erwies sich als guter Kompromiss zwischen zusätzlicher Analyse der Trajektorien und dem durchschnittlichen Endzeitpunkt der Trajektorien, begrenzt durch eine endliche Aufnahmedauer.

Für die Vergleichsdarstellung zwischen Messungen an Ciliobrevin A behandelten Zellen und Cytochalasin D behandelten Zellen wurde die instantane Geschwindigkeit der Bewegung (iii) nur für den anfänglichen Transport bis zum Erreichen des Nukleus berechnet. Dies hatte ausschließlich organisatorische Gründe, da die Messungen an Cytochalasin D behandelten Zellen an einem anderen Aufbau durchgeführt wurden, Details hierzu siehe Kapitel 6.6.

Signifikanztests zur Differenzierung der Verteilung der Resultate analysierter Transporteigenschaften in Abhängigkeit der Phagosomendurchmesser wurden mittels Studentischem T-Test und der in MATLAB implementierten Funktion *ttest2* zum Vergleich zweier unabhängiger Proben durchgeführt.

Visualisierung des Zytoskelettes, Untersuchungen zu intrazellulären Transportmotoren & Einfluss inhibitorischer Medikamente auf den phagosomalen Transport



Dieses Kapitel beschreibt die Grundlagen und die Möglichkeiten zur Visualisierung von intrazellulären Strukturen in fixierten Zellen mittels fluoreszenter Farbstoffe, ohne dabei die Morphologie der Zellen verfälscht abzubilden oder die Position von Phagosomen zu verändern. Begonnen wird dabei mit den notwendigen technischen Voraussetzungen, gefolgt von der Beschreibung und Anwendung geeigneter Farbstoffe sowie zuletzt die qualitative und quantitative Analyse der gewonnenen Daten. Des Weiteren beschäftigt sich dieses Kapitel mit den Möglichkeiten

gezielt intrazellulären Transport zu beeinflussen und zu unterbinden. Hierzu werden diverse Medikamente und entsprechende Verfahrenstechniken präsentiert.

6.1. Spinning Disk Mikroskopie	76
6.2. Fixierung von Zellen & Immunfärbung	76
6.3. Zytoskelett & Motorprotein-Farbstoffe	77
6.4. Anfärbung von Aktinfilamenten	78
6.5. Analyse der Fluoreszenzaufnahmen	78
6.6. Manipulation zellulären Transportverhaltens	82

6.1 Spinning Disk Mikroskopie

Um relevante intrazelluläre Strukturen, welche mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert wurden, mit einer möglichst hohen Auflösung in lateraler und axialer Richtung abbilden zu können, ist die Nutzung eines konfokalen Mikroskops notwendig. Dazu wurde in dieser Arbeit ein DMI 6000 Mikroskop (LEICA, Wetzlar, Deutschland) mit einem 100x/1,40 Öl-Immersionsobjektiv (HCX PL APO) genutzt. Ausgestattet war das Mikroskop mit einer zusätzlichen Spinning Disk Einheit (CSU-X1, YOKOGAWA, Musashino, Japan) und einer EMCCD Kamera (Evolve 512, PHOTOMETRICS, Tucson, Arizona) sowie einer zusätzlichen Linse mit einer 1,2-fachen Vergrößerung. Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe standen ein 100 mW 405 nm Laser (Cube 405-100C, COHERENT, Santa Clara, Kalifornien), ein 50 mW 488 nm Laser (Sapphire 488, COHERENT) sowie eine 50 mW 561 nm Laser (Sapphire 561, COHERENT) zu Verfügung. Es wurde unabhängig des genutzten Lasers bei einer Scheibengeschwindigkeit von 5000 upm gemessen. Der Abstand zwischen aufeinanderfolgenden z-Ebenen bei allen aufgenommenen Bilderstapeln betrug 0,25 µm, welcher für eine Überabtastung unter Beachtung der möglichen z-Auflösung des Mikroskops ausreichend ist [125]. Bei Hellfeld- und DIC-Aufnahmen wurde auf einen z-aufgelösten Bilderstapel verzichtet und nur die Fokusebene, in welcher sich der Phagosomenmittelpunkt befand, abgebildet.

6.2 Fixierung von Zellen & Immunfärbung

Um intrazelluläre Strukturen mittels Fluoreszenzfarbstoff sichtbar und quantifizierbar zu machen, wurde eine Immunfärbung (engl. *Immunostaining*) angewandt. Dabei handelt es sich um eine Markierung der Zielstrukturen mit einem strukturspezifischen, primären Antikörper, dessen Position anschließend durch einen für den primären Antikörper spezifischen sekundären Antikörper, gekoppelt mit einem Fluorophor, gekennzeichnet wurde. Um eine exklusive Markierung der Zielstruktur zu gewährleisten und Kreuzreaktionen zu vermeiden, sollte der primäre Antikörper in einem Wirt kultiviert worden sein, welcher nicht dem Organismus der Zielstruktur entspricht. Der sekundäre Antikörper wurde spezifisch für den Wirt des primären Antikörpers gewählt und reagierte somit nicht mit intrazellulären Kompartimenten, die dem Organismus der Zielstruktur zugehörig sind. Daher wird diese Methode auch als Antikörper-Antikörper-Färbung bezeichnet.

Voraussetzung für die Immunfärbung ist, dass die Zellen immobilisiert werden. Dazu wurde der Metabolismus der Zellen gestoppt, während Morphologie und intrazelluläre Strukturen unverändert blieben. Diese sogenannte Fixierung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 5.7 beschrieben. Nach Kultivierung der Zellen auf Deckgläsern in Zwölflochplatten für 24-48 h, Zugabe der gewünschten Partikelkonzentration ($\sim 10^8$ Partikel/ml), 0-2 h Zeit für die Phagozytose der Partikel bei 37 °C und anschließendem Spülen der Zellen mit DPBS wurden die Zellen für 15-20 min auf Eis in 4%-PFA-Lösung fixiert.

Nach der Fixierung wurde die PFA-Lösung entfernt und die Zellen erneut dreimal mit DPBS gespült. Anschließend wurden die Zellen für 60 min in *Blocking Buffer* bei Raumtemperatur inkubiert. Der *Blocking Buffer* dient dem Blocken unerwünschter Bindungsstellen für den sekundären Antikörper sowie der Überwindung der Zellmembran und besteht aus 94,7% DPBS, 0,3% Triton X-100 (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri) und 5% Ziegen Serum (CELL SIGNALING, Cambridge, Großbritannien). Das Triton dient der Permeabilisierung der Zellmembran, damit diese durchlässig wird für den primären und sekundären Antikörper. Das Serum sollte identisch mit dem Wirt des sekundären Antikörpers gewählt werden, um bestmögliche, rauscharme Resultate zu erhalten. Um die

Wirkung des *Blocking Buffers* zu erhalten, wurde dieser nach dem Entfernen nicht ausgespült, stattdessen wurden die Zellen direkt in einer primären Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung bestand aus der gewünschten Menge primärer Antikörper (siehe Abschnitt 6.3) und einem Lösungspuffer, zusammengesetzt aus 98,7% DPBS, 0,3% Triton X-100 und 1% Bovines Serumalbumin (BSA, APPLICHEM, Darmstadt, Deutschland). Die Zugabe von BSA diente der Saturierung unspezifischer, intrazellulärer Bindungsstellen und verhinderte somit das Anbinden des primären Antikörpers an diese. Zur Entfernung überschüssiger, ungebundener, primärer Antikörper wurden die Zellen anschließend dreimal mit DPBS gespült. Darauf folgend wurden sie für 2h abgedunkelt und bei Raumtemperatur in einer weiteren Antikörperlösung bestehend aus der gewünschten Menge sekundärer Antikörper (siehe Abschnitt 6.3) in Lösungspuffer inkubiert und danach erneut dreifach mit DPBS gespült. Im Anschluss wurde eine neue Antikörper-Lösung hinzugegeben, welche einer zusätzlichen Anfärbung der Zell DNS respektive bei Zellen außerhalb der Mitose dem Zellkern diente und nicht Teil der Immunfärbung war. Dazu wurde der Farbstoff Hoechst 33342 (CAYMAN, Ann Arbor, Michigan) im Verhältnis 1:1000 in Lösungspuffer gelöst und die Zellen darin 2 min bei Raumtemperatur und abgedunkelt inkubiert. Erneut wurden die Zellen dreimal mit DPBS gespült. Nachdem das DPBS restlos entfernt und durch destilliertes Wasser (THERMO FISHER) ersetzt wurde, wurden die Deckgläser mit je 7 µl Fluoromount-G auf Glasobjektträger aufgebracht und für mindestens 24 h bei Raumtemperatur getrocknet.

6.3 Farbstoffe für das Zytoskelett & molekulare Motoren

Ein wichtiger Bestandteil des Zytoskelettes einer Säugerzelle sind die Mikrotubuli, welche auch als essenzielle Struktur für langreichweitigen, phagosomalen Transport gelten [10]. Zur Visualisierung intakter MT wurde als primärer Antikörper α -Tubulin (DM1A) Maus-Antikörper (CELL SIGNALING) mit einer Konzentration von 1:100 - 1:1000 und als sekundärer Antikörper Anti-Maus (H+L) IgG DyLight 488 (THERMO FISHER) oder Alexa Fluor 594 (CELL SIGNALING) mit einer Konzentration von 1:100 - 1:200 verwendet. H+L steht dabei für *heavy & light chain* und beschreibt die Anbindungsspezifität des Antikörpers. Für die Aufnahme der Bilderstapel am Spinning Disk Mikroskop (Details siehe Abschnitt 6.1) wurde für die Anregung des DyLight 488 Farbstoffes der 488 nm Laser und für des Alexa Fluor 594 Farbstoffes der 561 nm Laser verwendet. Der DNA-Farbstoff Hoechst 33342 wurde durch den 405 nm Laser angeregt.

Unerlässliche Motoren für langreichweitigen, phagosomalen Transport entlang der MT sind Dynein und Kinesin, je nach Richtung, in welcher der Transport erfolgen soll [10]. Zur Visualisierung intrazellulären Dyneins wurde der primäre Antikörper DYNC 1|2 Hase Antikörper (THERMO SCIENTIFIC), Konzentration 1:200, und der sekundäre Antikörper Anti-Hase IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (THERMO SCIENTIFIC), Konzentration 1:100, verwendet. Die Anregung des Farbstoffes erfolgte mit dem 488 nm Laser. Zur Anfärbung von intrazellulärem Kinesin-2 wurde der primäre Antikörper KIF3A Hase Antikörper (THERMO SCIENTIFIC), Konzentration 1:50 - 1:100 und der sekundäre Antikörper Anti-Hase IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (THERMO SCIENTIFIC), Konzentration 1:100 - 1:200, verwendet. Zur Visualisierung von Kinsein-1 wurde der primäre Antikörper KIF5B Hase-Antikörper (THERMO SCIENTIFIC), Konzentration 1:250, und die sekundären Antikörper Anti-Hase IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (THERMO SCIENTIFIC) sowie Anti-Hase IgG 594 (THERMO SCIENTIFIC), Konzentration 1:150, verwendet. Für die Anregung der 488er Farbstoffe wurde der 488 nm Laser sowie der 594er Farbstoffe der 561 nm Laser genutzt.

Ein weiterer Bestandteil des Zytoskelettes mit hoher Relevanz für intrazellulärem Transport sind Aktinfilamente, welche in dieser Arbeit mit Phalloidin (A12381, MOLECULAR PROBES) nach einem abweichenden Protokoll angefärbt wurden, siehe Abschnitt 6.4. Entlang der AF können sich die für kurzreichweitigen, phagosomalen Transport relevanten Myosin V Motoren bewegen. Eine Untergruppe dieser Motorproteine, die Myosin Va Motoren wurden in dieser Arbeit mit dem primären Myosin Va Antikörper (CELL SIGNALING), Konzentration 1:50, und dem sekundären 488 Anti-Hase Antikörper, Konzentration 1:150, angefärbt. Für die Aufnahme der Bilderstapel am Spinning Disk Mikroskop wurde für die Anregung des Antikörperfarbstoffes der 488 nm Laser verwendet. Der DNA-Farbstoff Hoechst 33342 wurde durch den 405 nm Laser angeregt.

6.4 Abweichendes Protokoll zur Anfärbung von Aktinfilamenten

Als Basis für Myosin Motoren tragen auch die Aktinfilamente einer Zelle potenziell zum Organellentransport bei [10]. Zur Verifizierung ihres Einflusses wurden diese mittels Phalloidin (A12381, MOLECULAR PROBES) fluoreszent markiert. Phalloidin ist ein Phallotoxin, welches sich an F-Aktin anlagert und in lebenden Zellen strukturelle Veränderungen der Filamente inhibiert. Das hier verwendete Phalloidin ist direkt mit dem Fluorophor Alexa Fluor 594 gekoppelt, womit ein Sekundärprotein zur Färbung hinfällig wurde.

Zunächst wurden die Makrophagen kultiviert und fixiert sowie die Phagozytose von 1 μm , 2 μm & 3 μm Partikel initiiert, wie in Kapitel 5.7 beschrieben. Nach der Fixierung wurde die PFA-Lösung entfernt und die Zellen erneut dreimal mit DPBS gespült. Anschließend wurden die Zellen unter seichtem Durchmischen in je 500 μl DPBS inklusive 0,25 % Triton X-100 abgedunkelt und bei Raumtemperatur 5 min lang inkubiert. Die Zellen wurden danach dreimal mit DPBS gespült, bevor sie für 30 min abgedunkelt und bei Raumtemperatur in je 500 μl DPBS inklusive 1 % BSA gelagert wurden. (Details zu Triton X-100 & BSA siehe Abschnitt 6.2.) Die DPBS-BSA Lösung wurde entfernt und die Zellen für 30 min abgedunkelt und bei Raumtemperatur in der Phalloidin-Lösung inkubiert. Die Phalloidin-Lösung setzte sich zusammen aus Phalloidin-Stammlösung (Phalloidin gelöst in Methanol, Konzentration 6,6 μM) und DPBS inklusive 1 % BSA im Verhältnis 1:40. Zuletzt wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen.

Die abschließende Färbung der Zell-DNS und das Fixieren der Deckgläser auf Objektträgern erfolgte analog zu der Vorgehensweise der Immunfärbung, siehe hierzu Abschnitt 6.2.

6.5 Qualitative & Quantitative Analyse der Fluoreszenzaufnahmen

Die statistische Analyse der Anordnung und Verteilung fluoreszenzmarkierter, intrazellulärer Strukturen in der Umgebung von realen und hypothetischen Phagosomen erfolgte mittels im Rahmen dieser Arbeit entwickeltem MATLAB-Programm (MATHEWORKS). Zunächst wurden von allen zu analysierenden Zellen ein Hellfeld- und ein DIC-Bild (Definition der Aufnahmearten siehe Kapitel 4.1) der Fokusebene des Phagosomes akquiriert sowie ein Bilderstapel des fluoreszenten Zellkerns und der entsprechenden Zielstrukturen. Details hierzu siehe Abschnitt 6.1.

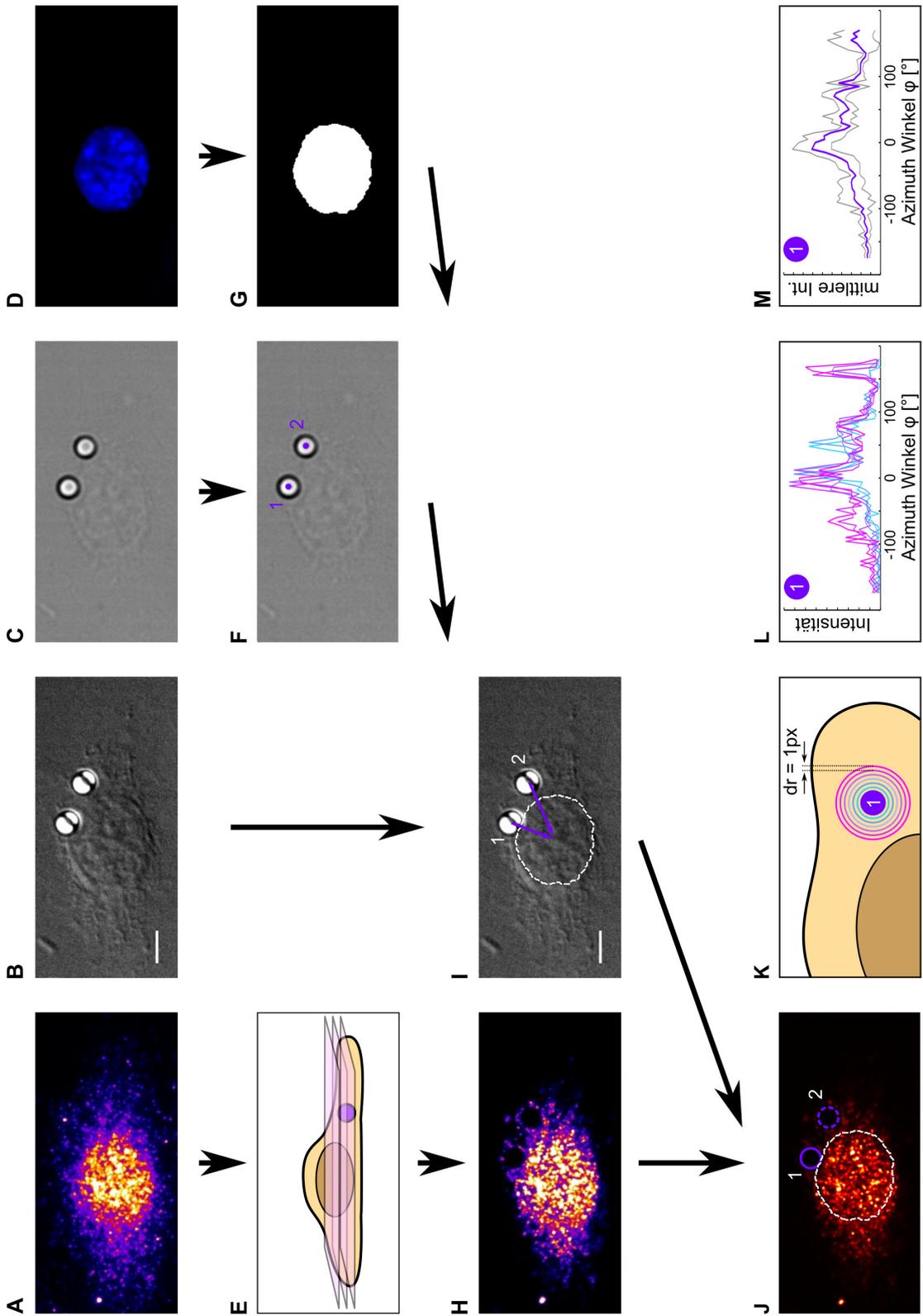
Aufnahmen & Vorprozessierung für automatisierte Analyse Die Analyse der Zielstrukturen erfolgte in allen vier Fällen (Hellfeld-, DIC-, Nukleus- und Zielstruktur-Aufnahme) ausschließlich in 2 Dimensionen. Dazu wurde aus dem Bilderstapel des Zellkerns die Ebene

per Hand ausgewählt, welche die Umrisse des Nukleus am deutlichsten darstellte. Von dem Bilderstapel der Zielstruktur wurde eine 2D Projektion der Intensitätsverteilung entlang der axialen Richtung angefertigt, welche in jedem Pixel die mittlere Intensität in dieser Ausbreitungsrichtung repräsentierte. Für die Analyse der Verteilung der Zielstrukturen in der Umgebung realer Phagosomen wurden für diese Projektion der Intensitätsverteilung die Fokusebene des zu betrachtenden Phagosomes sowie eine Ebene darunter und darüber ($\pm 0,25 \mu\text{m}$) herangezogen. Durch die Beschränkung auf drei Ebenen mit einem Gesamtabstand von $0,5 \mu\text{m}$ konnte eine identische Analyse für alle Phagosomendurchmesser ($> 0,5 \mu\text{m}$) durchgeführt werden. Für die Analyse in der Umgebung hypothetischer Phagosomen wurden alle Ebenen, welche die Zielstruktur in der Zelle darstellten, projiziert, um das komplette Zellvolumen für potenzielle Phagosomen zur Verfügung zu haben. Eine exemplarische Darstellung der Ausgangsaufnahmen für die Analyse der Intensitätsverteilungen der Zielstrukturen, hier von markierten Dynein Motorproteinen (Details siehe 6.3), um reelle Phagosomen findet sich in Abbildung 6.1. Das Teilbild 6.1A zeigt die 2D Intensitätsprojektion der Zielstruktur erstellt aus allen Ebenen, wie beschrieben für die Analyse der Umgebung hypothetischer Phagosomen. Im Falle reeller Phagosomen wurde noch im Vorfeld des Analyse-Programms auf eine mittlere Intensitätsprojektion aus drei Ebenen (phagosomale Fokusebene, sowie die Ebenen darunter und darüber, vgl. Teilbild 6.1E) reduziert (Teilbild 6.1H). Aufgrund der Beschränkung auf 3 Ebenen sind die Phagosomen bereits deutlich als schwarze Kreise zu erkennen. Das Teilbild 6.1B zeigt die DIC-Aufnahme der dazugehörigen Makrophage inklusive zwei phagozytierter, $3 \mu\text{m}$ großer, IgG-beschichteter Polystyrolpartikel, Teilbild 6.1C die Hellfeldaufnahme dieser Zelle und Teilbild 6.1D die ausgewählte Ebene des Zellkern-Bilderstapels.

Erkennung von Partikelpositionen Das Analyse-Programm erkennt automatisiert die Position kreisrunder Strukturen (hier Polystyrolpartikel) in einer Hellfeldaufnahme, siehe Abb. 6.1F, mit Subpixelgenauigkeit basierend auf modifizierten Programmstrukturen von Crocker und Grier [121].

Die Erkennung der Partikelpositionen erfolgte anhand von Intensitätsmaxima, die von deutlich dunkleren Strukturen umgeben werden. Im Falle nicht fokussierter Partikel mit dunklem Kern und heller Umgebung bestand die Option die Hellfeldaufnahme zu invertieren. Danach erfolgte ein Gauß'sches Weichzeichnen der Aufnahme, also eine Faltung des Bildes mit einer Gauß-Funktion zur Verringerung des Rauschens. Die Standardabweichung für diesen Gauß-Filter stand dabei als freier Parameter zur Auswahl. Implementiert war der Gauß-Filter durch das MATLAB interne Kommando *imfilter*. Anschließend folgte die Anwendung eines Bandpassfilters, um kleine, irrelevante Strukturen sowie langreichweitige Bildvariationen herauszufiltern. Die Grenzen des Bandpass-Filters, bezeichnet als Rauschlevel und zu erwartende Objektgröße, waren ebenfalls Eingabeparameter.

Danach wurde das prozessierte Bild an den *pkfnd*-Algorithmus (entwickelt von Crocker und Grier, überarbeitet und in MATLAB implementiert von Eric R. Dufresne, 2005, Yale University) übergeben. Der genannte Algorithmus kalkuliert lokale Intensitätsmaxima mit Pixelgenauigkeit. Dazu wurden alle Pixel, welche heller waren als ein frei wählbarer, variabler Schwellwert, auf die maximale Intensität mit ihren direkten Nachbarn abgeglichen. Der Schwellwert wurde dabei so gewählt, dass er deutlich über der Medianintensität des Bildes lag. Als zusätzlicher Parameter konnte eine minimale Objektgröße angegeben werden. Innerhalb von Gebieten dieser Objektgröße darf sich maximal ein lokales Intensitätsmaximum befinden, wobei der Algorithmus stets das größte, lokale Maximum übernimmt. Für die Errechnung der Subpixelgenauigkeit wurde der *cntrd*-Algorithmus genutzt (entwickelt von Crocker und Grier, überarbeitet und implementiert von Eric R. Dufresne).



Dieser kalkuliert eine Maske aus dem prozessierten Bild und den bereits mittels *pkfnd*-Algorithmus bestimmten Partikelpositionen und präzisiert diese Positionen durch eine gewichtete Mittelung aller Intensitätswerte innerhalb der Maskenstrukturen in x- & y-Richtung und ihrem Abstand zur pixelgenauen Position.

Die finale, subpixelexakte Position konnte, wenn notwendig, per Hand korrigiert werden, was aber die Genauigkeit auf Pixelniveau reduzierte.

Erkennung der Nukleusposition Anhand der Fluoreszenzaufnahme des Nukleus ermittelt das Analyse-Programm die Position sowie die Umrisse des Nukleus (Vgl. Abb. 6.1G). Dazu erfolgt zunächst die Anwendung eines Schwellwert-Filters, welcher per Hand und bildspezifisch justiert wurde sowie die Umwandlung in ein binäres Bild. Der Schwellwert wurde dabei so gewählt, dass er deutlich über dem Hintergrundrauschen des Bildes lag. Anschließend werden zusammenhängende Strukturen per MATLAB implementiertem Befehl *regionprops* erfasst und aufgrund unpassender Flächenausdehnung sowie zu erwartender Exzentrizität diskriminiert. Die Exzentrizität wurde ebenfalls per Hand und bildspezifisch angepasst. Die minimal notwendige Ausdehnung eines Nukleus wurde mit $4\ \mu\text{m}$ abgeschätzt, welche sich anhand aller Aufnahmen als sinnvoll erwies, da keine anderen fluoreszenten Strukturen dieser Größenordnung beobachtet wurden.

Abstand & Zuordnung von Phagosom & Nukleus Anhand der Partikelposition in der Zelle (Abb. 6.1F) und der Umrisse des Nukleus (Abb. 6.1G) errechnet das Analyse-Programm die Distanz zwischen Nukleusmembran und Partikeloberfläche sowie den Punkt auf der Partikeloberfläche mit dem geringsten Abstand zum Nukleusrand (Abb. 6.1I). Die Größe des zu analysierenden Phagosomes bzw. der Partikelradius war dabei ein Eingabeparameter. Bei mehreren Partikeln und Nuklei wird basierend auf der kürzesten Distanz zwischen Partikel und Nukleus ebenfalls eine Zuordnung zwischen Partikel und Zellkern vorgenommen. Sollte es dabei zu einer Fehlzuordnung kommen, konnte diese per Hand korrigiert werden.

Abbildung 6.1. Funktionsweise des Programms zur Analyse fluoreszenter, intrazellulärer Strukturen. Die Grafik veranschaulicht die Funktionsweise des MATLAB-basierten Programms zur Analyse fluoreszent markierter Strukturen in der Umgebung der Phagosomenoberfläche. Beispielsweise ist hier eine Makrophage mit 2 phagozytierten $3\ \mu\text{m}$ Partikeln dargestellt. Für die Analyse wurde ein Bilderstapel der fluoreszenten Zielstruktur (A), hier mittels DYNC 1|2 angefärbte Dynein Motoren, und des Nukleus aufgenommen sowie eine DIC (B) und eine Hellfeldaufnahme (C) der Fokusebene der Phagosomen. Wurde die Intensitätsverteilung der Zielstruktur an der Oberfläche reeller Phagosomen untersucht, wurde aus dem Bilderstapel der Zielstruktur (A) eine gemittelte Intensitätsprojektion (H) aus der Fokusebene des Phagosomes sowie der Ebene darüber und darunter (E) erstellt. In dieser Projektion (H) sind die Phagosome deutlich erkennbar. Die Bestimmung der Partikelposition erfolgte anhand der Hellfeldaufnahme (C) durch Erkennung lokaler Intensitätsmaxima (F). Die Bestimmung des Zellkernumrisses erfolgte anhand einer repräsentativen Ebene (D) aus dem Nukleus-Bilderstapel durch Anwendung von Schwellwerten für Intensität, Fläche und Exzentrizität (G). Mittels Partikelposition und Zellkernumriss erfolgte die Zuordnung der Partikel zu einem Nukleus, die Berechnung der Distanz zwischen Nukleusmembran und Partikeloberfläche sowie die Festlegung des Punktes auf der Partikeloberfläche mit der minimalen Distanz zum Nukleus (I). Die Position der Partikel wurde in die 2D Intensitätsprojektion der Zielstruktur übertragen (J) und die Intensität wurde entlang eines Kreisumfanges mit dem Radius entsprechend des Partikelradius ausgelesen. Um Fluktuationen in der Intensität zu kompensieren, wurde über die Intensitäten entlang von 6 Kreisumfängen mit dem Abstand von 1 px gemittelt (K). Grafik (L) zeigt die ausgelesenen Intensitäten der Kreisumfänge aus Grafik (K) als Funktion des Polarwinkels φ , wobei $\varphi = 0^\circ$ dem Punkt mit minimalem Abstand zur Nukleusmembran entspricht, Grafik (M) zeigt die Mittelung der Intensitäten in 5° -Intervallen unter Angabe der Standardabweichung. Die Längenskala entspricht $5\ \mu\text{m}$. Die Aufnahmen wurden mit dem Spinning Disk Mikroskop erstellt.

Intensitätsverteilung an der Phagosomenoberfläche Die errechneten und per Hand überprüften Phagosomenpositionen und der Umriss des Nukleus wurden in die 2D Intensitätsprojektion der Zielstruktur übernommen (Abb. 6.1J). Entsprechend des Partikelradius r_0 wurde ein Kreis definiert, mit einem Mittelpunkt identisch mit der Phagosomenposition. Entlang der Außenlinie des Kreises wurde die Intensitätsverteilung der Zielstruktur ermittelt. Um den Einfluss von Intensitätsfluktuationen entlang des Kreisumfangs durch variierende Fluorophorexprimierung in der Zelle zu verringern sowie zur Rauschreduzierung, wurde die Intensitätsverteilung innerhalb eines Ringes mit Innenradius r_0 und Außenradius $r_0 + \Delta r$ gemittelt. Der frei wählbare Parameter Δr wurde auf $0,64 \mu\text{m}$ festgelegt, da dies bei den unter 6.1 genannten Parametern exakt 5 weiteren Kreisumrissen mit jeweils einem Pixel Abstand entsprach, was die technische Umsetzung der Intensitätsmittelung im Programm vereinfachte. (Vergleiche Abb. 6.1K.) Um eine Vergleichbarkeit der Intensitätsverteilungen, unabhängig vom Partikelradius ($r_0 = 0,5 \mu\text{m}$, $1 \mu\text{m}$ oder $1,5 \mu\text{m}$), der Phagosomenposition oder der Anzahl der Pixel, welche der Kreisumriss enthält, zu gewährleisten, wurde die Verteilung als Funktion des Polarwinkels φ berechnet und dargestellt (Abb. 6.1L). Für jedes Phagosom entsprach die Position $\varphi = 0^\circ$ der Richtung des Nukleus, also dem Punkt auf der Phagosomenoberfläche mit der geringsten Distanz zur Nukleusmembran. Die anschließende Mittelung der Intensitäten über die Kreisumrisse erfolgte entsprechend den Polarkoordinaten in festgelegten 5° Intervallen von φ (vgl. Abb. 6.1M).

Analyse mehrerer Phagosomen Die Intensitätsverteilungen der Zielstrukturen in der Umgebung (innerhalb eines Ringes $r_0 + \Delta r$) der Phagosome wurden final über alle Phagosome mit gleichem Radius (r_0) und gleicher Kategorie (reell oder hypothetisch) gemittelt. Um erneut den Einfluss von Variationen in der Effizienz der Anfärbung der Zielstrukturen in unterschiedlichen Zellen und verschiedenen Proben zu minimieren sowie eine phagosomenortsunabhängige Analyse zu erhalten, wurden die winkelabhängigen Intensitätsverteilungen der Einzelphagosomen vor der Mittelung auf ihre maximale Intensität normiert. Für die Quantifizierung der Intensitätsverteilungen der Zielstrukturen an der Partikeloberfläche wurde eine dem Nukleus zugewandte Phagosomenseite mit $|\varphi| \leq 45^\circ$ und eine der Zellperipherie zugewandte Phagosomenseite mit $|\varphi| \geq 135^\circ$ definiert. Der Intensitätsunterschied $\Delta I_{\text{Zielstruktur}}$ zwischen diesen beiden Phagosomenseiten ist die Differenz der gemittelten Intensitätsverteilungen in beiden Intervallen.

6.6 Medikamente zur Manipulation zellulären Transportverhaltens

Um das von der Phagosomengröße abhängige Transportverhalten detailliert in Bezug auf das Zusammenspiel mit intrazellulären Strukturen wie molekularen Motoren oder Filamenten des Zytoskelettes untersuchen zu können, wurden diese Strukturen verändert, inaktiviert oder entfernt. Dabei handelte es sich in dieser Arbeit um die molekularen Motoren Dynein und Myosin sowie um MT. Ergänzend zu dieser Arbeit wurden AF in den Zellen von Konrad Berghoff (2017, Universität Bayreuth) modifiziert.

Manipulation molekularer Motoren Um den MT-assoziierten Motor Dynein zu inhibieren wurde Ciliobrevin A (auch HPI-4, SIGMA-ALDRICH) genutzt [112]. Ciliobrevin A reduziert die ATPase-Aktivität des Dynein Motors, wodurch dieses in einem inaktiven Zustand verharrt [113]. Vor der Anwendung von Ciliobrevin A wurden die Zellen für 24-48 h

auf Deckgläsern unter Standardbedingungen in Nährmedium kultiviert. Ciliobrevin A wurde mit einer Konzentration von 10 mM in Dimethylsulfidoxid (DMSO, SIGMA-ALDRICH) gelöst und bei -20°C gelagert. Für die Experimente mit lebenden Zellen wurde das Kulturmedium entfernt, Ciliobrevin A Lösung mit *Image Medium* auf eine Konzentration von $75\ \mu\text{M}$ verdünnt und die Zellen für 30 min bei 37°C in dieser Lösung inkubiert. Die verdünnte Ciliobrevin-Lösung kann maximal innerhalb von 24 h genutzt werden, danach nimmt die Effektivität des gelösten Ciliobrevin A deutlich ab. Im Rahmen der Montage der Deckgläser in die Objektträger und die Zugabe der Partikellösung in gewünschter Konzentration wurde die Ciliobrevin A-Konzentration auf eine finale Konzentration von $50\ \mu\text{M}$ verdünnt [126].

Um den Aktin-assoziierten Motor Myosin V zu inhibieren, wurde MyoVin-1 (MERCK MILLIPORE, Darmstadt, Deutschland) genutzt. MyoVin-1 verhindert das Herauslösen von ADP und fixiert Myosin V in einem AF gebundenen Zustand [109]. Vor der Anwendung von MyoVin-1 wurden die Zellen für 24-48 h auf Deckgläsern unter Standardbedingungen in Nährmedium kultiviert. MyoVin-1 wurde mit einer Konzentration von $200\ \mu\text{M}$ [127] in Minimum Essential Medium (MEM, GIBCO) inklusive 1 % DMSO gelöst. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen für 2 h bei 37°C in der MyoVin-Lösung inkubiert. Im Rahmen der Montage der Deckgläser in die Objektträger und die Zugabe der Partikellösung in gewünschter Konzentration wurde die MyoVin-1 Konzentration auf eine finale Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ verdünnt. Die finale DMSO Konzentration von 0,5 % erwies sich in Kontrollexperimenten mit gleicher DMSO Konzentration ohne MyoVin-1 als unbedenklich, da die Zellen ein identisches Verhalten und eine identische Morphologie zeigten wie Zellen in DMSO-freiem Medium.

Die Phagozytose wurde, unabhängig des Inhibitors, mittels Partikelsedimentation oder gezielter Anbindung der Partikel durch die optische Pinzette initiiert. Die Visualisierung der Phagosomenreifung, die Bildaufnahme, das Nachverfolgen der Partikel und die Auswertung der Partikeltrajektorien erfolgte analog zu den unbehandelten Zellen und wie in Kapitel 5.9 beschrieben.

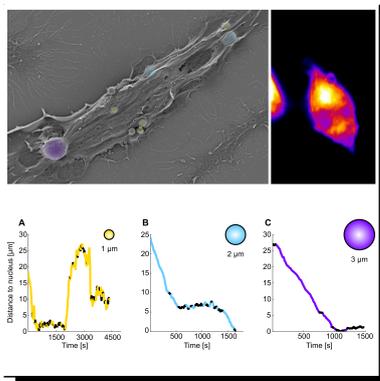
Manipulation von Filamenten des Zytoskelettes Um die Basis der Motoren Dynein und Kinesin zu modifizieren, wurden die MT in den Zellen zerstört, welche als relevant für den langreichweitigen Phagosomentransport gelten. Dazu wurde das Medikament Nocodazol genutzt, welches den Aufbau neuer MT verhindert. Vor der Anwendung von Nocodazol wurden die Zellen für 24-48 h auf Deckgläsern unter Standardbedingungen in Nährmedium kultiviert. Nocodazol (SIGMA-ALDRICH) wurde mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst und bei 4°C gelagert. Für die Anwendung an lebenden Zellen wurde die Nocodazol-Lösung auf eine Konzentration von $2\ \mu\text{M}$ mit *Image Medium* verdünnt und die Zellen nach Entfernung des Kulturmediums für 10 min auf Eis in dieser Verdünnung inkubiert. Die Inkubation auf Eis dient hierbei der Zerstörung vorhandener MT, da Nocodazol nur den Aufbau hemmt. Anschließend wurde die Lösung entfernt, die Zellen in den Objektträger montiert und die gewünschte Partikelkonzentration sowie *Image Medium* inklusive Nocodazol zugegeben. Die finale Nocodazolkonzentration während der Experimente betrug $1,5\ \mu\text{M}$. Initiierung, Aufnahme und Analyse der Phagozytose erfolgte bei 37°C und analog zu unbehandelten Zellen, wie in Kapitel 5.9 beschrieben.

Um die Basis der Myosin Motoren zu modifizieren und den Einfluss von intrazellulärem Aktin-Rückfluss zu untersuchen, wurden die AF in den Zellen zerstört. Dazu wurde das Medikament Cytochalasin D (cytoD, C8273, SIGMA-ALDRICH) mit einer Konzentration von $2\ \mu\text{M}$ gelöst in *Image Medium* genutzt, welche zu einer Depolymerisation der AF führt. Die dazugehörigen Experimente wurden von Konrad Berghoff (2017, Universität

Bayreuth) an einer magnetischen Pinzette durchgeführt. Für eine detaillierte Beschreibung der magnetischen Pinzette siehe Zahn u.a. [128].

- Ergebnisse der Messungen -

Größenabhängiger, phagosomaler Transport in unbehandelten Makrophagen



Dieses Kapitel beschreibt die grundlegenden und neuen Beobachtungen bezüglich des phagosomalen Transportverhaltens in gesunden, voll funktionsfähigen Makrophagen, in Abhängigkeit der Größe der aufgenommenen Objekte. Zunächst werden die Grundlagen zur Initiierung und Beobachtung einer Phagozytose in Makrophagen, wie Oberflächenbeschichtung des Zielobjektes, Partikelsedimentationszeiten, Rezeptorenverteilung, Visualisierung des Prozesses, Nachweismethoden der erfolgreichen Aufnahme und Phagozytosewahrscheinlichkeiten erläutert. Anschließend wird ein genereller Überblick über

die grundlegenden Beobachtungen gegeben, bevor diese unter diversen Gesichtspunkten zur besseren Quantifizierung der Ergebnisse im Detail analysiert werden. Darauf folgt eine kritische Betrachtung der eingeführten Parameter und ihres Einflusses auf die Ergebnisse. Den Abschluss bildet eine Analyse des Einflusses der Zellgeometrie auf die größenabhängigen phagosomalen Transporteigenschaften.

7.1. Oponisierung von Zielobjekten	88
7.2. Partikelsedimentationszeiten	88
7.3. Verteilung Fc γ -Rezeptoren	90
7.4. Nachweis einer erfolgreichen Phagozytose	91
7.5. Phagozytosewahrscheinlichkeit	97
7.6. Partikelaufnahme	98
7.7. Allgemeines Transportverhalten	99
7.8. Starker zentrifugaler Transport von Phagosomen	101
7.9. Verteilung von Transportphasen	103
7.10. Geschwindigkeiten des Phagosomentransportes	104
7.11. Persistenz der Phagosomenbewegung	106
7.12. Stationäre Phasen während des Transportes	106
7.13. Parameterabhängigkeiten der Ergebnisse	107
7.14. Einfluss des Abstandes zwischen Phagosom & Nukleus	110

7.1 Opsonisierung von Zielobjekten

Die in dieser Arbeit betrachtete phagosomale Aufnahme von Zielobjekten und deren anschließender intrazellulärer Transport basiert auf einer $Fc\gamma$ -Rezeptor-initiierten Immunantwort. Dies bedeutet, die Oberflächenbeschichtung der Zielobjekte muss so konzipiert sein, dass die $Fc\gamma$ -Rezeptoren in der Makrophagenmembran selektiv aktiviert werden. Dazu erfolgte eine Beschichtung der in dieser Arbeit verwendeten Mikropartikel mit einem Durchmesser von $1\ \mu\text{m}$, $2\ \mu\text{m}$ und $3\ \mu\text{m}$ mit Immunglobulin G (IgG), wie in Kapitel 5.4, beschrieben. Abbildung 7.1 stellt die Verifikation einer erfolgreichen Beschichtung der Partikeloberfläche mit IgG mittels fluoreszente, sekundären Antikörper dar, wie beschrieben unter 5.4. Die Grafik 7.1A zeigt die DIC Aufnahme eines $3\ \mu\text{m}$ Polystyrolpartikels mit einer IgG-Oberflächenbeschichtung und sekundärem Antikörper. Grafik 7.1B stellt dasselbe Partikel unter Fluoreszenzbeleuchtung dar, wobei der sekundäre Antikörper deutlich in grün auf der Partikeloberfläche erkennbar war. Dies bedeutete eine Anbindung des sekundären Antikörpers an das IgG auf der Partikeloberfläche und somit eine erfolgreiche Partikelopsonisierung mit IgG. Grafik 7.1C zeigt ein gleiches Partikel ohne IgG-Opsonisierung, aber mit sekundärem Antikörper unter Fluoreszenzbeleuchtung. Dieses Partikel zeigte kein detektierbares Signal, da der sekundäre Antikörper nicht auf der Partikeloberfläche anbinden konnte. Alle für die Phagozytose verwendeten Partikel wurden zuvor stichprobenartig auf eine erfolgreiche Opsonisierung mit IgG getestet.

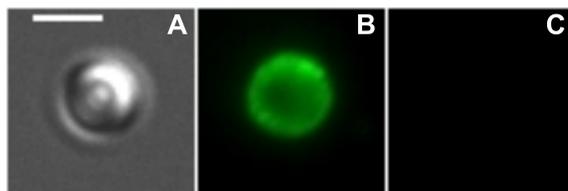


Abbildung 7.1. Nachweis einer erfolgreichen Opsonisierung der Zielpartikel mit IgG. Die Abbildung stellt die verwendete Nachweismethode für die Opsonisierung der Polystyrolpartikel mit IgG und Zugabe eines fluoreszente, sekundären Antikörpers, welcher an IgG bindet, dar. Grafik (A) zeigt die DIC-Aufnahme eines $3\ \mu\text{m}$ Partikels mit IgG-Beschichtung und sekundärem Antikörper. In Grafik (B) ist das Fluoreszenzsignal des sekundären Antikörpers desselben Partikels dargestellt. Die Beschichtung der Partikeloberfläche ist deutlich sichtbar. Grafik (C) zeigt ein gleiches Partikel mit sekundärem Antikörper ohne IgG-Beschichtung unter gleichen Aufnahmebedingungen wie in Grafik (B). Es ist keine Oberflächenbeschichtung detektierbar. Der Maßstab beträgt $3\ \mu\text{m}$.

Eine alternative Methode zur Verifikation sowie die Möglichkeit zur Quantifizierung der Partikelopsonisierung ist die Visualisierung der Partikeloberfläche mittels Rasterelektronenmikroskop. Siehe hierzu Abbildung 7.2. Auch hier war eine homogene Verteilung der Antikörper auf der Oberfläche der Mikropartikel zu beobachten.

7.2 Zeitdauer für die Partikelsedimentation in Abhängigkeit ihrer Größe

Eine relevante Grundlage für die Phagozytoseexperimente bildete eine reproduzierbare Partikelkonzentration in der Probe beziehungsweise in der Umgebung der Zellen, welche für alle Partikeldurchmesser vergleichbar war. Dazu wurden die Sedimentationszeiten der Partikel in Abhängigkeit ihrer Größe und ihres Materials sowohl experimentell, wie in Kapitel 5.5 beschrieben, als auch theoretisch, mittels Simulation, bestimmt.

Die theoretische Berechnung der Sedimentationsgeschwindigkeit wurde mittels der Stokeschen Gleichung durchgeführt. Diese gilt für die Bewegung sphärischer Körper bei kleinen

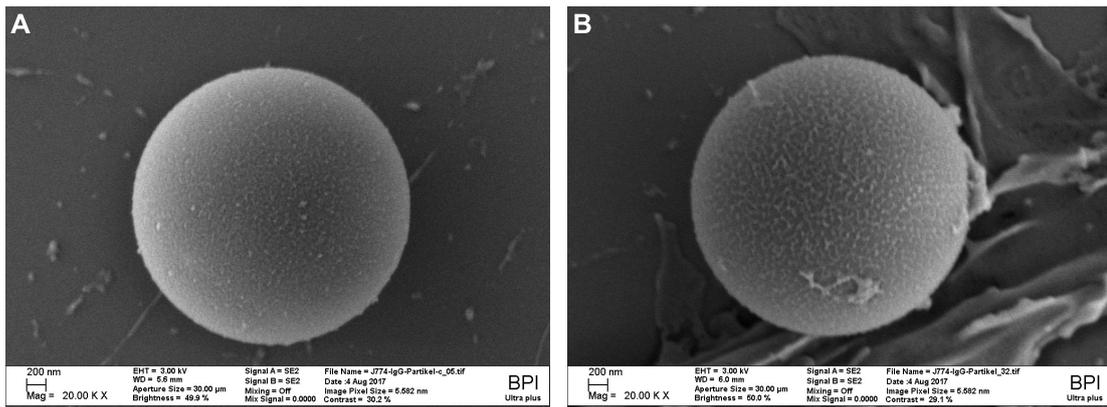


Abbildung 7.2. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der homogenen Oponisierung der Zielpartikel mit IgG. Die Abbildung zeigt die Aufnahmen zweier 3 µm Polystyrolpartikel, beschichtet auf der Oberfläche mit dem Antikörper IgG, aufgenommen mittels Rasterelektronenmikroskop. In Grafik (A) ist ein freies Partikel auf dem Deckglas dargestellt, in Grafik (B) ein Partikel, nachdem bereits der Partikel-Zell-Kontakt hergestellt wurde. Details der Aufnahmen sind direkt in der Grafik eingebildet. Die Strukturen auf der Partikeloberfläche zeigten eine gleichmäßige Verteilung und bedeckten die komplette, sichtbare Partikelaußenseite, wobei angenommen wurde, dass es sich bei diesen sichtbaren Strukturen um IgG-Moleküle handelte [129].

Reynoldszahlen, d.h. bei laminarer Strömung [92]. Ein konstantes Absinken der Partikel ist gegeben bei einem Gleichgewicht zwischen der Stokeschen Reibungskraft und der Differenz aus Gravitationskraft und statischer Auftriebskraft des Partikels:

$$F_{\text{Stokes}} = F_{\text{Gravitation}} - F_{\text{Auftrieb}}$$

$$6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v = g \cdot V \cdot \rho_{\text{Partikel}} - g \cdot V \cdot \rho_{\text{Fluid}} .$$

Somit ergibt sich für die Sedimentationsgeschwindigkeit v :

$$v = \frac{g \cdot V \cdot (\rho_{\text{Partikel}} - \rho_{\text{Fluid}})}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} .$$

Dabei ist r der Partikelradius, η die dynamische Viskosität des Fluides, g die Gravitationskonstante, $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ das Volumen des Partikels und ρ die Dichte des Partikels oder des Fluides. Zur Vereinfachung wurde für das Medium, in welchem die Durchführung der Experimente stattfand, die dynamische Viskosität und Dichte von Wasser bei 37 °C angenommen. Bei konstanter Sedimentationsgeschwindigkeit ist die Sedimentationszeit eines Partikels direkt proportional zu dem Abstand h_{Partikel} des Partikels von dem Gefäßboden zu Beginn des Experimentes. Dabei wurde als Anfangsverteilung eine homogene, zufällige Partikelverteilung innerhalb des kompletten Gefäßvolumens simuliert. Das Gefäßvolumen entsprach den Abmessungen einer Vertiefung einer Zwölflochplatte (siehe 5.5), gefüllt mit 500 µl Partikellösung. Damit ergibt sich für die Sedimentationszeit:

$$t_{\text{Sedimentation}} = \frac{h_{\text{Partikel}}}{v}$$

$$= \frac{h_{\text{Partikel}} \cdot 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}{g \cdot V \cdot (\rho_{\text{Partikel}} - \rho_{\text{Fluid}})} .$$

Potenziell auftretende Diffusion während der Sedimentation wurde für die Abschätzung der Sedimentationszeit vernachlässigt.

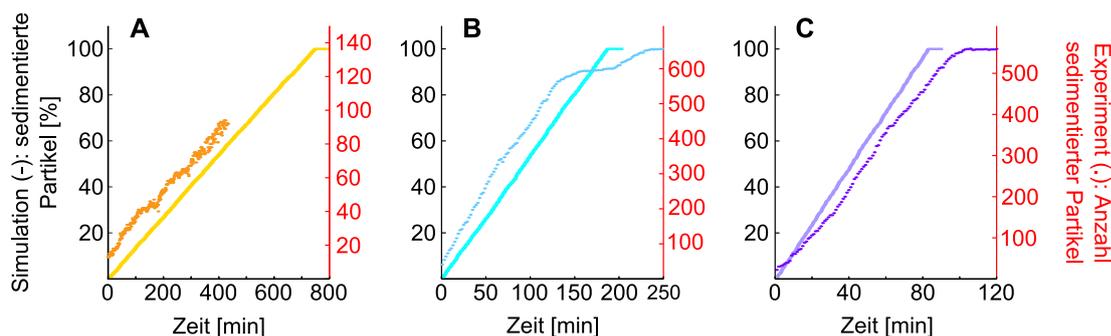


Abbildung 7.3. Zeitdauer für die Partikelsedimentation in Abhängigkeit ihrer Größe für Polystyrolpartikel. Die Abbildung zeigt die experimentell (gepunktet) und theoretisch (durchgezogene Linie) bestimmten Sedimentationszeiten der verwendeten Partikel in Abhängigkeit ihres Durchmessers ((A) 1 µm, (B) 2 µm & (C) 3 µm) innerhalb des verwendeten experimentellen Aufbaus, siehe Kapitel 5.5. Es wird deutlich, dass die benötigte Zeit zum Erreichen einer konstanten Partikelanzahl (vollständige Sedimentation) auf Deckglasebene mit sinkendem Partikeldurchmesser zunahm. Für 1 µm kleine Partikel wurde innerhalb der Messdauer keine vollständige Sedimentation erreicht.

Abbildung 7.3 zeigt die theoretisch und experimentell ermittelten Sedimentationszeiten für Polystyrolpartikel in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers. Die theoretischen Sedimentationskurven sind in Prozent der gesamt vorhandenen Partikelanzahl angegeben, da die exakte Ausgangskonzentration der Partikel bekannt war. Die experimentellen Sedimentationskurven zeigen die absolute Anzahl an Partikeln am Gefäßboden, da nicht bekannt war, wie viele Partikel sich in der Lösung befanden. Wurde während der Sedimentation ein finales Niveau erreicht, d.h. eine konstante Anzahl an abgesunkenen Partikeln, wurde dieses Niveau gleichgesetzt mit dem simulierten Wert für 100 %-ige Partikelsedimentation. Dies war der Fall für 2 µm und 3 µm Partikel. Für Partikel mit 1 µm Durchmesser stieg auch nach mehreren Stunden die Anzahl abgesunkener Partikel stetig an. Die Grafik zeigt, dass die theoretisch und experimentell ermittelten Werte gut übereinstimmten und das für 3 µm Partikel nach etwa 1,5 h alle in der Probe befindlichen Partikel die Zellebene erreicht hatten. Für 2 µm Partikel dauerte dies circa 3,5 h und für 1 µm Partikel mindestens 12 h. Daraus wird ersichtlich, dass während der Experimentdurchführung eine Sedimentation aller Partikel nicht abgewartet werden konnte. Stattdessen wurde die Anfangskonzentration erhöht, sodass die gewünschte Anzahl an Partikel innerhalb von 2,5 h sedimentierte.

7.3 Verteilung von $Fc\gamma$ -Rezeptoren auf der Membranoberfläche

Die Erkennung von IgG-opsonisierten Fremdkörpern, hier simuliert durch Antikörperbeschichtete Mikropartikel, erfolgt durch $Fc\gamma$ -Rezeptoren an der Membranoberfläche der Makrophagen. Da die Rezeptoren nicht nur für die Erkennung der Fremdkörper zuständig sind, sondern auch die anschließende Aufnahme dieser mittels biochemischer Signalkaskaden steuern, musste im Rahmen der Arbeit sichergestellt werden, dass die Zielobjekte an die $Fc\gamma$ -Rezeptoren anbinden können. Die potenzielle Herstellung des Antikörper-Rezeptor-Kontaktes musste unabhängig der Phagozytose-Initiierungs-Methode (Partikelsedimentation oder Herstellung des Partikel-Zell-Kontaktes mittels HOT, Details siehe Abschnitt 7.6) gewährleistet sein. Der Nachweis des Vorkommens von $Fc\gamma$ -Rezeptoren auf der Makrophagenmembran, unabhängig von der Position auf der Membran oder dem Abstand zum Zellkern, erfolgte mit Hilfe eines primären Antikörpers wie in Kapitel 5.5

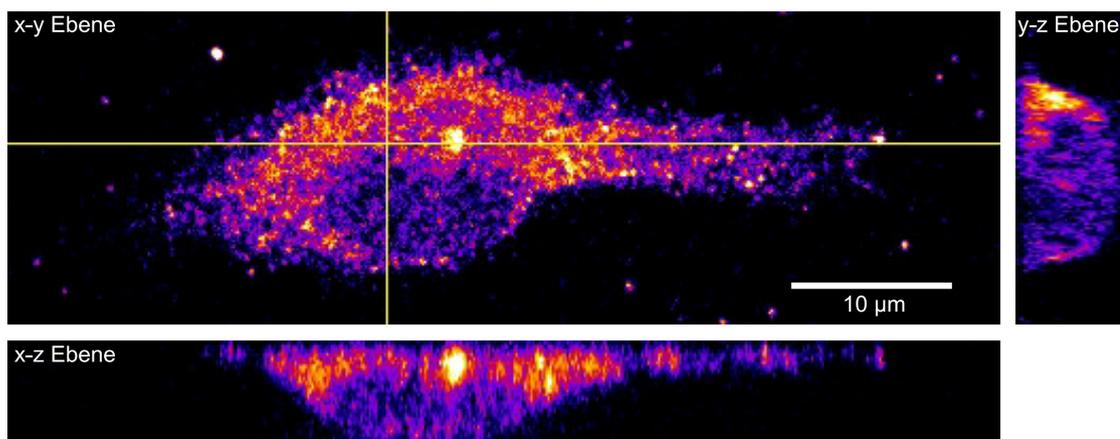


Abbildung 7.4. Verteilung von $Fc\gamma$ -Rezeptoren auf der Makrophagenmembran. Die Abbildung zeigt die Orthogonalprojektion einer chemisch fixierten Mausemakrophagenzelle, bei welcher die $Fc\gamma$ -Rezeptoren mittels primärem Antikörper angefärbt wurden. Die in der x-z- und y-z-Ebene dargestellten Schnitte durch die Zelle sind in der x-y-Ebene mittels gelber Geraden gekennzeichnet. Trotz teilweiser Clusterbildung der Rezeptoren ist erkennbar, dass an allen Positionen auf der Zellmembran Rezeptoren existieren und mittels IgG gekennzeichnete Fremdkörper an beliebiger Stelle der Zelloberfläche erkannt werden können.

beschrieben.

Die Abbildung 7.4 zeigt die Aufnahme einer Zelle mit gefärbten $Fc\gamma$ -Rezeptoren in orthogonaler Projektion. Deutlich zu erkennen war hierbei, dass an jeder Stelle auf der Zellmembran $Fc\gamma$ -Rezeptoren vorhanden waren und keine expliziten Rezeptorregionen durch die Zelle ausgebildet wurden, welche für die weiteren Phagozytoseexperimente zur Herstellung des Partikel-Zellkontaktes zu bevorzugen gewesen wären.

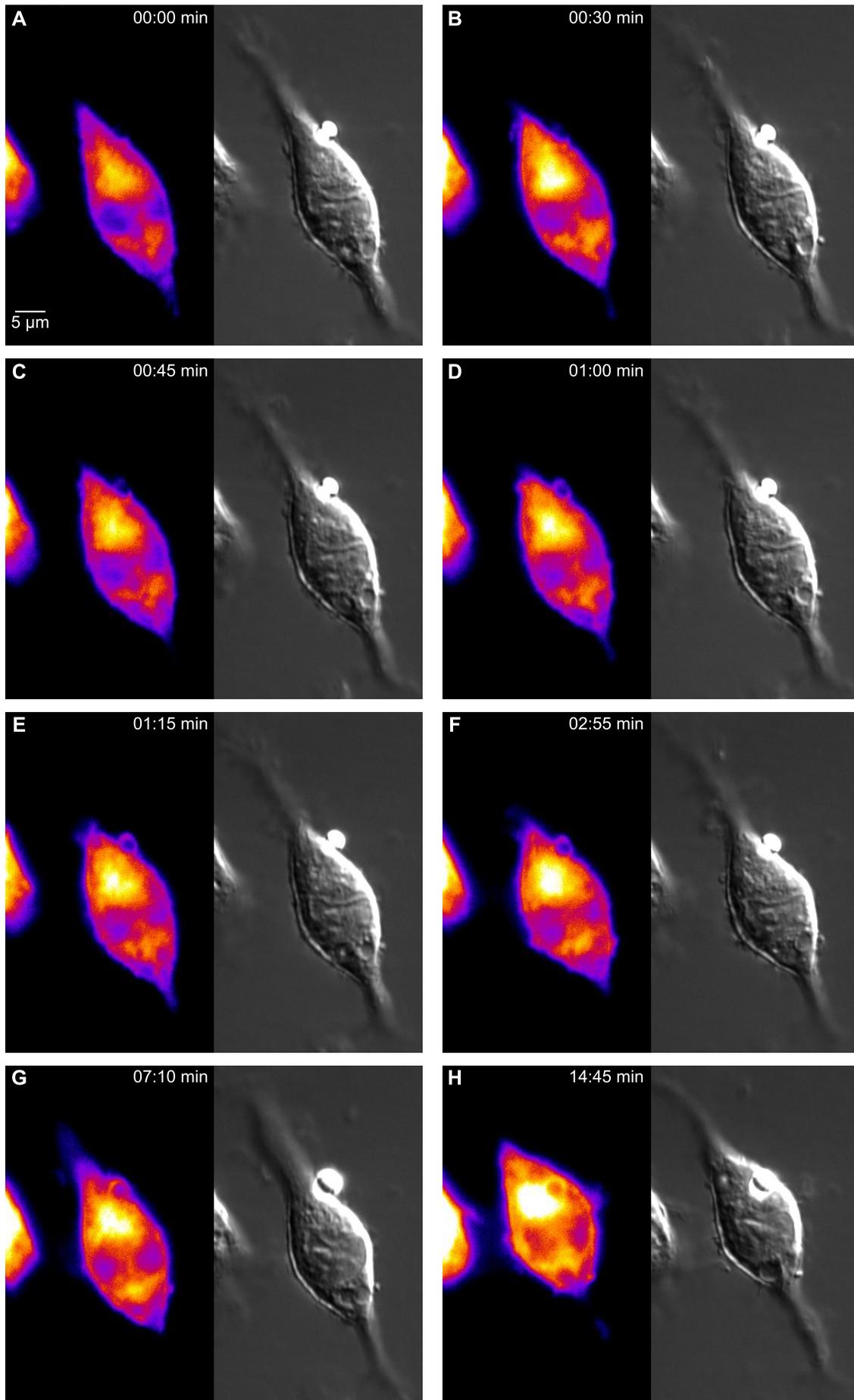
7.4 Nachweis einer erfolgreichen Phagozytose von Zielobjekten

Für den Nachweis einer erfolgreichen Aufnahme der IgG-markierten Zielobjekte durch die Makrophagen kamen drei unterschiedliche Methoden zur Anwendung. Diese Methoden wurden exemplarisch für lebende sowie für fixierte Zellen genutzt. Eine vierte Methode beruhte auf einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Aufnahme der Partikel basierend auf den Erkenntnissen der primären drei Methoden. Die vierte Methode wurde bei allen ausgewerteten Phagozytoseprozessen zur Sicherstellung der Aufnahme angewendet.

Visualisierung der Zellmembran während der Phagozytose

Bei der Arbeit mit lebenden Zellen wurde die Phagozytose der Partikel exemplarisch durch die Visualisierung der Zellmembran nachgewiesen (siehe Kapitel 5.7). Durch die Verwendung einer fluoreszenzmarkierten äußeren Zellmembran konnte das Partikel mittels holografischer optischer Pinzette exakt mit der Membran in Kontakt gebracht werden. Anschließend wurden die Bildung von Membranausstülpungen, das Hochziehen der Membran entlang der Partikeloberfläche, die Ausbildung einer phagozytischen Kappe und die abschließende komplette Ummantelung des Partikels durch die Zellmembran und somit die Bildung eines Phagosomes aufgenommen und ausgewertet. Abbildung 7.5A zeigt die Positionierung eines Partikels an der Zellmembran sowie die folgende Aufnahme des Zielobjektes durch Ausstülpfen der Membran (7.5B,C), die Bildung einer phagozytischen Kappe (7.5D,E) und schließlich das Schließen der Membranhülle um das Partikel (7.5F). Nach der

7. Größenabhängiger, phagosomaler Transport in unbehandelten Makrophagen



Entstehung eines Phagosomes wurde dieses in Richtung der perinuklearen Region transportiert. Das bedeutete, dass sich das Partikel vollständig innerhalb des Zytoplasmas befand und die Zellmembran verließ (7.5 *G, H*). Die komplette Bildung einer phagozytischen Membrankappe und somit eines Phagosomes war dabei in weniger als 3 min abgeschlossen. Dargestellt sind in den Einzelgrafiken jeweils die fluo-reszente Zellmembran (links) sowie eine DIC-Aufnahme (rechts) zum gleichen Zeitpunkt des Aufnahme-prozesses, da das Zielobjekt im Fluoreszenzkanal nur sichtbar wurde, sobald Zellmembran daran gebunden war. Eine geschlossene Membranhülle um das Zielobjekt und die Bildung eines Phagosomes waren dabei sichere Zeichen einer erfolgreichen Phagozytose, welche jedoch nur durch die Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht werden konnten. Bei der darauffolgenden Entfernung des Partikels von der Zellmembran und einem aktiven Transport zur perinuklearen Region konnte anhand der exemplarischen Aufnahmen mit Fluoreszenzmarkierung auch bei alleinigen DIC- und HellfelddBilderserien von einer erfolgreichen Phagozytose ausgegangen werden.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von den Zellen

Bei der Nutzung eines Rasterelektronenmikroskopes konnte die Zellmembran auch ohne Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht werden. Voraussetzung hierfür waren chemisch fixierte Zellen, welche entsprechend der Beschreibung in 5.7 präpariert wurden. Analog zu der im vorigen Abschnitt beschriebenen Methode der Visualisierung der Zellmembran konnten auch hier diverse Stufen einer Partikelaufnahme (Partikel-Zell-Kontakt, Membranausstülpungen, Bildung einer phagozytischen Kappe) bis hin zur vollständigen Bedeckung des Zielobjektes durch die Zellmembran dargestellt werden.

Die Abbildung 7.6 zeigt je zwei Beispiele für drei aufeinanderfolgende Stadien der phagosomalen Aufnahme des Zielobjektes. Das erste Stadium (7.6 *A, B*) war die Initiierung der Phagozytose durch den Kontakt zwischen Zelle und IgG-opsonisiertem Partikel. Darauf folgend kam es zur Ausbildung von Membranausstülpungen durch die Zelle, welche sich entlang der Partikeloberfläche anlagerten (7.6 *C, D*). In den REM-Aufnahmen wurde deutlich, dass die Formung einer phagozytischen Kappe durch die Membranausstülpungen nicht gleichmäßig und schüsselförmig geschah, sondern meist durch eine einseitige Überlappung des Partikels durch eine Membranfalte. Die in Abb. 7.6 *D* dargestellte Kappe schien dabei zu einem späteren Zeitpunkt der Phagozytose fixiert worden zu sein als die in Abb. 7.6 *C* dargestellte Kappe, da hier bereits mehr Prozent der Partikeloberfläche mit Membran bedeckt waren. Umschloss die Membrankappe das Zielobjekt vollständig, war die Internalisierung des Fremdkörpers abgeschlossen (7.6 *E, F*) und die Reifung des Phagosomes setzte ein.

Abbildung 7.5. Visualisierung der Zellmembran zur Darstellung der Partikelinternalisierung.

Die Abbildung zeigt relevante Stadien einer phagosomalen Aufnahme eines IgG-opsonierten Polystyrolpartikels mit einem Durchmesser von 3 μm . Mit Hilfe des Fluoreszenzmarkers FM 4-64 wurde die Zellmembran visualisiert, um eine erfolgreiche Aufnahme des Zielobjektes verifizieren zu können. Die linke Aufnahme jeder Teilabbildung zeigt das detektierte Fluoreszenzsignal, die rechte Aufnahme die Zelle und das Partikel in DIC. Die Internalisierung begann mit der Initiierung der Phagozytose durch Zell-Zielobjekt-Kontakt (*A*, 0 min). Anschließend folgte die Ausstülpung der Zellmembran (*B*), Anlagerung solcher Membranfalten an der Partikeloberfläche (*C-F*) und Bildung einer phagozytischen Kappe. Nachdem die Membrankappe das Partikel vollständig umschlossen hatte (*F*), wodurch ein Phagosom gebildet wurde, kam es zum Transport des Phagosomes in Richtung perinuklearer Zellregion (*G, H*). Der Maßstab beträgt 5 μm .

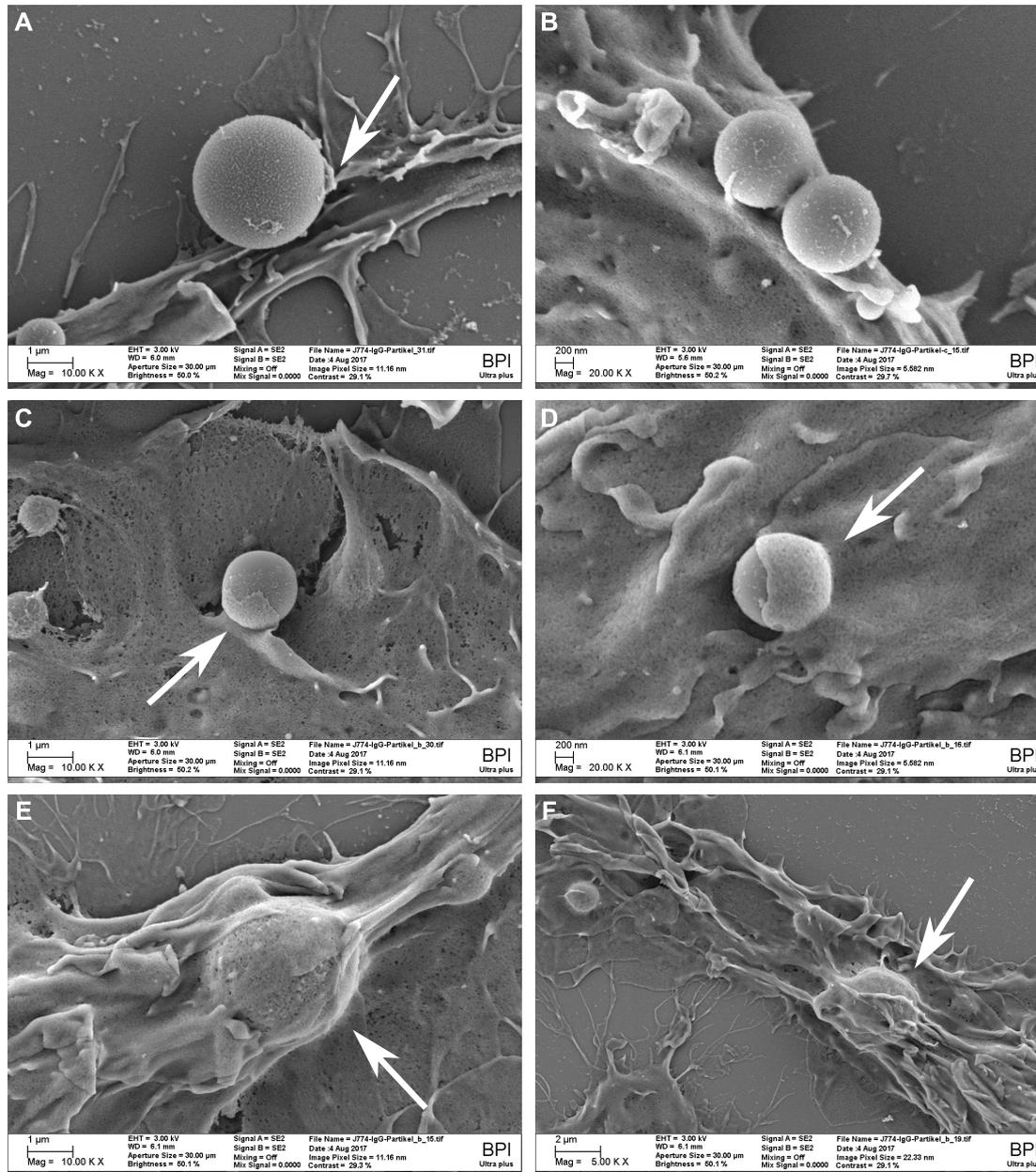


Abbildung 7.6. Nachweis erfolgreicher Phagozytose mittels Rasterelektronenmikroskop. Die Abbildung zeigt je zwei Beispiele für drei aufeinanderfolgende Stadien der phagosomalen Aufnahme eines IgG-opsonisierten Partikels durch einen Makrophagen. Für die Erstellung der Aufnahmen wurden die Zellen chemisch fixiert. Die Teilabbildungen (A & B) sind Beispiele für das erste Stadium, die Initiierung der Phagozytose durch Kontakt zwischen Zelle und Zielobjekt. Die Zelle reagierte mit der Ausbildung kleiner Membranfühler (weißer Pfeil, Abb. (A)). Darauf folgten Membranausstülpungen, welche sich an die Oberfläche des Partikels anhafteten und dieses umstülpten. Diese Membrananlagerung wird als phagozytische Kappe bezeichnet (C & D, weißer Pfeil). Die Größe der Kappe war dabei proportional zum Fortschritt der zellulären Partikelaufnahme. War die Membrankappe geschlossen, war auch die Internalisierung des Zielobjektes erfolgreich abgeschlossen (E & F). Die Partikel waren nur noch als Ausstülpungen des Zellinneren wahrnehmbar (weißer Pfeil). Details der Aufnahmen sowie der Maßstab sind in den Teilabbildungen separat angegeben.

Visualisierung nicht phagozytierter Zielobjekte mittels sekundärem Antikörper

Eine dritte Möglichkeit um eine erfolgreiche Aufnahme der Partikel durch die Makrophagen zu verifizieren, ist die Fluoreszenzmarkierung IgG-opsonisierter Partikel mittels eines sekundären Antikörpers, spezifisch für Maus-IgG. Der sekundäre Antikörper kennzeichnete in der Probe alle Partikel, die sich teilweise oder vollständig außerhalb der Zellen befanden. Partikel, welche bereits vollständig in ein Phagosom eingeschlossen waren, wurden dabei nicht markiert. Die chemische Fixierung der Zellen und die Zugabe des sekundären Antikörpers erfolgte wie in Kapitel 5.7 beschrieben.

Die Abbildung 7.7 zeigt die Differenzierung zwischen freien und membranumschlossenen Partikeln (7.7A) sowie Partikeln auf oder an der Zellmembran nach gescheiterter Phagozytose (oder noch davor) im Vergleich zu erfolgreich phagozytierten Partikeln (7.7B). Partikel, welche aufgrund der Phagosomenbildung vollständig von Zellmembran umschlossen waren, wiesen im Fluoreszenzkanal kein Signal auf, da der sekundäre Antikörper nicht an das IgG auf der Partikeloberfläche binden konnte. Während der Anfärbung der Partikel kam es dabei auch zu einer geringen Anlagerung des sekundären Antikörpers an die Zellen selbst sowie im Zytoplasma. Daraus resultierte, dass phagozytierte Partikel zusätzlich als schwarze Kreise innerhalb leicht fluoreszenter Zellen erkennbar waren. Freie sowie unvollständig umschlossene Partikel oder Partikel außerhalb der Zellmembran wiesen im Fluoreszenzkanal ein deutliches Signal auf. (Im DIC-Kanal, Abb. 7.7, zusätzlich durch einen weißen Pfeil gekennzeichnet.)

Anhand der Aufnahmen fixierter Zellen und fluoreszenzmarkierter, nicht phagozytierter Partikel wurde deutlich, dass eine Partikelposition innerhalb der Abgrenzung des Zytoplasmas durch die Zellmembran und insbesondere eine Lokalisierung der Partikel in der perinuklearen Region als Anzeichen für eine erfolgreiche Phagozytose angenommen werden konnte.

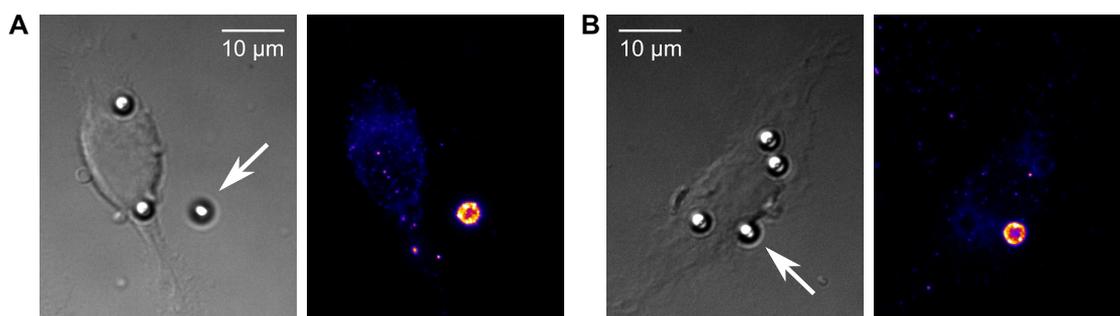


Abbildung 7.7. Nachweis erfolgreicher Phagozytose mittels sekundärem Antikörper. Die Abbildung zeigt den Nachweis erfolgreicher Partikel durch die Makrophage mittels sekundärem Antikörper. Dargestellt ist jeweils die gleiche Zelle unter DIC- und Fluoreszenzbeleuchtung. Die Darstellung der Fluoreszenzaufnahme ist dabei eine Intensitätsmittelung über alle relevanten Ebenen des aufgenommenen z-Stapels. Grafik A zeigt die Anlagerung des fluoreszenten sekundären Antikörpers an ein freies 3 µm IgG-Polystyrolpartikel (weißer Pfeil). Partikel, welche durch die Phagozytose von Zellmembran umschlossen sind (Partikel links), zeigen kein Fluoreszenzsignal. Grafik B zeigt die Unterscheidung zwischen Partikel innerhalb einer Zelle (ohne Fluoreszenzsignal) nach erfolgreicher Phagozytose und Partikel die sich außerhalb der Zellmembran befinden (Fluoreszenzsignal, weißer Pfeil).

Nachweis der erfolgreichen Phagozytose durch Anzeichen der Phagosomenreifung

Wie bereits in den obigen Abschnitten angesprochen, gab es diverse intrazelluläre Transportprozesse der Phagosomen und Partikelpositionen innerhalb der Zelle, welche auf eine erfolgreiche Aufnahme der Zielobjekte schließen ließen. Auf diese Anzeichen wurde bei der Durchführung aller Experimente geachtet.

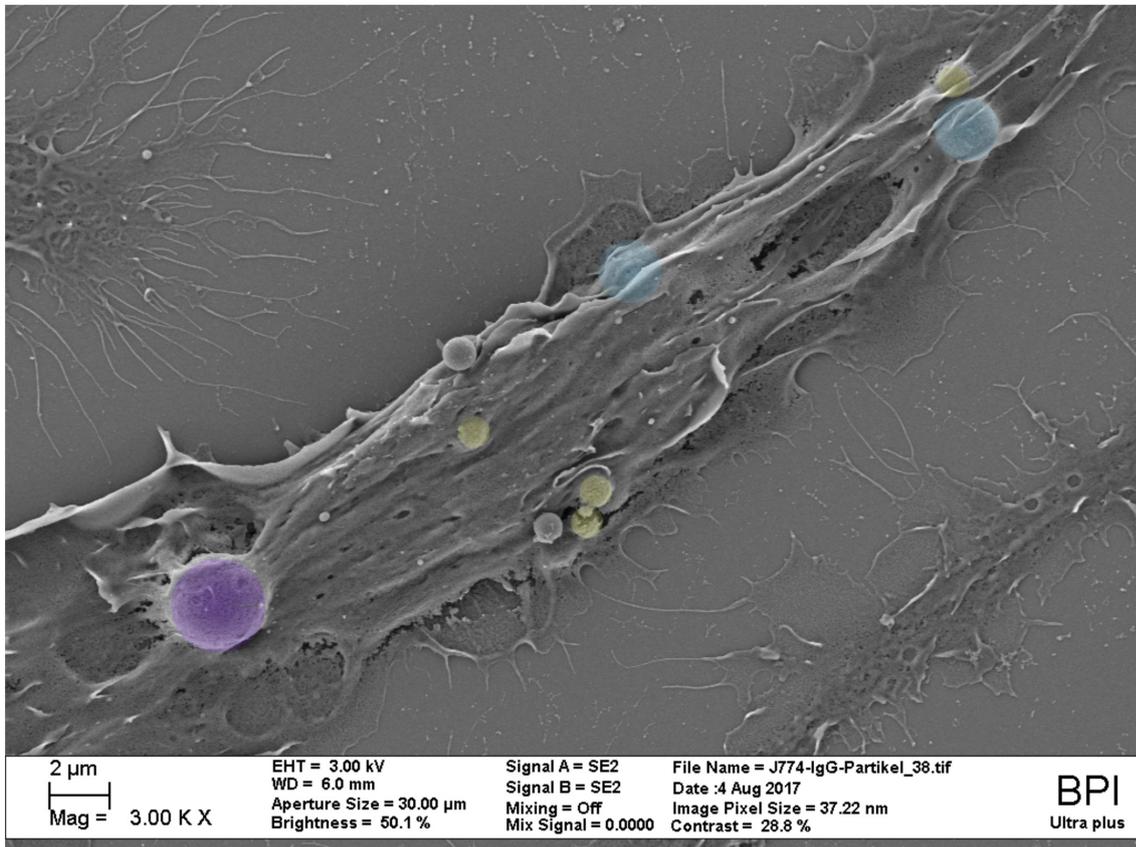


Abbildung 7.8. Nachweis erfolgreicher Phagozytose durch typische intrazelluläre Partikelpositionierung. Die Abbildung zeigt typische Positionen von Phagosomen innerhalb der Zelle, in Abhängigkeit des Durchmessers der Zielobjekte, welche auf eine erfolgreiche Phagozytose schließen ließen. Die Zelle wurde chemisch fixiert und mittels REM dargestellt. Die Aufnahmedetails sind im Bild angegeben. Große Partikel ($d = 3 \mu\text{m}$, violette Markierung) befanden sich typischerweise nach ausreichender Phagozytosedauer ($t_{\text{Phago}} > 1 \text{ h}$) in der perinuklearen Region. 2 μm große Partikel (blaue Markierung) befanden sich ebenfalls in dieser Region oder auf dem Weg dorthin, da hier die Transportgeschwindigkeit reduziert war. Kleine Partikel ($d = 1 \mu\text{m}$, gelbe Markierung) waren beliebig in der Zelle verteilt, befanden sich aber in vollem Umfang innerhalb der Zelle (und waren von Membran umschlossen).

Typische Partikelpositionen waren nach ausreichend langer Phagozytosedauer für 2 und 3 μm Partikel die perinukleare Region sowie für 1 μm Partikel eine beliebige Position innerhalb des Zytoplasmas, wobei das Partikel im vollen Umfang innerhalb der Zelle lokalisiert ist. Die Phagozytosedauer sollte dabei $> 1 \text{ h}$ gewählt werden. Die Abbildung 7.8 zeigt wahrscheinliche Partikelpositionen in Abhängigkeit des Durchmessers des Zielobjektes, farblich markiert in einer REM-Aufnahme. Die REM-Aufnahme bietet hier den Vorteil, dass bei den markierten Partikelpositionen die erfolgreiche Phagozytose des Zielobjektes deutlich wird, da diese vollständig von Membran umschlossen waren. Diese Tatsache war bei den Aufnahmen an lebenden Zellen nicht detektierbar.

Bei den intrazellulären Transportprozessen handelte es sich um aktiven Transport des Partikels, welcher aufgrund der Geschwindigkeit sowie der zurückgelegten Strecke durch rein diffusive Prozesse oder Transportprozesse auf der Zellmembran nicht realisierbar wäre. Die Beurteilung eines aktiven Transportes erfolgte zunächst rein visuell anhand der Bewegung des Zielobjektes während der Aufnahmen und wurde nach erfolgtem Nachverfolgen der Partikel im Rahmen der Auswertung bestätigt oder korrigiert. Details hierzu siehe Kapitel 7.7 und folgende. Als visuelles Kriterium diente außerdem, dass typischerweise die Nettobewegung eines Partikels nach erfolgreicher Phagozytose zunächst von dem Ort der Internalisierung an der Zellmembran in Richtung der perinuklearen Region erfolgte, unabhängig von der Partikelgröße. Ein Ausscheiden von Partikeln und somit ein Verlassen der Zellfläche wurde nach erfolgter phagosomaler Aufnahme nicht beobachtet.

Die mittels dieser Nachweismethode als phagozytiert detektierten Zielobjekten befanden sich alle in einem späteren Stadium der Phagosomenreifung. Die anfänglichen Stadien, beginnend mit der vollständigen Umschließung des Fremdkörpers durch eine Membrankappe sowie dem Abschluss der Internalisierung konnten hier nicht detektiert werden. Der Transport des Phagosomes und somit die Positionierung innerhalb der Zelle erfolgen erst nach der erfolgreichen Bildung eines Phagosomes.

7.5 Phagozytosewahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Oberfläche des Zielobjektes

Für die Bestimmung der Phagozytosewahrscheinlichkeit von IgG-opsonisierten Partikeln wurde die erfolgreiche Aufnahme der Zielobjekte mittels sekundärem Anti-Maus-IgG-Antikörper verifiziert (vergleiche Abschnitt 7.4). Die Zellen wurden 15 min, 30 min und 60 min nach erfolgtem Zellmembran-Partikel-Kontakt (d.h. plus je ~ 15 min Sedimentationszeit) fixiert und anschließend in sekundärem Antikörper inkubiert wie in Kapitel 5.5 beschrieben. Bereits nach 15 min waren mehr als (86 ± 11) % der Partikel (Mittelwert \pm Standardabweichung) mit Kontakt zur Zellmembran vollständig internalisiert (von Membran eingeschlossen). 30 min nach Partikel-Membran Kontakt waren es mehr als (96 ± 3) %. Vergleiche hierzu Abbildung 7.9.

Um die Aufnahme von Partikeln ohne IgG-Opsonisierung mit der von beschichteten Partikeln vergleichen zu können, wurden unbeschichtete Partikel ebenfalls in Kontakt mit der Zellmembran gebracht und die Zellen 15 min, 30 min und 60 min später fixiert. Eine Verifikation der erfolgreichen Phagozytose mittels sekundärem Antikörper war aufgrund fehlendem IgG auf der Partikeloberfläche hier nicht möglich. Ein Partikel wurde als phagozytiert betrachtet, wenn es sich innerhalb der Zelle befand. Eine Orientierung für die Positionen erfolgreich aufgenommener Mikropartikel boten dabei die Positionen IgG-beschichteter Partikel innerhalb von Zellen, welche mittels sekundärem Antikörper als Phagosome identifiziert werden konnten. Dabei handelte es sich um ein weniger strenges Phagozytosekriterium für unbeschichtete Partikel als für die Phagozytose der IgG-beschichteten Partikel. Ursache dafür war, dass bei unbeschichteten Partikeln nicht zwischen Partikel auf der Zellmembran und tatsächlichen Phagosomen unterschieden werden konnte, da die Mikroskopaufnahmen nur eine zweidimensionale Abbildung der Zellen in der x-y-Ebene lieferten. Das bedeutete, es ist eine Überschätzung der Phagosomenbildung bei den unbeschichteten Partikeln zu erwarten. Dennoch sind 60 min nach erfolgtem Kontakt zwischen Partikel und Zellmembran nicht mehr als (34 ± 16) % der Partikel aufgenommen. Vergleiche hierzu Abbildung 7.9.

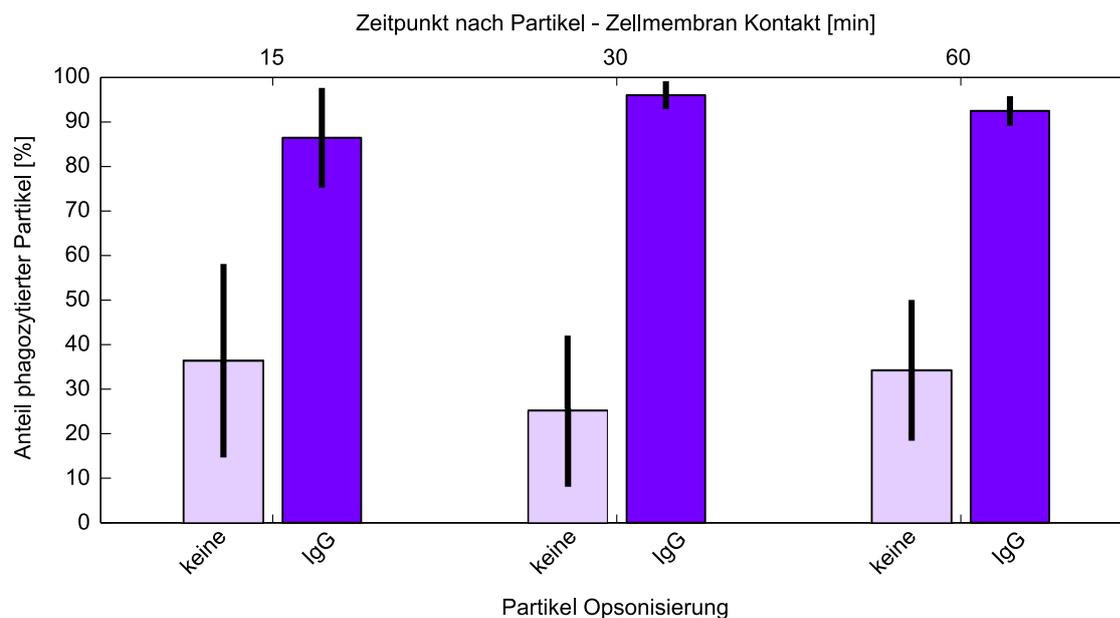


Abbildung 7.9. Phagozytosewahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Partikelopsonisierung.

Die Grafik zeigt den Prozentsatz der erfolgreich aufgenommenen 3 μm Polystyrolpartikel in Makrophagen 15 min, 30 min und 60 min nachdem die Partikel in Kontakt mit der Zellmembran gebracht wurden (~ 15 min Sedimentationszeit). Dabei wurden unbeschichtete und mit IgG opsonisierte Partikel verwendet. Die Aufnahmewahrscheinlichkeit für beschichtete Partikel war dabei zu jedem Zeitpunkt mindestens doppelt so hoch wie für unbeschichtete Partikel. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für die verschiedenen Zellproben. Für die Zeitpunkte 15 min, 30 min und 60 min wurden 299, 269 und 1262 unbeschichtete Partikel und 539, 594 und 798 IgG beschichtete Partikel analysiert.

7.6 Partikelaufnahme

Die Partikelinternalisierung durch die Makrophagen wurde unabhängig von der Partikelgröße durch Partikelsedimentation initiiert. Für Partikel mit einem Durchmesser größer als 1 μm wurde die Partikelaufnahme zusätzlich durch das gezielte Heranfahren der Partikel an die Zellmembran mittels holografischer optischer Fallen herbeigeführt [117, 119]. Der Großteil der aufgenommenen intrazellulären Phagosomenbewegungen wurde durch Partikelsedimentation und somit zufälliger Partikel-Zellmembran-Bindung initiiert, da hier alle Partikelgrößen verwendet werden konnten. Diese Methode bot den zusätzlich Vorteil, dass eine Vielzahl von Phagosomenreifungsprozessen in mehreren Zellen simultan aufgenommen und nachverfolgt werden konnten. Nachteilig an dieser Methode war jedoch, dass der Zeitpunkt der Partikelaufnahme sowie der Ort der Phagosomenbildung und somit auch der Abstand zwischen Phagosom und Nukleus zufällig entstand und nicht kontrolliert erfolgte. Des Weiteren konnte dabei nicht garantiert werden, dass die Phagosomenbewegung beginnend mit dem Internalisierungsprozess des Partikels sowie der Bildung eines Phagosomes vollständig aufgezeichnet wurde. Um einen möglichen Einfluss der potenziell fehlenden Aufnahme der ersten Phasen des Phagosomenreifungsprozesses auf die Charakterisierung des Transportverhaltens auszuschließen, wurden zusätzliche Kontrollexperimente durchgeführt. Dabei wurde der Partikel-Zell-Kontakt für jedes Phagosom individuell durch präzise Partikelpositionierung mittels optischer Falle hergestellt. Somit konnte eine komplette Aufzeichnung des Phagosomentransportes von der Bildung des Phagosomes in der Zellperipherie bis zum Kontakt des Phagosomes mit dem Nukleus sichergestellt werden. In

der anschließenden Analyse der Phagosomentrajektorien konnten keine Unterschiede in den Transportcharakteristika festgestellt werden, unabhängig von der Methode zur Initiierung der Partikelaufnahme. Auf dieser Grundlage wurden für die folgenden Analysen alle aufgezeichneten Phagosomentrajektorien zusammengelegt.

7.7 Allgemeine Aspekte des phagosomalen Transportverhaltens

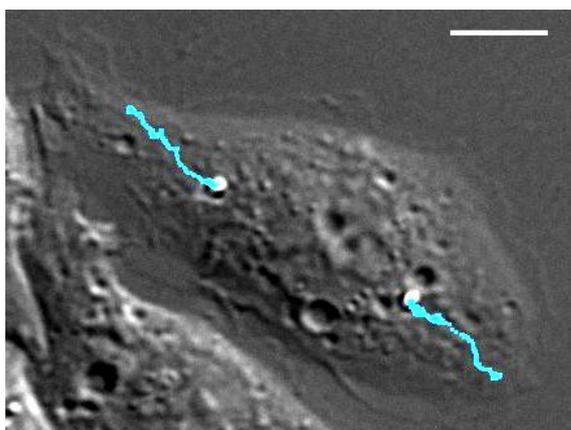


Abbildung 7.10. Transport zweier Phagosomen innerhalb eines Makrophagen. Die Abbildung zeigt eine DIC Aufnahme eines Zeitpunktes, circa 8 min nach Partikel-Zell-Kontakt, extrahiert aus einer Zeitserie des phagosomalen Transportes innerhalb des J774-Mausmakrophagen mit zwei phagozytierten IgG-opsonisierten Partikeln mit 2 µm Durchmesser. Mit cyan eingzeichnet sind die ermittelten Positionen der Phagosomen von der Internalisierung bis zum Zeitpunkt des DIC-Bildes. Der Maßstab beträgt 10 µm.

Nach einer erfolgreichen Internalisierung der Partikel wurden die Phagosomen während ihres Reifungsprozesses für mehrere Minuten bis Stunden nachverfolgt. Die exakte Positionsbestimmung des Phagosomes in Abhängigkeit von der Position des Zellkernmittelpunktes erfolgte dabei automatisiert mittels Kreuzkorrelationsalgorithmus wie in Kapitel 5.8 beschrieben. Abbildung 7.10 zeigt die ermittelten Phagosomenpositionen zweier Phagosomen innerhalb eines Makrophagen. Es wurden mehr als 50 Phagosomentrajektorien jedes Partikeldurchmessers analysiert und dabei erhebliche qualitative und quantitative Unterschiede zwischen den charakteristischen Transportprozessen der jeweiligen Phagosomengrößen festgestellt.

Abbildung 7.11 zeigt beispielhaft das typische Transportverhalten der Phagosomen entsprechend ihres Durchmessers. Große Phagosomen mit 3 µm Durchmesser wurden typischerweise persistent und direkt, das heißt mit nur wenigen Unterbrechungen und kaum Transport in die entgegengesetzte Richtung, von der Zellperipherie zur perinuklearen Region transportiert (zentripetaler Transport). Das resultierte in einer hohen Effizienz dieses Transportes, beispielhaft in Abb. 7.11C zu sehen. Abbildung 7.11B veranschaulicht exemplarisch das Transportverhalten intermediärer Phagosomen (2 µm Durchmesser), deren Transport eine deutlich verringerte Effizienz und Persistenz durch einen deutlich erhöhten Anteil von ausgedehnten Unterbrechungen des Transportes zeigte. Der Anteil an Transportphasen in die entgegengesetzte Richtung von der perinuklearen Region in Richtung Zellperipherie (zentrifugaler Transport) blieb hingegen gering. Erst für die Bewegung kleiner 1 µm Phagosomen spielte der zentrifugale Transport eine wesentliche Rolle. Wie anhand der Beispieltrajektorie in Abbildung 7.11A ersichtlich, war der Transport geprägt von häufigen Richtungsänderungen und Unterbrechungen sowie von einem starken zentrifugalen Transport. Dies führte zu einer sehr niedrigen Persistenz, einer stark reduzierten effektiven Geschwindigkeit und einer geringen Effizienz des Transportes (Definitionen der Eigenschaften siehe 5.9, Details siehe Abschnitte 7.8-7.12). Das typische Transportverhalten entsprechend des Partikeldurchmessers spiegelte sich auch in der Positionierung der Phagosomen innerhalb der Zelle wider, vergleiche hierzu Abschnitt 7.4 und Abb. 7.8.

Grundlegend wurde bei hinreichend langer Aufnahmezeit des phagosomalen Reifungspro-

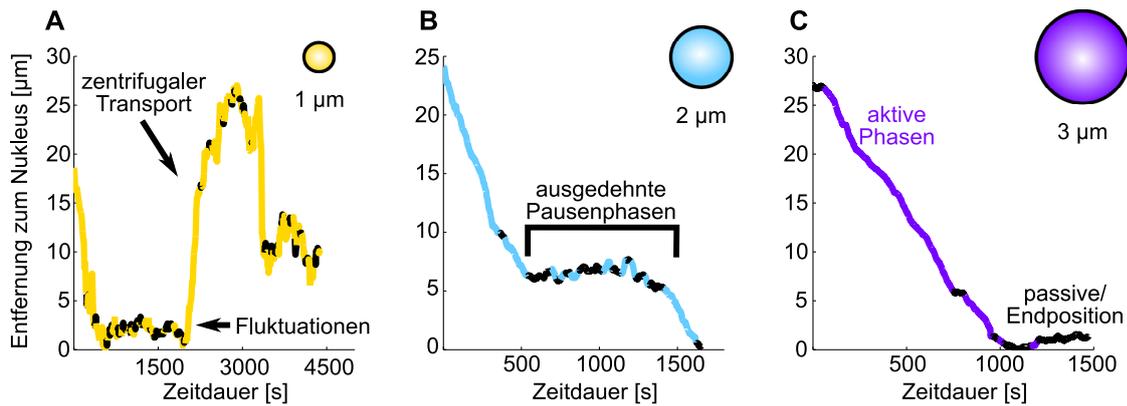
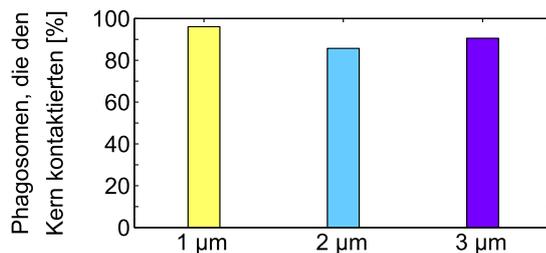


Abbildung 7.11. Exemplarische phagosomale Transporttrajektorien für diverse Phagosomendurchmesser in unbehandelten Makrophagen. Die Abbildung zeigt repräsentative Trajektorien der Phagosomenbewegung nach erfolgreicher Aufnahme von Polystyrolpartikeln mit einem Durchmesser von 1 µm (A, gelb), 2 µm (B, cyan) und 3 µm (C, violett). Dargestellt sind in den Grafiken jeweils der kürzeste Abstand zwischen Partikeloberfläche und der Nukleusmembran als Funktion der Zeitdauer der Phagosomenbewegung. Der Zeitpunkt 0 s entspricht dabei dem ersten Kontakt zwischen Partikel und Zelle. Die Trajektorien wurden in 30 s Transportphasen unterteilt. Veränderungen sich der Abstand zwischen Phagosom und Nukleus innerhalb einer Transportphase um mehr als 400 nm, wurde diese als aktiver Transport (farbige Transportphasen) klassifiziert. Bei Abstandsänderungen unterhalb des Schwellwertes handelte es sich um passive Phasen (schwarz eingezeichnet). Grafik (A) zeigt das typische Transportverhalten kleiner Phagosomen, gekennzeichnet durch häufige aktive Phasen in Richtung der Zellperipherie, schnelle Richtungswechsel des Transportes und vermehrte Phasen passiver Fluktuationen. Phagosomen mit einem Durchmesser von 2 µm zeigten typischerweise einen verringerten zentrifugalen Transport kombiniert mit häufigen Unterbrechungen des zentripetalen Transportes durch ausgedehnte passive Phasen bevor der Zellkern erreicht wurde. Große Phagosomen (C) wurden in der Regel aktiv, mit hoher Persistenz und Effizienz, von der Zellperipherie in die perinukleare Region transportiert. Nachdem der Nukleus erreicht wurde, folgten nahezu ausschließlich passive Phasen. Solche wohldefinierten Endpunkte des aktiven Phagosomentransportes wurden nur für 2 µm und 3 µm Partikel beobachtet. Bei 1 µm Partikel erfolgte meist ein erneuter Transport der Phagosomen in Richtung der Zellperipherie.

zesses in über 85 % aller Trajektorien ein Kontakt des Phagosomes mit der Nukleusaußenseite festgestellt, unabhängig des Phagosomendurchmessers oder dessen Endposition nach Abschluss des Transportes respektive der Beobachtung der Zelle. Siehe hierzu Abb. 7.12. Um das größenabhängige phagosomale Transportverhalten exakter quantifizieren zu können, wurden diverse Transportparameter eingeführt, welche in den folgenden Abschnitten detailliert besprochen werden. Diese Parameter sind der Rücktransport von Phagosomen (starker zentrifugaler Transport), die Verteilung der Transportphasen, die instantane und effektive Transportgeschwindigkeit, die Persistenz des Transportes und das Auftreten von ausgedehnten stationären Phasen während der Phagosomenbewegung. Für die Berechnung

Abbildung 7.12. Anzahl der Phagosomen, welche die Nukleusaußenseite kontaktierten. Die Abbildung zeigt die Anzahl an Trajektorien, in welchen das Phagosom die Nukleusaußenseite erreichte, was in mehr als 85 % aller Messungen unabhängig von der Phagosomengröße der Fall war. Diese Grafik gibt in Vergleich zu Abbildung 7.14 keine Auskunft über den Endpunkt des Phagosomentransportes.



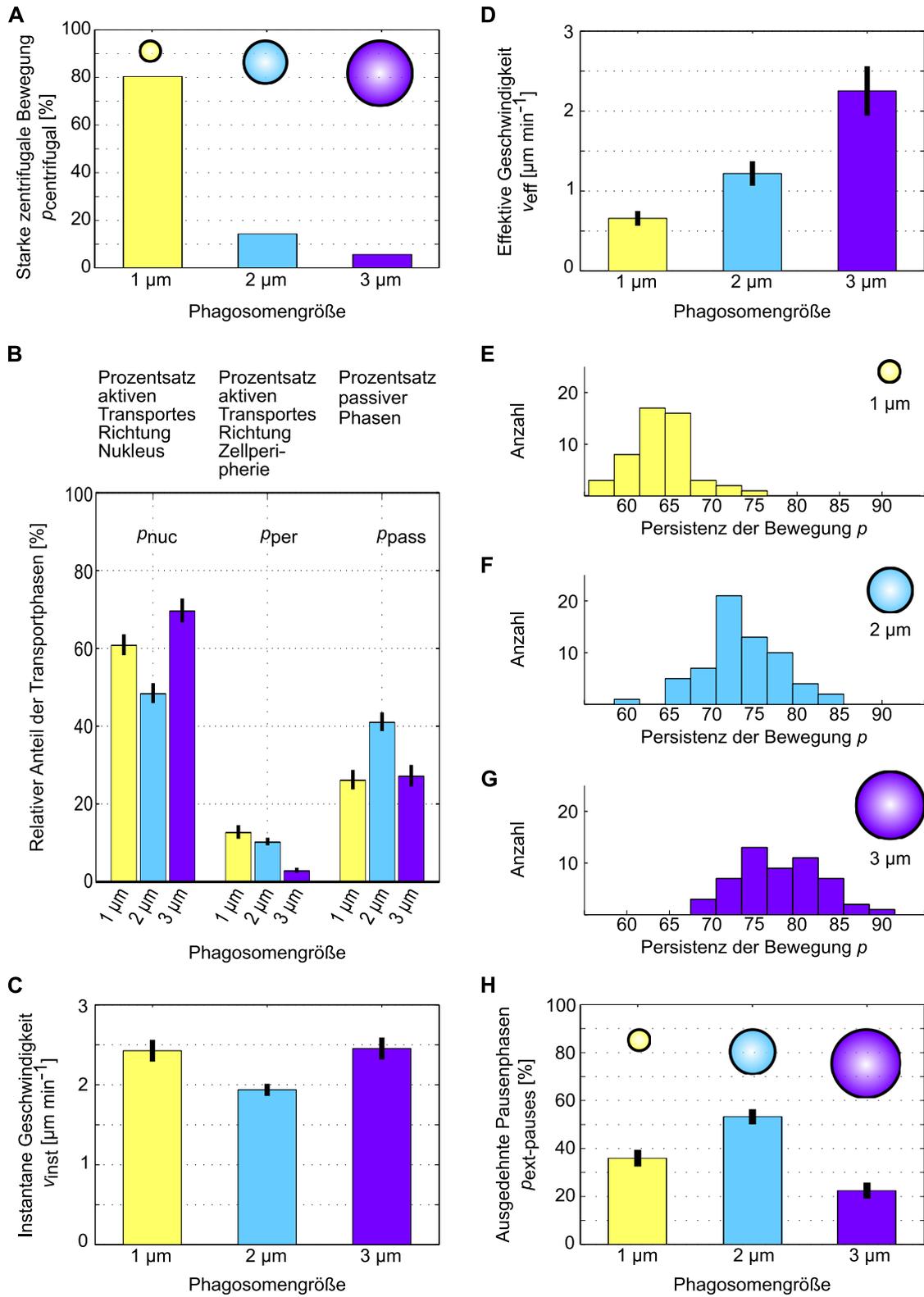
eines Teils dieser Parameter wurden die Trajektorien der kompletten Phagosomenbewegung in Untereinheiten von je 30 s unterteilt, wobei eine Differenzierung in aktive und passive Transportuntereinheiten erfolgte, entsprechend des innerhalb dieser 30 s zurückgelegten Transportweges. Der Schwellwert für diesen Transportweg war $0,8 \mu\text{m min}^{-1}$. Für weitere Details hierzu siehe Kapitel 5.9 sowie Abschnitt 7.13. Die Kennzeichnung der Untereinheiten in den Trajektorien ist in Abbildung 7.11 ersichtlich, wobei aktive Untereinheiten farbig hervorgehoben und passive schwarz gekennzeichnet wurden.

7.8 Rücktransport (starker zentrifugaler Transport) von Phagosomen in Richtung der Zellperipherie

Um das Auftreten von starkem zentrifugalen Transport zu quantifizieren wurde die prozentuale Anzahl an Phagosomen $p_{\text{centrifugal}}$ bestimmt, welche die perinukleare Region wieder verließen, nachdem sie den Nukleus durch aktiven Transport erreicht hatten. Die Phagosomen mussten dabei nach dem Erreichen des Zellkernes mindestens $5 \mu\text{m}$ wieder in Richtung der Zellperipherie transportiert werden [65]. Die Abbildung 7.13A zeigt die Werte für $p_{\text{centrifugal}}$ in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers. Es wird deutlich, dass nur für Zielobjekte mit $1 \mu\text{m}$ Größe der starke zentrifugale Transport eine wesentliche Rolle spielte. Partikel dieses Durchmessers wurden in 82 % der Fälle nach Erreichen der perinuklearen Region wieder Richtung Zellmembran transportiert. Partikel mit $2 \mu\text{m}$ Durchmesser verließen die Zellkernregion in 17 % der Fälle und $3 \mu\text{m}$ große Partikel nur noch in 6 % der Fälle.

Die Analyse des starken zentrifugalen Transportes erfolgte anhand der Phagosomenbewegung in lebenden Zellen, das bedeutet auf einer Zeitskala von maximal 2 h. Zur Untersuchung der Fragestellung, ob Partikel mit einem Durchmesser größer als $1 \mu\text{m}$ bei ausreichender Phagozytosedauer einen verstärkten Transport in Richtung Zellperipherie nach Erreichen der perinuklearen Region zeigen, wurden Zellen nach 30 min, 60 min und 24 h nach dem Partikel-Zell-Kontakt chemisch fixiert und die Position der Phagosomen innerhalb der Zellen bestimmt. Siehe Abbildung 7.14. Auch hier zeigte sich, dass im Verlauf der ersten Stunde des Phagozytoseprozesses 90,9 % der $3 \mu\text{m}$ großen Phagosomen in die perinukleare Region transportiert wurden, bei einer vollständigen Internalisierung aller Zielobjekte. Partikel mit einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ zeigten analog zu den $3 \mu\text{m}$ großen Partikeln ein Zunahme der am Kern lokalisierten Phagosomen innerhalb des Zeitraumes von 30 min bis 60 min von 38,9 % auf 43,3 % (bei einer Internalisierungsrate von 83,3 %). Dies ließ auf einen Transport der Phagosomen in die perinukleare Region schließen, allerdings mit einer geringeren Effektivität als bei großen Phagosomen. Intermediäre $2 \mu\text{m}$ große Phagosomen wurden zu 50,5 % innerhalb der ersten Stunde in die perinukleare Region transportiert (bei einer Internalisierungsrate von 96,2 %). Für diese Phagosomengröße spielte in diesem Zeitraum der verzögerte Transport eine wesentliche Rolle, siehe Abschnitt 7.9 & 7.12. Nach 24 h befanden sich 84,4 % der $2 \mu\text{m}$ großen Phagosomen und 94,7 % der $3 \mu\text{m}$ großen Phagosomen am Zellkern. Ein Verlassen der perinuklearen Region nach deren Erreichen hat auch nach eintägiger Phagozytosedauer nicht stattgefunden. Während sich nach 60 min 52,5 % aller internalisierten Phagosomen mit einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ am Zellkern befanden, waren es nach 24 h nur noch 33,4 % aller aufgenommenen Phagosomen. Das bedeutet, auch auf längeren Zeitskalen wurde das Verlassen der perinuklearen Region durch starken zentrifugalen Transport bei kleinen Phagosomen beobachtet. Über die Bewegung der Phagosomen innerhalb des Zeitraumes von 1 h bis 24 h kann keine detaillierte Aussage getroffen werden, da es sich um fixierte Zellproben handelte. Die Messungen an fixierten Zellen sowie die Beurteilung der Phagosomenpositionen wurden von Pamela An-

7. Größenabhängiger, phagosomaler Transport in unbehandelten Makrophagen



ger (technische Angestellte) und Christopher Greve (Bachelorstudent) durchgeführt, die Experimente wurden unter anderem von Steve Keller betreut, die Auswertung der Daten wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt bzw. überarbeitet [130].

7.9 Verteilung von Transportphasen während der Phagosomenreifung

Wie anhand Abbildung 7.14 verdeutlicht und bereits in Abschnitt 7.7 qualitativ analysiert wurde, war der intrazelluläre Transport der internalisierten Partikel von der Zellperipherie in Richtung des Zellkerns nicht für alle Partikelgrößen identisch. Die Effizienz des Transportes stieg dabei mit zunehmendem Partikeldurchmesser an. Um diesen Sachverhalt hinreichend quantifizieren zu können, wurden 3 Klassifizierungen des Transportes eingeführt: Phasen aktiven Transportes in Richtung der perinuklearen Region (zentripetaler Transport, p_{nuc}), Phasen aktiven Transportes in Richtung der Zellperipherie (zentrifugaler Transport, p_{per}) und Phasen passiver Bewegung (p_{pass}). Diese drei Transportphasen beziehen sich auf den phagosomalen Transport auf kurzen Zeitskalen von jeweils 30 s und wurden entsprechend der Beschreibung in Kapitel 5.9 definiert. Die Abbildung 7.13B zeigt die prozentuale Verteilung der Transportphasen in Abhängigkeit der Phagosomengröße. Phagosomen mit einem Durchmesser von 3 μm zeigten den höchsten Prozentsatz an aktiven Transportphasen in Richtung des Nukleus, $p_{\text{nuc}} = (70 \pm 3) \%$ (Mittelwert \pm s.e.m.), sowie den niedrigsten Anteil an aktiven Transportphasen in Richtung der Zellperipherie, $p_{\text{per}} = (3 \pm 1) \%$. Intermediäre Phagosome (2 μm Durchmesser) hatten den größten Anteil an passiven Bewegungsphasen, $p_{\text{pass}} = (41 \pm 2) \%$. Der höchste Anteil an aktiven zentrifugalen Transportphasen wurde von kleinen Phagosomen mit 1 μm Durchmesser hervorgebracht, $p_{\text{per}} = (13 \pm 2) \%$. Der Anteil an passiven Phasen, $p_{\text{pass}} = (26 \pm 3) \%$, lag dabei ähnlich niedrig wie bei 3 μm großen Phagosomen, $p_{\text{pass}} = (27 \pm 3) \%$.

Der große Anteil an aktiven zentripetalen Transportphasen in Kombination mit dem niedrigsten Anteil an zentrifugalen Transportphasen und wenigen passiven Phasen garantiert

Abbildung 7.13. Größenabhängige Charakteristika des phagosomalen Transportes in gesunden Zellen. Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit charakteristischer Eigenschaften des phagosomalen Transportes vom Durchmesser des internalisierten Partikels. Grafik (A) zeigt den Prozentsatz an Phagosomen, die nach Erreichen der perinuklearen Region durch aktiven Transport zurück zur Zellperipherie transportiert wurden, definiert als starker zentrifugaler Transport $p_{\text{centrifugal}}$. Dieser hatte mit $p_{\text{centrifugal}} = 82 \%$ primär starken Einfluss auf den Transport von 1 μm Phagosomen. Grafik (B) zeigt den Anteil diverser Transportphasen am Transport des Phagosomes von der Zellperipherie bis zum ersten Kontakt mit der Nukleusmembran. 3 μm Phagosomen zeigten den höchsten Prozentsatz aktiven Transportes in Richtung Nukleus p_{nuc} und den geringsten Prozentsatz an Transport in Richtung der Zellperipherie p_{per} . Phagosomen mit 2 μm Durchmesser wiesen den höchsten Anteil an passiven Phasen p_{pass} auf. Kleine Phagosomen mit 1 μm Durchmesser hatten den größten Anteil an Phasen zentrifugalen Transportes. Grafik (C) stellt die mittlere instantane Geschwindigkeit v_{inst} in Abhängigkeit des Phagosomendurchmessers dar, welche unabhängig der Phagosomengröße waren, mit 1,9 $\mu\text{m min}^{-1}$ bis 2,5 $\mu\text{m min}^{-1}$. Grafik (D) zeigt die mittleren effektiven Geschwindigkeiten v_{eff} des gesamten aktiven Phagosomentransportes. Diese Geschwindigkeiten hingen sehr stark von der Phagosomengröße ab und nahmen mit steigendem Partikeldurchmesser deutlich zu. Die Grafiken (E-G) zeigen die Verteilungen der Persistenz des phagosomalen Transportes der Einzeltrajektorien für Phagosomen mit 1 μm (E), 2 μm (F) und 3 μm Durchmesser (G). Die Persistenz des Transportes stieg mit zunehmendem Phagosomendurchmesser. Grafik (H) visualisiert den Prozentsatz an ausgedehnten Pausenphasen (Transportunterbrechungen) $p_{\text{ext-pauses}}$ während des Phagosomentransportes von der Zellmembran bis zum ersten Phagosom-Zellkern-Kontakt. 2 μm Phagosomen zeigten dabei den größten Anteil an ausgedehnten stationären Phasen. Die dargestellten Fehler sind die Standardfehler der Mittelwerte. Analysiert wurden 51, 63 und 53 Trajektorien für Phagosomen mit einem Durchmesser von 1 μm , 2 μm und 3 μm .

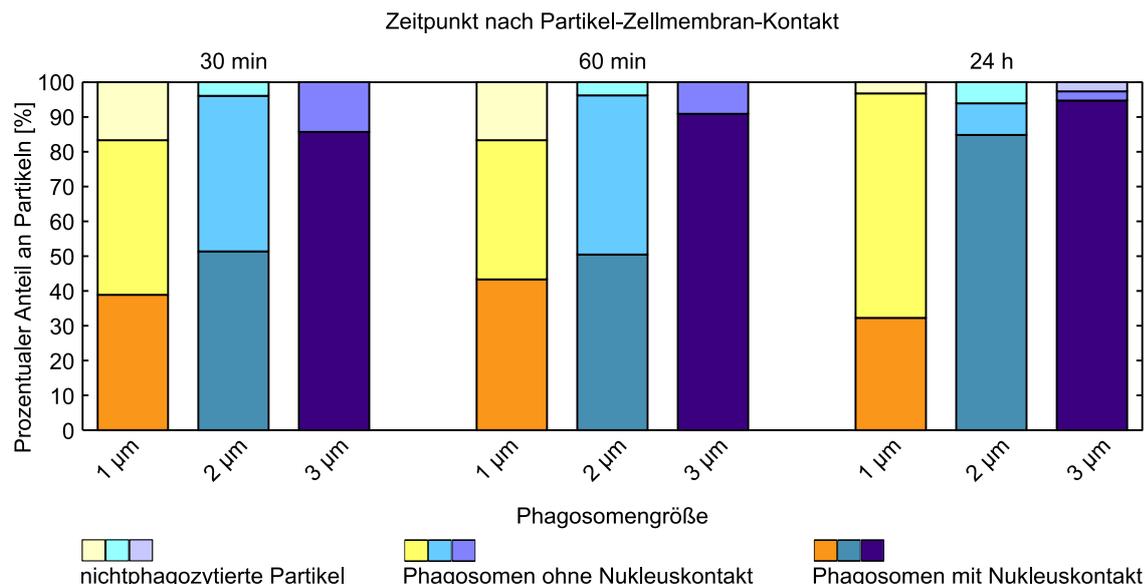


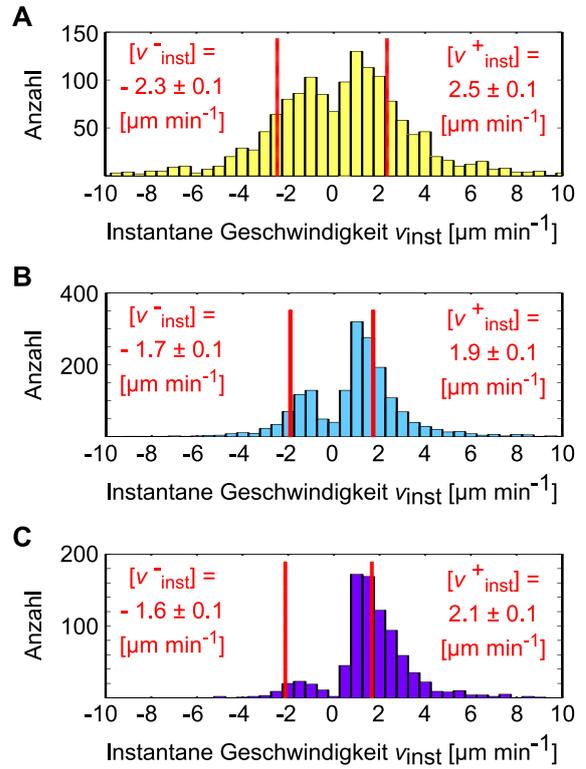
Abbildung 7.14. Phagosomenpositionen innerhalb der Zellen in Abhängigkeit der Phagozytosedauer und der Partikelgröße. Die Abbildung zeigt die Positionen der Partikel innerhalb der Makrophagen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Partikelzugabe zu den Zellen, in Abhängigkeit der Partikelgröße. Die betrachteten Phagozytosedauern waren 30 min, 60 min und 24 h. Kategorien für Partikelpositionen waren: Phagosomen mit oder ohne Nukleuskontakt für internalisierte Partikel und nichtphagozytierte Partikel, das heißt Partikel außerhalb des Zytoplasma. Durch einen Anstieg des Phagosomenanteils am Zellkern mit steigender Phagozytosedauer konnte auf einen Transport der Partikel in die perinukleare Region geschlossen werden. Nach 30 min befanden sich 85,7%, nach 60 min 90,9% und nach 24 h 94,7% der 3 µm großen Partikel in Kontakt mit dem Nukleus. Ein Abfall des Anteils an Phagosomen mit Nukleuskontakt bei steigender Phagozytosedauer ließ hingegen Rückschlüsse auf einen starken zentrifugalen Transport nach Erreichen der perinuklearen Region zu. Nach 60 min befanden sich 43,3% der 1 µm Partikel am Zellkern, nach 24 h nur noch 32,3% der Partikel. Datenakquirierung durch Pamela Anger und Christopher Greve. Analysiert wurden nach 30 min 36, 255 & 28; nach 60 min 30, 317 & 22; und nach 24 h 31, 33 & 38 Partikel mit einem Durchmesser von je 1 µm, 2 µm & 3 µm.

den großen Phagosomen mit 3 µm Durchmesser die höchste Effizienz des intrazellulären phagosomalen Transportes in Richtung Zellkern im Vergleich mit den anderen Phagosomengrößen. Die Transporteffizienz ist bei 2 µm großen Phagosomen aufgrund des erhöhten Prozentsatzes an passiven Bewegungsphasen reduziert. Die geringste Effizienz für den Transport von der Zellperipherie zur perinuklearen Region wiesen Phagosomen mit 1 µm Durchmesser auf, da hier das Phagosom häufig in die entgegengesetzte Richtung (Richtung Zellperipherie) transportiert wurde. Trotz der häufigen Fluktuationen der Transportrichtung zeigten kleine Phagosomen aber auch wieder deutlich weniger passive Phasen und somit Unterbrechungen des aktiven Transportes als intermediäre Phagosomen.

7.10 Geschwindigkeiten des phagosomalen Transportes auf kurzen & langen Zeitskalen

Zur genaueren und detaillierteren Quantifizierung der Transporteffizienz wurden die instantane Geschwindigkeit v_{inst} und die effektive Geschwindigkeit v_{eff} der Transportvorgänge in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers bestimmt (Details siehe Kapitel 5.9). Dabei ist die instantane Geschwindigkeit ein Maß für das phagosomale Transportverhalten auf kurzen Zeitskalen, hier im Bereich der Analyseintervalle von 30 s. Im Gegensatz dazu cha-

Abbildung 7.15. Instantane Geschwindigkeitsverteilung der Einzelsegmente entsprechend der Transportrichtung und Phagosomengröße. Die Abbildung zeigt die Verteilung der instantanen Geschwindigkeiten aller analysierten aktiven 30 s Intervalle für 1 μm (A), 2 μm (B) und 3 μm (C) große Phagosomen unter Beachtung der Transportrichtung. Positive Geschwindigkeiten charakterisieren aktiven zentripetalen Transport und negative Geschwindigkeiten aktiven zentrifugalen Transport. Die roten Linien und Werte geben den Mittelwert (\pm s.e.m.) der instantanen Geschwindigkeit der jeweiligen Richtung an. Für 1 μm kleine Partikel waren die mittleren Geschwindigkeiten und die Anzahl an Segmenten des Transportes in zentripetaler und zentrifugaler Richtung vergleichbar, wohingegen bei Phagosomen mit 3 μm Durchmesser der zentripetale Transport an Segmentanzahl und Geschwindigkeit deutlich überwog. Die Ergebnisse repräsentieren 1450 aktive Segmente aus 51 Trajektorien für 1 μm Partikeln, 1742 aktive Segmente aus 63 Trajektorien für 2 μm Partikeln und 869 aktive Segmente aus 53 Trajektorien für 3 μm Partikel.



Charakterisiert die effektive Transportgeschwindigkeit die Effizienz des Transportes auf einer längeren Zeitskala, hier mehrere Minuten bis Stunden. Diese Zeitdauer entspricht in der Regel dem kompletten, beobachteten phagosomalen Transportvorgang. Eine ausführliche Erläuterung zur Zusammensetzung der analysierten Zeitspanne befindet sich ebenfalls in Kapitel 5.9.

Die Grafik 7.13C zeigt, dass die mittlere instantane Geschwindigkeit für alle beobachteten Phagosomen in einem Bereich zwischen 1,9 und 2,5 $\mu\text{m min}^{-1}$ lag, unabhängig der Phagosomengröße. Die untere Grenze bildete dabei die mittlere instantane Geschwindigkeit der Phagosomen mit 2 μm Durchmesser, mit $v_{\text{inst}} = (1,9 \pm 0,1) \mu\text{m min}^{-1}$ (Mittelwert \pm s.e.m.). Die aktive Bewegung der 1 μm und 3 μm großen Phagosomen war mit $v_{\text{inst}} = (2,4 \pm 0,1)$ und $(2,5 \pm 0,1) \mu\text{m min}^{-1}$ dezent schneller.

Unterschiede hinsichtlich der Phagosomengröße wurden sichtbar, wenn man anstelle der Mittelwerte pro Trajektorie die instantanen Geschwindigkeiten als Histogramm aller Einzelwerte der aktiven 30 s Zeitintervalle unter Beachtung der Richtung des phagosomalen Transportes betrachtete. Die Verteilungen der instantanen Geschwindigkeiten für zentripetalen und zentrifugalen Transport waren nur für kleine Phagosomen mit 1 μm Durchmesser vergleichbar. Dies galt sowohl für die mittleren instantanen Transportgeschwindigkeiten, mit $[v_{\text{inst}}^-] = (-2,3 \pm 0,1) \mu\text{m s}^{-1}$ (Mittelwert \pm s.e.m.) für den Transport in Richtung der Zellperipherie und $[v_{\text{inst}}^+] = (2,5 \pm 0,1) \mu\text{m s}^{-1}$ für den Transport in die perinukleare Region, als auch für die Anzahl an Segmenten des Transportes in die jeweilige Richtung, siehe Abbildung 7.15. Für Phagosomen mittlerer Größe war die Anzahl an Segmenten mit zentrifugaler Transportrichtung bereits deutlich reduziert. Für Phagosomen mit einem Durchmesser von 3 μm existierten nur wenige, langsame ($[v_{\text{inst}}^-] = (-1,6 \pm 0,1) \mu\text{m s}^{-1}$) Segmente mit zentrifugaler Transportrichtung im Vergleich zur zentripetalen Transport-

richtung mit einer mittleren instantanen Geschwindigkeit von $[v_{\text{inst}}^+] = (2,1 \pm 0,1) \mu\text{m s}^{-1}$ und einer deutlich höheren Anzahl an Segmenten. Die mittlere instantane Geschwindigkeit der aktiven Einzelsegmente entspricht dabei nicht der im letzten Abschnitt angegebenen, mittleren instantanen Geschwindigkeit der Trajektorien, da bei letzteren zunächst über eine gesamte Trajektorie richtungsunabhängig gemittelt wurde und anschließend über alle Trajektorien einer Phagosomengröße.

Während die mittleren instantanen Geschwindigkeiten der Gesamtrajektorien (v_{inst} , Abbildung 7.13C) der diversen Phagosomengrößen vergleichbar zueinander waren, wiesen die mittleren effektiven Geschwindigkeiten (v_{eff} , Abbildung 7.13D) eine sehr starke Abhängigkeit von der jeweiligen Phagosomengröße auf. Die effektive Geschwindigkeit der $3 \mu\text{m}$ großen Phagosomen, $v_{\text{eff}} = (2,3 \pm 0,3) \mu\text{m min}^{-1}$ (Mittelwert \pm s.e.m.), war vergleichbar mit der mittleren instantanen Geschwindigkeit dieser Phagosomen und war signifikant höher als die mittleren effektiven Geschwindigkeiten kleinerer Phagosomen. Die Vergleichbarkeit mit der mittleren instantanen Geschwindigkeit entsprach den Erwartungen eines unidirektionalen, ballistischen Transportes mit hoher Persistenz und nahezu frei von Unterbrechungen oder Pausen. Die Reduzierung der mittleren effektiven Geschwindigkeit mit sinkendem Phagosomendurchmesser entsprach ebenfalls den Erwartungen anhand des generellen Verhaltens der Phagosomen (Abschnitt 7.7). Aufgrund des erhöhten Anteils an passiven Phasen sank die mittlere effektive Geschwindigkeit für Phagosomen mit $2 \mu\text{m}$ Durchmesser auf $v_{\text{eff}} = (1,2 \pm 0,2) \mu\text{m min}^{-1}$. Kleine $1 \mu\text{m}$ Phagosomen zeigten die geringste effektive Geschwindigkeit, mit $v_{\text{eff}} = (0,7 \pm 0,1) \mu\text{m min}^{-1}$, was den häufigen Wechseln der Transportrichtung geschuldet war. Dies korrelierte mit der geringsten Effizienz des phagosomalen Transportes.

7.11 Persistenz der Phagosomenbewegung

Um den Einfluss häufiger Richtungswechsel während der aktiven Phagosomenbewegung auf die Effizienz des Transportes exakter charakterisieren zu können, wurde die Persistenz des Transportes p für jede Phagosomengröße definiert, wie in Kapitel 5.9 beschrieben. Wie aufgrund der Phagosomengrößen abhängigen Transporteffizienz (vergleiche Abschnitt 7.9) zu erwarten, hing die Persistenz der Bewegung ebenfalls stark von dem Durchmesser der Phagosomen ab (Abbildung 7.13E-G). Entsprechend der höchsten effektiven Geschwindigkeit und des größten Anteils an zentripetalen Transportphasen in Kombination mit weniger als 5 % zentrifugalen Transportphasen wiesen Phagosomen mit einem Durchmesser von $3 \mu\text{m}$ die höchste Persistenz der Bewegung auf, mit einem Mittelwert von $p = (78 \pm 1) \%$ (Mittelwert \pm s.e.m., Abbildung 7.13G). $2 \mu\text{m}$ große Phagosomen zeigten eine reduzierte Persistenz mit $p = (74 \pm 1) \%$ (Abbildung 7.13F) und kleine Phagosomen mit $1 \mu\text{m}$ Durchmesser erreichten aufgrund häufiger Richtungswechsel während des aktiven phagosomalen Transportes die geringste Persistenz mit $p = (64 \pm 1) \%$ (Abbildung 7.13E). Die niedrige Persistenz der Bewegung $1 \mu\text{m}$ großer Phagosomen war in guter Übereinstimmung mit der im vorigen Absatz beschriebenen Gleichverteilung der instantanen Geschwindigkeiten der aktiven Einzelsegmente (Abbildung 7.15).

7.12 Ausgedehnte stationäre Phasen während des phagosomalen Transportes

Während der Betrachtung der Transportphasenverteilung (Abschnitt 7.9) zeigten $2 \mu\text{m}$ große Phagosomen besonders auffällige, ausgedehnte passive Phasen ohne Unterbrechung durch aktive Bewegung während ihres Transportes vom Ort der Internalisierung zur pe-

rinuklearen Region. Zur Quantifizierung dieses speziellen Transportverhaltens wurde der Prozentsatz an ausgedehnten stationären Phasen (*extended pauses*, $p_{\text{ext-pauses}}$) des phagosomalen Transportes von der Zellperipherie bis zum ersten Phagosom-Nukleus-Kontakt definiert, wie in Kapitel 5.9 beschrieben. Abbildung 7.13H zeigt diesen Prozentsatz in Abhängigkeit des Phagosomendurchmessers.

Intermediäre Phagosomen mit einem Durchmesser von $2\ \mu\text{m}$ wiesen dabei mit Abstand den höchsten Prozentsatz an ausgedehnten Pausenphasen auf, mit $p_{\text{ext-pauses}} = (53 \pm 3)\%$ (Mittelwert \pm s.e.m.). Dies entsprach den Erwartungen anhand der Abbildung 7.13B sowie den typischen phagosomalen Trajektorien von $2\ \mu\text{m}$ Phagosomen, dargestellt in Abbildung 7.11. Die anderen untersuchten Phagosomengrößen zeigten deutlich weniger ausgedehnte Pausen während des Transportes, mit $p_{\text{ext-pauses}} = (36 \pm 3)\%$ für Partikel mit $1\ \mu\text{m}$ Durchmesser und $p_{\text{ext-pauses}} = (22 \pm 3)\%$ für Partikel mit $3\ \mu\text{m}$ Durchmesser.

7.13 Einfluss genutzter Parameter auf die Analyse der Transporteigenschaften

Die für die Datenauswertung genutzten Parameter, welche einen potenziellen Einfluss auf die analysierten phagosomalen Transporteigenschaften haben, sind der Schwellwert zur Differenzierung zwischen aktiven und passiven Transportphasen, der wieder erreichte Mindestabstand zwischen Partikel und Nukleusmembran für die Definition eines starken zentrifugalen Transportes innerhalb der Trajektorie und die damit verbundene, zusätzlich analysierte Zeit. (Definition der Parameter siehe Kapitel 5.9.) Die Abbildung 7.16 zeigt das Verhältnis diverser Transporteigenschaften von großen $3\ \mu\text{m}$ messenden Phagosomen, zu kleinen $1\ \mu\text{m}$ messenden Phagosomen in Abhängigkeit der obengenannten Parameter. Diese Parameter wurden dabei in jeweils sinnvollen Bereichen variiert.

Die Grafiken 7.16A-C visualisieren zunächst den Einfluss des Schwellwertes zur Differenzierung zwischen aktiven und passiven Transportphasen auf das Verhältnis der instantanen Geschwindigkeiten (7.16A), das Verhältnis der effektiven Geschwindigkeiten (7.16B) und das Verhältnis der Anteile an zentripetaler Bewegung (7.16C), also aktive Bewegungsphasen in Richtung Nukleus zwischen großen und kleinen Phagosomen. Der Schwellwert wurde um bis zu 75 % des eigentlichen Wertes ($800\ \text{nm min}^{-1}$) variiert, von $200\ \text{nm min}^{-1}$ bis $1400\ \text{nm min}^{-1}$. Abhängig von dem genutzten Schwellwert schwankte das Verhältnis der instantanen Geschwindigkeiten von $3\ \mu\text{m}$ und $1\ \mu\text{m}$ Phagosomen zwischen $0,98 \pm 0,07$ und $1,03 \pm 0,09$. Das Verhältnis der effektiven Geschwindigkeiten variierte zwischen $3,1 \pm 0,6$ und $3,6 \pm 0,8$ und das Verhältnis der Anteile an aktiver, zentripetaler Bewegung zwischen großen und kleinen Phagosomen schwankte zwischen $1,51 \pm 0,06$ und $1,54 \pm 0,06$. Im Rahmen der Fehler (für alle angegebenen Größen Standardfehler des Mittelwertes) bestand somit keine Korrelation zwischen der Wahl des Schwellwertes und der Resultate der analysierten Transporteigenschaften.

Die Grafik 7.17 zeigt die Abhängigkeit der Anzahl an Trajektorien mit starkem zentrifugalem Transport von dem zu erreichenden Mindestabstand zwischen Phagosom und Nukleus nach Phagosom-Nukleus-Kontakt (Ausdehnung der perinuklearen Region). Dieser Schwellwert wurde von $3\ \mu\text{m}$ bis $7\ \mu\text{m}$ variiert. Ein kleinerer Schwellwert liegt unterhalb des Durchmessers großer Phagosomen und ist daher wenig sinnvoll, um eine perinukleare Region zu definieren (siehe auch Kapitel 9.6). Größere Schwellwerte als $7\ \mu\text{m}$ kollidieren sehr schnell mit der Gesamtgeometrie der verwendeten Zellen und wurden daher ebenfalls außer Acht gelassen. Der in dieser Arbeit genutzte Schwellwert betrug $5\ \mu\text{m}$, in Anlehnung an [74]. Die Grafik zeigt, dass mit größer werdendem Schwellwert die Anzahl an Trajektorien mit starkem zentrifugalem Transport zurückging, aber unabhängig des gewählten

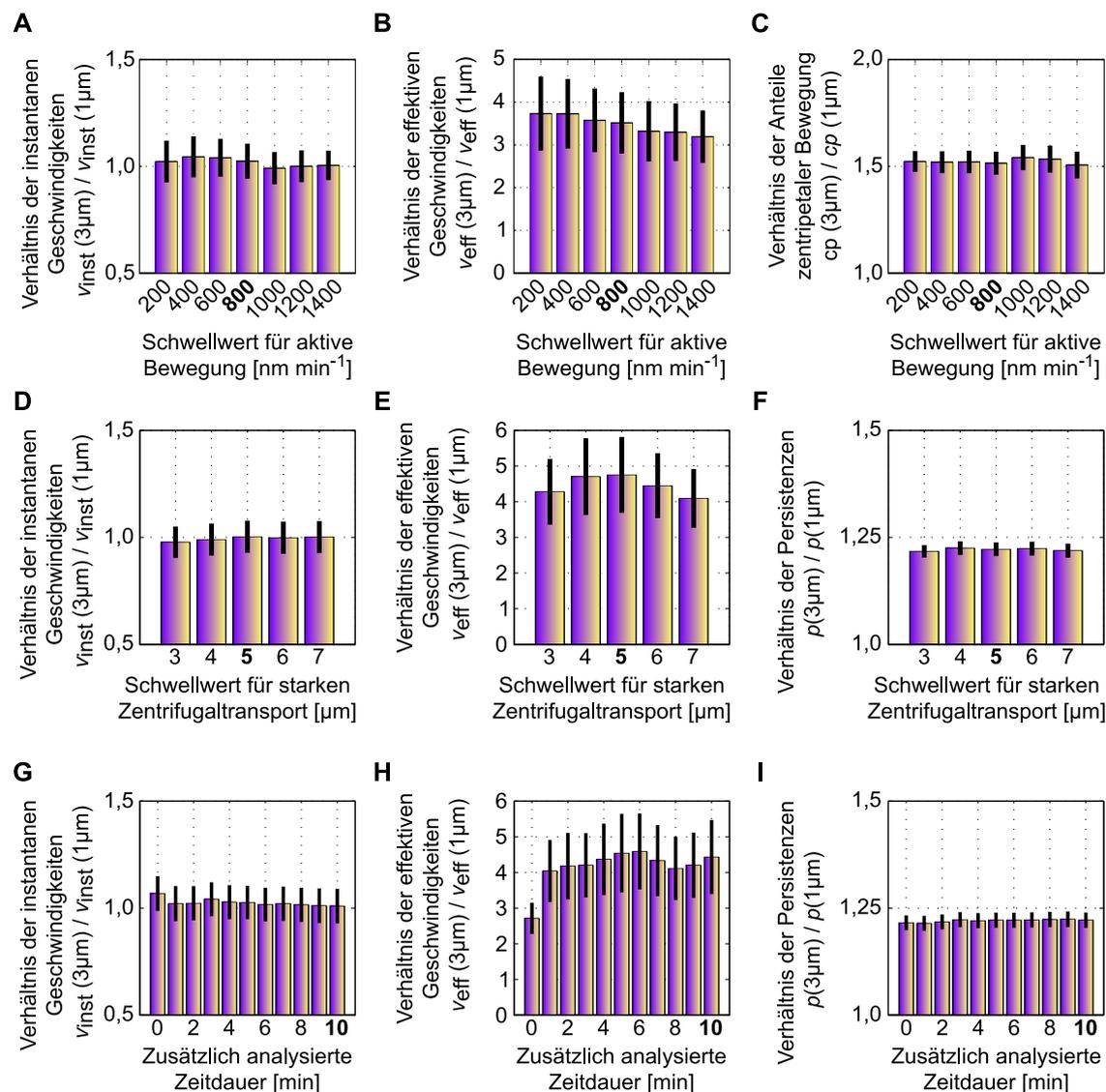
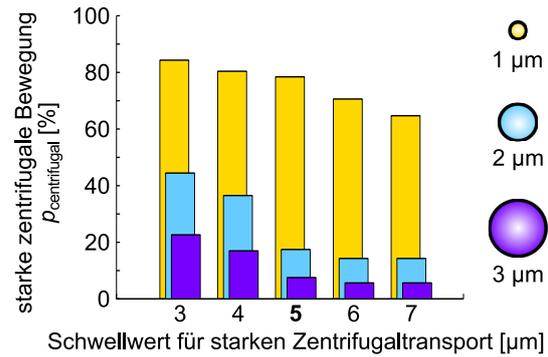


Abbildung 7.16. Übersicht über den Einfluss relevanter, genutzter Parameter auf die phagosomalen Transporteigenschaften. Die Abbildung zeigt den Einfluss des Schwellwertes zur Diskrimination zwischen aktiven und passiven Transportphasen (A-C), den Einfluss des Mindestabstandes zur Kategorisierung als Transport mit starker zentrifugaler Bewegung (D-F) und der zusätzlich analysierten Zeitdauer im Falle eines starken zentrifugalen Transportes (G-I) auf das Verhältnis der instantanen Geschwindigkeiten zwischen 3 µm und 1 µm Phagosomen (A,D,G), das Verhältnis der effektiven Geschwindigkeiten (B,E,H), das Verhältnis der aktiven, zentripetalen Transportphasen (C) und das Verhältnis der Transportpersistenzen (F,I). Für keine der angegebenen Größen zeigten die Verhältnisse im Rahmen ihrer Fehler eine Abhängigkeit von dem verwendeten Parameter. Ausnahme war das Verhältnis der effektiven Geschwindigkeiten für eine zusätzlich analysierte Zeit von 0 min (H). Details hierzu siehe Text. Hervorgehoben sind die in dieser Arbeit verwendeten Werte. Die angegebenen Abweichungen entsprechen den Standardfehlern der Mittelwerte. Zur Berechnung der angegebenen Transporteigenschaften lagen jeweils 51 Datensätze für 1 µm und 53 Datensätze für 3 µm Phagosomen zugrunde. Die Datensätze zur Berechnung der Grafiken (A-C) wurden dabei im Abgleich mit den Videodateien nachkorrigiert und weichen daher dezent von den anderen Datensätzen ab.

Abbildung 7.17. Anzahl an Trajektorien mit starker zentrifugaler Bewegung in Abhängigkeit des Mindestabstandes. Die Abbildung zeigt die Anzahl an phagosomalen Trajektorien, welche einen starken zentrifugalen Transport aufwiesen, in Abhängigkeit des gewählten Mindestabstandes zwischen Phagosom und Nukleus, welcher zur Erfüllung des Kriteriums wieder erreicht werden musste. Den größten Anteil zeigten dabei, unabhängig vom Schwellwert, kleine 1 μm messende Phagosomen.



Schwellwertes immer von den 1 μm Phagosomen dominiert wurde. Die geringste Anzahl wiesen dabei ebenfalls kontinuierlich 3 μm Phagosomen auf.

Die Grafiken 7.16D-E stellen den Einfluss der Ausdehnung der perinuklearen Region (Mindestabstand) auf das Verhältnis der instantanen Geschwindigkeiten (7.16D), das Verhältnis der effektiven Geschwindigkeiten (7.16E) und das Verhältnis der Transportpersistenzen (7.16F) zwischen 3 μm und 1 μm Phagosomen dar. Da das Verhältnis der Anteile aktiver, zentripetaler Bewegung nur bis zum ersten Kontakt zwischen Phagosom und Nukleus definiert war, wurde es durch den hier analysierten Schwellwert nicht beeinflusst. Der stärksten Schwankung unterlag hier das Verhältnis der effektiven Geschwindigkeiten mit Werten zwischen $4,1 \pm 0,8$ und $4,8 \pm 1,1$. Für keines der drei analysierten Verhältnisse war im Rahmen der Fehler (s.e.m.) eine Korrelation zwischen dem Mindestabstand für starken zentrifugalen Transport und den Resultaten der phagosomalen Bewegung zu beobachten. Neben der Klassifizierung des Transportes hing von dem Erreichen eines starken zentrifugalen Transportes aber auch die analysierte Zeitdauer ab. Die Grafiken 7.16G-I zeigen den generellen Einfluss der zusätzlich analysierten Zeit im Falle eines starken zentrifugalen Transportes auf das Verhältnis der instantanen Geschwindigkeiten (7.16G), das Verhältnis der effektiven Geschwindigkeiten (7.16H) und das Verhältnis der Persistenzen des Transportes (7.16I) von großen und kleinen Phagosomen. Die zusätzlich analysierte Zeitspanne der phagosomalen Bewegung wurde dabei zwischen 0 min und 10 min variiert. Dabei entsprach 0 min einer reinen Analyse des Transportes von der Zellmembran bis zum ersten Phagosom-Nukleus-Kontakt und 10 min dem standardmäßig genutzten Wert, um möglichst lange die intrazelluläre Phagosomenbewegung charakterisieren zu können. Größere Zeitspannen als 10 min waren aufgrund der technischen Realisierung der Experimente nicht möglich. Das Verhältnis der instantanen Geschwindigkeiten variierte dabei zwischen $1,02 \pm 0,08$ und $1,07 \pm 0,08$ und das Verhältnis der Persistenzen variiert zwischen $1,21 \pm 0,02$ und $1,22 \pm 0,02$. Somit war auch hier im Rahmen der Fehler (s.e.m.) keine Abhängigkeit der Analyseresultate von der zusätzlich ausgewerteten Zeit zu beobachten. Dies galt für das Verhältnis der effektiven Geschwindigkeiten nur für Zeitspannen > 0 min, wobei die Werte zwischen $4,0 \pm 0,9$ und $4,6 \pm 1,1$ lagen. Wurde keine zusätzliche Zeit analysiert (Zeitspanne = 0 min) war das Verhältnis der effektiven Geschwindigkeiten mit $2,7 \pm 0,4$ niedriger. Die Ursache hierfür war, dass mit einer zusätzlich analysierten Zeitspanne auch eine gewisse Verweildauer des Phagosomes am Kern einherging, bevor das Phagosom die perinukleare Region verließ, welche die Gesamtdauer des beobachteten phagosomalen Transportprozesses erhöhte und somit die effektive Geschwindigkeit tendenziell erniedrigte. Diese Verweildauer entfiel, wenn nur der Transportprozess bis zum ersten Phagosom-Nukleus-Kontakt betrachtet wurde. Für ausführliche Details zur Zusammensetzung und Bestimmung der analysierten Zeitdauern und Transportgrößen siehe Kapitel

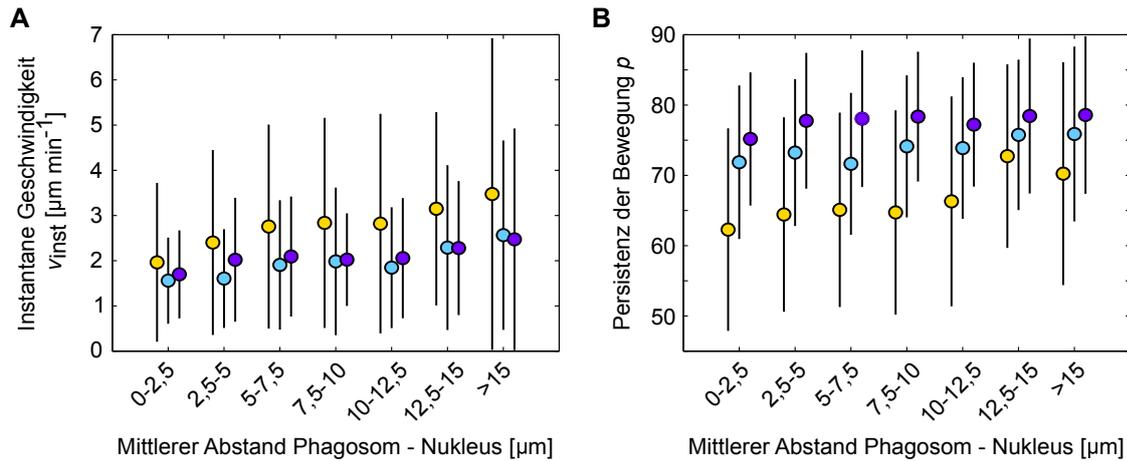


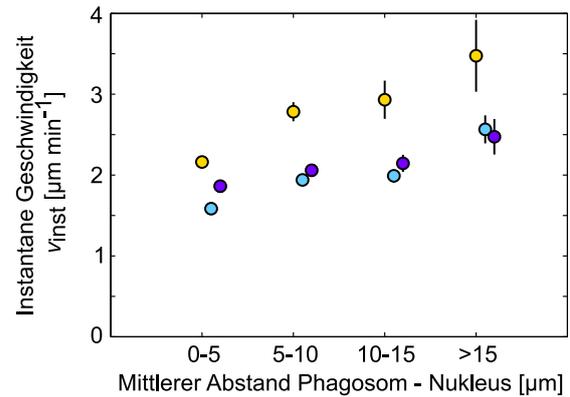
Abbildung 7.18. Einfluss des Abstandes zwischen Phagosom und Nukleus auf die instantane Geschwindigkeit und Persistenz des phagosomalen Transportes. Die Abbildung zeigt die instantane Geschwindigkeit (A) und die Persistenz (B) des phagosomalen Transportes von 1 µm (gelb), 2 µm (cyan) und 3 µm (violett) großen Phagosomen in Abhängigkeit des Abstandes des Phagosomes zur Nukleusmembran. Der Abstand wurde dabei innerhalb eines aktiven, 30s Transportsegmentes gemittelt und in 2,5 µm breite Intervalle zusammengefasst. Innerhalb der Standardabweichung (Fehlerbalken) zeigte sich keine Korrelation zwischen Abstand und instantaner Geschwindigkeit respektive Persistenz. Ausgewertet wurden 1372 aktive Segmente von 1 µm Phagosomen, 1734 Segmente von 2 µm Phagosomen und 853 Segmente von 3 µm Phagosomen.

5.9, für Details zur Verweildauer der Phagosomen in der perinuklearen Region siehe 10.5. Die Zeitdauer der Analyseintervalle $t = 30\text{ s}$ spielte hingegen eine untergeordnete Rolle und war ein Kompromiss aus ausreichend Aufnahmepunkten der Partikelpositionen innerhalb des Intervalls und möglichst hoher Auflösung der Partikelbewegung. Ein längeres Intervall ist nicht sinnvoll, da hochfrequente Richtungswechsel der Phagosomenbewegung nicht mehr aufgelöst werden könnten. Ein kürzeres Intervall konnte im Rahmen der hier genutzten technischen Möglichkeiten nicht für alle Phagosomengrößen realisiert werden.

7.14 Einfluss des Abstandes zwischen Phagosom und Nukleus auf die Transporteigenschaften

Zur Analyse potenzieller Einflussnahme der Zellgeometrie und damit verbundener zellulärer Eigenschaften wie der Kortextspannung auf das Transportverhalten der Phagosomen wurden charakteristische, größenabhängige Transporteigenschaften auf ihre Abhängigkeit von dem Abstand zwischen Phagosomenoberfläche und Nukleusmembran hin untersucht. Die Abbildung 7.18 zeigt die Abhängigkeit der instantanen Geschwindigkeit (7.18A) und der Persistenz des Transportes (7.18B) vom mittleren Abstand zwischen Phagosom und Nukleus. Der Abstand wurde dabei innerhalb einer aktiven 30 s Transportphase gemittelt und anschließend in 2,5 µm breite Intervalle zur übersichtlicheren Darstellung zusammengefasst. Die Transporteigenschaften wurden dabei separat für die jeweiligen Phagosomengrößen (1 µm, 2 µm und 3 µm) betrachtet. Die instantane Geschwindigkeit der Phagosomen mit 1 µm Durchmesser war dabei höher als die der größeren Phagosomen unabhängig vom Abstand. Die in Abbildung 7.18A gezeigten Mittelwerte wichen dabei von den in Abbildung 7.13C gezeigten Mittelwerten ab, da hier Einzelintervalle statt Gesamttrajektorien analysiert wurden. Bei der Persistenz des Transportes zeigten 3 µm Phagosomen stets den größten Wert und Phagosomen mit 1 µm Durchmesser die geringste Persistenz. Im Rah-

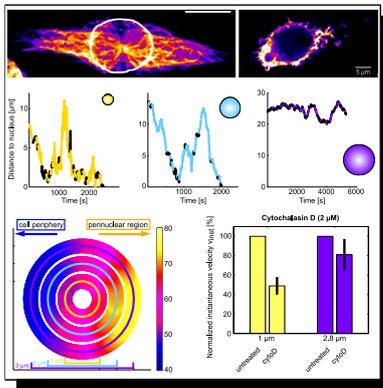
Abbildung 7.19. Einfluss des Phagosom-Nukleus-Abstandes auf die instantane Geschwindigkeit des Transportes. Die Abbildung zeigt eine alternative Darstellung der Abhängigkeit der instantanen Geschwindigkeit von 1 μm (gelb), 2 μm (cyan) und 3 μm (violett) großen Phagosomen von dem mittleren Abstand (zusammengefasst in 5 μm Intervallen) des Phagosomes zur Nukleusmembran. Dargestellt ist der Standardfehler des Mittelwertes. Für 1 μm große Phagosomen war eine deutliche Erhöhung der Geschwindigkeit mit zunehmendem Abstand erkennbar.



men der Standardabweichungen der dargestellten Werte ließ sich keine Korrelation zwischen dem Phagosom-Nukleus-Abstand und der instantanen Geschwindigkeit respektive der Persistenz der Bewegung feststellen. Auf die Darstellung negativer Abstände zwischen Phagosom und Nukleus wurde aufgrund geringer Statistik dieser Werte verzichtet. Negative Abstände waren möglich, da die Trajektorien auf den ersten Kontaktpunkt zwischen Phagosom und Nukleus als Nullpunkt normiert wurden, aber eine nachfolgende Bewegung des Phagosomes entlang des Kerns sowie eine nicht kugelförmige Geometrie des Nukleus nicht ausgeschlossen werden konnten.

Weiterhin wurden für eine detaillierte Analyse die mittleren Abstände in 5 μm breite Intervalle zusammengefasst und statt der Standardabweichung der Standardfehler des Mittelwertes dargestellt, siehe Abbildung 7.19. Die in Abhängigkeit des Phagosom-Nukleus-Abstandes betrachtete Transporteigenschaft von 1 μm , 2 μm und 3 μm großen Phagosomen ist erneut die instantane Geschwindigkeit. Hierbei zeigte sich ein Anstieg der instantanen Geschwindigkeit mit zunehmendem Abstand zwischen Phagosom und Nukleus. Dabei war der Anstieg der Geschwindigkeiten von Phagosomen mit 1 μm Durchmesser von $(2,16 \pm 0,07) \mu\text{m min}^{-1}$ bei einem Abstand zwischen 0 bis 5 μm auf $(3,48 \pm 0,45) \mu\text{m min}^{-1}$ bei einem Abstand von mehr als 15 μm am deutlichsten im Vergleich zu dem Anstieg von $(1,58 \pm 0,04) \mu\text{m min}^{-1}$ (Abstand 0 bis 5 μm) auf $(2,57 \pm 0,17) \mu\text{m min}^{-1}$ (Abstand mehr als 15 μm) bei 2 μm großen Phagosomen und dem geringsten Anstieg von $(1,87 \pm 0,07) \mu\text{m min}^{-1}$ (Abstand 0 bis 5 μm) auf $(2,47 \pm 0,22) \mu\text{m min}^{-1}$ (Abstand mehr als 15 μm) bei 3 μm Phagosomen. Somit nahm die instantane Geschwindigkeit im Randbereich der Zelle mit einem Phagosom-Nukleus-Abstand von mehr als 15 μm mit zunehmender Phagosomengröße ab. Kleine Phagosomen zeigten die höchste instantane Geschwindigkeit, obwohl ihnen innerhalb der Zelle mehr Platz zur Verfügung steht als großen Phagosomen, d.h. ein geringerer Einfluss kortikaler Spannungen oder ähnlicher Zellgeometrieeffekte auf kleine Phagosomen zu erwarten wäre. (Weiterführende Diskussion siehe Kapitel 9.)

Zusammenspiel intrazellulärer Filamente & assoziierter Motorproteine während des phagosomalen Transportes



Dieses Kapitel beschreibt die Resultate der Untersuchung und Analyse der molekularen Basis für die beobachteten Transportphänomene respektive die Zusammenhänge zwischen dem größenabhängigen, phagosomalen Transport und diverser intrazellulärer Filamente sowie den damit assoziierten Motorproteinen. Diese sind laut aktuellen Publikationen internationaler Gruppen für den intrazellulären Phagosomentransport verantwortlich. Zunächst erfolgt eine nähere Betrachtung der Rolle von Mikrotubuli und dem assoziierten Motorprotein Dynein für die beobachteten größenabhängigen Transportcharakteristika sowie eine analoge Analyse bezüglich der Aktinfilamente und dem assoziierten Motorprotein Myosin Va. Anschließend wird die Verteilung der obigen Filamente und Motoren sowie des zusätzlichen MT-basierten Motors Kinesin in den Zellen und an der Oberfläche der Phagosomen quantifiziert. Abschließend folgt eine kritische Betrachtung des Einflusses des Abstandes zwischen Phagosom und Nukleus auf die beobachteten Verteilungen der Filamente und assoziierten Motoren.

8.1. Mikrotubuli & MT-assoziierter Motoren-basierter Transport	114
8.2. Aktinfilamente & AF-assoziierter Motoren-basierter Transport	120
8.3. Vergleich MT- & AF-basierter Transport	128
8.4. Intrazelluläre Verteilung von Mikrotubuli	129
8.5. Intrazelluläre Verteilung von MT-assozierten Motoren	133
8.6. Intrazelluläre Verteilung von Aktinfilamenten	136
8.7. Intrazelluläre Verteilung von AF-assozierten Motoren	138
8.8. Einfluss des Abstandes zwischen Phagosom & Nukleus	140

8.1 Anteil von Mikrotubuli & auf Mikrotubuli-basierender Motorproteine an dem größenabhängigen, phagosomalen Transport

Aufgrund diverser Publikationen in den letzten Jahrzehnten ist allgemein anerkannt, dass der langreichweitige, intrazelluläre Transport von Phagosomen und Organellen durch die Motorproteine Kinesin, für zentrifugalen Transport, und Dynein, für zentripetalen Transport, gewährleistet wird und somit auf Mikrotubulifilament-basiertem Transport aufbaut. Im Vergleich dazu basiert der kurzreichweitige Transport von Phagosomen auf Aktinfilamenten und dem damit assoziierten Motorprotein Myosin [10, 37, 54, 55, 62, 74]. Es ist somit zu erwarten, dass diese Filamente und die zugehörigen Motorproteine als molekulare Basis für den Transport einen wesentlichen Einfluss auf die beobachteten, größenabhängigen Transporteigenschaften der Phagosome, besonders die steigende Transporteffizienz mit zunehmendem Phagosomendurchmesser, haben.

Inhibierung der Mikrotubulipolymerisation

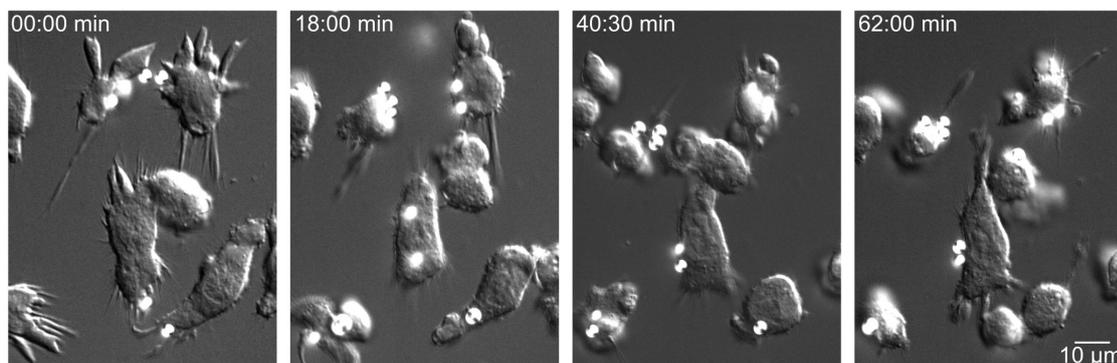


Abbildung 8.1. Zellverhalten und phagosomaler Transport unter Einfluss von 2 µM Nocodazol. Die Abbildung zeigt eine Zeitserie von dem Verhalten von J774-Mausmakrophagen und dem Transport von internalisierten 3 µm großen Phagosomen nach der Behandlung der Zellen mit Nocodazol. Aufgrund der reduzierten Mikrotubulipolymerisation durch Nocodazol zeigten die Zellen eine sämige, gallertartige Morphologie mit starken Variationen während der Messung. Des Weiteren kam es zu sehr starker Migration der Zellen und starker intrazellulärer Bewegung der Phagosomen. Eine quantitative Analyse des Phagosomentransportes war nicht durchführbar. Die Aufnahmen wurden an dem HOT Aufbau erstellt.

In diesem Abschnitt liegt das Hauptaugenmerk auf dem langreichweitigen Transport der Phagosomen und somit auf der Einbindung der Mikrotubuli und assoziierter Motorproteine in den phagosomalen Transport. Mit Hilfe der Droge Nocodazol wurde zunächst das intrazelluläre Mikrotubuligerüst stark reduziert [38, 65, 131]. Nach induzierter Phagozytose von 3 µm IgG-opsonisierten Partikeln an mit 2 µM Nocodazol inkubierten Makrophagen erfolgte eine Internalisierung der Partikel. Ein anschließender zentripetaler Transport der Phagosome konnte häufig nicht beobachtet werden. Die Makrophagen mit fehlendem Mikrotubuliskelett zeigten eine sehr elastische, sämige und gallertartige Morphologie. Die Zellen bewegten sich auf der Zeitskala des zu erwartenden Phagosomentransportes über mehrere Mikrometer, wobei der Nukleus innerhalb des Zytosols nahezu frei beweglich war, während sich die Morphologie der Zelle immer wieder stark veränderte. Auch die Phagosomen zeigten eine hohe Beweglichkeit innerhalb des Zytosols, welche nicht zwingend mit intrazellulärem Transport korreliert zu sein schien. Die Abbildung 8.1 repräsentiert das

Zellverhalten während einer Messung. Aufgrund der starken Bewegung des Nukleus sowie der Fluktuationen der Zellmorphologie und der Zellokalisierung war eine quantitative Analyse des phagosomalen Transportverhaltens in Zellen ohne Mikrotubuliskelett nicht möglich. Auf einen quantitativen Nachweis der Internalisierung der Partikel durch die behandelten Zellen wurde ebenfalls verzichtet, wobei bereits bekannt ist, dass Nocodazol die Aufnahme von Fremdobjekten in Makrophagen reduziert [131].

Inhibierung von Dynein Motorproteinen

Probleme bei Experimenten mit adhärenen J774-Mausmakrophagen und Nutzung von Nocodazol berichtete auch Blocker et. al [38]. Im Gegensatz zu ihrer Alternative, dem Ausweichen auf eine andere Zelllinie, wurde in dieser Arbeit statt der Zerstörung der Mikrotubuli (MT) die Inhibierung des assoziierten Motorproteins Dynein vorgezogen, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den bisherigen Ergebnissen zu gewährleisten. Die Inhibierung des Motorproteins Kinesin spielt aufgrund seiner Transportrichtung von der perinuklearen Region hin zur Zellperipherie eine untergeordnete Rolle für den phagosomalen Transport in Richtung Nukleus und wurde hier vernachlässigt.

Zur Untersuchung der molekularen Basis für den langreichweitigen, zentripetalen Transport, realisiert durch Dynein, wurden die Zellen mit 50 μM Ciliobrevin A behandelt und die Experimente zur induzierten Phagozytose identisch den unbehandelten Zellen durchgeführt, wie in Kapitel 5.6 beschrieben. Ciliobrevin A reduziert die ATPase-Aktivität von Dynein und verhindert somit die Vorwärtsbewegung des Motors mittels *power stroke* [113]. Die Beschreibung und Charakterisierung des phagosomalen Transportes erfolgte analog der qualitativen und quantitativen Transportanalyse in unbehandelten Zellen. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibierung von Dynein den phagosomalen Transport sehr stark in Abhängigkeit von der Phagosomengröße beeinflusst, wie anhand der folgenden Kriterien dargelegt ist.

Generelle Aspekte des Transportverhaltens. Die Abbildung 8.2 zeigt repräsentative Trajektorien des phagosomalen Transportes in Ciliobrevin A behandelten Zellen. Dabei ist erkennbar, dass der Einfluss der Droge mit zunehmendem Phagosomendurchmesser steigt. Das Transportverhalten 1 μm großer Phagosomen ist weiterhin gekennzeichnet durch häufige Fluktuationen der Transportrichtung und starkem zentrifugalen Transport nach Erreichen der perinuklearen Region und ist somit nahezu unverändert gegenüber unbehandelten Zellen. Der Transport von 2 μm großen Phagosomen weist in Zellen ohne aktive Dynein Motoren ebenfalls einen starken zentrifugalen Transport und somit das Fehlen eines wohldefinierten Endpunktes der Transportbewegung auf. Der Transport von großen Phagosomen mit einem Durchmesser von 3 μm kommt in Ciliobrevin A behandelten Zellen meist zum Erliegen und die Phagosomen verweilen in der Zellperipherie.

Starker zentrifugaler Transport. Zur Quantifizierung des Transportverhaltens von Phagosomen in Ciliobrevin A behandelten Zellen dienten die gleichen Klassifizierungen wie in unbehandelten Zellen. Die Abbildung 8.3 zeigt die Transportcharakteristika in Zellen ohne Dynein Motoren und ist analog der Abbildung 7.13 für unbehandelte Zellen.

Die Grafik 8.3A zeigt dabei den Prozentsatz der Phagosomen, welche nach erfolgreicher Internalisierung und phagosomalem Transport die Nukleusaußenseite kontaktierten. Für kleine und intermediäre Phagosomen ist dieser Prozentsatz in Ciliobrevin A behandelten Zellen nahezu identisch dem Prozentsatz in unbehandelten Zellen, mit 3% Abweichung für 1 μm große und 0% Abweichung für 2 μm große Phagosomen. Bei großen Phagosomen

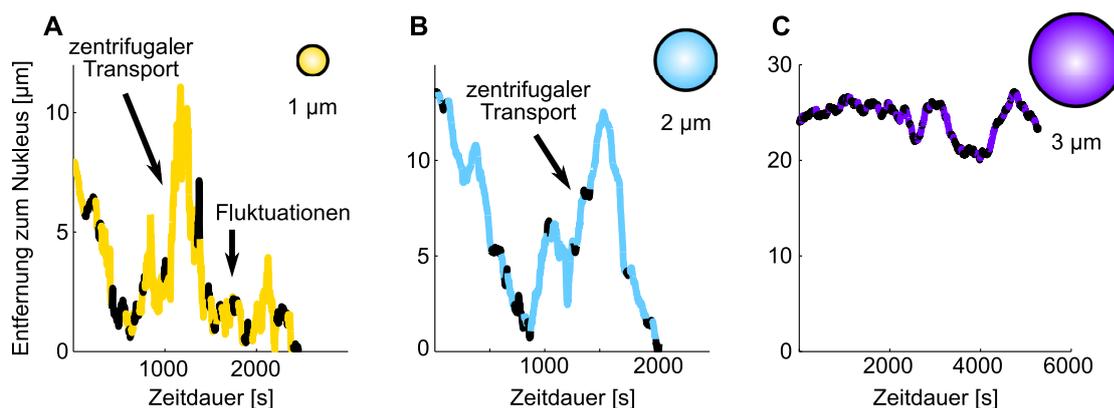


Abbildung 8.2. Beispiele für phagosomale Transporttrajektorien für diverse Phagosomen-durchmesser in Ciliobrevin A behandelten Makrophagen. Die Abbildung zeigt repräsentative Trajektorien des Transportes von Phagosomen mit einem Durchmesser von 1 μm (A), 2 μm (B) und 3 μm (C) in Ciliobrevin A behandelten Zellen. Ciliobrevin A unterbindet die intrazelluläre Aktivität von Dynein Motoren. Dargestellt sind in den Grafiken jeweils der kürzeste Abstand zwischen Partikeloberfläche und der Nukleusmembran als Funktion der Zeitdauer der Phagosomenbewegung, weitere Details siehe Beschreibung der Grafik 7.11, welche analoge Daten für den Transport in unbehandelten Zellen repräsentiert. Während kleine Phagosomen kaum Veränderungen des Transportverhaltens zeigen, fehlt ein wohldefinierter Endpunkt des Transportes bei der Bewegung mittlerer Phagosomen (B). Es kommt zu starkem zentrifugalen Transport. Bei großen Phagosomen entfällt ein effektiver Transport von der Zellperipherie zur perinuklearen Region, der Nukleus wird meist nicht erreicht.

mit 3 μm Durchmesser erreichten hingegen nur 40 % den Nukleus im Vergleich zu 91 % aller Phagosomen in unbehandelten Zellen.

Der Prozentsatz an starkem zentrifugalem Transport $p_{\text{centrifugal}}$ bezieht sich auf alle Phagosomen, welche die perinukleare Region erreichten und gibt an, wie viele von diesen Phagosomen die perinukleare Region durch aktiven Transport in Richtung Zellperipherie wieder verließen. Siehe hierzu Abbildung 8.3B und Kapitel 5.9. Bei dem Transport von kleinen und großen Phagosomen ist dieser Prozentsatz mit $p_{\text{centrifugal}} = 93\%$ für kleine und $p_{\text{centrifugal}} = 17\%$ für große Phagosomen nur dezent erhöht gegenüber dem Prozentsatz in unbehandelten Zellen, mit $p_{\text{centrifugal}} = 82\%$ bei 1 μm und $p_{\text{centrifugal}} = 6\%$ bei 3 μm Phagosomen. Dabei ist allerdings zu beachten, dass generell nur 40 % der 3 μm Phagosomen die perinukleare Region erreichten. Der Transport von intermediären Phagosomen hingegen war in Zellen ohne Dynein Motoren deutlich höher von starkem zentrifugalem Transport geprägt, mit $p_{\text{centrifugal}} = 83\%$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen, mit $p_{\text{centrifugal}} = 17\%$.

Verteilung von Transportphasen während der Phagosomenreifung. Auch bei der Quantifizierung der Transportphasen analog zu dem Verhalten der Phagosomen in unbehandelten Zellen, vergleiche Abbildung 7.13B, wird deutlich, dass die Zugabe von Ciliobrevin A neben einer generellen Reduktion der Transporteffizienz einen phagosomengrößenspezifischen Einfluss zeigte. Die Grafik 8.3C visualisiert die Verteilung der relevanten Transportphasen, Transport in Richtung perinuklearer Region p_{nuc} , Transport in Richtung Zellperipherie p_{per} und passive Transportphasen p_{pass} , in Zellen mit stark verminderter Aktivität von Dynein Motoren.

Im Allgemeinen ist der Anteil an Transportphasen in Richtung Nukleus gesunken, während der Prozentsatz an passiven Phasen anstieg, was in Übereinstimmung mit den Erwartungen liegt, nach denen Dynein ein notwendiger Transporter für langreichweitige Phagosomenbewegung ist [10]. Das Resultat war eine Abnahme der Transporteffizienz.

Eine genauere Analyse zeigte, dass die Reduktion der aktiven Phasen zentripetalen Transportes in Ciliobrevin A behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen mit $(57 \pm 5) \%$ für große Partikel am stärksten ausgeprägt war. Für kleine Phagosomen sank der Anteil dieser Transportphasen nur um $(25 \pm 4) \%$ und für $2 \mu\text{m}$ große Phagosomen um $(9 \pm 5) \%$. Der Anteil an passiven Phasen bei dem Transport von $3 \mu\text{m}$ Phagosomen stieg hingegen um $(56 \pm 5) \%$ an, im Vergleich zu einem Anstieg von $(21 \pm 7) \%$ bei kleinen und von $(7 \pm 5) \%$ bei intermediären Phagosomen. Die Kombination aus starker Reduktion aktiver zentripetaler Transportphasen und Erhöhung passiver Phasen zeigte, dass die Verminderung der Transporteffizienz für die $3 \mu\text{m}$ Phagosomen am deutlichsten ausfiel, was im Einklang mit der Beobachtung des fehlenden Transportes der großen Phagosomen zur perinuklearen Region in 40% der Fälle, siehe vorheriger Abschnitt, war.

Für den phagosomalen Transport in Richtung der Zellperipherie scheinen Dynein Motoren (entsprechend den Erwartungen gemäß der Laufrichtung der Motoren [10]) eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Anteile dieser Transportphasen zeigten kaum Veränderungen. Der Anstieg zentrifugaler Transportphasen betrug für $1 \mu\text{m}$ Phagosomen $(5 \pm 4) \%$, für $2 \mu\text{m}$ Phagosomen $(2 \pm 4) \%$ und für $3 \mu\text{m}$ Phagosomen $(1 \pm 1) \%$. Dies bedeutet, dass auch in Zellen mit fehlender Dynein-Aktivität kleine Phagosomen die häufigsten Fluktuationen bezüglich der phagosomalen Transportrichtung aufweisen, wohingegen $2 \mu\text{m}$ große Phagosomen trotz eines deutlich höheren Anteils an starkem zentrifugalen Transport von 83% , siehe vorheriger Abschnitt, keine Erhöhung der Fluktuationen zeigten. Die intermediären Phagosomen verhalten sich während des Transportes bis zum Erreichen der perinuklearen Region vergleichbar mit Phagosomen identischer Größe in unbehandelten Zellen und lassen Artefakte aufgrund fehlender Dynein Motoren erst nach Erreichen des Nukleus in Form von Rücktransport zur Zellperipherie erkennen.

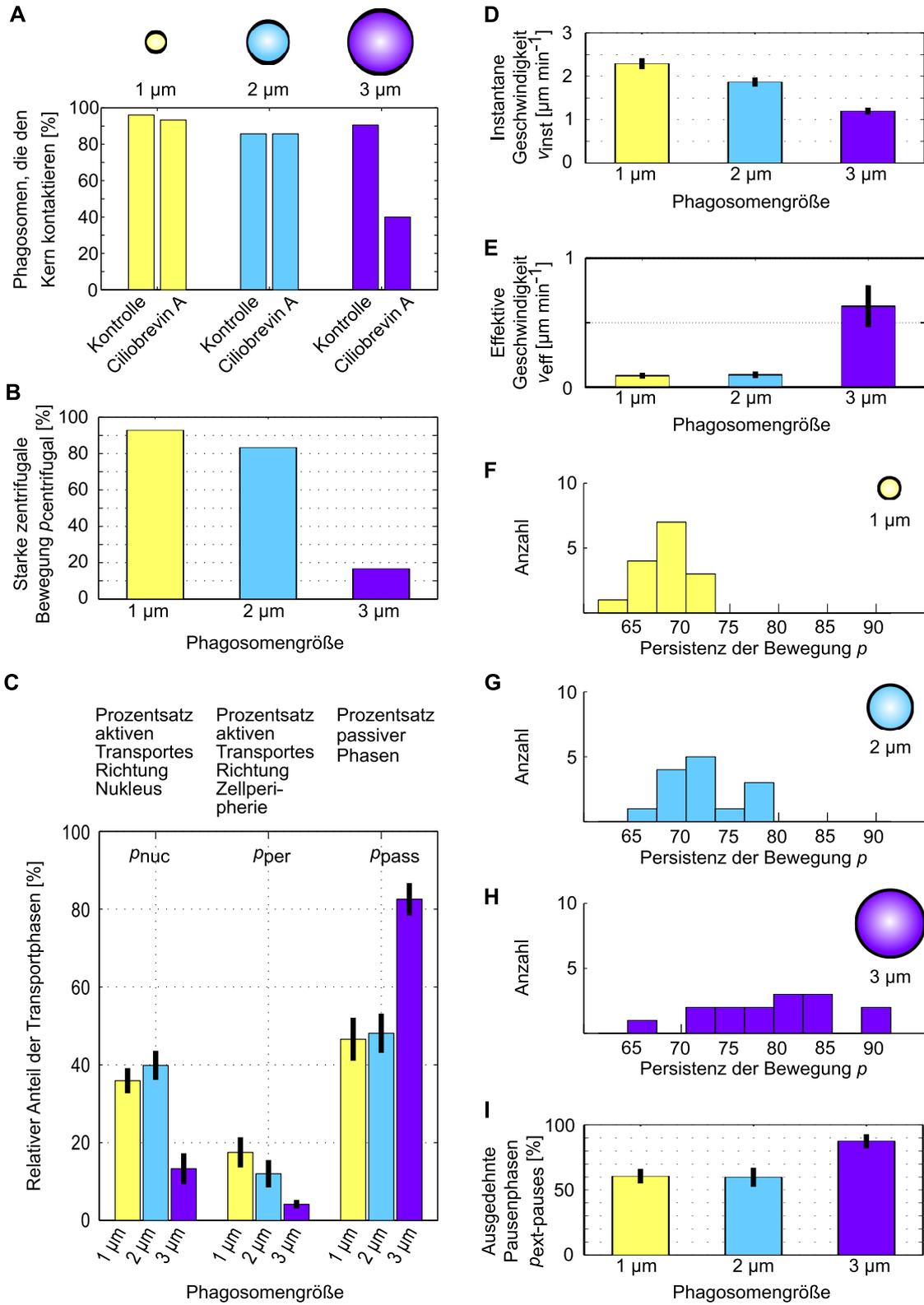
Geschwindigkeiten des phagosomalen Transportes auf kurzen & langen Zeitskalen.

Die Charakterisierung der phagosomalen Transportgeschwindigkeiten in Ciliobrevin A behandelten Zellen erfolgte analog zu den unbehandelten Zellen, wobei die instantane Geschwindigkeit v_{inst} (Abb. 8.3D) das Transportverhalten auf kurzen Zeitskalen und die effektive Geschwindigkeit v_{eff} (Abb. 8.3E) das Transportverhalten auf längeren Zeitskalen beschreibt.

Auf kurzen Zeitskalen änderte sich die instantane Geschwindigkeit von kleinen und intermediären Phagosomen trotz fehlender Dynein Motoren kaum ($(-0,1 \pm 0,1) \mu\text{m min}^{-1}$ bei $1 \mu\text{m}$ Phagosomen) bis gar nicht ($2 \mu\text{m}$ Phagosome) im Vergleich zu den Transportgeschwindigkeiten in unbehandelten Zellen. Trotz reduziertem Anteil an aktiven Transportphasen in Ciliobrevin A behandelten Zellen, vergleiche letzter Abschnitt, war die Geschwindigkeit des aktiven Transportes selbst innerhalb der Transportphasen unverändert. Für große Phagosomen hingegen bewirkte ein Fehlen der Dynein Motoren eine Reduktion der instantanen Geschwindigkeit um $(52 \pm 4) \%$, was bedeutet, dass auch auf kurzen Zeitskalen der phagosomale Transport von $3 \mu\text{m}$ Phagosomen um mehr als die Hälfte verlangsamt war gegenüber dem Transport in unbehandelten Zellen.

Auf langen Zeitskalen in der Größenordnung der experimentellen Beobachtungsdauer des Phagosomentransportes war die Transportgeschwindigkeit deutlich reduziert, unabhängig vom Durchmesser der Phagosomen. Für kleine und intermediäre Phagosomen betrug die effektive Geschwindigkeit lediglich $v_{\text{eff}} = (0,09 \pm 0,02) \mu\text{m min}^{-1}$ (Mittelwert \pm s.e.m.) und $v_{\text{eff}} = (0,10 \pm 0,03) \mu\text{m min}^{-1}$ aufgrund des erhöhten Anteils an starkem zentrifugalen Transport sowie der starken Fluktuationen bei der Bewegung kleiner Phagosomen. Die effektive Geschwindigkeit von Phagosomen mit einem Durchmesser von $3 \mu\text{m}$ war in Zellen ohne Dynein-Aktivität ebenfalls um $(74 \pm 9) \%$ reduziert, allerdings ist hierbei zu

8. Zusammenspiel intrazellulärer Filamente & assoziierter Motorproteine



beachten, dass die Geschwindigkeiten nur im Falle eines aktiven Phagosomentransportes berechnet wurden und somit ein Großteil der Bewegung großer Phagosomen in den Ciliobrevin A behandelten Zellen keine Beachtung fand, was die Aussagekraft der effektiven Geschwindigkeit großer Phagosomen mindert.

Anmerkung: Die hier angegebenen Werte der instantanen und effektiven Geschwindigkeiten entsprechen nicht den Werten von Keller u.a. [132], da eine andere Zeitspanne des phagosomalen Transportes zugrunde lag. Weitere Erläuterungen hierzu siehe Abschnitt 8.3.

Persistenz der Phagosomenbewegung. Für die Quantifizierung der Fluktuationen wurde auch in Ciliobrevin A behandelten Zellen die Persistenz des Phagosomentransportes p bestimmt, analog zu den unbehandelten Zellen, vergleiche Abbildung 7.13. Die Persistenz war in Zellen ohne Dynein-Aktivität nahezu identisch zu der Persistenz in unbehandelten Zellen mit $p = (72 \pm 4) \%$ (Mittelwert \pm s.e.m.) für $2 \mu\text{m}$ große Phagosomen, Abbildung 8.3F, und $p = (80 \pm 7) \%$ für $3 \mu\text{m}$ große Phagosomen, Abbildung 8.3G. Lediglich die Persistenz der kleinen Phagosomen, Abbildung 8.3H, war leicht erhöht mit $p = (69 \pm 3) \%$, aber dennoch kleiner als die der größeren Phagosomen. Die Persistenz der Bewegung nahm somit auch in Zellen ohne Dynein Motoren mit steigendem Phagosomendurchmesser zu, wobei auch hier die reduzierte Transporteffizienz der $3 \mu\text{m}$ Phagosomen zu berücksichtigen ist. Die größeren Fehler der Mittelwerte lassen sich erklären durch eine reduzierte Statistik bezüglich der Trajektorien in Ciliobrevin A behandelten Zellen.

Abbildung 8.3. Größenabhängige Charakteristika des phagosomalen Transportes in Ciliobrevin A behandelten Zellen. Die Abbildung zeigt die Veränderungen der charakteristischen Transporteigenschaften entsprechend des Phagosomendurchmessers in mit $50 \mu\text{M}$ Ciliobrevin A behandelten Zellen. Die Droge Ciliobrevin A vermindert dabei die ATPase-Aktivität des Motorproteins Dynein und inhibiert somit langreichweitigen, Mikrotubuli-basierten Transport in Richtung perinuklearer Region durch Dynein. Es wurde ein verstärkter Einfluss von Ciliobrevin A auf den Transport großer Phagosomen beobachtet. Die dargestellten Transporteigenschaften sind analog zu denen unbehandelter Zellen, dargestellt in Abbildung 7.12 & 7.13. Grafik (A) zeigt den Prozentsatz der Phagosomen, welche während ihres Transportes den Nukleus erreichten in unbehandelten (Kontrolle) und Ciliobrevin A behandelten Zellen in Abhängigkeit der Phagosomengröße. Für große Phagosomen wird der Nukleus ohne Dynein in weniger als 50% erreicht. Grafik (B) zeigt den Prozentsatz der Phagosomen, die nach Erreichen der perinuklearen Region diese wieder verlassen, definiert als Prozentsatz starken zentrifugalen Transportes $p_{\text{centrifugal}}$. Dieser ist in Ciliobrevin A behandelten Zellen für $2 \mu\text{m}$ Phagosomen mit 83% deutlich erhöht. Grafik (C) zeigt die relativen Anteile an aktiven zentripetalen p_{nuc} und aktiven zentrifugalen p_{per} Transportphasen sowie passiven Phasen p_{pass} an der Bewegung der Phagosomen. Der Anteil an aktiven Transportphasen in Richtung Nukleus hat dabei im Allgemeinen abgenommen, während der Anteil an passiven Phasen zunahm, mit einem stärkeren Effekt für große Phagosomen. Grafik (D) zeigt die mittleren instantanen Geschwindigkeiten v_{inst} , welche für kleine und intermediäre Phagosomen in Zellen ohne Dynein nahezu unverändert sind im Vergleich mit unbehandelten Zellen. Für große Phagosomen ist sie um mehr als 50% reduziert. Grafik (E) visualisiert die mittleren effektiven Geschwindigkeiten des Transportes v_{eff} , welche unabhängig vom Phagosomendurchmesser stark reduziert sind gegenüber unbehandelten Zellen. Die Grafiken (F-H) zeigen die Verteilungen der Persistenz des Transportes p von $1 \mu\text{m}$, $2 \mu\text{m}$ und $3 \mu\text{m}$ großen Phagosomen, welche nur geringe Veränderungen gegenüber natürlichen Zellen aufweisen, wobei die mittlere Persistenz weiterhin mit steigendem Phagosomendurchmesser zunimmt. Grafik (I) stellt den Prozentsatz an ausgedehnten Pausenphasen $p_{\text{ext-pauses}}$ entsprechend der Phagosomengröße dar. Dieser ist für alle Größen durch die Dynein-Inhibierung erhöht, mit dem drastischsten Anstieg für $3 \mu\text{m}$ große Phagosomen auf $(87 \pm 5) \%$. Die dargestellten Fehler sind die Standardfehler der Mittelwerte. Analysiert wurden 15, 14 und 15 Trajektorien für Phagosomen mit einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$, $2 \mu\text{m}$ und $3 \mu\text{m}$.

Ausgedehnte stationäre Phasen während des phagosomalen Transportes. Abschließend wurden analog zu den unbehandelten Zellen ausgedehnte passive Phasen während des Phagosomentransportes ohne Unterbrechung durch aktive Phasen in Zellen ohne Dynein untersucht, vergleiche Abbildung 8.3I. Die Definition ausgedehnter Pausenphasen $p_{\text{ext-pauses}}$ bezieht sich auch hier nur auf die erste Phase des Transportes vom Ort der Internalisierung bis zum erstmaligen Erreichen der perinuklearen Region. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen waren die Anteile an extensiven Pausenphasen unabhängig der Phagosomengröße in Ciliobrevin A behandelten Zellen auf über 60% gestiegen ($p_{\text{ext-pauses}} = (61 \pm 6)\%$ für 1 μm Phagosomen, $p_{\text{ext-pauses}} = (60 \pm 7)\%$ für 2 μm Phagosomen und $p_{\text{ext-pauses}} = (87 \pm 5)\%$ für 3 μm Phagosomen, Mittelwert \pm s.e.m.). Dies entspricht den Beobachtungen der vorherigen Abschnitte von einer reduzierten Transporteffizienz und erhöhten Anteilen passiver Transportphasen im Allgemeinen in Ciliobrevin A behandelten Zellen.

Der Anstieg der ausgedehnten Pausenphasen war dabei mit $(65 \pm 6)\%$ für 3 μm große Phagosomen deutlich ausgeprägter als bei den anderen Phagosomendurchmessern. Somit zeigte auch diese Transportcharakteristik einen stärkeren Einfluss des Dynein-Inhibitors Ciliobrevin A auf den Transport großer Phagosome mit einem Durchmesser von 3 μm im Vergleich zu dem Transport von intermediären und kleinen Phagosomen.

8.2 Anteil von Aktinfilamenten & auf Aktinfilamenten basierender Motorproteine an dem größenabhängigen phagosomalen Transport

Im Vergleich zu den Mikrotubuli ist der kurzreichweitige intrazelluläre Transport eng verknüpft mit Aktinfilamenten (AF) und deren assoziierten Motorproteinen, den Myosinen, allen voran dem Motor Myosin Va [65]. Über die Funktion von AF als Basis für Motorenaktivität hinaus sind weitere potenzielle Einflussmöglichkeiten von Aktin als molekulare Basis auf den Transport von intrazellulären Organellen existent. Zum einen eine Organellenbewegung aufgrund auftretender Polymerisationskräfte der Aktinfilamente und zum anderen eine Kopplung der zu transportierenden Objekte an den retrograden Aktinfluss [54, 55, 117, 133]. Daher wurde zunächst generell der Einfluss der AF auf die größenabhängigen Transporteigenschaften untersucht, bevor eine detaillierte Betrachtung des Myosin Va Motorproteins erfolgte.

Inhibierung der Polymerisation von Aktinfilamenten

Zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen intrazellulären Aktinfilamenten und dem größenabhängigen Transport erfolgte eine Behandlung der Makrophagen mit der Droge Cytochalasin D, einem Pilzmetaboliten, welcher die Polymerisation der Aktinfilamente durch das Anlagern an die Filamentenden unterbindet [110]. Die Messungen des Phagosomentransportes in Zellen mit verminderten AF erfolgten an einer Magnetischen Pinzette [128] und wurde von Konrad Berghoff durchgeführt.

Durch die Wirkung von Cytochalasin D und die damit verbundenen Verkürzungen der AF kam es zu Veränderungen der Zellmorphologie und Einschränkungen des intrazellulären Transportes. Abbildung 8.4 zeigt diese Morphologieänderungen in Abhängigkeit der Konzentration der Droge. Für hohe Konzentrationen war der Aktinkortex unterhalb der Zellmembran nahezu vollständig zerstört, was eine enorme Einschränkung der Zellperipherie zur Folge hatte (8.4D), welche eine Messung des phagosomalen Transportes nicht zuließ. Zu geringe Cytochalasin D Konzentrationen (8.4B) schienen die Zellen nur gering-

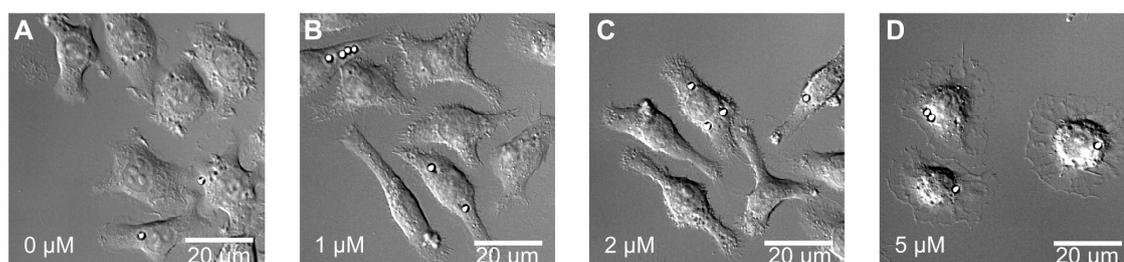


Abbildung 8.4. Zellmorphologie unter dem Einfluss von diversen Cytochalasin D Konzentrationen. Die Abbildung zeigt die Morphologie der Makrophagen unter dem Einfluss diverser Cytochalasin D Konzentrationen. Die Droge verhindert eine Polymerisation der AF und somit den Aufbau eines Aktinkortexes, was für hohe Konzentrationen deutlich sichtbar wird. Die verwendeten Konzentrationen sind 1 μM (B), 2 μM (C), 5 μM (D) sowie Zellen ohne die Zugabe von Cytochalasin D (A). Die dargestellten DIC-Aufnahmen wurden von Konrad Berghoff an dem Aufbau der Magnetischen Pinzette erstellt.

fällig zu beeinflussen. Es wurde sich daher für die hier vorgestellten Untersuchungen für eine mittlere Konzentration Cytochalasin D von 2 μM entschieden (8.4C).

Die Nutzung einer Magnetischen Pinzette zur Untersuchung des phagosomalen Transportes war notwendig, weil die Zugabe von Cytochalasin D erst nach erfolgter Phagozytose der Zielpartikel erfolgen konnte, da ein intaktes Aktinskelett der Zellen eine essenzielle Voraussetzung für die phagosomale Aufnahme darstellt [134]. Aufgrund des effizienten und persistenten Transportes großer Phagosomen von der Peripherie zur perinuklearen Region war der Transport dieser Organellen nach der notwendigen Einwirkdauer der Droge häufig bereits abgeschlossen und die Mehrheit der großen Partikel befand sich in der Nähe des Zellkerns. Um dennoch die Messung und Analyse des phagosomalen Transportes nach gewünschter Einwirkung von Cytochalasin D zu ermöglichen, wurden die Partikel mittels Magnetischer Pinzette zurück in die periphere Region der Zellen gezogen. Nach dem Abschalten der Pinzette wurde der phagosomale Transport, wie in Kapitel 5.8 beschrieben, nachverfolgt. Abbildung 8.5 zeigt die Rückführung eines Phagosomes von der perinuklearen Region in die Zellperipherie schematisch (8.5A) und in einer Hellfeld-Mikroskopieaufnahme reeller Zellen (8.5C&D) sowie den anschließenden Transport des Phagosomes (8.5E). Genutzt wurden für die Messung phagosomalen Transportes in Cytochalasin D behandelten Zellen superparamagnetische, mit IgG beschichtete Partikel mit einem Durchmesser von 1 μm und 2,8 μm . Weitere Details zu Aufbau und Durchführung der Experimente sind in [132] ausführlich beschrieben.

Die Analyse der Messungen des Transportes in Cytochalasin D behandelten Zellen im Vergleich zum Transport identischer Partikel (superparamagnetisch, Durchmesser 1 μm & 2,8 μm) in unbehandelten Zellen nach den Standardkriterien des phagosomalen Transportes, wie beschrieben in Kapitel 5.9, zeigte im Allgemeinen einen stärkeren Einfluss der Droge auf den Transport der kleineren Partikel als auf die Bewegung der 2,8 μm großen Phagosomen. Generell kam es dabei zu einer Verminderung der Transportgeschwindigkeit in Kombination mit einer Erhöhung der passiven Phasen während des Transportes, siehe Abbildung 8.6. Die instantane Geschwindigkeit v_{inst} des Transportes von 1 μm Phagosomen verminderte sich in Cytochalasin D behandelten Zellen um $(51 \pm 9)\%$ (Mittelwert \pm s.e.m.) gegenüber der instantanen Geschwindigkeit in unbehandelten Zellen (Abb. 8.6A). Die Geschwindigkeit des Phagosomentransportes auf kurzen Zeitskalen reduzierte sich hingegen für 2,8 μm große Phagosomen kaum, lediglich um $(19 \pm 16)\%$. Der Anteil an passiven Phasen p_{pass} während des Transportes in Zellen mit unzureichend polymerisierten AF erhöhte sich für 1 μm große Phagosomen sowie für Phagosomen mit 2,8 μm Durchmesser um

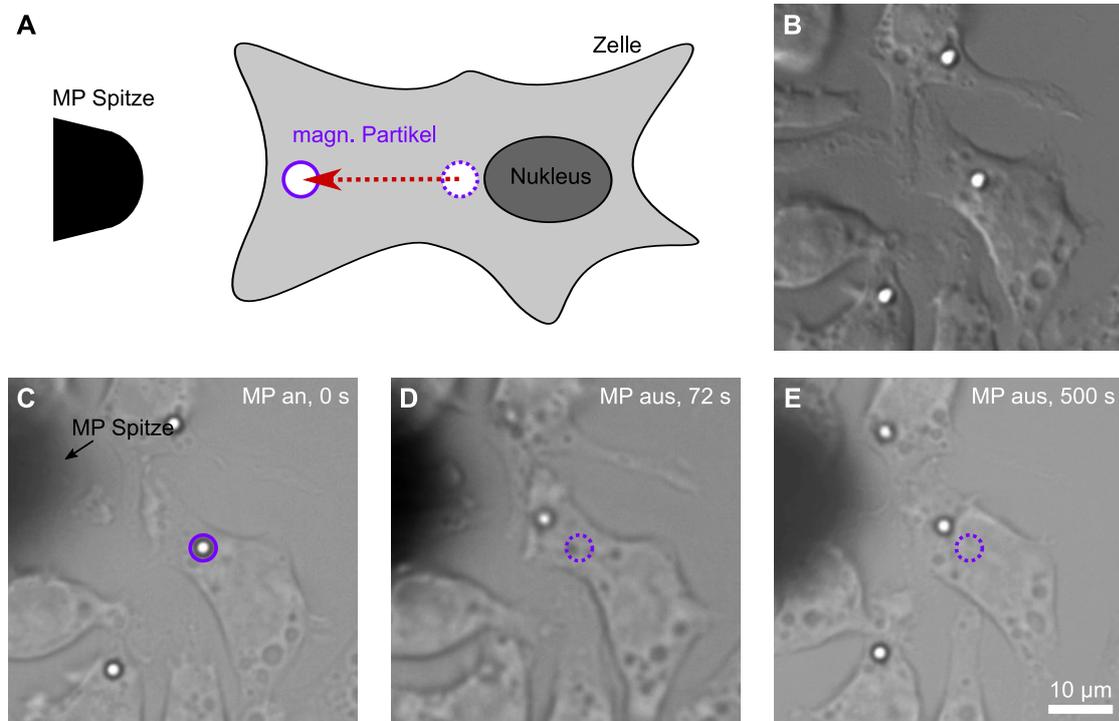


Abbildung 8.5. Analyse des Phagosomentransportes mit Hilfe einer Magnetischen Pinzette.

Die Abbildung zeigt die Initiierung und Messung des phagosomalen Transportes in unbehandelten und Cytochalasin D behandelten Zellen mittels einer Magnetischen Pinzette (MP). Grafik (A) zeigt eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. Nach erfolgreicher Phagozytose superparamagnetischer Partikel wurden die Zellen je nach Messung mit Cytochalasin D behandelt. Anschließend wurde durch Anschalten der magnetischen Pinzettenspitze, welche nahe der Zellmembran der Makrophagen platziert wurde, das Phagosom in die Zellperipherie gezogen. Nach Abschalten erfolgt der Transport des Phagosomes in Richtung perinuklearer Region. Die ursprüngliche Phagosomenposition ist durch einen gestrichelten violetten Kreis gekennzeichnet, die neue bzw. aktuelle Position durch einen violetten durchgezogenen Kreis. Grafiken (B)-(E) zeigen eine zugehörige, exemplarische Zeitserie des experimentellen Ablaufs. (B) zeigt eine DIC-Aufnahme von J774-Zellen inklusive internalisierter 2,8 µm großer, IgG-oponisierter, magnetischer Partikel. Grafik (C) visualisiert eine Hellfeldaufnahme der gleichen Zelle zum Zeitpunkt 0 s, an dem die MP angeschaltet wurde und eine Auslenkung des Phagosomes aus seiner Ausgangsposition in Richtung der MP Spitze folgte. Die finale Auslenkung des Phagosomes ist in Grafik (D) gezeigt. Nach Abschalten der MP erfolgte der zentripetale Phagosomentransport, welcher aufgezeichnet und analysiert wurde, exemplarisch gezeigt in Grafik (E). Die Aufnahmen (B-E) wurden von Konrad Berghoff erstellt.

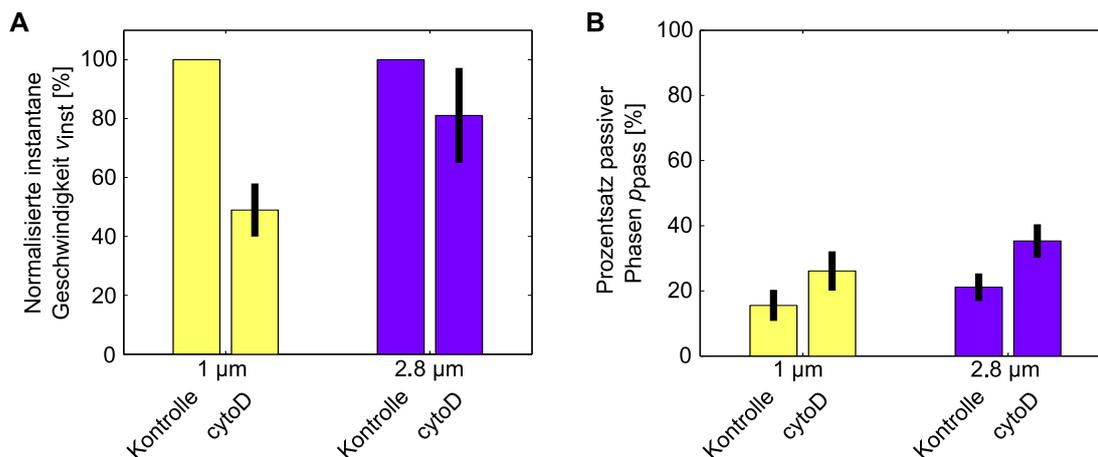


Abbildung 8.6. Einfluss von Cytochalasin D auf den größenabhängigen, phagosomalen Transport. Die Abbildung zeigt den Einfluss von 2 µM der Aktinpolymerisation-inhibierenden Droge Cytochalasin D (*cytoD*) auf die normalisierte, instantane Geschwindigkeit (A) und den Anteil an passiven Phasen (B) des Phagosomentransportes im Vergleich zu diesen Transporteigenschaften in unbehandelten Zellen (Kontrolle). Für kleine, 1 µm große Phagosomen war die Geschwindigkeit auf $(49 \pm 9)\%$ reduziert gegenüber unbehandelten Zellen. Für große Partikel mit 2,8 µm Durchmesser war die Geschwindigkeit in Cytochalasin D behandelten Zellen hingegen noch immer bei $(81 \pm 16)\%$. Der Anteil an passiven Phasen während des Transportes stieg durch die Behandlung der Zellen mit Cytochalasin D im Vergleich zu unbehandelten Zellen an, für 1 µm großen Phagosomen von $(16 \pm 5)\%$ auf $(26 \pm 6)\%$ und für 2,8 µm große Phagosomen von $(21 \pm 4)\%$ auf $(35 \pm 5)\%$. Die Messung und Analyse der Daten wurde durchgeführt von Konrad Berghoff. Analysiert wurden 16 & 22 Trajektorien für große und kleine Phagosomen in Cytochalasin D behandelten Zellen und 16 & 21 Trajektorien in unbehandelten Zellen. Die Fehlerbalken visualisieren den Standardfehler des Mittelwertes.

einen Faktor von 1,7 im Vergleich zu deren Anteil in unbehandelten Zellen (Abb. 8.6B). Für alle Phagosomentrajektorien in behandelten sowie unbehandelten Zellen erfolgte die Analyse der instantanen Geschwindigkeit sowie dem Anteil der passiven Phasen hier nur für den Transport der Phagosomen von der Zellperipherie bis zum erstmaligen Erreichen der perinuklearen Region.

Inhibierung von Myosin V Motorproteinen

Neben einem grundlegenden Zusammenhang zwischen AF und dem größenabhängigen, phagosomalen Transport aufgrund diverser Mechanismen wird auch eine starke Korrelation zwischen AF-assoziierten Motorproteinen, insbesondere von Myosin V und kurzreichweitigem Organellentransport, vor allem in der AF-reichen Zellperipherie erwartet [10,65]. Zur Untersuchung der Frage, ob diese Korrelation zwischen Myosin und kurzreichweitigem Transport von der Größe des Phagosomes beeinflusst wird und somit eine potenzielle Erklärung größenabhängigen Transportverhaltens auf molekularer Basis liefern kann, wurden die Makrophagen mit der Droge MyoVin-1 behandelt und die Messungen und Analyse der phagosomalen Trajektorien erneut durchgeführt, wie in Kapitel 5.6 beschrieben. MyoVin-1 inhibiert die Myosin V Aktivität durch Inaktivierung der Motoren in ihrem AF-gebundenen Zustand, da es die Hydrolyse von ADP aus dem Actomyosinkomplex unterbindet [109]. Die Quantifizierung der analysierten Transporteigenschaften erfolgte analog zu den unbehandelten Zellen und den Zellen mit inaktiven Dynein Motoren (detailliert beschrieben in Kapitel 5.9).

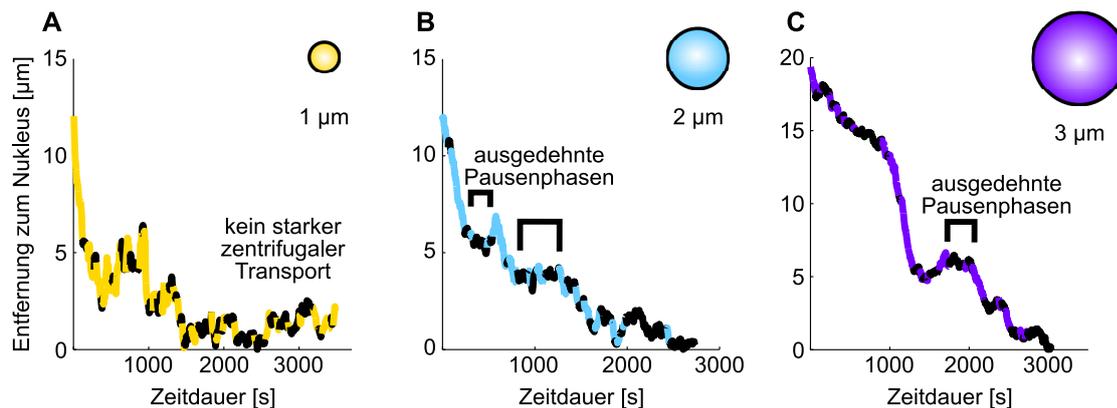


Abbildung 8.7. Beispiele für phagosomale Transporttrajektorien für diverse Phagosomendurchmesser in MyoVin-1 behandelten Makrophagen. Die Abbildung zeigt repräsentative Trajektorien des Transportes von Phagosomen mit einem Durchmesser von 1 μm (A), 2 μm (B) und 3 μm (C) in MyoVin-1 behandelten Zellen. MyoVin-1 fixiert Myosin V Motoren in ihrem AF-gebundenen Zustand und unterbindet somit deren intrazelluläre Aktivität. Dargestellt sind in den Grafiken jeweils der kürzeste Abstand zwischen Partikeloberfläche und der Nukleusmembran als Funktion der Zeitdauer der Phagosomenbewegung, weitere Details siehe Beschreibung der Grafik 7.11, welche analoge Daten für den Transport in unbehandelten Zellen repräsentiert. Der Transport aller Partikelgrößen war gekennzeichnet durch eine verminderte Transporteffizienz basierend auf einem hohen Anteil an passiven Phasen und ausgedehnten Pausen. Für 1 μm Phagosomen kam der starke zentrifugale Transport zum Erliegen und der Phagosomentransport endete in der perinuklearen Region.

Generelle Aspekte des Transportverhaltens. Die Abbildung 8.7 zeigt exemplarische Trajektorien phagosomalen Transportes entsprechend der untersuchten Phagosomengröße in MyoVin-1 behandelten Zellen. Infolge einer Inaktivierung der Myosin V Motoren kam es in den Zellen zu einer generellen Verlangsamung und häufigen Unterbrechungen des Transportes aufgrund der Zunahme an passiven Phasen und ausgedehnter Pausen, was zu einer Abnahme der Transporteffizienz führte. Der in unbehandelten Zellen für kleine Phagosomen beobachtete starke zentrifugale Transport der Phagosomen nach Erreichen der perinuklearen Region kam zum Erliegen und alle Phagosomengrößen zeigten weitestgehend einen wohldefinierten Endpunkt des Phagosomentransportes in Nähe des Nukleus. Des Weiteren nahm die Aufnahmebereitschaft der Zellen mittels Phagozytose aufgrund der fehlenden aktiven Myosin Motoren ab. Nicht oder nur teilweise aufgenommene Partikel wurden nicht für die Auswertung verwendet.

Starker zentrifugaler Transport. Die Abbildung 8.8 zeigt die Quantifizierung des beschriebenen Transportverhaltens in MyoVin-1 behandelten Zellen und ist analog der Abbildung 7.13 für die Transportcharakteristika in unbehandelten Zellen mit identischen Kriterien zur Beschreibung des Transportes.

Nach erfolgreicher Internalisierung der Zielobjekte erreichten unabhängig ihrer Größe mehr als Dreiviertel aller Phagosomen die perinukleare Region trotz Inaktivität der Myosin V Motoren (Abbildung 8.8A). Im Detail war der Prozentsatz an Phagosomen, welche den Nukleus erreichten, leicht reduziert gegenüber unbehandelten Zellen, um 1 % bei 1 μm großen Phagosomen, um 10 % bei 2 μm großen Phagosomen und um 3 % bei 3 μm großen Phagosomen.

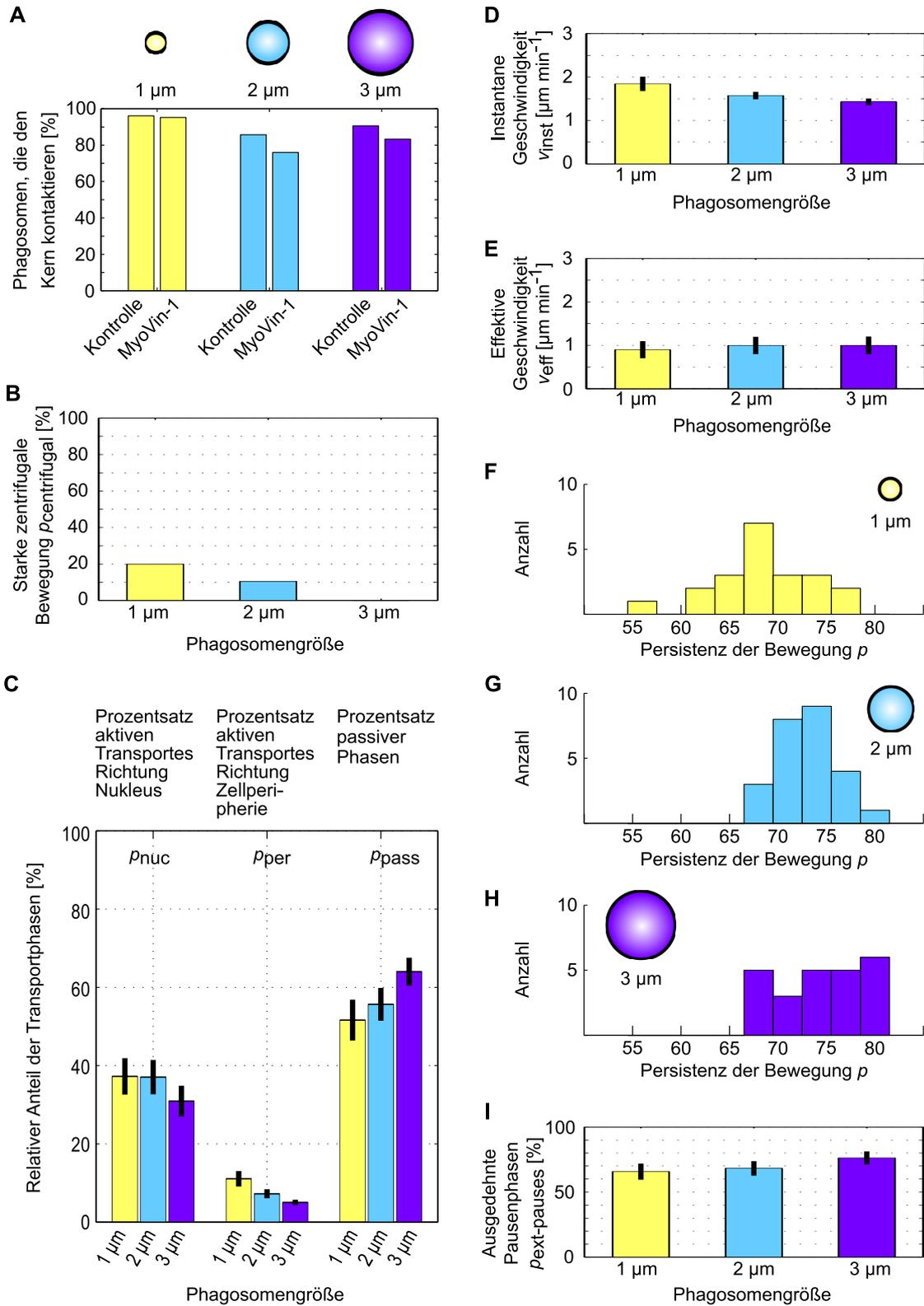
Wurde die perinukleare Region erreicht, verließen mindestens 80 % der Phagosomen diese nicht mehr. Somit wies die Bewegung der Phagosomen aller Größen einen wohldefinierten Transportendpunkt in der Nähe des Nukleus in Zellen ohne aktive Myosin V Motoren auf.

Der starke zentrifugale Transport für intermediäre und große Partikel blieb vergleichbar mit dem starken zentrifugalen Transport in unbehandelten Zellen, mit einer dezenten Reduktion auf $p_{\text{centrifugal}} = 11\%$ für $2\ \mu\text{m}$ Phagosomen und $p_{\text{centrifugal}} = 0\%$ für $3\ \mu\text{m}$ Phagosomen. Bei kleinen Phagosomen wurde der starke zentrifugale Transport durch MyoVin-1 um 62% verringert (8.8B).

Verteilung der Transportphasen während der Phagosomenreifung. Durch die Inaktivierung der Myosin V Motoren konnte ein genereller Anstieg der passiven Phasen für alle Phagosomendurchmesser beobachtet werden, kombiniert mit einer Reduktion der aktiven Phasen in zentripetaler Richtung (Abbildung 8.8C). Die Unterbrechungen des Transportes aufgrund passiver Phasen p_{pass} stiegen für kleine Phagosomen um $(26 \pm 6)\%$, für intermediäre Phagosomen um $(15 \pm 4)\%$ und für große Phagosomen um $(37 \pm 5)\%$ gegenüber den Anteilen passiver Phasen in unbehandelten Zellen. Die Anteile des aktiven zentrifugalen Transportes p_{per} veränderten sich lediglich maximal um $\pm 3\%$ und zeigten somit eine vernachlässigbare Korrelation mit der Inhibierung der Myosin V Motoren. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigten auch in MyoVin 1 behandelten Zellen $1\ \mu\text{m}$ Phagosomen die häufigsten Fluktuationen mit einem Anteil zentrifugalen Transportes von $p_{\text{per}} = (11 \pm 2)\%$ (Mittelwert \pm s.e.m.). Die Phasen aktiven Transportes in Richtung der perinuklearen Region p_{nuc} wurde hingegen aufgrund des inaktiven Myosin V deutlich reduziert, auf weniger als 40% unabhängig vom Phagosomendurchmesser. Analog zu der Erhöhung der passiven Phasen war auch hier der Einfluss von MyoVin-1 auf Phagosomen mit $2\ \mu\text{m}$ Durchmesser am geringsten, mit einer Reduktion der aktiven zentripetalen Phasen um $(12 \pm 5)\%$ gegenüber unbehandelten Zellen. Die Verminderung dieser Phasen in $1\ \mu\text{m}$ Phagosomen belief sich auf $(24 \pm 6)\%$ und in $3\ \mu\text{m}$ Phagosomen auf $(39 \pm 5)\%$, was einen deutlich stärkeren Einfluss inhibierter Myosin V Motoren auf kleine und große Partikel indiziert.

Geschwindigkeit des phagosomalen Transportes auf kurzen & langen Zeitskalen. Die instantane Geschwindigkeit v_{inst} war für alle gemessenen Phagosomengrößen in MyoVin-1 behandelten Zellen deutlich reduziert, auf weniger als $2\ \mu\text{m}\ \text{min}^{-1}$ gegenüber natürlichen Zellen, was eine verminderte Beweglichkeit der Phagosomen auf kurzen Zeitskalen durch das Fehlen aktiver Myosin V Motoren impliziert (8.8D). Die Reduktion der instantanen Geschwindigkeit aufgrund der Inaktivierung von Myosin V betrug in intermediären Zellen $(16 \pm 7)\%$ gegenüber unbehandelten Zellen. Für kleine und große Phagosomen fiel diese Verminderung der Geschwindigkeit mit $(25 \pm 9)\%$ und $(44 \pm 5)\%$ deutlich größer aus. Auf langen Zeitskalen glichen sich die effektiven Geschwindigkeiten v_{eff} der diversen Phagosomengrößen aufgrund gestiegener Transportunterbrechungen und erhöhter passiver Phasen bei großen Phagosomen und fehlendem starken zentrifugalen Transport bei kleinen Phagosomen merklich an (8.8E). Die effektiven Geschwindigkeiten ergaben $v_{\text{eff}} = (0,9 \pm 0,2)\ \mu\text{m}\ \text{min}^{-1}$ (Mittelwert \pm s.e.m.) für $1\ \mu\text{m}$ Phagosomen, $v_{\text{eff}} = (1,0 \pm 0,2)\ \mu\text{m}\ \text{min}^{-1}$ für $2\ \mu\text{m}$ und $3\ \mu\text{m}$ Phagosomen und entsprechen somit dem Niveau der effektiven Geschwindigkeit intermediärer Phagosomen in unbehandelten Zellen.

Persistenz der Bewegung. Korreliert mit dem geringen Einfluss der Myosin V Inaktivierung auf den Anteil der aktiven Transportphasen in Richtung der Zellperipherie zeigte auch die Persistenz der phagosomalen Transportbewegung nur geringfügige Änderungen (8.8F-H). Es kam zu einem leichten Anstieg der Persistenz der kleinen Phagosomen auf $p = (69 \pm 5)\%$ (Mittelwert \pm s.e.m., Abbildung 8.8F) und einem leichten Abfall der Persistenz großer Phagosomen auf $p = (74 \pm 4)\%$ (8.8H) gegenüber der Persistenz in unbehandelten Zellen. Diese Entwicklung war identisch mit dem leichten Abfall zentrifugaler



Phasen bei kleinen Phagosomen und deren dezentem Anstieg bei großen Phagosomen. Die Persistenz intermediärer Phagosomen war mit $p = (73 \pm 3)\%$ in MyoVin-1 behandelten Zellen nahezu unverändert gegenüber unbehandelten Zellen (Abbildung 8.8 G).

Ausgedehnte stationäre Phasen während des phagosomalen Transportes. Parallel zu dem Anstieg der passiven Phasen während des Transportes in Zellen ohne aktives Myosin V, unabhängig der Phagosomengröße, stiegen auch die Anteile ausgedehnter, stationärer Phasen $p_{\text{ext-pauses}}$ während des Transportes der Phagosomen von der Zellperipherie zur perinuklearen Region für alle betrachteten Phagosomendurchmesser auf über 65% an (Abbildung 8.8 I). Dabei war der Anstieg der ausgedehnten Pausenphasen für 2 μm große Phagosomen mit $(15 \pm 6)\%$ gegenüber unbehandelten Zellen am geringsten verglichen mit $(30 \pm 7)\%$ Anstieg bei 1 μm Phagosomen und $(54 \pm 6)\%$ Anstieg bei 3 μm Phagosomen. Allerdings war der Anteil ausgedehnter, stationärer Phasen kleiner und großer Phagosomen in unbehandelten Zellen auch deutlich geringer als bei intermediären Phagosomen. Der Anstieg an ausgedehnten Pausenphasen zeigte analog zu den anderen betrachteten quantitativen Transportkriterien die Verlangsamung der Phagosomenbewegung in Zellen ohne aktive Myosin V Motoren verglichen mit dem Phagosomentransport in natürlichen Zellen. Wobei die Auswirkungen von MyoVin-1 auf intermediäre Phagosomen geringer waren als auf kleine und große Phagosomen. Der grundlegende Transport nach der Internalisierung der Phagosomen von der Zellperipherie in die perinukleare Region kam durch eine Inaktivierung der Myosin V Motoren aber nicht zum Erliegen.

Abbildung 8.8. Größenabhängige Charakteristika des phagosomalen Transportes in MyoVin-1 behandelten Zellen. Die Abbildung zeigt die Veränderungen der charakteristischen Transporteigenschaften entsprechend des Phagosomendurchmessers in mit 100 μM MyoVin-1 behandelten Zellen. Die Droge MyoVin-1 inaktiviert intrazelluläre Myosin V Motoren in ihrem AF-gebundenen Zustand. Die dargestellten Transporteigenschaften sind analog zu denen unbehandelter Zellen, dargestellt in Abbildung 7.12 & 7.13. Grafik (A) zeigt den Anteil an Phagosomen, welche nach erfolgreicher Internalisierung die perinukleare Region erreichten. Neben den Phagosomen in MyoVin-1 behandelten Zellen sind vergleichsweise analoge Werte in unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Ein Phagosomentransport war auch ohne aktive Myosin V Motoren möglich. Grafik (B) visualisiert die starke zentrifugale Bewegung $p_{\text{centrifugal}}$ von Phagosomen nach Erreichen der perinuklearen Region. Diese war aufgrund von MyoVin-1 für kleine Phagosomen deutlich reduziert. Grafik (C) stellt die Verteilung der Transportphasen unterschieden in aktiven Transport in Richtung Zellkern p_{nuc} oder Zellperipherie p_{per} und in passive Phasen p_{pass} dar. Dabei waren die Anteile an passiven Phasen deutlich erhöht, während sich die Anteile an zentrifugalem Transport kaum änderten im Vergleich zu unbehandelten Zellen, unabhängig des Phagosomendurchmessers. Grafik (D) visualisiert die Geschwindigkeit der Phagosomen auf kurzen Zeitskalen v_{inst} , welche aufgrund von MyoVin-1 für alle Phagosomengrößen reduziert war im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die effektive Geschwindigkeit v_{eff} , dargestellt in Grafik (E), hingegen zeigte eine Erhöhung für kleine und eine Reduktion der Geschwindigkeit für große Phagosomen auf die Größenordnung der effektiven Geschwindigkeit intermediärer Phagosomen in MyoVin-1 sowie in unbehandelten Zellen. Die Grafiken (F-H) visualisieren die Persistenz p des Transportes der betrachteten Phagosomengrößen, welche aufgrund inaktiver Myosin V Motoren nur geringfügige Veränderungen zeigte. Grafik (I) zeigt den Anteil an ausgedehnten, stationären Phasen $p_{\text{ext-pauses}}$ während des Transportes an, welcher für alle Phagosomendurchmesser in MyoVin-1 behandelten Zellen deutlich erhöht war. Die dargestellten Fehler sind die Standardfehler der Mittelwerte. Analysiert wurden 21, 25 und 24 Trajektorien für Phagosomen mit einem Durchmesser von 1 μm , 2 μm und 3 μm .

8.3 Vergleich zwischen Mikrotubuli- & Aktinfilament-basiertem Transport für die Bewegung der Phagosomen

Dieser Abschnitt gibt einen abschließenden Vergleich des Einflusses von AF-basiertem und MT-basiertem intrazellulären Organellentransport auf die beobachteten größenabhängigen phagosomalen Transporteigenschaften. Dazu wurden zwei repräsentative Transporteigenschaften, die normalisierte instantane Geschwindigkeit v_{inst} der Phagosomen und der Anteil an passiven Phasen p_{pass} , während des Transportes herangezogen und für kleine, 1 μm Phagosomen und große, 2,8 - 3 μm Phagosomen in unbehandelten, natürlichen Zellen, in Zellen ohne Aktinskelett (Cytochalasin D behandelte Zellen), in Zellen mit inaktiven Myosin V Motoren (MyoVin-1 behandelte Zellen) und in Zellen mit inaktiven Dynein Motoren (Ciliobrevin A behandelte Zellen) verglichen. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Abschnitten wurden hier die betrachteten Transporteigenschaften nur für den Transport von der Zellperipherie bis zum erstmaligen Erreichen der perinuklearen Region analysiert, wie in Abbildung 8.9 dargestellt, um eine direkte Vergleichbarkeit der Eigenschaften zu gewährleisten. Auf die Darstellung intermediärer Phagosomen wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Die Abbildungen 8.9A-C zeigen den Einfluss von AF- und MT-basiertem Transport auf die Geschwindigkeiten der Phagosomen auf kurzen Zeitskalen. Wurde dieser Transport durch die Zugabe von diversen Drogen reduziert oder gar unterbunden, kam es in diesen Zellen zu einer generellen Reduktion der instantanen Geschwindigkeit gegenüber unbehandelten Zellen. Es wurde deutlich, dass die Inaktivierung von intrazellulärem Dynein (Abb. 8.9A) einen weitaus größeren Einfluss auf die instantane Geschwindigkeit großer Phagosomen hat, mit einer Reduktion um $(51 \pm 4) \%$, im Vergleich zu der Geschwindigkeitsabnahme um $(23 \pm 7) \%$ bei kleinen Phagosomen. In Zellen ohne Aktinskelett (Abb. 8.9B) war das Verhalten antonym. Die Abnahme der Geschwindigkeit kleiner Phagosomen betrug $(51 \pm 9) \%$, während sie bei großen Phagosomen lediglich $(19 \pm 16) \%$ betrug. Dieses Verhalten lässt auf eine Korrelation zwischen AF-basierter Mobilität und dem Transport kleiner Phagosomen sowie zwischen MT-basierter Bewegung und dem Transport großer Phagosomen schließen. Betrachtete man allerdings den Einfluss der AF-basierten Myosin V Motoren, zeigt sich, dass eine Inaktivierung dieser (Abb. 8.9C) einen vergleichbaren Einfluss auf beide Phagosomengrößen hat, mit Tendenz zu stärkerem Einfluss auf große Phagosomen. Die Reduktion der Geschwindigkeit gegenüber unbehandelten Zellen betrug hier $(29 \pm 7) \%$ für 1 μm Phagosomen und $(42 \pm 4) \%$ für 3 μm Phagosomen. Im Vergleich zu den Cytochalasin D behandelten Zellen war hier das Aktinskelett noch vollständig intakt, was den großen Phagosomen deutlich weniger Raum für die Transportbewegung ließ. Die Veränderung durch Einschränkungen des AF- & MT-basierten Transportes bezüglich der Verteilung der passiven Phasen während des phagosomalen Transportes sind in den Abbildung 8.9D-F dargestellt. Unspezifisch bezüglich der Droge stieg der Anteil an passiven Phasen in allen behandelten Zellen gegenüber natürlichen Zellen an. Es kam somit zu einem langsameren Transport inklusive häufiger Unterbrechungen der Bewegung. Dabei hatte die Inaktivierung von Motoren (Ciliobrevin A und MyoVin-1) einen stärkeren Anstieg passiver Phasen zur Folge als die Zerstörung des intrazellulären Aktinskelettes, da durch die Inaktivierung kein zusätzlicher Platz innerhalb des Zytosols gewonnen wurde und auch die Motorproteine in den Zellen verblieben. Im Detail wirkte sich die Inaktivierung von Dynein Motoren (Abb. 8.9D) mit einem Anstieg passiver Phasen von $(56 \pm 5) \%$ deutlich stärker auf das Transportverhalten großer Phagosomen aus, statt einem Anstieg von $(21 \pm 7) \%$ bei kleinen Phagosomen. Dieses Verhalten war somit analog zu dem Verhalten der instantanen Geschwindigkeit in Ciliobrevin A behandelten Zellen im Vergleich

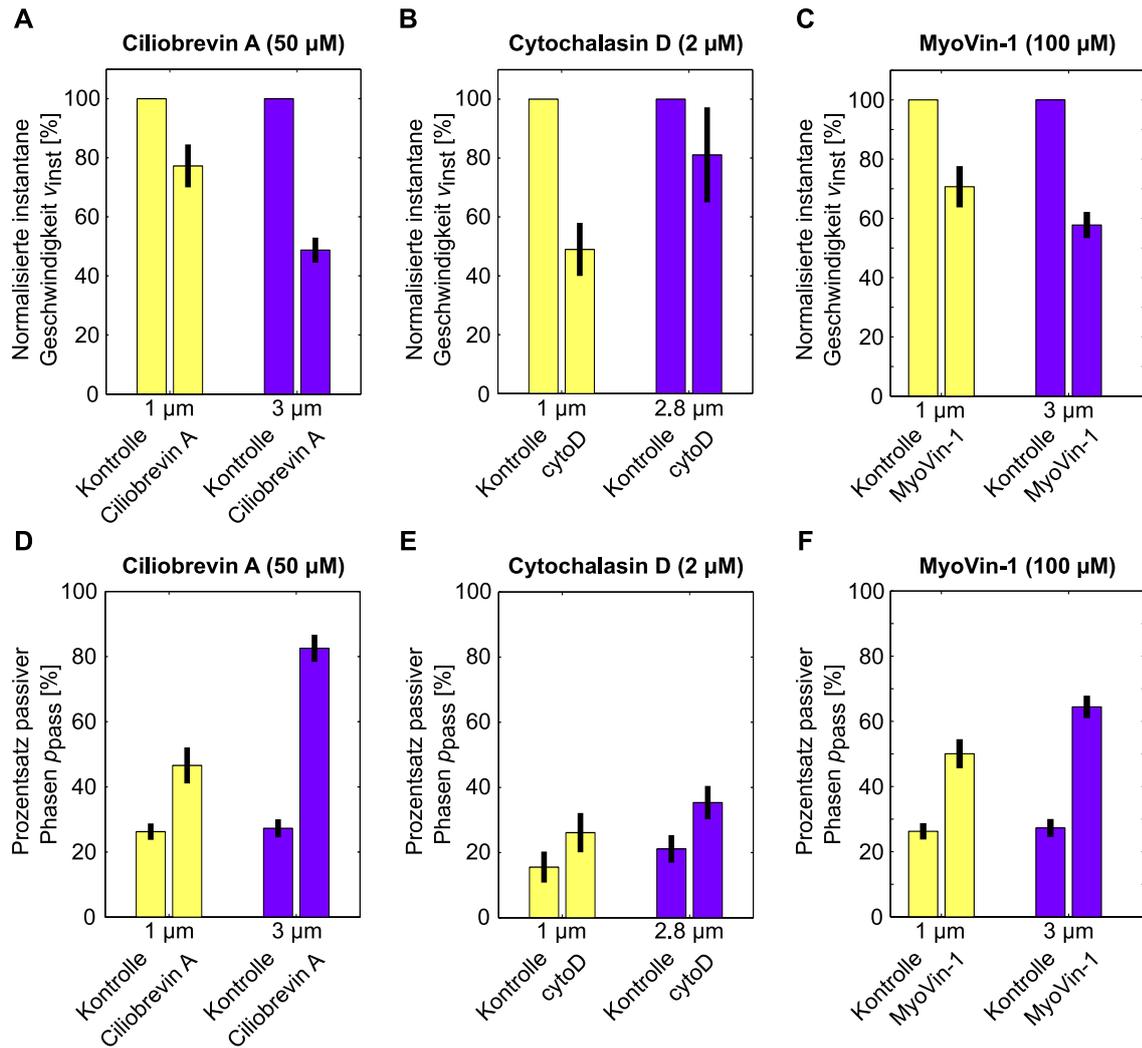
mit unbehandelten Zellen. In Zellen ohne Aktinskelett stieg der Anteil passiver Phasen unabhängig der Phagosomengröße um den Faktor 1,7 (Abb. 8.9E). Das Verhalten der passiven Phasen in MyoVin-1 behandelten Zellen gegenüber natürlichen Zellen war ebenfalls analog dem Verhalten der Geschwindigkeiten auf kurzen Zeitskalen. Die passiven Phasen stiegen für beide Phagosomengrößen an, mit einer stärkeren Tendenz zugunsten großer Phagosomen (Anstieg um $(37 \pm 4)\%$) verglichen mit dem Anstieg passiver Phasen kleiner Phagosomen von $(24 \pm 5)\%$.

Abschließend zeigte die Analyse, dass weder das Fehlen von AF-basiertem noch von MT-basiertem Transport ein vollständiges Erliegen der intrazellulären Phagosomenbewegung zur Folge hatte. Dies lässt auf ein Zusammenspiel beider Transportprozesse bei der Phagosomenreifung in intakten Zellen schließen. Hierbei ist zu beachten, dass Aktin grundlegend für die phagosomale Aufnahme der Zielobjekte von Nöten ist und bei inaktiven Dynein Motoren nur noch etwa die Hälfte aller Phagosomen nach der Aufnahme transportiert wurden. (Dabei ist zu beachten, dass Trajektorien ohne aktive Phasen keine Beachtung bei der Errechnung der phagosomalen Geschwindigkeiten aus Abb. 8.9 fanden, da sich diese Größen über den aktiven Transport definierten.)

8.4 Intrazelluläre Verteilung von Mikrotubuli

Anhand der vorangegangenen Abschnitte wurde deutlich, dass die Bewegung großer Phagosomen eng mit Mikrotubuli-basiertem Transport verbunden ist und dass damit ein gewisser Einfluss der MT sowie assoziierter Motoren auf die größenabhängige, phagosomale Transportcharakteristik sehr wahrscheinlich ist. Zur detaillierteren Analyse dieser Korrelation soll im folgenden Abschnitt die Verteilung der MT innerhalb der Zellen genauer betrachtet werden. Dazu wurden die intrazellulären MT Strukturen fluoreszent markiert und ihre Verteilung entlang der Oberfläche realer und hypothetischer Phagosomen mittels *Spinning Disk* - Konfokalmikroskopie analysiert, wie in Kapitel 6.1 beschrieben.

Verteilung von MT entlang der Oberfläche realer Phagosomen. Zunächst wurde die Verteilung der MT-Filamente entlang der Oberfläche realer Phagosomen analysiert. Die Phagosomen befanden sich dabei an beliebiger Stelle innerhalb der Zelle nach erfolgreich abgeschlossener Internalisierung. Die Abbildung 8.10A zeigt eine repräsentative Zelle in Orthogonalprojektion inklusive eines phagozytierten $3\ \mu\text{m}$ Partikels und fluoreszierendem MT-Netzwerk. Essentiell bei der intrazellulären MT-Verteilung war eine deutlich höhere MT-Dichte in der perinuklearen Region verglichen mit der MT-Dichte in der Zellperipherie basierend auf der Organisation der MT im Mikrotubuli-Organisations-Zentrum (MTOC), welches sich in Nukleusnähe befindet. Mit diesem grundlegenden Dichtegradienten der MT wurden auch die Phagosomen innerhalb der Zelle konfrontiert. Dabei war die Dichte der MT an der Kern-zugewandten Phagosomenoberfläche höher verglichen mit der Zellperipherie-zugewandten Oberfläche. Zur Quantifizierung dieser Asymmetrie der MT-Verteilung entlang der Phagosomenoberfläche und dem Ungleichgewicht zwischen Kern- & Peripherieseite wurde die normalisierte Intensitätsverteilung der fluoreszenten MT-Strukturen entlang der Phagosomenoberfläche bestimmt. Grafik 8.10B zeigt diese Intensitätsverteilung in Abhängigkeit des Azimutalwinkels, welcher die Position auf der Phagosomenoberfläche in 2D repräsentiert. Dabei entsprechen 0° dem Kern am nächsten gelegenen Oberflächenpunkt und 180° dem der Zellperipherie am nächsten gelegenen Oberflächenpunkt. Die Darstellung der Verteilung wurde in Absolutwerten des Azimutalwinkels gewählt, da Unterschiede zwischen positiven Azimutalwinkeln ($0^\circ \rightarrow 180^\circ$) und negativen ($0^\circ \rightarrow -180^\circ$) entlang der Phagosomenaußenseite bezüglich der Inten-



sität und somit der Dichte der MT weder zu erwarten waren noch in den Messungen beobachtet werden konnten, vergleiche hierzu Grafik 8.10C. Die asymmetrische Verteilung der MT, mit höherer MT-Dichte entlang der Kern-zugewandten Phagosomenoberfläche und niedriger MT-Dichte entlang der Peripherie-zugewandten Seite stieg mit zunehmendem Durchmesser der Phagosomen an. So betrug das Ungleichgewicht in der normalisierten Intensität der MT-Strukturen bei 1 μm Phagosomen $\Delta I_{\text{MT-phagosomes}} = 9\%$. Für 2 μm Phagosomen stieg diese Asymmetrie auf 15 % und für 3 μm Phagosomen war die MT-Dichte an der Kern-zugewandten Seite schließlich 40 % höher als auf der gegenüberliegenden Phagosomenseite. Im Gegensatz zu großen und kleinen Phagosomen lag das Maximum der MT-Fluoreszenzintensität intermediärer Phagosomen nicht entlang der Kern-zugewandten Phagosomenoberfläche, sondern an den Außenseiten der Phagosomen ($\varphi(I_{\text{MT-phagosomes}}^{\text{max}}) \sim 45^\circ - 90^\circ$).

Da die in Grafik 8.10 gezeigten Werte auf der normalisierten Fluoreszenzintensität der MT basieren, können diese nicht mit quantitativen Werten für die Anzahl an vorhandenen MT-Filamenten assoziiert werden, sondern geben lediglich Auskunft über relative Dichteunterschiede der MT bezüglich großer und kleiner Phagosomen.

Verteilung von MT entlang der Oberfläche hypothetischer Phagosomen. Zur Klärung der Fragestellung, ob die entlang der Oberfläche von realen Phagosomen gemessenen Asymmetrien der MT-Dichte zwischen Kern- und Peripherie-zugewandter Phagosomenseite durch den intrazellulären Transport dieser Phagosomen initiiert wurden oder ob sie

Abbildung 8.9. Einfluss von MT-basiertem & AF-basiertem Transport auf repräsentative, größenabhängige phagosomale Transporteigenschaften. Die Abbildung zeigt den Einfluss von Ciliobrevin A, Cytochalasin D (cytoD) und MyoVin-1 auf die phagosomalen Transporteigenschaften normalisierte instantane Geschwindigkeit v_{inst} und dem Anteil an passiven Phasen während des Transportes p_{pass} im Vergleich mit unbehandelten Zellen. Ciliobrevin A bewirkt eine Inaktivierung der intrazellulären Dynein Motoren und unterbindet somit MT-basierten Transport. Cytochalasin D verhindert den Aufbau des Aktinskelettes und MyoVin-1 inaktiviert AF-basierte Myosin Motoren. Grafik (A) zeigt die Verminderung der instantanen Geschwindigkeit in mit 50 μM Ciliobrevin A behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Geschwindigkeit der 1 μm Phagosomen sank auf $(77 \pm 7)\%$ und die von 3 μm Phagosomen auf $(49 \pm 4)\%$. In mit 2 μM Cytochalasin D behandelten Zellen, Grafik (B), wurde die instantane Geschwindigkeit auf $(49 \pm 9)\%$ bei kleinen Phagosomen sowie auf $(81 \pm 16)\%$ bei großen Phagosomen reduziert. Grafik (C) zeigt die Veränderung der Geschwindigkeit in MyoVin-1 behandelten Zellen. Auch hier kam es zu einem Absinken dieser gegenüber der Geschwindigkeit in unbehandelten Zellen auf $(71 \pm 7)\%$ und $(58 \pm 4)\%$ in 1 μm und 3 μm großen Phagosomen. Im Vergleich dazu stiegen die Anteile an passiven Phasen in Zellen unter Drogeneinfluss im Vergleich zu natürlichen Zellen. Grafik (D) zeigt den Anstieg unter Einfluss von Ciliobrevin A von $(26 \pm 3)\%$ auf $(47 \pm 6)\%$ bei kleinen und von $(27 \pm 3)\%$ auf $(81 \pm 4)\%$ bei großen Phagosomen. In Cytochalasin D behandelten Zellen, Grafik (E), stieg der Anteil passiver Phasen von $(16 \pm 5)\%$ auf $(26 \pm 6)\%$ bei 1 μm Phagosomen und von $(21 \pm 4)\%$ auf $(35 \pm 5)\%$ bei 2,8 μm Phagosomen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Grafik (F) zeigt die Erhöhung der passiven Phasen in MyoVin-1 behandelten Zellen gegenüber natürlichen Zellen von $(26 \pm 3)\%$ auf $(50 \pm 4)\%$ bei kleinen und von $(27 \pm 3)\%$ auf $(64 \pm 3)\%$ bei großen Phagosomen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Zur Untersuchung des Transportverhaltens in Ciliobrevin A behandelten Zellen wurden 15 Trajektorien kleiner und 15 Trajektorien großer Phagosomen untersucht, für MyoVin-1 behandelte Zellen 26 & 25 Trajektorien kleiner und großer Phagosomen und in unbehandelten Zellen 51 & 53 Trajektorien der 1 μm & 3 μm großen Phagosomen. Für die Erhebung der Daten in cytoD behandelten Zellen wurden magnetische Zielobjekte für die Phagosomenbildung verwendet, daher wurden hier auch die Referenzdaten in unbehandelten Zellen mit magnetischen Zielobjekten erhoben, weshalb diese von den Daten der übrigen unbehandelten Zellen abweichen. Es wurden 16 & 22 Trajektorien für kleine und große Phagosomen in cytoD behandelten Zellen und 16 & 21 Trajektorien für 1 μm & 2,8 μm große Phagosomen in unbehandelten Zellen analysiert. Die Aufnahme und Analyse der Trajektorien in cytoD Zellen erfolgte durch Konrad Berghoff.

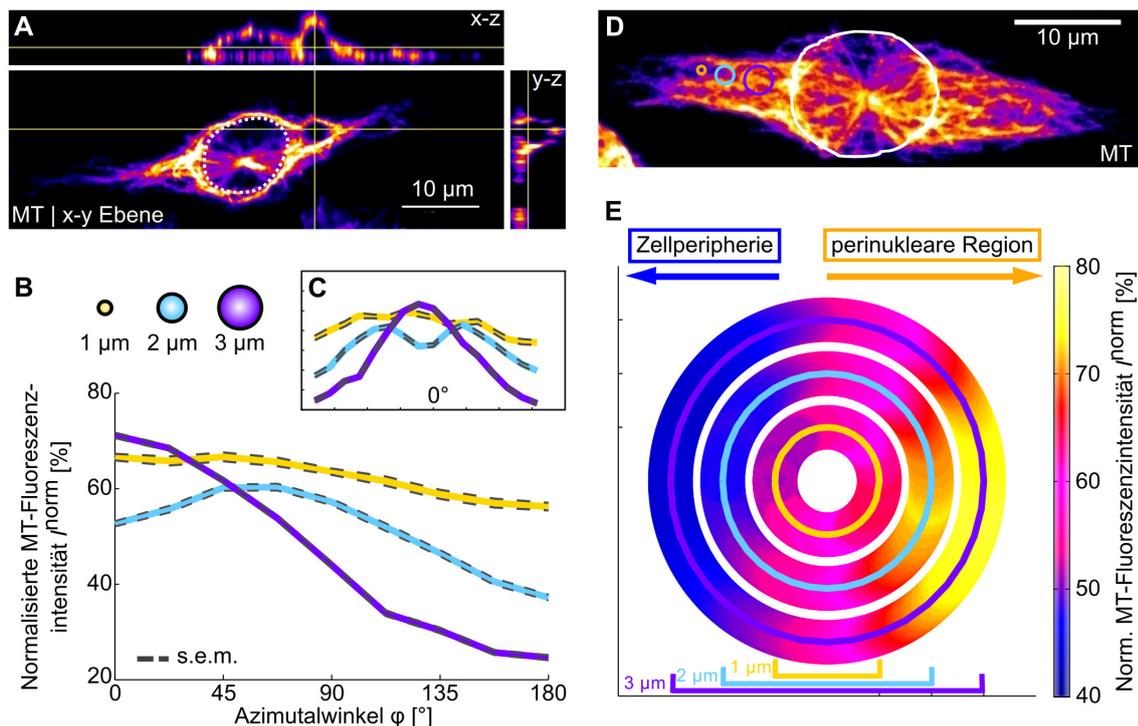


Abbildung 8.10. Intrazelluläre Verteilung von Mikrotubuli (MT) bei realen & hypothetischen Phagosomen.

Die Abbildung zeigt die qualitative und quantitative Verteilung von Mikrotubuli entlang der Oberfläche von realen und hypothetischen Phagosomen. Grafik (A) zeigt die Verteilung fluorescent markierter MT in einer repräsentativen Makrophage inklusive Phagosom in Falschfarben-Orthogonalprojektion. Das Phagosom ist durch den Schnittpunkt der gelben geraden gekennzeichnet, welche gleichzeitig die Ebenen der Orthogonalprojektion visualisieren. Markiert wurde Alphetubulin mit Hilfe eines sekundären Antikörpers per Immunfärbung. Der helle Punkt in der Bildmitte entspricht dem MT-Organisationszentrum (MTOC). Die Lage des Zellkerns wird im Bereich der perforierten weißen Linie erwartet. Die MT-Dichte war in der perinuklearen Region deutlich höher als in der Zellperipherie. Die quantitative Verteilung der MT, repräsentiert durch die gemittelte normalisierte Fluoreszenzintensität der MT, entlang der Phagosomenaußenseite innerhalb gemittelter Intensitätsprojektionen diverser z-Bilderstapel, entsprechend Grafik (A), sind in Grafik (B) dargestellt. Sie wurden für 1 µm, 2 µm & 3 µm Phagosomen als Funktion des absoluten Azimutalwinkels ϕ dargestellt, wobei $\phi = 0^\circ$ der Richtung des Zellkerns und $\phi = 180^\circ$ der Richtung der Zellperipherie entspricht. Das Ungleichgewicht einer hohen MT-Dichte an der Kern-zugewandten Phagosomenseite und einer niedrigen MT-Dichte an der Peripherie-zugewandten Seite stieg mit steigendem Phagosomendurchmesser. Analysiert wurden mehr als 50 Phagosomen jedes Durchmessers. Fehlerangaben entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte (s.e.m.). Grafik 8.10C zeigt die identischen Werte wie Grafik (B), lediglich aufgetragen für Azimutalwinkel von -180° bis 180° , daher wurde hier auf die vollständigen Angaben der Achsenbeschriftungen verzichtet. Die Intensitätsverteilung entlang der Phagosomenaußenseite war erwartungsgemäß symmetrisch für positive & negative Azimutalwinkel und kann daher in absoluten Winkelwerten, Grafik (B), zusammengefasst werden. Grafik (D) zeigt die MT-Strukturen in einer weiteren repräsentativen J774-Mausmakrophage exklusive internalisierter Fremdkörper, dargestellt als gemittelte Intensitätsprojektion eines z-Bilderstapels in Falschfarben. Die weiße Linie entspricht der Lage des Nukleus. Markiert wurde Alphetubulin. Die Dichte der MT war auch hier in der perinuklearen Region höher im Vergleich zu der Zellperipherie. Der zentrale, helle Knotenpunkt entspricht dem MTOC. In die Zelle eingebrachte, hypothetische Phagosomen mit Durchmesser von 1 µm (gelber Kreis), 2 µm (Kreis in Cyan) & 3 µm (violetter Kreis) sind links neben dem Nukleus exemplarisch eingezeichnet. Die quantitative, gemittelte, normalisierte Intensitätsverteilung der MT entlang des Umfangs hypothetischer Phagosomen wurde in Grafik (E) als Polarplot für jeden analysierten Phagosomendurchmesser dargestellt. Die Farbkodierung der Phagosomendurchmesser ist analog zu den Kreisen in Grafik (D). Analysiert wurde die MT-Intensitätsverteilung von 444 hypothetischen Phagosomen für jeden Durchmesser. Die Asymmetrie in der MT-Dichte zugunsten der Kern-zugewandten Phagosomenseite stieg auch hier mit dem Phagosomendurchmesser deutlich an.

eine grundlegende Eigenschaft aller Makrophagen sind, wurden zusätzlich fluoreszente MT-Strukturen innerhalb von Zellen ohne internalisierte Fremdkörper gemessen. Grafik 8.10D zeigt eine repräsentative Zelle inklusive fluoreszenter MT und exklusive Phagosomen. Auch hier wurde die zentrale Organisation der MT durch das MTOC in Nähe des Zellkerns deutlich und damit korreliert eine höhere MT-Dichte in der perinuklearen Region, verglichen mit der Zellperipherie. Der beobachtete MT-Gradient ist somit eine Eigenschaft aller Makrophagen und auch hypothetische Phagosomen, welche nachträglich digital als Kügelchen innerhalb der Zellen platziert wurden und keine reelle intrazelluläre Beeinflussung des MT-Netzwerkes bewirken konnten, würden mit einer höheren MT-Dichte an ihrer Kern-zugewandten Oberfläche, verglichen mit der gegenüberliegenden Seite, konfrontiert werden. Die normalisierte Intensitätsverteilung der MT entlang der Oberfläche hypothetischer Phagosomen ist in Abbildung 8.10E dargestellt. Auch hier stieg das Ungleichgewicht zwischen Kern-zugewandter Seite mit einer hohen MT-Dichte und Peripherie-zugewandter Seite mit wenigen MT mit zunehmendem Phagosomendurchmesser an. Für kleine Phagosomen betrug die Asymmetrie $\Delta I_{\text{MT-spheres}} = 12\%$, für intermediäre Phagosomen 22% und für 3 μm Phagosomen stieg Differenz zwischen der MT-Dichte der Kern-zugewandten Seite und der Peripherie-zugewandten Seite auf 29%. Die Beobachtung des Intensitätsmaximums an den Außenseiten der Phagosomen bei intermediären, realen Phagosomen konnte bei den hypothetischen Phagosomen nicht verifiziert werden.

8.5 Intrazelluläre Verteilung von Mikrotubuli-assozierten Motoren

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass die Verteilung der MT-Strukturen entlang der Oberfläche von realen und hypothetischen Phagosomen von dem Durchmesser des internalisierten Fremdkörpers abhängt, wurde eine gleiche Analyse für MT-assozierte Motorproteine durchgeführt. Das für langreichweitigen, zentripetalen Transport verantwortliche Dynein und das für langreichweitigen, zentrifugalen Transport notwendige Kinesin wurden fluoreszent markiert und ihre Dichte mittels korrelierter Intensitätsverteilung entlang der Phagosomenoberfläche ermittelt, wie in Kapitel 6.1 protokolliert.

Verteilung von MT-assozierten Motoren entlang der Oberfläche realer Phagosomen.

Analog zu den Betrachtungen bezüglich der intrazellulären MT-Verteilungen wurden auch für die Motorproteine zunächst reale Phagosomen an beliebiger Position innerhalb der Zelle betrachtet. Eine repräsentative, fixierte Zelle mit fluoreszent markiertem Dynein ist in Abbildung 8.11A zu sehen. Der akquirierte Bilderstapel ist dabei als gemittelte Intensitätsprojektion dargestellt, wodurch sich spätere Messungen der Intensitätsverteilung der Motoren entlang der Phagosomenoberfläche auf eine 2D-Analyse entlang des Umfangs der Phagosomen reduzieren ließen. Die Dynein Motoren zeigten Clusterbildungen innerhalb der Zelle, wobei die Anzahl der Cluster und somit die Dichte der Motoren von der perinuklearen Region ausgehend in Richtung Zellperipherie abnahm. Auch entlang der Phagosomenoberfläche war eine höhere Motorenintensität entlang der Nukleus-zugewandten Oberfläche verglichen mit der gegenüberliegenden Seite zu erkennen. Eine quantitative Analyse der normierten Intensitätsverteilungen entlang der Phagosomenaußenseiten von mehr als 50 Phagosomen jedes Durchmessers ergaben, dass diese Asymmetrie zwischen hoher Motorendichte auf der Kern-zugewandten Seite und niedriger Motorendichte auf der Peripherie-zugewandten Seite mit steigender Phagosomengröße ebenfalls anstieg (Abb. 8.11B). Für große 3 μm Phagosomen betrug der Unterschied zwischen der

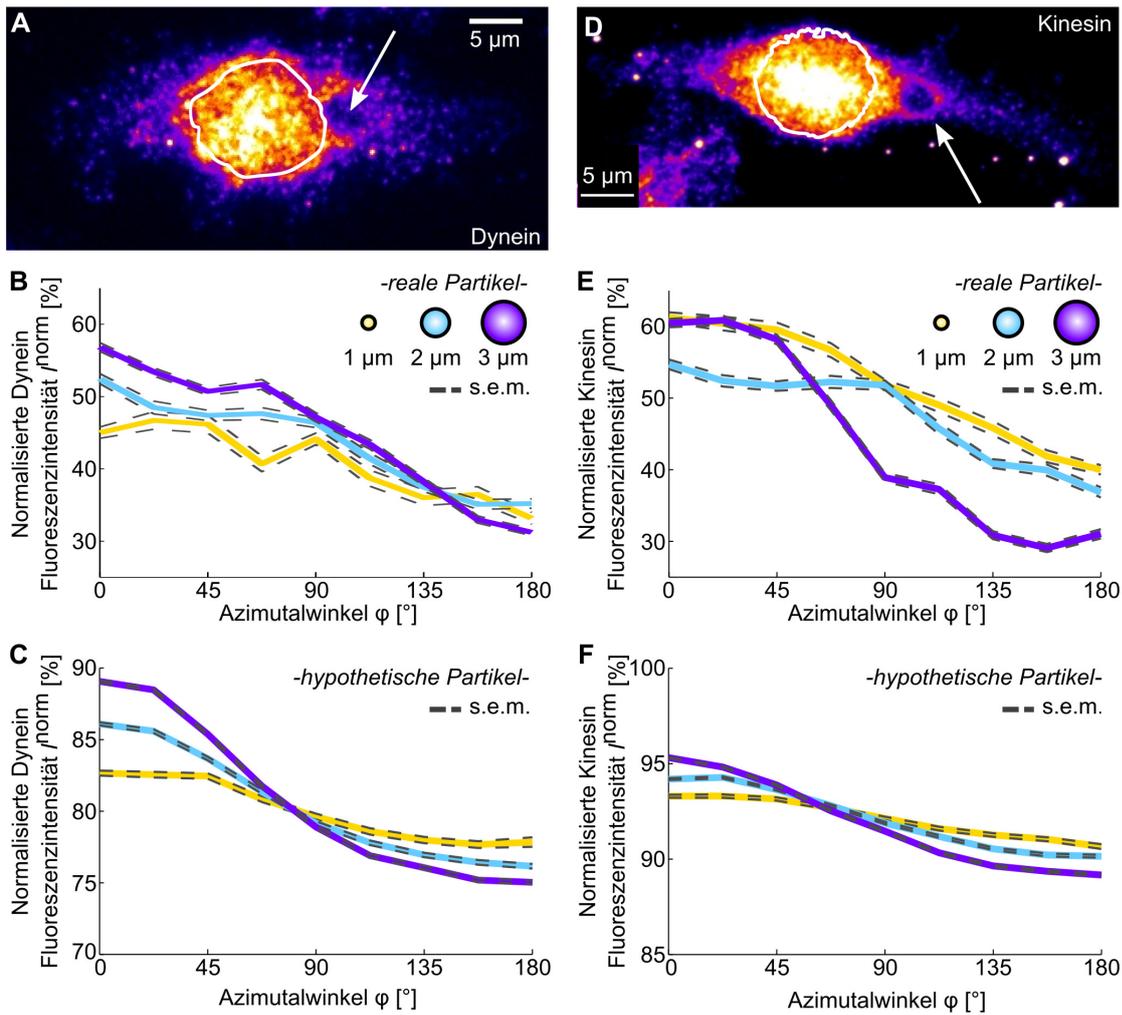


Abbildung 8.11. Intrazelluläre Verteilung von Mikrotubuli(MT)-assoziierten Motoren bei realen & hypothetischen Phagosomen. Die Abbildung (A) zeigt die Verteilung des MT-assoziierten Motors Dynein innerhalb einer repräsentativen Zelle sowie entlang der Oberfläche eines Phagosomes (3 μm , weißer Pfeil) als Falschfarbenbild (gemittelte Intensitätsprojektion eines Bilderstapels). Dynein Motoren wurden mittels sekundärem Antikörper per Immunfärbeverfahren fluoreszent markiert. Die Lage des Nukleus wird mittels weißer durchgezogener Linie angezeigt. Grafik (B) zeigt die normierte Intensitätsverteilung der Dynein Motoren entlang der Außenseite realer Phagosomen mit Durchmessern von 1 μm , 2 μm und 3 μm als Funktion des Azimutalwinkels φ , wobei $\varphi = 0^\circ$ die Richtung zum Nukleus und $\varphi = 180^\circ$ die Richtung zur Zellperipherie repräsentiert. Analysiert wurden mehr als 50 Phagosomen jeden Durchmessers. Eine analoge Intensitätsverteilung entlang hypothetischer Phagosomen ist in Grafik (C) dargestellt. Diese Phagosomen sind nachträglich digital eingefügt und beeinflussen die natürliche intrazelluläre Verteilung der Motoren z.B. durch Verdrängung nicht. Analysiert wurden 257 hypothetische Phagosomen. Die Asymmetrie in der Dynein-Dichte zwischen Kern-zugewandter und Peripherie-zugewandter Phagosomenseite nahm dabei bei realen sowie bei hypothetischen Phagosomen mit steigendem Phagosomendurchmesser zu. Grafik (D) zeigt analog zu (A) die Verteilung von mittels sekundärem Antikörper markierten Kinesin Motoren innerhalb einer J774-Makrophage und entlang der Außenseite eines Phagosomes (3 μm , weißer Pfeil) als Falschfarbenbild (gemittelte Intensitätsprojektion, weiße Linie kennzeichnet die Nukleusposition). Die normierte Intensitätsverteilung von Kinesin entlang der Phagosomenaußenseite von 1 μm , 2 μm & 3 μm Phagosomen als Funktion von φ ist in Grafik (E) dargestellt. Analysiert wurden mehr als 50 Phagosomen jeden Durchmessers. Grafik (F) visualisiert die Intensitätsverteilung der Kinesin Motoren innerhalb natürlicher Zellen, entlang des Umfanges nachträglich als Kügelchen digital eingebrachter hypothetischer Phagosomen. Der Gradient der Kinesin-Verteilung zwischen Kern-zugewandter und gegenüberliegender Phagosomenaußenseite ist hier deutlich geringer als bei realen Phagosomen. Analysiert wurden 242 hypothetische Phagosomen. Angegebene Fehler sind der Standardfehler des Mittelwertes.

Dynein-Dichte auf Kern-zugewandter und Peripherie-zugewandter Phagosomen Seite etwa $\Delta I_{\text{Dynein}} = 20\%$ zugunsten der nukleusnahen Oberfläche. Für $2\ \mu\text{m}$ Phagosomen sank die Differenz auf 14% und für kleine Phagosomen mit $1\ \mu\text{m}$ Durchmesser betrug sie lediglich 11% .

Die Grafik 8.11D zeigt analog zu Grafik 8.11A eine repräsentative Zelle mit markierten Kinesin Motorproteinen. Kinesin zeigte weniger ausgeprägte Clusterbildungen innerhalb der Zelle, aber dennoch eine deutlich höhere Dichte in der perinuklearen Region verglichen mit der Zellperipherie. Auch hier war diese asymmetrische Motorenverteilung entlang der Phagosomenaußenseite erkennbar. Eine den Dynein Motoren identische Analyse der Intensitätsverteilung der Motorproteine entlang der Außenseite von mehr als 50 Phagosomen jedes Durchmessers zeigte eine Schwankung des Kinesin-Dichtegradienten zwischen Kern-zugewandter und Peripherie-zugewandter Phagosomenoberfläche von mehr als 15% in Abhängigkeit der Phagosomengröße (Abb. 8.11E). Dabei zeigten große Phagosomen die höchste Verteilungsasymmetrie zugunsten der Kern-zugewandten Seite mit $\Delta I_{\text{Kinesin}} = 30\%$. Den geringsten Unterschied zeigten allerdings intermediäre Phagosomen mit 14% . Für kleine $1\ \mu\text{m}$ Phagosomen betrug die Asymmetrie 18% . Da auch hier die Intensitätsverteilungen der Motorproteine normiert wurden, um diverse individuelle Schwankungen in der zellbasierten Expressierung des Fluoreszenzfarbstoffes zu kompensieren, lassen die Intensitätsverteilungen der Motorproteine lediglich Rückschlüsse auf relative Dichtegradienten zu und nicht auf absolute Anzahlen der jeweiligen Motoren an der Phagosomenoberfläche.

Verteilung von MT-assoziierten Motoren entlang der Oberfläche hypothetischer Phagosomen. Für die Verteilungen der Motorproteine Dynein und Kinesin wurden ebenfalls Zellen ohne internalisierten Fremdkörper aufgenommen und nachträglich digital über 200 hypothetische Kügelchen als Phagosomen eingefügt entlang deren Oberfläche die Dichteverteilung der Motorproteine bestimmt wurde, welche somit nicht durch den Phagosomentransport beeinflusst werden konnte. Siehe Abbildung 8.11C für die Verteilung der Dynein Motoren und Abbildung 8.11F für die Verteilung von Kinesin Motoren. Für Dynein Motoren zeigte sich eine vergleichbare Steigerung des Gradienten zwischen hoher Dynein-Dichte an der Kern-zugewandten Phagosomenseite und der gegenüberliegenden Seite mit zunehmendem Phagosomendurchmesser bei hypothetischen Phagosomen mit 7% verglichen mit realen Phagosomen mit 9% . Dabei sind die Dynein-Gradienten bei realen Phagosomen grundlegend mindestens 5% höher als bei hypothetischen Phagosomen, d.h. in unbeeinflussten Zellen. Kleine, hypothetische Phagosomen zeigen dabei eine Differenz zwischen Kern-zugewandter und Peripherie-zugewandter Phagosomenaußenseite bezüglich der Dynein-Intensität von 5% , intermediäre Phagosomen einen Unterschied von 8% und $3\ \mu\text{m}$ Phagosomen einen Unterschied von 12% .

Die Asymmetrie der Dichte der Kinesine entlang der Kern-zugewandten Phagosomenaußenseite und der Peripherie-zugewandten Seite fiel generell sehr gering aus und betrug maximal 5% . Die Asymmetrie nahm dabei im Vergleich zu der Kinesin Verteilung entlang der Oberfläche realer Phagosomen mit steigendem Phagosomendurchmesser zu, wobei der Anstieg lediglich 3% betrug. Dabei war die Differenz der normierten Kinesin Fluoreszenzintensität zwischen Kern-zugewandter und gegenüberliegender Phagosomenseite bei kleinen Phagosomen 2% , die Differenz bei intermediären Phagosomen 4% und bei großen Phagosomen betrug der Unterschied 5% .

8.6 Intrazelluläre Verteilung von Aktinfilamenten

Basierend auf den in den Abschnitten 8.2 & 8.3 analysierten Messreihen wurde deutlich, dass AF-fundierte, intrazelluläre Bewegung vor allem für den Transport kleinerer Phagosomen eine wesentliche Rolle spielt. Dieser Abschnitt beschäftigt sich darauf aufbauend mit der Fragestellung, ob die gefundenen, von der Phagosomengröße abhängigen Transporteigenschaften mit der intrazellulären Anordnung der AF in Verbindung gebracht werden können. Dazu wurden analog zu den MT-Strukturen, beschrieben in Abschnitt 8.4, die AF innerhalb der J774-Makrophagen fluoreszent markiert und ihre Verteilung entlang der Oberfläche realer und hypothetischer Phagosomen mittels *Spinning Disk* - Konfokalmikroskopie analysiert (Details siehe Kapitel 6.1).

Verteilung von AF entlang der Oberfläche realer Phagosomen. Gemäß der bisherigen Vorgehensweise zur Analyse intrazellulärer Strukturen wurde zunächst die Verteilung der AF entlang des Umfangs realer Phagosomen in gemittelten Intensitätsprojektionen ausgewählter Ebenen der akquirierten Bilderstapel ausgewertet. Die Position der Phagosomen nach vollständiger Phagozytose innerhalb der Makrophagen war dabei zufällig. Die Abbildung 8.12A zeigt einen der Analyse zugrunde liegenden, repräsentativen Bilderstapel einer Zelle mit fluoreszenzmarkierten AF inklusive einem internalisierten 3 μm Phagosom als Orthogonalprojektion. Die Projektion macht deutlich, dass das Phagosom in allen drei Raumrichtungen von Aktin umschlossen war, wobei im Allgemeinen die Konzentration an AF in der Zellperipherie im Vergleich zur näheren Umgebung des Zellkerns merklich zunahm. Dies entsprach der Erwartung einer erhöhten AF-Konzentration entsprechend des Aktinkortex direkt unterhalb der Zellmembran [68]. Darauf basierend zeigte auch die Projektion der x-y-Ebene sowie der x-z-Ebene eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität durch die AF entlang der vom Zellkern-abgewandten Phagosomenaußenseite verglichen mit der dem Kern-zugewandten Seite. Eine quantitative Analyse der AF-Dichteunterschiede zwischen diesen Phagosomenseiten ist in Form der normalisierten AF-Fluoreszenzintensität als Funktion des Azimutalwinkels φ in Abbildung 8.12B dargestellt. Der Azimutalwinkel $\varphi = 0^\circ$ entspricht, analog zu vorherigen Betrachtungen, der Position der Phagosomenoberfläche (repräsentiert durch den Phagosomenumfang, da es sich um eine Intensitätsprojektion der Bilderstapel handelt) mit dem geringsten Abstand zum Zellkern und $\varphi = 180^\circ$ der Richtung der Zellperipherie. Auch hier zeigte die Verteilung der AF entlang der Phagosomenoberfläche eine Asymmetrie zwischen der Kern-zugewandten und der Peripherie-zugewandten Seite, welche mit steigendem Phagosomendurchmesser zunahm. Dies konnte bereits für die Verteilung der MT (Abschnitt 8.4) beobachtet werden, allerdings war der Gradient der AF-Verteilung, im Gegensatz zum MT-Gradienten, zugunsten der Peripherie-zugewandten Phagosomenseite. Analysiert wurden mehr als 50 Phagosomen jeden Durchmessers, wobei kleine Phagosomen einen AF-Gradienten zwischen Kern-zugewandter und gegenüberliegender Seite von etwa $\Delta I_{\text{AF-phagosomes}} = -0,5\%$ aufwiesen, welcher für intermediäre Phagosomen $-1,5\%$ und für 3 μm Phagosomen $-2,4\%$ betrug. Im Gegensatz zu den Gradienten der MT-Verteilung entlang realer Phagosomen waren die für AF gemessenen Differenzen der AF-Intensitäten sehr gering und einer Gleichverteilung der AF entlang der Oberfläche internalisierter Objekte sehr ähnlich ($\Delta I_{\text{AF-phagosomes}} = 0\%$). Dass eine Darstellung der normalisierten Intensitätsverteilung in Abhängigkeit absoluter Azimutalwinkel gerechtfertigt war, zeigt Abbildung 8.12C, welche eine ähnliche Verteilung der Intensität für positive und negative Azimutalwinkel entlang des Phagosomenumfanges zeigt.

Da auch hier normalisierte Fluoreszenzintensitätswerte analysiert wurden, ist ein Rück-

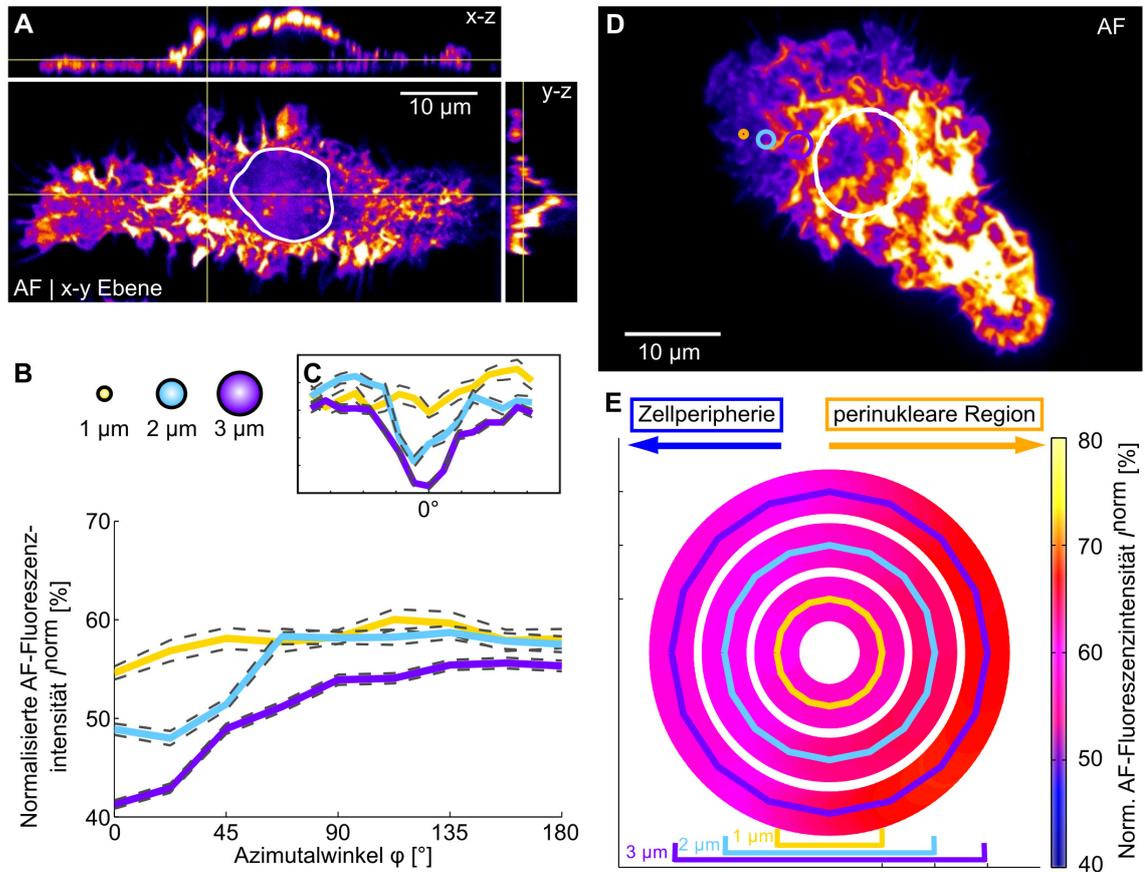


Abbildung 8.12. Intrazelluläre Verteilung von Aktinfilamenten (AF) bei realen & hypothetischen Phagosomen. Die Abbildung zeigt die qualitative und quantitative Verteilung von AF entlang der Oberfläche von realen und hypothetischen Phagosomen. Grafik (A) zeigt die Falschfarben-Orthogonalprojektion einer repräsentativen Mausmakrophage inklusive phagozytisiertem 3 µm Polystyrolpartikel (gelbes Kreuz) mit fluoreszente AF, die mittels eines sekundären Antikörpers und Immundefärbung markiert wurden. Die gelben Linien geben die Lage der im jeweiligen Bild nicht gezeigten Ebenen an. Die Lage des Nukleus ist durch die weiße Linie gekennzeichnet. Die Dichte an AF war dabei in der Region des Aktinkortex erhöht. Eine quantitative Analyse der AF-Verteilung entlang der Außenseite von 1 µm, 2 µm & 3 µm Phagosomen ist in Grafik (B) in Form der mittleren, normalisierten Fluoreszenzintensität als Funktion des absoluten Azimutalwinkels φ dargestellt. Der Winkel $\varphi = 0^\circ$ entspricht dabei der Position auf der Phagosomenoberfläche mit Orientierung Richtung Zellkern und $\varphi = 180^\circ$ der Richtung der Zellperipherie. Dass eine Darstellung des absoluten Azimutalwinkels aufgrund einer ähnlichen Verteilung für positive & negative Azimutalwinkel gerecht fertigt ist, zeigt Grafik (C), welche die gleiche Verteilung wie in (B) in Abhängigkeit des tatsächlichen Winkels darstellt. Fehlerangaben entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Analysiert wurden mehr als 50 Phagosomen jeden Durchmessers. Grafik (D) zeigt die mittlere Intensitätsprojektion in z-Richtung einer repräsentativen Zelle mit fluoreszente AF exklusive internalisierter Fremdkörper. Die Phagosomen wurden nachträglich digital eingefügt (hypothetische 1 µm, 2 µm & 3 µm Phagosomen exemplarisch visualisiert durch gelben, cyanfarbenen & violetten Kreis) und hatten somit keinen Einfluss auf intrazelluläre Strukturen. Die Lage des Zellkerns ist mittels weißer Linie gekennzeichnet. Die quantitative Analyse der AF-Verteilung entlang der Außenseite hypothetischer Phagosomen ist in Form der gemittelten, normalisierten Fluoreszenzintensität als Polarplot in Abhängigkeit des jeweiligen Phagosomendurchmessers in Grafik (E) dargestellt. Analysiert wurden 385 hypothetische Phagosome.

schluss auf die absolute Anzahl an AF entlang der Phagosomenoberflächen nicht möglich, es werden lediglich relative Verteilungsgradienten aufgezeigt.

Verteilung von AF entlang der Oberfläche hypothetischer Phagosomen. Zur Analyse des Einflusses eines innerhalb der Zelle transportierten Fremdkörpers auf das intrazelluläre Aktinnetzwerk wurden die Messungen der AF-Verteilung in Makrophagen ohne Phagosomen wiederholt. Abbildung 8.12D zeigt eine J774-Zelle mit fluoreszenzmarkiertem Aktin, exklusive Fremdkörper als Intensitätsprojektion des akquirierten Bilderstapels. Die AF zeigten eine unregelmäßige Verteilung innerhalb der Zelle, wobei teilweise eine erhöhte Dichte der Filamente im Bereich der Zellperipherie zu erkennen war. Der Aktinkortex selbst wurde aufgrund der Intensitätsprojektion nicht an jeder Stelle der Zellmembran deutlich, da die Zellen eine kegelförmige Morphologie in z-Richtung aufwiesen. Die unregelmäßige Verteilung der AF entsprach nicht der Beobachtung eines negativen AF-Dichtegradienten an der Außenseite reeller Phagosomen zugunsten der Peripherie-zugewandten Seite, wie zuvor beschrieben, sondern ließen vielmehr eine Gleichverteilung entlang der Phagosomenoberfläche erwarten. (Diese Erwartung gilt in erster Linie für die Analyse der Intensitätsprojektionen aller relevanten Ebenen des Bilderstapels. Werden nur einzelne oder wenige Ebenen ausgewählt oder eine dreidimensionale Analyse der AF-Verteilung betrachtet, ist ein negativer Gradient zugunsten der Zellperipherie durchaus zu erwarten.) Für die Überprüfung dieser Erwartung wurden nachträglich digital hypothetische Phagosomen (1 μm , 2 μm & 3 μm) in die akquirierten Bilderstapel eingefügt und die Verteilung der AF entlang deren Umfang innerhalb der Intensitätsprojektion aller relevanten Ebenen bestimmt. Die Verteilung der AF, repräsentiert durch die normalisierte Intensitätsverteilung der markierten Strukturen, ist als Polarplot für die analysierten Phagosomendurchmesser in Abbildung 8.12E dargestellt. Im Vergleich zur Verteilung der MT entlang der Außenseite hypothetischer Phagosomen (Abb. 8.10E) war die Anordnung der AF entlang der Phagosomen relativ homogen ohne Präferenz einer bestimmten Seite. Bei genauerer Betrachtung der 385 ausgewerteten Phagosomen konnte ein geringer AF-Dichteunterschied zwischen der Kern-zugewandten und der Peripherie-zugewandten Seite gemessen werden, welcher mit steigendem Durchmesser der Phagosomen ebenfalls anstieg. Der AF-Dichtegradient zugunsten der Kern-zugewandten Seite betrug für kleine, 1 μm Phagosomen $\Delta I_{\text{AF-spheres}} = 1\%$. Für 2 μm Phagosomen stieg der Unterschied auf 5% an und war abschließend für große Phagosomen 9%.

Der negative AF-Dichtegradient der realen Phagosomen konnte für hypothetische Phagosome nicht beobachtet werden, wobei hier die Analysemethode (siehe Kapitel 6.5) eine wesentliche Rolle spielt, da für reale Phagosomen nur die Fokusebene der Phagosomen sowie die Bildebene darüber und darunter für die Messung der AF-Strukturverteilung herangezogen wurden. Zur Analyse der AF an der Außenseite hypothetischer Phagosomen hingegen wurde die Intensitätsprojektion der gesamten Zellebenen herangezogen.

8.7 Intrazelluläre Verteilung von Aktinfilament-assoziierten Motoren

Da für den intrazellulären Transport nicht nur Aktinfilamente eine tragende Rolle spielen, sondern auch AF-assoziierte Motorproteine, wurde exemplarisch die intrazelluläre Verteilung des Motorproteins Myosin Va analysiert. Myosin V wurde ausgewählt, da es dem Organellentransport innerhalb des Zytosols dient und Myosin Va an internalisierten Phagosomen nachgewiesen werden konnte [65, 135]. Das Analyseverfahren der Motorenverteilung wurde mittels Markierung der Motoren durch einen fluoreszenten sekundären Antikörper

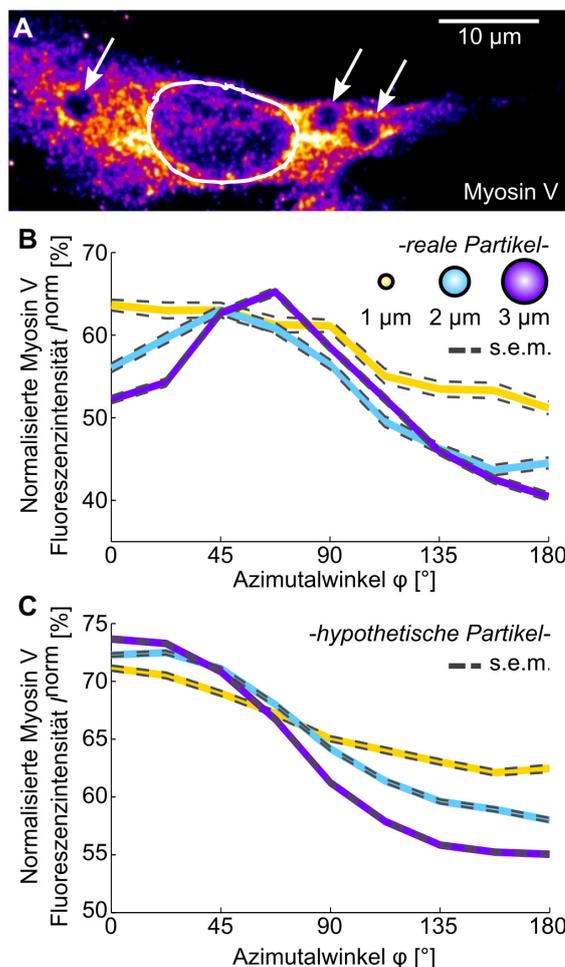


Abbildung 8.13. Intrazelluläre Verteilung von Aktinfilamenten (AF)-assoziierten Motoren bei realen & hypothetischen Phagosomen. Die Abbildung (A) zeigt die Verteilung von mittels fluoreszentes sekundären Antikörper markierten Myosin Va Motoren innerhalb einer repräsentativen Mausemphyse als Falschfarbendarstellung (mittlere Intensitätsprojektion entlang der z-Achse). Von besonderem Interesse war dabei die Myosin-Verteilung entlang der Außenseite von Phagosomen (weiße Pfeile) in Abhängigkeit der Orientierung der Phagosomen zum Nukleus (weiße Linie). Abbildung (B) zeigt die quantitative Analyse dieser Verteilung für Phagosomen mit 1 µm, 2 µm & 3 µm Durchmesser als gemittelte Fluoreszenzintensität des Myosins als Funktion des Azimutalwinkels φ als Maß für die Position entlang der Phagosomenaußenseite ($\varphi = 0^\circ$ entspricht der Richtung des Nukleus & 180° der Richtung der Zellperipherie). Analysiert wurden circa 60 Phagosomen jeden Durchmessers. Abbildung (C) zeigt eine identische Analyse der Myosin Va Motoren entlang der Außenseite nachträglich digital in die Zellen eingefügter hypothetischer Phagosomen, welche somit keinen Einfluss auf intrazelluläre Strukturen hatten. Analysiert wurden 407 hypothetische Phagosomen. Der dargestellte Fehler ist die Standardfehler der Mittelwerte.

und Aufnahme von Bilderstapeln mittels *Spinning Disk* - Konfokalmikroskopie durchgeführt, analog der Analyse MT-basierter Motoren in Abschnitt 8.5 (Details siehe Kapitel 6.1).

Verteilung von AF-assoziierten Motoren entlang der Oberfläche realer Phagosomen.

Zunächst wurde die Verteilung der Myosin Va Motoren innerhalb der Mausemphyse im Allgemeinen und entlang der Phagosomenoberfläche im Speziellen betrachtet. Abbildung 8.13A zeigt eine repräsentative Zelle nach der Internalisierung von drei 3 µm IgG-beschichteten Polystyrolpartikeln mit fluoreszent markierten Motoren. Der aufgenommene Bilderstapel ist als gemittelte Intensitätsprojektion entlang der z-Achse dargestellt, wodurch sich für die spätere Analyse der Motoren entlang der Phagosomenoberfläche eine 2D-Verteilung entlang des Phagosomenumfangs ergab. Die allgemeine Anordnung des Myosins innerhalb der Makrophage war inhomogen, ohne bekannte Strukturierung oder einer erkennbaren Vorzugsregion wie der Zellperipherie oder der perinuklearen Region. Die Verteilung der Motoren entlang der Phagosomenaußenseiten wies ebenfalls Inhomogenitäten auf, welche keine Korrelation mit der Orientierung ihrer Position auf der Phagosomenoberfläche zeigten. Eine quantitative Analyse der Myosin Va-Dichte entlang der Außenseite von mehr als 50 unterschiedlichen Phagosomen ergab dabei einen Gradienten in der Motorenverteilung mit höherer Motorendichte entlang der Nukleus-zugewandten Phagosomenseite. Dieser Gradient ist als normalisierte Fluoreszenzintensität der Myosin Motoren als Funktion des Azimutalwinkels, repräsentativ für die Orientierung auf der Pha-

gosomenoberfläche, in Abbildung 8.13B dargestellt. Der Myosin-Gradient lag in der gleichen Größenordnung wie der Gradient der Dynein-Verteilung (siehe Abschnitt 8.5), stieg aber im Vergleich zu diesem nicht mit größer werdendem Phagosomendurchmesser an. Für 1 μm große Phagosomen war der Unterschied zwischen Myosin Motoren entlang der Kern-zugewandten Phagosomenseite und der Peripherie-zugewandten Seite mit $\Delta I_{\text{Myosin}} = 11\%$ am geringsten, für 2 μm Phagosomen mit 15% am größten. Für große Phagosomen betrug der Gradient 13%. Der Unterschied in der Myosin-Asymmetrie innerhalb der betrachteten Phagosomendurchmesser von etwa 4% war dabei deutlich geringer als für andere Verteilungen (MT, AF, Dynein, Kinesin) beobachtet wurde. Ein ebenfalls essentieller Unterschied zu den Verteilungen der Dynein und Kinesin Motoren (Abschnitt 8.5) war die Lokalisation des Maximums der Myosin-Dichte, welches sich für intermediäre und große Phagosomen nicht an der Kern-zugewandten Phagosomenfläche befand, sondern zwischen Kern- und Peripherie-zugewandter Seite, bei einem Azimutalwinkel zwischen $\varphi = 45^\circ$ und 90° . Der Kurvenverlauf der Myosin-Verteilung der 2 μm und 3 μm Phagosomen war dabei für alle Azimutalwinkel sehr ähnlich.

Verteilung von AF-assozierten Motoren entlang der Oberfläche hypothetischer Phagosomen. Für eine mögliche Verallgemeinerung der beobachteten Verteilungen der Myosin Va Motoren entlang realer Phagosomen war auch hier eine grundlegende Analyse der Verteilung des Myosins innerhalb von Zellen ohne Beeinflussung der intrazellulären Strukturen durch internalisierte Fremdkörper notwendig. Dazu wurden analog zu der bisherigen Vorgehensweise Zellen ohne Phagosomen aufgenommen und in die mittleren Intensitätsprojektionen der Zellen entlang der z-Achse nachträglich digital sphärische Objekte eingefügt, um hypothetische Phagosomen zu simulieren. Die Verteilung der Myosin Va Motoren entlang der Außenseite von mehr als 400 solcher hypothetischer Phagosomen ist in Abbildung 8.13C dargestellt. Auch hier konnte wie bereits für reale Phagosomen ein Gradient bezüglich der Myosin Dichte zugunsten einer höheren Dichte auf der Kern-zugewandten Phagosomenseite festgestellt werden. Der Gradient stieg dabei allerdings mit größer werdendem Phagosomendurchmesser an. Er betrug für kleine Phagosomen 8%, für intermediäre Phagosomen 13% und für große Phagosomen 17% und war damit höher als der ermittelte Gradient MT-basierter Motorproteine oder der Gradient von AF entlang der Außenseite hypothetischer Phagosomen. Die bei den realen Phagosomen beobachtete Lokalisierung des Maximums der Myosin-Dichte zwischen 45° und 90° Azimutalwinkel der Phagosomenaußenseite konnte bei den hypothetischen Phagosomen nicht beobachtet werden und deutet auf eine Verschiebung der Motoren durch die Internalisierung von Fremdkörpern und deren Transport hin.

8.8 Einfluss des Abstandes zwischen Phagosom & Nukleus auf die intrazelluläre Verteilung der betrachteten Strukturen

Im abschließenden Abschnitt dieses Kapitels wurde der Einfluss des Abstandes zwischen Nukleus und dem phagozytierten Objekt auf die Verteilung der in den vorangegangenen Abschnitten betrachteten Strukturen entlang der Phagosomenaußenseite analysiert und ausgewertet. Zur Quantifizierung der Verteilung diente analog zu den anderen Abschnitten die Fluoreszenzintensität der zu untersuchenden intrazellulären Strukturen. Bei diesen Strukturen handelte es sich um Mikrotubuli, die MT-assozierten Motoren Dynein und Kinesin, Aktinfilamente sowie den AF-assozierten Motorprotein Myosin V. Die dabei zugrunde liegenden Daten waren identisch mit den Daten aus den Abschnitten 8.4, 8.5, 8.6 und 8.7.

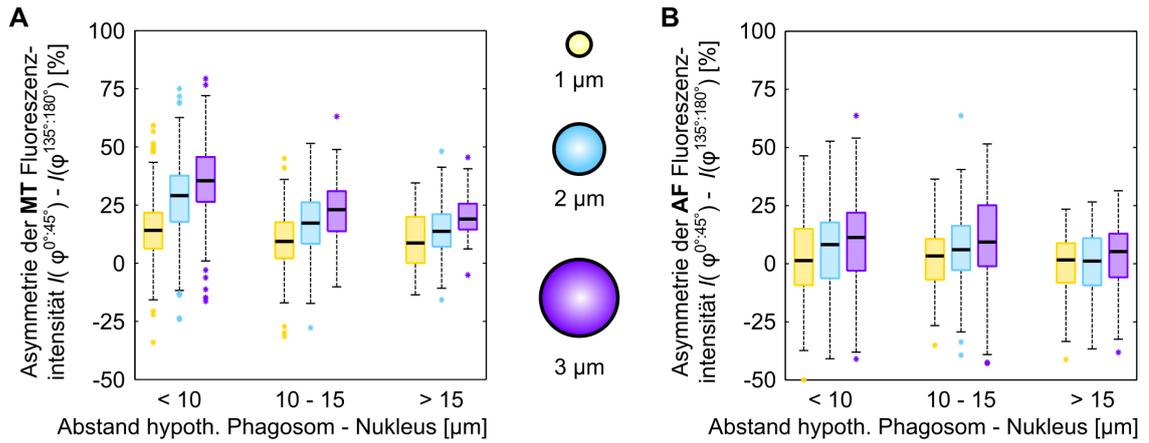


Abbildung 8.14. Korrelation der Distanz zwischen Phagosom & Nukleus und der Verteilung von MT & AF entlang der Außenseite hypothetischer Phagosomen. Die Abbildung zeigt die Asymmetrien (Differenz) der Fluoreszenzintensitäten von mit sekundären Antikörpern markierten MT- (A) und AF-Strukturen (B) zwischen der Kern-zugewandten Phagosomenseite ($0^\circ \leq \varphi \leq 45^\circ$) und der Zellperipherie-zugewandten Phagosomenseite ($135^\circ \leq \varphi \leq 180^\circ$), auch bezeichnet als Fluoreszenzintensitätsgradient. Bestimmt wurden die Intensitäten dabei entlang der Außenseite hypothetischer Phagosomen (nachträglich digital in die Zellen eingefügte sphärische Objekte). Diese Asymmetrien wurden für 1 μm , 2 μm & 3 μm Phagosomen bestimmt und in Abhängigkeit des Abstandes zwischen Mittelpunkt des betrachteten Phagosomes und Nukleuszentrum aufgetragen. Die Abstände sind in Intervalle von <10 μm , 10-15 μm & >15 μm zusammengefasst. Dargestellt ist die Verteilung der Fluoreszenzintensitätsgradienten in Form eines Boxplots, wobei die Box dem Bereich entspricht, in dem 50% der Daten liegen (Intervalllänge dieses Bereiches als Interquartilsabstand bezeichnet) und der horizontale Strich innerhalb der Box den Medianwert der Verteilung repräsentiert. Die Länge der Antennen wurde auf den 1.5fachen Interquartilsabstand beschränkt. Analysiert wurden bei den MT 220 Phagosomen im Intervall <10 μm , 158 im Intervall 10-15 μm & 66 im Intervall >15 μm . Für AF betrug die Anzahl analysierter Phagosomen in identischen Intervallen 186, 109 & 90.

Zunächst wurde die Verteilung zytoskelettaler Strukturen detaillierter betrachtet. Abbildung 8.14 zeigt die Verteilung der Fluoreszenzintensitätsgradienten von 1 μm , 2 μm und 3 μm Phagosomen in Abhängigkeit von Distanzintervallen zwischen dem Phagosomenmittelpunkt und dem Nukleuszentrum. Die Fluoreszenzintensitätsgradienten wurden dabei als Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität entlang der absoluten Azimutalwinkeln zwischen $0^\circ \leq \varphi \leq 45^\circ$ entlang der Phagosomenoberfläche und der Fluoreszenzintensität entlang absoluten Azimutalwinkeln zwischen $135^\circ \leq \varphi \leq 180^\circ$ berechnet. Sie waren somit ein Maß für die Asymmetrie in der Intensitätsverteilung zwischen Kern-zugewandter Phagosomenoberfläche und Peripherie-zugewandter Oberfläche. Die dargestellten Gradienten wurden entlang der Außenseite hypothetischer Phagosomen bestimmt. Die Abbildung 8.14A stellt die Gradientenverteilung von MT und die Abbildung 8.14B die Gradientenverteilung von AF dar. Da es sich hier um hypothetische Phagosomen handelt, existierte zu jeder Distanz zwischen Nukleus und Phagosom ein Phagosom mit 1 μm , 2 μm und 3 μm Durchmesser, was eine sehr gute Vergleichbarkeit der drei Phagosomengrößen gewährleistete. Unabhängig von der Distanz und der betrachteten Struktur zeigten die Gradientenverteilungen eine steigende Tendenz für größer werdende Phagosomen. Die Gradientenverteilung der MT wurde dabei für größer werdende Abstände zwischen Kern und Phagosom für alle Phagosomendurchmesser geringer. Dies entsprach der natürlichen intrazellulären Anordnung der MT, deren Dichte in Richtung der Zellperipherie abnahm, vergleiche Abschnitt 8.4. Die Verteilung der AF hingegen zeigte kaum Abhängigkeit von der Distanz zwischen Nukleus und Phagosom. Entsprechend dem Abschnitt 8.6 würde aufgrund des

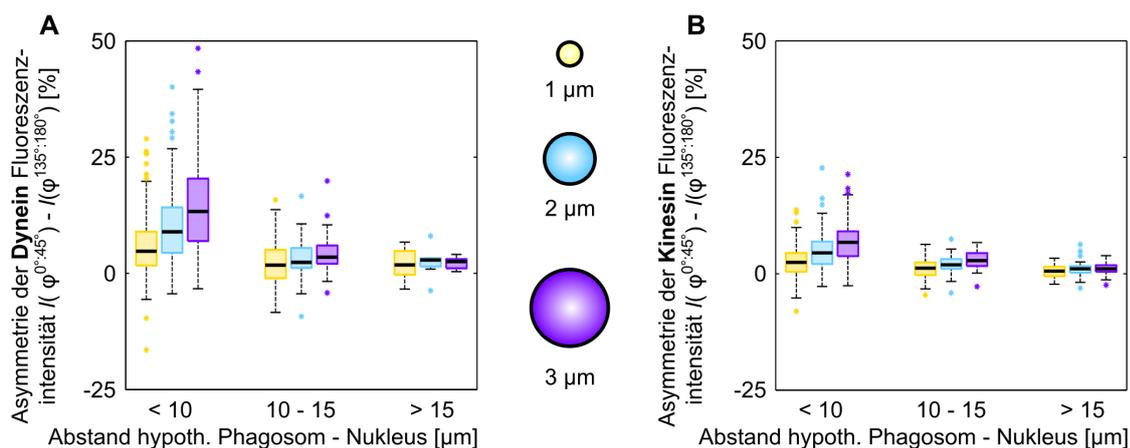


Abbildung 8.15. Korrelation der Distanz zwischen Phagosom & Nukleus und der Verteilung von Dynein & Kinesin entlang der Außenseite hypothetischer Phagosomen. Die Abbildung zeigt die Asymmetrien (Differenz) der Fluoreszenzintensitäten von mit sekundären Antikörpern markierten Dynein (A) und Kinesin (B) Motoren zwischen der Kern-zugewandten Phagosomenseite ($0^\circ \leq \varphi \leq 45^\circ$) und der Zellperipherie-zugewandten Phagosomenseite ($135^\circ \leq \varphi \leq 180^\circ$), analog der Abbildung 8.14. Betrachtete Distanzintervalle, analysierte Partikeldurchmesser sowie Aufbau der Boxplots sind ebenfalls identisch, für weitere Details siehe Bildunterschrift der Abb. 8.14. Analysiert wurden für die Dynein-Verteilung jeweils 187 $1\ \mu\text{m}$, $2\ \mu\text{m}$ & $3\ \mu\text{m}$ Phagosome in dem Intervall $<10\ \mu\text{m}$, 62 im Intervall $10\text{-}15\ \mu\text{m}$ & 8 im Intervall $>15\ \mu\text{m}$. Für Kinesin betrug die Anzahl analysierter Phagosomen in identischen Intervallen 153, 60 & 29.

zellulären Aktinkortexes eine höhere Dichte an AF in der Zellperipherie erwartet werden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass sich die Region des Aktinkortexes einer kleinen Zelle in einem geringeren Distanzintervall widerspiegelt als bei einer großen Zelle, da die Zellen keine einheitliche Größenverteilung aufwiesen. Der Unterschied zwischen den Gradienten bei $3\ \mu\text{m}$ Phagosomen und $1\ \mu\text{m}$ Phagosomen war dabei bei AF deutlich geringer als bei MT, unabhängig des Distanzintervalls.

Die Abbildung 8.15 entspricht einer identischen Darstellung wie Abbildung 8.14 für die MT-assoziierten Motorproteine Dynein, 8.15A und Kinesin, 8.15B. Dargestellt ist dabei ebenfalls die Verteilung entlang der Außenseite hypothetischer Phagosomen, sodass identische Bedingungen galten wie für die Betrachtung der MT- und AF-Gradientenverteilungen. Beide Motorproteine zeigten bezüglich der Asymmetrie zwischen Kern-zugewandter Phagosomenseite und gegenüberliegender Seite eine drastische Reduzierung mit zunehmender Distanz zwischen Kern und Phagosom. Dies korrelierte mit der Reduktion der MT-Dichte im Bereich der Zellperipherie. Für große Abstände kam es dabei nahezu zum Ausgleich der Asymmetrien, unabhängig vom Phagosomendurchmesser oder betrachteten Motorproteinen. Die Abbildung 8.16 stellt die Gradientenverteilung aller Phagosomengrößen in Abhängigkeit des Abstandes zwischen Kern und Phagosom bei AF-assoziierten Myosin V Motoren dar. Auch hier galten identische Bedingungen wie bei den beiden vorangegangenen Abbildungen. Die Gradientenverteilung der Myosin V Motoren entlang der Außenseite hypothetischer Phagosomen erhöhte sich mit steigendem Phagosomendurchmesser, unabhängig des Abstandes zum Nukleus. Die Asymmetrie im Allgemeinen reduzierte sich dabei dezent mit größer werdender Distanz zwischen Phagosom und Zellkern. Die Abhängigkeit der Gradientenverteilung bezüglich des Distanzintervalls war dabei bei Myosin Motoren deutlich geringer als bei Dynein und Kinesin Motoren (Abb. 8.15), was mit der bereits identifizierten Verteilung der Motoren innerhalb der Zelle ohne erkennbare Vorzugsregion korrelierte, vergleiche Abschnitt 8.7.

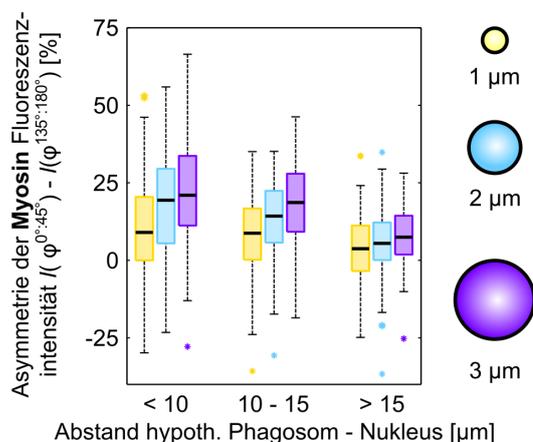


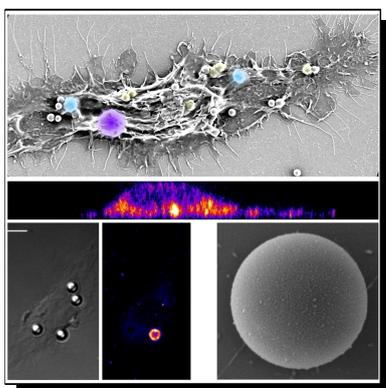
Abbildung 8.16. Korrelation der Distanz zwischen Phagosom & Nukleus und der Verteilung von Myosin V entlang der Außenseite hypothetischer Phagosomen. Die Abbildung zeigt die Asymmetrien der Intensitäten von Fluoreszenz markiertem Myosin V zwischen der Kern-zugewandten Phagosomenseite und der Peripherie-zugewandten Seite. Betrachtete Distanzintervalle, analysierte Partikeldurchmesser sowie Aufbau der Boxplots sind identisch mit der Abb. 8.14, für weitere Details siehe dortige Bildunterschrift. Analysiert wurden für 167 1 μm, 2 μm & 3 μm Phagosome in dem Intervall <10 μm, 116 im Intervall 10-15 μm & 124 im Intervall >15 μm.

Die in diesem Abschnitt gezeigte Abhängigkeiten der Asymmetrien struktureller Verteilungen zwischen Kern-zugewandter und Peripherie-zugewandter Phagosomenoberfläche von dem Abstand zwischen Phagosom und Nukleus konnten nicht mit einer Ortsabhängigkeit von Transporteigenschaften in Verbindung gebracht werden. Wie in Kapitel 7.14 gezeigt, waren die extrahierten Transporteigenschaften unabhängig von der Phagosomenposition innerhalb der Zellen.

Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Verteilung der Gradienten von MT, MT-assoziiierter Motoren, AF und AF-assoziiierter Motoren und der Distanz zum Zellkern wurde ebenfalls für die Fluoreszenzintensitäten entlang realer Phagosomen durchgeführt. Dabei konnte weder eine Tendenz noch eine Abhängigkeit der Gradientenverteilung von der Distanz beobachtet werden. Aufgrund großer Schwankungen in den Positionen der Phagosomen und somit einer schlechten Vergleichbarkeit der Phagosomenpositionen der diversen Phagosomendurchmesser und großen Schwankungen in den Verteilungen der Gradienten ergab diese Analyse keine weiteren zusätzlichen Erkenntnisse.

- Diskussion -

Diskussion der experimentellen Grundlagen



Dieses Kapitel dient einer kritischen Auseinandersetzung mit den in der vorliegenden Arbeit genutzten experimentellen Methoden, etablierten Protokollen und genutzten Parametern. Weiterhin werden Ansätze zur Optimierung der Messabläufe und Analyseroutinen aufgezeigt und erläutert. Die kritischen Parameter für die hier durchgeführten Experimente und deren anschließende quantitative und qualitative Auswertung sind: die Antikörperopsonisierung der Zielobjekte, die Verteilung der $Fc\gamma$ -Rezeptoren auf der Zellmembran, die größenabhängigen Sedimentationszeiten der Zielobjekte zur Initiierung der

Phagozytose, der Nachweis einer erfolgreichen Aufnahme der Zielobjekte sowie deren Wahrscheinlichkeit, die Beeinflussung der Zellen in ihrer natürlichen Funktionsweise durch die Aufnahme von unzersetzbaren Fremdkörpern und die Abhängigkeit der gewonnenen Ergebnisse von den während der Analyse gesetzten Schwellwerten.

9.1. Opsonisierung der Zielobjekte	148
9.2. Verteilung der $Fc\gamma$ -Rezeptoren	148
9.3. Sedimentationszeiten der Partikel	149
9.4. Nachweis der erfolgreichen Phagozytose	149
9.5. Potenzielle Störungen der Zellfunktionen	150
9.6. Diskussion der eingeführten Analyseparameter	152

9.1 Opsonisierung der Zielobjekte

Die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchung zum größenabhängigen Transport von Phagosomen war die Internalisierung von Fremdkörpern durch Makrophagen. Um diese Internalisierung zu gewährleisten, wurden die Zielobjekte, hier 1-3 µm Polystyrolpartikel mit einer carboxylierten Oberfläche, passiv mit Immunglobulin G (IgG) beschichtet. Eine passive Beschichtung bedeutet dabei eine Anlagerung der Antikörper an der Oberfläche durch Adhäsionskräfte ohne vorherige Aktivierung der Oberfläche. Eine Kontrolle der Antikörperopsonisierung erfolgte mittels elektronenmikroskopischer Aufnahme der Partikel oder mittels fluoreszenter Markierung adhärenter Antikörper auf der Partikeloberfläche durch einen zweiten (sekundären) Antikörper, spezifisch bindend gegenüber Immunglobulin G. Anhand beider Nachweismethoden konnte überprüft werden, ob die Antikörperbeschichtung erfolgreich war und ob sie sich homogen über die Partikeloberfläche verteilte. Aufgrund des hohen Aufwandes zur Erstellung einer elektronenmikroskopischen Abbildung konnte dieser Nachweis nur einmalig durchgeführt werden. Auch ein Nachweis mittels sekundärem Antikörper war nur stichprobenartig möglich, da davon ausgegangen werden kann, dass der sekundäre Antikörper die Phagozytosewahrscheinlichkeit der Zielobjekte reduziert. (Durch den sekundären Antikörper wird der primäre Antikörper abgeschirmt und es kommt zu keiner IgG-Fc γ -Rezeptor initiierten Phagozytose, sondern nur zu einer zufälliger Aufnahme ähnlich wie bei carboxylierten Partikeln, siehe Abb. 7.9.) Beide Nachweismethoden zeigten eine homogene und erfolgreiche Beschichtung der Zielobjekte mit IgG. Damit konnte die gezielte Aktivierung einer Fc γ -Rezeptoren-basierten Phagozytose der Zielobjekte sichergestellt werden. Weiterhin konnte aufgrund der homogenen IgG-Verteilung auf der Partikeloberfläche die Orientierung der Zielobjekte gegenüber den Zellen vernachlässigt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Rotation bereits an Rezeptoren gebundener Zielobjekte aufgrund von IgG-Gradienten wurde somit reduziert. Eine Methode zur direkten Überprüfung der Antikörperopsonisierung des zur Phagozytoseinitiierung verwendeten Zielobjektes ist derzeit nicht bekannt, eine intakte Beschichtung spiegelte sich jedoch in einer erfolgreichen Aufnahme und dem intrazellulären Transport des Zielobjektes wieder.

Aufgrund der einfachen Durchführbarkeit der Nachweismethode mittels sekundärem Antikörper konnte diese Überprüfung der Beschichtung von Zielobjekten zu jedem beliebigen Zeitpunkt nach der Opsonisierung durchgeführt werden. Dadurch konnte die Qualität der Zielobjektbeschichtung auch über längere Zeiträume gesichert werden, um die Vergleichbarkeit der Messreihen zu gewährleisten. Eine Optimierung der IgG-Opsonisierung der Zielobjekte bietet hier die aktive Beschichtung der Partikel mit Antikörpern durch eine vorausgehende chemische Aktivierung der Partikeloberfläche. Dies erhöht die Bindungskräfte zwischen Antikörpern und Partikelaußenseite, war allerdings im Rahmen der hier durchgeführten Experimente nicht notwendig, da nach initiiertem Phagozytose die Zielobjekte vollständig den Zellen überlassen wurden. Für die Lagerung der Zielobjekte erwies sich eine passive Opsonisierung als ausreichend stabil.

9.2 Verteilung der Fc γ -Rezeptoren

Neben der homogenen Verteilung des IgGs auf der Oberfläche der Zielobjekte spielte auch die Verteilung der Gegenspieler, die Fc γ -Rezeptoren an der Außenseite der Zellmembran, eine wesentliche Rolle für die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der durchgeführten Experimente. Dazu wurden die Fc γ -Rezeptoren mittels fluoreszentes Antikörper markiert und ihre Verteilung mittels konfokaler Mikroskopie analysiert (siehe Abb. 7.4). Dabei wur-

de gezeigt, dass sich an jeder Außenseite der Zellmembran eine ausreichende Menge an $Fc\gamma$ -Rezeptoren befand, ohne dass es dabei zur Ausbildung von Membranregionen mit stark erhöhter oder reduzierter Rezeptordichte kam. Darauf basierend konnte für die Experimentreihen angenommen werden, dass die Position entlang der Zellmembran, an welcher die Phagozytose aktiv (HOT) oder passiv (Partikelsedimentation) initiiert wurde, keinen Einfluss auf die Aktivierung des Phagozytoseprozesses durch $Fc\gamma$ -Rezeptoren-getriggerte biochemische Signalkaskaden hatte. Ebenfalls konnte davon ausgegangen werden, dass die Einleitung der Phagozytose grundlegend an jedem Ort der Zellaußenwand möglich ist. Auf eine systematische Untersuchung der Rezeptorenverteilung in Abhängigkeit diverser Zeileigenschaften wie Morphologie, Zellzyklus oder Kultivierungsdauer wurde hier verzichtet, bietet aber eventuell die Möglichkeit zu einer Optimierung der Phagozytoseinitiierung.

9.3 Sedimentationszeiten der Partikel

Ein weiterer Faktor zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der durchgeführten Experimente, nicht nur zwischen aktiver und passiver Einleitung der Partikelaufnahme, sondern auch bezüglich der variierenden Durchmesser der Zielpartikel, war die größenabhängige Sedimentationszeit der Zielobjekte innerhalb der Probe und somit ihr Erreichen der Zellaußenseite nach ihrer Zugabe. Die mit reduziertem Zielobjektdurchmesser steigende Sedimentationszeit konnte für statistische Analysen wie beispielsweise der Bestimmung von Phagozytosewahrscheinlichkeiten durch angepasste Startzeiten, Sedimentation der Partikel auf Eis oder angepasste Partikelkonzentration ausgeglichen werden. Dazu wurde zunächst die Sedimentationszeit in Abhängigkeit der Partikelgröße bestimmt, wobei gezeigt werden konnte, dass die tatsächliche Sedimentationszeit den theoretischen Erwartungen für das Absinken eines sphärischen Körpers bei kleinen Reynoldszahlen entspricht (siehe Abb. 7.3). Dabei konnte außerdem gezeigt werden, dass die Dauer einer vollständigen Sedimentation von $1\ \mu\text{m}$ großen Partikeln sehr hoch war. Daraus folgte, dass die Durchführung der Sedimentation auf Eis (Abkühlen der Proben auf $0\ ^\circ\text{C}$) trotz guter Reproduzierbarkeit dieser Methode nicht ohne zusätzliche Anpassungen realisierbar war. Für diverse Experimente wurde daher bei entsprechender Notwendigkeit zusätzlich die Ausgangskonzentration an Zielobjekten angepasst. Die kurzzeitige Lagerung der Proben auf Eis wurde, wenn notwendig beibehalten, da sie auch einen identischen Startzeitpunkt der phagozytischen Aufnahme der Zielobjekte gewährleistete. Eine Optimierung der größenabhängigen Sedimentationszeiten könnte durch die Verwendung von Zielobjekten aus Silikat anstelle von Polystyrol erreicht werden, da sich aufgrund der höheren Dichte von Silikat die Sedimentationszeiten drastisch verkürzen. Für Experimente, bei denen nur einzelne Zielobjekte betrachtet wurden und ihr Transport innerhalb der Makrophagen analysiert wurde, war es nicht notwendig eine identische Partikelkonzentration unabhängig der Zielobjektgröße im Umfeld der Zellen zu gewährleisten. Eine Diskussion der Beeinflussung der Zellen in ihrer natürlichen Funktionsweise durch bereits aufgenommene Zielobjekte findet sich in Abschnitt 9.5.

9.4 Nachweis der erfolgreichen Phagozytose

Im Anschluss an die Initiierung der Phagozytose war es notwendig die erfolgreiche und vollständige Aufnahme der Zielobjekte in ein Phagosom durch die Makrophagen nachzuweisen, um sicherzustellen, dass es sich bei dem später beobachteten Transport auch um intrazelluläre Phagosomenbewegung handelte. Dazu wurde exemplarisch an fixierten Zellen die Aufnahme der Fremdkörper mittels sekundärem Antikörper, spezifisch für das IgG

der Partikeloberfläche, und mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen (siehe Abb. 7.7 & 7.6). Zusätzlich wurde exemplarisch die Aufnahme einzelner Zielobjekte in lebenden Zellen mit fluoreszent gekennzeichnete Zellmembran visualisiert (siehe Abb. 7.5). Dabei wurde festgestellt, dass die Aufnahmewahrscheinlichkeit der mit IgG opsonierten Zielobjekte sehr hoch war und nach initiiertem Phagozytose auch meist eine Aufnahme der Zielobjekte bei hinreichend langer Zeitdauer erfolgte. Eine frustrierte Phagozytose, d.h. ein Abbruch der Partikelaufnahme, oder eine erfolglose Phagozytoseinitiierung (keine oder abgebrochene Zellreaktion auf den Fremdkörper) wurde für die hier verwendeten sphärischen Zielobjekte mit 1-3 μm Durchmesser und homogener IgG-Opsonisierung kaum beobachtet. Es ergaben sich somit Anzeichen für eine erfolgreiche Aufnahme der Zielobjekte wie beispielsweise aktive intrazelluläre Bewegung, Entfernung von der Zellmembran oder Position innerhalb der Zelle, welche für jede durchgeführte Messreihe zum Transportverhalten der Phagosomen kontrolliert wurden. Durch wiederholten Abgleich dieser Indizien mit den Methoden zum Nachweis der Aufnahme, konnte sichergestellt werden, dass es sich bei dem beobachteten intrazellulären Transport mit hoher Wahrscheinlichkeit um die Bewegung von Phagosomen handelte. Um diese Wahrscheinlichkeit noch weiter zu verbessern, wurde die generelle Aufnahme von Zielobjekten mit IgG-Opsonisierung nach erfolgtem Kontakt zwischen Zielobjekt und Zellmembran gemessen. Diese wurde sowohl für mehrere Zeitpunkte nach dem Kontakt als auch im Vergleich mit der Aufnahme von Zielobjekten ohne Antikörperbeschichtung bestimmt (siehe Abb. 7.9). Auch hier zeigten sich Aufnahmeraten von über 80% der opsonierten Zielobjekte, selbst bei sehr kurzer Zeitdauer (~ 15 min) nach erfolgtem Partikel-Zellkontakt. Aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit einer Aufnahme der IgG-beschichteten Zielobjekte durch die Makrophagen nach initiiertem Partikel-Zellkontakt erwies sich das hier vorgestellte System von Rezeptoren und Liganden als relativ sicherer Modellorganismus zur Beobachtung von phagosomalem Transportverhalten. Um die Sicherstellung des phagosomalen Aufnahmeprozesses zu optimieren und für jede beobachtete Internalisierung visualisieren zu können, empfiehlt sich der dauerhafte Einsatz eines Membranfarbstoffes oder die Verwendung von stabil transfizierten Zelllinien beispielsweise mit markiertem Aktinzytoskelett und der Akquirierung von zusätzlichen Fluoreszenzaufnahmen während der Initiierung der Phagozytose. Allerdings gilt es dabei auch die mögliche Schädigung der Zellen durch fluoreszenzinduzierte Phototoxizität zu beachten.

9.5 Potenzielle Störungen der Zellfunktionen

Da in der vorliegenden Arbeit auf den Einsatz von Fluoreszenzmikroskopie während der Akquirierung von Bilderserien zur phagosomalen Transportanalyse verzichtet wurde, spielte hier Phototoxizität (Zellschädigungen durch freie Sauerstoffradikale) keine Rolle, da keine fluoreszenten Moleküle in den Zellen vorhanden waren, welche mit molekularem Sauerstoff hätten reagieren können. Allerdings kann es dennoch zu einer Einschränkung der Zellen in ihrer natürlichen Funktionsweise kommen beispielsweise durch die Aufnahme und Ansammlung von Fremdkörpern, welche die Zellen nicht zersetzen können, durch Beschädigung der Zellen mittels Laserstrahl oder durch Adhäsion der Zellen auf Deckgläsern. Eine Veränderung der Zellfunktionen durch die Aufnahme der Polystyrolpartikel konnte im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht festgestellt werden. Zellfunktionen wie hohe Beweglichkeit, weitere Aufnahme von Fremdobjekten, Ausbildung von Filopodien (Scheinfüßchen) oder Zytokinese blieben auch bei längeren Beobachtungsdauern von bis zu 3 h vollständig erhalten, vergleiche hierzu Abb. 9.1. Es kam dabei lediglich zu einer Aktivierung der Zelloberfläche durch das IgG, was dem natürlichen Zellverhalten

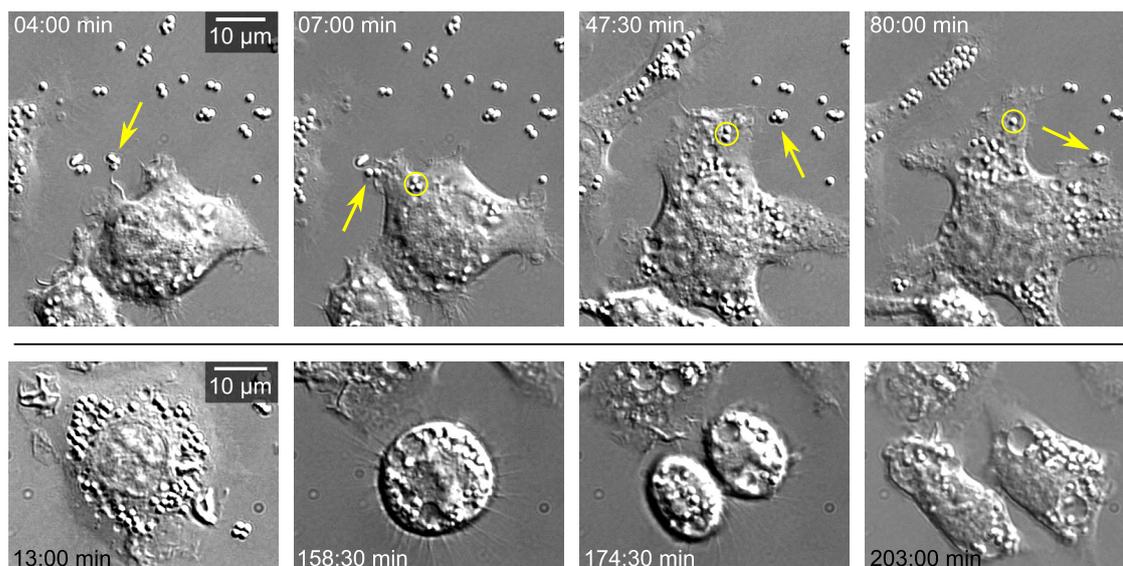


Abbildung 9.1. Einfluss der Phagozytose von Fremdkörpern auf die natürliche Zellfunktion. Die Abbildung zeigt an zwei repräsentativen Zellen die Auswirkungen der Aufnahme von Fremdkörpern, welche die Zellen nicht zersetzen können, auf natürliche Zellfunktionen, hier der Morphologie, Ausbildung von Filopodien, Zellmobilität und Phagozytose (Zelle in der oberen Reihe) und Zytokinese (Zelle in der unteren Reihe). Die Zelle in der oberen Reihe zeigt im Zeitverlauf die kontinuierliche Suche nach Fremdkörpern (gelbe Pfeile) mit Hilfe von Filopodien. Es folgt eine Membran-basierte Anbindung an die Fremdkörper und eine Bewegung in deren Richtung. Diese Zielobjekte werden anschließend durch die Zelle internalisiert und intrazellulär transportiert (gelbe Kreise). Dabei sind weder bezüglich der Aufnahme von Fremdkörpern, der Beweglichkeit der Zellen oder der Zellmorphologie Unterschiede zu Zellen ohne internalisierte, nicht zersetzbare Fremdkörper festzustellen. Es findet lediglich eine Aktivierung der Zelloberfläche statt. Die Zelle in der unteren Reihe zeigt nach der Internalisierung mehrerer Fremdkörper die Einleitung der Mitosephase, erkennbar durch das Aufrunden der Zelle. Anschließend folgt eine Teilung der Zelle, resultierend in zwei Tochterzellen mit natürlicher Morphologie und aufgeteilter Anzahl an Fremdkörpern. Eine Beeinträchtigung der Zytokinese wurde nicht beobachtet. Alle bereits aufgenommenen Fremdkörper verblieben in der jeweiligen Zelle.

entspricht. Die Erhaltung der Zellfunktionen bei Messdauern von mehreren Stunden zeigte, dass auch potenzielle Zellschädigungen durch intensive Hellfeld- oder DIC-Beleuchtung ausgeschlossen werden konnten. Eine maximale Aufnahmekapazität der Zellen gegenüber den Zielobjekten konnte dabei ebenfalls nicht festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen anderer Gruppen, z. B. von Kodali und Kollegen [88]. Um die Beschädigung der Zellen durch den Fallenlaser zu minimieren, wurde eine Laserwellenlänge im infraroten Bereich mit geringer biologisch schädlicher Wirkung gewählt [103]. Des Weiteren wurde die Falle nach erfolgtem Partikel-Zellkontakt und initiiertem Phagozytose umgehend abgeschaltet. Der Einfluss des Lasers auf das natürliche Zellverhalten wird somit als vernachlässigbar gering abgeschätzt. Das Verhalten der betrachteten Zellen auf einem Untergrund mit geringerer Steifigkeit als Deckgläser, welcher somit auch besser der natürlichen Umgebung der Zellen angepasst wäre, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Da es sich aber um eine kultivierte Zelllinie und nicht um Primärzellen handelt, konnte bereits eine gewisse Gewöhnung der Makrophagen an das adhärenente Zellwachstum auf steifem Untergrund stattfinden.

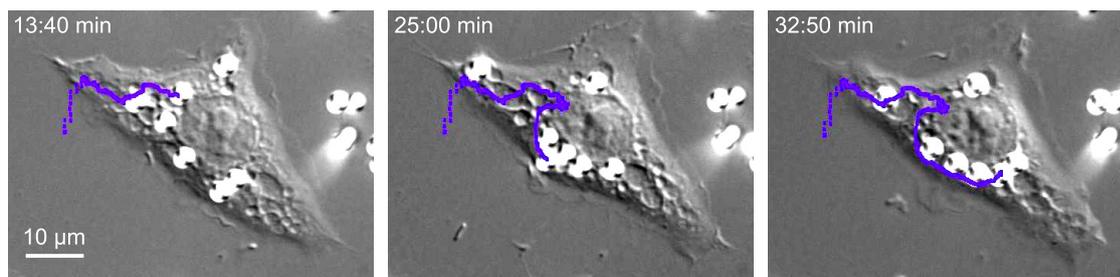


Abbildung 9.2. Veranschaulichung der perinuklearen Region. Zur Analyse der Daten wurde ein Toleranzbereich entlang der Nucleusaußenseite eingeführt, bezeichnet als perinukleare Region, innerhalb derer sich die Partikel nach Erreichen des Nucleus bewegen konnten, ohne dass der dabei auftretende zentrifugale Transport als starker zentrifugaler Transport charakterisiert wurde. Die in der Abbildung dargestellte Makrophage zeigt, dass nach erfolgreicher Internalisierung eines Fremdobjektes und phagosomalem Transport zum Nucleus (violette Trajektorie) die perinukleare Region zur Umverteilung der phagozytierten Objekte entlang der Nucleusaußenseite genutzt werden konnte. Dabei kam es zum Verlassen der Nucleusmembran durch das gekennzeichnete Phagosom um einen Phagosomendurchmesser und anschließender Wiederherstellung des Partikel-Nucleuskontaktes. Ein starker zentrifugaler Transport trat dabei nicht auf.

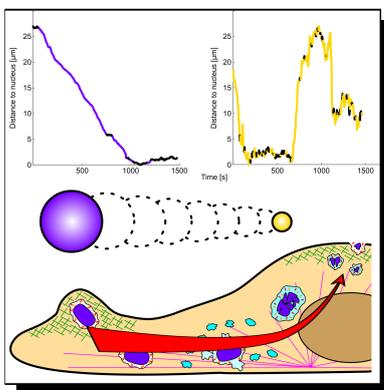
9.6 Diskussion der eingeführten Analyseparameter

Während der Analyse der aufgenommenen Zeitserien des phagosomalen Transportes in Abhängigkeit der Größe des Zielobjektes wurden diverse Schwellwerte festgelegt, welche zur Definition der betrachteten Transportcharakteristika unerlässlich waren. Kritische Schwellwerte waren dabei die Geschwindigkeit zur Differenzierung zwischen aktiven Transportphasen und passiven Phasen von 800 nm min^{-1} , der wiedererlangte Mindestabstand zwischen Nucleusmembran und Phagosom zur Bestimmung von starkem zentrifugalem Transport und die damit verbundene zusätzlich analysierte Phagozytosedauer bei Trajektorien mit auftretendem starkem zentrifugalem Transport. Um den Einfluss dieser Parameter auf die Analyse und die daraus resultierenden Ergebnisse zu untersuchen, wurden essentielle Transportcharakteristika unter Variation der kritischen Schwellwerte erneut bestimmt und mit den bereits bestehenden Ergebnissen verglichen (siehe Abb. 7.17 & 7.16). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit zur Differenzierung zwischen aktiven Transportphasen und passiven Phasen keinen Einfluss auf das Verhältnis der Transportcharakteristika zwischen großen und kleinen Phagosomen besaß. Gleiches galt für die Definition der perinuklearen Region und somit den Mindestabstand zum Nucleus, welchen ein Phagosom aufgrund zentrifugaler Bewegung nach Erreichen der perinuklearen Region erreichen musste, dass die zugehörige Trajektorie als starken zentrifugalen Transport aufweisend gezählt wurde. Auch hier existierte keine Korrelation zwischen dem Verhältnis essentieller Transportcharakteristika und der Ausdehnung der perinuklearen Region. Lediglich die Gesamtanzahl der Phagosomen mit starkem zentrifugalem Transport sank mit größer werdender perinuklearer Region, wobei hier die Gesamtausdehnung der Zellen sicherlich bereits eine Rolle spielte und nur ein endlich großer Abstand zum Nucleus bei endlicher Zellausdehnung von den Phagosomen realisiert werden konnte. Dass eine generelle Definition einer perinuklearen Region sinnvoll und notwendig war, wird in Abb 9.2 deutlich. Hier ist zu erkennen, dass $3 \mu\text{m}$ große Phagosomen nach Erreichen der Nucleusmembran einen Positionswechsel entlang der Nucleusaußenseite durchführen. Um anderen Phagosomen am Zellkern auszuweichen, verlassen die Phagosomen den Nucleus um einen Phagosomendurchmesser wieder und kehren anschließend zurück, wobei jedoch kein starker zentrifugaler Transport auftritt. Die Einführung einer Toleranzregion entlang

der Zellkernaufseite war somit unerlässlich und die Ausdehnung dieser Region sollte dabei mindestens dem Durchmesser eines Phagosomes betragen. Dieser Toleranzbereich entsprach im Weiteren in guter Näherung der perinuklearen Region. Eine alternative Einführung der perinuklearen Region, ebenfalls mit einem Abstand von 4-5 μm findet sich in der Quelle [65]. Die für Trajektorien mit starkem zentrifugalen Transport zusätzlich analysierte Zeitspanne der Phagosomenbewegung zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf das Verhältnis repräsentativer Transportcharakteristika großer und kleiner Phagosomen. Einzige Ausnahme war dabei der komplette Wegfall einer zusätzlichen Zeitspanne für den Phagosomentransport, da hier die Verweildauer von kleinen Phagosomen vor einem potenziellen Rücktransport vom Zellkern in Richtung der Zellperipherie ignoriert wurde. Da diese Verweildauer des Phagosomes am Nukleus potenzieller Bestandteil der Phagosomenreifung ist, wie in Abschnitt 10.5 diskutiert, wurde für die generelle Auswertung der in dieser Arbeit vorgestellten Daten eine minimale zusätzlich analysierte Zeitspanne angenommen und der Sonderfall von $t = 0$ min vernachlässigt.

Zusammenfassend konnte dabei gezeigt werden, dass keiner der kritischen Parameter einen essentiellen Einfluss auf die Verhältnisse repräsentativer Transportcharakteristika zwischen 3 μm und 1 μm Phagosomen hatte. Daraus ergibt sich qualitativ die Unabhängigkeit der Transportcharakteristika von den eingeführten und verwendeten Parametern und eine universelle Gültigkeit der Transporteigenschaften für den Transport von 1 μm , 2 μm & 3 μm Phagosomen in J774-Mausmakrophagen.

Größenabhängiger phagosomaler Transport



Dieses Kapitel dient der Interpretation der in der vorliegenden Dissertation beschriebenen, experimentellen Beobachtungen. Die Interpretation gibt einen Überblick über die Resultate bezüglich den größenabhängigen, phagosomalen Transporteigenschaften und erklärt ihre potenziellen Ursachen. Weiterhin erfolgt eine Einordnung der Resultate und Aussagen in den globalen, zellulären Zusammenhang unter Berücksichtigung möglicher weiterer Faktoren mit Einfluss auf die Abhängigkeit der Transporteigenschaften vom Phagosomendurchmesser. Abschließend folgt die Erstellung einer finalen Hypothese bezüglich der

biologischen Relevanz der untersuchten Größenabhängigkeit inklusive ihrer Schlussfolgerungen für weitere experimentelle Untersuchungen und die praktische Anwendung diverser Transporteigenschaften basierend auf den Ausmaßen des Zielobjektes.

10.1. Diskussion des Transportverhaltens	156
10.2. Diskussion beteiligter Filamente und Motoren	157
10.3. Diskussion der intrazellulären Filamentanordnung und Motorenverteilung	161
10.4. Diskussion des Einflusses der Phagosomenposition	166
10.5. Diskussion besonderer Transportcharakteristika	166
10.6. Zusammenfassung	168
10.7. Anwendungen und weiterführende Projekte	169

10.1 Diskussion des Transportverhaltens

Einleitung Basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten zur Phagozytose von IgG opsonierten Zielobjekten im Größenbereich von 1 bis 3 μm durch Säugetiermakrophagen konnte gezeigt werden, dass der phagosomale Transport in Makrophagen sehr stark von der Größe des Phagosomes abhängig ist (siehe Abb. 7.11, 7.13, 7.15). Dies gilt sowohl für qualitative als auch für quantitative Aspekte des Transportes. Die intrazelluläre Bewegung großer Phagosomen mit 3 μm Durchmesser war durch Transport mit höchster Persistenz und größter effektiver Geschwindigkeit von der Zellperipherie in die perinukleare Region dominiert verglichen mit den anderen Phagosomengrößen. In Kombination mit dem größten Anteil an aktiven Transportphasen in Richtung Nukleus und geringstem Anteil aktiver Transportphasen in Richtung Zellperipherie sowie einem vernachlässigbaren Anteil an Trajektorien mit starkem zentrifugalen Transport nach Erreichen der perinuklearen Region resultierte dies in der höchsten Effizienz des phagosomalen Transportes. Intermediäre Phagosomen zeigten eine reduzierte Transportpersistenz und eine geringere effektive Geschwindigkeit gegenüber den 3 μm Phagosomen. Die Ursache dafür war der höchste gemessene Anteil an passiven Transportphasen während der Phagosomenbewegung von der Peripherie zum Zellkern. Diese häufigen Unterbrechungen verursachten eine Reduktion der Transporteffizienz bei 2 μm Phagosomen. Nach dem Erreichen der perinuklearen Region kam es nur bei einem kleinen Anteil aller Phagosomen zu einem Verlassen dieser Region und dadurch zu starkem zentrifugalen Transport. Dieser wohldefinierte Endpunkt des phagosomalen Transportes, wie er bei 2 & 3 μm Phagosomen gefunden wurde, verschwand bei kleinen Phagosomen, welche in einem Großteil der Messungen starken zentrifugalen Transport aufwiesen. Dies galt auch für Beobachtungsdauern weit über die typische Zeitskala des phagosomalen Transportes hinaus, mit Messzeiten von bis zu 24 h. Des Weiteren war das generelle Transportverhalten 1 μm großer Phagosomen charakterisiert durch die geringste Persistenz und die niedrigste effektive Geschwindigkeit. Für kleine Phagosomen resultierte daraus die geringste gemessene Transporteffizienz. Weiterhin verursachten der höchste Anteil an zentrifugalen Transportphasen in Kombination mit dem zweithöchsten Anteil an aktiven, zentripetalen Transportphasen häufige Richtungswechsel des Transportes und starke Fluktuationen während der Bewegung.

Trotz hohem Anteil zentrifugaler Transportphasen und starkem zentrifugalen Transport der kleinen Phagosomen verglichen mit sehr persistentem Transport bei großen Phagosomen erreichten mehr als $\frac{4}{5}$ aller internalisierten Zielobjekte, unabhängig ihrer Größe die perinukleare Region (siehe Abb. 7.12). Außerdem zeigten alle Phagosomen auf kurzen Zeitskalen vergleichbare instantane Geschwindigkeiten, was auf identische Transportprozesse auf diesen Zeitskalen hindeutet, wie es bei motorbasiertem intrazellulären Transport der Fall ist (siehe Abb. 7.13 C).

Diskussion physikalischer Faktoren. Als mögliche Ursache für die Einflussnahme der Phagosomengröße auf das intrazelluläre phagosomale Transportverhalten kamen, neben komplexen, bisweilen weitgehend unbekanntem größenabhängigen biochemischen Signalkaskaden, auch einfache physikalische Faktoren in Frage. Potenzielle Faktoren, basierend auf physikalischen Eigenschaften der Zielobjekte könnten zum Beispiel die zelluläre Spannung durch den Aktinkortex, welche sich auf das Phagosom auswirkt oder vom Phagosomendurchmesser abhängige, variierende Stokes-Reibung innerhalb der Zellen seien. Das kortikale Aktinnetzwerk befindet sich direkt unterhalb der Plasmamembran und gibt in Kombination mit AF basierten Motoren der Zelle die Möglichkeit zur Erzeugung kortikaler Spannungen [68,136]. Entsprechend der Zellgeometrie mit einer großen Höhenausdehnung

in der perinuklearen Region und geringer Höhenausdehnung in der Zellperipherie würde eine stärkere Interaktion zwischen Phagosom und Aktinkortex in der Peripherie erwartet werden. Der Einfluss der Kortextspannung, welche den Transport des Fremdkörpers in Richtung Nukleus unterstützt, nimmt zu, je weniger Raum dem Phagosom innerhalb des kortikalen Netzwerkes zur Verfügung steht. Daraus resultiert eine erhöhte Transportgeschwindigkeit und Persistenz für ein Phagosom, wenn es sich in der Zellperipherie befindet (großer Abstand zum Nukleus) sowie ein Anstieg dieses Effektes mit zunehmender Phagosomengröße. Wie aus den Abbildungen 7.18 und 7.19 hervorgeht, konnte dies für die beobachteten Phagosomen nicht verifiziert werden. Da sich im Rahmen der Standardabweichungen kein Einfluss des Abstandes zwischen Phagosom und Nukleus auf die analysierten Transporteigenschaften ergab, konnte der Einfluss der Aktinkortextspannung als Ursache für größenabhängigen phagosomalen Transport weitestgehend ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ergab sich bei der Betrachtung der Abstandsabhängigkeit innerhalb der Standardabweichung des Mittelwertes (Abb. 7.18) ein größerer Einfluss des Abstandes zwischen Phagosom und Nukleus auf die Transporteigenschaften von 1 μm Partikeln, was der oben genannten Hypothese explizit widerspricht.

Aufgrund des natürlichen Aufbaus einer Säugetierzelle mit einer Vielzahl an Makromolekülen und membranumschlossenen Organellen innerhalb des Zytoplasmas, welche einen weiten Größenbereich abdecken, ist ein nicht unerheblicher Einfluss dieses dichten zellulären Fluides auf die Transporteigenschaften der Phagosomen zu erwarten [136, 137]. Dieser kann mit Hilfe der Stokes-Reibung ($F_{\text{Stokes}} = 6\pi R\eta v$) charakterisiert werden, welche einer Abschätzung des viskosen Widerstandes dient. Dabei beschreibt η die Viskosität des Fluides, welche innerhalb der Zellen für alle Phagosomen identisch ist, und für Zytoplasma in etwa dem 100-fachen Wert von Wasser entspricht und v der Geschwindigkeit des betrachteten Objektes. Da die Geschwindigkeit der beobachteten Phagosomen auf kurzen Zeitskalen identisch war, ist eine Zunahme des viskosen Widerstandes mit steigendem Phagosomendurchmesser R gegeben. Die Beobachtungen in den vorliegenden Experimenten zeigten aber eine deutliche Verbesserung der Transporteffizienz mit größer werdendem Phagosomendurchmesser, trotz erhöhtem viskosen Widerstand, womit die Stokes-Reibung als Ursache für die vorliegenden größenabhängigen Transporteigenschaften ausgeschlossen werden kann.

10.2 Diskussion beteiligter Filamente und Motoren

Mikrotubuli. Da auf kortikalen Spannungen oder viskoser Reibung basierende Ursachen für die Phagosomendurchmesser bedingte Diversität der Transporteigenschaften ausgeschlossen werden konnten, wurden intrazelluläre Filamentstrukturen und die auf ihnen basierenden Motorproteine als mögliche Grundlage für die größenabhängigen Unterschiede detailliert betrachtet. Da für die generelle, langreichweitige Bewegung von Phagosomen innerhalb von Zellen Mikrotubuli-basierter Transport eine wesentliche Rolle spielt, wurde zunächst das intrazelluläre MT-Netzwerk mittels Nocodazol depolymerisiert [10, 54, 61, 62, 65]. Ähnlich der Beobachtungen von Blocker u.a. konnten hier keine quantitativen Messungen des phagosomalen Transportes in Zellen nach ihrer Behandlung mit Nocodazol durchgeführt werden, da sich die Zellmorphologie zu stark änderte [38]. Analog zu ihrer Feststellung, dass Phagosomen in Nocodazol behandelten NRK-Zellen (Nierenzellen der Wanderratte) zufällig im Zytoplasma oder in der Zellperipherie verteilt und nicht konzentriert in der perinuklearen Region vorliegen, konnte auch in den hier vorgestellten Experimenten beobachtet werden, dass die internalisierten Zielobjekte zufällig in den Zellen verteilt waren (siehe Abb. 8.1). Sie zeigten keine Akkumulation in der Nähe des Nukleus, wie dies für 3 μm große Phagosomen nach ausreichender Phagozytosedauer in unbehandelten Zellen

der Fall war. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass ein intrazellulärer Transport ohne MT nicht in dem Umfang möglich ist, wie er in natürlichen Mausmakrophagen beobachtet wurde. Weiterhin konnte Bridgman zeigen, dass der Transport von Organellen in Nocodazol behandelten SCG-Zellen (Zellen des Halsganglions) nicht völlig zum Erliegen kommt, sondern durch AF-basierte Mobilität mit geringerer Geschwindigkeit aufrecht erhalten wird [64].

MT-assoziierte Motoren. Um den Einfluss MT-basierter Mobilität auf das phagosomale Transportverhalten besser untersuchen zu können, wurde statt der Depolymerisation der MT mittels Nocodazol das Motorprotein Dynein mittels Ciliobrevin A in den Makrophagen inhibiert. Dynein ist ein MT-basiertes Motorprotein, welches für den zentripetalen Transport innerhalb der Zellen verantwortlich ist und somit einen wesentlichen Anteil an dem phagosomalen Transport von der Peripherie zur perinuklearen Region trägt [10, 54, 55, 62, 65]. Es konnte gezeigt werden, dass der phagosomale Transport bei verminderter Aktivität von Dynein Motoren eine deutlich geringere Transporteffizienz aufwies, welche sich unter anderem durch einen Anstieg an passiven Transportphasen in Kombination mit einem Abfall aktiver zentripetaler Transportphasen sowie einer Reduzierung der Geschwindigkeit der Phagosomenbewegung äußerte (siehe Abb. 8.2 & 8.3). Unabhängig der Phagosomengröße zeigte die effektive Geschwindigkeit einen deutlichen Abfall, während der Prozentsatz ausgedehnter Pausenphasen erhöht war. Der Einfluss der Dynein-Inhibierung war grundlegend am größten auf den effektiven persistenten Transport großer Phagosomen im Vergleich zum Einfluss auf den Transport von Phagosomen mit geringerem Durchmesser. Durch die Zugabe von Ciliobrevin A erreichten nur noch 40 % der internalisierten Phagosomen mit 3 μm Durchmesser die perinukleare Region im Vergleich zu mehr als 85 % aller Phagosomen mit kleinem oder intermediärem Durchmesser. Weiterhin stieg der Anteil an passiven Phasen bei großen Phagosomen um mehr als 50 %, während der Anteil an aktiven zentripetalen Transportphasen um mehr als 50 % abfiel. Im Vergleich dazu erhöhten sich die passiven Phasen bei kleinen Phagosomen um circa 20 % und die aktiven zentripetalen Phasen sanken um 25 %. Auch die instantane Geschwindigkeit war bei kleinen Phagosomen nicht signifikant verändert. Dass die Geschwindigkeit des Transportes auf kurzen Zeitskalen für kleine Phagosomen nahezu unverändert ist, während sie sich für große Phagosomen stark verlangsamt, deutet darauf hin, dass für kleine Phagosomen weitere Motorproteine eine essentielle Rolle bei deren Transport spielen, während die Dynein Motoren eine dominierende Rolle für den Transport großer Phagosomen tragen.

Zusammenfassend deuteten die oben genannter Beobachtungen auf einen generellen Einfluss MT-basierter Mobilität auf den phagosomalen Transport hin, wobei bei kleineren Phagosomen weitere Motoren und Filamente zunehmend involviert zu sein scheinen. Da die Dynein Motoren essentiell für den Transport großer Phagosomen sind, ist auch eine entsprechende Beteiligung von Kinesin Motoren an dem Transport von 3 μm Phagosomen zu erwarten. Da diese jedoch primär für den Transport von der perinuklearen Region in Richtung der Zellperipherie verantwortlich sind, spielen sie für eine hohe Transporteffizienz in Richtung des Nukleus nur eine untergeordnete Rolle, weswegen hier auf Experimente in Zellen mit inhibierten Kinesin Motoren verzichtet wurde [10]. Dass Kinesin dennoch einen gewissen Einfluss auf den phagosomalen Transport hat, deutet sich aber bereits in den Experimenten unter Zugabe von Ciliobrevin A zu den Zellen an. Der Anteil an aktiven zentrifugalen Transportphasen war innerhalb der Zellen ohne aktive Dynein Motoren nahezu unverändert. Intermediäre Phagosomen zeigten dafür in mehr als 80 % dieser Zellen einen starken zentrifugalen Transport nach Erreichen der perinuklearen Region (siehe Abb.

8.3B). Neben dem zentripetalen Transport scheinen Dynein Motoren ebenfalls eine wichtige Rolle für einen wohldefinierten Endpunkt des phagosomalen Transportes intermediärer Phagosomen einzunehmen.

Aktinfilamente Wie bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert wurde, ist für den Transport kleiner Phagosomen nicht MT-basierte Mobilität der dominante Mechanismus. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die Zusammenhänge zwischen AF-basiertem Transport und den größenabhängigen, phagosomalen Transporteigenschaften untersucht. Der AF-basierte Transport spielt dabei vor allem bei kurzen Distanzen und in Regionen mit geringer MT-Dichte eine wesentliche Rolle [10,54,55,64]. Dabei kann AF-basierte Mobilität auf mehrere Arten mit dem phagosomalen Transport gekoppelt sein. Neben einer direkten aktiven Beteiligung durch AF-assoziierte Myosin V Motoren besteht zum Beispiel auch die Möglichkeit, dass der retrograde Aktinfluss von der Zellperipherie in Richtung perinuklearer Region den Transport der Phagosomen beeinflusst. Die gemessenen Transportgeschwindigkeiten der Phagosomen zwischen 30 und 40 nm s⁻¹ (1,9 bis 2,5 µm min⁻¹) entsprechen den gemessenen Geschwindigkeiten von Aktin innerhalb des retrograden Flusses [138,139]. Zu beachten ist dabei allerdings, dass der retrograde Fluss vor allem zwischen der führenden Zellmembrankante während der Migration und dem Zellzentrum auftritt und die Geschwindigkeiten von Aktin von ~ 25 nm s⁻¹ in den Lamellipodien der Zellen gemessen wurden und im Zellkörper die Aktingeschwindigkeit auf circa 2 nm s⁻¹ reduziert war [139]. Dennoch wurden die Experimente zur Charakterisierung der größenabhängigen, phagosomalen Transporteigenschaften in Zellen ohne AF wiederholt. Dabei wurde die Polymerisation der AF mittels Zugabe von Cytochalasin D unterbunden. Es konnte gezeigt werden, dass AF-basierte Mobilität eine Rolle für den Transport der Phagosomen aller Größen spielt, da es durch den Wegfall der AF zu einem generellen Anstieg an passiven Transportphasen in Kombination mit einer Reduzierung der instantanen Geschwindigkeiten kam. Dabei hatte das Cytochalasin D einen stärkeren Einfluss auf den Transport kleiner Phagosomen, während die AF-basierte Bewegung nicht der dominierende Mechanismus für den Transport großer Phagosomen gewesen ist. Dies wurde besonders deutlich an einer Reduzierung der instantanen Geschwindigkeiten in Zellen ohne AF um knapp 50 % verglichen mit circa 20 % Verlangsamung bei größeren Phagosomen (siehe Abb. 8.6). Da der grundlegende phagosomale Transport aber auch in Zellen ohne AF nicht zum Erliegen kam und der Einfluss AF-basierter Mobilität auf kleine Phagosomen deutlich größer war als auf große Phagosomen, konnte eine Kopplung der Phagosomen an den retrograden Fluss als Ursache für die beobachteten Transporteigenschaften ausgeschlossen werden. Ein Zusammenhang zwischen den Transporteigenschaften und intrazellulärer Polymerisationskräfte der Aktinfilamente konnte aus denselben Gründen als nicht gegeben angenommen werden [117].

AF-assoziierte Motoren. Um den Zusammenhang mit AF-assoziiertem Transport und der Bewegung kleiner Phagosomen detaillierter beschreiben zu können, wurde auch für die AF-basierte Mobilität die Aktivität eines der wichtigsten Motorproteine für den Organellentransport, das Myosin V, unterbunden [62]. Die Experimente zur Charakterisierung größenabhängiger Transporteigenschaften wurden in Makrophagen unter Zugabe von MyoVin-1, einem Inhibitor von Myosin V, wiederholt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der generelle, phagosomale Transport durch eine geringere Effizienz, unabhängig der Phagosomengröße gekennzeichnet war. Anders als von Al-Haddad u.a. (Messung einer zweimal schnelleren Akkumulation von 1 µm Partikeln in der perinuklearen Region in Zellen ohne Myosin V Motoren) beobachtet, kam es hier zu einer Verlangsamung der Transportes

von der Zellperipherie in Richtung des Nukleus aufgrund häufiger Unterbrechungen des Transportes und einem Anstieg der kurzreichweitigen Fluktuationen während der Bewegung [54, 65]. Für alle drei betrachteten Phagosomendurchmesser, 1 μm , 2 μm & 3 μm , stieg der Anteil an passiven Phasen auf mehr als 50 %, während der Anteil an aktiven, zentripetalen Transportphasen auf weniger als 40 % fiel (siehe Abb. 8.8). Zusätzlich sank die instantane Geschwindigkeit auf unter 2 $\mu\text{m min}^{-1}$, die effektive Geschwindigkeit wurde auf maximal 1 $\mu\text{m min}^{-1}$ reduziert und die Anteile ausgedehnter Pausenphasen stiegen auf mehr als 60 %. Diese generelle, größenunabhängige Verlangsamung des Transportes und die Reduzierung seiner Effektivität zeigt, dass Myosin V grundlegend den phagosomalen Transport unterstützt zum Beispiel durch zusätzliche Kraftauswirkung auf das Zielobjekt oder als Unterstützung beim Ausweichen von Hindernissen [10, 71, 72, 74].

Ein großes Problem bei den Experimenten mit MyoVin-1 war, dass die Motorproteine nicht aus den Zellen verschwanden, sondern nur der Bewegungsapparat inaktiviert wurde. Somit konnte Myosin eine Ankerfunktion zwischen zu transportierenden Phagosomen und vorhandenem AF-Netzwerk einnehmen [70]. Im Vergleich dazu wurde das AF-Netzwerk bei Experimenten mit Cytochalasin D depolymerisiert und vorhandene Myosin V Motoren hatten keine Möglichkeit mit AF zu interagieren. Eine weitere Aufgabe der Myosin V Motoren neben der Hilfestellung bei Ausweichmanövern ist womöglich die Unterstützung der MT-assoziierten Motorproteine auf der Phagosomenoberfläche bei dem Auffinden von MT und dem Überwinden von MT-armen Regionen, vor allem in der Zellperipherie [54, 63, 64, 71, 74]. Dieser Aspekt wurde auch durch das verstärkte Auftreten von Fluktuationen während des Transportes ohne Myosin V sowie den häufigen Unterbrechungen unterstützt (siehe Abb. 8.7).

Hinsichtlich der Persistenz der Phagosomenbewegungen waren allerdings keine starken Veränderungen messbar zwischen MyoVin-1 behandelten und unbehandelten Zellen, da die Persistenz nur die Wahrscheinlichkeit für einen Transportschritt in die gleiche oder entgegengesetzte Richtung zwischen zwei Zeitschritten angibt, nicht aber geringfügige Wechsel in der Transportrichtung erfasst. Zur Optimierung der Analyse der Transportpersistenz von Phagosomen wäre hier eine erweiterte Definition der Persistenz als Orientierungswinkel zwischen allen Tripeln aufeinanderfolgender Punkte entlang der Trajektorie, wie von Gal und Kollegen vorgeschlagen, möglich [140].

Der Wegfall der motorisierten intrazellulären Unterstützung bei Ausweichvorgängen und Suchprozessen zeigte sich deutlich durch den stärksten Anstieg an passiven Phasen und dem stärksten Abfall an aktiven zentripetalen Phasen von jeweils fast 40 % bei dem Transport von 3 μm großen Phagosomen. Während der auch in unbehandelten Zellen vor allem durch Pausen und Unterbrechungen gekennzeichnete Transport intermediärer Phagosomen in MyoVin-1 behandelten Zellen die geringsten Veränderungen zeigte, war der Wegfall von Myosin V Motoren bei der Bewegung kleiner Phagosomen deutlich realisierbarer, insbesondere die Reduktion des Anteils an Phagosomen, die nach Erreichen der perinuklearen Region diese wieder verließen auf 20 %. Somit zeigten nahezu alle Phagosomen in Zellen ohne aktive Myosin V Motoren einen wohldefinierten Endpunkt ihres Transportes in der Nähe des Nukleus. Außerdem schien im Zusammenhang mit diesem starken zentrifugalen Transport Myosin V eine wesentliche Rolle als treibende Kraft, Dynein hingegen als Anker der Phagosomen in der perinuklearen Region zu spielen. Aufgrund der ebenfalls starken Veränderungen bezüglich der Transportphasenverteilung bei 1 μm Phagosomen und den Ergebnissen der Messungen des phagosomalen Transportverhaltens in Zellen ohne AF, schien Myosin V bei dem Transport kleiner Phagosomen einen wesentlichen Anteil als Transportunterstützer und Kraftinitiator auf das Phagosom zu haben. Aufgrund ihres geringeren Durchmessers beziehungsweise Volumens ist das Scheitern von kleinen Phago-

men an intrazellulären Hindernissen unwahrscheinlicher als bei 2 μm großen Phagosomen, da ihnen mehr Platz zum Ausweichen zur Verfügung steht und sie weniger Freiraum benötigen um eine Kreuzung oder eine Blockade zu passieren. Das bedeutet, dass bei 1 μm Phagosomen die Funktion zum Ausweichen von Barrikaden oder Überbrücken von Kreuzungen mittels Myosin V im Vergleich zu intermediären und großen Phagosomen weniger notwendig zu sein scheint.

Der generelle, phagosomale Transport kam in Zellen ohne aktive Myosin V Motoren allerdings nicht zum Erliegen, denn mehr als 75 % der internalisierten Zielobjekte erreichten die perinukleare Region (siehe Abb. 8.8). Das bedeutet, dass Myosin V der Unterstützung des Transportes dient aber nicht der alleinigen Realisierung der intrazellulären Organellenbewegung. Abschließend konnte gezeigt werden, dass sich unabhängig der Phagosomengröße der Anteil an aktiven zentrifugalen Transportphasen um weniger als 5 % ändert, was auch für die Ciliobrevin A behandelten Zellen der Fall ist und somit ein deutliches Indiz dafür ist, dass dieser Anteil an Transportphasen hauptsächlich durch Kinesin Motoren verursacht werden könnte.

Zusammenfassung der bisherigen Resultate. Aufgrund der Analyse des Transportes von Phagosomen diverser Größen konnte gezeigt werden, dass die Transporteffizienz mit steigendem Phagosomendurchmesser zunimmt, MT-assozierte Mobilität eine wichtige Rolle für den Transport großer und AF-basierte Bewegung eine wichtige Rolle für den Transport kleiner Phagosomen spielt sowie dass Myosin V zur Transportunterstützung aller Phagosomen dienlich ist.

10.3 Diskussion der intrazellulären Filamentanordnung und Motorenverteilung

Zur weiteren Analyse dieser beobachteten Zusammenhänge wurden in fixierten Zellen MT, Dynein, Kinesin, AF und Myosin V angefärbt und ihre Verteilung entlang der Außenseite von realen und hypothetischen Phagosomen quantifiziert. Dabei konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben bislang unbekanntem phagosomengrößenabhängigen biochemischen Signalkaskaden auch einfache architektonische intrazelluläre Merkmale einen größenabhängigen Einfluss auf den Transport von Phagosomen haben könnten. Primär relevantes Merkmal ist dabei die Symmetrie bzw. Asymmetrie in der Verteilung der betrachteten Strukturen bezüglich der perinuklearen Region oder auch der Kern-zugewandten Außenseite der Phagosomen und der gegenüberliegenden Seite, der Zellperipherie-zugewandten Außenseite.

Mikrotubuli & MT-assozierte Motoren bei realen Phagosomen. Bei der Betrachtung der MT und MT-assozierten Motoren ergab sich für alle Phagosomendurchmesser eine wesentlich höhere Dichte dieser Strukturen entlang der Nukleus-zugewandten Phagosomenoberfläche verglichen mit der Zellperipherie-zugewandten Phagosomenoberfläche. Diese Asymmetrie nahm mit steigender Phagosomengröße deutlich zu (siehe Abb. 8.10 und 8.11). (Einzige Ausnahme war hier die Verteilung der Kinesin Motoren bei kleinen und intermediären Phagosomen, was im weiteren Verlauf separat diskutiert wird.) Der Gradient (definiert als Fluoreszenz- bzw. Dichteunterschiede der betrachteten Strukturen, ΔI) zwischen Kern-zugewandter Phagosomenseite und gegenüberliegender Seite war beispielsweise für Dynein Motoren bei 3 μm Phagosomen nahezu doppelt so groß wie bei 1 μm Phagosomen. Die erhöhte Anzahl von MT und Dyneinen an der Kern-zugewandten Phagosomenseite verglichen mit der Peripherie-zugewandten Seite, welche mit steigendem

Phagosomendurchmesser zunimmt, ist insbesondere für die Dynein Motoren von außerordentlicher Relevanz. Rai und Kollegen konnten zeigen, dass Dyneine auf der Oberfläche isolierter Phagosomen Cluster bilden, welche für den Transport und die Reifung der Phagosomen von Bedeutung sind [78]. Dabei haben die Dyneine innerhalb der Cluster die Möglichkeit als Teams zu interagieren und große kollektive Kräfte zu generieren, was für Kinesin Motoren nicht beobachtet wurde [76,79]. Die Kräfte zeigen dabei eine lineare Verbesserung der Größe und Wirkungsdauer in Abhängigkeit von der Anzahl der Motoren [78]. Eine höhere Dichte von Dynein Motoren bedeutet somit eine größere Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Dynein-Clustern und kollektiven Kräften. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass die Dynein-Cluster entlang der Kern-zugewandten Seite bei großen Phagosomen aufgrund einer starken asymmetrischen Dynein-Verteilung entlang der Phagosomenoberfläche zur Entstehung großer kollektiver Kräfte entlang der Kern-zugewandten Seite führten, welche zum Minusende der MT und somit zur perinuklearen Region gerichtet waren. Diese Kräfte resultierten in einem persistenten, aktiven, zentripetalen Transport mit wenig Unterbrechungen oder Fluktuationen in der Transportrichtung. Die Dynein generierten Kräfte sind dabei den Kräften anderer Motoren überlegen. Diese Dominanz sinkt aufgrund abnehmender Strukturgradienten und somit abnehmender Clusterformation und kollektiver Dynein-Aktivität bei verringertem Phagosomenradius. Dadurch nimmt die Wahrscheinlichkeit der Einflussnahme anderer Motorproteine auf den Transport kleinerer Phagosomen zu. Ein weiterer Hinweis auf das Vorkommen großer (kollektiver) Kräfte bei großen Phagosomen ergab sich aus Messungen der Transportkräfte, welche auf das Phagosom ausgeübt wurden. Die Kraftmessungen führten Magdalena Haaf, Solange Hofbauer und Simon Wieland im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten in lebenden Zellen mittels magnetischer Pinzette durch. Dabei konnten für 3 μm Phagosomen Kräfte von (30 ± 11) pN und für 1 μm Phagosomen lediglich Kräfte von (7 ± 4) pN vorläufig gemessen werden [141–143].

Die Asymmetrie in der MT-Dichte an sich spielte dabei vor allem als Grundlage für die Motorproteine und Basis für die Krafterzeugung eine wichtige Rolle. Hendriks u.a. beobachtete, dass in Zellen aufgrund ihrer viskoelastischen Umgebung die Verweildauer von Transportobjekten in der Nähe der MT durch die Ausbildung von Bindungen zwischen Motoren und MT gefördert wurde [72]. Es ist zu erwarten, dass diese Ausbildung der Bindung durch mehr zur Verfügung stehende Filamente und Motoren sowie der Größe des Transportobjektes verstärkt wird. Eine höhere Dichte an MT bietet somit auch mehr Motorproteinen die Möglichkeit zur Interaktion und Kraftausübung, wodurch der Teambildungseffekt zur kollektiven Krafterzeugung bei Dynein Motoren zusätzlich unterstützt wird. Auch Kinesin Motoren können leichter Bindungen ausbilden, was allerdings keine verstärkten Kräfte durch interne Zusammenarbeit impliziert [78]). Generell wurde für beide MT-basierten Motorproteine, Dynein und Kinesin, eine ähnliche Verteilung der Motoren entlang der Phagosomenoberfläche gemessen, wobei der Unterschied einer hohen Dichte entlang der Kern-zugewandten Seite verglichen mit einer geringeren Anzahl an Proteinen entlang der Peripherie-zugewandten Außenseite bei 3 μm Phagosomen am ausgeprägtesten war. Dabei lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die intrazelluläre Verteilung der Motoren stark mit der im MTOC zentrierten Anordnung der MT korreliert. Die große Ähnlichkeit in der Gradientenverteilung von Dynein und Kinesin zeigt, wie essentiell die Clusterformation und Ausbildung kollektiver Kräfte seitens der Dyneine für die Persistenz und Effizienz des Transportes großer Phagosomen ist. Da der Dichtegradient der Strukturen stark von dem Phagosomendurchmesser abhängt, folgt auch eine starke Abhängigkeit der Transporteffizienz von der Phagosomengröße, wie sie beobachtet wurde. Die geringere Clusterbildung der Kinesin Motoren war auch qualitativ in den Fluoreszenzaufnahmen zu

beobachten.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Strukturen entlang der Außenseiten der Phagosomen vergleichbar war und nur die Kern-zugewandte Seite sowie die gegenüberliegende, der Peripherie-zugewandten, Seite eine Rolle spielten und keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Bereichen der Außenseiten dazwischen auftraten. Ob Unterschiede zwischen der Zellboden-zugewandten und Zelldecke-zugewandten Phagosomenhälfte bestehen, konnte im Rahmen der hier vorgestellten Experimente nicht untersucht werden. Aufgrund der intrazellulären MT-Anordnung liegt die Vermutung aber nahe, dass Differenzen vorhanden sind, welche eine Rotation der Phagosomen bewirken könnten [75]. Interessanterweise lag das Maximum der MT-Strukturen bei 2 μm Phagosomen nicht an der Kern-zugewandten Phagosomenseite, wie dies für 1 μm und 3 μm beobachtet wurde, sondern an den Phagosomenaußenseiten dazwischen, zwischen Kern- und Peripherie-zugewandter Seite. Da die MT die Basis für die Motoren zur Kraftausübung bilden, könnten diese MT-Maxima häufige Kräfte seitlich an den Phagosomen zur Folge haben. Dieser Sachverhalt könnte eine potenzielle, teilweise Erklärung für die vermehrte Häufigkeit passiver Phasen und ausgedehnter Pausen bei dem Transport der intermediären Phagosomen liefern.

Eine weitere Besonderheit ist, dass die Verteilung der Kinesin Motoren entlang der Oberfläche realer Phagosomen als einzige Ausnahme einen dezent stärkeren Gradienten bei kleinen Phagosomen als bei intermediären Phagosomen aufwies. Kombiniert mit der geringen kollektiven Dynein-Aktivität bei 1 μm Phagosomen folgt daraus eine erhöhte Wahrscheinlichkeit Kinesin basierter, zentrifugaler Transportphasen, wie sie beobachtet wurde.

Mikrotubuli & MT-assoziierte Motoren bei hypothetischen Phagosomen. Um die generelle Verteilung der MT, Dyneine und Kinesine innerhalb der Makrophagen und die Einflussnahme der Internalisierung von Fremdkörpern auf diese Strukturen zu diskutieren, wurden hypothetische, nachträglich digital eingefügte Phagosomen innerhalb von Zellen ohne tatsächlichen Phagosomen analysiert (siehe Abb. 8.10 und 8.11). Dabei zeigte sich entlang der Außenseite dieser hypothetischen Phagosomen ebenfalls eine Gradientenbildung der analysierten Strukturen mit einer hohen Dichte entlang der Nukleus-zugewandten Phagosomenseite und einer geringen Dichte entlang der Peripherie-zugewandten Seite. Dieser Gradient nahm mit steigendem Phagosomendurchmesser zu und war somit eine Eigenschaft aller Makrophagen unabhängig von intrazellulären Veränderungen durch den Transport von Phagosomen. Die Internalisierung von Fremdobjekten verstärkte den generellen, größenabhängigen Gradienten der MT, wobei der MT-Gradient durch 1 μm Phagosomen reduziert und der MT-Gradient durch 3 μm Phagosomen erhöht wurde. Dies unterstützt ebenfalls die Clusterbildung und kollektive Kraftausübung der Dynein Motoren zur Erzeugung einer hohen Transporteffizienz bei großen Phagosomen. Eine maximale Anzahl an MT-Strukturen entlang der Außenseiten von intermediären Phagosomen (zwischen Nukleus- und Peripherie-zugewandter Seite) konnte für hypothetische Phagosomen nicht beobachtet werden und war somit ein Resultat der Aufnahme und des Transportes von 2 μm großen Zielobjekten.

Für Dynein und Kinesin Motoren war der Gradient entlang hypothetischer Phagosomen kleiner als bei realen Phagosomen. Im Falle von Kinesin verschwand der Gradient gänzlich auf weniger als 5%. Dabei nahm auch hier die Asymmetrie zwischen Zellkern- und Peripherie-zugewandter Seite mit steigendem Phagosomendurchmesser zu. Die Internalisierung von Zielobjekten und der Transport von Phagosomen führte innerhalb der Zellen zu einer Steigerung der Asymmetrie bezüglich der MT-assoziierten Motorproteine, mit der Besonderheit, dass der Kinesin-Gradient kleiner Phagosomen den Kinesin-Gradient inter-

mediärer Phagosomen überbot. Ob diese Veränderung, zumeist Verstärkung der intrazellulären Strukturgradienten zugunsten der Nukleus-zugewandten Phagosomenseite durch Verdrängung und vor-sich-her Schieben der MT und den assoziierten Motoren beim Transport oder durch gezielte und regulierte Umverteilung der Strukturen stattfand, konnte dabei nicht geklärt werden. Die großen Abmessungen der Zielobjekte (1-3 μm) im Vergleich zu den Abmessungen der Zellen (10-30 μm , Abschätzung anhand der akquirierten DIC Bilder) lassen die Vermutung zu, dass die Verdrängung und Verschiebung der MT und Motoren während des Transportes eine wesentliche Rolle spielte.

Aktinfilamente & AF-assoziierte Motoren bei realen Phagosomen. Im Gegensatz zu den MT und den assoziierten Motoren zeigten AF und Myosin V Motoren eine relativ homogene Verteilung entlang der Phagosomenoberfläche. Betrachtet man die AF Verteilung entlang der Außenseite realer Phagosomen, zeigt sich eine dezent höhere Dichte an AF entlang der Peripherie-zugewandten Phagosomenseite als auf der Nukleus-zugewandten Seite. Dieser, im Vergleich zur MT-Verteilung, inverse Gradient resultiert aus der hohen AF-Dichte im Bereich des Aktinkortex unterhalb der Zellmembran. Große und intermediäre Phagosomen zeigten relativ ähnliche Verteilungen der AF-Asymmetrie zugunsten der Zellperipherie, wohingegen diese Ungleichverteilung bei kleinen Phagosomen kaum ausgeprägt war (siehe Abb. 8.12). Die Verteilung der Myosin V Motoren entlang der realen Phagosomen zeigte ebenfalls nur eine geringe Ausbildung von Gradienten, welche keinem linearen Zusammenhang mit dem Phagosomendurchmesser folgte, wie dies bei Dynein Motoren der Fall war (siehe Abb. 8.13). Für kleine Phagosomen war die Dichte an Myosin V Motoren an der Kern-zugewandten Phagosomenseite am größten und an der gegenüberliegenden Seite am geringsten. Für intermediäre und große Phagosomen war das Maximum der Myosin V Motoren jedoch an den Bereichen der Phagosomenaußenseiten zwischen Kern- und Peripherie-zugewandter Seite. In Kombination mit der Verteilung der AF ergänzt dies die Vermutung aufgrund der MyoVin-1 Experimente, dass AF-basierte Mobilität und Myosin V bei größeren Phagosomen lediglich dem Ausweichen von Hindernissen und dem Überbrücken von Kreuzungen dient, wohingegen es bei kleinen Partikeln den Transport im Allgemeinen unterstützt.

Des Weiteren ist AF-basierte Mobilität vor allem in Regionen mit geringer MT-Dichte notwendig, um den Phagosomen das Suchen und die Anbindung an MT zu erleichtern [54,65]. Das Überbrücken solcher Regionen ist aufgrund ihrer endlichen Ausdehnung für Phagosomen mit größerem Durchmesser schneller möglich. Die Notwendigkeit einer homogenen oder einer zugunsten der Nukleus-zugewandten Seite asymmetrischen Verteilung von AF und assoziierten Motoren zum Auffinden von MT und zur Unterstützung des Transportes nimmt daher mit steigender Phagosomengröße ab. Auch der komplette Verlust des Kontaktes zwischen allen MT-assoziierten Motoren auf der Phagosomenoberfläche und den MT wird aufgrund der Anzahl an Motoren mit steigender Phagosomengröße unwahrscheinlicher. Eine langanhaltende Bindung zwischen Motoren und MT fördert ein effizientes und persistentes Transportverhalten und verringert die Notwendigkeit AF-basierter Mobilität zur generellen Unterstützung des Transportes. Nur das Ausweichen von intrazellulären Hindernissen kann ohne AF-assoziierte Motoren nicht gewährleistet werden. Analog zu den MT waren auch für die Verteilung der AF entlang realer Phagosomen keine Unterschiede zwischen den beiden Hälften der Phagosomen entlang der horizontalen Ebene festzustellen, was die Wahrscheinlichkeit für eine Vorzugsrichtung zum Ausweichen von Hindernissen bei 2 & 3 μm großen Phagosomen oder für die Transportunterstützung kleiner Phagosomen drastisch reduziert. Eine Analyse der Verteilung der Strukturen bezüglich der oberen und unteren Phagosomenhälften (bezüglich der Zellhöhe) wurde nicht durchgeführt, wird aber

aufgrund der kegelförmigen Zellmorphologie in z-Richtung und der dementsprechenden Anordnung des Aktinkortex erwartet, mit einer höheren AF-Dichte zugunsten der oberen Phagosomenhälfte.

Aktinfilamente & AF-assoziierte Motoren bei hypothetischen Phagosomen. Entsprechend der Kegelmorphologie und einer Integration der Fluoreszenz der AF-Strukturen in z-Richtung ergab sich für die AF-Verteilung entlang der Außenseiten hypothetischer Phagosomen ein geringerer Einfluss des Aktinkortex entlang der Zellperipherie [140]. Das bedeutet, dass der AF-Gradient zugunsten der Peripherie-zugewandten Phagosomenseite in Zellen ohne tatsächlich internalisierte Fremdkörper verschwand (siehe Abb. 8.12). Auch die Verteilung der Myosin V Motoren entlang nachträglich in unbeeinflusste Zellen eingefügter hypothetischer Phagosomen zeigte eine Asymmetrie mit mehr Motoren entlang der Kern-zugewandten Phagosomenseite im Vergleich zur gegenüberliegenden Seite (siehe Abb. 8.13). Dieser Gradient stieg für Myosin V sowie auch für AF mit zunehmendem Phagosomendurchmesser an. Das bedeutete, dass ähnlich wie bei MT und MT-assoziierten Motoren die Verteilung der Myosin V Motoren in Zellen ohne internalisierte Fremdkörper sehr stark mit der Verteilung der AF korreliert war. Es zeigte aber auch, dass die Internalisierung von Fremdkörpern zu einer Verschiebung oder einer Verdrängung der AF und assoziierten Motoren führte, vor allem bei 2 μm und 3 μm großen Phagosomen. Dabei kommt es nicht wie bei MT und assoziierten Motoren zu einem Aufstauen der Strukturen entlang der Nukleus-zugewandten Phagosomenseite, sondern eher einem Verdrängen nach außen oder in Richtung der Peripherie-zugewandten Seite. Im Falle der AF liegt die Vermutung nahe, dass die Ursache hierfür wieder in der Anordnung des Aktinkortex entlang der Zellmembran und einer aktinarmen perinuklearen Region lag. Für Myosin V Motoren scheint eine Verteilung der Motorproteine entlang der Phagosomenoberfläche entsprechend ihrer Funktion (zum Ausweichen oder zur generellen Transportunterstützung) denkbar.

Zusammenfassung der bisherigen Resultate. Beide durchgeführte Experimentkategorien zur gezielten Unterbindung MT- oder AF-basierter Mobilität oder zur Fluoreszenzmarkierung von MT und AF sowie assoziierter Motorproteine deuten darauf hin, dass es entlang der Phagosomenoberfläche zu einer gemeinsamen Anlagerung diverser Motorproteine kommt, deren Kräfte sich überlagern. Die Beiträge der motorenbedingten Einzelkräfte zur Gesamtkraft sind dabei je nach Phagosomendurchmesser unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei großen Phagosomen spielt eine hohe Dynein-Dichte entlang der Kern-zugewandten Phagosomenseite verglichen mit der gegenüberliegenden Seite und die damit verbundene erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Clusterbildung und Generierung kollektiver Kräfte eine dominante Rolle. Myosin V Motoren werden anscheinend eher an die seitlichen Flächen der Phagosomen gedrängt und dienen dem Ausweichen von intrazellulären Hindernissen während des Transportes. Mit abnehmender Phagosomengröße sinkt hingegen die Dominanz der kollektiven Dynein-Aktivität und die Verteilung der Myosin Motoren und AF entlang der Phagosomenaußenseiten spielen eine zunehmend relevante Rolle für die Transportunterstützung. Dabei scheint eine homogene Verteilung von AF und assoziierten Motoren entlang der Phagosomenseiten hilfreich zu sein. Allerdings führt die fehlende Vorzugsrichtung bei der Myosin V-Bewegung zu vermehrten Richtungsänderungen während des Transportes [54]. Auch ein zunehmender Prozess der Gleichberechtigung aller ausgeübten Motorenkräfte entlang MT sowie entlang AF ist für kleiner werdende Phagosomendurchmesser denkbar, welche sich in Form eines Tauziehens entlang der Basisfilamente der Motoren äußert, wie von Schröder und Kollegen beobachtet [71]. Bereits 2011 konnte in einer theoretischen Abhandlung gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Motoren auf

Lastpartikeln mit einem Durchmesser von weniger als 500 nm einen wesentlichen Einfluss auf das Transportverhalten hat [144]. Weiterhin deutet der inverse Gradient entlang der Außenseite realer Phagosomen von AF, welcher mit steigendem Phagosomendurchmesser zunimmt, an, dass auch der zur Verfügung stehende Platz innerhalb der Zelle eine Rolle spielt, da die Inversion der AF-Gradienten in Zellen ohne internalisierten Fremdkörper nicht beobachtet werden konnte.

10.4 Diskussion des Einflusses der Phagosomenposition innerhalb der Makrophage

Da die Experimente der fluoreszenzmarkierten intrazellulären Strukturen auf einen Einfluss der zentralen Organisation der MT sowie der dezentralen Organisation der AF zu einem Kortex auf die beobachteten Gradienten der Strukturen entlang der Phagosomenoberfläche schließen ließen, wurde zusätzlich der Einfluss des Abstandes zwischen hypothetischen Phagosomen und Nukleus auf die Asymmetrien bezüglich der MT und AF sowie assoziierter Motorproteine untersucht (siehe Abb. 8.14, 8.15 & 8.16). Es konnte gezeigt werden, dass die absoluten Werte der Gradienten mit zunehmendem Abstand geringer wurden, aber dass das Verhältnis der Gradienten von kleinen zu großen Phagosomen nahezu unverändert blieb. Die Gradienten von MT und assoziierten Motoren zeigten dabei aufgrund der zentralen Organisation der MT eine stärkere Reduzierung der Gradienten mit zunehmendem Abstand zwischen Nukleus und Phagosom als AF und AF-basierte Motoren. Auf die Darstellung, Auswertung und Diskussion der Untersuchung des Einflusses des Abstandes zwischen realen Phagosomen und Nukleus auf die Asymmetrie von MT und AF wurde verzichtet, da keine vergleichbaren Phagosomenpositionen und Zellstrukturen gewährleistet werden konnten. Ursache hierfür war, dass sich an einer Position in einer Zelle nicht drei reale Phagosomen unterschiedlichen Durchmessers befinden können. Eine Auswertung der vorhandenen Zellen und Phagosomenpositionen wies große Schwankungen zwischen den einzelnen Phagosomen auf. Vorherige Messungen zeigten aber bereits, dass die Internalisierung von Fremdkörpern die Anordnung der Strukturen veränderte, wodurch wahrscheinlich nicht nur die Position der Phagosomen zum Zeitpunkt der Fixierung eine Rolle spielt, sondern auch der bis dahin zurückgelegte Weg.

10.5 Diskussion besonderer Transportcharakteristika

Transportgeschwindigkeiten. Betrachtet man die ermittelten Geschwindigkeiten des phagosomalen Transportes auf kurzen Zeitskalen und vergleicht diese mit den für motorbasierten Transport zu erwartenden Geschwindigkeiten, so fällt auf, dass sie deutlich geringer ausfallen als die Geschwindigkeiten reiner Motorenbewegungen. Die in dieser Arbeit gemessenen instantanen Transportgeschwindigkeiten lagen im Bereich von circa $30\text{-}40\text{ nm s}^{-1}$ ($2\text{-}2,5\text{ }\mu\text{m min}^{-1}$). Für Dynein Motoren-basierten Transport wurden *in vitro* Geschwindigkeiten im Bereich von $200\text{-}700\text{ nm s}^{-1}$, für Kinesin-basierten Transport Geschwindigkeiten zwischen $150\text{-}750\text{ nm s}^{-1}$ und für Myosin-basierten Transport Geschwindigkeiten zwischen $300\text{-}450\text{ nm s}^{-1}$ gemessen (für Ladungen $< 1\text{ }\mu\text{m}$) [145–149]. Aufgrund der dichten und viskoelastischen Umgebung innerhalb von Zellen und dem damit verbundenen Auftreten von viskosen Reibungskräften (Stokeskräfte im Falle sphärischer Transportobjekte) kommt es zu einer Reduzierung der effektiven Transportgeschwindigkeiten, welche von den Motorproteinen generiert werden können [137, 140]. Zusätzlich kommt es zu einem Tauziehen der involvierten Motorproteine Dynein, Kinesin und Myosin V, welches ebenfalls Einfluss auf den Transport der Zielobjekte nimmt [74]. Die in dieser Arbeit beobachteten Trans-

portgeschwindigkeiten befinden sich in Einklang mit den in der Literatur angegebenen Geschwindigkeiten für Lasttransport entlang MT und AF innerhalb diverser Zelltypen von $25\text{-}130\text{ nm s}^{-1}$ [38, 59, 65, 88]. Des Weiteren stellten Klumpp und Lipowsky in einer theoretischen Abhandlung fest, dass neben der Anzahl der Motoren auch die Lastkraft eine wesentliche Rolle für den Transport spielt und mit steigender Lastkraft die Transportgeschwindigkeit reduziert wird [150]. Diese Verlangsamung der Geschwindigkeit spielt sicherlich eine große Rolle bei dem Vergleich zwischen Motoren-basiertem Transport *in vitro* und *in vivo*, allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Phagosomenradius um den Faktor drei und somit eine Erhöhung des viskosen Widerstandes verbunden mit einer Erhöhung der für den Transport aufzubringenden Kraft keinen Einfluss auf die instantane Transportgeschwindigkeit des Phagosomes hat.

Starker zentrifugaler Transport. Der fehlende Endpunkt des intrazellulären Transportes kleiner Phagosomen in der perinuklearen Region und der damit verbundene, starke zentrifugale Transport in über 80 % aller betrachteten $1\text{ }\mu\text{m}$ Phagosomentrajektorien (siehe Abb. 7.13) legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei nicht um einen zufälligen Prozess handelt, sondern um einen von den Zellen genutzten und biologisch relevanten Vorgang. Bereits Zhang u.a. beschrieb die Beobachtung von zentrifugalem Transport bei $1\text{ }\mu\text{m}$ großen Phagosomen [59]. Im Vergleich zu ihrer Vermutung, dass der zentrifugale Transport eine grundlegende Eigenschaft aller Phagosomen darstellt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es sich dabei um eine Eigenschaft nahezu ausschließlich kleiner Phagosomen handelt. Der zentrifugale Transport von $2\text{ }\&\text{ }3\text{ }\mu\text{m}$ großen Phagosomen sank auf unter 20 %. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Rücktransport kleiner Phagosomen zu einem wesentlichen Teil in Zusammenhang mit der Aktivität von Myosin V Motoren steht, während Dynein Motoren einen Endpunkt des Transportes in Kernnähe und die Reduzierung von starkem zentrifugalem Transport unterstützen.

Eine biologisch relevante Erklärung dieses starken zentrifugalen Transportes liefert die Tatsache, dass bei Wirbeltieren die Möglichkeit zur Ankopplung von Verdauungsprodukten an die Maschinerie der Antikörperpräsentation besteht [53]. Dies bedeutet, dass ein Transport von der perinuklearen Region zur Zellperipherie nach vollendeter Verdauung und Zersetzung des phagosomalen Inhaltes, die Exozytose von Verdauungsendprodukten, die Präsentation von Antikörpern, die membrangebundene Ausstellung von bakteriellen Peptidfragmenten und das Recycling von Fc-Rezeptoren unterstützt [10, 20, 41]. Tjelle und Kollegen äußerten dabei die Vermutung, dass neben der Antigenpräsentation mittels Haupthistokompatibilitätskomplexen (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) der Klasse II auch für die Präsentation der AK durch MHC Klasse I Komplexe ein alternativer Pfad zum Durchlaufen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) existiert [20]. Dieser Pfad, unter Beteiligung des ER direkt an der Antigenprozessierung, bietet die Möglichkeit eines vakuolaren Transportes vom Phagolysosom zur Zellplasmamembran (siehe Abb. 2.8) [53]. Zusätzlich konnte bei *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass Phagosome eine aktive Rolle bei der Regulation ihres Reifungsprozesses einnehmen [48, 49]. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass Zellen gezielt die Internalisierung und den zentripetalen Transport großer Phagosomen fördern, während für bereits zersetzten phagosomalen Inhalt, verbunden mit kleineren Phagosomendurchmessern, der Abtransport und die damit verbundene, größenbeschränkte Exozytose der Restprodukte, wie unverdauliches Material, Rezeptoren und Antigene, in Richtung der Zellperipherie unterstützt wird.

Pausenphasen in der perinuklearen Region. Die dem starken zentrifugalen Transport vorausgehende Pause der $1\text{ }\mu\text{m}$ Phagosomen in der perinuklearen Region von einigen Mi-

nuten (siehe Abb. 7.11) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht auf Basis der Motorenverteilung entlang der Phagosomenoberfläche und der Beteiligung AF- oder MT-gestützter Mobilität erklärt werden. Daraus folgend kann angenommen werden, dass es sich hier vorrangig um eine biochemische Regulierung des phagosomalen Reifungsprozesses in Abhängigkeit von weiteren intrazellulären Prozessen, beispielsweise der Vorbereitung der Antigenpräsentation oder der Exozytose, handelt. Für die MHC Klasse II basierte Antigenpräsentation wird eine Dauer von mindestens 20 bis 30 min benötigt, um die Peptid-MHC Klasse II Komplexe an der Zelloberfläche zu generieren. Außerdem muss die ausreichende Zersetzung der Bakterien für eine Ausstellung der bakteriellen Peptid-Epitope entlang der Membranaußenseite gewährleistet werden [20]. Alternativ wäre auch eine geometrische, zytoskelettbasierte Erklärung für das Verhalten der kleinen Phagosomen denkbar. Simulationen ballistischer Bewegung entlang von polarisierten Filamenten, welche, verglichen mit der Zellperipherie, eine höhere Filamentdichte innerhalb der perinuklearen Region aufwiesen, zeigten, dass spezielle Arrangements der Filamente zur Fallenbildung für Phagosome in Kernnähe führen können. Die Folge dessen sind Zeitverzögerungen der zu transportierenden Zielobjekte in dieser Region [61]. Die Simulationen wurden dabei unabhängig von den Ausmaßen der zu transportierenden Ladung durchgeführt, wodurch der Einfluss des Ladungsdurchmessers auf auftretende Zeitverzögerungen während des Transportes offen bleibt.

10.6 Zusammenfassung

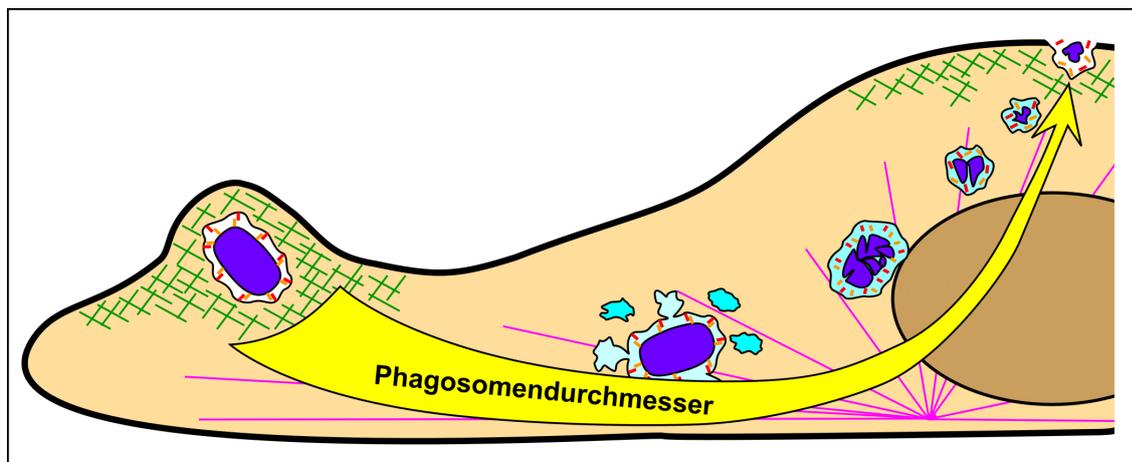


Abbildung 10.1. Illustration des Sortiermechanismus. Die Abbildung zeigt die Illustration der aufgestellten Hypothese des intrazellulären Sortiermechanismus basierend auf der Phagosomengröße.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Transport von Phagosomen in Makrophagen sehr stark von der Größe des Phagosomes beeinflusst wird. Insbesondere steigt die Transporteffizienz in Richtung Nukleus mit steigendem Phagosomendurchmesser signifikant an. Es wurde herausgefunden, dass große Phagosomen mit einem Durchmesser von $3\ \mu\text{m}$ einen sehr persistenten Transport von der Zellperipherie zur perinuklearen Region aufweisen, welcher kaum durch Pausen oder bidirektionale Transportphasen gestört wird. Der Transport intermediärer Phagosomen hingegen ist charakterisiert durch häufige Unterbrechungen und passive Phasen. Kleine Phagosomen zeigen häufige Fluktuationen der Transportrichtung während der intrazellulären Bewegung und lassen einen wohldefinierten Endpunkt des Transportes in Kernnähe vermissen. Durch wei-

terführende Untersuchungen der molekularen Ursachen für dieses größenabhängige phagosomale Transportverhalten konnte gezeigt werden, dass MT-gestützte Mobilität eine wesentliche Rolle für den Transport großer Phagosomen spielt, während AF-basierte Bewegung wichtiger für den Transport von kleinen Phagosomen ist. Eine detaillierte Analyse der Filamentstrukturen- und Motorenverteilung entlang der Phagosomenoberfläche ergab, dass vor allem bei großen Phagosomen die starke Asymmetrie zwischen hoher MT- und Dynein-Dichte entlang der Nukleus-zugewandten Phagosomenseite verglichen mit geringer Dichte entlang der Peripherie-zugewandten Seite eine große Bedeutung zukommt. Verbunden mit dieser Asymmetrie ist dabei eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Clusterbildung der Motoren bei hoher Dynein-Dichte und zur Ausbildung kollektiver Dynein-Kräfte in dieser Region. Diese unausgeglichene Verteilung liefert neben bislang unbekanntem biochemischen Regulationen eine potenzielle, teilweise Erklärung für die hohe Transporteffizienz großer Phagosomen im Vergleich zur Transporteffizienz der Phagosomen mit geringerem Durchmesser.

Auch konnte beobachtet werden, dass der molekulare Motor Myosin V, trotz Dominanz der AF-basierten Mobilität bei dem Transport kleiner Phagosomen, eine wichtige Funktion für den Transport aller Phagosomen hat. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es zu einer Anlagerung aller wichtigsten intrazellulären Transportmotoren Dynein, Kinesin und Myosin V entlang der Phagosomenoberfläche und einer Superposition ihrer Kräfte kommt. Dabei kann die Zusammensetzung bzw. die Anzahl sowie die Clusterbildung der Motorproteine in Abhängigkeit des Phagosomendurchmessers stark variieren. Ein dominanter Einfluss von nicht motorgestützten intrazellulären Bewegungen und Prozessen auf das größenabhängige Transportverhalten konnte für offensichtliche Ursachen wie beispielsweise kortextspannungsinduzierte Kräfte durch die Zellgeometrie oder Diffusion innerhalb des Zytoplasmas basierend auf den vorliegenden Messergebnissen weitestgehend ausgeschlossen werden.

Auf Grundlage dieser Resultate folgt die Hypothese, dass innerhalb der Zellen ein Sortiermechanismus existiert, welcher sich nur nach der physikalischen Größe des Zielobjektes richtet. Dieser dient ergänzend zur biochemischen Regulation der Optimierung der Phagozytose von Fremdkörpern und Bakterien. Es kommt zu einer gleichzeitigen Unterstützung des Transportes von großen internalisierten Bakterien von der Zellperipherie in Richtung des Nukleus, zur Förderung der Verdauung und Zersetzung dieser und der Unterstützung des Transportes von kleinen bakteriellen Fragmenten und Recyclingprodukten nach erfolgreicher Zerstörung der Bakterien von der perinuklearen Region in Richtung der Zellmembran zu Zwecken der Exozytose oder Präsentation dieser Produkte.

10.7 Anwendungen und weiterführende Projekte

Der in dieser Arbeit vorgestellte intrazelluläre Sortiermechanismus basierend auf dem Phagosomendurchmesser eröffnet diverse Möglichkeiten für die gezielte Lokalisation von partikelbasierter intrazellulärer Medikamentenverabreichung und deren Wirkungsstätte beispielsweise in der Zellperipherie oder in der perinuklearen Region. Sollte der Sortiermechanismus zusätzlich auch eine schnellere und effektivere Reifung, Verdauung und Zersetzung großer Objekte oder Bakterien implizieren, so wäre eine Zusammenführung von Bakterien oder das gezielte Herstellen von Bakterienclustern mittels Medikamenten eine Möglichkeit die Beseitigung von Fremdobjekten durch Makrophagen zu beschleunigen und zu optimieren. Des Weiteren verdeutlicht der Mechanismus, dass die Zellen neben komplexen biochemischen Signal- und Regulationskaskaden auf einfache physikalische Eigenschaften der Zielobjekte zurückgreifen können, um die essentielle Funktion der intrazellulären Pha-

gosomenreifung zu gewährleisten.

Für eine weiterführende Diskussion und Deutung der hier beobachteten und analysierten größenabhängigen phagosomalen Transporteigenschaften ist es zunächst notwendig die Korrelation zwischen der Transporteffizienz und der Effektivität der Phagosomenreifung, insbesondere der Verdauung und Zersetzung der Zielobjekte, zu analysieren. Eine Möglichkeit bietet dabei die Analyse des pH-Wertes des phagosomalen Inhaltes, welcher ein Maß für den Säuregehalt des Phagosomes und somit für das Stadium des Phagosomes innerhalb des Reifungsprozesses darstellt. Aufgrund häufiger Fusion zwischen Phagosomen und Endosomen oder Lysosomen entspricht ein sehr niedriges pH-Level einer bereits stark vorangeschrittenen Phagosomenreifung [151]. Dazu wurde im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Gurbet Köse die Ansäuerung von 2 & 3 μm Phagosomen während des intrazellulären Transportes untersucht und um die Untersuchung der Ansäuerung von 1 μm Phagosomen im Rahmen eines Nebenprojektes zu der vorliegenden Arbeit erweitert. Dabei ergab sich die Notwendigkeit zu weiterführenden Messungen allen voran bezüglich der Bewegung 1 μm großer Phagosomen parallel zur z-Achse der Zellen sowie die Notwendigkeit zur Nutzung eines quantifizierbaren Indikators für den phagosomalen pH-Wert. Eine Beschreibung der durchgeführten Experimente sowie die Darstellung und Diskussion der Ergebnisse findet sich in der Bachelorarbeit von Gurbet Köse [152].

Weitere ergänzende Projekte zu dieser Arbeit wären die Unterbindung der Produktion der analysierten Motorproteine Dynein und Myosin mittels siRNA anstelle einer Inaktivierung der Motoren durch Zugabe diverser Medikamente. Eine vollständige Löschung der Motorproteine innerhalb der Zellen verhindert die Einflussnahme der Motoren durch passive Funktionen wie beispielsweise einer Ankerfunktion oder als intrazelluläre Hindernisse gegenüber dem Lasttransport. Außerdem könnte mittels detaillierter Untersuchung des Einflusses von Kinesin Motoren auf den phagosomalen Transport die in obiger Diskussion aufgestellten Hypothesen bezüglich der Kinesin-Funktionen während der größenabhängigen Phagosomenbewegung verifiziert oder dementiert werden. Dazu kann eine Inaktivierung mittels Medikamenten oder eine Löschung mittels siRNA der Kinesine sinnvoll sein. Ein potenzieller nächster Schritt wäre die Prüfung des gefundenen und charakterisierten intrazellulären Sortiermechanismus auf Universalität. Dafür wäre die Analyse des phagosomalen Transportes in diversen weiteren Zelllinien beispielsweise RAW 264.7 Makrophagen prädestiniert. Interessant wäre ebenfalls die Fragestellung, ob der Sortiermechanismus basierend auf den physikalischen Eigenschaften der Zielobjekte allein ausreichend ist, um größenabhängige Transporteffizienz zu generieren. Dies könnte durch die Inhibierung diverser intrazellulärer biochemischer Signalkaskaden analysiert werden, da diese Signalkaskaden einen wesentlichen Einfluss auf die Fusion mit zeitigen und späten Endosomen und Lysosomen mit dem Phagosom und somit auf die Reifung des Phagosomes haben [10].

Ebenfalls noch offen steht die Frage, ob es sich um kontinuierliche Veränderung der Transporteffizienz skalierend mit der Phagosomengröße handelt oder ob ein diskretes Verhalten vorherrscht, d.h., ob ein konkreter Phagosomendurchmesser existiert, welcher den Übergang zwischen einem hocheffizienten und einem weniger effizienten Transport markiert. Zunächst deuten die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen bezüglich des Transportes von intermediären Phagosomen auf einen kontinuierlichen Übergang hin, dennoch sind diverse Transporteigenschaften ausschließlich auf eine Phagosomengröße beschränkt wie beispielsweise der starke zentrifugale Transport bei 1 μm Phagosomen. Dazu wurden im Rahmen eines Nebenprojektes zu dieser Arbeit Untersuchungen des phagosomalen Transportes von 1,5 μm großen Phagosomen begonnen, welche aber zugunsten anderer Messungen nicht weitergeführt und analysiert wurden. Auch ist noch nicht bekannt, bei welcher Phagosomengröße die Grenzen des hier vorgestellten Sortiermechanismus und der Effizi-

enzsteigerung des Transportes mit zunehmendem Phagosomendurchmesser liegen. Dazu könnten die durchgeführten Experimente und Analysen des Phagosomentransportes von Zielobjekten mit Durchmessern $< 1 \mu\text{m}$ oder $> 3 \mu\text{m}$ reproduziert werden.

Für eine technische Anwendung des gefundenen Sortiermechanismus wäre eine Nutzung von Partikeln lohnenswert, welche über die Zeit ein Medikament freisetzen wie sie beispielsweise für Experimente zur Chemotaxis genutzt werden [153]. Mit ihrer Hilfe kann überprüft werden, ob eine lokale Freisetzung einer Droge oder eines Medikamentes in der Zellperipherie oder in der perinuklearen Region basierend allein auf dem Partikeldurchmesser möglich ist.

Protokolle

Dieser Anhang enthält im Rahmen der Arbeit verwendete und etablierte Laborprotokolle mit detaillierter und schrittweiser Auflistung der Vorgehensweise.

A.1. Passives Adsorptionsprotokoll	XII
A.2. Nachweis der Opsonisierung	XIII
A.3. Zellfixierung	XIV
A.4. Immun- & Partikelfärbung	XV

A.1 Passives Adsorptionsprotokoll - Opsonisierung von Partikeln

Anmerkung: nach Vorlage Life Technologies (*invitrogen.com*)

Präparation der Partikel & Waschen der Partikel

Anmerkung: Das Protokoll setzt die Verwendung von Partikeln mit Oberflächenbeschichtung voraus, getestet anhand von carboxylierten Silika- & Polystyrolpartikeln.

1. 200 µl Partikellösung (50 mg/ml) in 1 ml MES-Puffer (0.025M pH 6) lösen
2. 20 min bei 2000 g zentrifugieren
(**Achtung:** für Partikel < 2 µm: 10 min Ultraschallbad (20°), anschließend 30 min bei 3500 g zentrifugieren)
3. Überschuss abnehmen & Partikelpellet in 1 ml MES-Puffer suspendieren
4. Erneut zentrifugieren & überschüssige Flüssigkeit entfernen & Überschuss abnehmen
5. Pellet vollständig in 500 µl MES-Puffer suspendieren

Anmerkung: Partikelsuspension mit ca. 40 mg/ml

Zugabe der primären Antikörper (AK)

1. Herstellung von 500 µl Antikörperlösung: gewünschte Menge Antikörper in MES-Puffer lösen mit einer finalen Konzentration von 1 mg/ml (\leftrightarrow ca. 0,5 mg Antikörper & 0,495 ml MES-Puffer)

Empfehlung: Menge der Antikörper so wählen, dass eine theoretische 200 %-ige Oberflächenbeschichtung aller suspendierten Partikel möglich ist.

Anmerkung: Exakte Menge Antikörper richtet sich nach Hersteller, Antikörperkonzentration & -größe sowie Partikelkonzentration & -größe in der Partikelsuspension.

2. Zugabe der Partikelsuspension zur Antikörperlösung (Verhältnis 1:1)
3. Inkubation der Partikel in der Suspension für ca. 12 h (über Nacht), bei vorsichtigem Durchmischen
4. Zentrifugation der Partikel-Antikörpersuspension für 20 min bei 2000g (**Achtung:** für Partikel < 2 µm Zentrifugationsgeschwindigkeit & -dauer anpassen)
5. Überschuss abnehmen

Anmerkung: Zur Kontrolle der Opsonisierung kann die Konzentration der im Überschuss verbliebenen (ungebundenen) Antikörper bestimmt werden.

6. Partikelpellet in 1 ml PBS suspendieren & erneut zentrifugieren & Überschuss abnehmen (**3 Wiederholungen**)
7. Abschließend Partikelpellet in 1 ml Lagerungspuffer suspendieren

Anmerkung: Lagerungspuffer: 0,1 M PBS (pH-Wert: 7.2), inklusive 0.1% Glycin (Deaktivierung ungebundener reaktiver Stellen) & optional 0.1% NaN₃ (gegen Bakterien, aber auch zellschädigend)

A.2 Nachweis der Opsonisierung mittels sekundärer Antikörperfärbung

Anmerkung: Voraussetzung ist Partikelbeschichtung nach Protokoll A.1.

1. Vorbereitung: Verdünnung der finalen Partikelsuspension (Protokoll A.1) mit PBS im Verhältnis 1:20
2. Zugabe von gelösten sekundären Antikörpern (verwendete Lösung entspricht der Herstellerlösung, Details siehe Text, Kapitel 5.4) zur verdünnten Partikelsuspension im Verhältnis 1:200
3. Inkubation der Lösung (60 min bei Raumtemperatur, abgedunkelt, vorsichtiges Durchmischen/ Lagerung auf Wippe)
4. Zentrifugation der Lösung (1000g 20 min, **Achtung:** Lage des Eppendorf-Tubes in Zentrifuge kennzeichnen, da teilweise kein sichtbares Partikelpellet erzeugt wird), Überstand abnehmen & Partikelpellet in 1 ml PBS lösen (**3 Wiederholungen**)
5. Weitere Verdünnung der antikörpergefärbten Partikelsuspension mit PBS für sinnvolle Konzentrationen während der Messungen möglich

A.3 Fixieren der Zellen

Anmerkung 1: Details zur Zellfixierung mit PFA siehe Text, Kapitel 5.7.

Anmerkung 2: Alle Mengenangaben beziehen sich auf eine Vertiefung einer Standard-Zwölflochplatte (Arbeitsvolumen: 2 ml , Kulturfläche: 3,5 cm²).

1. Vorbereitung 1: Aussäen der Zellen auf Deckgläsern in einer Zwölflochplatte (ein Deckglas pro Vertiefung) mit Zellkulturmedium, Inkubationszeit: 1-2 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ Gehalt

2. Vorbereitung 2 (bei Bedarf): Zugabe der Partikellösung in gewünschter Konzentration & Inkubation der Zellen in der Partikellösung für die gewünschte Dauer

Anmerkung: Für identische Phagozytosezeiten der Zellen bei unterschiedlichen Partikelgrößen oder -materialien muss die Sedimentation der Partikel bei 0° erfolgen.

3. Abnahme des Kulturmediums (& der Partikellösung)

4. Zugabe von 1 ml PBS & vorsichtiges Schwenken der Lochplatte (ca. 1 min) & PBS abnehmen (**3 Wiederholungen**)

5. Zugabe von 1 ml 4% PFA (Raumtemperatur)

6. PFA-Lösung 15 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen

7. PFA-Lösung abnehmen

8. Zugabe von 1 ml PBS & vorsichtiges Schwenken der Lochplatte (ca. 1 min) & PBS abnehmen (**3 Wiederholungen**)

Anmerkung: An dieser Stelle kann bei Bedarf die Immunfärbung oder Partikelfärbung (siehe Protokoll A.4) durchgeführt werden.

9. Zugabe von 1 ml destilliertem Wasser

10. 5 µl Fluoromunt-G auf Objektträger geben

11. Deckglas aus Lochplatte herausnehmen, überschüssiges Wasser abtropfen lassen & mit der Seite, auf welcher sich die Zellen befinden, auf Objektträger flach ablegen & unter Entfernung etwaiger Luftblasen vorsichtig anpressen

12. Objektträger inkl. Deckglas min. 12 h austrocknen lassen

A.4 Immunfärbung & Partikelfärbung

Anmerkung 1: Fixierung der Zellen nach Protokoll A.3 notwendig.

Anmerkung 2: Details zur Immunfärbung siehe Text, Kapitel 6.2, oder Quelle [98].

Anmerkung 3: Details zur Anfärbung von beschichteten Partikeln siehe Text, Kapitel 5.4.

Immunfärbung

Anmerkung: nach Vorlage Cell Signaling (cellsignal.com → Immunofluorescence General Protocol)

1. Vorbereitung: Durchführung der Zellfixierung (A.3) bis einschließlich Schritt 8
2. Zugabe von 1 ml Blocking Buffer & Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur
Anmerkung: Blocking Buffer: 94,7% PBS, 0,3% Triton X 100 & 5% Ziegenserum
3. Zugabe primärer Antikörperlösung (primärer Antikörper in Lösungspuffer in gewünschter Konzentration gelöst), so dass Grundfläche der Lochplatte (Zellen) bedeckt ist
Anmerkung 1: Konzentration primärer Antikörper je nach Herstellerangabe, gängige Empfehlung: 1:200 bis 1:500
Anmerkung 2: Lösungspuffer: 98,7% PBS, 0,3% Triton X 100 & 1% BSA
4. Inkubation der Antikörperlösung für 24 h bei 4 °C
5. Abnehmen der Antikörperlösung
6. Zugabe von 1 ml PBS & vorsichtiges Schwenken der Lochplatte (ca. 1 min) & PBS abnehmen (**3 Wiederholungen**)
7. Zugabe sekundärer Antikörperlösung (sekundärer Antikörper in Lösungspuffer in gewünschter Konzentration gelöst), so dass Grundfläche der Lochplatte (Zellen) bedeckt ist
Anmerkung: Konzentration sekundärer Antikörper je nach Herstellerangabe, gängige Empfehlung: 1:100 bis 1:1000
8. Inkubation der Antikörperlösung für 1-2 h bei Raumtemperatur, abgedunkelt
9. Abnehmen der Antikörperlösung
10. Zugabe von 1 ml PBS & vorsichtiges Schwenken der Lochplatte (ca. 1 min) & PBS abnehmen (**3 Wiederholungen**)
Anmerkung: Fortsetzung mit weiteren Immunfärbungen, Anfärbung des Zellkerns oder Anfärbung nicht phagozytierter Partikel (folgende Abschnitte) an dieser Stelle möglich
11. Zellfixierung (Protokoll A.3) mit Schritt 9 fortsetzen

Färbung des Zellkerns

1. Vorbereitung: Durchführung der Zellfixierung (A.3) bis einschließlich Schritt 8
2. Zugabe von Höchst-Lösung (Lösung des Farbstoffes Höchst in *Lösungspuffer* mit der Konzentration 1:1000)
Anmerkung: Lösungspuffer: 98,7% PBS, 0,3% Triton X 100 & 1% BSA
3. Inkubation der Höchst-Lösung für 2 min bei Raumtemperatur, abgedunkelt
4. Abnehmen der Höchst-Lösung
5. Zugabe von 1 ml PBS & vorsichtiges Schwenken der Lochplatte (ca. 1 min) & PBS abnehmen (**3 Wiederholungen**)
Anmerkung: Fortsetzung mit Anfärbung nicht phagozytierter Partikel (folgender Abschnitt) an dieser Stelle möglich
6. Zellfixierung (Protokoll A.3) mit Schritt 9 fortsetzen

Färbung der Partikel mit sekundären Antikörpern

Anmerkung: Nachweis nicht phagozytierter Partikel

1. Vorbereitung: Durchführung der Zellfixierung (A.3) bis einschließlich Schritt 8
2. Zugabe von 500 µl PBS
3. Zugabe von 5 µl gelöstem sekundären Antikörper (verwendete Lösung entspricht der Herstellerlösung, Details siehe Text, Kapitel 5.4)
4. Inkubation der Antikörpersuspension für 60 min (abgedunkelt, auf EIS/ 0°, vorsichtiges Schwenken der Lochplatte)
5. Antikörperlösung entfernen
6. Vorsichtige Zugabe von 1 ml PBS & vorsichtiges Schwenken der Lochplatte (ca. 1 min) & PBS vorsichtig abnehmen (**3 Wiederholungen**)
Anmerkung: Vorsichtige Verfahrensweise beim Spülen hier dringend notwendig.
7. Zellfixierung (Protokoll A.3) mit Schritt 9 fortsetzen

Anmerkung: Objektträger anschließend abgedunkelt bei 4°C lagern.

Literaturverzeichnis

- [1] SÜSS, G.: Krankheitskonzepte und Patientenschulung bei juveniler chronischer Arthritis. In: *Monatsschrift Kinderheilkunde* 151 (2003), Nr. 7, S. 738–744
- [2] HOF, H.; DÖRRIES, R.: *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*. 4. Georg Thieme Verlag KG, 2009
- [3] KLEIN, P.; FALKE, D.; HAHN, H.: Ursprung der Medizinischen Mikrobiologie. In: HAHN, H. (Hrsg.); KAUFMANN, S. H. (Hrsg.); SCHULZ, T. F. (Hrsg.); SUERBAUM, S. (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg, 2009, S. 7–10
- [4] WÜTHRICH, B.: Aus der Geschichte der Allergologie: Beginn der immunologischen Forschung - von der Serumkrankheit, der Anaphylaxie und dem Arthus-Phänomen zum „Allergie“-Begriff. In: *Allergologie* 40 (2017), Nr. 00/2017, S. 1–7
- [5] RINK, L.; KRUSE, A.; HAASE, H.: Das Immunsystem: Eine Übersicht. In: *Immunologie für Einsteiger*. Springer, 2012, S. 1–17
- [6] GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A.: Tissue macrophages: heterogeneity and functions. In: *BMC Biology* 15 (2017), Nr. 1, S. 53
- [7] FLANNAGAN, R. S.; JAUMOILLÉ, V.; GRINSTEIN, S.: The cell biology of phagocytosis. In: *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 7 (2012), S. 61–98
- [8] GORDON, S.: Phagocytosis: an immunobiologic process. In: *Immunity* 44 (2016), Nr. 3, S. 463–475
- [9] MARTIN, M.; RESCH, K.: *Immunologie*. 1. UTB, 2009
- [10] VIEIRA, O. V.; BOTELHO, R. J.; GRINSTEIN, S.: Phagosome maturation: aging gracefully. In: *Biochemical Journal* 366 (2002), Nr. Pt 3, S. 689
- [11] FLANNAGAN, R. S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S.: Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. In: *Nature Reviews Microbiology* 7 (2009), Nr. 5, S. 355
- [12] PAUL, W. E.: Bridging innate and adaptive immunity. In: *Cell* 147 (2011), Nr. 6, S. 1212–1215
- [13] NOBEL MEDIA AB: *Nobel Prizes and Laureates*. <https://www.nobelprize.org/>, 2019. – Accessed: 2019-01-20
- [14] KINCHEN, J. M.; RAVICHANDRAN, K. S.: Phagosome maturation: going through the acid test. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2008), Nr. 10, S. 781–795

- [15] CHAMPION, J. A.; MITRAGOTRI, S.: Role of target geometry in phagocytosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006), Nr. 13, S. 4930–4934
- [16] CHAMPION, J. A.; WALKER, A.; MITRAGOTRI, S.: Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. In: *Pharmaceutical Research* 25 (2008), Nr. 8, S. 1815–1821
- [17] DOSHI, N.; MITRAGOTRI, S.: Macrophages recognize size and shape of their targets. In: *PLOS ONE* 5 (2010), Nr. 4, S. e10051
- [18] KOVAL, M.; PREITER, K.; ADLES, C.; STAHL, P. D.; STEINBERG, T. H.: Size of IgG-opsonized particles determines macrophage response during internalization. In: *Experimental Cell Research* 242 (1998), Nr. 1, S. 265–273
- [19] PACHECO, P.; WHITE, D.; SULCHEK, T.: Effects of microparticle size and Fc density on macrophage phagocytosis. In: *PLOS ONE* 8 (2013), Nr. 4, S. e60989
- [20] TJELLE, T. E.; LØVDAL, T.; BERG, T.: Phagosome dynamics and function. In: *BioEssays* 22 (2000), Nr. 3, S. 255–263
- [21] TOLLIS, S.; DART, A. E.; TZIRCOTIS, G.; ENDRES, R. G.: The zipper mechanism in phagocytosis: energetic requirements and variability in phagocytic cup shape. In: *BMC Systems Biology* 4 (2010), Nr. 1, S. 149
- [22] ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.: *Molekularbiologie der Zelle. 6. Ausgabe.* 6. Wiley-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA, 2017
- [23] CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B.; MARL, J.: *Biologie. 8. Auflage.* 8. Pearson Studium, 2009
- [24] JANEWAY, C. A.: Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* Bd. 54 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, S. 1–13
- [25] VOLCHENKOV, R.; SPRATER, F.; VOGELANG, P.; APPEL, S.: The 2011 Nobel Prize in physiology or medicine. In: *Scandinavian Journal of Immunology* 75 (2012), Nr. 1, S. 1–4
- [26] UNDERHILL, D. M.; GOODRIDGE, H. S.: Information processing during phagocytosis. In: *Nature Reviews Immunology* 12 (2012), Nr. 7, S. 492
- [27] DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T.: Mechanisms of endocytosis. In: *Annual review of biochemistry* 78 (2009), S. 857–902
- [28] LAM, J.; HERANT, M.; DEMBO, M.; HEINRICH, V.: Baseline mechanical characterization of J774 macrophages. In: *Biophysical Journal* 96 (2009), Nr. 1, S. 248–254
- [29] ROSALES, C.; URIBE-QUEROL, E.: Phagocytosis: a fundamental process in immunity. In: *BioMed Research International* 2017 (2017)
- [30] JOSHI, T.; BUTCHAR, J. P.; TRIDANDAPANI, S.: Fc γ receptor signaling in phagocytes. In: *International Journal of Hematology* 84 (2006), Nr. 3, S. 210–216
- [31] NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V.: Fc γ receptors as regulators of immune responses. In: *Nature Reviews Immunology* 8 (2008), Nr. 1, S. 34

-
- [32] NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V.: Fc γ receptors: old friends and new family members. In: *Immunity* 24 (2006), Nr. 1, S. 19–28
- [33] VAN ZON, J. S.; TZIRCOTIS, G.; CARON, E.; HOWARD, M.: A mechanical bottleneck explains the variation in cup growth during Fc γ R phagocytosis. In: *Molecular Systems Biology* 5 (2009), Nr. 1, S. 298
- [34] RICHARDS, D. M.; ENDRES, R. G.: The mechanism of phagocytosis: two stages of engulfment. In: *Biophysical Journal* 107 (2014), Nr. 7, S. 1542–1553
- [35] PAUL, D.; ACHOURI, S.; YOON, Y.-Z.; HERRE, J.; BRYANT, C. E.; CICUTA, P.: Phagocytosis dynamics depends on target shape. In: *Biophysical Journal* 105 (2013), Nr. 5, S. 1143–1150
- [36] BENINGO, K. A.; WANG, Y.-l.: Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. In: *Journal of Cell Science* 115 (2002), Nr. 4, S. 849–856
- [37] BLOCKER, A.; SEVERIN, F. F.; BURKHARDT, J. K.; BINGHAM, J. B.; YU, H.; OLIVO, J.-C.; SCHROER, T. A.; HYMAN, A. A.; GRIFFITHS, G.: Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. In: *The Journal of Cell Biology* 137 (1997), Nr. 1, S. 113–129
- [38] BLOCKER, A.; GRIFFITHS, G.; OLIVO, J.-C.; HYMAN, A. A.; SEVERIN, F. F.: A role for microtubule dynamics in phagosome movement. In: *Journal of Cell Science* 111 (1998), Nr. 3, S. 303–312
- [39] TOYOHARA, A.; INABA, K.: Transport of phagosomes in mouse peritoneal macrophages. In: *The Journal of Cell Science* 94 (1989), Nr. 1, S. 143–153
- [40] DESJARDINS, M.; CELIS, J. E.; VAN MEER, G.; DIEPLINGER, H.; JAHRAUS, A.; GRIFFITHS, G.; HUBER, L. A.: Molecular Characterization of Phagosomes. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), Nr. 51, S. 32194–32200
- [41] BLANDER, J. M.; MEDZHITOV, R.: On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. In: *Nature Immunology* 7 (2006), Nr. 10, S. 1029–1035
- [42] DESJARDINS, M.: Biogenesis of phagolysosomes: the ‘kiss and run’ hypothesis. In: *Trends in Cell Biology* 5 (1995), Nr. 5, S. 183–186
- [43] PITT, A.; MAYORGA, L.; STAHL, P.; SCHWARTZ, A.: Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. In: *The Journal of Clinical Investigation* 90 (1992), Nr. 5, S. 1978–1983
- [44] SCIANIMANICO, S.; DESROSIERS, M.; DERMINE, J.-F.; MÉRESSE, S.; DESCOTEAUX, A.; DESJARDINS, M.: Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. In: *Cellular Microbiology* 1 (1999), Nr. 1, S. 19–32
- [45] FRATTI, R. A.; BACKER, J. M.; GRUENBERG, J.; CORVERA, S.; DERETIC, V.: Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. In: *The Journal of Cell Biology* 154 (2001), Nr. 3, S. 631–644

- [46] THILO, L. u. a.: Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. In: *European Journal of Cell Biology* 74 (1997), Nr. 1, S. 49–62
- [47] VIEIRA, O. V.; BOTELHO, R. J.; RAMEH, L.; BRACHMANN, S. M.; MATSUO, T.; DAVIDSON, H. W.; SCHREIBER, A.; BACKER, J. M.; CANTLEY, L. C.; GRINSTEIN, S.: Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. In: *The Journal of Cell Biology* 155 (2001), Nr. 1, S. 19–26
- [48] DESJARDINS, M.; NZALA, N. N.; CORSINI, R.; RONDEAU, C.: Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. In: *Journal of Cell Science* 110 (1997), Nr. 18, S. 2303–2314
- [49] JAHRAUS, A.; TJELLE, T. E.; BERG, T.; HABERMANN, A.; STORRIE, B.; ULLRICH, O.; GRIFFITHS, G.: In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), Nr. 46, S. 30379–30390
- [50] PITT, A.; MAYORGA, L.; SCHWARTZ, A.; STAHL, P.: Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. In: *Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), Nr. 1, S. 126–132
- [51] HOLM, Å.; TEJLE, K.; MAGNUSSON, K.-E.; DESCOTEAUX, A.; RASMUSSEN, B.: Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. In: *Cellular Microbiology* 3 (2001), Nr. 7, S. 439–447
- [52] JAHRAUS, A.; EGEBERG, M.; HINNER, B.; HABERMANN, A.; SACKMAN, E.; PRALLE, A.; FAULSTICH, H.; RYBIN, V.; DEFACQUE, H.; GRIFFITHS, G.: ATP-dependent membrane assembly of F-actin facilitates membrane fusion. In: *Molecular Biology of the Cell* 12 (2001), Nr. 1, S. 155–170
- [53] DESJARDINS, M.; HOUDE, M.; GAGNON, E.: Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. In: *Immunological Reviews* 207 (2005), Nr. 1, S. 158–165
- [54] ARAKI, N.: Role of microtubules and myosins in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. In: *Frontiers in Bioscience* 11 (2006), S. 1479–1490
- [55] SOLDATI, T.; SCHLIWA, M.: Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (2006), Nr. 12, S. 897
- [56] HOEPFNER, S.; SEVERIN, F.; CABEZAS, A.; HABERMANN, B.; RUNGE, A.; GILLOOLY, D.; STENMARK, H.; ZERIAL, M.: Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. In: *Cell* 121 (2005), Nr. 3, S. 437–450
- [57] PFEIFER, J. D.; WICK, M. J.; ROBERTS, R. L.; FINDLAY, K.; NORMARK, S. J.; HARDING, C. V.: Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. In: *Nature* 361 (1993), Nr. 6410, S. 359

-
- [58] WUBBOLTS, R.; FERNANDEZ-BORJA, M.; JORDENS, I.; REITS, E.; DUSSELJEE, S.; ECHEVERRI, C.; VALLEE, R. B.; NEEFJES, J.: Opposing motor activities of dynein and kinesin determine retention and transport of MHC class II-containing compartments. In: *Journal of cell science* 112 (1999), Nr. 6, S. 785–795
- [59] ZHANG, F.; SOUTHWICK, F. S.; PURICH, D. L.: Actin-based phagosome motility. In: *Cell Motility and the Cytoskeleton* 53 (2002), Nr. 2, S. 81–88
- [60] FORESTIER, C.; MORENO, E.; PIZARRO-CERDA, J.; GORVEL, J.-P.: Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an in vitro and in vivo study. In: *The Journal of Immunology* 162 (1999), Nr. 11, S. 6784–6791
- [61] ANDO, D.; KORABEL, N.; HUANG, K.; GOPINATHAN, A.: Cytoskeletal network morphology regulates intracellular transport dynamics. In: *Biophysical Journal* 109 (2015), Nr. 8, S. 1574–1582
- [62] MALLIK, R.; GROSS, S. P.: Molecular motors as cargo transporters in the cell—The good, the bad and the ugly. In: *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 372 (2006), Nr. 1, S. 65–69
- [63] HOLT, J. P.; BOTTOMLY, K.; MOOSEKER, M. S.: Assessment of myosin II, Va, VI and VIIa loss of function on endocytosis and endocytic vesicle motility in bone marrow-derived dendritic cells. In: *Cell Motility and the Cytoskeleton* 64 (2007), Nr. 10, S. 756–766
- [64] BRIDGMAN, P.: Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex. In: *The Journal of Cell Biology* 146 (1999), Nr. 5, S. 1045–1060
- [65] AL-HADDAD, A.; SHONN, M.; REDLICH, B.; BLOCKER, A.; BURKHARDT, J.; YU, H.; HAMMER, J.; WEISS, D.; STEFFEN, W.; GRIFFITHS, G. u. a.: Myosin Va bound to phagosomes binds to F-actin and delays microtubule-dependent motility. In: *Molecular Biology of the Cell* 12 (2001), Nr. 9, S. 2742–2755
- [66] YU, W.; BAAS, P. W.: Changes in microtubule number and length during axon differentiation. In: *Journal of Neuroscience* 14 (1994), Nr. 5, S. 2818–2829
- [67] MAMEREN, J. van; VERMEULEN, K. C.; GITTES, F.; SCHMIDT, C. F.: Leveraging Single Protein Polymers To Measure Flexural Rigidity†. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 113 (2009), Nr. 12, S. 3837–3844
- [68] HARRIS, A. R.; JREIJ, P.; FLETCHER, D. A.: Mechanotransduction by the Actin Cytoskeleton: Converting Mechanical Stimuli into Biochemical Signals. In: *Annual Review of Biophysics* 47 (2018), S. 617–631
- [69] MÜLLER, M. J.; KLUMPP, S.; LIPOWSKY, R.: Tug-of-war as a cooperative mechanism for bidirectional cargo transport by molecular motors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (2008), Nr. 12, S. 4609–4614
- [70] WU, X.; BOWERS, B.; RAO, K.; WEI, Q.; HAMMER, J. A.: Visualization of Melanosome Dynamics within Wild-Type and Dilute Melanocytes Suggests a Paradigm for Myosin V Function In Vivo. In: *The Journal of Cell Biology* 143 (1998), Nr. 7, S. 1899–1918

- [71] SCHROEDER, H. W.; MITCHELL, C.; SHUMAN, H.; HOLZBAUR, E. L.; GOLDMAN, Y. E.: Motor Number Controls Cargo Switching at Actin-Microtubule Intersections In Vitro. In: *Current Biology* 20 (2010), Nr. 8, S. 687–696
- [72] HENDRICKS, A. G.; HOLZBAUR, E. L.; GOLDMAN, Y. E.: Force measurements on cargoes in living cells reveal collective dynamics of microtubule motors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (2012), Nr. 45, S. 18447–18452
- [73] HEUSER, J.: Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. In: *The Journal of Cell Biology* 108 (1989), Nr. 3, S. 855–864
- [74] GROSS, S. P.; TUMA, M. C.; DEACON, S. W.; SERPINSKAYA, A. S.; REILEIN, A. R.; GELFAND, V. I.: Interactions and regulation of molecular motors in *Xenopus* melanophores. In: *The Journal of Cell Biology* 156 (2002), Nr. 5, S. 855–865
- [75] GAO, Y.; ANTHONY, S. M.; YU, Y.; YI, Y.; YU, Y.: Cargos Rotate at Microtubule Intersections during Intracellular Trafficking. In: *Biophysical Journal* 114 (2018), Nr. 12, S. 2900–2909
- [76] TYLERÁMCLAUGHLIN, R. u. a.: Collective dynamics of processive cytoskeletal motors. In: *Soft Matter* 12 (2016), Nr. 1, S. 14–21
- [77] SOPPINA, V.; RAI, A. K.; RAMAIYA, A. J.; BARAK, P.; MALLIK, R.: Tug-of-war between dissimilar teams of microtubule motors regulates transport and fission of endosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (2009), Nr. 46, S. 19381–19386
- [78] RAI, A. K.; RAI, A.; RAMAIYA, A. J.; JHA, R.; MALLIK, R.: Molecular adaptations allow dynein to generate large collective forces inside cells. In: *Cell* 152 (2013), Nr. 1-2, S. 172–182
- [79] RAI, A.; PATHAK, D.; THAKUR, S.; SINGH, S.; DUBEY, A. K.; MALLIK, R.: Dynein clusters into lipid microdomains on phagosomes to drive rapid transport toward lysosomes. In: *Cell* 164 (2016), Nr. 4, S. 722–734
- [80] MALLIK, R.; CARTER, B. C.; LEX, S. A.; KING, S. J.; GROSS, S. P.: Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. In: *Nature* 427 (2004), Nr. 6975, S. 649
- [81] SINGH, M. P.; MALLIK, R.; GROSS, S. P.; CLARE, C. Y.: Monte Carlo modeling of single-molecule cytoplasmic dynein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (2005), Nr. 34, S. 12059–12064
- [82] KULIĆ, I. M.; BROWN, A. E.; KIM, H.; KURAL, C.; BLEHM, B.; SELVIN, P. R.; NELSON, P. C.; GELFAND, V. I.: The role of microtubule movement in bidirectional organelle transport. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2008)
- [83] SCOTT, C.; BOTELHO, R.; GRINSTEIN, S.: Phagosome maturation: a few bugs in the system. In: *The Journal of Membrane Biology* 193 (2003), Nr. 3, S. 137–152
- [84] PIZARRO-CERDÁ, J.; MORENO, E.; SANGUEDOLCE, V.; MEGE, J.-L.; GORVEL, J.-P.: Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. In: *Infection and Immunity* 66 (1998), Nr. 5, S. 2387–2392

-
- [85] FELDMESSER, M.; TUCKER, S.; CASADEVALL, A.: Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. In: *Trends in Microbiology* 9 (2001), Nr. 6, S. 273–278
- [86] ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A.: Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages. In: *Current Biology* 16 (2006), Nr. 21, S. 2161–2165
- [87] MA, H.; CROUDACE, J. E.; LAMMAS, D. A.; MAY, R. C.: Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages. In: *Current Biology* 16 (2006), Nr. 21, S. 2156–2160
- [88] KODALI, V. K.; ROOS, W.; SPATZ, J. P.; CURTIS, J. E.: Cell-assisted assembly of colloidal crystallites. In: *Soft Matter* 3 (2007), Nr. 3, S. 337–348
- [89] MEYER, K.; SHAW, E.: A Comparison of the Morphologic, Cultural and Biochemical Characteristics of *B. Abortus* and *B. Melitensis*: Studies on the Genus *Brucella* Nov. Gen. I. In: *The Journal of Infectious Diseases* (1920), S. 173–184
- [90] RYAN, K.; RAY, C.; DREW, W.; FLORDE, J.; AHMAD, N.: *Sherris medical microbiology*. 5. McGraw Hill Medical, 2010
- [91] DEMTRÖDER, W.: *Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik*. 7. Springer Spektrum, 2017
- [92] MESCHEDE, D.: *Gerthsen Physik*. Bd. 23. Springer Berlin Heidelberg, 2004
- [93] WAGNER, J.; TIPLER, P.; MOSCA, G.; BASLER, M.; KOMMER, C.: *Physik für Wissenschaftler und Ingenieure, 7. dt. Aufl.* Berlin, Springer Spektrum, 2015
- [94] DEMTRÖDER, W.: *Experimentalphysik 3: Atome, Moleküle und Festkörper*. 5. Springer Spektrum, 2016
- [95] HAKEN, H.; WOLF, H. C.: *Molekülphysik und Quantenchemie: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen*. 5. Springer-Verlag, 2006
- [96] ABBE, E.: Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. In: *Archiv für mikroskopische Anatomie* 9 (1873), Nr. 1, S. 413–418
- [97] SACKMANN, E.; MERKEL, R.: *Lehrbuch der Biophysik*. Wiley-VCH, 2010
- [98] COX, G.: *Optical imaging techniques in cell biology*. 2. CRC Press, 2012
- [99] GRÄF, R.; RIETDORF, J.; ZIMMERMANN, T.: Live cell spinning disk microscopy. In: *Microscopy techniques*. Springer, 2005, S. 57–75
- [100] COLLIEX, C.: *Elektronenmikroskopie: eine anwendungsbezogene Einführung*. Wiss. Verlag-Ges., 2008
- [101] HOBBIIE, R. K.; ROTH, B. J.: *Intermediate physics for medicine and biology*. 5. Springer Science & Business Media, 2015
- [102] ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J. M.; BJORKHOLM, J.; CHU, S.: Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. In: *Optics Letters* 11 (1986), Nr. 5, S. 288–290

- [103] NEUMAN, K. C.; BLOCK, S. M.: Optical trapping. In: *Review of Scientific Instruments* 75 (2004), Nr. 9, S. 2787–2809
- [104] APPLEYARD, D.; VANDERMEULEN, K.; LEE, H.; LANG, M.: Optical trapping for undergraduates. In: *American Journal of Physics* 75 (2007), Nr. 1, S. 5–14
- [105] ASHKIN, A.: Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. In: *Biophysical Journal* 61 (1992), Nr. 2, S. 569–582
- [106] ABBONDANZIERI, E. A.; GREENLEAF, W. J.; SHAEVITZ, J. W.; LANDICK, R.; BLOCK, S. M.: Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. In: *Nature* 438 (2005), Nr. 7067, S. 460
- [107] KRESS, H.: *Cell Mechanics During Phagocytosis Studied by Optical Tweezers Based Microscopy*. Cuvillier Verlag, 2006
- [108] DESJARDINS, M.; GRIFFITHS, G.: Phagocytosis: latex leads the way. In: *Current Opinion in Cell Biology* 15 (2003), Nr. 4, S. 498–503
- [109] ISLAM, K.; CHIN, H. F.; OLIVARES, A. O.; SAUNDERS, L. P.; DE LA CRUZ, E. M.; KAPOOR, T. M.: A myosin V inhibitor based on privileged chemical scaffolds. In: *Angewandte Chemie International Edition* 49 (2010), Nr. 45, S. 8484–8488
- [110] COOPER, J. A.: Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. In: *The Journal of Cell Biology* 105 (1987), Nr. 4, S. 1473–1478
- [111] LEE, J. C.; FIELD, D. J.; LEE, L. L.: Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin. In: *Biochemistry* 19 (1980), Nr. 26, S. 6209–6215
- [112] FIRESTONE, A. J.; WEINGER, J. S.; MALDONADO, M.; BARLAN, K.; LANGSTON, L. D.; O'DONNELL, M.; GELFAND, V. I.; KAPOOR, T. M.; CHEN, J. K.: Small-molecule inhibitors of the AAA+ ATPase motor cytoplasmic dynein. In: *Nature* 484 (2012), Nr. 7392, S. 125
- [113] ROOSSEN, D. H.; MILLER, K. E.; GALLO, G.: Ciliobrevins as tools for studying dynein motor function. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (2015)
- [114] CHAPIN, S. C.; GERMAIN, V.; DUFRESNE, E. R.: Automated trapping, assembly, and sorting with holographic optical tweezers. In: *Optics express* 14 (2006), Nr. 26, S. 13095–13100
- [115] DUFRESNE, E. R.; GRIER, D. G.: Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics. In: *Review of Scientific Instruments* 69 (1998), Nr. 5, S. 1974–1977
- [116] DUFRESNE, E. R.; SPALDING, G. C.; DEARING, M. T.; SHEETS, S. A.; GRIER, D. G.: Computer-generated holographic optical tweezer arrays. In: *Review of Scientific Instruments* 72 (2001), Nr. 3, S. 1810–1816
- [117] MEJEAN, C. O.; SCHAEFER, A. W.; BUCK, K. B.; KRESS, H.; SHUNDROVSKY, A.; MERRILL, J. W.; DUFRESNE, E. R.; FORSCHER, P.: Elastic coupling of nascent apCAM adhesions to flowing actin networks. In: *PLOS ONE* 8 (2013), Nr. 9, S. e73389

-
- [118] MEJEAN, C. O.; SCHAEFER, A. W.; MILLMAN, E. A.; FORSCHER, P.; DUFRESNE, E. R.: Multiplexed force measurements on live cells with holographic optical tweezers. In: *Optics Express* 17 (2009), Nr. 8, S. 6209–6217
- [119] BERGHOFF, K.; KELLER, S.; GROSS, W.; GEBHARDT, L.; KRESS, H.: Application of Optical tweezers for biochemical and thermal cell stimulation. In: GLÜCKSTAD, J. (Hrsg.); PALMA, D. (Hrsg.): *Light Robotics-Structure-mediated Nanobiophotonics*. 1. Elsevier, 2017, Kapitel 13, S. 385–410
- [120] MAHAMDEH, M.; CAMPOS, C. P.; SCHÄFFER, E.: Under-filling trapping objectives optimizes the use of the available laser power in optical tweezers. In: *Optics Express* 19 (2011), Nr. 12, S. 11759–11768
- [121] CROCKER, J. C.; GRIER, D. G.: Methods of digital video microscopy for colloidal studies. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 179 (1996), Nr. 1, S. 298–310
- [122] HARMON, D. R.; ZARAFONETIS, C.; CLARK, P. F.: Temperature relations in phagocytosis. In: *Journal of Bacteriology* 52 (1946), Nr. 3, S. 337
- [123] SABRI, A. Z.: *Masterarbeit: Cellular decision making during phagocytosis*. 12 2015. – AG Biologische Physik, Universität Bayreuth
- [124] LEWIS, J.: Fast normalized cross-correlation. In: *Industrial Light & Magic* 2011 (1995), S. 15–19
- [125] JONKMAN, J. E.; SWOGER, J.; KRESS, H.; ROHRBACH, A.; STELZER, E. H.: Resolution in optical microscopy. In: *Methods in Enzymology* 360 (2003), S. 416–446
- [126] WADA, Y.; BABA, S. A.; KAMIMURA, S.: Effects of the dynein inhibitor ciliobrevin on the flagellar motility of sea urchin spermatozoa. In: *Cytoskeleton* 72 (2015), Nr. 4, S. 182–192
- [127] AVASTHI, P.; ONISHI, M.; KARPIAK, J.; YAMAMOTO, R.; MACKINDER, L.; JONIKAS, M. C.; SALE, W. S.; SHOICHET, B.; PRINGLE, J. R.; MARSHALL, W. F.: Actin is required for IFT regulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Current Biology* 24 (2014), Nr. 17, S. 2025–2032
- [128] ZAHN, C.; KELLER, S.; TORO-NAHUEL PAN, M.; DORSCHT, P.; GROSS, W.; LAUMANN, M.; GEKLE, S.; ZIMMERMANN, W.; SCHÜLER, D.; KRESS, H.: Measurement of the magnetic moment of single *Magnetospirillum gryphiswaldense* cells by magnetic tweezers. In: *Scientific Reports* 7 (2017)
- [129] ZHOU, T.; ZHANG, K.; KAMRA, T.; BÜLOW, L.; YE, L.: Preparation of protein imprinted polymer beads by pickering emulsion polymerization. In: *Journal of Materials Chemistry B* 3 (2015), Nr. 7, S. 1254–1260
- [130] GREVE, C.: *Bachelorarbeit: Untersuchung phagosomaler Transporteffizienz in Abhängigkeit von der Phagosomengröße*. 10 2015. – AG Biologische Physik, Universität Bayreuth
- [131] KUHN, M.: The microtubule depolymerizing drugs nocodazole and colchicine inhibit the uptake of *Listeria monocytogenes* by P388D1 macrophages. In: *FEMS Microbiology Letters* 160 (1998), Nr. 1, S. 87–90

- [132] KELLER, S.; BERGHOFF, K.; KRESS, H.: Phagosomal transport depends strongly on phagosome size. In: *Scientific Reports* 7 (2017), Nr. 1, S. 17068
- [133] LIN, C.; ESPREAFICO, E.; MOOSEKER, M.; FORSCHER, P.: Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. In: *Neuron* 16 (1996), Nr. 4, S. 769–782
- [134] SWANSON, J. A.: Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (2008), Nr. 8, S. 639
- [135] SWANSON, J. A.; JOHNSON, M. T.; BENINGO, K.; POST, P.; MOOSEKER, M.; ARAKI, N.: A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. In: *Journal of Cell Science* 112 (1999), Nr. 3, S. 307–316
- [136] CLERI, F.: *The physics of living systems*. Springer, 2016
- [137] STIEHL, O.; WEISS, M.: Heterogeneity of crowded cellular fluids on the meso- and nanoscale. In: *Soft Matter* 12 (2016), Nr. 47, S. 9413–9416
- [138] LIN, C.-H.; FORSCHER, P.: Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. In: *Neuron* 14 (1995), Nr. 4, S. 763–771
- [139] GARDEL, M. L.; SABASS, B.; JI, L.; DANUSER, G.; SCHWARZ, U. S.; WATERMAN, C. M.: Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed. In: *Journal of Cell Biology* 183 (2008), Nr. 6, S. 999–1005
- [140] GAL, N.; LECHTMAN-GOLDSTEIN, D.; WEIHS, D.: Particle tracking in living cells: a review of the mean square displacement method and beyond. In: *Rheologica Acta* 52 (2013), Nr. 5, S. 425–443
- [141] HAAF, M.: *Bachelorarbeit: Optimierung und Charakterisierung einer magnetischen Pinzette zur Messung intrazellulärer Transportkräfte*. 6 2017. – AG Biologische Physik, Universität Bayreuth
- [142] WIELAND, S.: *Bachelorarbeit: Entwicklung einer Methode zur Messung von Transportkräften kleiner Organellen in Zellen*. 12 2017. – AG Biologische Physik, Universität Bayreuth
- [143] HOFBAUER, S.: *Masterarbeit: Untersuchung des Einflusses von Dynein auf phagosomale Transportkräfte*. 03 2018. – AG Biologische Physik, Universität Bayreuth
- [144] ERICKSON, R. P.; JIA, Z.; GROSS, S. P.; CLARE, C. Y.: How molecular motors are arranged on a cargo is important for vesicular transport. In: *PLOS Computational Biology* 7 (2011), Nr. 5, S. e1002032
- [145] ALI, M.; VILFAN, A.; TRYBUS, K.; WARSHAW, D.: Cargo transport by two coupled myosin Va motors on actin filaments and bundles. In: *Biophysical Journal* 111 (2016), Nr. 10, S. 2228–2240
- [146] KING, S. J.; SCHROER, T. A.: Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. In: *Nature Cell Biology* 2 (2000), Nr. 1, S. 20
- [147] MALLIK, R.; PETROV, D.; LEX, S.; KING, S.; GROSS, S.: Building complexity: an in vitro study of cytoplasmic dynein with in vivo implications. In: *Current Biology* 15 (2005), Nr. 23, S. 2075–2085

- [148] XU, J.; KING, S. J.; LAPIERRE-LANDRY, M.; NEMEC, B.: Interplay between velocity and travel distance of kinesin-based transport in the presence of tau. In: *Biophysical Journal* 105 (2013), Nr. 10, S. L23–L25
- [149] YOKOKAWA, R.; TARHAN, M. C.; KON, T.; FUJITA, H.: Simultaneous and bidirectional transport of kinesin-coated microspheres and dynein-coated microspheres on polarity-oriented microtubules. In: *Biotechnology and Bioengineering* 101 (2008), Nr. 1, S. 1–8
- [150] KLUMPP, S.; LIPOWSKY, R.: Cooperative cargo transport by several molecular motors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (2005), Nr. 48, S. 17284–17289
- [151] HARTMANN, R.; WEIDENBACH, M.; NEUBAUER, M.; FERY, A.; PARAK, W. J.: Stiffness-dependent in vitro uptake and lysosomal acidification of colloidal particles. In: *Angewandte Chemie International Edition* 54 (2015), Nr. 4, S. 1365–1368
- [152] KOESE, G.: *Bachelor thesis: Phagosomal acidification in relation to the phagosome-Size*. 1 2017. – AG Biologische Physik, Universität Bayreuth
- [153] KRESS, H.; PARK, J.-G.; MEJEAN, C. O.; FORSTER, J. D.; PARK, J.; WALSE, S. S.; ZHANG, Y.; WU, D.; WEINER, O. D.; FAHMY, T. M. u. a.: Cell stimulation with optically manipulated microspheres. In: *Nature Methods* 6 (2009), Nr. 12, S. 905

Publikationen

Artikel

1. Keller, S., Berghoff, K. und Kress, H., 2017. Phagosomal transport depends strongly on phagosome size. *Scientific reports*, 7(1), p.17068.
2. Berghoff, K., Keller, S., Gross, W., Gebhardt, L. und Kress, H., 2017. Application of optical tweezers for biochemical and thermal cell stimulation. In Glückstad, J. und Palima, D., Editoren. *Light Robotics-Structure-mediated Nanobiophotonics*, Kapitel 13, p.385-41. Elsevier, 1. Edition
3. Zahn, C., Keller, S., Toro-Nahuelpán, M., Dorscht, P., Gross, W., Laumann, M., Geckle, S., Zimmermann, W., Schüler, D. und Kress, H., 2017. Measurement of the magnetic moment of single *Magnetospirillum gryphiswaldense* cells by magnetic tweezers. *Scientific Reports*, 7(1), p.3558.
4. Keller, S. und Kress, H., 2019. Actin-based motility strongly influences the transport of small phagosomes. *In Vorbereitung*.

Konferenzbeiträge

1. Keller, S., Berghoff, K. und Kress, H., 2015. Characterization of intracellular phagosome transport. *DPG Frühjahrstagung 2015 - Fachverband Biologische Physik*, Berlin
2. Keller, S., Berghoff, K. und Kress, H., 2016. Phagosomes of different size show qualitatively different transport characteristics. *DPG Frühjahrstagung 2016 - Fachverband Biologische Physik*, Regensburg
3. Keller, S., Berghoff, K. und Kress, H., 2016. Phagosomes of different size show qualitatively different transport characteristics. *7th BZM PhD Student Symposium*, Selb
4. Keller, S., Berghoff, K. und Kress, H., 2017. Phagosomes of different size show qualitatively different transport characteristics. *Biophysical Society 61st Annual Meeting*, New Orleans, Louisiana
5. Keller, S., Berghoff, K. und Kress, H., 2018. Size-dependent phagosomal transport depends on microtubules, actin filaments and associated motors. *DPG Frühjahrstagung 2018 - Fachverband Biologische Physik*, Berlin
6. Keller, S., Berghoff, K. und Kress, H., 2018. Size-dependent phagosomal transport depends on microtubules, actin filaments and associated motors. *Dutch Biophysics 2018*, Veldhoven

Danksagung

Ich bin dankbar für all die Unterstützung, die ich in den Jahren meiner Doktorandenzeit erfahren habe und die Möglichkeiten, welche mir währenddessen zur Verfügung gestellt wurden. Sie bilden die Basis für die erfolgreiche Promotion und die Erstellung der vorliegenden, von der Universität Bayreuth zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Abhandlung. Ich möchte diese Gelegenheit nutzen und im Besonderen folgenden Personen meinen Dank aussprechen:

Professor Dr. Holger Kress, meinem Doktorvater und Supervisor, welcher den Grundstein für die vorliegende Dissertation und die entsprechenden Forschungsarbeiten legte, mein Interesse für die Verwendung optischer Fallen zur Untersuchung der Phagozytose in Säugetierzellen weckte und mir die Möglichkeit bot, Teil einer wachsenden Biophysikgemeinde zu werden. Ich bedanke mich für viele Jahre erfolgreicher Zusammenarbeit, großen Freiheiten bei der Verwirklichung neuer Ideen und weiterführenden Experimenten, uneingeschränkt entgegengebrachtem Vertrauen in Kombination mit einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre, vielfältiger konstruktiver Unterstützung im Rahmen der eigenen Forschungsarbeit sowie einer immer offenen Tür bei auftretenden Fragen oder zu lösenden Problemen.

Professor Dr. Gareth Wyn Griffiths, welcher sich als externer Experte auf dem Gebiet der Phagozytose und Bewegung molekularer Motoren bereit erklärte die vorliegende Arbeit zu begutachten sowie die weite Anreise von Oslo nach Bayreuth auf sich zu nehmen, um an dem Promotionskolloquium teilnehmen zu können. Vielen Dank für hilfreiche, aufschlussreiche konstruktive Diskussionen über meine Forschung und die wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Professor Dr. Eva Herzig und **Professor Dr. Walter Zimmermann** für das entgegengebrachte Interesse an meiner Arbeit und der Auseinandersetzung mit einem sehr biologischen Thema im Bereich der Physik. Vielen Dank für die Teilnahme an meinem Promotionskolloquium als dritte Gutachterin sowie als Vorsitzender des Prüfungsausschusses.

Professor Dr. Matthias Weiss für die gemeinsame Nutzung der Labore, die unkomplizierten Möglichkeiten zur Verwendung vorhandener Geräte und Mikroskopieaufbauten sowie für die kollektive Arbeit beider Arbeitsgruppen in einem angenehmen und motivierenden gemeinsamen Arbeitsklima.

Dr. Konrad Berghoff für die Unterstützung meines Forschungsprojektes durch die Ergänzung von Messungen an einer magnetischen Pinzette, für die Grundsteinlegung der Arbeiten an der holografischen optischen Pinzette durch das gemeinsame Aufbauen, Justieren und stetigem Erweitern dieser, für kritische, aber immer konstruktive Diskus-

sionen, für all die gemeinsamen Jahre als Schreibtischnachbarn und für die persönliche Beziehung weit über ein kollegiales Verhältnis hinaus.

Den Doktoranden und Masterranden der Arbeitsgruppe biologische Physik Manuel Eisentraut, Wolfgang Gross, Anja Ramsperger und Simon Wieland für die gute Zusammenarbeit am Lehrstuhl und im Labor, die Hilfe bei diversen Experimenten und Analysen dieser, der Unterstützung während der Erstellung meiner Dissertation und einem allzeit freundschaftlichen Verhältnis auch über die reinen Belange der Arbeit hinaus. Außerdem allen weiteren aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe biologische Physik sowie des Lehrstuhls Experimentalphysik I für die Unterstützung bei vielfältigen Problemen und einer mehr als angenehmen Zeit in Bayreuth.

Gurbet Köse, Christopher Greve und Pamela Angerer für ihre unterstützenden Projekte, Messungen, Analysen und Arbeiten in direktem Zusammenhang mit dem von mir verfolgten Forschungsprojekt und die Zurverfügungstellung ihrer Daten zur weiterführenden Analyse und Verwendung.

Den aktuellen und ehemaligen medizinisch technischen Angestellten Pamela Angerer, Christina Gräbner, Andrea Hanold, Alexandra Stadler und Kathrin Weidner-Hertrampf für die umfangreiche Betreuung im Bereich des Nasslabors und der Zellkultur, für vielfältige Unterstützung vor allem die Grundlagen der Experimente betreffend, für weitreichende Diskussionen und Anregungen zur Verwirklichung der theoretisch geplanten Versuche sowie für die zuverlässige und hervorragende Pflege der Zellen. Außerdem allen weiteren Angestellten des Lehrstuhls für die Unterstützung bei den alltäglich anfallenden Problemen.

Rita Grotjahn und Martina Heider für die Vorbereitung und Hilfe bei der Durchführung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

All meinen Freunden hier in Bayreuth aus diversen Vereinen, den Spökos, Kommilitonen aus längst vergangenen Studienzeiten und einfach allen Freunden für so viel Abwechslung außerhalb der Welt der biophysikalischen Forschung und reichlich Motivation für lange Arbeitstage und anstrengenden Stunden im Labor.

Meinen Eltern **Anke & Peter Keller** dafür, dass sie immer für mich da sind, immer an mich glauben und mir diesen Weg in die Wissenschaft bis hin zu einem erfolgreichen Abschluss in einem solchen Rahmen ermöglicht haben. Außerdem meiner ganzen Familie und meiner Schwiegerfamilie sowie Lilly & Achim für die Unterstützung des Doktoranden in der Familie.

Abschließend meiner Frau und HPM **Vicki Keller** für einfach ausnahmslos alles.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich die Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe, noch künftig in Anspruch nehmen werde.

Zusätzlich erkläre ich hiermit, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe.