

Entwicklung einer Arbeitsstation zur
optischen Mikromanipulation und
Charakterisierung des Einflusses von
Aktin auf die Zellmechanik der
Phagozytose

Konrad Berghoff

2018

Entwicklung einer Arbeitsstation zur optischen Mikromanipulation und Charakterisierung des Einflusses von Aktin auf die Zellmechanik der Phagozytose

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

vorgelegt von
Konrad Berghoff
aus Werl

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Kress
 2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Weiss
- Tag der Einreichung: 21.11.2018
Tag des Kolloquiums: 21.03.2019

Zusammenfassung

Phagozytose ist ein essentieller Teil des Immunsystems und ein hochkomplexer, aktiver, durch Aktin-Remodellierung mediierter Prozess. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der zellmechanischen Untersuchung der Phagozytose mit Fokus auf der Rolle des Strukturproteins Aktin. Hierfür wird im ersten Teil eine - im Rahmen dieser Arbeit erstellte - Arbeitsstation zur Beobachtung von lebenden Zellen und zur zellmechanischen Untersuchung mittels holografischer optischer Fallen vorgestellt und diskutiert. Im zweiten Teil wird der biophysikalischen Fragestellung nachgegangen, inwieweit sich die Rolle von Aktin in den Phasen der Partikelinternalisierung und des nachfolgenden Phagosomtransports experimentell nachweisen und quantifizieren lässt. Aktinremodellierung ist ein wesentlicher Bestandteil der Phagozytose, die Längen- und Zeitskalen der Aktinremodellierung während der Phagozytose wurden bisher jedoch noch nicht eindeutig identifiziert. Ein besseres Verständnis dieser zellmechanischen Vorgänge der Phagozytose kann zur Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen beitragen und ist Ziel dieser Arbeit.

Zur Beantwortung dieser Fragen werden Techniken der Mikromanipulation und Mikroskopie verwendet. Eine Abnahme der globalen Phagozytose-Effizienz mit steigendem Grad der Inhibierung der Aktin-Polymerisierung in *J-774A.1*-Zellen wird durch Nachweis erfolgreicher Partikelinternalisierung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie gemessen. Mit Hilfe von holografischen optischen Fallen wird der Einfluss von Aktin auf die zellmechanischen Eigenschaften während der Partikelinternalisierung untersucht. Im Rahmen der Experiment-Limitierungen kann in *J-774A.1*-Zellen mit einem intakten Aktin-Netzwerk eine Zunahme der lokalen Zellsteifigkeit mit fortschreitender Partikelinternalisierung nachgewiesen werden, eine Änderung der Viskoelastizität der phagozytierenden Zellen ist in den Experimenten nicht feststellbar. Die Quantifizierung der Rolle von Aktin während des Partikeltransports erfolgt mit Hilfe von magnetischen Pinzetten. Die Inhibierung der Aktin-Polymerisierung hat hierbei eine Reduktion der Transportgeschwindigkeiten und eine Zunahme der Transportpausen zur Folge. Mit einer experimentellen Technik zur Beobachtung der Phagozytose im Zellprofil und einer experimentellen Anwendung der Kombination von Echtzeit-Partikeltracking mit rückgekoppelter Probenpositionierung werden zusätzliche Ansätze präsentiert, mit denen sich das Fortschreiten der Membranhüllung während der Partikelinternalisierung detailliert beobachten und spezifizieren lässt. Die präsentierten Ergebnisse weisen den direkten Einfluss von Aktin auf die Partikelinternalisierung und den Phagosomtransport zellmechanisch nach. Für eine hohe Phagozytose-Wahrscheinlichkeit und eine charakteristische Partikelauslenkung in Folge der Phagozytose ist eine intakte Aktin-Struktur notwendig. Die gemessenen Zeitskalen einer Zunahme der Zellsteifigkeit während der Partikelinternalisierung liegen in der Größenordnung von 10^2 s.

Abstract

Phagocytosis is an essential part of the immune system and a highly complex, active process. Among others, phagocytosis is mediated via a remodelling of the structural protein actin. In this thesis, the cell mechanics during phagocytosis are studied. The research focus lies on the role of actin during phagocytosis. In the first part of this thesis, a work station for live cell microscopy and the investigation of cellular mechanics via holographic optical traps is introduced and discussed. The second part of this thesis addresses the biophysical question of how to proof and quantify the role of actin during phagocytic uptake of the target particle and successive intracellular phagosomal transport. The length- and timescales of actin remodelling, a key part of phagocytosis, have not been clearly identified yet. A better understanding of such cellmechanical processes will help fighting autoimmune diseases and is an intention of this thesis.

To answer these questions, micromanipulation techniques and optical microscopy are used. A decrease of the global phagocytosis efficiency in *J-774A.1* cells with increasing grade of the inhibition of the actin polymerisation is measured with fluorescence microscopy. Holographic optical traps are used to investigate the mechanical properties of the cell during phagocytic uptake. Within the limitations of the experimental design, *J-774A.1* cells with undisturbed actin network show an increase of the local cell stiffness during phagocytic uptake. However, changes in the local viscoelasticity of the cells are not measured. The quantification of the role of actin during phagosomal transport is done via magnetic tweezers studies. Inhibition of actin polymerisation results in reduced transport velocities and increased pause phases during phagosomal transport. Finally, a technique for side-view observation of phagocytosis and a piezo stage feedback-loop based on real-time particle tracking are presented, which enable detailed studies of membrane wrapping during phagocytic uptake. The results of this thesis proof the direct influence of actin on particle internalisation and phagosomal transport via cell mechanical studies. An intact actin network is essential for efficient internalisation and a characteristic particle displacement during uptake. The time scales of an increase of the cellular stiffness during particle internalisation were measured to be in the order of 10^2 s.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Aufbau dieser Arbeit	3
2. Mikromanipulation von Zellen	5
2.1. Mikromanipulation mit optischen Fallen	6
2.1.1. Optische Kräfte	8
2.1.2. Kalibration von optischen Fallen	10
2.1.3. Holografische optische Fallen	13
2.1.3.1. Optische Fouriertransformation	14
2.1.3.2. Phasenmusterberechnung	15
2.2. Mikromanipulation mit magnetischen Pinzetten	17
3. Biologischer Hintergrund: Phagozytose	19
3.1. Phasen der Phagozytose	20
3.2. Offene Fragen	24
3.3. Motivation der wissenschaftlichen Fragestellungen dieser Arbeit	25
3.3.1. Aktinremodellierung während der Phagozytose	25
3.3.2. Messung von zellmechanischen Eigenschaften während der Phagozytose	26
3.3.3. Charakterisierung des Aktin-Einflusses auf die Phagozytose	27
4. Experimenteller Aufbau	29
4.1. Mikroskopie und Bildaufnahme	29
4.2. Piezotisch	32
4.3. Optischer Aufbau	32
4.4. Räumlicher Licht-Modulator	34
4.5. Kalibration der optischen Falle	38
4.6. Diskussion	39
5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose	43
5.1. Methoden und Materialien	43
5.1.1. Zellkultur und Probenvorbereitung	43
5.1.2. Partikelfunktionalisierung	46
5.1.3. Partikeltracking	46
5.1.4. Inhibierung der Aktin Polymerisation mit <i>Cytochalasin D</i>	48
5.2. Messung des Aktin-Einflusses auf die Phagozytose-Effizienz	49
5.2.1. Experimentelle Durchführung	49

Inhaltsverzeichnis

5.2.2.	Auswertung	51
5.2.3.	Ergebnisse	51
5.2.4.	Diskussion	52
5.3.	Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung	53
5.3.1.	Experimentelle Durchführung	54
5.3.2.	Auswertung	57
5.3.2.1.	Partikeltrajektorien und Anbindezeitpunkt	57
5.3.2.2.	Bestimmung der <i>blinking</i> -Intervalle	58
5.3.2.3.	Zusammenhang zwischen Fallenmodulation und Partikelrelaxation	60
5.3.2.4.	Auswertung der <i>blinking</i> -Intervalle - Bestimmung der zellulären Viskoelastizität	62
5.3.2.5.	Zeitreskalierung	63
5.3.3.	Blinking mit <i>Live Tracking</i> -Routine	64
5.3.4.	Ergebnisse	66
5.3.5.	Diskussion	72
5.4.	Beobachtung der Phagozytose im Profil	81
5.4.1.	Experimentelle Durchführung	81
5.4.2.	Ergebnisse und Diskussion	83
5.5.	Messung des Aktin-Einflusses auf den Phagosomtransport	84
5.5.1.	Experimenteller Aufbau	84
5.5.2.	Experimentelle Durchführung	85
5.5.3.	Auswertung	86
5.5.4.	Ergebnisse	87
5.5.5.	Diskussion	90
5.6.	Zusammenfassung der Experimente und Ergebnisse	93
6.	Zusammenfassung und Ausblick	99
6.1.	Arbeitsstation zur Quantifizierung der Phagozytose	99
6.2.	Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose	100
6.3.	Ausblick	102
A.	Mikroskopobjektive, Kameras und technische Details des <i>Ti-E</i>-Mikroskops	105
B.	Bauteile und Justage des experimentellen Aufbaus	107
C.	Technische Details der SLM-Ansteuerung	111
D.	Zur Kalibration der optischen Falle	113
E.	Zur Bestimmung der Präzision des <i>tracking</i>-Algorithmus	115
F.	Berechnung der Phagozytose-Effizienz	117
G.	Zur Auswertung der <i>blinking traps</i> Experimente	121
G.1.	Ruhephasen der Partikeltrajektorien für $d=0,2\ \mu\text{m}$	121
G.2.	Zeitreskalierung der <i>blinking traps</i> Trajektorien	121
	Abkürzungsverzeichnis	125

Abbildungsverzeichnis	127
Tabellenverzeichnis	129
Literaturverzeichnis	131
Publikationen und Konferenzbeiträge	147
Danksagung	149
Eidesstattliche Versicherung	151

Einleitung

There are these two young fish swimming along and they happen to meet an older fish swimming the other way, who nods at them and says “Morning, boys. How’s the water?” And the two young fish swim on for a bit, and then eventually one of them looks over at the other and goes “What the hell is water?”

- **David Foster Wallace**, (1962-2008) -

Die Art und Weise naturwissenschaftlichen Erkenntnisgewinns hat sich im Laufe des letzten Jahrhunderts sehr stark verändert. So veröffentlichte Albert Einstein¹ im Jahre 1905, in seinem sogenannten *annus mirabilis*, gleich vier wissenschaftliche Abhandlungen, welche unser heutiges physikalisches Verständnis grundlegend veränderten („Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt“, „Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen“, „Zur Elektrodynamik bewegter Körper“ und „Ist die Trägheit eines Körpers von seinem Energieinhalt abhängig?“ in *Annalen der Physik* [1, 2, 3, 4]). An dem Nachweis von Gravitationswellen² im Jahre 2016, welche ebenfalls bereits von Einstein postuliert wurden [5], waren hingegen über tausend Wissenschaftler maßgeblich beteiligt („*Observation of gravitational waves from a binary black hole merger*“ in *Physical Review Letters* 116 [6]). Grundlegende wissenschaftliche Arbeiten einzelner Forscher werden immer seltener, kollaborative Arbeiten rücken in den Vordergrund. Dies lässt sich zum einen durch die stark gestiegenen technischen und experimentellen Anforderungen an Aufbauten und Messapparaturen erklären. Zum anderen erfordert die Beantwortung immer detaillierterer Fragestellungen in stark spezialisierten Themengebieten ein hohes Maß an interdisziplinärem Detailwissen. Diese Tendenzen zeigen sich in nahezu allen Bereichen der wissenschaftlichen Forschung. Im Fall der Biophysik lassen sich diese Aspekte unter anderem am Beispiel der Phagozytose aufzeigen.

Phagozytose, erstmalig systematisch untersucht von Elias Metchnikoff [7], bezeichnet den Prozess der zellulären Internalisierung und sukzessiven Zersetzung von großen Partikeln, wie zum Beispiel Pathogenen oder Bakterien, und ist ein essentieller Teil des vertebralen Immunsystems [8, 9, 10]. Eine erfolgreiche Phagozytose erfordert ein hochkomplexes, geregeltes Zusammenwirken

¹<https://www.nobelprize.org/> - Physik Nobel-Preis 1921 an A. Einstein für die Entdeckung des Photoeffekts, offizielle Seite des Nobel-Preises, Stand November 2018

²<https://www.nobelprize.org/> - Physik Nobel-Preis 2017 an B. C. Barish, K. S. Thorne, R. Weiss für ihre Beiträge zur Beobachtung von Gravitationswellen, offizielle Seite des Nobel-Preises, Stand November 2018

1. Einleitung

von aufeinanderfolgenden und sich gegenseitig bedingenden zellbiologischen, biochemischen und zellmechanischen Vorgängen. Zahlreiche Studien auf den Gebieten der Immunologie, Biophysik und/oder Zellbiologie tragen zu einem immer weiter fortschreitenden Verständnis der einzelnen Vorgänge bei [11, 10, 12]. So induzieren zum Beispiel sogenannte Transmembranrezeptoren durch Anbindung an das zu internalisierende Pathogen und ihre damit verbundenen Konformationsänderungen eine Reihe von aufeinanderfolgenden intrazellulären chemischen Reaktionen, beispielsweise Protein-Phosphorylierungen. Diese Signalkaskaden bewirken unter anderem eine Polymerisierung und Remodellierung von Aktinfilamenten und eine Rekrutierung der zur Internalisierung benötigten zusätzlichen Zellmembran entlang der Kontaktfläche zwischen Zelle und Pathogen [8, 9]. Die Vielzahl an der Identifizierung eines Pathogens beteiligten Rezeptoren und die zahlreichen damit verbundenen unterschiedlichen, zeitgleich ablaufenden Signalkaskaden [12] verdeutlichen die enorme Komplexität der Phagozytose und die Schwierigkeit der Identifizierung von Zusammenhängen. Viele der zur Phagozytose beitragenden Vorgänge und ihr genaues Zusammenspiel - genannt seien hier beispielsweise die Frage nach den Ursprüngen und dem Zusammenwirken der von der Zelle aufbrachten Kräfte, der Mechanismus der Phagosombildung nach vollständiger Membranhüllung des Pathogens oder die Rolle von Aktin während der verschiedenen Phasen der Phagozytose - bleiben daher bisher in vielen Teilen unverstanden [10, 13]. Die Kenntnis dieser Vorgänge der Phagozytose kann zu einem besseren Verständnis und damit zur Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen beitragen [11]. So lässt sich beispielsweise der sogenannte *Wiskott-Aldrich Syndrom* Immundefekt [14] unter anderem auf eine gestörte Aktin-Remodellierung und eine damit einhergehende beeinträchtigte Phagozytose [15] zurückführen. Die Längen- und Zeitskalen der Aktinremodellierung während der Phagozytose wurden bisher nicht eindeutig identifiziert und erst ansatzweise untersucht [16, 17]. Eine Fragestellung dieser Arbeit ist daher, wie sich die Rolle von Aktin während der Partikelinternalisierung und während des Phagosomtransports experimentell nachweisen und quantifizieren lässt.

Zur Beantwortung einiger der oben erwähnten offenen Fragen zur Phagozytose bedarf es eines hohen technischen Aufwandes. Zum Verständnis der natürlichen Vorgänge während der Phagozytose ist die Beobachtung der Zellen unter physiologischen Bedingungen für den Zeitraum notwendig, in dem die Phagozytose stattfindet. Messung und Quantifizierung von zellmechanischen Eigenschaften während der Phagozytose, wie zum Beispiel Membranspannung, Membrankrümmung oder involvierte intrazelluläre Kräfte, erfordern moderne Techniken der zellulären Mikromanipulation, wie zum Beispiel Mikropipetten und optische oder magnetische Pinzetten. Hohe zeitliche Messauflösungen und die Messung von intrazellulären Vorgängen lassen sich mit Hilfe von Hochgeschwindigkeitsmikroskopie in Kombination mit modernen bildgebenden Techniken wie Fluoreszenzmikroskopie von markierten Proteinen erreichen. Um die in diesen oder ähnlichen Untersuchungen erzeugten mitunter sehr großen Datenmengen effektiv verarbeiten zu können, bedarf es eines hohen Maßes an automatisierter Datenverarbeitung und -auswertung. Eine möglichst vielseitige Arbeitsstation zur zellmechanischen Untersuchung von Phagozytose an lebendigen Zellen kombiniert folglich viele der genannten Aspekte in einem einzelnen Aufbau.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine solche Arbeitsstation, welche die zellmechanische Untersuchung von Phagozytose an lebendigen Zellen und zelluläre Mikromanipulation mittels holografischer optischer Fallen ermöglicht, geplant, aufgebaut und charakterisiert. Mit optischen Fallen wurde die Phagozytose von funktionalisierten Partikeln in Maus-Makrophagen der Zelllinie *J-774A.1* präzise induziert und die zeitliche Entwicklung der Zellsteifigkeit der Kontaktregion zwischen Zellen und Partikeln während der fortschreitenden Partikelinternalisierung bestimmt. Mit Hilfe von

optischen Fallen und magnetischen Pinzetten wurde des Weiteren die Frage untersucht, inwieweit sich die Beteiligung von Aktin an Partikelinternalisierung und an den darauffolgenden intrazellulären Phagosomtransportprozessen mit Hilfe von zellmechanischen Kenngrößen charakterisieren lässt. Diese Arbeit ist dabei wie folgt strukturiert.

1.1. Aufbau dieser Arbeit

Kapitel 1 liefert eine kurze Einführung in die Thematik und erläutert den Aufbau dieser Arbeit. In Kapitel 2 werden die gängigen Techniken zur zellulären Mikromanipulation vorgestellt und in einen biophysikalischen Zusammenhang bezüglich relevanter Kräfte und Größenordnungen auf zellulärer Ebene gestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Techniken der (holografischen) optischen Falle (Abschnitt 2.1) und der magnetischen Pinzette (Abschnitt 2.2) werden detailliert diskutiert. Besonderer Fokus liegt hierbei auf der Erläuterung des physikalischen Prinzips von optischen Fallen, den Techniken zu ihrer Kalibration sowie der Theorie von holografischen optischen Fallen und ihrer experimentellen Realisierung mittels räumlicher Licht-Modulatoren (*spatial light modulators*).

In Kapitel 3 wird der biologische Hintergrund dieser Arbeit erläutert, beginnend mit einer kurzen Einführung in die Biologie und Zellmechanik der Phagozytose und Verweisen auf die zugehörige Fachliteratur. Zur besseren Systematisierung lässt sich der Prozess der Phagozytose in vier Phasen (Initiierung - Membranhüllung - Phagosombildung - Phagosomreifung) kategorisieren (Abschnitt 3.1). Mit den einzelnen Phasen verbundene bisher unbeantwortete wissenschaftliche Fragen (Abschnitt 3.2) und der Bezug zu dieser Arbeit (Abschnitt 3.3) werden vorgestellt. Der experimentelle Nachweis der Rolle von Aktin während der Partikelinternalisierung und des nachfolgenden Phagosomtransports sowie deren Quantifizierung soll in dieser Arbeit als zentrale Fragestellung dienen. Die gewählten experimentellen Herangehensweisen zur Beantwortung dieser Fragen werden in Kapitel 5 dargelegt.

Ein Großteil der durchgeführten Arbeiten bestand in der Planung, dem Aufbau und der Charakterisierung eines experimentellen Aufbaus zur Echtzeit-Messung von Phagozytose und optischer Mikromanipulation. Die Diskussion dieses Aufbaus, seiner wesentlichen Merkmale und Limitierungen sind Gegenstand des Kapitels 4.

Kapitel 5 beinhaltet die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Charakterisierung des Aktineinflusses und zur Messung der zellmechanischen Eigenschaften während der Phagozytose. Die Untersuchungen zum Aktineinfluss befassen sich mit der Bestimmung der Phagozytose-Effizienz von *J-774A.1*-Zellen (Abschnitt 5.2) und der Charakterisierung des intrazellulären Phagosomtransports (Abschnitt 5.5) unter verschiedenen Graden der Inhibierung der Aktin-Polymerisierung. Mit Hilfe von *blinking traps*-Experimenten werden die Entwicklung der Zellsteifigkeit und der Viskoelastizität der Zelle während der Phase der Partikelinternalisierung bestimmt (Abschnitt 5.3). Des Weiteren wird eine experimentelle Technik eingeführt, mit der sich die Phagozytose mit Hilfe der optischen Pinzette induzieren und gleichzeitig unter Beobachtung der Zelle im Profil studieren lässt (Abschnitt 5.4).

Abschließend werden in Kapitel 6 die zentralen Aspekte und Erkenntnisse dieser Arbeit zusammengefasst und aufbauend auf den in Kapitel 5 diskutierten Ergebnissen einige spannende Ansätze für weiterführende Studien vorgeschlagen.

Mikromanipulation von Zellen

Kräfte, die von Zellen - zum Beispiel extrazellulär per Membranrezeptoren oder intrazellulär durch molekulare Motoren - übertragen werden, liegen typischerweise in der Größenordnung einiger pN bis nN, wie an den in Tabelle 2.1 aufgelisteten Beispielen verdeutlicht wird. Zelluläre Kräfte dieser Größenordnung lassen sich mit einer großen Anzahl an experimenteller Techniken quantifizieren [18, 19].

Eine besondere Rolle wird hierbei den sogenannten Mikromanipulationstechniken zu Teil, weil diese eine direkte Kraftausübung auf die Zelle sowie eine direkte Zellinteraktion ermöglichen. Weit verbreitete Techniken zur Mikromanipulation sind optische Fallen (*optical traps* oder auch optische Pinzetten, *optical tweezers*, OT) [20], magnetische Pinzetten (*magnetic tweezers*, MT) [21] sowie das Rasterkraftmikroskop (*atomic force microscope*, AFM) [22, 23]. Eine direkte Kraftausübung erfolgt mit Hilfe des AFM durch direkten Kontakt der AFM-Spitze mit der zu vermessenden Probe [24, 25]. Die Auflösung und Sensitivität einer AFM-Messung hängt also stark von der Spitzenbeschaffenheit ab. Bei optischen und magnetischen Pinzetten erfolgt die Kraftübertragung und Kraftmessung indirekt mittels in den Kraftfeldern befindlicher Partikel. Die entsprechenden Kraftfelder werden hierbei durch optische, beziehungsweise magnetische Kräfte erzeugt. Eine Weiterentwicklung der magnetischen Pinzetten stellt die Technik der sogenannten *magnetic twisting cytometry* (MTC) dar [26, 27], welche durch Anwendung hochfrequenter wechselnder magnetischer Felder unter anderem die Messung von zellulären Spannungs-Verformungskurven und damit die Bestimmung des zellulären Elastizitätsmoduls ermöglicht. Ebenfalls zu den Techniken der zellulären Mikromanipulation zählen die Mikropipette (*micro pipette*, MP) [28, 16], welche die Zelle durch Erzeugung von Unterdruck an der Pipettenspitze festhält sowie Mikrofluidik-Kammern (*microfluidic channel*, MFC) [29, 30], mit denen sich unter anderem Scherkräfte an Zellen in einem Strömungsprofil messen lassen. Im Vergleich zu den bisher genannten Techniken erfolgt die Kraftausübung in den beiden letztgenannten Techniken auf die gesamte zu untersuchende Zelle, es lassen sich somit nur globale Zellparameter bestimmen. Eine Zusammenfassung der charakteristischen Merkmale und Unterschiede der hier kurz vorgestellten Techniken zur zellulären Mikromanipulation ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente der Mikromanipulation und Kraftmessung an Makrophagen wurden mit Hilfe von optischen Fallen und magnetischen Pinzetten durchgeführt, auf die in den folgenden Abschnitten dieses Kapitels daher genauer eingegangen wird. Die optische Falle wurde in der Realisierung als holografische optische Falle zur Induzierung der Phagozytose durch Herstellung des Zell-Partikel Kontakts und zur Charakterisierung des darauf-

2. Mikromanipulation von Zellen

Kraft	Größenordnung*	gemessen mit	Veröffentlichung
Haltekraft Dynein-Motor	1 pN	OT	[31]
Haltekraft Aktin-Filament	1 pN	OT	[32]
Haltekraft Kinesin-Motor	5 – 7 pN	OT	[33, 31]
$\alpha_5\beta_1$ Integrin-ECM Bindung	10 pN	AFM	[34]
Öffnen eines Membran Ionen-Kanals	10 pN	MT	[35]
Zell-Zell Wechselwirkungskraft zwischen Immunzellen	5 – 20 pN	OT	[36]
Kraft einer RNA Polymerase während der Transkription	25 pN	AFM	[37]
Bindungskraft Biotin-Streptavidin	250 pN	AFM	[38]
Kraft zwischen 2 DNA Strängen	1 nN	AFM	[39]
Haltekraft einer einfachen kovalenten Bindung	1 – 2 nN ($\approx \frac{1\text{eV}}{0,1\text{nm}}$)	AFM	[40]
Abreißkraft Fokaler Adhäsions-Kinasen (FAK)	10 nN	MT	[41]

Tabelle 2.1.: Ausgewählte Kräfte auf der zellulären Ebene. OT: optische Fallen, AFM: Rasterkraftmikroskop, MT: magnetische Pinzetten. (*) Die Angaben dienen zur Einordnung der Kräfte und wurden den jeweiligen Veröffentlichungen entnommen, genaue Details zu den jeweiligen experimentellen Quantifizierungen (zeitliche Auflösung, Belastungsrate, Messunsicherheiten etc.) finden sich in den Originalpublikationen.

folgenden zellulären Aufnahmeprozesses verwendet. Mit Hilfe der magnetischen Pinzette wurden bereits internalisierte Partikel ausgelenkt und das intrazelluläre Transportverhalten charakterisiert.

2.1. Mikromanipulation mit optischen Fallen

Das Bewegen und Fangen von Mikropartikeln durch Laserlicht wurde erstmals von Arthur Ashkin 1970 demonstriert¹ [42]. Mit Hilfe eines stark fokussierten Laserstrahls lassen sich in einem geeigneten Medium dielektrische Partikel in der Größenordnung der genutzten Wellenlänge dreidimensional manipulieren [43]. Aufgrund ihrer optischen Eigenschaften, insbesondere ihres hohen Brechungsindex [44, 45], werden zum optischen Fangen häufig Polystyrol- oder Silica-Partikel verwendet. Unter Berücksichtigung der experimentellen Voraussetzungen, wie zum Beispiel eine geeigneten Laser-Wellenlänge, das passende Medium und ausreichende Akzessibilität, lassen sich biologische Proben, wie zum Beispiel lebende Zellen und Bakterien, ebenfalls in optischen Fallen fangen, so dass sie überleben können und keine sichtbaren Konformationsänderungen erfahren [46, 47].

Seit den Arbeiten von Ashkin haben sich optische Fallen - oft auch optische Pinzetten (*optical tweezers*) genannt - zu einem vielgenutzten Werkzeug für physikalische und biologische Anwendungen entwickelt [48, 49, 50, 51], mit denen sich Kräfte in der Größenordnung pN bis nN erzeugen und messen lassen [52]. So konnten mit optischen Fallen unter anderem das Drehmoment der Flagellenrotation von *E.coli* Bakterien [53], die Haltekraft und Schrittlängen molekularer Motoren entlang Mikrotubuli [54, 33], die Filopodien-Retraktion von Makrophagen [55] oder die Kraft ei-

¹<https://www.nobelprize.org/> - Physik Nobel-Preis 2018 an A. Ashkin, G. Mourou und D. Strickland für bahnbrechende Erfindungen in der Laserphysik, *offizielle Seite des Nobel-Preises, Stand November 2018*

2.1. Mikromanipulation mit optischen Fallen

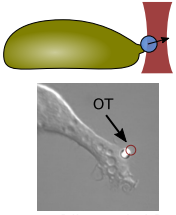
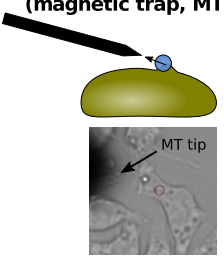
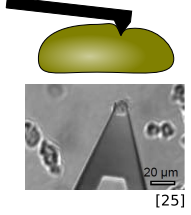
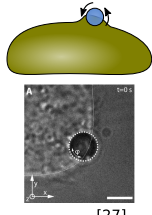
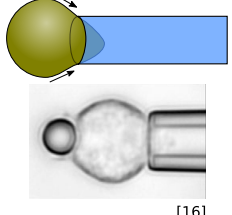
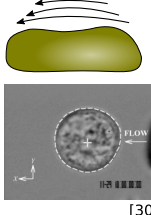
Technik	Optische Falle (optical trap, OT)	Magnetische Falle (magnetic trap, MT)	Rasterkraftmikroskop (atomic force microscope, AFM)
	 <p>[diese Arbeit]</p>	 <p>[121]</p>	 <p>[25]</p>
Kraftbereich	pN - nN	pN - 100 nN	pN - 100 nN
Kraft-lokalisierung	- an Testpartikel gebundene Strukturen, ~100 nm	- an Testpartikel gebundene Strukturen, ~100 nm	- durch AFM-Spitze bestimmt ~10 nm
Vorteile	- präzise Lokalisierung und 3D Kontrolle - nicht-invasiv - hohe zeitliche Auflösung	- sehr großer und variabler Kraftbereich - hohe zeitliche Auflösung - parallele Messungen möglich	- sehr großer und variabler Kraftbereich - hohe zeitliche Auflösung
Limitierungen	- Kraft beschränkt (< nN) - Aufheizen der Probe möglich	- unpräzise Partikelpositionierung - Kraftausübung unidirektional	- niedriger experimenteller Durchsatz - Präzision von AFM Spitze abhängig
typische Anwendungen	- 3D Manipulation - Kraftmessung von Membranrezeptoren	- intrazelluläre Kraftmessung, - Kraftmessung von Membranrezeptoren	- Messung von viskoelastischen Zelleigenschaften
Ausgewählte Referenzen	[20,50]	[84, 109, 121]	[25, 178]
Technik	Magnetic Twisting Cytometry (MTC)	Mikropipette (micro pipette, MP)	Mikrofluidik Kammern (microfluidic channel, MFC)
	 <p>[27]</p>	 <p>[16]</p>	 <p>[30]</p>
Kraftbereich	pN - 100 nN	pN - nN	pN - nN
Kraft-lokalisierung	- Bereich um Aktuatorpartikel ~ 1-10 µm	- gesamte Zelloberfläche ~ 10 µm	- gesamte Zelle ~ 10 µm
Vorteile	- Induzierung von Partikelrotation - großer Frequenzbereich - parallele Messungen möglich	- Einzelzellmessung in 3D	- parallele Messungen möglich
Limitierungen	- unpräzise Partikelpositionierung	- Messung globaler Parameter - beschränkte Zell-Akzessibilität	- Messung globaler Parameter - beschränkte Zell-akzessibilität
typische Anwendungen	- Mechanotransduktion, - Messung von Zytoskelett-Verformung	- Messung von Membran-spannungen - Phagocytic cup formation	- Ausüben von Scherkräften - Messung von Abreißkräften
Ausgewählte Referenzen	[17, 26, 112]	[16, 28, 176]	[29, 30]

Abbildung 2.1.: Techniken zur Mikromanipulation von Zellen und ihre wesentlichen Merkmale.

2. Mikromanipulation von Zellen

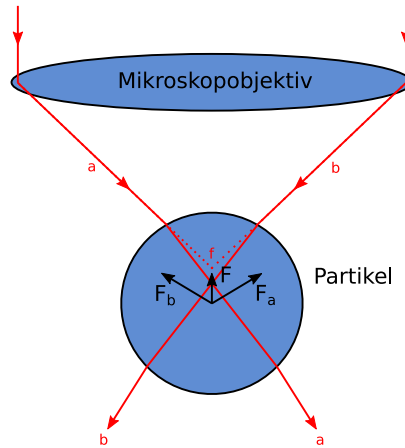


Abbildung 2.2.: Prinzipskizze einer *single beam gradient trap*. Für transparente Partikel mit Durchmesser $a \gg \lambda$ lässt sich das Prinzip der optischen Falle mit Hilfe der Strahlenoptik herleiten. Die Lichtbrechung der Strahlen a und b an der Partikeloberfläche erzeugt die in Richtung Laserfokus f gerichtete resultierende Kraft $F_a + F_b = F$, die gegen die Streukraft (nicht eingezeichnet) wirkt, und somit ein stabiles dreidimensionales Fangen des Partikels ermöglicht. F_a und F_b zeigen in Richtung des jeweiligen Impulsübertrags. Abbildung nach [63].

ner RNA-Polymerase während der Transkription [56] bestimmt werden. Durch die Kombination von optischen Fallen mit magnetischen Feldern zu sogenannten *magneto-optical traps* gelang das Kühlen und Fangen von einzelnen Atomen² [57]. Durch ihre stetige Weiterentwicklung und Verbesserung - zum Beispiel mit Hilfe optischer Phasenkonjugation [58], durch strukturierte Lichtfelder [59] und weitestgehende Automatisierung [60], insbesondere durch per Flächenlichtmodulatoren ansteuerbare holografische optische Fallen (siehe Kapitel 2.1.3) - bieten optische Fallen neuartige Möglichkeiten der Mikromanipulation im Bereich Biophotonik und Licht-Robotik [49, 61].

Das physikalische Prinzip einer optischen Falle basiert auf der Überwindung der durch den Strahlungsdruck des Laserlichts hervorgerufenen Streukraft, welche in Richtung des Energietransports des elektromagnetischen Feldes wirkt. Dies kann, wie bereits in den Arbeiten von Ashkin demonstriert, durch Wand- oder Gravitationskräfte, durch einen zweiten gegenläufigen Laserstrahl oder durch die Erzeugung eines starken Intensitätsgradienten der Lichtverteilung realisiert werden [42, 62].

Der zuletzt genannte Fall einer sogenannten *single beam gradient trap* lässt sich für transparente Partikel, deren Durchmesser mit $a \gg \lambda$ signifikant größer als die Wellenlänge des zum optischen Fangen benutzten Lasers sind (Mie-Regime) und deren Brechungsindizes n signifikant größer als die des umgebenden Mediums, mit Hilfe der Strahlenoptik herleiten [43, 63]. Aufgrund des Impulsübertrags der Lichtverteilung auf das Partikel resultiert eine der Steukraft entgegengerichtete Kraftkomponente F , wie in Abbildung 2.2 skizziert. Eine Herleitung der optischen Kräfte für kleine Partikel mit $a \ll \lambda$ liefert der folgende Abschnitt.

2.1.1. Optische Kräfte

Für sphärische Partikel, deren Durchmesser mit $a \ll \lambda$ signifikant kleiner als die Wellenlänge des zum optischen Fangen benutzten Lasers sind, lassen sich die auf das Partikel wirkenden optischen

²<https://www.nobelprize.org/> - Physik Nobel-Preis 1997 an S. Chu, C. Cohen-Tannoudji und W. D. Phillips für die Entwicklung von Methoden zum Kühlen und Fangen von Atomen, *offizielle Seite des Nobel-Preises*, Stand November 2018

Kräfte mit Hilfe der Rayleigh Näherung herleiten [64, 65, 66]. Die Partikel, an denen die Lichtstreuung erfolgt, werden in der Rayleigh Näherung als Ansammlung mikroskopischer Dipole in einem elektrischen Feld \mathbf{E} ausgedrückt. Demnach besitzt ein Dipol mit Volumenelement V und Brechungsindex n_p das Dipolmoment \mathbf{p} mit

$$\mathbf{p} = \epsilon_0 n_m^2 V \alpha \mathbf{E} , \quad (2.1)$$

wobei ϵ_0 die Permittivität, n_m der Brechungsindex des umgebenden Mediums und α die Polarisierbarkeit mit $\alpha = 3 \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2}$ und $m = n_p/n_m$ mit $m > 1$ bedeuten. Das durch das Laserlicht auf den Dipol wirkende elektromagnetische Feld erzeugt eine Lorentz-Kraft \mathbf{F}_d mit [65, 67]

$$\mathbf{F}_d = (\mathbf{p} \cdot \nabla) \mathbf{E} + \frac{\partial \mathbf{p}}{\partial t} \times \mathbf{B} . \quad (2.2)$$

Durch Einsetzen der Vektoridentität $(\mathbf{E} \cdot \nabla) \mathbf{E} = \frac{1}{2} \nabla E^2 - \mathbf{E} \times (\nabla \times \mathbf{E})$ und des Faradayschen Gesetzes $\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t}$ lässt sich (2.2) mit (2.1) umformulieren zu

$$\mathbf{F}_d = \epsilon_0 n_m^2 V \alpha \left(\frac{1}{2} \nabla E^2 + \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \times \mathbf{B} \right) . \quad (2.3)$$

Monochromatische elektromagnetische Wellen mit einer Feldverteilung $\mathbf{E}(\mathbf{x}, t) = \mathbf{E}_0(\mathbf{x}) \exp^{i\omega t}$ am Ort $\mathbf{x} = (x, y, z)$ oszillieren mit sehr großen optischen Frequenzen (für $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ist $\omega = 2\pi c \lambda^{-1} \approx 1,7 \cdot 10^{15} \text{ s}^{-1}$), so dass die Mittelung über ein großes Zeitintervall eine Vielzahl an optischen Zyklen beinhaltet und somit der zweite Term in (2.3) verschwindet [67] mit

$$\mathbf{F}_d = \frac{\epsilon_0 n_m^2 V \alpha}{4} \nabla E_0^2(\mathbf{x}) . \quad (2.4)$$

Hierbei wurde die zeitliche Mittelung $\langle \mathbf{F}_d(\mathbf{x}, t) \rangle_t = \frac{\text{Re}\{\epsilon_0 n_m^2 V \alpha \nabla |\mathbf{E}|^2\}}{4}$ verwendet. Die auf das gesamte dielektrische Partikel wirkende optische Kraft \mathbf{F} erhält man durch Integration der elektromagnetischen Kraftdichte $\mathbf{f} = \frac{\mathbf{F}_d}{V}$ über das Partikelvolumen

$$\mathbf{F} = \int_V \mathbf{f} dV = \frac{\epsilon_0 n_m^2 \alpha}{4} \int_V \nabla E_0^2 dV . \quad (2.5)$$

Das elektrische Feld \mathbf{E}_0 setzt sich aus einem einfallenden und einem am Partikel gestreuten Teil zusammen mit $\mathbf{E}_0 = \mathbf{E}_i + \mathbf{E}_s$. Damit und nach Anwenden des Gaußschen Integralsatzes lässt sich (2.5) auflösen zu

$$\mathbf{F} = \frac{\epsilon_0 n_m^2 \alpha}{4} \int_V \nabla |\mathbf{E}_i|^2 dV + \frac{\epsilon_0 n_m^2 \alpha}{4} \oint_{\partial V} \mathbf{n} (|\mathbf{E}_s|^2 + \mathbf{E}_i \mathbf{E}_s^* + \mathbf{E}_i^* \mathbf{E}_s) d\mathbf{A} . \quad (2.6)$$

Das erste (Volumen-)Integral beinhaltet somit nur noch die Komponente des einfallenden E-Feldes \mathbf{E}_i und ist proportional zum Intensitätsgradienten der E-Feld-Verteilung, es beschreibt daher die Gradientenkraft \mathbf{F}_{grad} . Für kleine Partikel, bei denen die Rayleigh-Gans-Näherung (Born-Näherung 1. Ordnung) gültig ist, lässt sich \mathbf{F}_{grad} mit dem Ausdruck $I_0(\mathbf{x}) = \frac{c \epsilon_0 n_m}{2} |E_i^2|$ für die einfallende Intensität vereinfachen zu [66]

$$\mathbf{F}_{\text{grad}} = \frac{n_m V \alpha}{2c} \nabla I_0(\mathbf{x}) . \quad (2.7)$$

2. Mikromanipulation von Zellen

\mathbf{F}_{grad} wirkt in Richtung des Intensitätsgradienten.

Das zweite (Oberflächen-)Integral in (2.6) drückt die Anteile des an der Partikeloberfläche mit Normalenvektor \mathbf{n} gestreuten E-Feldes \mathbf{E}_s aus und wird daher als Streukraft $\mathbf{F}_{\text{streu}}$ bezeichnet. Eine vereinfachte Darstellung von $\mathbf{F}_{\text{streu}}$ für sphärische Rayleigh-Partikel lässt sich gemäß [43] herleiten zu

$$\mathbf{F}_{\text{streu}} = \frac{n_m \mathbf{P}_{\text{streu}}}{c}, \quad (2.8)$$

wobei $\mathbf{P}_{\text{streu}}$ die gestreute Leistung bezeichnet. $\mathbf{F}_{\text{streu}}$ ist proportional zum durch den Poynting-Vektor $\mathbf{S} = \mathbf{E} \times \mathbf{B}$ beschriebenen Energiefluß und zeigt in \mathbf{S} -Richtung (siehe (2.3)). Für stabiles dreidimensionales optisches Fangen müssen die der Streukraft $\mathbf{F}_{\text{streu}}$ entgegengerichteten axialen Komponenten der Gradientenkraft \mathbf{F}_{grad} größer sein als der Betrag $|\mathbf{F}_{\text{streu}}|$ [43, 68].

Die in diesem Abschnitt diskutierten optischen Kräfte gelten für den Spezialfall sphärischer Partikel mit $a \ll \lambda$ und $n_p > n_m$. Für den allgemeinen Fall lässt sich die optische Kraft auf ein dielektrisches Streuobjekt ausdrücken durch [69, 70, 71]

$$\mathbf{F} = \int_V \frac{\epsilon_0 n_m \alpha^*}{2c} \nabla I_0(\mathbf{x}) dV + \frac{n_m}{c} I_0 (C_{\text{ext}} \langle \cos \theta_i \rangle - C_{\text{streu}} \langle \cos \theta_s \rangle) \mathbf{k} / |\mathbf{k}|, \quad (2.9)$$

wobei α^* die komplexe Polarisierbarkeit, I_0 die einfallende Intensität am Ort des Streuobjektes und C_{ext} und C_{streu} die Wirkungsquerschnitte für Extinktion und Streuung in stark fokussierten elektromagnetischen Feldern bedeuten. \mathbf{k} ist der Wellenvektor, $\langle \cos \theta_i \rangle$ und $\langle \cos \theta_s \rangle$ sind Asymmetriefaktoren [72], welche sich durch Mie-Streutheorie bestimmen lassen [73, 69].

Die Fangeffizienz \mathbf{Q} [69] mit

$$\mathbf{Q} = \mathbf{F} \frac{c}{P n_m} \quad (2.10)$$

beschreibt die Qualität einer optischen Falle unabhängig von der einfallenden Laserleistung P .

2.1.2. Kalibration von optischen Fallen

Bei optischen Fallen erfolgt die Kraftübertragung auf und die Kraftmessung an einer Lebzelle mit Hilfe eines optisch gefangenen Partikels. Im Gegensatz zu den Techniken der Kraftspektroskopie mit AFM oder Mikropipette erfolgt die Kraftmessung per optischer Falle also indirekt. Zur Kraftmessung ist entsprechend eine Kalibration der optischen Falle notwendig. In diesem Abschnitt werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Techniken zur Kalibration von optischen Fallen vorgestellt und diskutiert. Ausführlichere Zusammenfassungen über die Methodik zur Fallenkalibration liefern die Quellen [50, 74, 75].

Ein Maß für die Steifheit einer optischen Falle ist die Fallensteifigkeit oder *trap stiffness* $\kappa = (\kappa_x, \kappa_y, \kappa_z)$ mit

$$\kappa_x = \frac{\partial F_x}{\partial x}, \quad \kappa_y = \frac{\partial F_y}{\partial y}, \quad \kappa_z = \frac{\partial F_z}{\partial z}. \quad (2.11)$$

κ hängt nicht nur von den Falleneigenschaften, wie Laserleistung, Laserprofil und Numerischer Apertur (N.A.) des zum Fangen verwendeten Objektivs, sondern auch von den Eigenschaften des gefangenen Partikels (Größe, Brechungsindex, Oberflächenbeschaffenheit) sowie dem Brechungsindex des umgebenden Mediums und der Lage zur Probenoberfläche ab [63] und muss daher für jeden Einzelfall neu bestimmt werden. Im Falle eines harmonischen Fangpotentials ist κ konstant. Die *trap stiffness* lässt sich aus den thermischen Positionsfluktuationen eines optisch gefangenen

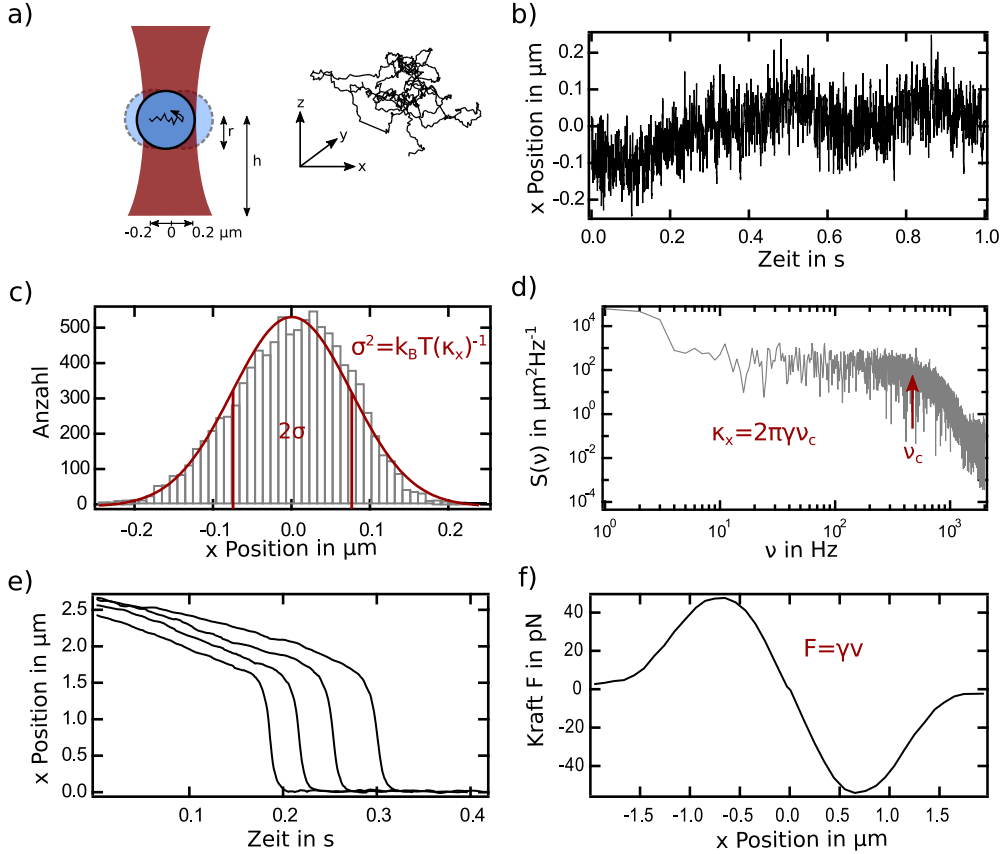


Abbildung 2.3.: Übersicht der Methoden zur Fallenkalibration. (a) Skizze und Trajektorie eines in der Höhe h optisch gefangenen Partikels mit Radius r . Anhand der auf innerhalb des Fangpotential beschränkten Partikelbewegung (hier $-0,2 \mu\text{m} \leq x \leq 0,2 \mu\text{m}$) lassen sich Rückschlüsse über die Stärke der optischen Falle ziehen. (b) Aus der Partikelbewegung berechnete eindimensionale Partikeltrajektorie als Funktion der Zeit ($2 \mu\text{m}$ großes Partikel, 10 kHz Bildrate). (c) Auftragung der Partikelpositionen aus (b) als Histogramm und Berechnung der Varianz σ^2 liefert die Fallensteifigkeit κ_x gemäß (2.12). (d) Leistungsspektrum $S(\nu)$ der Partikelbewegung aus (b) in doppelt logarithmischer Auftragung. Die charakteristische Frequenz ν_c ergibt sich aus einem Lorentzfit gemäß (2.13). (e-f) Bestimmung des Kraftprofils der optischen Falle mit Hilfe der *step response* Methode. (e) Relaxationen $x(t)$ eines zur Zeit $t = 0$ im Abstand $2,5 \mu\text{m}$ befindlichen Partikels in die Gleichgewichtsposition nach Einschalten der optischen Falle, dargestellt sind 4 sequentielle Relaxationen in $-x$ Richtung. (f) Aus den Momentangeschwindigkeiten der gesamten Partikelrelaxationen (in $\pm x$ Richtung) ergibt sich gemäß (2.14) das eindimensionale Kraftprofil. Alle Daten wurden mit Hilfe des in dieser Arbeit beschriebenen Aufbaus aufgenommen, genaue Details der Kalibrationsmessungen finden sich in Kapitel 4.

Partikels bestimmen. Für die eindimensionale Varianz σ^2 der Partikelposition gilt das Equipartitionstheorem [76, 50] mit

$$\frac{1}{2} k_B T = \frac{1}{2} \kappa_x \sigma^2 \quad (2.12)$$

unter Annahme eines harmonischen Fangpotentials. T ist die Proben temperatur, k_B die Boltzmann-Konstante. Ein in wässriger Lösung bei Raumtemperatur in einem harmonischen Fangpotential mit $\kappa_x = 100 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$ gefangenes Partikel vollzieht demnach Zitterbewegungen mit einer Standardabweichung der Größenordnung $\sigma \approx 6 \text{ nm}$. Nach (2.12) lässt sich die *trap stiffness* aus den Fluktuationen bestimmen, ohne dass Kenntnisse über die Viskosität η des Mediums oder über genaue Partikeleigenschaften und Partikelposition nötig sind. Allerdings fließen eventuelle Störfaktoren, wie zum Beispiel Laserdrift oder Rauschquellen, prinzipiell in die Berechnung von σ^2 mit ein, σ^2

2. Mikromanipulation von Zellen

ist also ein sogenannter *biased estimator* und liefert möglicherweise ein nicht erwartungstreu, unterschätztes Maß der *trap stiffness* [50].

Eine alternative Möglichkeit zur Bestimmung der *trap stiffness* liefert die Berechnung des Leistungsspektrums (*power spectrum*) $S_x(\nu)$ von in optischen Potentialen gefangenen Partikeln [77, 50]. $S_x(\nu)$ ergibt sich beispielsweise aus der Fourier-Transformation der Autokorrelation der Partikelbewegung (Wiener-Khinchin-Theorem [78]). Das einseitige *power spectrum* $S_x(\nu)$ der aus den Partikelfluktuationen berechneten Frequenzen ν lässt sich nach [77] aus der charakteristischen Frequenz ν_c und dem Stokes'schen Reibungskoeffizienten γ berechnen zu

$$S_x(\nu) = \frac{k_B T}{\gamma \pi^2 (\nu_c^2 + \nu^2)}. \quad (2.13)$$

Die charakteristische Frequenz mit $\nu_c = \kappa_x (2\pi\gamma)^{-1}$ beschreibt den Übergang der Frequenzen von innerhalb des optischen Potentials beschränkter Partikelbewegung ($\nu < \nu_c$) zu den Frequenzen der freien Partikeldiffusion ($\nu > \nu_c$) und ist somit mit der *trap stiffness* verknüpft [77].

Anhand einer Frequenzanalyse des Leistungsspektrums $S_x(\nu)$ lassen sich mögliche Störfaktoren, die die optische Falle beeinflussen, wie zum Beispiel Störfrequenzen elektronischer Bauteile, thermische Drift oder Pointing-Instabilitäten des Laser, identifizieren. Eine sorgfältige Interpretation des Leistungsspektrums eignet sich deshalb gut zur Fehlerbehebung und zu einer präzisen Kalibration der optischen Falle, kann jedoch aufgrund unvollständiger Kenntnis der Störeinflüsse sowie aufgrund zusätzlicher Effekte, wie zum Beispiel der Frequenzabhängigkeit der Reibungskraft, sehr aufwendig sein [79, 80]. Um das Leistungsspektrum bis hin zur maximal auftretenden Frequenz ν_{\max} korrekt darzustellen, ist eine Abtastung des Positionssignals mit ausreichend hoher Frequenz $\nu_{\text{Nyq}} \geq 2\nu_{\max}$ erforderlich (Nyquist-Theorem [77]), weshalb zur Fallenkalibration häufig Quadrantenphotodioden oder, wie in dieser Arbeit, Hochgeschwindigkeitskameras verwendet werden. Zusätzlich kann in manchen Fällen eine Fensterung des Eingangssignals notwendig werden [77].

Alternativ zur Bestimmung der Fallensteifigkeit lässt sich eine optische Falle durch ihr Kraftprofil charakterisieren. Das Kraftprofil der auf ein gefangenes Partikel wirkenden optischen Kraft lässt sich mit Hilfe der Stokes'schen Reibungskraft bestimmen [81, 82], welche für Partikelbewegung in Systemen niedriger Reynoldszahlen gegenüber vernachlässigbaren Trägheitseffekten der dominierende Faktor ist [83, 84]. Auf ein sphärisches Partikel mit Radius r , das sich mit einer Geschwindigkeit v in einem viskosen Medium bewegt, wirkt die Stokes'sche Reibungskraft F_{drag} mit

$$F_{\text{drag}} = \gamma \cdot v. \quad (2.14)$$

Zur Bestimmung des Kraftprofils ist die Kenntnis des Stokes'schen Reibungskoeffizienten γ mit

$$\gamma = 6\pi\eta\beta r \quad (2.15)$$

notwendig. r ist der Partikelradius und β ein Korrekturfaktor [85, 83], der mit

$$\beta = \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{r}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{r}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left(\frac{r}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{r}{h} \right)^5 \right]^{-1} \quad (2.16)$$

den Einfluss der Grenzfläche auf die Stokes Reibung beschreibt. Mit sinkendem Abstand h des gefangenen Partikels zur Probenunterseite nimmt die Stokes'sche Reibung aufgrund von Scherflüssen zu. Das laterale Fangprofil lässt sich gemäß (2.14) durch Anlegen einer viskosen Kraft F_{drag} , zum

Beispiel mit Hilfe eines periodisch verfahrenbaren motorisierten Probenstisches, und Messung der Partikelauslenkung bestimmen [82, 50]. Diese Methode der Fallenkalibration wird häufig als *drag force* Methode bezeichnet. Mit der *drag force calibration* lässt sich das Kraftprofil bis hin zur maximalen Kraft F_{\max} , die von der optischen Falle aufgebracht werden kann und bei Partikelauslenkungen x mit $x \approx r$ erreicht [63] wird, bestimmen. Im Falle $F_{\text{drag}} > F_{\max}$ entweicht das Partikel dem Fangpotential. Alternativ lässt sich das Fangprofil durch Messung der Partikelrelaxation $x(t)$ eines Partikels in die Gleichgewichtslage nach schneller Positionsänderung der optischen Falle und Berechnung des resultierenden Geschwindigkeitsprofils bestimmen [81]. Diese häufig als *step-response calibration* bezeichnete Methode ermöglicht bei geeigneter Parameterwahl, insbesondere der Partikelauslenkung, gegenüber der *drag force* Methode die Bestimmung des gesamten Kraftprofils, sowohl von harmonischen, als auch von nicht harmonischen Fallenpotentialen. Für reale Fangpotentiale ermöglicht die Bestimmung des Kraftprofils eine direkte Abschätzung des Bereiches, in dem die optische Kraft auf das Partikel annähernd linear mit der Partikelauslenkung verläuft und in dem das optische Fangpotential somit als harmonisch angenähert werden kann. Eine Übersicht der beschriebenen Methoden zur Kalibration einer optischen Falle liefert Abbildung 2.3.

2.1.3. Holografische optische Fallen

Eine Möglichkeit, die Funktionalität einer optischen Falle zu verbessern, ist das Generieren mehrerer Fangpositionen. Durch Nutzung mehrerer optischer Fallen lässt sich in geeigneten experimentellen Anordnungen somit der experimentelle Durchsatz erhöhen. Für viele Anwendungen von optischen Fallen ist eine Erhöhung der Fallenzahl intrinsisch notwendig. Zur kontrollierten Heranführung und Kraftmessung zwischen zwei Objekten werden beispielsweise mindestens zwei optische Fallen benötigt [86]. Die Charakterisierung der Bewegung eines einzelnen Myosin-Motors entlang eines Aktin-Filaments erfordert ebenfalls ein wohldefiniertes Festhalten der beiden Filament-Enden mit Hilfe zweier optischer Fallen [87]. Nicht sphärische, ausgedehnte Fangobjekte lassen sich mittels multipler optischer Fanggeometrien drehen und geometrisch ausrichten [88]. Durch die Kombination von holografischen optischen Fallen mit speziellen Partikeln, zum Beispiel mit stark aufheizbaren Partikeln oder Trägerpartikeln, welche chemische Botenstoffe in die Umgebung abgeben, lassen sich komplexe thermische bzw. chemische Gradientenfelder zur Zellstimulation erzeugen [89, 90].

Multiple optische Fanggeometrien lassen sich mechanisch und nichtmechanisch generieren. Mechanisch erzeugt werden Mehrfachfallen zum Beispiel durch den Einbau zusätzlicher Laserquellen [91], durch schnelle Positionsänderung der Fangposition mittels hochfrequenter Spiegel oder akustooptischer Deflektoren [92, 93] oder durch die Verwendung eines interferometrischen Aufbaus, welcher den einfallenden Laserstrahl in mehrere Strahlen aufteilt [94]. Nichtmechanisch lassen sich Mehrfachfallen beispielsweise durch die Methode des generalisierten Phasen-Kontrasts [95, 96] oder durch das Verwenden von diffraktiven optischen Elementen (DOE) [97, 98, 60] erzeugen. Ein DOE prägt der einfallenden kohärenten Wellenfront eine charakteristische Phasenmodulation auf, so dass das entstehende Interferenzmuster im Fernfeld der Fraunhofer-Beugung in eine entsprechende Amplitudenverteilung übergeht (wie in Abschnitt 2.1.3.1 beschrieben). Diese Art der Realisierung von optischen Fallen nutzt also den vollständigen Wellencharakter der Lichtwelle und wird daher als holografische optische Falle bezeichnet. Dynamische holografische optische Fallen lassen sich mit variablen computer-generierten DOEs, welche zum Beispiel mit Hilfe von räumlichen Licht-Modulatoren (*spatial light modulator*, SLM) dargestellt werden, generieren und steuern

2. Mikromanipulation von Zellen

[99, 60]. Die Berechnung der auf den SLM-Displays dargestellten Phasenmuster erfolgt mit Hilfe von Computer-Algorithmen [100, 101, 102].

2.1.3.1. Optische Fouriertransformation

Die Erzeugung von holografischen optischen Fallen mittels DOEs basiert auf dem Prinzip der optischen Fouriertransformation. In der Fourier-Optik lassen sich ebene Wellen mit komplexer Amplitude als Superposition von harmonischen Funktionen in Abhängigkeit der Raumfrequenzen ν_x, ν_y ausdrücken [67]. Die Raumfrequenzen sind definiert als $\nu_x = \frac{k_x}{2\pi}, \nu_y = \frac{k_y}{2\pi}$ und lassen sich in der paraxialen Näherung ($k_x \ll k, k_y \ll k$) mit den Einfallswinkeln θ_x, θ_y des Wellenvektors $\mathbf{k} = (k_x, k_y, k_z)$ mit $k = 2\pi\lambda^{-1}$ verknüpfen zu

$$\theta_x = \arcsin\left(\frac{k_x}{k}\right) = \arcsin \lambda \nu_x \stackrel{k_x \ll k, k_y \ll k}{\approx} \lambda \nu_x \quad (2.17)$$

(entsprechend $\theta_y \approx \lambda \nu_y$). Eine harmonische Funktion mit den transversalen Periodenlängen $\Lambda_x = \nu_x^{-1}, \Lambda_y = \nu_y^{-1}$ an der Stelle $z = 0$ entspricht einer ebenen Welle mit Ausbreitungsrichtung $\theta = (\theta_x, \theta_y)$. Für eine ebene Welle am Ort $\mathbf{r} = (x, y, z)$ mit komplexer Amplitude $U(x, y, z) = A \exp(-j\mathbf{k}\mathbf{r})$, wobei A die komplexe Einhüllende beschreibt, gilt

$$U(x, y, z) = \int \int_{-\infty}^{\infty} F(\nu_x, \nu_y) \exp[-i2\pi(\nu_x x + \nu_y y)] \exp(-ik_z z) d\nu_x d\nu_y . \quad (2.18)$$

Die komplexe Einhüllende $F(\nu_x, \nu_y)$ mit

$$F(\nu_x, \nu_y) = \int \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \exp[i2\pi(\nu_x x + \nu_y y)] dx dy \quad (2.19)$$

ist hierbei die Fouriertransformierte von $f(x, y)$ [67] mit

$$f(x, y) = \int \int_{-\infty}^{\infty} F(\nu_x, \nu_y) \exp[-i2\pi(\nu_x x + \nu_y y)] d\nu_x d\nu_y . \quad (2.20)$$

Mit Hilfe der Fouriertransformation lassen sich die komplexen Amplituden der ebenen Welle im Nahfeld $f(x, y, 0)$ und im Fernfeld $g(x', y', d)$ mit $d \gg 1$ in Beziehung setzen. In der Fraunhofer-Näherung ($\frac{a^2}{\lambda d} \ll 1, \frac{b^2}{\lambda d} \ll 1$ mit $x^2 + y^2 \ll a^2, x'^2 + y'^2 \ll b^2$) gilt

$$g(x', y') = c \cdot F\left(\frac{x'}{\lambda d}, \frac{y'}{\lambda d}\right) . \quad (2.21)$$

Die komplexe Amplitude $g(x', y')$ der ebenen Welle im Fernfeld ist proportional zur Fourier-Transformierten der harmonischen Funktion $f(x, y)$. Der Faktor c resultiert aus der Transferfunktion des freien Raums. Mit Hilfe einer Linse lässt sich das Fernfeld in der Fresnel-Näherung ($\frac{a^2 \theta^2}{4\lambda d} \ll 1$) ins Endliche holen, so dass die beiden Brennebenen der Linse die zugehörigen Fourier-Ebenen bilden. Eine direkte Manipulation der ebenen Welle am Ort $z = 0$, zum Beispiel durch ein diffraktives optisches Element, welches der transmittierten Welle eine Amplitudenverteilung aufprägt, oder durch Amplituden- und/oder Phasenmodulation per Flächenlichtmodulator (*spatial light modulator*, SLM) resultiert in eine wohldefinierte Amplitudenverteilung in der Fourier-Ebene. Dieses Prinzip wird in holografischen optischen Fallen zur Phasenmusterberechnung und Erzeugung komplexer Fanggeometrien genutzt.

2.1.3.2. Phasenmusterberechnung

Phasenmuster zur Erzeugung von dynamischen optischen Fanggeometrien lassen sich unter anderem mittels binärer Such-Algorithmen [102], dem *Gerchberg-Saxton* (GS) Algorithmus [101] oder, wie in dieser Arbeit realisiert, mit dem *Gratings and Lenses* (GL) Algorithmus [100] berechnen. Der GS-Algorithmus basiert auf der Bildung von Fouriertransformation und inverser Rücktransformation [101]. Mit Hilfe des GS-Algorithmus lässt sich nach einem iterativen Prinzip die Phasenverteilung bestimmen, mit der eine Intensitätsverteilung in der Bildebene (zum Beispiel eine ebene Welle) nach Aufmultiplikation in eine gewünschte Intensitätsverteilung in der Beugungsebene (zum Beispiel eine Welle unter einem Einfallswinkel θ) übergeht [60]. Analytisch lassen sich Phasenmuster anhand des *Gratings and Lenses* (GL) Algorithmus [100] berechnen. Eine laterale Ablenkung des einfallenden gaußförmigen Laserstrahls der Wellenlänge λ wird hierbei durch das Phasenmuster $\Phi_{\text{blaze}}(x, y)$ eines Blaze-Gitters mit

$$\Phi_{\text{blaze},j}(x, y) = \left(\frac{2\pi}{\Lambda_{x,j}}x + \frac{2\pi}{\Lambda_{y,j}}y \right) \mod 2\pi \quad (2.22)$$

induziert. $\Lambda_{x,j}$ und $\Lambda_{y,j}$ entsprechen den Periodizitäten des Blaze-Gitters in x- bzw. y-Richtung. Der Ablenkwinkel α_B des Laserstrahls wird hierbei durch die Bragg'sche Beugungsbedingung [67]

$$\sin \alpha_B = \frac{\lambda}{2\Lambda} \quad (2.23)$$

von der Gitterperiodizität Λ bestimmt. Eine axiale Verschiebung um die Länge Δz des Laserfokus lässt sich durch das Phasenmuster $\Phi_{\text{fresnel},j}(x, y)$ einer Fresnel-Linse mit

$$\Phi_{\text{fresnel},j}(x, y) = \Gamma_j \cdot (x^2 + y^2) \mod 2\pi \quad (2.24)$$

induzieren. $\Gamma_j = 2\pi\Delta z (\lambda f_{\text{eff}}^2)^{-1}$ ist hierbei ein von der effektiven Brennweite f_{eff} des optischen Systems abhängiger Faktor [60]. Mehrfach-Fang-Geometrien ergeben sich durch die phasenrichtige Addition der einzelnen, aus Blaze-Gitter und Fresnel-Linse zusammengesetzten Phasenmuster $\Phi_j = [(\Phi_{\text{blaze},j} + \Phi_{\text{fresnel},j}) \mod 2\pi]$ mit

$$\Phi(x, y) = \arg \sum_j \exp(i\Phi_j(x, y)) . \quad (2.25)$$

Die Intensitätsverteilung in der zugehörigen Fourier-Ebene der holografischen optischen Falle setzt sich entsprechend aus mehreren beugungslimitierten Laserfoki zusammen. Die im Rahmen dieser Arbeit geschriebene Software zur Berechnung von Phasenmustern und zur Steuerung der holografischen optischen Falle (siehe Anhang) basiert auf dem GL-Algorithmus. Das Prinzip der Berechnung von Phasenmustern mittels GL-Algorithmus, die entsprechend resultierenden Intensitätsverteilungen sowie die Anwendung dieser Intensitätsverteilung zur dreidimensionalen Partikelmanipulation zeigt Abbildung 2.4. Die dargestellten optischen Fallen wurden mit dem in Kapitel 4 beschriebenen Aufbau erzeugt und entsprechen typischen Anwendungen für Zellexperimente, vergleichbar mit den in dieser Arbeit diskutierten Experimenten. Die, insbesondere bei einer hohen Zahl generierter optischer Fallen, per GL-Methode berechneten Phasenmuster weisen eine hohe Symmetrie auf. Aufgrund dieser Symmetrie kommt es in den Intensitätsverteilungen häufig zu unerwünschten lokalen Intensitätsmaxima in höheren Beugungsordnungen, in denen Partikel gefangen werden können [103]. Eine deutliche Reduktion solcher sogenannter „Geisterfallen“ führt entsprechend zu

2. Mikromanipulation von Zellen

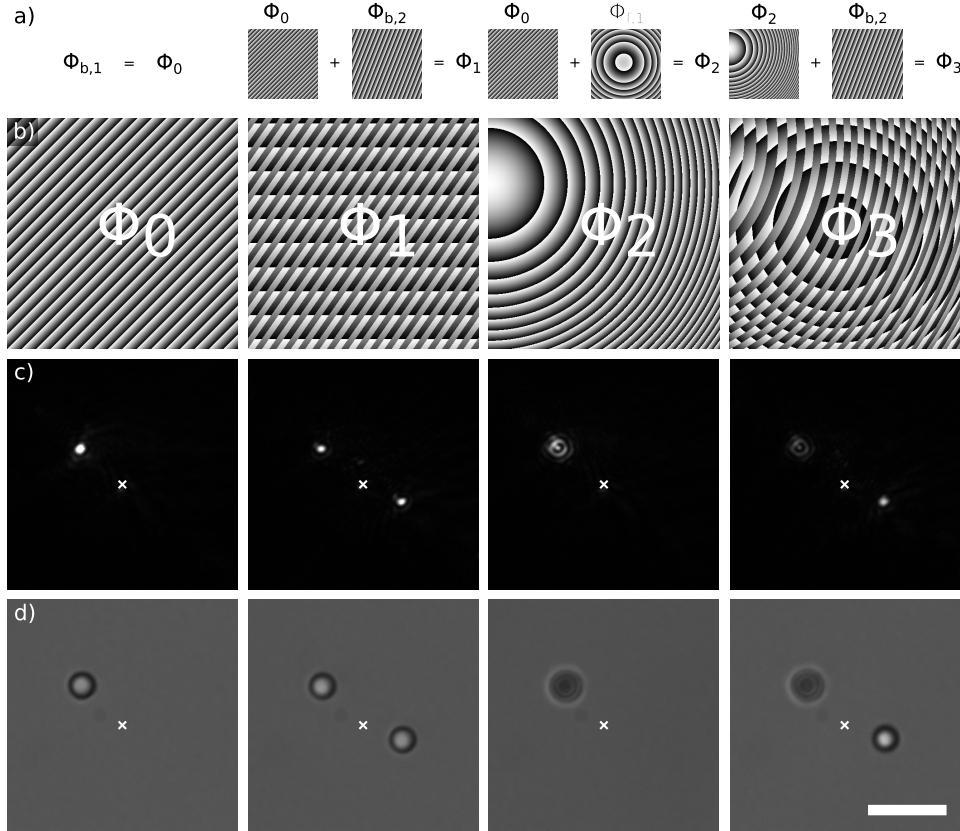


Abbildung 2.4.: Erzeugung von Mehrfach-Fanggeometrien mittels GL-Algorithmus. (a-d) verdeutlichen die Berechnung von in der Komplexität ansteigenden Phasenmustern ($\Phi_0 - \Phi_3$) und ihre Anwendung zur Erzeugung von Mehrfach-Fanggeometrien. (a) Grafische Darstellung der Berechnungsweise in Pseudocode gemäß Gleichungen (2.22 bis 2.25). (b) Die resultierenden Phasenmuster $\Phi_0 - \Phi_3$, dargestellt als 8bit-Grauwert Phasenmuster, wobei die Grauwerte 0 – 255 einer ansteigenden Phasenverschiebung zwischen 0 und 2π entsprechen. (c-d) Mikroskopbilder der Fokusebene bei Anwendung der Phasenmuster zur Ansteuerung der in dieser Arbeit verwendeten holografischen optischen Falle. (c) Reflexionen der Laserfoki an der Unterseite des Probendeckglases. (d) In den zugehörigen Fanggeometrien gefangene Partikel (Polystyrol, Durchmesser $3 \mu\text{m}$), *scale bar* $10 \mu\text{m}$. Die durch ein einfaches Blaze-Gitter $\Phi_{b,1}$ erzeugte Phasenmaske Φ_0 erzeugt eine laterale Verschiebung des Laserfokus aus der nullten Beugungsordnung (weißes Kreuz). Durch phasenrichtiges Addieren eines weiteren Blaze-Gitters (Φ_1), einer Fresnel-Linse zur z-Verschiebung (Φ_2) sowie durch Kombination von Blaze-Gittern und Fresnel-Linsen (Φ_3) lässt sich die Komplexität der Fanggeometrien sukzessive erhöhen.

einer höheren Beugungseffizienz in die gewünschten Ordnungen und lässt sich durch Verwendung des GS-Algorithmus erzielen. Effizientere Methoden erfordern beispielsweise den Einsatz speziell dazu entwickelter Fourier-Algorithmen oder *random mask encoding* [104, 103, 105]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf die Verwendung stark symmetrischer Phasenmuster weitestgehend verzichtet und die im Experiment verwendete Partikelkonzentration so eingestellt, dass der Einfluss von „Geisterfallen“ vernachlässigt werden kann.

2.2. Mikromanipulation mit magnetischen Pinzetten

Magnetische Pinzetten erzeugen mit Hilfe von Permanent- oder Elektromagneten - in der Regel inhomogene und wirbelfreie - magnetische Felder \mathbf{B} mit einem Feldgradienten $\nabla\mathbf{B} \neq 0$. Auf ein Partikel mit einem magnetischem Dipolmoment $\boldsymbol{\mu}$ wirkt im \mathbf{B} -Feld somit ein Drehmoment $\boldsymbol{\tau}$ mit [84]

$$\boldsymbol{\tau} = \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B} , \quad (2.26)$$

die auf das Partikel wirkende magnetische Kraft \mathbf{F}_{magn} lässt sich beschreiben durch [106]

$$\mathbf{F}_{\text{magn}} = (\boldsymbol{\mu} \cdot \nabla)\mathbf{B} . \quad (2.27)$$

Magnetische Pinzetten zur Zellmanipulation wurden erstmalig 1950 eingesetzt [107, 108] und ermöglichen im Vergleich zu optischen Fallen das Ausüben von sehr starken Kräften bis zu 100 nN [109], von sehr langreichweitigen Feldgradienten [110] sowie das Ausüben von Drehmomenten [111, 112].

In der Biophysik werden magnetische Pinzetten unter anderem für Rheologiemessungen zur Bestimmung von viskoelastischen Eigenschaften von Zellmembran oder Zytoplasma [113, 114, 115, 116], zur Messung von Abreißkräften [117, 118, 41] oder zur Bestimmung von magnetischen Momenten von Bakterien [119] verwendet. Durch Phagozytose-Studien mit magnetischen Pinzetten wurde die Stärke der Retraktionskräfte in Makrophagen-Protrusionen bis zu 5 nN bestimmt [117]. Zeitlich alternierende magnetische Felder ermöglichen unter anderem in *magnetic twisting cytometry* Aufbauten die Rotation von an die Zelle gebundener Partikel und die Charakterisierung des zellulären Antwortverhaltens [120, 17].

Die langreichweitigen magnetischen Felder der magnetischen Pinzette ermöglichen insbesondere das Ausüben intrazellulärer Stimuli durch Manipulation von internalisierten Partikeln [113, 26, 116]. Die in dieser Arbeit diskutierten Experimente zur Messung des Transportverhaltens von Phagosomen wurden daher mit Hilfe einer magnetischen Pinzette durchgeführt [121]. Weil in den in Abschnitt 5.5 diskutierten Experimenten die magnetische Falle in erster Linie als Werkzeug zur Partikelauslenkung vor der eigentlichen Messung des Transportverhaltens verwendet wurde und die Kenntnis der wirkenden magnetischen Kräfte für den weiteren Versuchsablauf irrelevant war, wird auf die Erläuterung der Kalibration magnetischer Pinzetten verzichtet. Ausführliche Übersichten über magnetische Pinzetten, Methoden zu ihrer Kalibration sowie weitere Anwendungen finden sich in den Quellen [84, 21]. Ein Foto der magnetischen Pinzette, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, und eine Skizzierung eines typischen Zellexperiments zeigt Abbildung 2.5. Eine detaillierte Beschreibung des experimentellen Aufbaus findet sich in Quelle [119].

2. Mikromanipulation von Zellen

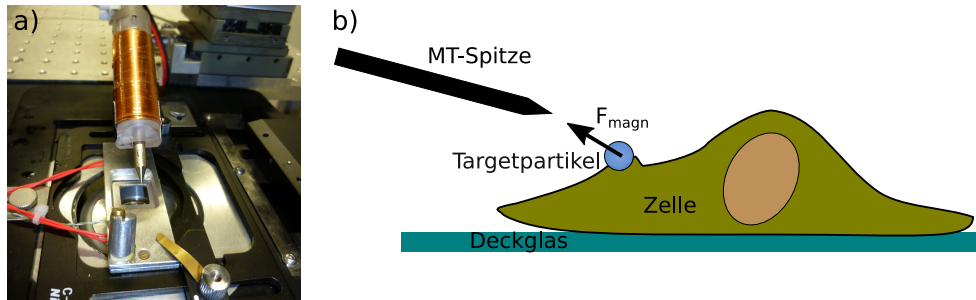


Abbildung 2.5.: Experimenteller Aufbau der magnetischen Pinzette. (a) Foto der in dieser Arbeit verwendeten magnetischen Pinzette. Die magnetische Pinzette besteht aus einer mit Kupferdraht umwickelten Mu-Metall-Spitze, die zur Zellmessung in eine beheizte Probenkammer eingetaucht wird. Die Kabel am linken Bildrand dienen zur Ansteuerung der Probenheizung. (b) Skizze einer typischen Experimentanordnung. Funktionalisierte magnetische Partikel, welche an der Oberfläche von Zellen angebunden sind, erfahren in Spitzennähe eine durch das \mathbf{B} -Feld hervorgerufene magnetische Kraft \mathbf{F}_{magn} in Richtung der Spitze. Eine detaillierte Beschreibung des experimentellen Aufbaus findet sich in Quelle [119].

Biologischer Hintergrund: Phagozytose

Phagozytose (griechisch: $\phi\alpha\gamma\epsilon\iota\nu$, *phagein* = „fressen“, *cytos* = „Zelle“) bezeichnet den Prozess der zellulären Aufnahme und, falls möglich, sukzessiven Zersetzung von Partikeln $\geq 0,5\ \mu\text{m}$, wie zum Beispiel Bakterien oder apoptotischen Zellen [8, 9, 10]. Deshalb ist Phagozytose ein wichtiger Teil der angeborenen Immunantwort in Lebewesen zur Bekämpfung von in den Körper eingedrungenen Krankheitserregern und Mikroorganismen. Phagozytose von toten körpereigenen Zellen mit der Möglichkeit zur teilweisen Wiederverwendung von zellulären Bestandteilen ist zudem ein essentieller Bestandteil der Homeostase und Embryogenese [122, 123]. In einzelligen Organismen, wie zum Beispiel des amöboiden Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum*, dient Phagozytose zur Nahrungsaufnahme [124].

Erstmals erkannt und systematisch beschrieben wurde die Bedeutung der Phagozytose gegen Ende des 19. Jahrhundert von Elias Metchnikoff. Metchnikoff legte mit seinen *Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation* [7] einen Grundstein der heutigen Immunologie, wofür ihm 1908 zusammen mit Paul Ehrlich der Nobelpreis verliehen wurde¹ [125]. Auch 100 Jahre später bleiben das Verständnis von angeborenem und adaptiven Immunsystem und der bei ihrer Regulierung involvierten Prozesse und Proteine hochrelevant und können unter anderem zur Krebstherapie beitragen^{2,3}[126, 127, 128].

Phagozytose ist ein spezifischer und aktiv durch Aktin-Remodellierung medierter Prozess [129, 130, 12]. Im Gegensatz zu den durch Makropinozytose beschriebenen alternativen Wegen, auf denen eine Zelle kleinere Partikel internalisieren kann, ermöglicht Phagozytose eine Internalisierung von größeren Objekten bis über $20\ \mu\text{m}$ [131].

Viele unterschiedliche Zelltypen, wie zum Beispiel Fibroblasten, Epithelzellen oder dendritische Zellen, sind neben ihrer eigentlichen Zellfunktion begrenzt phagozytose-fähig und werden als *nicht-professionelle* Phagozyten bezeichnet. Als *professionelle* Phagozyten werden dagegen Zellen angesehen, deren Hauptaufgabe die Phagozytose ist, wie zum Beispiel Monozyten, Neutrophile oder Makrophagen. Makrophagen nennt man im Gewebe ausdifferenzierte Monozyten, nachdem diese die Stelle der Infektion erreicht haben [132]. *Professionelle* Phagozyten weisen im Gegensatz zu

¹<https://www.nobelprize.org/> - Medizin Nobel-Preis 1908 an P. Ehrlich und E. Metchnikoff für ihre Arbeiten zur Immunität, *offizielle Seite des Nobel-Preises, Stand November 2018*

²<https://www.nobelprize.org/> - Medizin Nobel-Preis 2011 an B. A. Beutler, J. A. Hoffmann und R. M. Steinman für ihre Arbeiten zur angeborenen und adaptiven Immunität, *offizielle Seite des Nobel-Preises, Stand November 2018*

³<https://www.nobelprize.org/> - Medizin Nobel-Preis 2018 an J. P. Allison und T. Honko für die Entdeckung der Krebstherapie durch Inhibierung der negativen Immunregulierung, *offizielle Seite des Nobel-Preises, Stand November 2018*

3. Biologischer Hintergrund: Phagozytose

nicht-professionellen eine hohe Zahl spezifischer Transmembranrezeptoren zur Identifizierung potentieller Pathogene und Mikroorganismen auf [133]. Eine Vielzahl unterschiedlicher Pathogene und Mikroorganismen kann also von *professionellen* Phagozyten eindeutig erkannt und internalisiert werden. *Professionelle* Phagozyten tragen signifikant zur adaptiven Immunantwort des Organismus bei, weil sie die während der Pathogen-Degradierung extrahierten Antigene lymphatischen Zellen präsentieren [134]. Die Lymphozyten können somit effizient Antikörper sezernieren. Durch die große Zahl an Zytokinen, beziehungsweise Wachstumsfaktoren, können Phagozyten außerdem Entzündungen initiieren [135].

Die evolutionäre Entwicklung von phagozytosefähigen Zellen ist nicht vollständig geklärt und ist eng mit der Frage nach dem allgemeinen Ursprung von eukaryotischen Zellen verknüpft [136]. In der sogenannten *Endosymbiosentheorie* [137] wird die Entstehung der Mitochondrien, in denen die für den Metabolismus in Eukaryoten essentielle *ATP*-Synthese geregelt wird, durch die symbiotische Verbindung von aeroben Bakterien mit primitiven Vorläuferzellen der Eukaryoten beschrieben. Eine mögliche Erklärung des Zustandekommens dieser Symbiose ist eine Internalisierung der Bakterien durch eine Frühform phagozytose-fähiger Zellen [138]. Aufgrund der hohen Komplexität der Phagozytose, welche ein funktionierendes zelluläres Transportsystem erfordert und damit verbunden hohe energetische Ansprüche stellt, ist jedoch eine Entwicklung der Phagozytose nach Etablierung eines durch Vorläufer-Mitochondrien geregelten Energiesystems wahrscheinlich [136]. Phagozytose ist durch ein komplexes Zusammenspiel von koordinierten Zellprozessen, wie zum Beispiel Rezeptorrekrutierung- und -aktivierung, intrazelluläre Signalgebung und Membranremodellierung geregelt, und lässt sich in folgende vier Phasen unterteilen:

- i) *Initiierung*: spezifische Ligand-Rezeptorbindungen identifizieren das Ziel-Partikel und induzieren intrazelluläre Signalkaskaden.
- ii) *Membranhüllung*: Ausbildung des *phagocytic cup* durch Aktin-Remodellierung, Membranrekrutierung und sukzessive Ligand-Rezeptorbindungen entlang der Partikel-Oberfläche.
- iii) *Phagosombildung*: Vollständige Membranhüllung führt zur intrazellulären Ausbildung des Phagosoms.
- iv) *Phagosomreifung*: Phagosom-Fusionierung mit enzymatischen Lysosomen führt zu der sukzessiven Phagosom-Verdauung während des Phagosomtransports.

Diese vier Phasen sind in Abbildung 3.1 am Beispiel der $Fc\gamma$ -medierten Phagozytose von sphärischen Partikeln, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, in Makrophagen skizziert und werden im Folgenden genauer erläutert.

3.1. Phasen der Phagozytose

i) Initiierung

Der erste Schritt zur Initiierung der Phagozytose erfolgt durch das Anbinden des zu internalisierenden Partikels an die Zell-Rezeptoren eines Makrophagen (Abbildung 3.1a). Spezifische Rezeptor-Bindungen induzieren intrazelluläre Signalkaskaden und können so zu einer partikelspezifischen Zellaktivierung und Stimulation führen. Zur Differenzierung zwischen körpereigenen und körperfremden Zielen sowie zur eindeutigen Identifizierung verschiedener Pathogene besitzen Phagozyten ein komplexes System unterschiedlicher Zellrezeptoren [8, 139], welche im Zusammenspiel mit einer hohen Wahrscheinlichkeit das Pathogen identifizieren. Je nach Rezeptortyp besitzt eine Zelle Re-

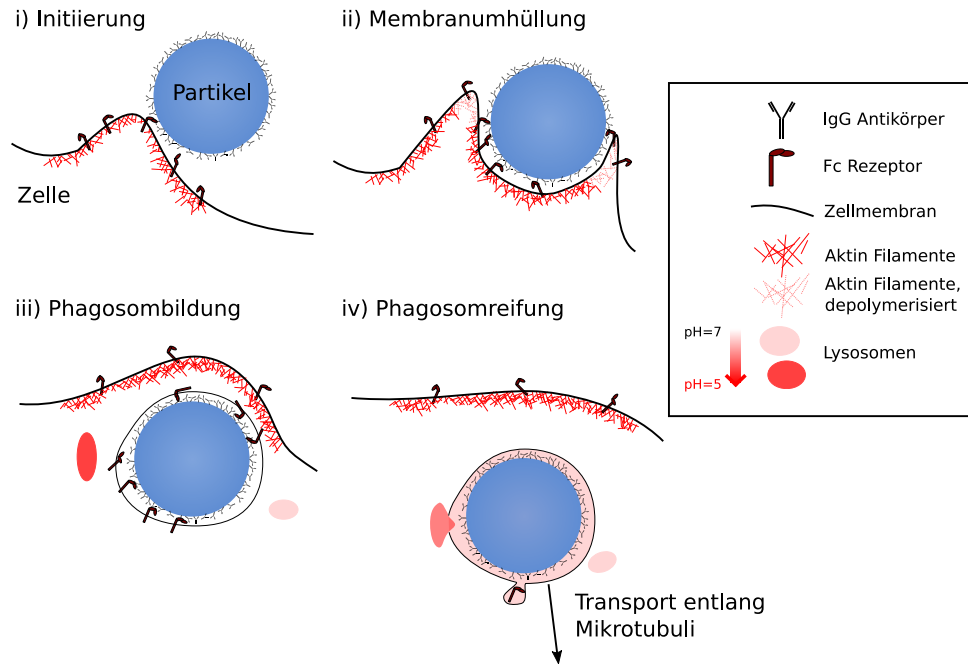


Abbildung 3.1.: Skizze der Phasen der Fc γ -medierten Phagozytose: (i) Initiierung. (ii) Membranhüllung. (iii) Phagosombildung. (iv) Phagosomreifung. Zur näheren Erläuterung der Phasen siehe Abschnitt 3.1.

zeptorenzahlen der Größenordnung $10^3 - 10^5$ [140], was Rezeptordichten von $1,4 - 141 \mu\text{m}^{-2}$ auf der Zelloberfläche entspricht (angenommen für eine sphärische Zelle mit $15 \mu\text{m}$ Durchmesser). Das spezifische Anbinden der Transmembranrezeptoren löst, je nach Art und Funktion des jeweiligen Rezeptors, intrazelluläre Signalkaskaden aus, welche unter anderem durch Aktivierung von Kinasen oder *GTPasen*, die nächsten Schritte zur Partikelinternalisierung einleiten [12]. Rezeptoren können hierbei zum einen direkt an sogenannte *pathogen-assoziierte* Bindungsmotive (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) an der Partikeloberfläche anbinden (*pattern recognition receptors*), wie im Fall von *Dectin-1* oder *Mannose*-Rezeptoren, zum anderen erfolgt eine spezifische Rezeptor-Bindung an auf der Partikeloberfläche opsonisierten Proteinen, wie zum Beispiel bei Komplement-Rezeptoren oder Fc-Rezeptoren. Im Fall der sogenannten Fc γ -medierten Phagozytose, welche ein bereits sehr gut verstandenes und daher experimentell weit verbreitetes Modellsystem für Phagozytose-Studien bildet [141, 8, 142, 143], erfolgt die Bindung zwischen den transmembranen Fc γ -Rezeptoren und den Antikörpern der Gruppe G (Immunglobuline G, IgG). IgG zählen zu den am häufigsten vorkommenden Antikörpern im menschlichen Blutkreislauf [144].

Zur Verhinderung ihrer Identifizierung haben viele Pathogene oder Bakterien Strategien entwickelt, welche das Anbinden von Rezeptoren unterdrücken können [145, 12]. So transportiert beispielsweise das Bakterium *Staphylococcus aureus* Protein A an seine Oberfläche, welches an die Bindungsstelle der Immunglobuline G anbindet und diese somit für die Fc γ -Rezeptoren blockiert [146]. Auch führen etablierte Rezeptor-Liganden-Bindungen nicht immer zu einer erfolgreichen Phagozytose des Zielobjekts. Ein Beispiel hierfür ist das sogenannte *CD47*-Protein, welches unter anderem an *SIRP α* -Rezeptoren von Makrophagen bindet. Eine Überexpression von *CD47* an der Oberfläche von myeloischen Leukämiezellen kann als sogenanntes „*don't eat me*“-Signal fungieren und so zu einer Inhibierung der Phagozytose und damit zum Überleben der Tumorzelle führen [147].

ii) Membranhüllung

Die Aktivierung des Makrophagen durch Rezeptor-medierte Signalkaskaden setzt den komplexen Vorgang der Partikelinternalisierung in Gang (Abbildung 3.1b), welcher mit der sukzessiven Membranhüllung des zu internalisierenden Objektes einhergeht. Die Ausbildung der Membranhüllung, auch *phagocytic cup formation* genannt, lässt sich zum Beispiel anhand von Mikropipetten-Experimenten detailliert beobachten und quantifizieren [16] (siehe auch Abschnitt 2.1). Je nach Art und Anzahl der an der Phagozytose beteiligten Rezeptoren, zum Beispiel Fc γ - oder Komplement-Rezeptoren, erfolgt die Partikelinternalisierung auf verschiedenen Weisen [8].

Ein erster Schritt der Partikelinternalisierung während der Fc γ -medierten Phagozytose ist die Akkumulierung von Rezeptoren im Bereich der Bindungsstelle und dem damit verbundenen Rezeptor-Clustering [12]. Im Falle der überwiegend durch Fc γ -Rezeptoren medierte Phagozytose erfolgt eine mit dem Rezeptor-Clustering einhergehende durch Signaltransduktion induzierte Rekrutierung von zusätzlicher Zellmembran entlang der Kontaktfläche. Intrazellulär damit einhergehend ist eine unter anderem durch den Aktin-Bindungsproteinkomplex *Arp 2/3* medierte Polymerisierung von verzweigten Aktinfilamenten [139]. Thermische Membranfluktuationen in der Nähe bereits etablierter Rezeptor-Liganden-Bindungen führen zur Bildung neuer Rezeptor-Liganden-Bindungen und damit zur immer weiter fortschreitenden Membranhüllung der Partikeloberfläche. Diese *phagocytic cup formation* lässt sich mit Hilfe des weitverbreiteten *zipper*-Modells (englisch, *zipper*=„Reissverschluss“) anhand des Prinzips einer Ratsche erklären [148, 130].

Zytoskelett-Remodellierung und sukzessive Aktin-Polymerisierung führen hierbei zu einer Immobilisierung der Rezeptor-Liganden-Paare und einer damit verbundenen effektiven Irreversibilität der *cup formation*. Dieses Modell des irreversiblen *active zipper* wird unter anderem durch Messungen von Fluoreszenz-Erholzeiten (*fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP) gestützt, welche im Vergleich zur ungebundenen Membran deutlich reduzierte Protein- und Lipidmobilitäten entlang der Kontaktfläche zwischen Membran und Partikel zeigen [149].

Im Gegensatz zum *active zipper*-Modell beschreibt das *passive zipper*-Modell die Partikelinternalisierung ohne Aktin-Polymerisierung, was zu längeren Zeitskalen der Membranhüllung und deutlich unregelmäßigeren Membranverteilungen entlang des Zielobjektes führt. Dieser unnatürlichere Fall der Membranhüllung lässt sich anhand von Phagozytose-Studien unter geringfügigem *Cytochalasin D*-Einfluss bestätigen und zeigt, dass Aktin-Polymerisierung unter gewissen Voraussetzungen nicht zwingend notwendig für die Partikelinternalisierung ist [150, 130]. Im Falle von unzureichend oder nur halbseitig mit Liganden bedeckten Partikeln findet eine Internalisierung in Übereinstimmung mit dem *zipper*-Modell mit sinkender Wahrscheinlichkeit statt, kann durch hybride Mechanismen erfolgen oder ganz fehlschlagen [151, 152].

Offensichtlich haben geometrische Eigenschaften wie Form, Größe und Orientierung des zu internalisierenden Objektes relativ zur Makrophagen-Zelle einen direkten und starken Einfluss auf die *phagocytic cup formation* [153, 154, 130]. Diese Faktoren stellen unterschiedliche energetische Anforderungen im Hinblick auf Membranverformung und Oberflächenspannung an die Zelle. Stark elliptische Partikel, deren große Halbachsen orthogonal zur Kontaktfläche des Makrophagen ausgerichtet sind, werden von der Zelle beispielsweise effizienter internalisiert als parallel ausgerichtete Partikel derselben Form [153]. Eine Ausbildung des *phagocytic cup* um sphärische Partikel herum erfolgt aus nicht vollständig geklärten Gründen stufenweise [155]. Die von der Zelle aufgebrauchte Kraft zur Ummantelung wird maximal bei Erreichen des Partikeläquators [150]. Rigide Partikel

werden bevorzugt internalisiert [142]. Sind die von der Zelle aufgebrauchten Kräfte nicht ausreichend für eine vollständige Partikelumhüllung, kommt der Internalisierungsprozess zum Erliegen.

iii) Phagosombildung

Nach der erfolgreichen Membranhüllung des Partikels ist dieses vollständig internalisiert (Abbildung 3.1c). Die so entstandene intrazelluläre Vakuole wird als Phagosom bezeichnet. Das Schließen der Membran und das Loslösen des Phagosoms von der äußeren Zellmembran ist ein bisher weitgehend unverstandener Prozess [156, 10]. Es wird vermutet, dass in Analogie zu Prozessen der Endozytose eine richtungsabhängige Aktin-Polymerisierung sowie die Rekrutierung von Spaltungsproteinen wie zum Beispiel *Dynamin* eine wichtige Rolle spielen [156]. Des Weiteren ist eine Beteiligung von Myosin-Motoren an der Zusammenschnürung der Membranprotrusionen wahrscheinlich [157], was sich experimentell durch Kollokalisationsmessungen verschiedener Myosinproteine während der Phagosombildung stützen lässt [158].

iv) Phagosomreifung und -zersetzung

Der finale Schritt der Phagozytose ist die Phagosomreifung, auch *phagosome maturation* genannt, (Abbildung 3.1d) mit dem Ziel der vollständigen Zersetzung des Phagosominhalts. Dazu erfährt das Phagosom eine Reihe von Interaktionen mit frühen Endosomen, späten Endosomen und Lysosomen. Diese Interaktionen können sich phagosomspezifisch voneinander unterscheiden. Durch vollständige oder teilweise Fusionen und sukzessiven Abspaltungen wird der Phagosominhalt und seine Membran stark modifiziert, das modifizierte Phagosom bezeichnet man daher als Phagolysosom [159]. Eine ausführliche Übersicht über die Vielzahl der in die *phagosome maturation* involvierten Prozesse und Proteine liefert Quelle [160]. Unter anderem nimmt das ursprünglich nur das Pathogen und extrazelluläres Medium enthaltende Phagosom lysosomatische Enzyme und bakterizidale Peptide auf, die Membranproteine des Phagosoms werden entfernt [159]. Ein zentrales Charakteristikum der Phagosom-Reifung ist die zunehmende Ansäuerung des Phagosomvolumens bis weit in den sauren Bereich mit $\text{pH} < 5$ [161], welcher für eine Vielzahl von Pathogenen und Bakterien zu einer lebensfeindlichen Umgebung beiträgt und ihre enzymatische Verdauung begünstigt [162].

Nicht immer ist eine Zersetzung des internalisierten Pathogens oder Bakteriums möglich. So haben Bakterien, wie zum Beispiel das *Mycobacterium tuberculosis*, der Überträger der Tuberkulose, oder das *Legionella pneumophila*, der Überträger der Legionärskrankheit, effiziente Strategien entwickelt, mit denen sie unter anderem die Phagosomfusionierung mit Lysosomen oder eine Phagosomansäuerung unterdrücken und somit ihr Überleben sichern können [163, 164].

Weil sich Phagosomen typischerweise an der Zellperipherie bilden, Endosomen und Lysosomen zur Fusionierung sich jedoch an unterschiedlichen Stellen innerhalb der Zelle befinden, ist die schrittweise Reifung des Phagosoms zum Phagolysosom unter anderem durch den Phagosomtransport entlang der Mikrotubuli geregelt [165]. Aufgrund ihrer Polarisierung und Orientierung ermöglichen Mikrotubuli gerichteten Transport. Der Transport des Phagosoms entlang einzelner Mikrotubuli erfolgt mit Hilfe des komplexen Zusammenspiels der mit den Mikrotubuli assoziierten Motorproteinen Dynein und Kinesin [166, 31]. Die Rolle von Aktin während der *phagosome maturation* ist nicht vollständig geklärt [160], einzelne Studien zeigen allerdings eine Beteiligung von Aktin an der Phagosommotilität [167, 168] und an der Phagosom-Endosom Fusion [169] auf. Eine direkte

3. Biologischer Hintergrund: Phagozytose

Messung der Beteiligung von Aktin am Phagosomtransport ist Gegenstand dieser Arbeit und wird in Abschnitt 5.5 diskutiert.

3.2. Offene Fragen

Wie in den vorherigen Abschnitten und den zitierten Reviews verdeutlicht, sind viele der während der Phagozytose stattfindenden intrazellulären Prozesse und die involvierten Bausteine, zum Beispiel die an der Aktin-Remodellierung beteiligten Proteine, bereits relativ gut untersucht. Bisherige experimentelle Phagozytosestudien beschränken sich allerdings in der Regel auf reduzierte Modellsysteme wie durch $Fc\gamma$ -Rezeptoren oder Komplement-Rezeptoren mediierte Phagozytose [142, 170], bei denen nur die entsprechenden Rezeptoren engagiert werden. Phagozytose bleibt ein in vielen Aspekten unverstandener Vorgang, was in diesem Abschnitt anhand einer Auswahl an zur Zeit noch offenen spannenden Fragestellungen verdeutlicht werden soll.

Die Ausbildung der Membranhülle um das zu internalisierende Objekt lässt sich bereits anhand von Modellen mit einem einfachen Satz an Variablen (zum Beispiel durch die mittlere Membrankrümmung, die Krümmungsenergie und die Oberflächenspannung der Zellmembran) beschreiben [16, 130, 17]. Aufgrund der Komplexität des Prozesses bleiben viele zusätzliche für die Phagozytose verantwortliche Faktoren, wie zum Beispiel die Aktin-Polymerisierung, der Einfluss von Rezeptoranzahl und -dynamik sowie energetische Voraussetzung in den Modellen unberücksichtigt [10], weil unter anderem die experimentellen Daten fehlen. Hier sind weitere experimentelle Studien über die Art und Weise der involvierten Kräfte und ihren Ursprung oder Messungen der Rezeptorkinetik notwendig. Forscher beginnen erst ansatzweise die Auswirkungen von Form, Größe und Beschaffenheit der zu phagozytierenden Objekte auf die Membranhülle zu verstehen [153, 154, 150, 130, 155]. Die Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der phagozytierenden Zelle während der Partikelinternalisierung sowie das vollständige Verständnis der Mechanik der Phagozytose stehen bisher jedoch noch aus und sind Gegenstand aktueller Studien [17, 16]. Hier setzt eine Fragestellung dieser Arbeit an: „Wie lässt sich die Zellmechanik während der Partikelinternalisierung quantifizieren?“ Eine tiefere Motivation und der wissenschaftliche Hintergrund dieser Frage werden im folgenden Abschnitt 3.3 ausführlich diskutiert.

Der Prozess der Phagosombildung und Einschnürung nach erfolgreicher Membranhülle ist ein bisher weitgehend unverstandener Prozess [156, 10], ebenso die einzelnen Schritte zur Anbindung des von der Membran losgelösten Phagosoms an die Mikrotubuli [160]. Nach Bildung des Phagosoms setzen sich der Phagosomtransport und damit einhergehende, zur Degradierung des Phagosom-Inhaltes beitragende Prozesse in Gang. Viele Bakterien sind in der Lage, durch zum Teil völlig unverstandene Mechanismen ihrer Zersetzung zu entgehen [171, 172]. Ein besseres Verständnis der an der Zersetzung beteiligten intrazellulären Vorgänge, wie zum Beispiel Phagosom-Lysosom-Fusionierung, kann dazu beitragen, Krankheiten wie Tuberkulose oder die Legionärskrankheit zu bekämpfen [163, 164]. Der Einfluss von Form, Größe und Beschaffenheit der Phagosomen auf ihr Transportverhalten wurde bisher nicht untersucht. Ebenso ist die Rolle von Aktin während des Phagosomtransports und der *phagosome maturation* nicht vollständig geklärt [160, 167, 168, 169]. Zur Beantwortung dieser Frage wird in dieser Arbeit daher die Beteiligung von Aktin am Phagosomtransport genauer untersucht, wie im nächsten Abschnitt erläutert wird.

3.3. Motivation der wissenschaftlichen Fragestellungen dieser Arbeit

3.3.1. Aktinremodellierung während der Phagozytose

Eine wichtige Rolle bei der Phagozytose spielt das Aktin-Zytoskelett und seine aktive Remodellierung, wie im vorherigen Abschnitt bereits angeklungen ist. Eine ausführliche Übersicht der während der Phagozytose bisher verstandenen Prozesse mit Fokus auf die Zytoskelett-Remodellierung und der daran beteiligten Proteine liefern Freeman und Grinstein in *Immunological Reviews* [139]. Im Folgenden werden einige Kernpunkte der Remodellierung mit Fokus auf die Fc γ -medierte Phagozytose kurz zusammengefasst. In dem Grundzustand von *J-774A.1*-Zellen vor Einsetzen der Phagozytose ist Aktin entlang der Zellmembran verteilt (vergleiche Abbildung 3.2a). Die Struktur entlang der Zellmembran entspricht typischerweise dem kortikalen Aktin-Netzwerk [173], welches durch Verbindung mit Transmembranproteinen die Zellmembran stabilisiert. Aufgrund dieser, in ihrer Geometrie an einen Gartenzaun (engl. *picket fence*, siehe Einfügung (i) in Abbildung 3.2b) erinnernden Struktur des Zytoskeletts ist die Mobilität von Membranrezeptoren, wie zum Beispiel Fc γ -Rezeptoren oder Integrinen durch Diffusionsbarrieren beschränkt [174, 175]. Unter anderem zeigen beispielsweise Diffusionsmessungen an Membranproteinen deutlich reduzierte Diffusionsraten im Vergleich zu artifiziellen Lipidmembranen ohne „*picket fence*“-Struktur [175]. Nach Identifizierung des zu internalisierenden Objekts wird der hochkomplexe und bisher nur teilweise verstandene Prozess der Aktin-Remodellierung durch die Zersetzung des kortikalen Aktins in Gang gesetzt [139, 11]. Die Zersetzung des kortikalen Aktins hat hierbei zum einen die Funktion der Bereitstellung der freien globularen Aktin-Monomere zur Formation neuer Aktin-Filamente entlang der sich ausbildenden Membranprotrusion, zum anderen führt das Aufbrechen der „*picket fence*“-Struktur zu einer erhöhten Rezeptormobilität und ermöglicht dadurch Rezeptorrekrutierung und Clustering entlang der Kontaktfläche. Für die für Fc γ -medierte Phagozytose folgende charakteristische Ausbildung der Membranprotrusion entlang des zu internalisierenden Objekts ist die konsekutiv einsetzende Aktin-Polymerisierung ausschlaggebend. Dieser bereits gut verstandene Prozess basiert im Wesentlichen auf der Ausbildung verzweigter Aktin-Netzwerke mittels *Arp 2/3*-Bindungskomplex [139] und führt sukzessiv zur vollständigen Partikelinternalisierung. Eine schematische Übersicht der beschriebenen Phasen der Aktin-Remodellierung und der damit einhergehenden Änderungen der Mobilität der Membranrezeptoren zeigt Abbildung 3.2b [139]. Den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung (siehe Abschnitt 5.3) liegt die Hypothese zugrunde, dass in Folge der hier beschriebenen Aktin-Remodellierung messbare Änderungen der Zellmechanik während der Phagozytose auftreten. Eine Einordnung der wissenschaftlichen Vorarbeiten, auf denen diese Hypothese aufbaut, sowie ein Überblick der gewählten experimentellen Herangehensweise zu ihrer Untersuchung werden im nächsten Abschnitt 3.3.2 dargestellt. Die experimentelle Charakterisierung des Einflusses von Aktin auf die Partikelinternalisierung und auf die darauffolgenden intrazellulären Phagosomtransportprozesse sind ebenfalls Thema dieser Arbeit und werden in Abschnitt 3.3.3 motiviert und erläutert.

3. Biologischer Hintergrund: Phagozytose

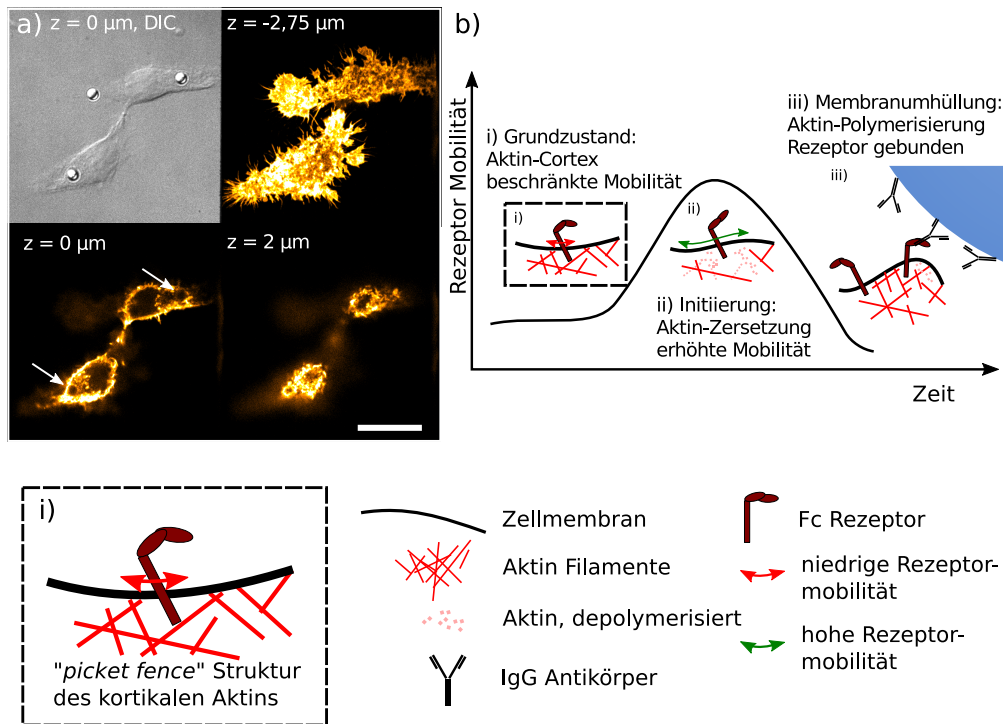


Abbildung 3.2.: Aktinremodellierung und Rezeptormobilität während der Phagozytose. (a) Typische Verteilung des Aktin-Netzwerks in *J-774A.1* Makrophagen. Dargestellt sind DIC und konfokale Aufnahmen in verschiedenen z -Positionen von *J-774A.1* Zellen mit internalisierten $3 \mu\text{m}$ Partikeln. Aktinreiche Strukturen wie Filopodien und Protrusionen weisen ein starkes Fluoreszenzsignal auf. Die Zellen wurden mit 4% PFA fixiert und das Aktin-Netzwerk mit dem Farbstoff Phalloidin (*CytoPainter Phalloidin ifluor 488 Reagent*, Abcam, Cambridge) fluoreszenz-markiert. Erfolgreich internalisierte Partikel (Pfeile) sind in den Fluoreszenz-Aufnahmen als dunkle Strukturen innerhalb des Aktin-Netzwerks zu erkennen, scale bar $20 \mu\text{m}$. Die Aufnahmen wurden von Steve Keller an einem *spinning disk confocal* Mikroskop (*Leica SD AF*, Leica Mikrosysteme, Wetzlar) aufgenommen. **(b)** Skizze der Aktin-Remodellierung und der damit verbundenen Rezeptormobilität während der Partikelinternalisierung, Skizze nach [139]. Die Einfügung (i) verdeutlicht die sogenannte „picket fence“-Struktur des Aktin-Netzwerks [174, 139], welche aufgrund ihrer Querverstrebungen zwischen den Aktin-Filamenten an einen Gartenzaun erinnert.

3.3.2. Messung von zellmechanischen Eigenschaften während der Phagozytose

Die in Kapitel 2 vorgestellten Techniken der zellulären Mikromanipulation und Kraftmessung bieten geeignete Werkzeuge zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der phagozytierenden Zelle. So wurden bereits der Einfluss von Partikelgröße, Partikelgeometrie und Partikelrigidität auf die *phagocytic cup formation* ansatzweise studiert [154, 153, 142]. Mit Hilfe von Mikropipetten-Ansaug-Experimenten konnten das Fortschreiten der Membranhüllung beobachtet und aktuelle Modelle wie zum Beispiel das *zipper*-Modell untermauert werden [16, 150, 130, 176].

Mit optischen Fallen lassen sich die Kräfte und Schrittweiten, mit denen Makrophagen an ihre Filopodien gebundene Partikel zur Internalisierung an sich ziehen, genau quantifizieren [55, 51]. Studien zeigen, dass nach erfolgreicher Anbindung von mit Phagozytose-Liganden funktionalisierten Partikeln an die Zellmembran die Zellen in den meisten Fällen mit einer nach innen gerichteten Zugkraft auf den Stimulus reagieren [177]. Mit magnetischen Pinzetten wurde unter anderem die im Bereich von nN liegende Kraftantwort von Makrophagen-Protrusionen auf externe Zugstimuli gemessen [117]. Durch Anbindung des Partikels an spezielle Transmembranrezeptoren und sukzessive

3.3. Motivation der wissenschaftlichen Fragestellungen dieser Arbeit

Kraftausübung lassen sich Rückschlüsse über das tieferliegende und die Rezeptoren verankernde Zytoskelettnetzwerk ziehen [115].

Die Charakterisierung der zellulären Antwort auf eine externe mechanische Spannung ist Gegenstand von Zellrheologie-Messungen, die typischerweise mit AFM, magnetischen oder optischen Fallen durchgeführt werden [178, 114]. Anhand der resultierenden Spannungs-Dehnungs-Kurven (*stress-strain relaxations*) lassen sich für die Zellen entsprechende Elastizitätsmoduln als Maß der Zellsteifigkeit definieren sowie ihr viskoelastisches Verhalten erfassen. Typische Elastizitätsmoduln für Zellen liegen in der Größenordnung von kPa [179], was im Vergleich mit dem Young Modul einzelner Aktin Filamente (Größenordnung GPa [180]) sehr gering ist.

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert, findet während der Phagozytose eine Remodellierung des Aktinzytoskeletts statt, welches unter anderem für die Stabilität der Zelle sorgt. Ob mit der Aktin-Remodellierung eine transiente und räumlich begrenzte Änderung der zellmechanischen Eigenschaften, wie zum Beispiel der lokalen Zellsteifigkeit, verbunden ist, und sich diese experimentell quantifizieren lässt, war eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Die charakteristischen Zeit- und/oder Längenskalen dieser Variationen wurden bisher nicht identifiziert. Entsprechende dynamische Messungen der Entwicklung der Zellkraft und Zellsteifigkeit während der fortschreitenden Phagozytose wurden bisher nur ansatzweise durchgeführt [17, 181].

Ein Ansatz zur Messung der globalen kortikalen Zellspannung während der Phagozytose mittels Mikropipetten wird beispielsweise unter anderem in *Herant et al.* [181] diskutiert. Eine lokal auf die Zellregion der Partikelinternalisierung begrenzte Methode zur Messung der Zellsteifigkeit präsentieren *Irmscher et al.* [17]. Sie verwenden *magnetic twisting cytometry*, um lokal auf die Kontaktfläche begrenzt die zeitliche Entwicklung der Zellsteifigkeit der Rotation während der Aktuation eines magnetischen Partikels zu bestimmen [17]. Die gemessenen Änderungen der Zellsteifigkeit der Rotation während der Partikelinternalisierung lassen sich als Folge der aus der Membranhüllung resultierenden eingeschränkten Partikelbewegung interpretieren und stimmen mit Vorhersagen des *active zipper*-Modells überein. Die sich ausbildende Membranprotrusion, auch *phagocytic cup*, entlang des zu internalisierenden Partikels lässt sich somit als Membran unter Vorspannung, welche mit einem elastisch verformbaren Aktin-Netzwerk verbunden ist, interpretieren [182, 17].

Ausgehend von den Ergebnissen von *Irmscher et al.* [17] wurde in dieser Arbeit ein ähnlicher, auf Mikromanipulation mit optischen Fallen basierender Ansatz zur Charakterisierung der lokalen Zellviskoelastizität verfolgt. Mit Hilfe von Spannungs-Dehnungs-Relaxationsmessungen wurden über den *power law*-Ansatz [183, 179] Rückschlüsse über die Entwicklung der Zellsteifigkeit und des viskoelastischen Verhaltens der Zelle während der Partikelinternalisierung gezogen. Im Gegensatz zu der *magnetic twisting cytometry* Technik war eine zusätzliche präzise Kontrolle über Ort und Zeitpunkt der Phagozytose möglich. Die Kraftausübung auf die Kontaktfläche erfolgte zudem in einer direkten Methode durch die Partikelauslenkung. Durch Variation der Stärke der optischen Falle wurde die zellmechanische Antwort von Zellen unter verschiedenen Vorspannungen untersucht. Die Rolle von Aktin während der Partikelinternalisierung wurde durch Inhibierung der Aktin-Polymerisierung untersucht, wie im folgenden Abschnitt motiviert wird.

3.3.3. Charakterisierung des Aktin-Einflusses auf die Phagozytose

Eine gängige Methode zur Messung des Einflusses des Aktin-Zytoskeletts auf zelluläre Vorgänge ist der Vergleich der mechanischen Eigenschaften von Zellen mit intakten Aktin-Strukturen und von Zellen mit gestörtem Aktin-Netzwerk [115, 89, 150, 184]. Dies lässt sich unter anderem durch

3. Biologischer Hintergrund: Phagozytose

Inhibierung der Aktin-Polymerisierung durch das Pilz-Toxin *Cytochalasin D* (CytoD) realisieren [185, 186]. CytoD bindet hierbei an die plus-Enden der Aktin-Filamente und unterdrückt somit das Anbinden weiterer globularer Aktin-Monomere. Abhängig von der gewählten CytoD-Konzentration und dem jeweiligen Zelltyp gehen aus der Aktin-Inhibierung sowohl mechanische als auch morphologische Veränderungen der Zelle hervor. Diese reichen von einer Verringerung der Zellsteifigkeit und der Motilität, der Einstellung von Membranruffling bis hin zum vollständigen Verlust der Zellspannung und einer resultierenden Abrundung der Zelle [185, 186, 187]. Bei vollständigem Ablösen der Verbindung des Zytoskeletts mit der Zellmembran lässt sich die Zellmembran zum Beispiel mittels optischer Fallen unter sehr geringem Kraftaufwand dehnen, und es lassen sich weitreichende Membran-Tethers herausbilden [188, 189].

Wie in diesem Kapitel bereits mehrfach betont wurde, ist die Aktin-Polymerisierung ein wichtiger Bestandteil erfolgreicher Phagozytose. Eine gestörte Aktin-Polymerisierung und die damit einhergehende beeinträchtigte Phagozytose [15] ist unter anderem Krankheitsbild des genetisch bedingten *Wiskott-Aldrich Syndrom* Immundefekts [14]. Bei vollständiger Inhibierung der Aktin-Polymerisierung findet keine Phagozytose mehr statt [190]. Bei nicht vollständiger Inhibierung hingegen - zum Beispiel durch niedrige Konzentrationen von CytoD - kann Phagozytose mit einer vom jeweiligen Zelltyp abhängigen reduzierten Effizienz beobachtet werden [150, 130, 17]. Eine Quantifizierung der Phagozytose-Effizienz der *J-774A.1* Zelllinie bei verschiedenen Graden der Inhibierung der Aktin-Polymerisierung mittels CytoD ist unter anderem Gegenstand dieser Arbeit.

Die Rolle, welche Aktin Filamente während des Phagosomtransports spielen, ist bisher nicht vollständig geklärt [160]. Studien belegen allerdings eine direkte Beteiligung von Aktin an Endosom- und Lysosombewegung [191, 192], so dass das Vorhandensein ähnlicher Mechanismen bezüglich der Phagosombewegung naheliegend ist. Mögliche durch Aktin medierte Bewegungsformen ergeben sich beispielsweise durch Aktin-Polymerisierung, durch direkt an Aktin Filamente gebundene Motor-Proteine oder durch Kopplung der Organellen an den durch Myosine gesteuerten retrograden Aktinfluss [193, 194, 195, 196]. In dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, in wieweit sich ein direkter Einfluss von Aktin auf den Phagosomtransport nach erfolgreicher Partikelinternalisierung nachweisen lässt. Explizit wird mit Hilfe von magnetischen Pinzetten und Partikeltracking der Einfluss von Aktin auf den Transport von Partikeln unterschiedlicher Größe untersucht und quantifiziert.

Experimenteller Aufbau

Die quantitative Untersuchung der zellmechanischen Eigenschaften während der Phagozytose an lebenden Zellen stellt hohe technische Ansprüche an die verwendete Versuchsanordnung. Neben der Echtzeitmikroskopie mit hoher zeitlicher und optischer Auflösung muss die Apparatur 3D-Mikromanipulation und/oder Kraftmessung ermöglichen sowie eine hohe Reproduzierbarkeit, gute Akzessibilität und Viabilität der zu untersuchenden Zellen gewährleisten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Steve Keller, Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Kress, eine den oben genannten Anforderungen genügende experimentelle Arbeitsstation geplant, aufgebaut und charakterisiert. Der experimentelle Aufbau wurde für einen Großteil der in dieser Arbeit diskutierten Experimente verwendet und besitzt die folgenden wesentlichen Merkmale:

- Automatisierte Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie
- Phasenkontrast- und Differentialinterferenzkontrastmikroskopie (*differential interference contrast*, DIC)
- Thermische Inkubationskammer für Zellmessungen bei 37 °C
- Bildaufnahme mit hoher zeitlicher Auflösung und hoher Sensitivität mit bis zu 3 Kameras gleichzeitig
- Präzise piezogesteuerte 3D Probenpositionierung
- Live Detektion der gefangenen Partikel mit rückgekoppelter Probenpositionierung
- Dynamische holografische optische Falle, welche per Flächenlichtmodulator (*spatial light modulator*, SLM) gesteuert wird
- Stabilisierung des Fanglasers durch Rückkopplungsschleife per akustooptischem Modulator (AOM)

Nachfolgend werden in diesem Kapitel diese wesentlichen Merkmale des experimentellen Aufbaus erläutert und die Kalibration der für einen Teil der Experimente verwendeten holografischen optischen Fallen diskutiert.

4.1. Mikroskopie und Bildaufnahme

Die Zellexperimente zur Induzierung der Phagozytose und Messung der Membransteifigkeit während der Partikelinternalisierung wurden mit einem invertierten Mikroskop (*Nikon Eclipse Ti-E*, Nikon, Düsseldorf) durchgeführt (siehe Abbildung 4.1a). Das Mikroskop besitzt die Möglichkeiten

4. Experimenteller Aufbau

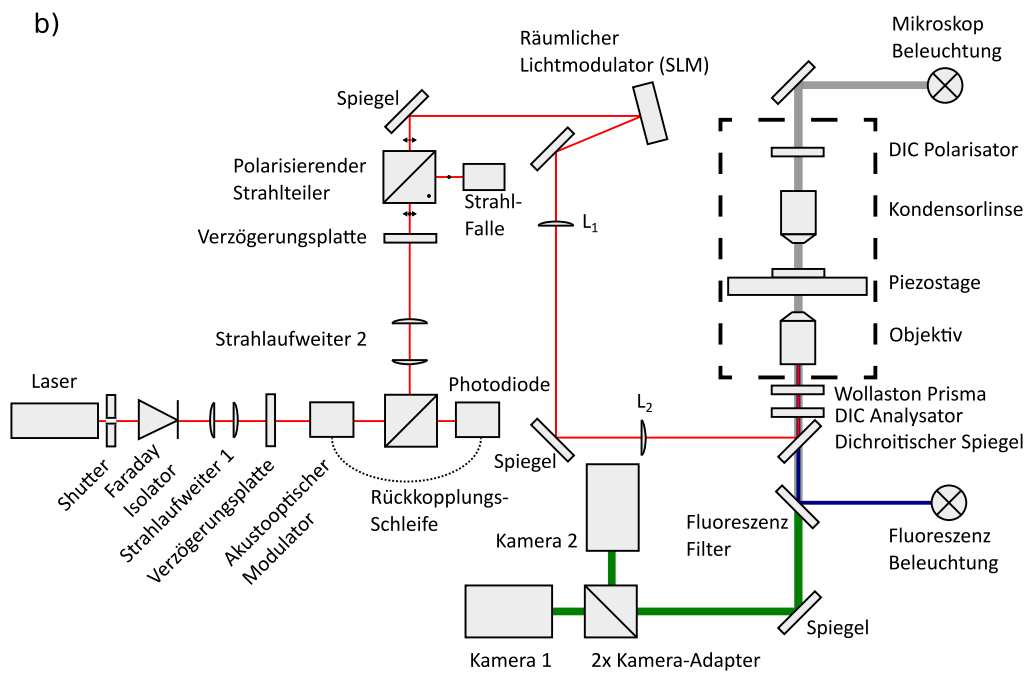
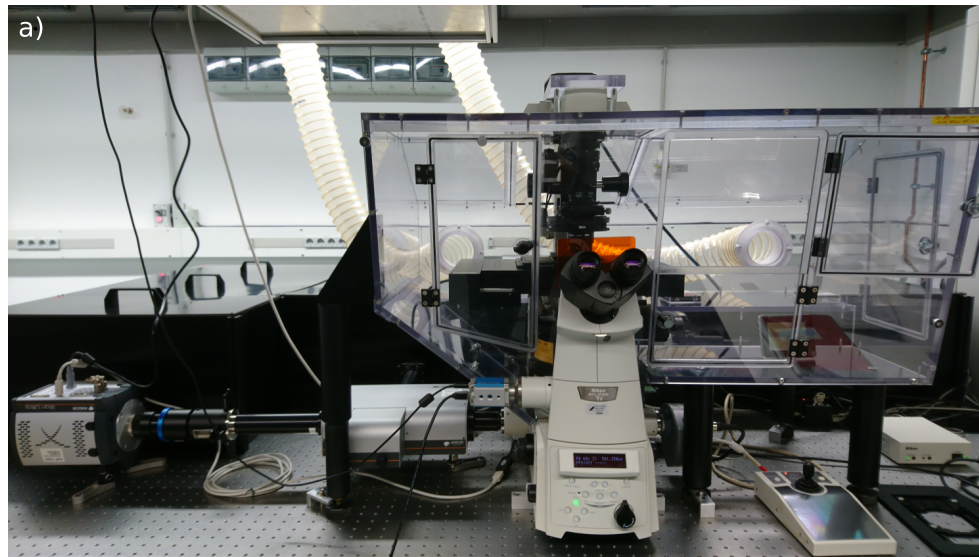


Abbildung 4.1.: Experimenteller Aufbau. (a) Foto des verwendeten Mikroskops *Nikon Eclipse Ti-E* mit in der Arbeitsgruppe entwickelter Inkubationskammer. Im Vordergrund links ist die für Fluoreszenz-Aufnahmen verwendete EMCCD Kamera *Andor DU-897* zu sehen, der optische Aufbau der holografischen optischen Pinzette befindet sich innerhalb der Laserschutzabdeckungen im Hintergrund. (b) Prinzipskizze des optischen Aufbaus der holografischen optischen Pinzette und der verwendeten Bauteile, die Linsen L_1, L_2 bilden als Teleskop in $4f$ -Anordnung das Display des räumlichen Lichtmodulators (SLM) auf die rückwärtige Mikroskop-Objektiv Öffnung ab. Die verschiedenen Strahlengänge sind farblich gekennzeichnet (Fanglaser ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) in rot, Hellfeld-Beleuchtung des Mikroskops in grau, Fluoreszenz-Einkopplung in blau, Bildgebung in grün). Das gestrichelte Rechteck zeigt die von der Inkubationskammer eingeschlossenen Bauteile an. Nicht wesentliche Bauteile wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen, eine Skizze des vollständigen experimentellen Aufbaus findet sich in Abbildung B.1.

zur Hellfeld-, Fluoreszenz-, Phasenkontrast- und Differentialinterferenzkontrast- (*differential interference contrast*, DIC) Mikroskopie und lässt sich weitgehend automatisiert per Computersoftware (*NIS Elements Advanced Research*, ver. 4, Nikon) ansteuern. Insbesondere bietet das Mikroskop die

Möglichkeit, Großbildaufnahmen mit einem Vielfachen der Größe des einfachen Kamerasichtfeldes aufzunehmen (*scan large image* Funktion), indem die dazu nötigen festgelegten Probenpositionen automatisch angefahren werden und die aufgenommenen Bilderserien passend aneinandergesetzt werden. Diese Technik der großen Bilderserien wurde in dieser Arbeit zur Messung der Phagozytose-Effizienz (5.2) verwendet. Des Weiteren besitzt das Mikroskop eine sogenannte *perfect focus*-Einheit (*perfect focus system 1.0*, PFS, Nikon), mit der während einer Messung der Abstand zwischen Mikroskopobjektiv und Probenebene gemessen und geregelt werden kann, um mögliche Fokusdrifts während der Messung zu kompensieren. Für die in dieser Arbeit diskutierten Experimente wurde das PFS-System allerdings nicht genutzt, weil es herstellerbedingt für Wellenlängen im Bereich von 340 – 800 nm ausgelegt ist und die Einkopplung des PFS-Strahlteilers aufgrund seines Transmissionsspektrums somit eine Reduzierung von über 50 % der nahinfraroten Laserstrahlung in der Probenebene verursacht. Eine Übersicht der Mikroskopobjektive sowie weitere technische Details des Mikroskop sind in Anhang A zusammengefasst. Zur Erzeugung der holografischen optischen Falle wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (*CFI Plan Apo IR 60xWI*, N.A.= 1,27, *Nikon Lambda S series*) mit einer 60× Vergrößerung verwendet. Das Objektiv hat einen Arbeitsabstand von $W.D. = 0,22$ mm, weshalb zur Probenpräparation dünne Deckgläser verwendet wurden. Um das Verhalten der Zellen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, wurde im Rahmen zweier Masterarbeiten eine speziell an das Mikroskop angepasste Inkubationskammer entwickelt (siehe Abbildung 4.1a), welche Messungen bei 37 °C ermöglicht [197, 198].

Die Hellfeld-Videoaufnahmen der Partikelbewegungen wurden mit einer Hochgeschwindigkeitskamera (*IDT Nx4-S2*, Imaging Solutions, Eningen u. Achalm) aufgenommen, DIC-Aufnahmen der Makrophagen-Zellen während der Partikelinternalisierung und Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einer EMCCD-Kamera (*Andor Luca r* oder *Andor iXon Ultra 897*, Andor Technology, Belfast, Irland) erstellt. Beide Kameras waren per 2x-Kamera-Adapter (*Andor TuCam*, Andor) an den gleichen Mikroskop-Ausgang angeschlossen. DIC- und Hellfeldaufnahmen konnten somit gleichzeitig durchgeführt werden. Hierfür wurde an Stelle des typischerweise für DIC-Aufnahmen verwendeten im Mikroskop integrierten DIC-Analysators ein Polarisationsfilter direkt vor dem Kameraeingang der Kamera positioniert, so dass nur vor dieser Kamera das DIC-typische Interferenzmuster rekonstruiert wurde. Der 2x-Kamera-Adapter induzierte aufgrund seiner internen optischen Komponenten (insbesondere zwei an jeden Kameraausgang angepasste Teleskope) eine zusätzliche 2×-Vergrößerung in die jeweiligen Kameraarme. Vor dem Beobachtungspfad des Mikroskops befindet sich ein herausnehmbarer Infrarotfilter (*HQ960SP25*, LOT Quantum Design, Darmstadt), um eine Überbelichtung des Kamerabildes durch Reflexionen des Laserstrahls an Deckglas oder Probenpartikeln zu verhindern. Ein Entfernen des IR-Filters mit gleichzeitig geeigneter Wahl der Kameraparameter ermöglicht hingegen die Abbildung der momentanen Intensitätsverteilung des Laserlichts in der Probenebene.

Die Experimente zur Live Detektion der Partikelposition mit rückgekoppelter Probenpositionierung wurden mit Hilfe einer zusätzlichen CCD-Kamera (*pco.pixelfly usb*, PCO, Kelheim) durchgeführt. Unter Nutzung des Seitenports des Okularausgangs im Mikroskop kann die CCD-Kamera gleichzeitig mit den anderen Kameras zum *live tracking* genutzt werden, das Mikroskop ermöglicht somit eine parallele Nutzung von bis zu drei Kameras gleichzeitig. Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Kameras findet sich in Tabelle A.2 in Anhang .

4.2. Piezotisch

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine automatische dreidimensionale Probenpositionierung mit Hilfe eines Piezotisches (*PInano PI P-545*, Physik Instrumente, Karlsruhe) und zugehöriger Kontrolleinheit (*PInano Piezo Stage Controller PI E-545*, Physik Instrumente) realisiert. Diese ermöglicht eine genaue Positionierung der Probe im Nanometerbereich und kann im Gegensatz zur Ansteuerung mit dem in das Mikroskop integrierten Mikroskoptisch außerhalb der Mikroskopsoftware in einer *MatLab* oder *LabVIEW* Umgebung erfolgen. Der maximale Verfahrweg in alle drei Dimensionen beträgt 200 μm . Weil der Piezoeffekt auf elastischer Verformung der verwendeten Piezokristalle basiert, kann es bei gleichzeitiger Nutzung von Piezotisch und Aufheizen der Heizbox allerdings aufgrund thermischer Effekte zu Problemen in der Ansteuerung der Stage kommen. So kann in solchen Fällen nicht mehr der volle Verfahrweg der Stage genutzt werden, weil die Bewegungen der Piezomotoren nicht mehr mit den internen, ab Werk kalibrierten Steuerspannungen übereinstimmen. Entsprechende Probleme lassen sich vermeiden, indem die Piezostage erst nach dem vollständigen Aufheizen der Inkubationskammer eingeschaltet wird und die Stage keinen starken Temperaturschwankungen mehr unterliegt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Piezostage in Kombination mit Echtzeit-Partikeltracking (siehe Abschnitt 5.1.3) zur Implementierung eines Rückkopplungskreises zur Probenpositionierung verwendet.

4.3. Optischer Aufbau

Eine Prinzipskizze des experimentellen Aufbaus der in dieser Arbeit verwendeten holografischen optischen Falle ist in Abbildung 4.1b dargestellt. Der Übersichtlichkeit halber wurden in der Darstellung zum Verständnis des Aufbaus nicht benötigte Bauteile weggelassen und der Strahlengang entsprechend angepasst. Eine vollständige Skizze des experimentellen Aufbaus und die genauen Typenbezeichnungen und Herstellerangaben aller verwendeten Bauteile finden sich in Anhang B. Der gesamte optische Aufbau und das zur Zellbeobachtung verwendete Mikroskop sind auf einem per Luftdruck kontrollierten, schwingungsgedämpften optischen Tisch horizontal gelagert und mechanisch stabilisiert. Zum optischen Fangen wurde ein Ytterbium-Faserlaser (*IPG YLM-5-LP-SC*, IPG Laser GmbH, Burbach) der zentralen Wellenlänge $\lambda = 1064 \text{ nm}$ verwendet. Diese Wellenlänge wurde gewählt, da Zellen und biologische Proben für Laserlicht im nah-infraroten Bereich größtenteils transparent wirken und so möglichst wenig optischen Schaden erfahren [199]. Der Laser arbeitet im Dauerstrichmodus (*continuous wave, CW*), hat eine maximale Leistung von $P_{\text{max}} = 5,9 \text{ W}$ und eine Strahldivergenz von $\vartheta_{\text{div}} = 0,94 \text{ mrad}$. Der Laser ist linear polarisiert und besitzt ein gaußförmiges Strahlprofil. Bevor der Laser in das Mikroskop eingekoppelt wird, durchläuft er auf dem optischen Tisch mehrere optische und elektrooptische Bauteile, welche zur Strahlkontrolle und Strahlformung dienen. Der mechanische Shutter kontrolliert die Laseraktivität. Der Faraday Isolator hat die Funktion einer optischen Diode, welche auf dem Prinzip des Faraday-Effekts basiert und den Laserkopf vor rückgestreutem Laserlicht schützt.

Nach Durchlaufen eines Strahlaufweiters und einer Verzögerungsplatte zur Anpassung des Strahlprofils sowie der Polarisationsrichtung, trifft der Laserstrahl auf den akustooptischen Modulator (AOM) und einen speziell angepassten Strahlteiler, welcher einen Bruchteil des Laserlichts auf eine Photodiode leitet. Photodiode und AOM sind durch eine schnelle für Leistungsstabilisierung entwi-

ckelte Regelelektronik (*NoiseEater*, TEM Messtechnik, Hannover) in einer Rückkopplungsschleife miteinander verbunden und dienen zur Strahlkontrolle des Lasersignals, basierend auf dem akustooptischen Effekt [67]. Hierzu misst die Photodiode die Leistung des abgekoppelten Lasersignals. Die Regelelektronik vergleicht mittels PID-Regelungstechnik das gemessene Photodetektorsignal (Ist-Wert) mit einem einstellbaren Soll-Wert und übersetzt eventuell auftretende Abweichungen in proportionale Steuerspannungen. Die Ansteuerung des AOM erfolgt mit einem Radio Frequenz Treiber, welcher im AOM eine Schallwelle mit der Trägerfrequenz $F_C = 110$ MHz anlegt und so ein optisches Beugungsgitter der Periodizität $\Lambda = \frac{v_S}{F_C}$ erzeugt. v_S beschreibt hierbei die Schallgeschwindigkeit im AOM. Damit und mit (2.23) ergibt sich der Bragg-Winkel ϑ_B mit

$$\sin \vartheta_B = \frac{\lambda F_C}{2v_S} \quad (4.1)$$

unter der Annahme eines optisch isotropen Materials [67]. Unter ϑ_B auf das Beugungsgitter treffendes Laserlicht wird somit in höhere Beugungsordnungen gestreut. Die Beugungseffizienz des in die erste Beugungsordnung gestreuten Laserlichts lässt sich durch Amplitudenmodulation der akustischen Trägerwelle kontrollieren. Die per Regelungselektronik berechneten Steuerspannungen geben hierbei die Größen der Modulationsamplituden an. Eine sehr große Steuerspannung, welche einer großen Abweichung zwischen gemessener Ist- und einzustellender Soll-Leistung entspricht, erzeugt eine starke Amplitudenmodulation der Ist-Leistung. Eine geringe Abweichung zwischen Ist- und Soll-Leistung erzeugt entsprechend eine niedrige Steuerspannung und resultiert in eine schwache Amplitudenmodulation. Mit diesem Prinzip lassen sich also im Lasersignal auftretende Leistungsschwankungen kompensieren und die in die erste Ordnung gebeugte Laserleistung auf einen konstanten Wert regeln, sofern dieser Sollwert im Falle sehr starker Schwankungen nicht unterschritten wird. Eine Verstärkung des unregulierten Eingangssignals ist ebenfalls nicht möglich. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Einstellungen der Photodiode und des Regelkreises sind auf eine Ausgangsleistung von $P = 3$ W optimiert. Diese Standardeinstellung wurde für alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet.

Im weiteren Strahlenverlauf trifft das stabilisierte Lasersignal auf eine Strahlaufweitung. Diese wurde so eingestellt, dass der aufgeweitete Strahl die nachfolgenden Komponenten zur Strahlformung, insbesondere das SLM Display mit einer Kantenlänge von 7,68 mm vollständig ausgeleuchtet. Nach Passieren der Strahlaufweitung trifft der Laser auf eine zweite, manuell einstellbare Verzögerungsplatte in Kombination mit einem polarisierenden Strahlteiler. Mit diesen beiden Komponenten lässt sich die experimentelle Arbeitsleistung des linear polarisierten Lasers kontrollieren, ohne die Standard-Ausgangsleistung variieren zu müssen. Mit der Verzögerungsplatte lassen sich die Polarisationrichtung des Laserlichts und somit das Verhältnis zwischen der am Strahlteiler reflektierten und transmittierten Laserleistung einstellen. Für den weiteren Strahlenverlauf wird nur der transmittierte p-polarisierte Anteil verwendet.

Die eigentliche Strahlformung zur Erzeugung der Fanggeometrien einer holografischen optischen Falle erfolgt durch den räumlichen Lichtmodulator (*spatial light modulator*, SLM), auf den im folgenden Abschnitt eingegangen wird, und basiert auf dem Prinzip der optischen Fouriertransformation (siehe Abschnitt 2.1.3.1). Die nachfolgenden antireflexbeschichteten Linsen (L_1, L_2) bilden dazu in $4f$ -Anordnung die SLM-Ebene auf die hintere Brennebene des Mikroskop-Objektivs ab. Die Brennweiten $f_1 = 500$ mm und $f_2 = 750$ mm dieser Teleskop-Linsen wurden entsprechend der geometrischen Voraussetzungen des experimentellen Aufbaus gewählt, so dass sich SLM Ebene und rückwärtige MO-Brennebene Öffnung im doppelten Abstand $L = 2(f_1 + f_2)$ der Summe der

4. Experimenteller Aufbau

SLM Spezifikationen	
Spezifikation	Wert
Name	<i>BNS XY Phase Series P512-1064</i>
Displaygröße	7,68 mm × 7,68 mm
Auflösung	512 × 512 Pixel ²
Pixelpitch	15 μm
Füllfaktor	100 %
Beugungseffizienz	90 – 95 %
Ansprechzeit	$\tau_{\text{SLM}} \leq 16,7 \text{ ms}$
Schaltfrequenz	$\nu_{\text{SLM}} \geq 60 \text{ Hz}$

Tabelle 4.1.: Spezifikationen des SLM *BNS XY Phase Series P512-1064* [200].

Brennweiten befinden. Einfallswinkel α_B und Ausfallswinkel α_2 von durch diesen Teleskop-Aufbau laufendem Licht sind durch die Relation

$$f_1 \tan \alpha_B = f_2 \tan \alpha_2 \quad (4.2)$$

bestimmt, wobei der Einfallswinkel α_B durch den SLM vorgegeben wird bzw. reguliert werden kann. Die zur experimentellen Realisierung der optischen Fouriertransformation (OFT) verwendeten optischen Komponenten, ihre geometrischen Relationen zueinander sowie die Lage der jeweiligen Fourierebenen illustriert Abbildung 4.2.

4.4. Räumlicher Licht-Modulator

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Spatial Light Modulator (BNS XY Phase Series, Modell P512-1064, *Meadowlark Optics, Colorado*, Abbildung 4.2a) besitzt ein 512×512 Pixel großes nematisches Flüssigkristalldisplay mit einer Kantenlänge von 7,68 mm. Das Display setzt sich aus einer Schutzglasschicht, einem transparenten leitfähigen Film, der Flüssigkristallschicht und einer Schicht hochreflektierender Pixel-Elektroden zusammen [200]. Zusätzlich besitzt das Display zwischen Elektroden- und Kristallschicht eine dielektrische Reflexbeschichtung für die zentrale Wellenlänge von $\lambda = 1064 \text{ nm}$, um die optische Effizienz zu erhöhen. Tabelle 4.1 fasst die wichtigsten Spezifikationen des in dieser Arbeit verwendeten SLMs zusammen. Die Schaltfrequenz (Ansprechzeit) des SLM ist durch die Grafikkarte des verwendeten Computers bedingt und beträgt in der aktuellen Realisierung $\nu_{\text{SLM}} = 60 \text{ Hz}$ ($\tau_{\text{SLM}} = 16,7 \text{ ms}$). Ausführliche Details zur SLM-Ansteuerung und ihrer möglichen Optimierung finden sich in Anhang C.

Das SLM Flüssigkristall-Display ist auf einem integrierten Schaltkreis (*very large scale integration, VLSI circuit*) montiert, so dass zwischen jeder der einzelnen Elektroden und der leitenden Schicht eine individuelle Steuerspannung angelegt werden kann. Durch Anlegen der Steuerspannung ändert sich die Orientierung der doppelbrechenden Flüssigkristalle im elektrischen Feld. Liegt keine Spannung an, sind die Kristalle parallel zum Deckglas orientiert, so dass einfallendes Laserlicht den maximalen Brechungsindex-Unterschied zwischen ordentlicher (Brechungsindex n_o) und außerordentlicher Polarisation (Brechungsindex n_{ao}) erfährt. Bei Anlegen maximaler Steuerspannung orientieren sich die Flüssigkristalle orthogonal zum Deckglas, so dass der Brechungsindex-Unterschied zwischen ordentlicher und außerordentlicher Polarisation verschwindet.

Der SLM wird als reiner Phasenmodulator genutzt. Parallel zur optischen Achse des SLM polarisiertes Laserlicht erfährt während des Durchgangs durch die Flüssigkristallschicht je nach Orientierung

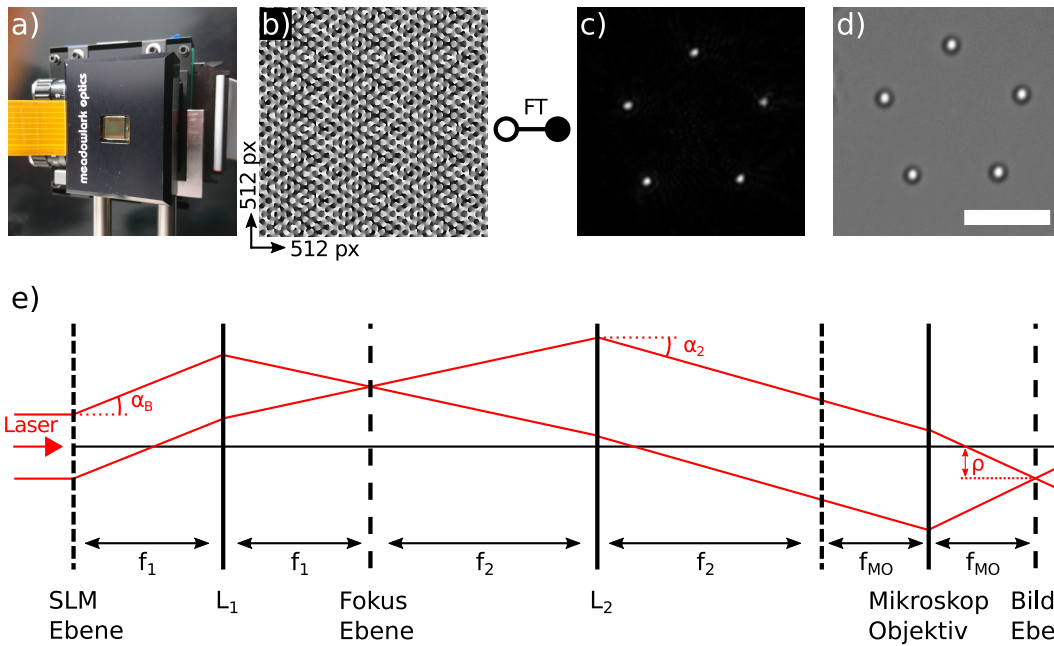


Abbildung 4.2.: Funktionsprinzip der mit einem SLM realisierten holografischen optischen Pinzette. (a) Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete räumliche Lichtmodulator (SLM) stellt auf seinem 512×512 Pixel² großen Flüssigkristalldisplay ein 8bit-Grauwert Phasemuster dar (b), so dass die Grauwerte 0 – 255 einer ansteigenden Phasenverschiebung zwischen 0 und 2π entsprechen. Auf den SLM treffendes Laserlicht wird entsprechend phasenmoduliert, so dass in der zugehörigen Fourierebene, in dieser Realisierung die Fangenebene der optischen Falle, per optischer Fouriertransformation (OFT) eine entsprechende Intensitätsverteilung (c) erzeugt wird, welche gleichzeitiges optisches Fangen von mehreren (im gezeigten Fall fünf) Polystyrol-Partikeln ermöglicht (d). Abbildung (c) zeigt eine Hellfeldaufnahme der Fokusebene bei ausgeschalteter Mikroskopbeleuchtung und Entfernen des Infrarot-Filters zur Sichtbarmachung der Laserreflexionen am Deckglas, Abbildung (d) eine entsprechende Aufnahme mit eingeschalteter Hellfeldbeleuchtung und eingesetztem IR-Filter, Maßstab 10 μm . (e) Prinzipskizze der im Aufbau realisierten holografischen optischen Pinzette, der Strahlengang ist rot dargestellt. Der auf das in der SLM-Ebene befindliche SLM-Display treffende linear polarisierte Laserstrahl wird phasenmoduliert. Die beiden Linsen L1 und L2 (siehe Abbildung 4.1) bilden ein Teleskop in 4f-Anordnung, welches die SLM-Ebene auf die hintere Brennebene des Mikroskopobjektivs (Brennweite f_{MO}) abbildet, so dass in der Bildebene die zugehörige optische Fangengeometrie erzeugt wird. Die Brennweiten f_1 und f_2 der Teleskoplinen wurden entsprechend der geometrischen Voraussetzungen für den experimentellen Aufbau gewählt. Ebenen mit der gleichen Fourier-Beziehung zueinander sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. Der rote Strahlengang verdeutlicht die Beiträge der einzelnen optischen Komponenten zur Strahlformung und dient zur Herleitung der Relation (4.3).

der jeweiligen Kristalle eine von der Steuerspannung abhängige Phasenverschiebung $\Delta\phi$ pro Pixelfläche. Mit Hilfe eines auf den SLM angepassten *look up tables* können somit vom SLM-Display reflektierte Wellenfronten mit gezielten räumlichen Phasenverschiebungen zwischen $0 \leq \Delta\phi < 2\pi$ erzeugt werden. Die Zuordnung der Phasenverschiebung erfolgt durch 8 bit Grauwertbilder der Auflösung 512×512 Pixel, welche an den SLM gesendet werden und somit als Phasenmasken das Flüssigkristalldisplay adressieren (siehe Abbildung 4.2b). Die Phasenverschiebung wird hierbei durch den Grauwert bestimmt, wobei die Grauwerte 0 – 255 einer ansteigenden Phasenverschiebung von 0 – 2π entsprechen. Die Phasenmasken wurden per *Lenses and Gratings* Algorithmus (siehe Abschnitt 2.1.3.2) berechnet, die Bedienung des SLM erfolgt mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Computerprogramms (siehe Anhang C).

Eine Phasenmodulation des Laserlichts in der SLM-Ebene (Abbildung 4.2b) resultiert aufgrund optischer Fouriertransformation (Abschnitt 2.1.3.1) in eine entsprechende Amplitudenmodulation

4. Experimenteller Aufbau

in der zugehörigen Fourierebene (Abbildung 4.2c). In holografischen optischen Fallen entspricht diese Ebene in der Regel der Fokusebene des Mikroskopobjektivs, so dass die Amplituden- respektive Intensitätsverteilung zum optischen Fangen von Mikropartikeln verwendet werden kann, wie in Abbildung 4.2d am Beispiel von 5 gleichzeitig optisch gefangenen sphärischen Partikeln dargestellt ist.

Eine Prinzipskizze der in dieser Arbeit realisierten holografischen optischen Falle mit den entsprechenden Fourier-Beziehungen zeigt Abbildung 4.2e. Eine ausführliche Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten holografischen optischen Falle erfolgte unter anderem im Rahmen einer Masterarbeit [201]. Der Zusammenhang zwischen der Periodizität Λ eines auf dem SLM-Display dargestellten Bragg-Gitters und der absoluten Ablenkung ρ des Laserfokus in der Fangenebene (roter Strahlengang in Abbildung 4.2e) lässt sich aus den einzelnen Beiträgen der optischen Komponenten zur Strahlablenkung mit Hilfe geometrischer Optik und der Gleichungen (4.1) und (4.2) herleiten zu

$$\rho = f_{\text{eff}} \cdot \tan \left(\arcsin \frac{\lambda}{2\Lambda} \right). \quad (4.3)$$

Die effektive Brennweite $f_{\text{eff}} = f_{\text{MO}} \frac{f_1}{f_2}$, welche sich aus den Brennweiten f_1, f_2 der Teleskoplin sen L_1, L_2 sowie der unbekanntnen Brennweite des Mikroskopobjektivs f_{MO} zusammensetzt, wurde experimentell durch Messung der Verschiebung ρ der ersten Beugungsordnung in Abhängigkeit der Blaze-Gitter Periodizitäten Λ und der Fitfunktion 4.3 bestimmt zu $f_{\text{eff}} = 4506 \pm 8 \mu\text{m}$, wie in Abbildung 4.3a dargestellt [201]. Durch Vorgabe zentraler Fangparameter (Anzahl der Fallen, transversaler Abstand und Orientierung der Fangpositionen zur nullten Ordnung) der zu erzeugenden optischen Fanggeometrie lassen sich mit Hilfe von (4.3) sowie der Gleichungen (2.22 - 2.25), somit die entsprechenden an den realen experimentellen Aufbau angepassten Phasenmuster berechnen. Die Berechnung erfolgt mit dem Computerprogramm zur SLM Ansteuerung. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde auf eine Auslenkung der Fangpositionen in axialer Richtung mit Hilfe von Fresnel-Linsen verzichtet, eine Herleitung vergleichbar zu (4.3) sowie eine entsprechende Kalibration findet sich in [201]. Der Bereich um die nullte Beugungsordnung, in dem sich Partikel innerhalb der ersten Beugungsordnung stabil fangen lassen, wurde experimentell bestimmt und lässt sich als Ellipse beschreiben, welche durch die aus den Intervallen $[-30 \mu\text{m} \leq x \leq 26 \mu\text{m}]$ in x -Richtung und $[-50 \mu\text{m} \leq y \leq 40 \mu\text{m}]$ in y -Richtung beschriebenen Halbachsen aufgespannt wird. Mit zunehmendem Abstand zur zentralen Beugungsordnung nimmt hierbei die relative Fallensteifigkeit der optischen Falle ab (siehe Abbildung 4.3b), ebenso hat die Anzahl der erzeugten Fallen einen direkten Einfluss auf die Stärke der jeweiligen einzelnen Fallen (Abbildung 4.3c). Mit steigender Fallenzahl nimmt die Stärke der einzelnen Fallen ab, werden mehr als eine Falle generiert, sinkt die Summe aller Fallenstärken auf etwa 60% der Stärke einer einzelnen Falle. Die in Abbildung 4.3 dargestellten Messungen der Fallensteifigkeiten wurden aus den Leistungsspektren der Partikelbewegungen von in der jeweiligen optischen Falle gefangenen Polystyrol-Partikeln berechnet, wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, und stammen aus [201].

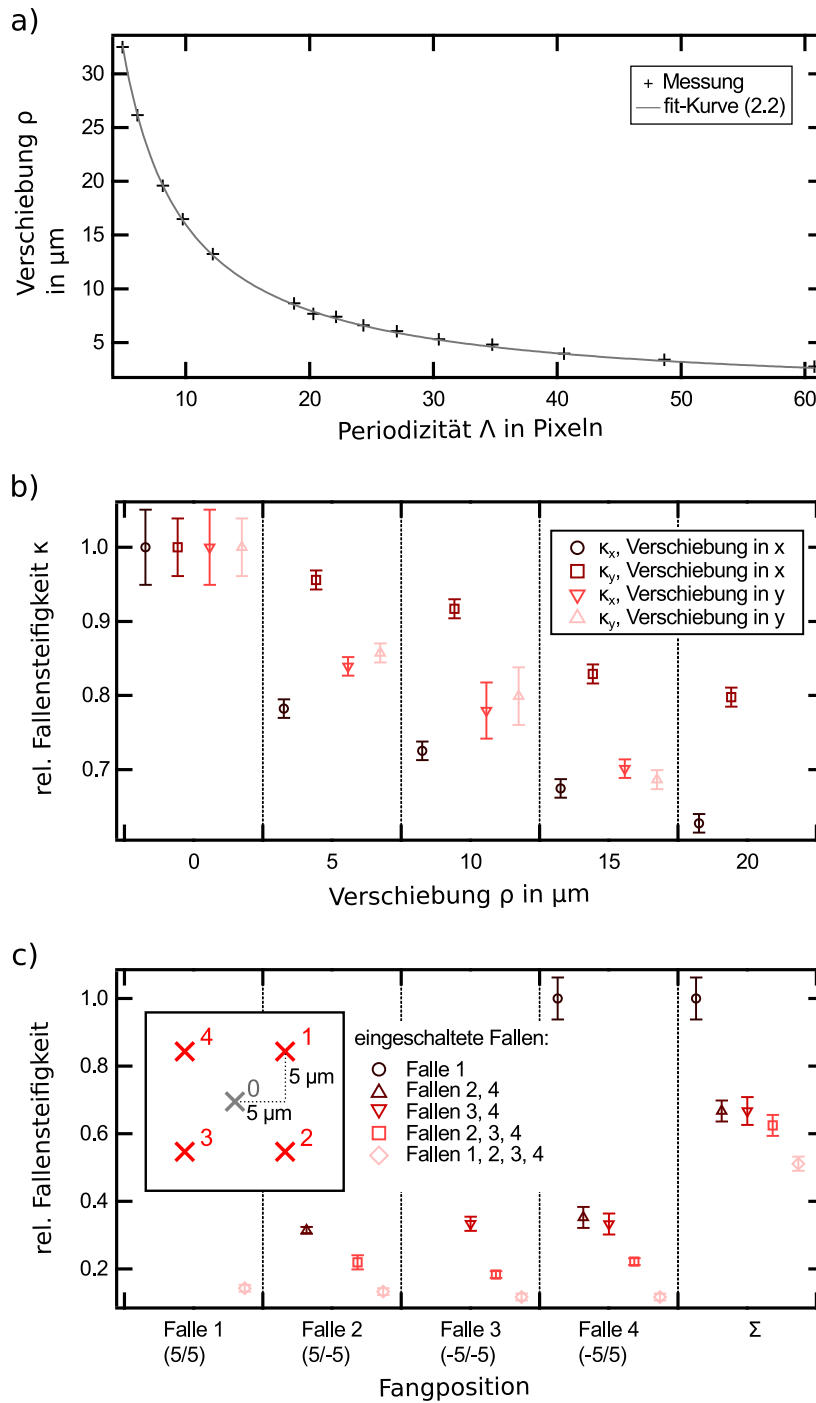


Abbildung 4.3.: Kalibration des SLM. (a) Abhängigkeit der Verschiebung ρ von der Periodizität Λ des auf dem SLM-Display dargestellten Blaze-Gitters, fit-Kurve gemäß Gleichung (4.3). Die resultierende effektive Brennweite wurde bestimmt zu $f_{\text{eff}} = 4506 \pm 8 \mu\text{m}$. (b) Relative Fallensteifigkeit κ in Abhängigkeit der Auslenkung ρ . Mit steigendem Abstand ρ nimmt die Fallensteifigkeit ab. (c) Relative Fallensteifigkeit κ in Abhängigkeit der Anzahl und Position von bis zu vier gleichzeitig erzeugten optischen Fallen. Die Fallen wurden, wie in der Einfügung skizziert, im Abstand von $\rho = \sqrt{(5 \mu\text{m})^2 + (5 \mu\text{m})^2} = 7,07 \mu\text{m}$ an den Stellen (5/5)(Falle 1), (5/ - 5), (Falle 2), (-5/ - 5)(Falle 3), (-5/5)(Falle 4) erzeugt. Die Fallenkalibration des Messungen in (b) und (c) erfolgte anhand der Leistungsspektren der Partikelfluktuationen von unter Messbedingungen in den jeweiligen Fallen gefangenen $2 \mu\text{m}$ großen Polystyrol-Partikeln, Bildrate 10 kHz. Die dargestellten Messungen wurden im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt [201].

4.5. Kalibration der optischen Falle

Die Stärke der per SLM erzeugten optischen Falle hängt, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, von der verwendeten Fallengeometrie ab und muss daher für jede Einstellung separat charakterisiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fanggeometrien wurden mit der in Abschnitt 2.1.2 erläuterten *step response* Methode kalibriert und die Partikelrelaxationen in einem hochviskosen Medium ausgewertet. Diese Methode wurde gewählt, weil sie insbesondere die Charakterisierung des gesamten Kraftprofils der Fanggeometrien ermöglicht. Die erhaltenen Kraftprofile werden zur Bestimmung der rücktreibenden optischen Kraft in den Experimenten zur Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung (Abschnitt 5.3) benötigt.

Im Folgenden ist die Kalibrierung am Beispiel einer Einfachfalle in der ersten Beugungsordnung in einem Abstand von $7,07\ \mu\text{m}$ zur nullten Ordnung und einem Winkel von 45° zur positiven x -Achse gezeigt. Dies entspricht einer Fallenposition an der Stelle (5/5) und ist die in dieser Arbeit am häufigsten verwendete Fanggeometrie. Die Kalibration aller anderen verwendeten Fanggeometrien erfolgte analog. Die Laserleistung bei ausgeschaltetem SLM wurde auf $500\ \text{mW}$ eingestellt, gemessen hinter der Linse L_1 (siehe Abbildung 4.1b), die entsprechende Laserleistung in der Probenebene betrug $460\ \text{mW}$ ohne Mikroskopobjektiv, die Leistung in der Fangenebene bei Nutzung des $60\times$ Immersionsobjektiv mit einer Transmission von $0,7$ [202] lässt sich somit abschätzen zu $320\ \text{mW}$.

Um die Relaxationen der Partikel in die Gleichgewichtsposition der optischen Falle mit ausreichend hoher zeitlicher Auflösung aufzunehmen, wurden die Partikel (jeweils $2\ \mu\text{m}$ und $3\ \mu\text{m}$ PS-COOH) im Verhältnis $1 : 100$ in einer Glycerin-Wasser Lösung mit einem Anteil von $73,9\%$ Glycerin ($c_{\text{Glycerin}} = 99,8\%$, *Grüssing GmbH*) verdünnt, so dass die Relaxationen aufgrund der erhöhten Viskosität verlangsamt sind. Die Bestimmung des Wasseranteils des Glycerin-Wasser-Gemisches erfolgte hierbei im Rahmen einer Bachelorarbeit [203] mit Hilfe eines Oswald-Viskosimeters [204]. Die dynamische Viskosität der Kalibrationslösung ($c_{\text{Glycerin,Kal}} = 73,6\%$) für eine Umgebungstemperatur von $T = 37^\circ$ berechnete sich gemäß [205] zu $\eta_{37^\circ} = 19,3\ \text{mPa}\cdot\text{s} \approx 0,02\ \text{Pa}\cdot\text{s}$. Zur Messung wurden die Partikel in der per SLM generierten optischen Fallenposition an der Stelle (5/5) in einer Höhe von $h = 3\ \mu\text{m}$ oberhalb des Deckglasbodens gefangen. Unter Messbedingungen wurde die optische Falle ausgeschaltet und der Mikroskopisch in $\pm x$ und $\pm y$ Richtung um bis zu $2,5\ \mu\text{m}$ große Abstände transversal verfahren, so dass beim darauffolgenden Einschalten der optischen Falle das ausgelenkte Partikel zurück in die Gleichgewichtsposition relaxierte. Die Aufnahme der Partikelbewegungen erfolgte mit einer Bildrate von $1\ \text{kHz}$. Die resultierenden Trajektorien wurden mit dem in Abschnitt 5.1.3 beschriebenen Kreuzkorrelationsalgorithmus ermittelt und mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten *MatLab* Programm ausgewertet. Das resultierende Geschwindigkeitsprofil $v(t)$ der Partikelbewegungen ergab sich durch eine Kurvenglättung mittels Tiefpassfilterung (*smooth.m*) und Berechnung der zeitlichen Ableitung der Partikelpositionen. Das gemittelte Kraftprofil berechnete sich gemäß den Gleichungen (2.14) bis (2.16) und ist in Abbildung 4.4a dargestellt. Es wurde jeweils über acht Partikelrelaxationen in Intervallen von $0,1\ \mu\text{m}$ pro Richtung und Partikelgröße gemittelt, die Messunsicherheiten in 4.4a entsprechen den Standardabweichungen. Die Bereiche, in denen das Kraftprofil annähernd linear mit der Partikelauslenkung d verläuft, lassen sich abschätzen zu $[-0,9\ \mu\text{m} < d_{3\ \mu\text{m}} < 0,9\ \mu\text{m}]$ und $[-0,45\ \mu\text{m} < d_{2\ \mu\text{m}} < -0,45\ \mu\text{m}]$ (Abbildung 4.4b). Anhand der Steigungen der linearen Bereiche lassen sich für die Einfachfalle an der Stelle (5/5) mit einer Laserleistung von $460\ \text{mW}$ in der Probenebene und bei Verwendung von $2\ \mu\text{m}$

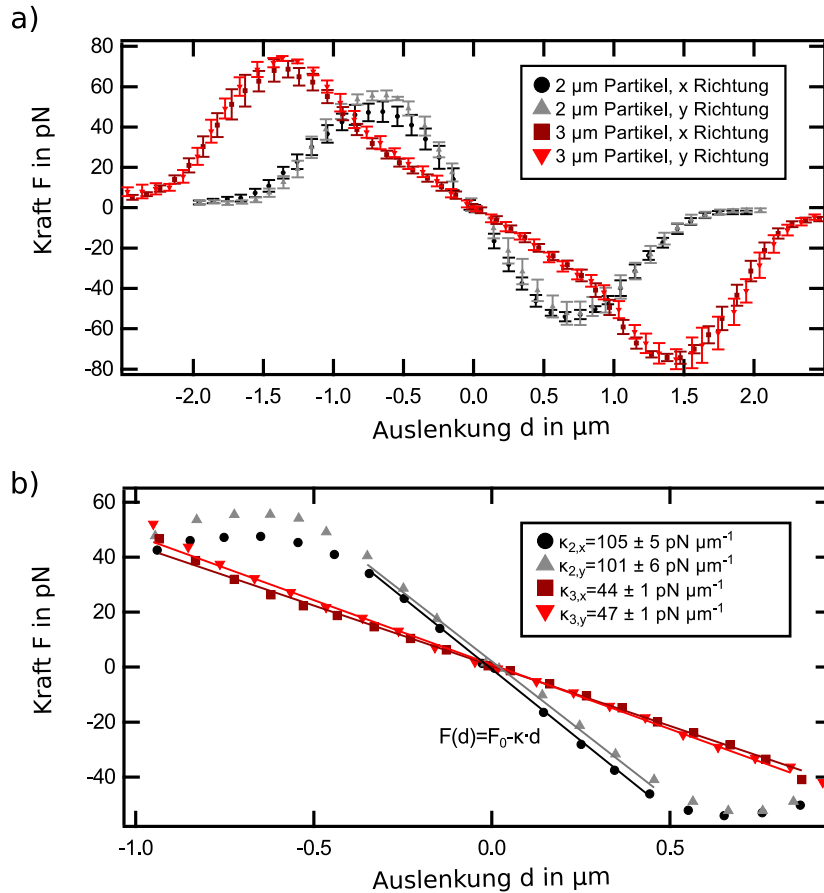


Abbildung 4.4.: Kraftprofil der optischen Falle. (a) Gemitteltetes Kraftprofil der per *step response*-Methode gemessenen Partikelrelaxationen. Das Kraftprofil ergibt sich gemäß den Gleichungen (2.14) bis (2.16). Pro Richtung und Partikelgröße wurde jeweils über acht Partikelrelaxationen in Intervallen von $0,1 \text{ nm}$ gemittelt. (b) Ausschnitt aus (a), die dargestellten Fallensteifigkeitswerte $\kappa_{\text{Kraftprofil}}$ ergeben sich anhand der linearen Fits der annähernd linear verlaufenden Bereiche der Kraft-Auslenkungskurve.

großen Partikeln Fallensteifigkeiten von $\kappa_{x,2 \mu\text{m}} = 104 \pm 5 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$, $\kappa_{y,2 \mu\text{m}} = 101 \pm 6 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$ angeben ($\kappa_{x,3 \mu\text{m}} = 44 \pm 1 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$, $\kappa_{y,3 \mu\text{m}} = 47 \pm 1 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$ für $3 \mu\text{m}$ große Partikel).

Zum Vergleich wurden die Fallensteifigkeiten ebenfalls mittels Varianzanalyse und anhand Berechnung des Leistungsspektrums (siehe Abschnitt 2.1.2) berechnet, wie in Anhang D beschrieben wird. Die Analyse per Leistungsspektrum lieferte jedoch aufgrund der in Abschnitt 4.6 diskutierten Limitierungen keine zuverlässigen Werte für κ . Die im Rahmen der Varianzanalyse berechneten Fallensteifigkeiten bei Verwendung von $3 \mu\text{m}$ großen Partikeln stimmen im Rahmen ihrer Messunsicherheiten mit den oben genannten Werten überein, im Falle der $2 \mu\text{m}$ großen Partikel lagen die Werte deutlich unter den anhand des Kraftprofils bestimmten Werten.

4.6. Diskussion

Die in diesem Kapitel vorgestellte Arbeitsstation wurde im Hinblick auf maximale Vielseitigkeit zur Beobachtung und Charakterisierung der Phagozytose konzipiert. Dadurch wurden einige Kompromisse eingegangen. So ist die gleichzeitige Nutzung des *perfect focus systems* und der optischen Falle in der aktuellen Realisierung aufgrund der Absorptionscharakteristik des PFS-Spiegels nur

4. Experimenteller Aufbau

unter starken Verlusten der Laserleistung möglich. Ebenfalls ist der Strahlengang des Lasers, bevor er in das Mikroskopobjektiv eingekoppelt wird, aufgrund der in Abschnitt 4.3 diskutierten geometrischen Voraussetzungen für Strahlformung und Strahlkontrolle mit über 6,6 m Länge sehr lang und besteht aus vielen optischen Komponenten. Thermische Drift und Störeffekte wirken sich daher im Vergleich zu deutlich kürzeren Strahlengängen stärker aus, wie unter anderem in den Kurven in Abbildung D.1a sichtbar ist.

Der Messaufbau bietet Potential für mögliche technische Erweiterungen. Durch leichte Modifikationen einzelner optischer Komponenten sollte sich beispielsweise die Funktionalität der holografischen optischen Falle relativ einfach erhöhen lassen. So könnten beispielsweise durch die Verwendung entsprechender Phasemuster zusätzlich Drehimpulse auf die gefangenen Objekte übertragen werden [206, 207], so dass sich die phagozytische Antwort der Zelle auf Objekte mit kontrollierbarer Rotation untersuchen ließe. Mit Hilfe einer modifizierten AOM-Ansteuerung ließe sich die Laserintensität während der Messung dynamisch regeln, beispielsweise mit hoher periodischer Frequenz oder in Kombination mit dem in Abschnitt 5.3.3 diskutierten *live tracking* in Abhängigkeit von der aktuellen Partikelposition.

Zur Bestimmung der zellulären Kräfte, welche Zellen auf optisch gefangene Partikel ausüben, wurde das Kraftprofil der verwendeten optischen Falle mit Hilfe der *step response*-Methode bestimmt. Die so experimentell bestimmten Kraft-Auslenkungskurven (Abbildung 4.4) wurden in den Zell-Experimenten als *look up table* verwendet, um die auf ausgelenkte Partikel wirkende rücktreibende Kraft zu quantifizieren, und ermöglichten eine direkte Kraftbestimmung über den linearen Bereich der optischen Falle hinaus. Die in Abbildung 4.4 dargestellten Kurven geben die bei der jeweiligen Partikelauslenkung im Rahmen ihrer Standardabweichungen wirkende rücktreibende optische Kraft F an. Die leichte Asymmetrie zwischen x- und y-Richtung lässt sich durch ein nicht zu 100% symmetrisches Strahlprofil des Fanglasers in der Probenebene erklären.

Zur Kontrolle wurde die für den linearen Bereich bestimmte Fallensteifigkeit mit den sich aus der Partikelfluktuation ergebenden Steifigkeitswerten verglichen. Die per Varianzanalyse berechneten Werte für $\kappa_{\text{Equipartition}}$ stimmen im Fall der 3 μm Partikel im Rahmen ihrer Ungenauigkeiten mit den entsprechenden $\kappa_{\text{Kraftprofil}}$ -Werten überein. Im Falle der 2 μm -Partikel liegen die Werte für $\kappa_{\text{Equipartition}}$ jedoch deutlich unter den anhand des Kraftprofils bestimmten Werten. Aufgrund der starken Positionsschwankungen (siehe Abbildung D.1a), welche in die Berechnung der Varianz mit einfließen, liefert die Berechnung per Equipartitionstheorem somit eine insbesondere im Falle der 2 μm großen Partikel unterschätzte Fallensteifigkeit [50]. Mögliche Ursachen der starken Drift resultieren unter anderem aus dem oben erwähnten sehr langen Strahlengang des optischen Aufbaus. Im Falle der *step response* Methode fielen entsprechende Positionsschwankungen weniger ins Gewicht. Die gemessenen Partikelrelaxationen $x(t)$ in die Gleichgewichtslage erfolgten im Vergleich zu den Amplituden der Schwankungen (siehe z.B. Abbildung 2.3b) über deutlich größere Distanzen von bis zu 2 μm , so dass eventuell überlagerte Positionsschwankungen nach Berechnung des gemittelten Geschwindigkeitsprofils vernachlässigt werden können. Die mittels Leistungsspektrum berechneten Fallensteifigkeiten κ_{PSD} lieferten keine einheitlichen Ergebnisse und waren im Fall der 2 μm Partikel deutlich niedriger, im Fall der 3 μm Partikel deutlich höher als die entsprechend anhand der Kraftprofile berechneten Werte. Die Leistungsspektren wiesen besonders im Bereich hoher Frequenzen starke Signale auf (siehe Abbildung D.1c), was auf *aliasing*-Effekte aufgrund unzureichender Samplingfrequenz hindeutet. In entsprechenden Leistungsspektren deutlich schwächerer optischer Fallen tritt dieser Effekt nicht auf. Die hohen Frequenzanteile der Partikelbewegung

können somit nicht vollständig erfasst werden und erhöhen fälschlicherweise die Anteile niedriger Frequenzen (*aliasing*). Dieser Effekt sowie weitere mögliche aus dem experimentellen Aufbau resultierende Störsignale (siehe auch Abschnitt 2.1.2) führen dazu, dass die *fit*-Funktionen 2.13 die Kurvenverläufe für hohe Frequenzen nicht gut erfassen. Die mittels Leistungsspektrum berechneten *trap stiffness*-Werte wurden daher insgesamt als nicht vertrauenswürdig angesehen. Für eine exakte Kalibration per Leistungsspektrum sind eine, die aktuell maximal erreichbare Samplingfrequenz deutlich übersteigende Samplingfrequenz sowie eine sorgfältige Analyse (Auffinden und Filterung von Störsignalen) des Powerspektrums notwendig.

Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

Wie in Kapitel 3 bereits ausführlich dargelegt wurde, ist die Art und Weise der Beteiligung von Aktin an den einzelnen Phasen der Phagozytose zum jetzigen Stand nicht vollständig geklärt. In diesem Kapitel werden daher experimentelle Ansätze präsentiert und diskutiert, welche zur Quantifizierung der Phagozytose und des Einflusses von Aktin auf die verschiedenen Phasen der Phagozytose dienen. Konkret werden hierfür, nach einer allgemeinen Erläuterung der verwendeten Materialien und Methoden (Abschnitt 5.1), die Phagozytose-Effizienz (Abschnitt 5.2), die Viskoelastizität und Zellsteifigkeit während der Partikelinternalisierung (Abschnitt 5.3) und der Partikeltransport nach abgeschlossener Internalisierung (Abschnitt 5.5) bei verschiedenen Graden der Aktin-Inhibierung untersucht. Die Inhibierung der Aktin-Polymerisation erfolgt mit Hilfe des fungalen Toxins *Cytochalasin D* (CytoD). Zusätzlich wird eine experimentelle Technik eingeführt, mit der sich die Phagozytose mit Hilfe einer optischen Pinzette induzieren und gleichzeitig unter Beobachtung der Zelle im Profil studieren lässt (Abschnitt 5.4). Am Schluss dieses Kapitels werden die Experimente und Ergebnisse zusammenfassend betrachtet (Abschnitt 5.6).

5.1. Methoden und Materialien

Alle in diesem Kapitel diskutierten experimentellen Arbeiten wurden an der Zelllinie *J-774A.1* durchgeführt und erforderten die Verwendung von mit Immunoglobulinen G (IgG) oberflächenfunktionalisierten Partikeln. Die Auswertung der aus den Experimenten gewonnenen Messdaten erfolgte mit Hilfe eines in der Arbeitsgruppe entwickelten *particle tracking*-Algorithmus, die Inhibierung der Aktin-Polymerisation wurde mit CytoD durchgeführt.

5.1.1. Zellkultur und Probenvorbereitung

Die Experimente in dieser Arbeit wurden an murinen Makrophagen der Zelllinie *J-774A.1* (DSMZ, Braunschweig) durchgeführt. Diese Art Zellen wurde ursprünglich aus dem J774 Retikulum Sarkom der weiblichen *BALB/c* Labormaus isoliert und zeichnet sich durch eine aktive Antikörpermedierte Phagozytose aus [208, 209]. Dadurch und aufgrund ihrer leichten Kultivierbarkeit haben sich *J-774A.1*-Zellen in der Immunologie und für Fc γ -medierte Phagozytose-Studien etabliert [165, 160, 210]. Die Zellen sind adhärent und unterliegen der biologischen Sicherheitsstufe 1 [211].

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

Die Zellkultivierung wurde in einem Zellkulturmedium bestehend aus *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM, Gibco, Carlsbad, California) mit einer 4 mmol l^{-1} Glukose-Konzentration (Gibco), einem 10 % Anteil an Hitze-inaktiviertem fetalen Kälber-Serum (FCS, Biochrom, Berlin) und einem 5 % Anteil von L-Glutamin (2 mmol l^{-1} , Thermo Scientific, Braunschweig) bei Standardbedingungen (Inkubationskammer *Heracell 150i*, Thermo Scientific, mit 37° Umgebungstemperatur, 5 % CO_2 , relative Luftfeuchtigkeit $\approx 93\%$) durchgeführt. Um die Zellen in einer für die Kultivierung geeigneten Konzentration zu halten wurde routinemäßig drei Mal pro Woche die Konzentration definiert verdünnt. Hierfür wurde das Zellkulturmedium durch *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS, Gibco) ersetzt und die adhären Zellen mittels eines Zellschabers (*cell scraper S*, TPP, Trasadingen, Schweiz) vom Boden des T-25 Kulturgefäßes (Corning, Corning, New York) gelöst und in 15 ml Zentrifugationsröhrchen (*Cellstar tubes*, 15 ml, Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Nach einem Waschschrift durch Zentrifugation (2 min bei 200 g und Raumtemperatur, *Heraeus Biofuge primo R*, Thermo Scientific) wurde das DPBS entnommen, das Zellpellet durch Auf- und Abpipettieren mit Zellkulturmedium gelöst und eine definierte Menge der Zellsuspension in ein T-25 Kulturgefäß zur weiteren Kultivierung verdünnt überführt. Die Zellen wurden steril gehalten und regelmäßig auf Mycoplasmenbefall überprüft. Alle relevanten Zellkulturarbeiten erfolgten an einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung (*Herasafe KS*, Thermo Scientific).

Die Zellexperimente erfolgten in einem Abstand von 1 - 2 Tagen nach Zellkultivierung, die Probenpräparation für die Zellexperimente erfolgte aus derselben Suspension, die der weiteren Kultivierung diente. Zur Probenpräparation wurden, soweit nicht anders angegeben, autoklavierte, runde Mikroskop-Deckgläser der Stärke #1 (nominelle Dicke 0,13 - 0,16 mm, Durchmesser 18 mm, Menzel Gläser, Braunschweig) verwendet, auf die in *12-well plates* (*Cellstar*, Greiner Bio-One) jeweils 1 ml einer verdünnten Zelllösung hinzugegeben wurde. Die vorbereiteten Proben wurden bis zu ihrer Verwendung in der Inkubationskammer unter Standardbedingungen gelagert und den Zellen somit genügend Zeit zur Sedimentation und Adhäsion gegeben. Zur Bestimmung der optimalen Zellkonzentration wurden die Zellen in ansteigenden Konzentrationen auf den Deckgläsern ausgesät und die zeitliche Entwicklung der Zelldichte auf den Deckgläsern für typische Inkubationszeiten kontrolliert, wie in Abbildung 5.1 dargestellt ist. Für Experimente am Folgetag wurde demnach, soweit nicht anders angegeben, eine verdünnte Zelllösung in der Konzentration von $4 \cdot 10^4$ Zellen/ml, für Experimente im zeitlichen Abstand von 48 Stunden nach Probenvorbereitung eine Zelllösung in der Konzentration von $3 \cdot 10^4$ Zellen/ml zur Probenvorbereitung verwendet. So wurde in den Messungen eine homogene und gleichbleibende Zelldichte mit erwarteter Zellmorphologie bei gleichzeitiger guter Zellakzessibilität für Einzelzellexperimente gewährleistet.

Für die Zellexperimente wurden die auf den Deckgläsern ausgesäten Zellen zunächst mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser in speziell für die verwendeten invertierten Mikroskope angefertigten Aluminium-Probenhaltern befestigt. Zur Befestigung der Deckgläser wurde hochviskoses Vakuumfett (*Korasilon Paste*, Kurt Obermeier GmbH, Bad Berleburg) verwendet, um die Entstehung von Luftbläschen an der Grenzfläche zu vermeiden und eine Versiegelung der Probe zu gewährleisten. Die Deckgläser mit den darauf befindlichen Zellen bildeten hierbei den Boden der Proben. Die so entstandene Probenkammer wurde mit einer verdünnten Lösung von Partikeln in *imaging medium*, bestehend aus *Minimum Essential Medium*, (MEM, Gibco) mit 5 % HEPES (Gibco) und 1 % Penicillin-Streptomycin (10^5 Einheiten ml^{-1} , Gibco) befüllt. HEPES fungiert hierbei als effizienter pH-Puffer zur Aufrechterhaltung physiologischer pH-Werte in Kulturmedien trotz stoffwechselbedingter Änderungen der CO_2 -Konzentration [212]. Im Gegensatz zum

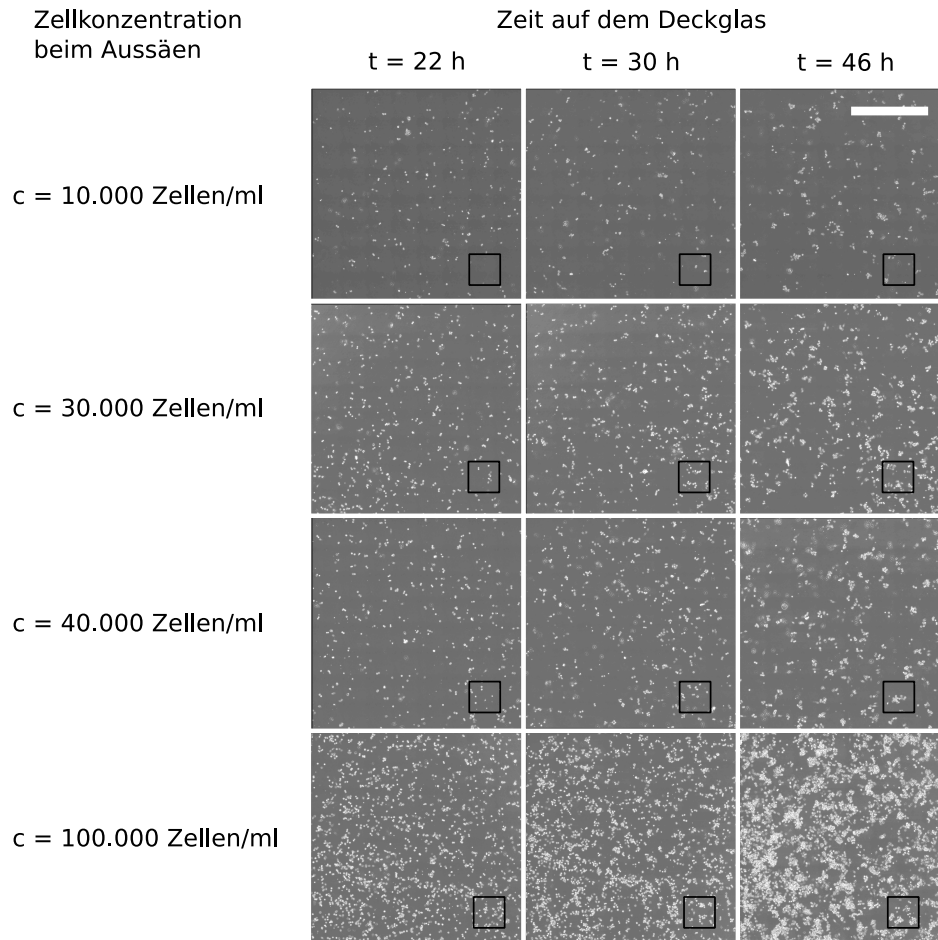


Abbildung 5.1.: Zeitliche Entwicklung der Zellkonzentration c auf den Deckgläsern. Dargestellt sind Großbildaufnahmen (Phasenkontrast, $20\times$ Vergrößerung, $2785 \times 2791 \mu\text{m}^2$) der *J-774.A1* Makrophagen, die in unterschiedlichen Anfangskonzentrationen c auf den Deckgläsern ausgesät wurden. Die Zellkonzentrationen wurden für dieselben Deckgläser jeweils 22, 30 und 46 Stunden nach Probenvorbereitung kontrolliert. Die Messung diente zur Bestimmung der optimalen Zellkonzentration. Mit steigender Inkubationsdauer nahm die Konfluenz der Zellen zu. Für reproduzierbare Konfluenzen wurden daher die Anfangskonzentrationen an die Inkubationszeiten bis zur Durchführung der Experimente angepasst. Die eingezeichneten Quadrate entsprechen dem typischen Sichtfeld ($400 \times 400 \mu\text{m}^2$) der *Andor Luca R* Kamera bei Verwendung derselben Mikroskopeinstellungen. Maßstabsbalken 1 mm.

Zellkulturmedium enthielt das *imaging medium* keinen Farbstoff zur pH-Indikation und kein FCS, um unspezifische Bindungen zwischen den funktionalisierten Partikeln und Serumproteinen auszuschließen. Die verwendeten Partikelkonzentrationen wurden an das jeweilige Experiment angepasst und lagen typischerweise in den Größenordnungen $10^7 - 10^8 \text{ ml}^{-1}$.

Für die Experimente zur Messung der Phagozytose-Effizienz und zur Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung wurden die Proben mit einem zusätzlichen Deckglas verschlossen, um Evaporation des Mediums zu verhindern und eine optimale Bildgebung im Mikroskop zu gewährleisten. Die Experimente zur Quantifizierung des Phagosomtransports mit Hilfe der magnetischen Pinzette erforderten hingegen offene Proben, um die magnetische Spitze in die Proben einzutauchen.

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

5.1.2. Partikelfunktionalisierung

Die Funktionalisierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Partikel mit Antikörpern basierte auf einem Protokoll zur passiven Adsorption des Antikörper-Herstellers (ThermoFisher, Waltham, USA). Als Partikel wurden weiße carboxylierte sphärische Polystyrol-Partikel mit den Durchmessern 1, 2 und 3 μm (*micromer COOH*, micromod, Rostock) sowie superparamagnetische carboxylierte sphärische Partikel in den Größen 1 μm (*Dynabeads MyOne*, ThermoFisher) und 2,8 μm (*Dynabeads M-270*, ThermoFisher) verwendet. Polystyrol-Partikel besitzen einen für Anwendungen mit optischen Fallen geeigneten hohen Brechungsindex $n \approx 1,6$ [44]. Der zur Funktionalisierung verwendete primäre Antikörper Immunglobulin G (IgG, Merck Millipore, Darmstadt) wurde aus Maus-Serum extrahiert. Die jeweilige Proteinkonzentration ist herstellungsbedingt und kann je nach Charge 20 - 30 mg ml^{-1} verschiedene IgG-Isotypen enthalten. Die Funktionalisierung erfolgte, wie im Folgenden beschrieben. Die Partikellösungen wurden in einer MES-Puffer-Lösung (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, 25 mmol l^{-1} , pH-Wert 6, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) verdünnt und dreimal durch Zentrifugieren (2000 g, 20°) gewaschen. Im Falle der magnetischen Partikel erfolgten die Waschschriffe mittels magnetischer Separation durch einen Permanentmagneten.

Die IgG-Stockkonzentration betrug 27 mg ml^{-1} . Zur Funktionalisierung wurde eine geeignete Menge an IgG zur Partikellösung hinzugegeben, um eine vollständige Bedeckung der Partikeloberfläche mit IgG zu gewährleisten. Für die Berechnung der benötigten Menge Antikörper wurde für die IgG-Proteine eine Masse von 150 kDa [213] und ein sphärisches Volumen mit einem Stokes-Radius von 6,4 nm [214] angenommen. Für 3 μm Partikel in der Konzentration $2 \cdot 10^9 \text{ ml}^{-1}$ und 1 ml Gesamtvolumen ergab sich damit das nötige Volumen der IgG-Lösung zu $V_{\text{IgG}} = 3,2 \mu\text{l}$. Die resultierende Partikel-Antikörper-Lösung wurde für 24 Stunden unter sanftem Mixen auf einem Wippschüttler (*Grant-bio PMR30*, Grant Instruments, Cambridgeshire, England) bei Raumtemperatur inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit DPBS in einem Lagerungspuffer (0,1 mol l^{-1} PBS, 0,1 % Glyzin-Anteil, 7,2 pH, Lonza, Basel) bei 4 °C gelagert. Eine qualitative Kontrolle der primären Antikörper-Beschichtung erfolgte mithilfe spezifisch an die primären Maus-IgG Proteine anbindender sekundärer fluoreszenter Antikörper (Ziege Anti-Maus, *Dy-Light 488*, Konzentration 1 mg ml^{-1} in 0,1 M Natriumphosphat, Thermo Scientific). Im Falle der magnetischen Partikel, welche eine starke Autofluoreszenz im grünen Bereich aufwiesen, wurden entsprechend angepasste sekundäre Antikörper (Ziege Anti-Maus, *Alexa Fluor 350*, Konzentration 2 mg ml^{-1} in 0,5 mM Natriumphosphat, Thermo Scientific) verwendet. Die sekundären Antikörper wurden im Verhältnis 1 : 100 zu einer verdünnten Lösung funktionalisierter Partikel hinzugegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde unter sanftem Mixen inkubiert. Die qualitative Kontrolle erfolgte nach einem Waschschriff durch Abbildung der Partikel mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie, siehe Abbildung 5.2.

5.1.3. Partikeltracking

Aus den aufgenommenen Bilderserien der jeweiligen Messungen wurde im ersten Schritt der Datenauswertung die Position der beobachteten Partikel bestimmt. Hierzu wurde ein in der Arbeitsgruppe entwickelter *particle tracking*-Algorithmus verwendet, welcher auf dem Prinzip der Kreuzkorrelation beruht und die jeweiligen Partikelpositionen pro Bild mit Subpixelgenauigkeit berechnet. Die Implementierung erfolgte mit *MatLab*. Das Prinzip des *tracking*-Algorithmus ver-

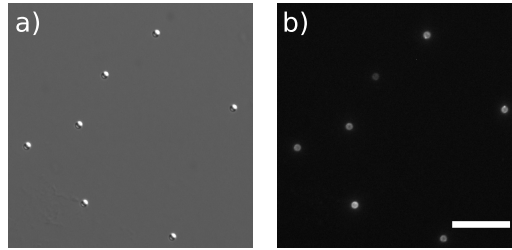


Abbildung 5.2.: Qualitative Kontrolle der Partikel-Funktionalisierung. (a) DIC-Aufnahme von sedimentierten Polystyrol-Partikeln mit Durchmesser von $2\ \mu\text{m}$ nach erfolgter Beschichtung mit primären Antikörpern (IgG) und anschließender Färbung mit sekundären fluoreszenten *Dy-Light 488* Antikörpern gemäß 5.1.2. (b) GFP-L Fluoreszenz-Aufnahme des Bildausschnitts in (a). Die mit sekundären Antikörpern markierten Partikel waren deutlich sichtbar. Unbeschichtete Polystyrol-Partikel hingegen waren nach entsprechender Inkubation mit sekundären Antikörpern im Fluoreszenz-Kanal nicht detektierbar (nicht gezeigt), *scale bar* $10\ \mu\text{m}$.

deutlicht Abbildung 5.3. Die Positionsbestimmung erfolgte im Wesentlichen in zwei Stufen. Im ersten Schritt wurde für jedes Einzelbild (Abb. 5.3a) die Pixelposition des zu trackenden sphärischen Partikels bestimmt. Hierzu wurde die normalisierte 2D-Kreuzkorrelation [215] zwischen einem Bildausschnitt, welcher das Partikel enthielt (*scan region*, Abb. 5.3a, gestrichelter Bereich), und einem kleineren Referenzbild (*region of interest*, ROI, Abb. 5.3b) berechnet. In der Regel entsprach das Referenzbild einem manuell ausgewählten Bereich um das Partikel im ersten Bild der aufgenommenen Bilderserie. Das Maximum der Kreuzkorrelationsmatrix (Abb. Abb. 5.3c-d) entsprach der Pixelposition mit größter Ähnlichkeit zwischen dem aktuellen Bild des Partikels und dem Referenzbild, im Bereich um das Maximum fielen die Korrelationswerte charakteristisch ab. Die subpixelgenaue Bestimmung der Partikelposition (Abb. 5.3d) erfolgte im zweiten Schritt des *tracking*-Algorithmus durch Fitten der Kreuzkorrelationsmatrix mit einer zweidimensionalen Gauss-Verteilung. Die Auflösung des Partikeltrackings hängt von den experimentellen Bildparametern (Vergrößerung, Bildkontrast, Kamera-pitch) ab. Für die in dieser Arbeit am häufigsten verwendeten Bildparameter (Hellfeldaufnahmen von $2\ \mu\text{m}$ Partikeln, *IDT Nx4* CMOS Kamera, $60\times$ Mikroskopobjektiv) wurde die Genauigkeit des Partikeltrackings mit Hilfe von Computer-Simulationen abgeschätzt. Dazu wurde die freie Diffusion von Partikeln der Größe $2\ \mu\text{m}$ unter Experiment-Bedingungen simuliert. Die Berechnung der Partikelbewegung erfolgte hierbei mittels Standardalgorithmus für randomisierte Brownsche Bewegung [216], das Partikel wurde als 2D-sinc Funktion genähert. Anschließend wurden die resultierenden Bilderserien mit dem *tracking*-Algorithmus ausgewertet. Die Abweichung der per *tracking*-Algorithmus rekonstruierten Partikelpositionen von den tatsächlichen Positionen der simulierten Bewegungen betragen hierbei im Mittel nicht mehr als $\delta = 1,3 \pm 0,5\ \text{nm}$ ($0,012 \pm 0,005$ Pixel). Ausführlichere Details zur Simulation finden sich in Anhang E.

Bei starker Änderung der Partikelabbildung während einer Messung, zum Beispiel durch Verschiebung der Fokusebene oder durch Kontakt mit weiteren Partikeln, kann die Bestimmung der Partikelposition fehlschlagen. Insbesondere bei der Verwendung der $1\ \mu\text{m}$ Partikel in den Messungen der Transporteigenschaften kleiner Phagosomen innerhalb der Zelle (siehe Abschnitt 5.5) trat dieser Effekt häufig auf. Hier führten die auftretenden starken Positionsänderungen der kleinen Phagosomen zu Helligkeits- und Schärfeschwankungen der Partikelabbildung. In diesen Fällen konnte die Positionsbestimmung durch Verwendung der Partikelabbildung im vorausgegangenen Bild als Referenzbild erfolgen oder musste, falls auch dies fehlschlug, durch manuelle Auswahl des Parti-

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

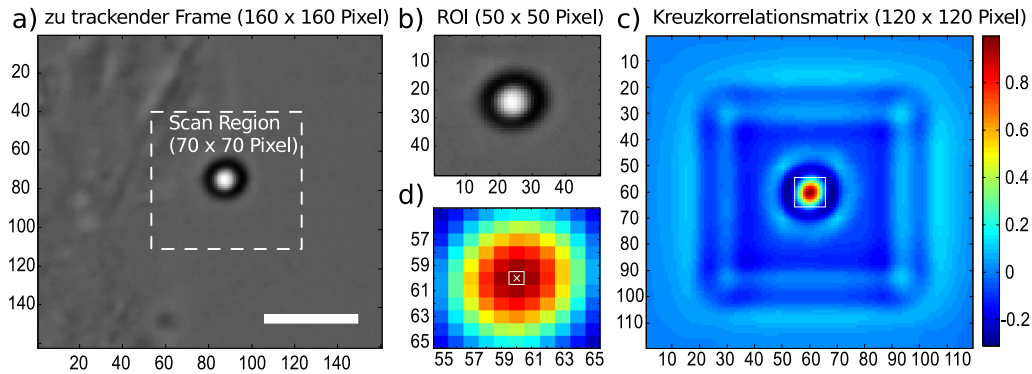


Abbildung 5.3.: Prinzip des *tracking*-Algorithmus. (a) Hellfeld-Bild eines an eine Makrophage (linker Bildrand) angehängten funktionalisierten Partikels mit einem Durchmesser von $3\ \mu\text{m}$. Der gestrichelte Bereich gibt die *scan region* an, innerhalb derer die Partikelposition bestimmt werden kann. Das Bild ist einer Messreihe zur Bestimmung der Zellsteifigkeit entnommen, *scale bar* $5\ \mu\text{m}$. (b) Referenzbereich (ROI), mit dem der Scan Bereich aus (a) per Kreuzkorrelation verglichen wird. Der Referenzbereich wurde im ersten Bild der Bilderserie manuell festgelegt. (c) Resultierende Kreuzkorrelationsmatrix aus der Berechnung der Kreuzkorrelation zwischen *scan region* und ROI. (d) Vergrößerter Ausschnitt der Kreuzkorrelationsmatrix (weißer Bereich in (c)). Das weiße Quadrat in (d) zeigt das Pixel (hier (60/60)) mit maximaler Korrelation an, das Kreuz innerhalb des weißen Quadrates den subpixelgenauen Wert (hier (60,026/60,002)) einer über den in (d) dargestellten Bereich gefitteten 2D Gauss-Verteilung.

kels festgelegt werden. Die neu festgelegte Partikelposition diene in den nachfolgenden Bildern als Referenzposition.

Für die Experimente, welche ein Partikeltracking in Echtzeit während der laufenden Messung erforderten, wurde eine leicht modifizierte Implementierung des *tracking*-Algorithmus verwendet. Die manuelle Partikelwahl im Falle von fehlgeschlagener Positionsbestimmung wurde hier durch eine alternative automatisch erfolgende Partikelbestimmung ersetzt, welche auf dem Prinzip der radialen Transformation [217] beruht. So konnte das Fortschreiten des *tracking*-Algorithmus garantiert werden.

5.1.4. Inhibierung der Aktin Polymerisation mit *Cytochalasin D*

Zur Inhibierung der Aktin Polymerisation wurde das fungale Toxin *Cytochalasin D* (CytoD, C8273, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) benutzt. Typische in der Literatur verwendete CytoD-Konzentrationen liegen in der Größenordnung einiger $\mu\text{mol l}^{-1}$, je nach Zellart und Anwendung sind die jeweils beschriebenen Auswirkungen auf die gewählten Konzentrationen unterschiedlich drastisch und weichen stark voneinander ab [185, 187, 186]. Daher wurde für den in dieser Arbeit verwendeten Zelltyp der *J-774A.1* Maus-Makrophagen in einer Messreihe der Einfluss von steigender CytoD-Konzentration auf das Zellverhalten und die Morphologie überprüft, wie in Abbildung 5.4 dargestellt. Ab einer CytoD-Konzentration von $1\ \mu\text{mol l}^{-1}$ ($=1\ \mu\text{M}$) traten sichtbare Effekte auf. Entlang der Zellmembran bildeten sich kleinere Membranfilamente heraus (weiße Pfeile in Abbildung 5.4), was auf ein Nachlassen der Membranspannung hindeutet, zudem wiesen die Zellen keine Membranruffles mehr auf. Die Zellmorphologie blieb weiterhin erhalten. Ab einer CytoD-Konzentration von $5\ \mu\text{M}$ änderte sich auch die Zellmorphologie und die Zellen zogen sich zusammen und lösten sich teilweise vom Deckglas ab. Anhand dieser Beobachtungen wurden in den folgenden Experimenten die CytoD-Konzentrationen $0\ \mu\text{M}$ (Kontrolle), 1 und $2\ \mu\text{M}$ (mittlere CytoD-Konzentration) und 5 und $10\ \mu\text{M}$ (hohe CytoD-Konzentration) verwendet. Die Experimente erfolgen nach einer Einwirkzeit von mindestens $15\ \text{min}$ nach Zugabe der CytoD Lösung.

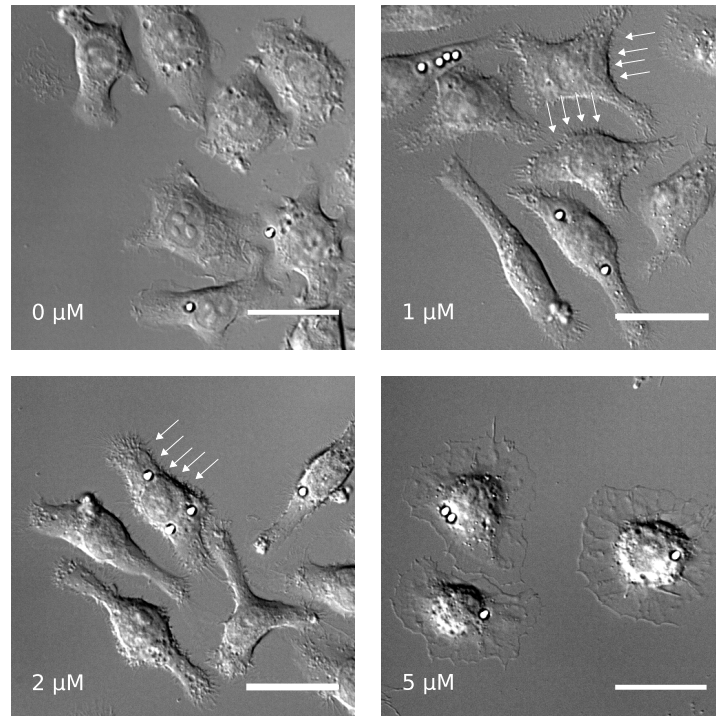


Abbildung 5.4.: Messreihe zur Bestimmung geeigneter CytoD-Konzentrationen. DIC-Aufnahmen der in den Experimenten verwendeten *J-774A.1* Zellen nach Zugabe von Partikellösungen mit steigender CytoD-Konzentration. Die Proben wurden entsprechend Abschnitt 5.1.1 vorbereitet, die CytoD Einwirkzeit betrug mindestens 15 Minuten. Ab einer CytoD-Konzentration von 1 μM traten mit der Ausbildung kleiner Membranfilamente (die weißen Pfeile zeigen einige Filamente an) sichtbare Effekte auf, ab Konzentrationen von 5 μM verloren die Zellen ihre typische Morphologie und zogen sich teilweise zusammen, scale bar 20 μm .

5.2. Messung des Aktin-Einflusses auf die Phagozytose-Effizienz

Eine gängige Technik zum Nachweis, ob ein Partikel vollständig internalisiert wurde, basiert auf einer an das Partikel angepassten Fluoreszenzmarkierung. Im Falle einer erfolgreichen Internalisierung sollte der nachträglich hinzugegebene Farbstoff das Partikel somit nicht mehr erreichen, so dass dieses im Gegensatz zu nicht internalisierten Partikeln im Fluoreszenzbild dunkel erscheint, wie in Abbildung 5.5 skizziert ist. Diese experimentelle Technik wird in diesem Abschnitt zur Quantifizierung der Phagozytose-Effizienz von *J-774A.1* Zellen bei verschiedenen Graden der Aktin-Inhibierung durch CytoD verwendet. Zur Bestimmung der Aufnahmewahrscheinlichkeiten wird ein automatisierter Algorithmus zur Partikel- und Zellidentifikation sowie zur Quantifizierung der internalisierten Partikelzahlen verwendet.

5.2.1. Experimentelle Durchführung

Zur Messung der Phagozytose-Effizienz wurden *J-774A.1* Maus Makrophagen in einer Konzentration von $4,5 \cdot 10^4$ Zellen/ml auf in 12-wells-Platten gelagerten, runden Deckgläsern (18 mm Durchmesser, Menzel Gläser) ausgesät und für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Direkt vor der Messung wurden 2 μm große Partikel mit IgG-Oberflächenfunktionalisierung in

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

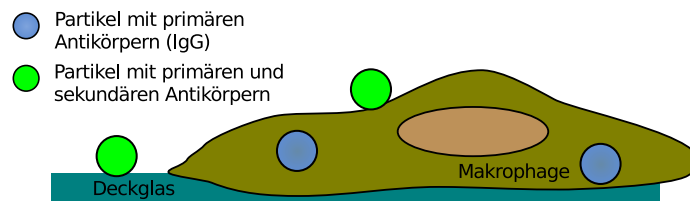


Abbildung 5.5.: Prinzip der Messungen zur Bestimmung der Partikelinternalisierung. Zur Unterscheidung zwischen internalisierten und nicht internalisierten Partikeln wird ein fluoreszenter, spezifisch an IgG anbindender sekundärer Antikörper verwendet. Wird der sekundäre Antikörper nach der Inkubation zugegeben, so erreicht er nicht internalisierte Partikel und kann an die primären Antikörper auf der Partikeloberfläche anbinden, so dass entsprechende Partikel fluoreszent markiert werden (grüne Partikel). Vollständig internalisierte Partikel erreicht der sekundäre Antikörper nicht. Partikel im Zellinneren werden somit nicht fluoreszent markiert und erscheinen somit bei fluoreszenter Beleuchtung im Mikroskop dunkel (blaue Partikel). Ein Beispiel einer entsprechenden Mikroskopaufnahme zeigt Abbildung F.1, zur detaillierten Beschreibung der Experimente siehe Abschnitt 5.2.1.

imaging medium mit CytoD-Konzentrationen von 0, 1, 2, 5 und 10 μM verdünnt und nach einem Waschschriff jeweils 0,5 ml der Partikellösung auf die Proben pipettiert. Die Partikelsedimentation erfolgte für 60 min auf Eis. Nach der Partikelsedimentation wurden die Proben für die Inkubationszeiten von $t_{\text{ink}} = 0, 15, 30$ und 60 min im Inkubationsschrank gelagert. Nach der Inkubationszeit wurde das *imaging medium* entfernt. Anschließend wurden 0,5 ml einer Lösung des spezifischen, fluoreszenten, an IgG anbindenden sekundären Antikörpers (Ziege Anti-Maus, *Dy-Light 488*, Konzentration 1 mg ml^{-1} in 0,1 M Natriumphosphat, Thermo Scientific) in einer 1 : 100 Verdünnung in PBS auf jedes Deckglas gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die sekundäre Antikörperfärbung erfolgte hierbei vor dem Fixierschritt, um das Eindringen des Farbstoffs in die Zellen durch porös gewordene Zellmembranen zu vermeiden. Nach Entfernen der sekundären Antikörperlösung erfolgte die Fixierung der Zellen mit 0,5 ml Paraformaldehyd (PFA, 4%, Sigma Aldrich) für 15 min. Die fixierten Proben wurden vorsichtig in de-ionisiertem Wasser gewaschen und mit *Fluoromount G* (Thermo Scientific) auf Objektträger ($76 \times 26 \text{ mm}^2$, Mediware, Eindhoven, Niederlande) geklebt und getrocknet. *Fluoromount G* bildet eine Versiegelung der Proben und ermöglicht eine langfristige Lagerung. Die Lagerung der versiegelten Proben erfolgte bis zur Bildaufnahme bei 4°C .

Die fixierten Proben wurden mit dem in Abschnitt 4.1 beschriebenen Mikroskop unter Verwendung des $40\times$ Objektivs beobachtet. Mit Hilfe der *scan large image* Funktion des Mikroskops wurde ein großflächiger Bereich gescannt. Dieser entsprach dem 7×7 -fachen des Kamerasichtfeldes der verwendeten *Andor Luca r* EMCCD-Kamera und somit einer Fläche von $1405,6 \times 1402,8 \mu\text{m}^2$. Für jede der 49 *scan*-Positionen wurden DIC- und Fluoreszenz-Aufnahmen (*GFP-L*, Anregungswellenlänge 460 – 500 nm, Emissionswellenlänge 510 nm, Belichtungszeit 200 ms, *Nikon Eclipse Ti-E*) aufgenommen. Um aufgrund der Probenbeschaffenheit resultierende Fokusunterschiede zwischen den einzelnen Positionen zu kompensieren, wurden in jeder Position 15 z-Ebenen über einen Bereich $[-7 \mu\text{m} \leq z \leq 7 \mu\text{m}]$ zentriert um die Deckglasebene $z = 0$ aufgenommen. So konnten in unterschiedlichen Höhen in und auf den Zellen liegende Partikel vollständig erfasst werden. Der Abstand der einzelnen Ebenen betrug $\Delta z = 1 \mu\text{m}$.

5.2.2. Auswertung

Zur Auswertung der Messdaten wurde eine von Wolfgang Groß, Doktorand der AG Kress, geschriebene *Matlab* Software verwendet. Die Software basiert im Kern auf einer Kombination eines *tracking*-Algorithmus zur automatischen Zell-Detektion in DIC-Bildern [90], eines auf 2D-Faltung basierenden Partikel-Detektionsalgorithmus und einer Auswert-Routine. Aus den Fluoreszenz-Kanal-Einzelbildern aller z-Ebenen wurden hierbei die maximalen Intensitätsprojektionen pro Partikel bestimmt. Mit dieser Software ließen sich somit die relativen Helligkeitsverteilungen I_{rel} von Partikeln ohne Zellkontakt mit den entsprechenden Helligkeitsverteilungen von an Zellen befindlichen Partikeln berechnen und vergleichen. Das Prinzip der Berechnung von I_{rel} ist im Anhang F näher erläutert.

Abbildung 5.6 zeigt die aus der Kontrollmessung mit $\text{CytoD} = 0 \mu\text{M}$ zur Zeit $t_{\text{ink}} = 60 \text{ min}$ berechneten Helligkeitsverteilungen für Partikel mit (rote Kurve) bzw. ohne Zellkontakt (schwarze Kurve). Anhand dieser Kontrollmessung wurde der Schwellwert I_{Int} für erfolgreiche Partikelinternalisierung auf $I_{\text{Int}} = 1,15$ festgelegt. Partikel, welche in der maximalen Intensitätsprojektion eine relative Helligkeit von $I_{\text{rel}} < I_{\text{Int}}$ aufwiesen, wurden entsprechend als internalisiert, Partikel mit $I_{\text{rel}} \geq I_{\text{Int}}$ als nicht internalisiert gewertet. Korrekte Partikeldetektion und Zuweisung wurden manuell überprüft. Eine grafische Übersicht der zur Berechnung verwendeten absoluten Partikelzahlen findet sich in Abbildung F.2 in Anhang F.

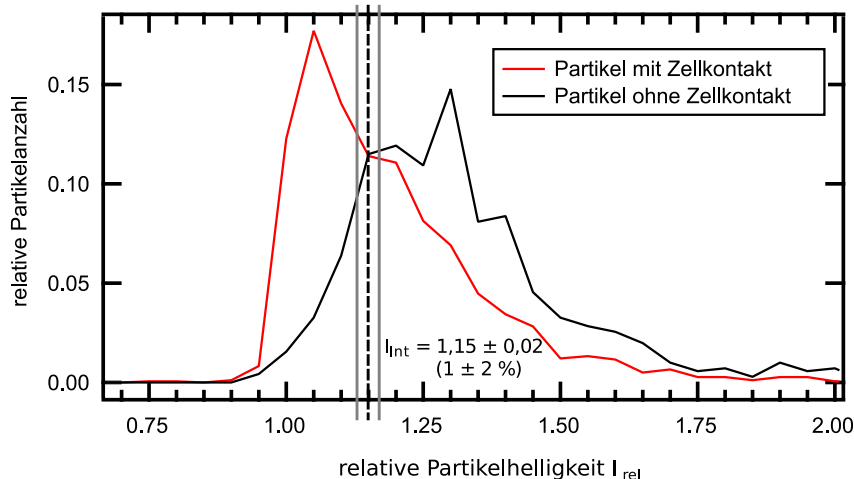


Abbildung 5.6.: Bestimmung des Schwellwerts I_{Int} für erfolgreiche Partikelinternalisierung. Die aus der Kontrollmessung ($0 \mu\text{M}$ CytoD, Inkubationszeit 60 min) berechneten Helligkeitsverteilungen für Partikel mit Zellkontakt (rot) und Partikel ohne Zellkontakt (schwarz) schneiden sich bei $I_{\text{Int}} = 1,15$ (gestrichelte Linie, graue Linien geben den 2% Fehler-Bereich von I_{Int} an). Partikel mit $I_{\text{rel}} < I_{\text{Int}}$ wurden als internalisiert, Partikel mit $I_{\text{rel}} \geq I_{\text{Int}}$ als nicht internalisiert gewertet.

5.2.3. Ergebnisse

Zur Bestimmung der Phagozytose-Effizienz wurden die Zellen nach Inkubationszeiten $t_{\text{ink}} = 0, 15, 30$ und 60 min fixiert, wobei der Zeitpunkt direkt nach der Partikelsedimentation als $t_{\text{ink}} = 0$ festgelegt wurde. Für jede Inkubationszeit wurden die Partikelinternalisierungen in den CytoD-Konzentrationen $0, 1, 2, 5$ und $10 \mu\text{M}$ bestimmt. In Abbildung 5.7 sind die gemäß Abschnitt 5.2.2 berechneten Aufnahmewahrscheinlichkeiten P für die untersuchten Konzentrationen und Zeiten dargestellt. Die Fehlerangaben beziehen sich hierbei auf eine 2% genaue Abschätzung des Schwell-

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

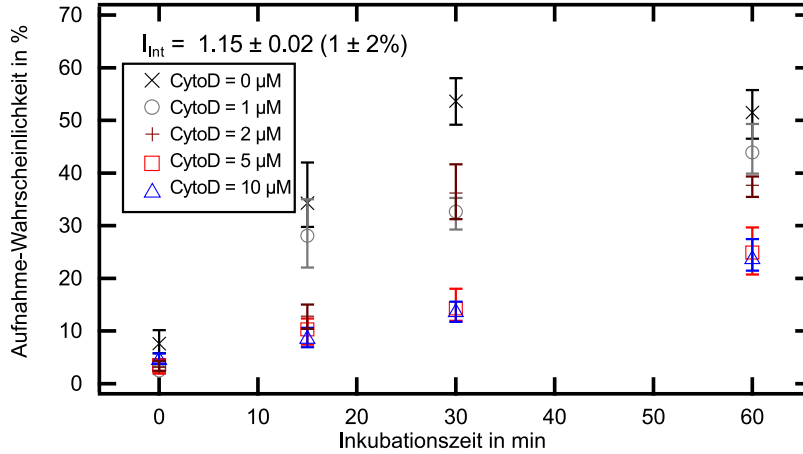


Abbildung 5.7.: Phagozytose-Effizienz der *J-774A.1* Zellen während der Phagozytose von $2\ \mu\text{m}$ großen Partikeln. Relative Aufnahmewahrscheinlichkeit bei verschiedenen CytoD-Konzentrationen ($0, 1, 2, 5, 10\ \mu\text{M}$) und zu verschiedenen Inkubationszeiten ($0, 15, 30, 60\ \text{min}$). Ein Partikel wurde als internalisiert gewertet, wenn seine relative Fluoreszenz-Intensität $I_{\text{rel}} < I_{\text{Int}} = 1,15$ betrug. Die Fehler zeigen die entsprechenden Aufnahmewahrscheinlichkeiten bei einer Änderung von I_{Int} um $\pm 2\%$ an.

werts I_{Int} (siehe Abbildung 5.6). Somit entsprechen die oberen und unteren Fehlergrenzen den P -Werten, welche sich aus analoger Berechnung für Schwellwerte $I_{\text{Int}} = 1,17$ (obere Grenze) bzw. $I_{\text{Int}} = 1,13$ (untere Grenze) ergeben. Aufgrund der Qualität der aufgenommenen experimentellen Daten erwies sich eine 2% Genauigkeit als realistisch.

In allen untersuchten CytoD-Konzentrationen wurde Partikelinternalisierung gemessen. Nach einer Stunde Inkubationszeit ergaben sich die folgenden Wahrscheinlichkeiten P (in %) für Partikelinternalisation: $P_{0\ \mu\text{M}} = 51(1 \pm 10\%)$ für den unbehandelten Fall, $P_{1\ \mu\text{M}} = 44(1 \pm 11\%)$ und $P_{2\ \mu\text{M}} = 38(1 \pm 5\%)$ für mittlere CytoD-Konzentrationen, $P_{5\ \mu\text{M}} = 25(1 \pm 20\%)$ und $P_{10\ \mu\text{M}} = 24(1 \pm 17\%)$ für hohe CytoD-Konzentrationen. Mit steigender CytoD-Konzentration reduzierten sich die Aufnahmewahrscheinlichkeiten.

5.2.4. Diskussion

Um zu verhindern, dass der sekundäre Antikörper in die Zellen eindringt, erfolgte in den Experimenten die sekundäre Antikörper-Färbung vor dem Fixieren der Zellen. Trotzdem konnte auch so das Eindringen des Antikörpers in die Zellen nicht vollständig verhindert werden, so dass in den Zellen zum Teil ebenfalls nicht verschwindende Fluoreszenzsignale gemessen wurden (siehe auch Abb. F.1). Weil die Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität auf dem Verhältnis von Partikelhelligkeit zur Helligkeit der angrenzenden Region beruhte, lag hier eine mögliche Fehlerquelle, so dass Partikel mit starker Helligkeit aufgrund der ebenfalls starken Umgebungshelligkeit fälschlich als internalisiert gewertet wurden. Eine weitere mögliche Fehlerquelle resultierte aus dem Design des *tracking*-Algorithmus. So konnte es vorkommen, dass Partikel, welche sich sehr nah neben einer Zelle befanden, fälschlicherweise als Partikel mit Zellkontakt gewertet wurden, weil der Algorithmus, zum Beispiel aufgrund schwachen Kontrastes der betreffenden Zelle, die Zellkontur nicht korrekt erkannte. Eine generelle Verbesserung des DIC-Zellkontrastes ließe sich durch die Verwendung eines zum *Fluoromount G* alternativen Mediums zur Probenversiegelung erzielen, da *Fluoromount G* mit $n = 1,4$ einen für guten DIC-Kontrast nicht optimalen hohen Brechungsindex besitzt [218]. Durch die nachträgliche manuelle Kontrolle der Partikelzuweisungen konnten beide

5.3. Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung

Fehlerquellen weitgehend reduziert werden. Alle weiteren trotz Kontrolle fälschlich eingeordneten Partikel fielen aufgrund der hohen Gesamtzahl nicht ins Gewicht.

Die verwendete Methode der Quantifizierung der Phagozytose-Effizienz setzt voraus, dass mit sekundären Antikörpern markierte Partikel ein starkes Fluoreszenzsignal aussenden. In den Experimenten fiel jedoch auf, dass viele Partikel der Kontrollgruppe (Partikel auf dem Deckglas ohne Zellkontakt) nur schwach fluoreszent waren und sich in der Intensität somit nicht deutlich von Partikeln mit Zellkontakt unterschieden. Die jeweiligen Helligkeitsverteilungen (Abbildung 5.6) zeigten also einen starken Überlapp. Eine mögliche Ursache hierfür ist der verwendete sekundäre Antikörper, bei dem aufgrund seiner langen Lagerung Alterungseffekte, wie zum Beispiel ein Nachlassen der Bindungsstärke oder eine höhere Wahrscheinlichkeit der Bildung von unspezifischen Antikörper-Bindungen, nicht ausgeschlossen werden konnten. Eine damit verbundene verbreiterte Helligkeitsverteilung der Kontrollgruppe würde somit zu einer Verschiebung des Schnittpunktes der beiden Histogramme in Abbildung 5.6 hin zu niedrigeren Werten und einer entsprechenden Unterschätzung des Anteils an internalisierten Partikeln führen.

Die berechneten Aufnahmewahrscheinlichkeiten stimmen mit vergleichbaren Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe überein und liegen in den erwarteten Größenordnungen vergleichbarer früherer Studien [150, 17]. So geben *van Zon et al.* [150] für *COS-7* Zellen nach 10 min Inkubationszeit und bei einer CytoD-Konzentration von $0,2\ \mu\text{M}$ eine Phagozytose-Wahrscheinlichkeit von etwa 3 % an, manuell quantifizierte Kontrollmessungen von *Irmscher et al.* [17] nach 30 min Inkubationszeit von *J-774A.1* Zellen ergaben Phagozytose-Wahrscheinlichkeiten von ca. 60 % für $\text{CytoD} = 0\ \mu\text{M}$, ca. 20 % für $\text{CytoD} = 1\ \mu\text{M}$ und ca. 2 % für $\text{CytoD} = 10\ \mu\text{M}$. Die Beobachtung, dass in allen verwendeten CytoD-Konzentrationen nicht verschwindende Anteile von internalisierten Partikeln auftraten, deutet darauf hin, dass im Falle der verwendeten *J-774A.1* Makrophagen Phagozytose zum Teil durch Internalisierung ohne starke Aktin-Polymerisierung stattfindet, ähnlich wie im *passive zipper*-Modell [130] und vergleichbar der Endozytose [219]. Es ist zudem möglich, dass durch CytoD-Behandlung zwar die Aktin-Polymerisierung inhibiert wird, bereits vorhandene Aktin-Filamente und ihre Querverbindungen allerdings weiterhin teilweise erhalten bleiben [150]. Ebenfalls plausibel ist ein verlangsamtes Einsetzen der durch das CytoD hervorgerufenen Inhibierung der Aktin-Polymerisation aufgrund der Lagerung der Zellen auf Eis während der Partikelsedimentation.

5.3. Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung

Die in diesem Abschnitt erläuterten und diskutierten Experimente dienen zur Quantifizierung der zellulären Viskoelastizität und der lokalen Zellsteifigkeit während der Phase der Partikelinternalisierung. Dazu wurden funktionalisierte Partikel optisch gefangen und an die Zellmembran von *J-774A.1*-Zellen angebunden. Die angebundenen Partikel erfuhren aufgrund der fortschreitenden Partikelinternalisierung eine Auslenkung aus der optischen Falle. Das Prinzip der hier vorgestellten Experimente basierte auf der gleichzeitigen Induzierung zusätzlicher Partikelrelaxationen und Analyse der resultierenden Trajektorien. Zur Analyse der Spannungs-Dehnungs-Relaxationen wurde ein *power law*-Ansatz gewählt [179, 183]. Die Experimente werden im Folgenden als *blinking traps* bezeichnet, weil die periodische Induzierung der Relaxationen durch Ein- und Ausschalten der ersten Beugungsordnung der holografischen optischen Falle erfolgte.

5.3.1. Experimentelle Durchführung

Zur Experiment-Vorbereitung wurden *J-774A.1*-Zellen in einer Konzentration von $3 - 4 \cdot 10^4$ Zellen/ml auf runden Deckgläsern mit einem Durchmesser von 18 mm und einer maximalen Deckglasdicke von $0,16 \mu\text{m}$ (Stärke #1, Menzel Gläser, Braunschweig) ausgesät, wie in Abschnitt 5.1.1 beschrieben. Diese Art der Probenpräparation ermöglicht im invertierten Mikroskop die Verwendung von Wasserimmersionsobjektiven mit geringem Arbeitsabstand. Nach einem Waschschrift wurden die Proben mittels Vakuumfett von unten in für das Mikroskop angepasste Aluminium Probenhalterungen geklebt, mit der jeweiligen Partikellösung befüllt und mit einem weiteren Deckglas versiegelt. Die Partikellösungen bestanden aus verdünnten Lösungen von mit IgG oberflächenfunktionalisierten gewaschenen Polystyrol-Partikeln mit einem Durchmesser von $2 \mu\text{m}$ in *imaging medium*. Die Partikelkonzentrationen der Arbeitslösungen lagen hierbei typischerweise in den Größenordnungen $10^7 - 10^8$ Partikel/ml. Für die Kontrollmessungen wurden die Partikel in *Cytochalasin D* (CytoD) Lösungen verdünnt, die Experimente erfolgten nach einer Einwirkzeit von mindestens 15 min nach Zugabe der CytoD-Lösungen. Für die Experimente wurde der in Kapitel 4 beschriebene Aufbau verwendet, die Umgebungstemperatur innerhalb der Inkubationskammer betrug 37°C .

Für jedes *blinking* Experiment wurden zwei Zeitserien mit den beiden Kameras an den Ausgängen des DualCameraPorts aufgenommen, so dass eine gleichzeitige Beobachtung desselben Probenbereichs per Hellfeld- und DIC-Mikroskopie möglich war (siehe Abschnitt 4.1). Die DIC-Zeitserien dienten zur Bestimmung der Fallenposition, der Kontrolle der Zellviabilität und der Beobachtung möglicher Membranfluktuationen und Membranausstülpungen während der Messung und wurden mit Bilderraten zwischen $1 - 10$ Hz aufgenommen (Aufgrund von nicht näher quantifizierten internen Speicherkonflikten des Messrechners bei Verwendung der *Nikon* Software konnte die Bildrate, insbesondere bei Verwendung der *Andor Luca r* EMCCD Kamera, während der Messung nicht immer konstant gehalten werden. Die Zeiten, zu denen die einzelnen Bilder aufgenommen wurden, wurden allerdings in den Messdaten gespeichert, so dass eine Rekonstruktion der Messzeiten im Nachhinein möglich war). Für die quantitative Analyse wurden die Hellfeld-Zeitserien der Hochgeschwindigkeitskamera verwendet. Die Hellfeldaufnahmen erfolgten mit einer Bildrate von 500 Hz, um die Positionsänderungen des Partikels während der *blinking* Intervalle zu erfassen. Während der Messungen wurden die Inkubationskammer sowie die Kameralüftungen ausgeschaltet, um Vibrationen zu vermeiden.

Das Prinzip der *blinking traps* Experimente ist in Abbildung 5.8 skizziert und basiert auf der periodischen Modulation des zum optischen Fangen verwendeten Lasers. Zur Modulation wurde die erste Beugungsordnung der optischen Falle verwendet, weil sich diese, im Gegensatz zur nullten Beugungsordnung, per SLM komplett ausschalten ließ. Je nach Experimentreihe wurden verschiedene Laserleistungen zur Ansteuerung der holografischen optischen Falle verwendet, aus denen unterschiedliche Fallenteifigkeiten κ resultierten. Somit ließen sich die optischen Kräfte F_{OT} kontrollieren, die die Vorspannung auf die Zellen verursachten. Nach *Gardel et al.* und *Kollmannsberger et al.* [182, 183] resultiert eine größere Vorspannung in einer Zunahme der Zellsteifigkeit (*stress stiffening*). In den Experimenten wurde dieser Zusammenhang für Zellen während der Phagozytose überprüft.

Eine typische Zeitreihe eines *blinking traps* Experiments in dieser Anordnung ist in Abbildung 5.9 dargestellt, alle anderen Messungen erfolgten analog. Mit Hilfe der an der Stelle (5/5) (Abstand $\Delta x = 5 \mu\text{m}$, $\Delta y = 5 \mu\text{m}$ von der Position der 0. Beugungsordnung) erzeugten und wie in Abschnitt

5.3. Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung

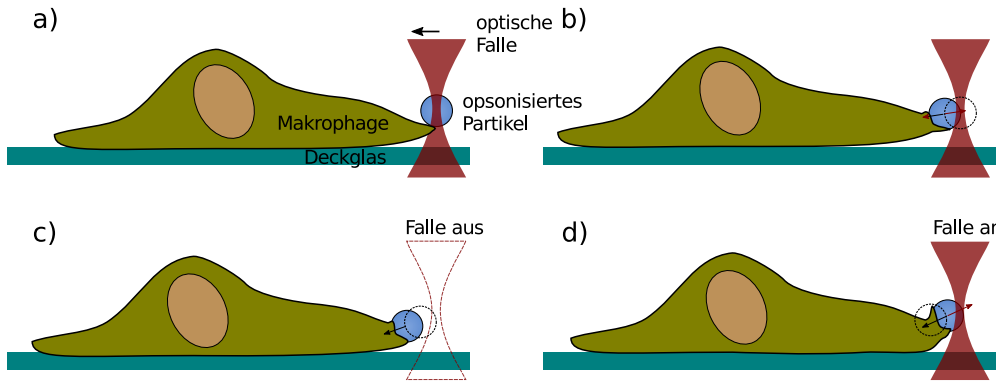


Abbildung 5.8.: Prinzip der *blinking traps* Experimente. (a) Das in der optischen Falle gefangene, mit IgG opsonierte Partikel wurde durch Bewegung des Mikroskoptisches in Kontakt mit der auf dem Deckglas befindlichen *J-774A.1* Makrophagenzelle gebracht und angebonden. (b) Durch die einsetzende Phagozytose wurde das Partikel durch die von der Zelle ausgeübten Kräfte mit steigender Messdauer aus der optischen Falle ausgelenkt. (c-d) Durch periodisches Aus- und Einschalten des zum optischen Fangen verwendeten Laserstrahls relaxierte das Partikel beim Ausschalten in Richtung Zellmembran (c), beim anschließenden Einschalten in die aktuelle Gleichgewichtslage zwischen den von Zelle (schwarze Pfeile) und optischer Falle (rote Pfeile) auf das Partikel ausgeübten Kräften.

4.5 beschriebenen kalibrierten holografischen optischen Falle wurde das opsonierte Partikel optisch gefangen und in die Nähe der zu vermessenden Zelle bewegt (Abbildung 5.8a). Dann wurde die DIC-Zeitserie gestartet. Durch schrittweises Verfahren des Mikroskoptisches wurde der Abstand zwischen Zelle und Partikel verringert, bis der Kontakt zwischen Zelle und Partikel hergestellt war. Nachdem das Partikel an die Zelle angebonden war, wurde die hochfrequente Hellfeld-Zeitserie (500 Hz) gestartet. Die einsetzende Phagozytose bewirkt eine mit der Experimentdauer zunehmende Auslenkung des Partikels aus der optischen Falle (Abbildung 5.8b). Nach Starten der Hellfeld-Zeitserie wurde die *blinking* Routine wie folgt durchgeführt. Die optische Falle an der Stelle (5/5) wurde mit Hilfe des SLMs periodisch moduliert. Durch abwechselnde Ansteuerung des SLMs mit dem zur optischen Falle an der Stelle (5/5) gehörigen SLM-Phasenmuster (dies entspricht gemäß Abschnitt 4.4 einem Blaze-Gitter mit der Gitterperiodizität $\Lambda = 22,6$ Pixel und einem Winkel von 45° zur SLM Achse) und einem räumlich konstanten weißen Phasenmuster (dieses erzeugt keine Phasenverschiebung und entspricht der Situation bei ausgeschaltetem SLM) wurde die Intensität der optischen Falle zwischen erster und nullter Ordnung moduliert. Die Modulation der Fallenintensität erfolgte mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten SLM-Ansteuerungssoftware und wird im Folgenden als Ein- und Ausschalten der optischen Falle bezeichnet. Die Laseremission erfolgte kontinuierlich während des gesamten Experiments. Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte das periodische Ein- und Ausschalten der optischen Falle in den Experimenten mit einer Frequenz von 0,25 Hz. In Folge des Ausschaltens relaxierte das Partikel aus seiner momentanen Gleichgewichtsposition der von der optischen Falle und durch die von der Zelle ausgeübten Kräfte in Richtung Zellmembran (Abbildung 5.8c). Nach anschließendem Einschalten der optischen Falle bewegte sich das Partikel entsprechend zurück in die jeweils aktuelle Gleichgewichtslage (Abbildung 5.8d), welche sich aufgrund der fortschreitenden Partikelauslenkung immer mehr in Richtung Zelle verschob. Die durch das *blinking* hervorgerufenen Positionsänderungen waren daher mit dieser kontinuierlich stattfindenden Partikelauslenkung überlagert. Sobald die Partikelauslenkung einen kritischen Abstand überschritten hatte, war kein stabiles optisches Fangen mehr möglich, und das Partikel entwich dem Fangpotential. Im Fall von $2\ \mu\text{m}$ großen Partikeln entsprach dies einer Partikelauslenkung von etwa $1,5\ \mu\text{m}$ aus dem Fallenmittelpunkt, in Übereinstimmung mit dem ex-

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

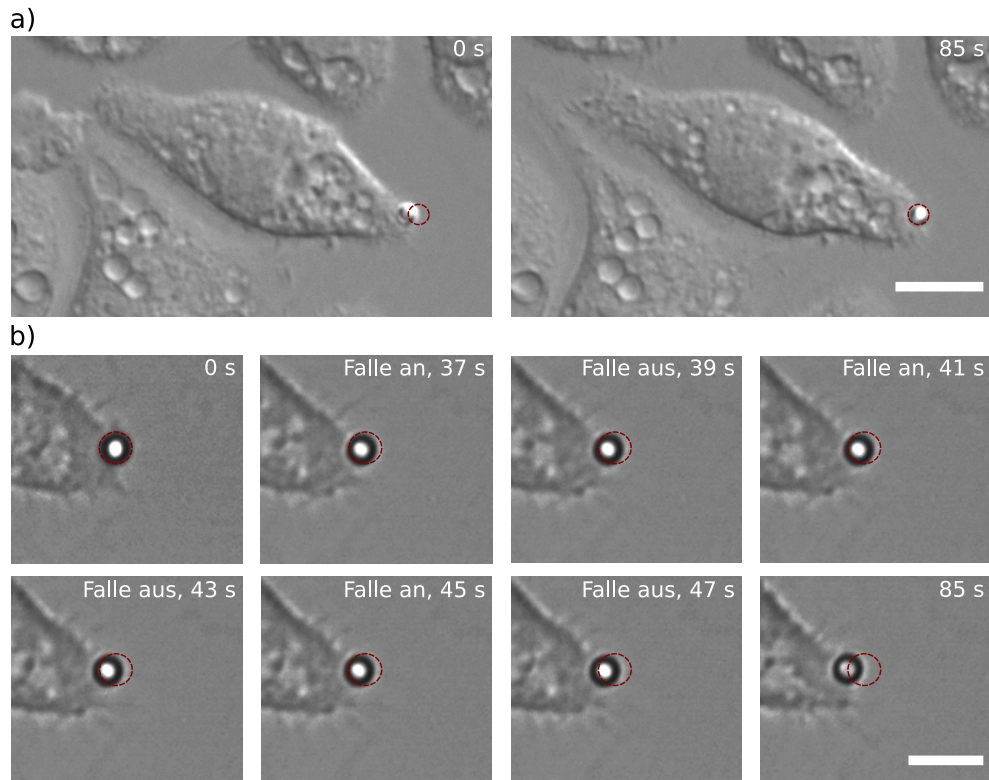


Abbildung 5.9.: Zeitreihe eines *blinking traps* Experiments. (a) Erstes und letztes Bild der DIC-Zeitreihe (2 Hz) zur optischen Kontrolle der Zellviabilität und Aufnahme der Membranfluktuationen. Zum Zeitpunkt $t = 0$ s wurde das optisch gefangene, mit IgG opsonierte und $2\ \mu\text{m}$ große Partikel (roter Kreis markiert die Position der optischen Falle) an die *J-774A.1* Makrophage gebunden. Während der Messung wurde das Partikel immer mehr von der Zelle aus der optischen Falle gezogen, so dass zum Zeitpunkt $t = 85$ s das Partikel aus dem optischen Fallenpotential entwich, *scale bar* $10\ \mu\text{m}$. **(b)** Bilder der gleichzeitig aufgenommenen hochfrequenten Hellfeld-Zeitreihe (500 Hz) zur Bestimmung der Partikelposition. Die fortschreitende Auslenkung des Partikels aus der optischen Falle (roter Kreis markiert die Position der optischen Falle) ist mit den durch das Blinking hervorgerufenen Positionsänderungen überlagert, die Periodendauer des *blinking* wurde zu $T_{\text{blinking}} = 4$ s gewählt. Zu den Zeitpunkten des Ausschaltens der optischen Falle (gezeigt sind jeweils die Zeiten $t = 37, 41$ und 45 s kurz vor dem Ausschalten der Falle) relaxierte das Partikel zur Zelle hin. Zu den Zeitpunkten des Einschaltens der optischen Falle (gezeigt sind jeweils die Zeiten $t = 39, 43$ und 47 s kurz vor dem Einschalten der Falle) relaxierte das Partikel entsprechend zurück in die aktuelle Gleichgewichtslage zwischen den von Zelle und optischer Falle auf das Partikel ausgeübten Kräften, *scale bar* $6\ \mu\text{m}$.

perimentell bestimmten Kraftprofil der optischen Falle (vgl. Abbildung 4.4). Bis zu dieser Auslenkung konnte im Experiment das *blinking* entsprechend ausgeübt werden, spätestens nach Verlassen des Fangpotentials wurden die Messungen im Falle schneller Partikel auslenkungen entsprechend beendet. Bei Zellmessungen, die eine langsame Partikel auslenkung zeigten, war der interne Kameraspeicherplatz der Hochgeschwindigkeitskamera der limitierende Faktor für die Messdauer. Bei einer typischen ROI Größe von 160×128 Pixel lassen sich mit der eingestellten Bildrate 500 Hz maximal 172322 Bilder aufnehmen. Dies entspricht einer Aufnahmezeit von 344,6 s. Nach Beendigung der Messung wurden die Inkubationskammer und Kameralüftungen eingeschaltet und die aufgenommenen Videodaten gespeichert. Aufgrund der Größe der Hochgeschwindigkeitszeitreihe (typische Dateigrößen liegen in dem Bereich zwischen 3 und 5 GB) wurden nur Messungen gespeichert, in denen eine sichtbare Auslenkung des Partikels aus der optischen Falle erfolgte. Dies war insbesondere für die Messungen bei sehr starkem CytoD-Einfluss ($5\ \mu\text{M}$) nicht der Fall, so dass von

Übersicht der blinking traps Experimentreihen				
Bezeichnung	CytoD-Konzentration	Fanggeometrie	Fallensteifigkeit in $\text{pN } \mu\text{m}^{-1}$	Messungen (ausgewertet/durchgeführt)
<i>Exp1</i>	0	(5/5)	304 ± 4	(21/21)
<i>Exp2</i>	0	(5/5)	124 ± 1	(52/68)
<i>Exp3</i> , 0 μM	0	(5/5)	102 ± 6	(17/22)
1 μM	1	(5/5)	102 ± 6	(20/20)
5 μM	5	(5/5)	102 ± 6	(5/5)

Tabelle 5.1.: Übersicht der blinking traps Experimentreihen. Der Datensatz für die Experimentreihen *Exp3* und 0 μM ist identisch.

den durchgeführten Experimenten nur wenig Messungen zur Kontrolle gespeichert wurden. Messungen, in denen während der Durchführung das Partikel an der Oberfläche des Deckglases anhaftete oder aufgrund von starker Probedrift oder unabsichtlicher Verschiebung der Probe sichtbar die Position änderte, wurden nicht ausgewertet.

Für die Kontrollmessungen unter CytoD-Einfluss wurden entsprechend 17 von 22 Messungen bei 0 μM , 20 von 20 Messungen bei 1 μM und 5 von 5 Messungen bei 5 μM ausgewertet. Die Messungen erfolgten unter Verwendung einer Einfachfalle an der Stelle (5/5) und einer Laserleistung von 500 mW, was entsprechend der Fallenkalibration (Abschnitt 4.5) einer *trap stiffness* von $\kappa_{\text{OT}} = 102 \pm 6 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$ entsprach.

Die Messungen zur Charakterisierung des Einflusses der Fallensteifigkeit auf die zelluläre Viskoelastizität während der Partikelinternalisierung erfolgten unter der Verwendung der Einfachfalle an der Stelle (5/5) in 3 verschiedenen experimentellen Anordnungen, die im Folgenden als *Exp1-3* bezeichnet werden und sich in den verwendeten Fallensteifigkeiten unterschieden. Die verwendeten Fallensteifigkeiten betragen $\kappa_1 = 304 \pm 4 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$, $\kappa_2 = 124 \pm 1 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$, $\kappa_3 = 102 \pm 6 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$. Der Datensatz von *Exp3* ist identisch mit dem Datensatz der zuvor beschriebenen Kontrollmessung bei 0 μM CytoD-Konzentration. Es wurden für *Exp1* 21 von 21 Messungen, für *Exp2* 52 von 68 Messungen und für *Exp3* 17 von 22 Messungen ausgewertet. Eine Übersicht der verwendeten experimentellen Einstellungen und Parameter findet sich in Tabelle 5.1.

5.3.2. Auswertung

5.3.2.1. Partikeltrajektorien und Anbindezeitpunkt

Die Auswertung und Datenanalyse der *blinking traps* Experimente erfolgte mit im Rahmen dieser Arbeit entwickelten *MatLab*-Skripten. Aus den Zeitserien wurden mit dem *particle tracking*-Algorithmus (Abschnitt 5.1.3) die Partikelpositionen $x(t)$, $y(t)$ bestimmt. Die Abstandskurve $d(t)$ der Partikelauslenkung aus der Ruheposition x_0, y_0 der optischen Falle wurde berechnet mit

$$d(t) = [(x(t) - x_0)^2 + (y(t) - y_0)^2]^{1/2} . \quad (5.1)$$

x_0, y_0 wurden aus den Mittelwerten der Positionsschwankungen des in der optischen Falle gefangenen, nicht an die Zelle angebundenen Partikels berechnet. Der Polarwinkel θ der Partikelbewegung

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

berechnete sich entsprechend mit

$$\theta(t) = \arctan \left(\frac{y(t) - y_0}{x(t) - x_0} \right). \quad (5.2)$$

In Abbildung 5.10a sind die zu dem in Abbildung 5.9 dargestellten Experiments zugehörigen Abstandskurven dargestellt. Abbildung 5.10b zeigt den zeitlichen Verlauf des aus der DIC-Zeitserie berechneten Polarwinkels $\theta(t)$. Der Zeitpunkt des ersten Kontaktes zwischen Zelle und Partikel wurde als Zeit $t = 0$ gewählt und konnte aus der Videoanalyse und dem Vergleich mit den Trajektorien der DIC-Zeitserie wie folgt rekonstruiert werden. Das Partikel erfuhr beim Anstoßen an die Zellmembran eine deutliche, in den Trajektorien erkennbare Positionänderung, nach erfolgreicher Anbindung reduzierten sich die Amplitudenfluktuationen in den Abstandskurven und im zeitlichen Verlauf des Polarwinkels θ (siehe Abbildung 5.10a-b). Für die dargestellte Messung lag der Zeitpunkt des Anbindens 68,6 s nach Beginn der Messung. Der Partikelabstand zum Nukleus wurde anhand der DIC-Bilder für den Anbindezeitpunkt abgeschätzt, indem die Positionen des Partikelmittelpunkts und des Nukleusmittelpunkts per Augenmaß bestimmt wurden. Die Genauigkeit der Abschätzung entsprach hierbei jeweils in etwa $\pm 1 \mu\text{m}$.

Da die DIC-Aufnahmen in erster Linie zur Kontrolle der Zellviabilität und Beobachtung der Zellmembran entlang der Kontaktstelle von Zelle und Partikel dienten und dementsprechend eingestellt wurden, konnte in diesen keine gleichzeitig optimale Partikel-Abbildung erzielt werden. Der hohe Brechungsindex der Partikel [44] erzeugte aufgrund der großen Unterschiede in den optischen Weglängen im Partikel einen im Vergleich zur Zelle zu großen Kontrast. Ebenfalls war die Rekonstruktion der genauen Zeitpunkte, zu denen die einzelnen Bilder aufgenommen wurden, aufgrund der schwankenden Bildrate aufwendig. Zur quantitativen Auswertung der *blinking*-Intervalle wurden daher die Hellfeld-Zeitserien verwendet, da diese außerdem die höhere zeitliche Auflösung besaßen und die Belichtungszeit und die Beleuchtung so eingestellt waren, dass die Partikel symmetrisch erschienen und keine Teile der Partikel überbelichtet waren. Somit war mit den Hellfeldbildern eine zuverlässige Bestimmung der Partikelposition mittels des auf Berechnung der Kreuzkorrelation beruhenden *tracking*-Algorithmus möglich. In Abbildung 5.10c-d sind die zu dem in Abbildung 5.9 dargestellten Experiments entsprechenden Hellfeld-Zeitserien und das Kraftprofil der rücktreibenden Kraft F_{OT} dargestellt. Die Partikelrelaxationen in Folge der zeitlichen Modulation der optischen Falle sind deutlich erkennbar.

Als Ruhephasen Δt wurden die Zeiten zwischen dem Anbinden der Partikel an die Zelle und dem Zeitpunkt deutlich sichtbarer Partikelauslenkung aus der Falle definiert, zu dem die Partikel um $d_{\text{start}} = 0,4 \mu\text{m}$ aus der optischen Falle ausgelenkt waren.

5.3.2.2. Bestimmung der *blinking*-Intervalle

Als *blinking*-Intervalle wurden die Zeitbereiche der Hellfeld-Trajektorien definiert, in denen die optische Falle ausgeschaltet war. Die Partikelrelaxationen während dieser Intervalle waren nicht in allen Fällen gleich stark ausgeprägt und teilweise aufgrund von Überlagerung mit Partikelfluktuationen nicht eindeutig zu identifizieren. Für eine reproduzierbare Bestimmung und Auswertung der einzelnen *blinking*-Intervalle wurde daher eine automatisierte, im Rahmen dieser Arbeit entwickelten *MatLab*-Routine verwendet, welche auf einer Kurvendiskussion basierte. Die Abstandskurven wurden hierzu mit einem gleitender Mittelwertfilter (*moving average filter* [220], Fenstergröße 20 Datenpunkte) tiefpassgefiltert, um hochfrequente Rauschanteile und Störfrequenzen zu unter-

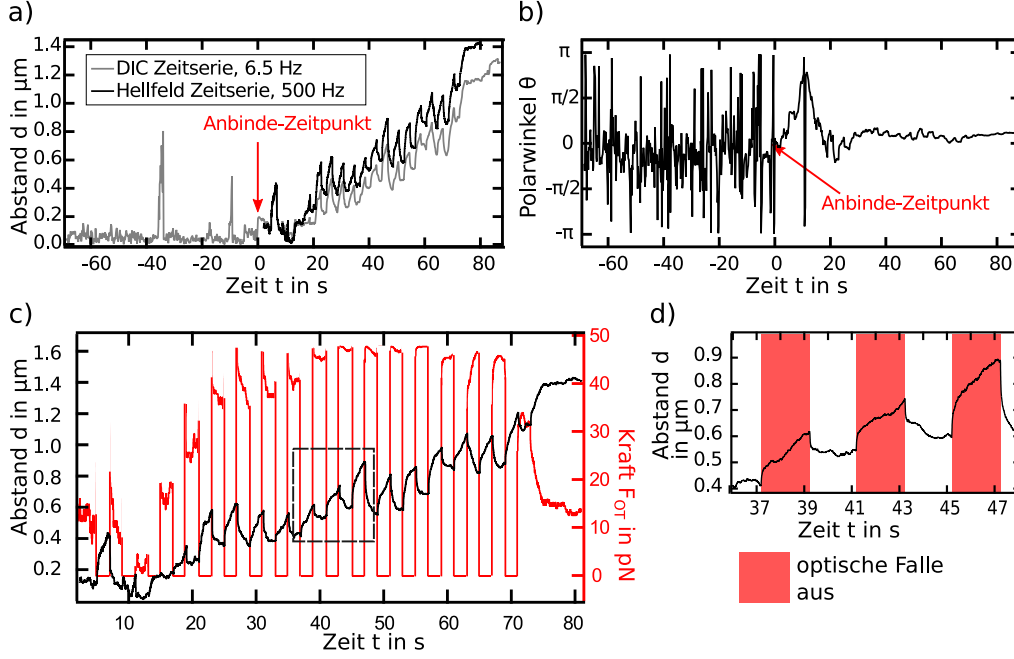


Abbildung 5.10.: Trajektorien des *blinking traps* Experiments aus Abbildung 5.9. (a) Trajektorien der DIC-Zeitserie (6,5 Hz, graue Kurve) und der Hellfeld-Zeitserie (500 Hz, schwarze Kurve), dargestellt als radialer Abstand $d(t)$ des getrackten $2\mu\text{m}$ großen Partikels im Verhältnis zum Fallenmittelpunkt der optischen Pinzette. Die Zeit $t = 0$ s entsprach dem Anbindezeitpunkt des Partikels an die Zelle (roter Pfeil). Die Hellfeldmessung wurde 2,3 s nach dem Anbinde-Zeitpunkt gestartet. Zur Zeit $t = 85$ s war das Partikel vollständig aus dem optischen Fallenpotential entwichen. Die beiden *peaks* in der DIC-Zeitserie bei $t = -34$ s und $t = -9$ s resultieren aus einer Partikelbewegung aufgrund des Ausschaltens der optischen Falle. Die Falle wurde ausgeschaltet um zu überprüfen, ob das Partikel bereits an die Zelle angebunden war. (b) Auftragung des aus der DIC-Zeitserie berechneten Polarwinkels $\theta(t)$. Bis zum Zeitpunkt des Anbindens schwankte $\theta(t)$ stark zwischen $-\pi \leq \theta \leq \pi$. Dies entspricht den freien Partikelfluktuationen innerhalb der optischen Falle. (c, schwarze Kurve) Abstandskurve $d(t)$ der Hellfeld-Zeitserie, die zur Auswertung der Partikelrelaxationen in Folge der *blinking traps*-Routine verwendet wurde. Die Periodendauer des *blinking* wurde zu $T_{\text{blinking}} = 4$ s gewählt. (rote Kurve) Kraftprofil der während der Partikelauslenkung wirkenden rücktreibenden Kraft F_{OT} . Bei ausgeschalteter optischer Falle relaxierte das Partikel entsprechend in Richtung Zelle. Aufgrund der Abnahme von F_{OT} bei großer Partikelauslenkung (ab etwa $t = 75$ s) entwich das Partikel aus dem optischen Fallenpotential. (d) Vergrößerter Ausschnitt des in (c) markierten Intervalls $t = 36$ - 48 s (gestricheltes Rechteck in (c), die rot hinterlegten Bereiche verdeutlichen die Phasen der Messung, in denen die optische Falle ausgeschaltet war). Die Zeitpunkte des Ausschaltens der optischen Falle ließen sich anhand der Trajektorie bestimmen zu $t = 37,06$, $41,06$ und $45,08$ s und entsprachen den in Abb. 5.9b gezeigten Zeitpunkten.

drücken, und die Ableitungen $\partial d/\partial t = v(t)$ der geglätteten Kurven bestimmt. An den Stellen der durch die *blinking*-Routine hervorgerufenen Positionsänderungen des Partikels wiesen die Trajektorien $d(t)$ jeweils hohe lokale Steigungen auf, so dass in den Ableitungen $\partial d/\partial t = v(t)$ ein Schwellwert v_{thres} der lokalen Geschwindigkeit für das Einsetzen der *blinking*-Positionsänderung definiert werden konnte. Ein Messzeitpunkt t_i der Trajektorie wurde als möglicher Startpunkt eines *blinking*-Intervalls definiert, falls v_{thres} für N auf t_i folgende Messpunkte überschritten wurde mit

$$v_j > v_{\text{thres}} \quad \text{für } j = 0, 1, 2, \dots, N. \quad (5.3)$$

Entsprechend definierten sich mögliche Endpunkte der *blinking*-Intervalle über

$$v_j < -v_{\text{thres}} \quad \text{für } j = 0, 1, 2, \dots, N. \quad (5.4)$$

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

Ein *blinking*-Interval wurde als gültig gewertet, wenn ein möglicher Endpunkt auf einen möglichen Startpunkt folgte und sich zwischen möglichem Start- und möglichem Endpunkt

$$\frac{\text{fps}}{2\nu_{\text{blinking}}} \leq N_{\text{Int}} \leq \frac{\text{fps}}{\nu_{\text{blinking}}} \quad (5.5)$$

Messpunkte N_{Int} befanden. fps bezeichnet hierbei die Bildrate (*frame rate* in frames/s) der Hellfeld-Zeitreihe, ν_{blinking} die Frequenz der *blinking*-Routine. Die Parameter wurden angepasst, bis die *blinking*-Intervalle ausreichend genau mit dem Verlauf der Trajektorien übereinstimmten. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *blinking traps* Experimente mit $2\ \mu\text{m}$ großen Partikeln entsprach dies den Parametern $v_{\text{thres}} = 1\ \mu\text{m s}^{-1}$, $N = 5$, $\text{fps} = 500\ \text{s}^{-1}$ und $\nu_{\text{blinking}} = 0,25\ \text{Hz}$.

5.3.2.3. Zusammenhang zwischen Fallenmodulation und Partikelrelaxation

Um zu testen, ob mit Hilfe der *blinking traps* Experimente Aussagen über die Relaxationszeiten der induzierten Partikelrelaxationen getroffen werden können, wurde der Zusammenhang zwischen dem zeitlichen Verlauf der per SLM modulierten Fallenintensität und den im Experiment beobachtbaren Partikelrelaxationen bestimmt, wie in Abbildung 5.11 dargestellt ist. Hierzu wurde ein Partikel mit der optischen Falle an die Zelle angebunden und die in den *blinking traps* Experimenten verwendete Lasermodulation eingeschaltet. Die Hellfeldaufnahme erfolgte mit einer Bilderrate von 1 kHz. Durch Entfernen des vor dem Kameraport befindlichen Infrarotfilters konnten Partikelbewegung und die Reflexionen des am Deckglas und Partikel gestreuten Laserlichts gleichzeitig aufgenommen werden. Die relativen Änderungen der Laserintensität in der nullten und ersten Beugungsordnung wurden aus der Summe der Helligkeitswerte aller Pixel in einem Bereich von 32×30 Pixel um die jeweiligen Ordnungen bestimmt (Abbildung 5.11a). Die Partikeltrajektorie wurde wie in Abschnitt 5.3.2.1 beschrieben berechnet. Im Gegensatz zu den Trajektorien aus den *blinking traps* Experimenten ist bei gleichzeitiger Beobachtung des am Partikel gestreuten Laserlichts jedoch keine optimale Abbildung des Partikels möglich. Aufgrund der Überlagerung der Hellfeldbilder des Partikels mit dem Laserreflexionen an Partikel und Deckglas unterschieden sich die Partikelabbildungen bei eingeschalteter optischer Falle daher deutlich von denen bei ausgeschalteter Falle (siehe Abbildung 5.11a). Die mittels *tracking*-Algorithmus und eines Referenzbildes bei ausgeschalteter 1. Ordnung bestimmten Partikelpositionen, bei eingeschalteter 1. Ordnung, waren somit nicht verlässlich. Für die Bestimmung der Relaxationszeiten wurden daher nur Intervalle bei ausgeschalteter 1. Ordnung verwendet. Die entsprechenden zeitlichen Verläufe der relativen Laserintensitäten sowie des berechneten Partikelabstands zeigt Abbildung 5.11b. Die starken Schwankungen der Maximalwerte der relativen Laserintensität der 1. Ordnung resultierten aus der variierenden Intensität des Laserstreulichts aufgrund der Partikelbewegung. Die konstanten Minima entsprachen der Summe der Pixelwerte der zeitlich nicht stark variierenden Partikelabbildung bei ausgeschaltetem Laser. Die Kurvenverläufe wurden an den Stellen der *blinking* Intervalle (Abschnitt 5.3.2.2) mit einem exponentiellen Fit der Form

$$y(t) = y_0 + a \cdot (1 - \exp(t/\tau)) \quad (5.6)$$

gefitet. Die resultierenden Relaxationszeiten der Fit-Intervalle und ihre Mittelwerte sind in Abbildung 5.11c dargestellt.

Die Ansprechzeit des SLM ist laut Herstellerangaben mit $\tau_{\text{SLM}} \leq 16,7\ \text{ms}$ angegeben (siehe Abschnitt 4.4). Die charakteristischen Zeiten für das Ausschalten der 1. Ordnung und das Einschalten der 0. Ordnung während der durch den SLM gesteuerten *blinking traps* Intensitätsmodula-

5.3. Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung

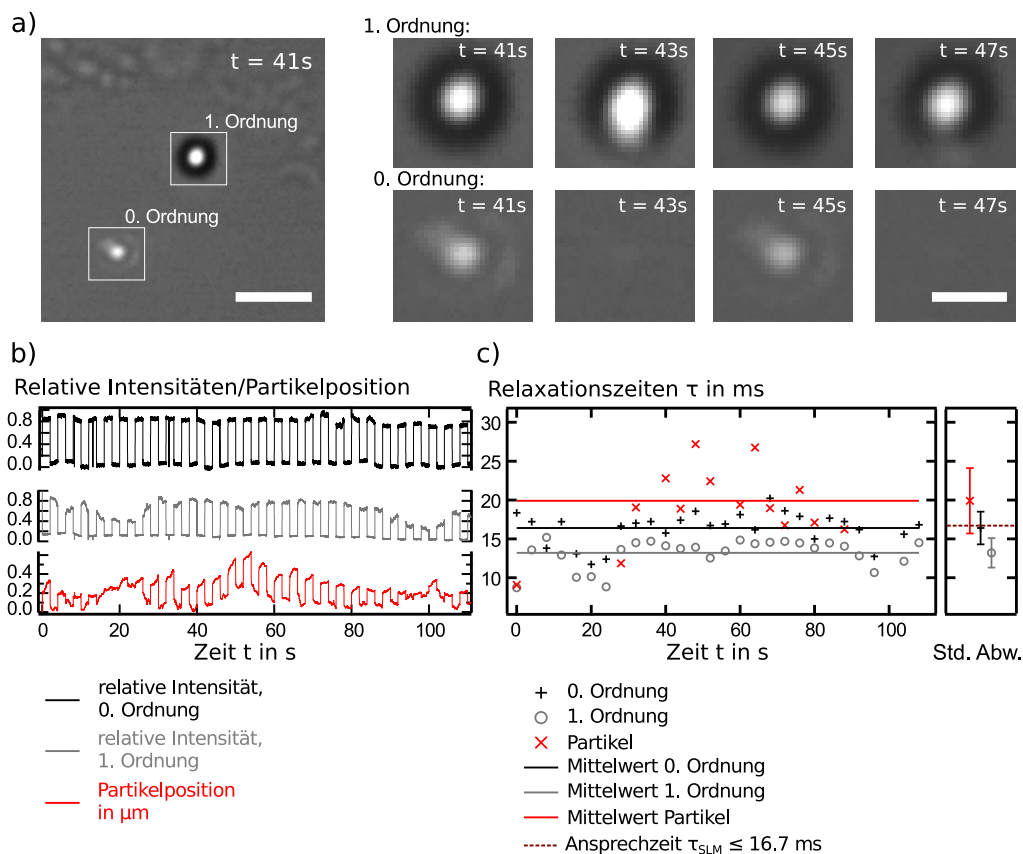


Abbildung 5.11.: Gleichzeitige Messung von Lasermodulation und Partikelrelaxation. (a) Ausschnitt der Hellfeld-Zeitserie (1 kHz) der Messung. Das Partikel wurde in der 1. Ordnung der per SLM erzeugten optischen Falle an der Stelle (5/5) gefangen und an eine Zelle (oberer Bildrand) gebunden. Durch Entfernen des IR-Filters (siehe Text) kann gleichzeitig zur Partikelabbildung die Laserleistung kontrolliert werden. Durch Einschalten der *blinking traps* Lasermodulation (Frequenz 0,25 Hz) alterniert die Laserleistung zwischen 0. und 1. Ordnung periodisch (gezeigt für die 2s-Intervalle zu den Zeiten $t = 41, 43, 45$ und 47 s). Die relativen Laserleistungen wurden aus den Grauwerten der Bildausschnitte berechnet, scale bar $5 \mu\text{m}$ ($2 \mu\text{m}$ für die Bilderserien). (b) Gesamter zeitlicher Verlauf der relativen Laserintensitäten der 0. Ordnung (schwarze Kurve) und 1. Ordnung (graue Kurve) sowie der per *tracking*-Algorithmus bestimmten Partikeltrajektorie (rote Kurve). (c) Relaxationszeiten τ der in (b) gezeigten Kurven (linker Graph) sowie die gemittelten Relaxationszeiten \pm Standardabweichungen (rechter Graph). Als Fitkurven wurde die Gleichung 5.6 verwendet. Die Relaxationszeiten der 0. und 1. Ordnung der optischen Falle liegen in der Größenordnung der Ansprechzeit des SLM ($\tau_{\text{SLM}} \leq 16,7$ ms, gestrichelte Linie). Die Partikelrelaxationszeiten stimmten im Rahmen ihrer Standardabweichungen mit τ_{SLM} überein.

tion lagen somit innerhalb dieses Bereichs. Die Zeiten der Partikelrelaxationen waren im Mittel mit $t_0 = 19,9 \pm 4,2$ ms größer als die SLM-Ansprechzeit und Laserschaltintervalle, wiesen jedoch eine große Streuung auf und stimmten im Rahmen ihrer Standardabweichungen mit der SLM-Ansprechzeit und dem Schaltintervall der 0. Ordnung überein. Der Parameter t_0 beschreibt also in erster Linie das Ansprechverhalten der SLM-Lasermodulation und lässt somit keine sinnvollen Rückschlüsse über die der Partikelbewegung inliegenden Relaxationszeiten zu. Um sinnvolle Aussagen über die Relaxationszeiten der Partikelbewegung während der Phagozytose zu treffen, ist daher der in dieser Arbeit realisierte Ansatz der *blinking* Modulation per SLM nicht geeignet. Laut Herstellerinformationen kann eine alternative Ansteuerung des SLMs per DVI Schnittstelle und schnellerer Grafikkarte die Ansprechzeit um einen Faktor 3 verkürzen (siehe Anhang C). Weit schnellere Alter-

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

nativen für eine Steuerung der Laserintensität bieten dagegen akustooptische Modulatoren, deren Anstiegszeiten in einem Bereich von ns liegen [221].

5.3.2.4. Auswertung der *blinking*-Intervalle - Bestimmung der zellulären Viskoelastizität

Zur Interpretation der Messdaten wurde im Rahmen dieser Arbeit der in Rheologie-Messungen weit verbreitete *power law*-Ansatz gewählt [183, 179]. Demnach lässt sich die viskoelastische Antwort von Zellen unter externen Spannungen anhand der resultierenden Zelldeformationen mit Hilfe von Potenzgesetzen charakterisieren. In der vorliegenden experimentellen Situation der *blinking traps*-Experimente wird die Zellspannung durch die auf das Partikel wirkenden optischen Kräfte F_{OT} nach Einschalten der optischen Falle und der damit verbundenen Partikelrelaxation in die Gleichgewichtslage zwischen der optischen Kraft und der von der Zelle ausgeübten Kraft hervorgerufen. Die sogenannte Kriech-Nachgiebigkeit (*creep compliance*) $J(t)$ der Zellen ist definiert als

$$J(t) = \frac{\epsilon(t)}{\sigma(t)} = \frac{d_s(t)}{F_{OT}} \cdot \pi r^2, \quad (5.7)$$

wobei $\sigma = F(\pi r^2)^{-1}$ die Zellspannung beschreibt, welche als wirkende Kraft (hier F_{OT}) pro Querschnittsfläche des Partikels definiert ist. $\epsilon(t) = d_s(t)r^{-1}$ beschreibt die resultierende Zelldehnung (*strain*) d_s geteilt durch den Partikelradius r . Für zeitlich konstante Kräfte F genügt die zeitliche Antwort $J(t)$ der Relation

$$J(t) = j_0 \cdot \left(\frac{t}{\tau_0}\right)^\beta, \quad (5.8)$$

wobei $\tau_0 = 1$ s ein Normierungsfaktor ist. j_0 in Einheiten von mPa^{-1} beschreibt die Nachgiebigkeit oder *compliance* der Zelle und ist somit ein Maß für die inverse Steifheit der Zelle. Der *power law*-Exponent β beschreibt die Viskoelastizität der Zelle. Ein Exponent $\beta = 0$ bedeutet hierbei den Grenzfall eines rein elastischen Materials, $\beta = 1$ beschreibt entsprechend den Grenzfall eines rein viskosen Fluids. Typische *power law*-Exponenten für Zellen liegen im Bereich $0,1 \leq \beta \leq 0,5$ [222, 183, 223].

Aufgrund der oben diskutierten endlichen Schaltzeit der optischen Falle (Abschnitt 5.3.2.3) ist der Kurvenverlauf der Relaxationskurven zum Teil durch den experimentellen Aufbau bedingt, was bei der Interpretation der Daten entsprechend berücksichtigt werden muss. Mathematisch betrachtet beschreiben die Relaxationskurven die Faltung der Zellantwort mit der Übertragungsfunktion des experimentellen Aufbaus. Die *fit*-Parameter j_0, β des gewählten Modells beschreiben somit nicht die rein rheologischen Eigenschaften der Zelle, sondern immer zu einem Teil auch das System. Aus analytischen Überlegungen lässt sich folgern, dass dies hauptsächlich für die Interpretation des die Kurvenform bestimmenden Parameters β relevant sein sollte.

Die Auswertung der nach 5.3.2.2 definierten gültigen *blinking*-Intervalle der Hellfeld-Zeitserien wurde wie folgt durchgeführt. Zur Bestimmung von $J(t)$ wurden die *blinking*-Relaxationen des Partikels in Richtung der optischen Falle ausgewertet. Für die Auswertung wurden die nach Abschnitt 5.3.2.5 berechneten zeitreskalierten Partikeltrajektorien verwendet (siehe Abschnitt 5.3.2.5 zur Motivation und Erklärung der Zeitreskalierung).

Die resultierende Positionsänderung $d_s(t) = |d(t) - d_0|$ des Partikels wurde als Maß für die Zelldeformation angesehen und aus den Partikeltrajektorien $d(t)$ berechnet, wobei d_0 den Partikelabstand zur optischen Falle zu Beginn der jeweiligen *blinking*-Relaxation bedeutete und im Folgenden als *offset* bezeichnet wird. Aus der Auslenkung $d(t)$ wurde mit Hilfe der aus der Fallenkalibration

5.3. Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung

bestimmten nichtlinearen Kraftprofile (siehe Abbildung 4.4) die jeweils auf das Partikel in Richtung der optischen Falle wirkende optische Kraft F_{OT} bestimmt und aus den Werten für $d_s(t)$ und $F_{OT}(t)$ gemäß Gleichung (5.7) die entsprechenden $J(t)$ -Kurven berechnet. Die $J(t)$ -Kurven wurden mit der in Gleichung (5.8) definierten *fit*-Funktion über einen Bereich von $\Delta t = 1$ s gefittet. Diese Länge der *fit*-Intervalle wurde gewählt, um starke Partikelbewegungen innerhalb des optischen Fangpotentials und Positionsänderungen aufgrund der Verschiebung der Gleichgewichtslage im *fit*-Bereich weitgehend auszuschließen. Eine Fitkurve wurde als gültig gewertet, wenn alle Fitparameter positiv waren, $0 < \beta < 1$ erfüllt war und das Bestimmtheitsmaß [224] R^2 der Fitkurve $R^2 \geq 0,9$ betrug.

Zur statistischen Analyse wurden die Fitparameter $d_0(t)$, $F_{OT}(t)$, $j_0(t)$, $\beta(t)$ in 20 s-Intervallschritten über die Messzeit gemittelt. Mittellungen über weniger als 5 Datenpunkte pro Intervall wurden nicht berücksichtigt. Die Anzahl der Datenpunkte, über die pro Intervall gemittelt wurde, ist in den Ergebnissen dargestellt.

Signifikanztests der berechneten Mittelwerte wurden mittels des Hypothesentests *Student's t-test* [225] für kleine Stichproben überprüft, der Signifikanzwert betrug $P < 0,05$. Zur Kontrolle statistischer Zusammenhänge der berechneten Messgrößen wurden die Korrelationskoeffizienten $R_{p,q}$ [224] bestimmt mit

$$R_{p,q} = \frac{\text{cov}(p, q)}{\sigma_p \sigma_q} = \frac{\sum_i (p_i - \langle p \rangle) (q_i - \langle q \rangle)}{\sqrt{\sum_i (p_i - \langle p \rangle)^2} \sqrt{\sum_i (q_i - \langle q \rangle)^2}}, \quad (5.9)$$

wobei $\text{cov}(p, q)$ die Kovarianz und σ_p, σ_q die Standardabweichung der beiden zu vergleichenden Größen p, q bedeuten. $R_{p,q}$ ist ein Maß für die lineare Korrelation zwischen p und q . Die Korrelation wurde als signifikant gewertet, falls die Nullhypothese der Korrelation mit mehr als 95% Wahrscheinlichkeit abgelehnt werden konnte (Signifikanzwert $P < 0,05$, der P -Wert gibt also die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine Korrelation der Größe $R_{p,q}$ zwischen den Größen p und q berechnet wird, obwohl in der Realität keine Korrelation zwischen p und q besteht). Die Auswertung der *blinking*-Intervalle erfolgte mit im Rahmen dieser Arbeit entwickelten *MatLab*-Skripten, zur Berechnung der Korrelationskoeffizienten wurde die *MatLab* Funktion *corrcoef.m* verwendet.

5.3.2.5. Zeitreskalierung

Anhand der Partikeltrajektorien ließen sich die Anbindezeitpunkte, wie in Abschnitt 5.3.2.1 beschrieben, rekonstruieren. Der Anbindezeitpunkt stimmte in den meisten Trajektorien nicht mit dem Beginn der Partikelauslenkung überein, vielmehr trat in den Messungen zwischen Anbindezeitpunkt und einsetzender Partikelauslenkung eine individuelle Ruhephase Δt auf, wie in Abbildung 5.13 anhand eines typischen *blinking traps*-Experiments gezeigt ist. In den durchgeführten *blinking traps* Experimenten wurden individuelle Ruhephasen zwischen 0 und 120 s gemessen (siehe Abschnitt 5.3.4 für eine quantitative Analyse der Ruhephasen). Eine quantitative Analyse der Partikeltrajektorien mit Zeitskalen, deren Nullpunkt durch den Anbindezeitpunkt definiert waren, erschien daher nicht sinnvoll und führte zu einer starken Streuung der Messwerte.

Es wurde jedoch beobachtet, dass die Partikelauslenkungen, sobald sie eingesetzt hatten, in etwa 55 % der Fälle einen ähnlichen Verlauf zeigten. Die Partikelauslenkung nahm hierbei in den ersten 20 - 50 s zu, dann änderte sie sich in einem längeren Zeitintervall ($\approx 40 - 120$ s) weniger stark, bevor die Auslenkung als letztes sehr schnell zunahm, und das Partikel letztendlich aus der opti-

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

schen Falle entwich. Die Auslenkung des Partikels aus der optischen Falle ging in vielen Fällen mit einer sichtbar einsetzenden Membranrekutierung entlang der Kontaktfläche sowie der Ausbildung von Membranruffles und Pseudopodien einher (Abbildung 5.13c).

Anhand dieses in den Messungen beobachteten, als charakteristisch definierten Verlaufs der Partikel auslenkung wurde daher eine Zeitreskalierung im Hinblick auf den Startpunkt der Partikel auslenkung wie folgt vorgenommen. Die Trajektorien, welche die charakteristische Partikel auslenkung aufwiesen, wurden als Referenztrajektorien verwendet. Die Referenztrajektorien wurden mit einem gleitenden Mittelwertfilter (Fenstergröße 100 Datenpunkte, [220]) geglättet, um die durch das *blinking* hervorgerufenen Positionsänderungen des Partikels zu kompensieren, damit diese nicht in die Analyse einfließen. Als Referenzzeitpunkt t_{ref} wurde in jeder Referenztrajektorie der Zeitpunkt t definiert, an dem die Auslenkung d des Partikels eine Mindestauslenkung d_{thres} überschritten hatte mit

$$d \geq d_{\text{thres}} . \quad (5.10)$$

Die Zeitachsen der Trajektorien wurden entsprechend um $\Delta t = t_{\text{ref}}$ verschoben, so dass die Trajektorien zur Zeit $t = 0$ dieselbe Auslenkung besaßen. Aus allen zeitverschobenen Referenztrajektorien mit derselben Reskalierung Δt wurde eine über 10 s Intervalle gemittelte Abstandskurve $\langle d(t) \rangle$ berechnet. Aus der Summe der Standardabweichungen aller Intervalle geteilt durch die Anzahl aller Intervalle wurde zusätzlich die mittlere Standardabweichung $\langle \sigma_d(d_{\text{thres}}) \rangle$ berechnet. Zur Bestimmung der optimalen Zeitverschiebung wurden dieses Vorgehen für Mindestauslenkungen d_{thres} von $d_{\text{thres}} = 0 \mu\text{m}$ bis $d_{\text{thres}} = 1 \mu\text{m}$ in $0,05 \mu\text{m}$ Schritten durchgeführt und die mittleren Standardabweichungen $\langle \sigma_d(d_{\text{thres}}) \rangle$ als Funktionen der Mindestauslenkungen verglichen (siehe Abbildung G.2 in Anhang G).

Ab einer Mindestauslenkung $d_{\text{thres}} = 0,15 \mu\text{m}$ verringerten sich die mittleren Standardabweichungen nicht mehr signifikant und erreichten ein ungefähres Plateau. Reskalierungen anhand dieser Plateauwerte wiesen also sehr ähnliche Verläufe der gemittelten Kurven aus und wurden als gleichwertig angesehen. Der generelle Trend der über die Zeit gemittelten Werte für Nachgiebigkeit j_0 und *power law*-Exponent β änderte sich zudem durch verschiedene Zeitreskalierungen d_{thres} nicht wesentlich (siehe Abbildung G.3 in Anhang G). Als Referenz auslenkung für die Zeitreskalierung wurde daher mit $d_{\text{thres}} = 0,4 \mu\text{m}$ ein Wert gewählt, bei dem sichergestellt war, dass das Plateau der d_{thres} -Werte erreicht wurde. Sehr große Werte für d_{thres} als Kriterium der Zeitreskalierung wurden als nicht sinnvoll erachtet, weil der Großteil der *blinking*-Relaxationen im Bereich $0,2 \leq d \leq 0,6 \mu\text{m}$ stattfand.

5.3.3. Blinking mit *Live Tracking*-Routine

Während der durchgeführten Arbeiten wurde der experimentelle Aufbau schrittweise erweitert. Eine Erweiterung stellte die Implementierung einer *live tracking*-Routine mit Hilfe der zusätzlichen *pco.pixelfly.usb* CCD Kamera dar und bot die Möglichkeit der direkten Datenauswertung durch Partikeldetektion in „Echtzeit“. So konnte beispielsweise die Detektion des Partikel-Zell Kontaktes während der Messung erfolgen. Zusätzlich wurde die *live tracking*-Routine mit einer rückgekoppelten Probenpositionierung durch die *piezo stage* kombiniert, mit den Zielen der praktischen Einbindung und Ansteuerung der *piezo stage* in den bestehenden Aufbau sowie der Erweiterung der in Abschnitt 5.3.1 erläuterten *blinking traps*-Experimente. Zweck dieser Erweiterung waren die Detektion und Kontrolle der in den *blinking*-Experimenten auftretenden Partikel auslenkungen

5.3. Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung

aus der optischen Falle durch eine entgegengerichtete *piezo stage*-Bewegung. Somit sollten längere Messungen bei konstant gehaltenen rücktreibenden optischen Kräften ermöglicht werden. Das Prinzip der modifizierten *blinking*-Experimente ist in Abbildung 5.12 als Flussdiagramm skizziert. Die Implementierung erfolgte in *MatLab*.

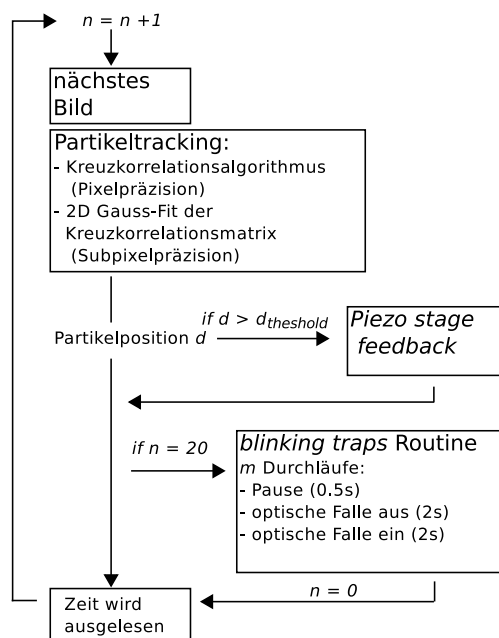


Abbildung 5.12.: Flussdiagramm der durch *live tracking* und *piezo stage-Rückkopplung* erweiterten *blinking traps*-Experimente. Das Partikeltracking und die Berechnung der Partikelposition d erfolgen in jedem Schritt für das aktuelle Bild n . Das *piezo stage feedback* greift ein, sobald der Schwellwert mit $d > d_{\text{thres}}$ überschritten war. Alle 20 Bilder erfolgte die *blinking traps*-Routine mit $m = 2$ Durchläufen bei pausierendem *piezo stage feedback*. Am Ende eines Schleifendurchlaufs wurde die Systemzeit am Rechner ausgelesen.

In jedem aufgenommenen Kamerabild n der CCD Kamera wurde aus der mittels modifiziertem *particle tracking*-Algorithmus (Abschnitt 5.1.3) bestimmten Partikelposition (x_n, y_n) der aktuelle Partikelabstand d_n zu einem Referenzabstand d_{ref} bei (x_0, y_0) berechnet. Überschreitet d_n einen Schwellwert d_{piezo} mit $d_n > d_{\text{piezo}}$, erfolgte eine der Auslenkung entgegen gerichtete, kompensierende *piezo stage*-Bewegung (*piezo stage feedback*) mit dem Betrag $|d_n|$ in Richtung $(x_0 - x_n, y_0 - y_n)$. Ziel des Verfahrens der *piezo stage* war also, das Partikel zurück zu seiner ursprünglichen Referenzposition bei (x_0, y_0) zu bewegen.

Alle 10 Kamerabilder ($n = 10$) wurde das *live tracking* pausiert und die *blinking traps*-Routine gestartet. Im vorliegenden Fall erfolgten hierzu jeweils zweimaliges Aus- und Einschalten der optischen Falle für 2 s sowie eine Pause von 0,5 s. Nach Durchlaufen der *blinking*-Routine wurde das *live tracking* für die nächsten 10 Bilder fortgesetzt. Eine Unterbrechung des *live trackings* während der *blinking traps*-Routine war notwendig, damit die erwünschten Partikelrelaxationen in Folge der Lasermodulation nicht durch das *piezo stage feedback* ebenfalls kompensiert wurden. Da die verwendete *pco* Kamera in dieser Ansteuerung keine wohldefinierte Bilderrate besaß, sondern zu von der Routine abhängigen Zeitpunkten das jeweilige Kamerabild lieferte, wurde in jedem Durchlauf zur Kontrolle zusätzlich die Systemzeit ausgelesen. In der aktuellen Realisierung ergab sich für die Bilderrate während des *live trackings* der Wert $3,75 \pm 0,15$ fps. Ebenso ist die Kamera der limitierende Faktor für die räumliche Auflösung und Genauigkeit des *live trackings* (in der aktuellen

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

Realisierung entspricht ein Kamerapixel der *pco* Kamera einer Fläche von $107,5 \times 107,5 \text{ nm}^2$). Die Bildaufnahmen und Datenauswertungen erfolgten entsprechend der Abschnitte 5.3.1 und 5.3.2.

5.3.4. Ergebnisse

Für die *blinking traps* Messungen unter CytoD-Einfluss wurden die CytoD-Konzentrationen 0, 1 und $5 \mu\text{M}$ verwendet. Die Messungen erfolgten unter Verwendung einer Einfachfalle an der Stelle (5/5) und einer Laserleistung von 500 mW, was entsprechend der Fallenkalibration (Abschnitt 4.5) einer *trap stiffness* von $\kappa_{\text{OT}} = 102 \pm 6 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$ entsprach. Die entsprechenden verwendeten experimentellen Parameter der übrigen Experimentreihen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Aufgrund der Auswahlkriterien zur automatisierten Bestimmung der *blinking*-Intervalle (Abschnitt 5.3.2.2) und der *fit*-Routine (Abschnitt 5.3.2.4) konnten nicht in allen ausgewerteten Messungen gültige *blinking events* identifiziert oder quantifiziert werden. In die Berechnung der Mittelwerte flossen daher für die $0 \mu\text{M}$ Experimente 16 von 17 ausgewerteten Messungen, für die $1 \mu\text{M}$ Experimente 19 von 20 Messungen, für die $5 \mu\text{M}$ Experimente 4 von 5 Messungen mit ein. Entsprechendes gilt für die Messungen *Exp1-3* bei verschiedenen Laserleistungen (siehe Abschnitt 5.3.1), hier wurden für *Exp1* in 17 von 21, für *Exp2* in 48 von 52 und für *Exp3* in 16 von 17 Messungen gültige *fit*-Werte identifiziert.

Abbildung 5.13 zeigt eine DIC-Zeitserie und die zugehörige Partikeltrajektorie eines typischen *blinking traps*-Experiments. Die Positionen und Zeitpunkte des Anbindens der Partikel an die Zellen ließen sich mit Hilfe der optischen Falle sehr genau kontrollieren. Im Rahmen der *blinking*-Experimente bildeten die Anbindezeitpunkte damit eine untere zeitliche Grenze, ab der sich frühestens die Mechanik der Partikelinternalisierung quantifizieren ließ. Anhand der DIC-Zeitserien und zugehörigen Partikeltrajektorien wurden die Anbindezeitpunkte, wie in Abschnitt 5.3.2.1 beschrieben, rekonstruiert. Der Anbindezeitpunkt stimmte in den meisten Trajektorien nicht mit dem Beginn der Partikelauslenkung überein, vielmehr trat in den Messungen zwischen Anbindezeitpunkt und einsetzender Partikelauslenkung eine individuelle Ruhephase auf (siehe Abbildung 5.13).

Als Ruhephase Δt wurde die Zeit zwischen dem Anbinden des Partikels an die Zelle und dem Zeitpunkt deutlich sichtbarer Partikelauslenkung aus der Falle definiert, an dem das Partikel um $d_{\text{start}} = 0,4 \mu\text{m}$ aus der optischen Falle ausgelenkt war. Für die in Abbildung 5.13 gezeigte Messung ergab sich entsprechend eine Ruhephase von $100 \pm 5 \text{ s}$. In den durchgeführten *blinking traps* Experimenten wurden individuelle Ruhephasen zwischen 0 und 120 s gemessen, wie in Abbildung 5.14a-b dargestellt ist. Abbildung 5.14a zeigt die Verteilung der gemessenen Ruhephasen. Zur besseren Übersicht wurde in der Darstellung als Abszisse der Abstand des Partikels zum Nukleus zum Zeitpunkt des Anbindens verwendet. Die mittleren Partikelabstände zum Zeitpunkt des Anbindens waren in allen Messungen vergleichbar und lagen im Bereich von etwa $22 \pm 5 \mu\text{m}$ (Abbildung 5.14c). Die mittleren Ruhephasen stimmten für alle untersuchten Experimentserien der CytoD-Konzentrationen von $0 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ im Rahmen ihrer Messunsicherheiten überein (Abbildung 5.14b). Es konnte kein systematischer Zusammenhang zwischen der Länge der Ruhephase und dem Abstand des Partikels zum Nukleus festgestellt werden (Abbildung 5.14c). Dieses Ergebnis ist unabhängig von der Wahl des Parameters d_{start} zur Berechnung der Ruhephasen, wie in Abbildung G.1 in Anhang G.1 für den Fall $d_{\text{start}} = 0,2 \mu\text{m}$ gezeigt ist (Zwar ergaben kleinere Werte für d_{start} insgesamt kürzere Ruhephasen, ein systematischer Zusammenhang zwischen Anbindezeitpunkt und dem Beginn der Partikelauslenkung konnte auch bei Variation von d_{start} nicht festgestellt werden).

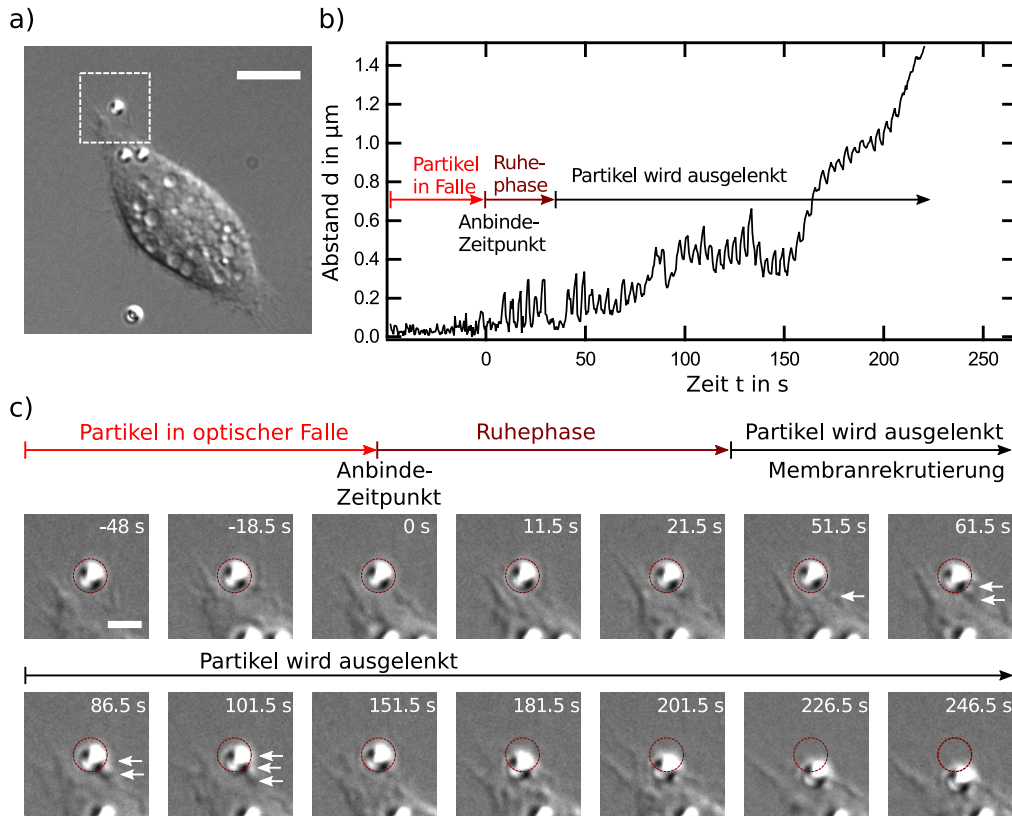


Abbildung 5.13.: Phasen der *blinking traps* Experimente. (a) DIC-Aufnahme zu Beginn eines *blinking traps* Experiments. Das Partikel am oberen linken Bildrand ist in der optischen Falle gefangen, *scale bar* 10 μm. (b) Partikeltrajektorie der Hellfeld-Zeitserie (500 Hz) des *blinking* Experiments in (a), dargestellt als radialer Abstand $d(t)$ des getrackten Partikels im Verhältnis zu seiner Ausgangslage zu Beginn des Experiments. Die Ausgangslage entspricht der Ruheposition des sich thermisch in der optischen Falle bewegendem Partikels. Die Pfeile verdeutlichen die unterschiedlichen Phasen des Experiments. Bis zum Zeitpunkt des Anbindens zur Zeit $t = 0$ s befindet sich das Partikel in der optischen Falle, die Partikelbewegung aus der optischen Falle setzte in etwa 39 s nach dem Anbindezeitpunkt ein. (c) DIC-Zeitserie des *blinking* Experiments zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Experiment-Phasen. Mit der einsetzenden Auslenkung des Partikels aus der Gleichgewichtsposition (der gestrichelte Kreis markiert die Fallenposition) ist eine erkennbare Membranrekrutierung entlang der Partikeloberfläche (weiße Pfeile) verbunden, *scale bar* 3 μm.

Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte somit kein systematischer Zusammenhang zwischen Anbindezeitpunkt und dem Beginn der Partikelauslenkung aus der optischen Falle erkannt werden. Eine zeitliche Mittelung der Abstandskurven über anhand des Anbindezeitpunkts definierte Intervalle erschien daher nicht sinnvoll und führte zu einer starken Streuung der Messwerte.

Die Trajektorien wurden daher für die weitere Analyse entsprechend Abschnitt 5.3.2.5 zeitlich reskaliert, der Schwellwert der Zeitreskalierung betrug $d_{\text{thres}} = 0,4 \mu\text{m}$. Abbildung 5.15 zeigt eine Auswahl an typischen *blinking traps* Messungen bei verschiedenen CytoD-Konzentrationen und die entsprechenden zeitreskalierten Abstandskurven. Im Falle der $5 \mu\text{M}$ Experimente konnte keine signifikante Partikelauslenkung während der Messungen beobachtet werden. Entsprechend wurden für die $5 \mu\text{M}$ -Messungen keine Zeitreskalierungen durchgeführt.

In Abbildung 5.16 sind für die durchgeführten Experimentreihen die gemittelten *offset*-Werte $d_0(t)$ als Funktionen der reskalierten Messzeit t dargestellt ($d_0(t)$ entspricht den Partikelabständen zur

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

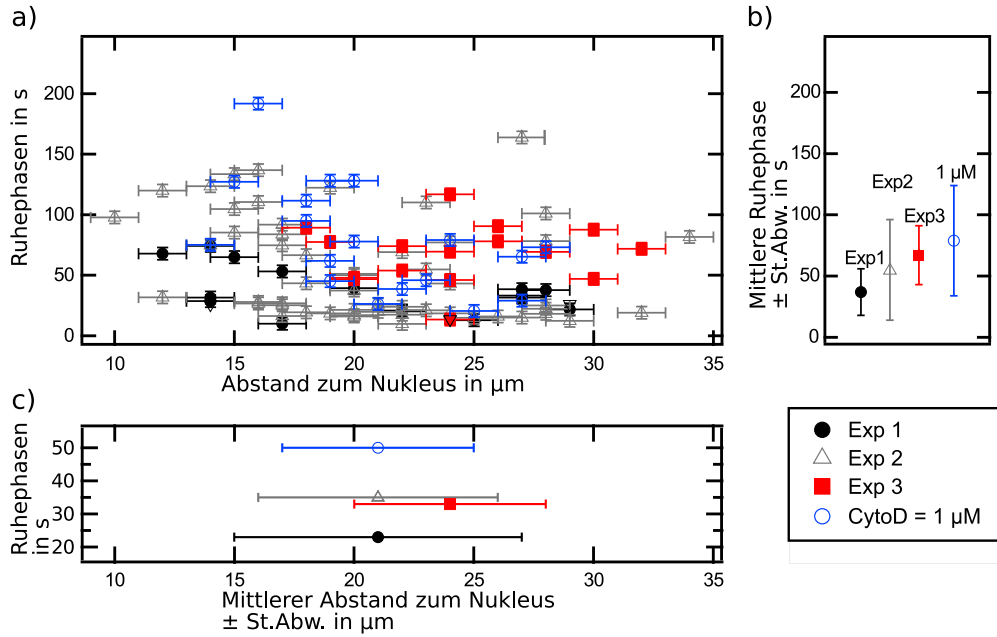


Abbildung 5.14.: Ruhephasen der Partikeltrajektorien. (a) Ruhephasen Δt der Partikel als Funktion des Abstands zum Nukleus. Als Ruhephase wurde hier die Zeit zwischen dem Anbindezeitpunkt und der Zeit, zu der das Partikel um $d = 0,4 \mu\text{m}$ aus der optischen Falle ausgelenkt war, definiert. Der Partikelabstand zum Nukleus wurde anhand der DIC-Bilder zu Beginn der jeweiligen Messung per Augenmaß mit einer Genauigkeit von \pm dem Partikelradius abgeschätzt. (b) Mittelwerte der Ruhephasen \pm Standardabweichungen. (c) Mittlere Abstände zum Nukleus \pm Standardabweichungen.

optischen Falle zu Beginn der jeweiligen blinking-Relaxation, wie in Abschnitt 5.3.2.4 beschrieben). Die Geschwindigkeiten $\frac{\Delta d(t)}{\Delta t}$ der Partikelpositionsänderungen wurden durch lineares Fitten vergleichbarer Zeitintervalle bestimmt und sind in Abbildung 5.16 dargestellt. Die Geschwindigkeiten für *Exp1-3* sowie für die Messungen unter geringem CytoD-Einfluss (CytoD = $1 \mu\text{M}$) lagen somit alle im Bereich der mittleren Geschwindigkeit $(\Delta d(t)/\Delta t) = 4,1 \pm 0,3 \text{ nm s}^{-1}$ (*Exp3* und CytoD = $0 \mu\text{M}$ entsprechen derselben Messreihe).

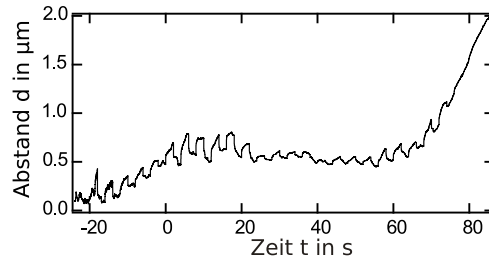
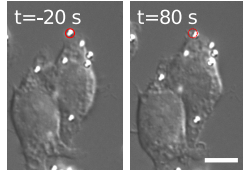
In den Fällen hoher CytoD Behandlung der Zellen (CytoD = $5 \mu\text{M}$) wurde keine signifikante Partikelauslenkung beobachtet, die mittlere Geschwindigkeit der Partikelauslenkung betrug entsprechend $\frac{\Delta d_{5 \mu\text{M}}}{\Delta t} = 0,04 \pm 0,31 \text{ nm s}^{-1}$.

Zur Bestimmung von $J(t)$ wurden die *blinking*-Relaxationen des Partikels in Richtung der optischen Falle ausgewertet. Die entsprechenden *offset*-Werte $d_0(t)$ wurden also aus den Partikelpositionen $d(t)$ zu Beginn der *blinking*-Relaxationen in Richtung Falle beim Einschalten der optischen Falle bestimmt und unterscheiden sich daher von den in Abbildung 5.16 dargestellten Werten.

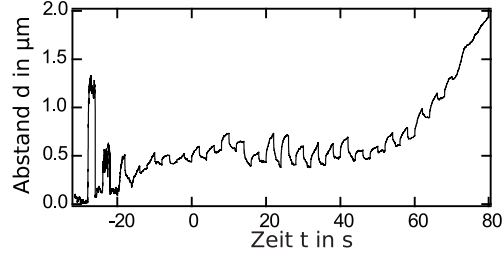
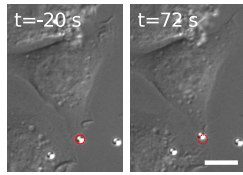
Abbildung 5.15. (nächste Seite): Typische Messungen der *blinking traps*-Experimente. Die Experimente wurden bei verschiedenen Graden der Inhibierung der Aktin-Polymerisierung durch CytoD durchgeführt, (a-c) CytoD = $0 \mu\text{M}$, Kontrollexperimente, (d-e) CytoD = $1 \mu\text{M}$, moderate CytoD-Konzentration, (f) CytoD = $5 \mu\text{M}$, hohe CytoD-Konzentration. (linke Spalte) DIC-Aufnahmen der entsprechenden *J-774A.1* Zellen mit $2 \mu\text{m}$ Partikeln vor und nach Durchführung der *blinking traps*-Routine. Die Zellen zeigen das typische Erscheinungsbild unter CytoD-Einfluss (siehe Abschnitt 5.1.4). Die Position der optischen Falle zu Beginn der Messung ist jeweils rot markiert, *scale bar* $10 \mu\text{m}$. (rechte Spalte) Die aus den Partikelpositionen gemäß 5.3.2.1 berechneten Abstandskurven $d(t)$ nach Durchführung der in Abschnitt 5.3.2.5 diskutierten Zeitreskalierung mit Schwellwert $d_{\text{thres}} = 0,4 \mu\text{m}$. Bei Behandlung der Zellen mit hoher CytoD-Konzentration wurde keine Partikelauslenkung aus der optischen Falle beobachtet, entsprechend wurde für die $5 \mu\text{M}$ -Messungen keine Zeitreskalierung durchgeführt.

5.3. Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung

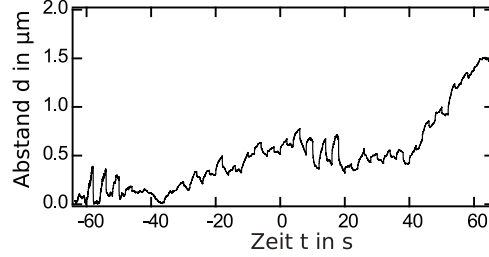
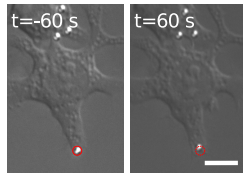
a) CytoD = 0 μM



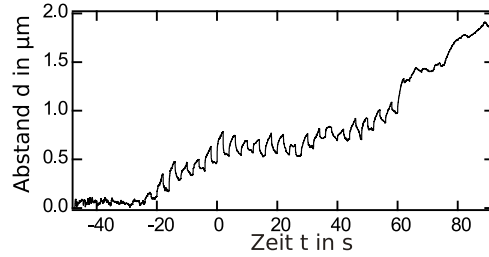
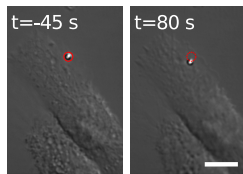
b) CytoD = 0 μM



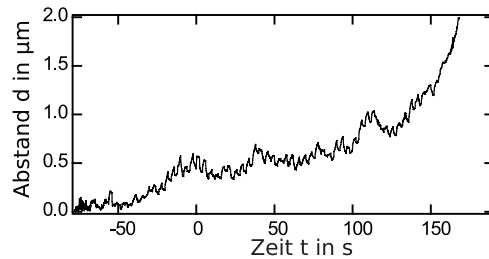
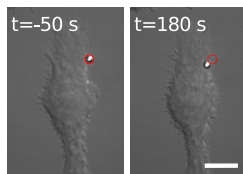
c) CytoD = 0 μM



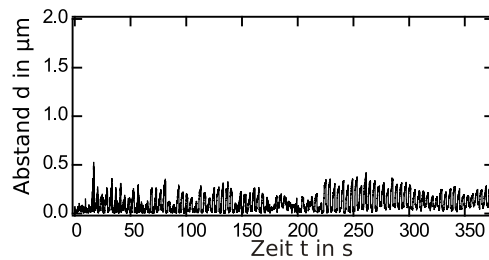
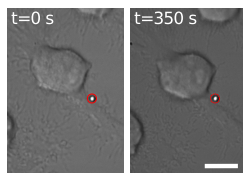
d) CytoD = 1 μM



e) CytoD = 1 μM



f) CytoD = 5 μM



5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

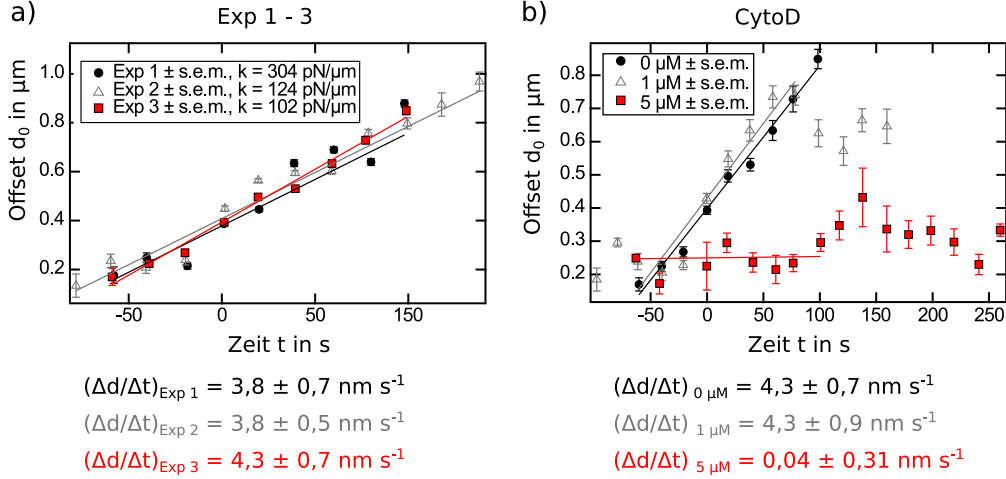


Abbildung 5.16.: Zur Berechnung der Geschwindigkeiten $\Delta d(t)/\Delta t$ der *offset*-Werte $d_0(t)$. (a) *Offset* $d_0(t)$ und lineare fit-Kurven für die Experimente *Exp 1-3* mit unterschiedlicher *trap stiffness*. (b) *Offset* $d_0(t)$ und lineare fit-Kurven für die Experimente mit unterschiedlicher CytoD-Behandlung der Zellen. Die Zahlenwerte unter den Graphen geben die aus den *fits* berechneten Steigungen an. Zur Vergleichbarkeit wurden die Zeitintervalle ausgewertet, für die in allen Messreihen Datenpunkte vorlagen.

In Abbildung 5.17 sind die über alle Trajektorien entsprechend Abschnitt 5.3.2.4 gemittelten und berechneten Werte $d_0(t)$ (Abbildung 5.17a) und $F_{OT}(t)$ (Abbildung 5.17b) und die sich aus den Fitkurven ergebenden Fitparameter $j_0(t)$ (Abbildung 5.17c) und $\beta(t)$ (Abbildung 5.17d) als Funktionen der Zeit für die bei verschiedenen Fallensteifigkeiten κ gemessenen Experimentreihen *Exp1-3* dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler (*standard error of the mean*, s.e.m.) an. Zur Übersicht ist in Abbildung 5.17e zusätzlich die Anzahl der Werte, aus denen sich die Standardfehler berechnen, angegeben. Abbildung 5.18 zeigt die entsprechenden Kurven \pm Standardfehler für die Messungen bei unterschiedlich starker CytoD-Behandlung der Zellen. Der Datensatz der Kontrollgruppe (0 μM , schwarze Kreise in Abbildung 5.18) ist mit der Experimentreihe *Exp3* (rote Quadrate in Abbildung 5.17) identisch. Tabelle 5.2 beinhaltet die nach Gleichung (5.9) berechneten Korrelationskoeffizienten R für die einzelnen Fitparameter.

Die zur Berechnung von $J(t)$ verwendeten *offset*-Werte d_0 stiegen in allen untersuchten Fällen mit der Messzeit an (Abbildungen 5.18a und 5.17a) und wiesen hohe signifikante Korrelationskoeffizienten $R_{d_0,t}$ auf. Der Anstieg für den Fall hoher CytoD-Behandlung (5 μM) erschien deutlich geringer.

Die anhand der Partikeltrajektorien bestimmte rücktreibende optische Kraft F_{OT} nahm für die gemessenen Bereiche in den Fällen, in denen eine Auslenkung des Partikels aus der optischen Falle stattfand, ebenfalls zu (Abbildungen 5.18b und 5.17b). Die Korrelationskoeffizienten lagen im mittleren Bereich $0,48 < R_{F_{OT},t} < 0,77$, waren jedoch nicht in allen Fällen signifikant.

Der Parameter j_0 beschreibt die Nachgiebigkeit oder *compliance* der untersuchten Zellregion und lässt sich als inverse Zellsteifigkeit interpretieren. Bei Betrachtung der zeitlichen Entwicklung von j_0 für die verschiedene Fallensteifigkeiten κ wird erkennbar, dass j_0 in *Exp1-3* mit zunehmender Messdauer abnimmt (Abbildung 5.17c). Diese Beobachtung wird durch die signifikant stark negativen Korrelationskoeffizienten ($-0,93 < R_{j_0,t} < -0,87$) bestärkt. In Abbildung 5.17c ist zudem ein inverser Zusammenhang zwischen j_0 und der eingestellten Fallensteifigkeit κ erkennbar. Je höher die eingestellte optische Fallensteifigkeit gewählt wurde, desto geringer waren die resultierenden

5.3. Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung

Werte für $j_0(t)$. Entsprechend ergaben sich für *Exp1-2* signifikante negative lineare Korrelationen $R_{j_0, F_{OT}}$ zwischen $j_0(t)$ und F_{OT} (Für *Exp3* nicht signifikant).

Im Rahmen der Messunsicherheiten konnte im Fall der *blinking traps*-Messungen bei verschiedenen Graden der Inhibierung der Aktin-Polymerisierung (1 μM , 5 μM) hingegen keine zeitliche Änderung von j_0 beobachtet werden (Abbildung 5.18c). Die lineare Korrelation für $j_0(t)$ lag entsprechend in niedrigen negativen Bereichen und war nicht signifikant ($-0,45 < R_{j_0, t} < -0,16$). Die gemittelte Nachgiebigkeit $\langle j_{0, 5 \mu\text{M}} \rangle$ für den Fall hoher CytoD-Konzentrationen war mit $\langle j_{0, 5 \mu\text{M}} \rangle = 30,9 \pm 11,9 \text{ mPa}^{-1}$ signifikant größer als die gemittelten Vergleichswerte $\langle j_{0, 0 \mu\text{M}} \rangle = 15,8 \pm 7,0 \text{ mPa}^{-1}$ und $\langle j_{0, 1 \mu\text{M}} \rangle = 13,6 \pm 5,9 \text{ mPa}^{-1}$ unter Annahme sich im Laufe der Messreihe nicht ändernder Nachgiebigkeiten j_0 (die eingefärbte Flächen in 5.18c geben die jeweiligen Mittelwerte \pm Standardabweichungen an).

Der in den Abbildungen 5.18d und 5.17d dargestellte *power law*-Exponent β änderte sich in den Messungen im Rahmen der Messunsicherheiten nicht wesentlich mit Verlauf der Messzeit t . Die Korrelationskoeffizienten $R_{\beta, t}$ wiesen entsprechend keine hohen Werte auf. Die gemittelten *power law*-Exponenten β der Messungen bei unterschiedlich starker CytoD-Behandlung der Zellen betragen $\langle \beta_{0 \mu\text{M}} \rangle = 0,25 \pm 0,03$, $\langle \beta_{1 \mu\text{M}} \rangle = 0,26 \pm 0,03$ und $\langle \beta_{5 \mu\text{M}} \rangle = 0,40 \pm 0,06$. Der *power law*-Exponent $\beta_{5 \mu\text{M}}$ für Messungen bei hoher CytoD-Konzentration (5 μM) war damit signifikant größer als $\beta_{0 \mu\text{M}}$ und $\beta_{1 \mu\text{M}}$ (Abbildung 5.18d, die eingefärbten Flächen geben die jeweiligen Mittelwerte \pm Standardabweichungen an). Die gemittelten Werte $\langle \beta \rangle$ für alle Messungen unterschiedlicher Laserleistungen ohne CytoD-Behandlung (Abbildung 5.17d) lagen im Bereich $\langle \beta \rangle = 0,25 \pm 0,02$.

Blinking mit *Live Tracking*-Routine

Eine typische Messung der *blinking traps*-Experimente mit Erweiterung durch die in Abschnitt 5.3.3 beschriebene *live tracking*-Routine und die Funktionsweise der damit rückgekoppelten Probenpositionierung zeigt Abb. 5.19. Als Parameter wurden der Referenzabstand $d_{\text{ref}} = 0,3 \mu\text{m}$ und der Schwellwert $d_{\text{piezo}} = 0,1 \mu\text{m}$ gewählt. Überschritt während der *live tracking*-Phasen mittels *tracking*-Algorithmus berechnete Partikelabstand $d_n = |d(t) - d_{\text{ref}}|$ den Wert $d_n \geq 0,1 \mu\text{m}$, erfolgte die Korrekturbewegung der *piezo stage* zurück zur Referenzposition im Abstand d_{ref} , wie in Abbildung 5.19c-d dargestellt ist. Die *blinking*-Routine mit jeweils zweifachem Ein- und Ausschalten der optischen Falle für 2 s und einer Pause von 0,5 s nach jedem dieser *blinking events* fand in den Phasen mit pausierender Rückkopplungskontrolle statt (nicht hinterlegte Zeitintervalle in Abbildung 5.19d).

Die Kontrolle der Partikelposition durch die Probenrückkopplung erwies sich als erfolgreich. Allerdings konnten bis zum jetzigen Stand der Arbeiten mit Hilfe der *live tracking*-Routine keine experimentellen Verbesserungen im Hinblick auf die Zellsteifigkeitsmessungen erzielt werden. Zum einen erschienen die für die Auswertung relevanten *blinking* Relaxationen in den Hellfeldmessungen deutlich stärker verrauscht und waren in vielen Fällen nicht eindeutig identifizierbar, bzw. fanden nicht statt, so dass weder automatische, noch händische Bestimmung der Start- und Endpunkte der Partikelrelaxationen eindeutig möglich waren. In der in Abb. 5.19 gezeigten Trajektorie konnten mit den in 5.3.2.2 beschriebenen Methoden so beispielsweise nur die in Abb. 5.19d als 2 und 4 nummerierten *blinking events* automatisiert identifiziert werden, in den Fällen 5, 7, 9, 11, 12 wurden keine signifikanten Partikelrelaxationen beobachtet. Insbesondere mit fortschreitender Messdauer konnten in den bisher durchgeführten Messungen keine *blinking*-Relaxationen beobachtet werden, so dass das Ziel einer höheren Grundgesamtheit durch längere Messreihen bisher nicht erfüllt wer-

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

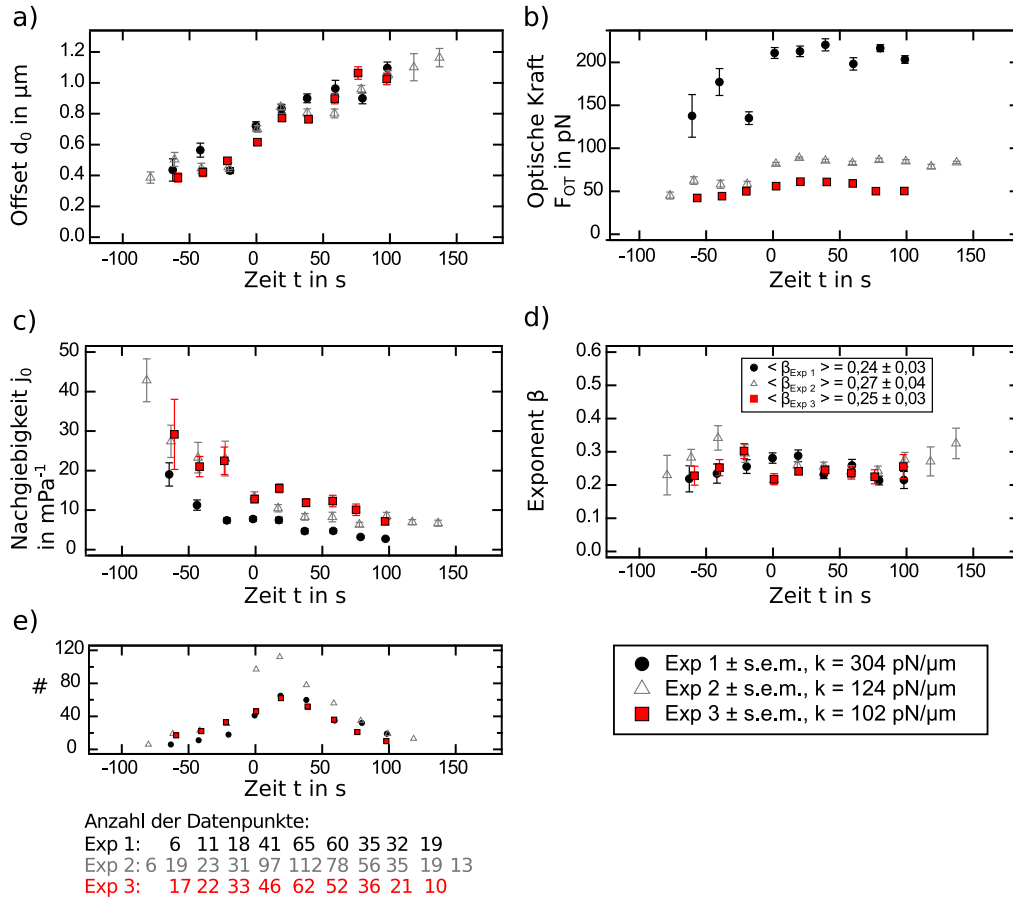


Abbildung 5.17.: Ergebnisse der *blinking traps*-Experimente bei verschiedenen Fallensteifigkeiten. Die Graphen zeigen die gemäß Abschnitt 5.3.2.4 definierten und gemittelten Größen \pm Standardfehler als Funktionen der reskalierten Zeit an. (a) Offset $d_0(t)$. (b) Optische Kraft $F_{OT}(t)$. (c) Nachgiebigkeit $j_0(t)$. (d) *Power law*-Exponent $\beta(t)$. (e) Anzahl der Datenpunkte, aus denen die jeweiligen Mittelwerte \pm Standardfehler in (a-d) berechnet wurden. Zeitintervalle, für die weniger als 5 Datenpunkte zur Verfügung standen, wurden nicht berücksichtigt. Für die Experimentreihe *Exp4* konnte aufgrund der Datenauswertung nicht der vollständige Messbereich erfasst werden.

den konnte. Zum anderen wurden die erweiterten *blinking traps*-Experimente mit *live tracking* aus Zeitgründen bis zum jetzigen Stand der Arbeiten nur ansatzweise getestet und die zahlreichen Messparameter noch nicht im Hinblick auf eine Vergleichbarkeit mit den bisher durchgeführten Experimenten optimiert.

5.3.5. Diskussion

Mit Spannungs-Dehnungs-Relaxationen durch zeitlich modulierte holografische optische Fallen (*blinking traps*-Experimente) wurde das viskoelastische Verhalten der Zellen während der Partikelinternalisierung untersucht. Als Kriterium für stattfindende Partikelinternalisierung wurde die Auslenkung des Partikels aus der optischen Falle gewertet, welche in vielen Fällen einen charakteristischen Verlauf aufwies (siehe Abbildung 5.15). Als weitere Indizien für Partikelinternalisierung wurden im Fall von unbehandelten Zellen die Beobachtung von Membranrekrutierung und Membranruffles entlang der zu internalisierenden Partikel gewertet. Entsprechend der Ergebnisse der Phagozytose-Effizienz Messungen (Abschnitt 5.2) wird für die Experiment-Bedingungen eine Phagozytose-Wahrscheinlichkeit von 30 - 55 % erwartet. Es ist möglich, dass die gemessenen Parti-

5.3. Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung

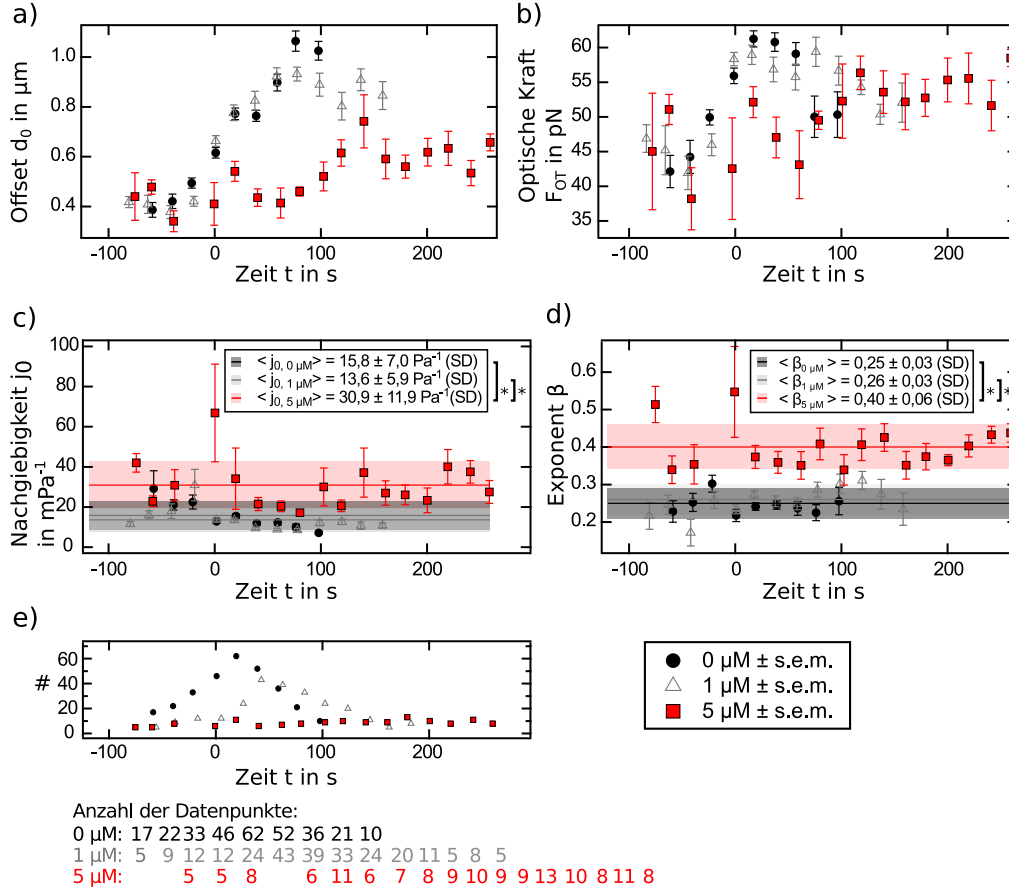


Abbildung 5.18.: Ergebnisse der *blinking traps*-Experimente unter CytoD-Einfluss. Die Graphen zeigen die für die Messreihen mit unterschiedlicher CytoD-Konzentration berechneten Größen \pm Standardfehler als Funktionen der reskalierten Zeit an. Die Daten für CytoD = 0 µM entsprechen den Daten *Exp3* aus Abbildung 5.17. Weil im Fall der 5 µM Experimente keine signifikante Partikelauslenkung beobachtet werden konnte, wurde für die 5 µM-Messungen keine Zeitreskalierung durchgeführt. (a) *Offset* $d_0(t)$. (b) *Optische Kraft* $F_{OT}(t)$. (c) *Nachgiebigkeit* $j_0(t)$. (d) *Power law-Exponent* $\beta(t)$. (e) Anzahl der Datenpunkte, aus denen die jeweiligen Mittelwerte \pm Standardfehler in (a-d) berechnet wurden. Zeitintervalle, für die weniger als 5 Datenpunkte zur Verfügung standen, wurden nicht berücksichtigt.

kelauslenkungen $d(t)$ zu einem Teil aus Partikeltransport entlang der Zellmembran resultieren. In dem verwendeten Modellsystem der Fc γ -medierten Phagozytose von mit IgG beschichteten Parti-

	Korrelationskoeffizienten R				
	Exp 1	Exp 2	Exp 3 (= 0 uM)	1 uM	5 uM
$R_{d_0,t}$	0,93**	0,97**	0,98**	0,85**	0,73**
$R_{F_{OT},t}$	0,71*	0,77**	0,48	0,50	0,73**
$R_{j_0,t}$	-0,89**	-0,87**	-0,93**	-0,45	-0,16
$R_{\beta,t}$	-0,18	0,09	-0,15	0,59*	-0,09
$R_{j_0,F_{OT}}$	-0,69*	-0,94**	-0,59	-0,57*	-0,28**
$R_{\beta,F_{OT}}$	0,16	-0,21	-0,13	0,61*	-0,14

Tabelle 5.2.: Korrelationskoeffizienten der aus den Experimenten bestimmten Fitparameter d_0, F_{OT}, j_0, β . Die dargestellten Korrelationskoeffizienten $R_{p,q}$ wurden mit Gleichung (5.9) berechnet und geben die lineare Korrelation der Größen p und q an. Die Sternchen zeigen die Signifikanzwerte der Korrelation an, wobei * = 0,05 und ** = 0,001 bedeuten.

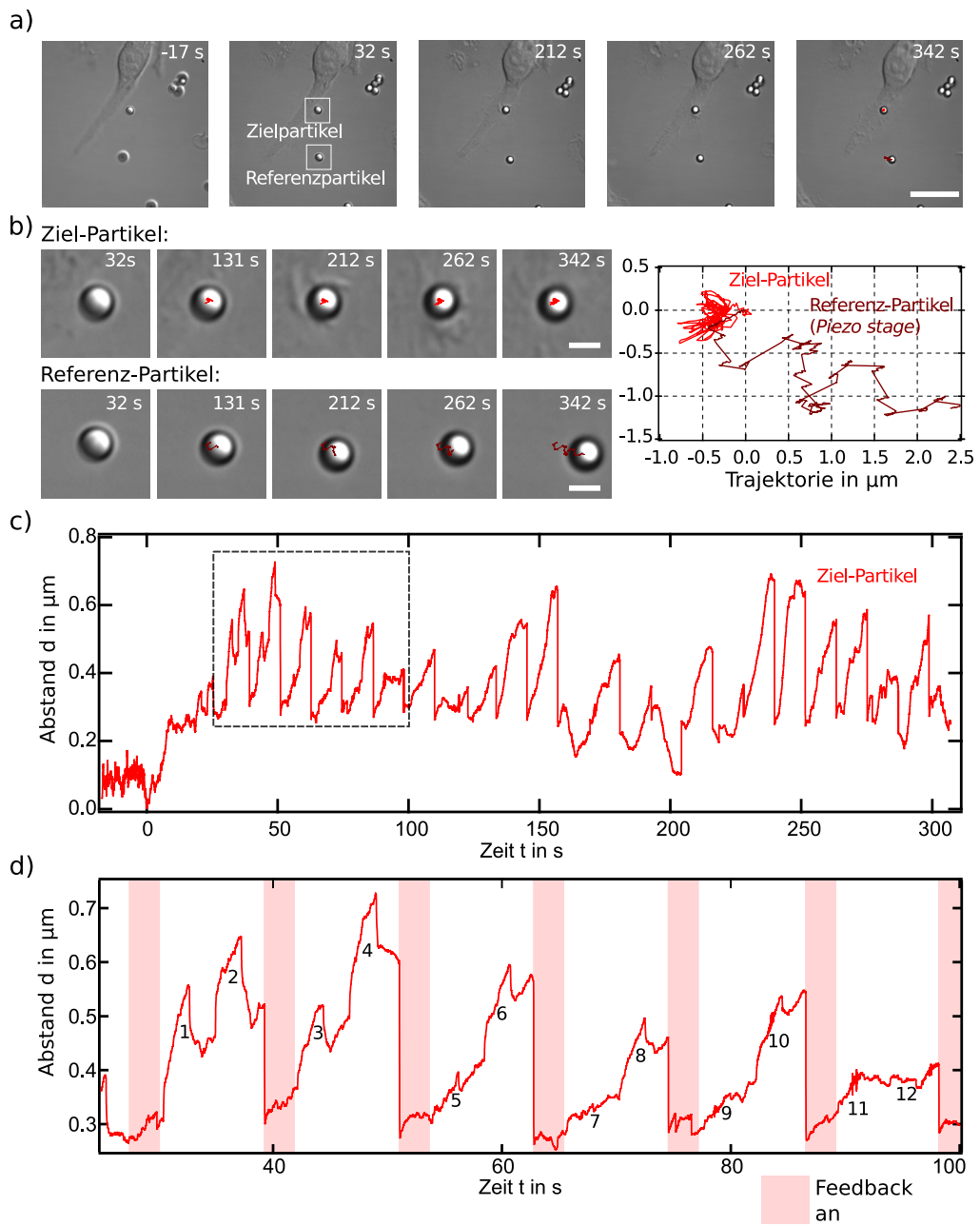
5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

keln an *J-774A.1* Zellen entspricht Partikeltransport entlang der Zellmembran allerdings nicht dem typischen Verhalten [17, 130, 226]. Um zusätzlich quantitative Aussagen über die Vollständigkeit oder den Grad der Membranhüllung des Partikels während der *blinking traps*-Experimente treffen zu können, ist eine weitere zusätzliche Kontrolle der Zellmembran, beispielsweise mit Hilfe von Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Aktin, notwendig. Somit ließe sich zudem gezielt zwischen Partikelinternalisierung und Partikeltransport differenzieren. Quantitative Nachweise einer vollständig abgeschlossenen Partikelinternalisierung, wie beispielsweise in Abschnitt 5.2 beschrieben, erfordern typischerweise das Fixieren der Zellen, was die Experimente aufgrund der nötigen Arbeitsschritte (Durchführung der Messungen, Fixierung und Färbung der Probe, Identifizierung der gemessenen Zellen in den fixierten Proben) sehr arbeits- und zeitaufwändig, und damit insbesondere den experimentellen Durchsatz sehr niedrig, machen würde. Aus diesen Gründen wurde darauf in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente verzichtet. Die im Folgenden diskutierten Ergebnisse der Untersuchung der Zellmechanik sind somit für die Anfangsphase der Phagozytose, welche unter anderem durch die einsetzende Partikelinternalisierung charakterisiert ist, aussagekräftig.

Für die bei starker CytoD-Konzentration ($5\ \mu\text{M}$) durchgeführten Experimente konnte keine signifikante Partikelauslenkung während der Messungen beobachtet werden (Abbildung 5.16b), so dass von den durchgeführten Experimenten nur wenige Messungen zur Kontrolle gespeichert wurden und keine Zeitreskalierung durchgeführt wurde. Aufgrund der in den Messungen bei CytoD = $5\ \mu\text{M}$ nicht beobachteten Partikelauslenkung wird in diesen Fällen von nicht stattfindender Phagozytose ausgegangen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Phagozytose-Effizienz Messungen (Abschnitt 5.2), welche für die untersuchten Experiment-Bedingungen eine Phagozytose-Wahrscheinlichkeit von 10 - 15 % vorhersagen. Im den übrigen Fällen (CytoD = 0 und $1\ \mu\text{M}$) verlief die Partikelauslenkung sehr ähnlich und mit einer mittleren Geschwindigkeit von

Abbildung 5.19. (nächste Seite): *Blinking traps*-Experiment mit Erweiterung durch *live tracking* und *piezo stage*-Rückkopplung. (a) DIC-Zeitserie (1 Hz) eines typischen Experiments. Das in der optischen Falle gefangene, mit IgG oberflächenfunktionalisierte Zielpartikel mit einem Durchmesser von $3\ \mu\text{m}$ wurde zum Zeitpunkt $t = 0\text{ s}$ an eine *J-774A.1*-Zelle angebunden und während der Messung von der Zelle internalisiert. Das Referenzpartikel haftete auf dem Boden des Deckglases. Im letzten Bild sind zusätzlich die getrackten Partikeltrajektorien von Ziel- und Referenzpartikel eingezeichnet, *scale bar* $20\ \mu\text{m}$. **(b)** Vergrößerte Ausschnitte der Zeitserie aus (a) für Ziel- und Referenzpartikel mit den zugehörigen Partikeltrajektorien. Die durch die Zelle hervorgerufene Auslenkung des Zielpartikels aus der optischen Falle wurde durch Verfahren der Piezostage in entgegengesetzte Richtung kompensiert. Die Trajektorie des Zielpartikels (hellrot) blieb aufgrund des Rückkopplungsalgorithmus daher räumlich stark begrenzt, die Trajektorie des Referenzpartikels (dunkelrot) entsprach der während der Messung durchgeführten Bewegung der *piezo stage* zur Kompensation der Auslenkung des Zielpartikels. Die Auslenkung des Zielpartikels erfolgte hauptsächlich in $-x$ -Richtung, die kompensierende Bewegung der *piezo stage* entsprechend hauptsächlich in $+x$ -Richtung über einen Bereich von $3\ \mu\text{m}$, *scale bars* $3\ \mu\text{m}$ **(c)** Aus der Hellfeldmessung (250 Hz) berechnete Abstandskurve $d(t)$ des Zielpartikels. Zum Zeitpunkt $t = 0\text{ s}$ wurde das Zielpartikel angebunden, der *live tracking*-Algorithmus wurde gestartet, nachdem das Partikel um $d_{\text{ref}} = 0,3\ \mu\text{m}$ aus der Fallenposition ausgelenkt war, der Schwellwert d_{piezo} für das Einsetzen der Rückkopplung betrug $d_{\text{piezo}} = 0,1\ \mu\text{m}$. Die Sprünge in der Abstandskurve zurück zur Referenzauslenkung d_{ref} resultierten aus dem Verfahren der Piezostage während der aktiven *live tracking*-Phasen, wenn die Partikelabstände $d_n = |d(t) - d_{\text{ref}}|$ die Bedingung $d_n \geq d_{\text{piezo}}$ erfüllten. Somit wurden Positionsänderungen des Partikels in Richtung der optischen Falle (zum Beispiel bei $t = 204\text{ s}$) ebenfalls kompensiert. **(d)** Ausschnitt der Trajektorie in (c) (gestrichelter Bereich). Die rot hinterlegten Bereiche entsprechen den $2,7\text{ s}$ Phasen (10 Bilder der *pco*-Kamera bei $3,75\text{ Hz}$), in denen das *live tracking* aktiv war. Während der nicht hinterlegten Zeitintervalle wurde die *blinking traps*-Routine durchgeführt mit jeweils 2 *blinking events* pro Intervall, so dass im gezeigten Ausschnitt zwölf einzelne Partikelrelaxationen an den nummerierten Stellen erwartet wurden.

5.3. Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung



5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

$\frac{\Delta d}{\Delta t} = 4,1 \pm 0,3 \text{ nm s}^{-1}$, unabhängig von der jeweils entgegenwirkenden optischen Kraft F_{OT} . Es kann also gefolgert werden, dass für eine messbare Partikelauslenkung, welche im Rahmen der *blinking traps*-Experimente als Indiz für Phagozytose angesehen wurde, ein intaktes Aktin-Netzwerk notwendig ist.

In den Messungen wurden individuelle Ruhephasen Δt zwischen Anbindezeitpunkt und Beginn der sichtbaren Partikelauslenkung aus der optischen Falle beobachtet. Ein systematischer Zusammenhang zwischen der Dauer der Ruhephasen, dem Ort der Partikelanbindung und der Art der Partikelauslenkung konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht erkannt werden. Die mittleren Partikelabstände zum Zeitpunkt des Anbindens waren in allen Messungen vergleichbar und lagen im Bereich von etwa $22 \pm 5 \mu\text{m}$ (Abbildung 5.14c). In den Experimenten wurde somit auf Partikelanbindung an weit vom Nukleus entfernte Zellausläufer von stark elongierten Zellen verzichtet. Im Rahmen ihrer Abweichungen stimmten die Mittelwerte der Dauern der Ruhephasen in allen Experimenten überein. Das generelle Auftreten von Ruhephasen ist jedoch plausibel und lässt sich unter anderem durch die endliche „Integrationszeit“ der Zellen erklären. Wie in Kapitel 3 beschrieben, erfordert der Prozess der Phagozytose des angebondenen Partikels die Rekrutierung von Rezeptor-Liganden-Bindungen und das Aufbrechen der „*picket fence*“-Struktur des Aktin-Kortex [11, 139]. Es ist wahrscheinlich, dass die Stärke der unter anderem verantwortlichen intrazellulären Signalkaskaden von dem Aktivierungszustand der untersuchten Zelle und der Anzahl der beim ersten Kontakt des Anbindens initiierten Rezeptor-Bindungen abhängig ist. Diese beiden Parameter wurden in den *blinking traps* Experimenten nicht kontrolliert und waren für jede Zelle individuell. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Aktivierungszustand der Zelle und Dauer der Ruhephasen Δt könnte beispielsweise durch wiederholtes kontrolliertes Anbinden von Partikeln an dieselbe Position der gleichen Zelle und Messung der jeweiligen Ruhephasen überprüft werden. Die Zahl der beteiligten Rezeptor-Liganden-Bindungen beim Anbinden des Partikels ließe sich experimentell durch die Verwendung von Partikeln mit variabler Güte der Oberflächenfunktionalisierung [227] oder von nur teilweise mit spezifischen Antikörpern funktionalisierten Partikeln [152] kontrollieren. Eine mögliche Kontrolle der Kontaktfläche beim Anbinden des Partikels kann durch eine Erweiterung der *blinking trap*-Experimente mit einem verbesserten *live tracking* erfolgen, wie weiter unten diskutiert wird.

In den Messungen bei ungestörter Aktin-Polymerisation entwich das Partikel während der Messungen dem optischen Fangpotential. Es kann gefolgert werden, dass in diesen Fällen die während der Partikelauslenkung von der Zelle aufgebrachten Kräfte F_{Zelle} größer als die entgegenwirkenden optischen Kräfte F_{OT} waren, welche in den hier durchgeführten Experimenten $F_{OT, \text{max}} = 200 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$ nicht überstiegen. Hier bietet sich eine experimentelle Möglichkeit zur Charakterisierung der maximalen Zellkraft mit Hilfe von magnetischen Pinzetten an, indem die Rückstellkraft so lange kontinuierlich erhöht wird, bis die Partikelauslenkung zum Erliegen kommt. Wie in Abschnitt 2 diskutiert, können magnetische Pinzetten deutlich stärkere Kräfte erzeugen als optische Pinzetten [109].

Die Beobachtung, dass die Partikel während der Messungen nicht instantan aus dem optischen Fangpotential entwichen, sondern sich die Gleichgewichtslage zwischen den von der Zelle ausgeübten Kräften und den optischen Kräften im Laufe der Messungen immer mehr in Richtung Zelle verschob, legt einen transienten Anstieg der Zellkraft F_{Zelle} nahe. Dies ist im Einklang mit dem in Abschnitt 3.1 erläuterten *zipper*-Modell der Membraneinhüllung während der Phagozytose [130]. Durch sukzessive Vergrößerung der Kontaktfläche und Zunahme der Rezeptor-Liganden-Bindungen

5.3. Messung der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung

zwischen Zellmembran und zu phagozytierendem Partikel können durch Zunahme von an der Internalisierung beteiligten Aktin-Filamenten und den damit verbundenen molekularen Motoren größere Kräfte erzeugt werden [150].

Eine Kontrolle der Kontaktfläche während der Messungen war in den Experimenten bisher auflösungsbedingt nicht möglich, so dass die Größe der Kontaktfläche nach dem Anbinden des Partikels unbekannt war. Daher konnten in den bisherigen Experimenten keine sinnvollen Annahmen über die Entwicklung der Zellkraft während der Partikelauslenkung gemacht werden. Aus der Größe und Form der Kontaktregion resultierende, möglicherweise die Zellsteifigkeit beeinflussende geometrische Faktoren wurden ebenfalls vernachlässigt. Hier können sich numerische Simulationen der Membrankrümmung während der Phagozytose als hilfreich erweisen [228, 229]. Ein möglicher experimenteller Ansatz, um Rückschlüsse auf die Entwicklung der Kontaktfläche zwischen phagozytischer Zelle und Zielobjekt während der Membranhüllung zu ziehen, wird in Abschnitt 5.4 diskutiert.

Aufgrund der Unkenntnis der Zellkraftkomponenten wurde die Zellkraft in der Auswertung der *blinking*-Relaxationen bisher vernachlässigt. Es wurden die Partikelrelaxationen in Richtung optischer Falle nach Einschalten der optischen Falle berücksichtigt. Diese Relaxationen entsprachen in guter Näherung den experimentellen Voraussetzungen für das in der Auswertung verwendete *creep compliance*-Modell für $J(t)$ gemäß Gleichung (5.7) [179, 183]. Die optischen Kräfte F_{OT} wurden hierbei als verantwortlich für die resultierende Zelldehnung $\epsilon(t)$ angenommen. Die bei verschiedenen Fallensteifigkeiten κ durchgeführten Experimente (*Exp1-3*) dienten zur Charakterisierung des Einflusses der zellulären „Vorspannung“ [182, 183] auf die Nachgiebigkeit der Zelle, die Experimente mit CytoD-Behandlung der Zellen zur Charakterisierung des Einflusses von Aktin auf die Zellmechanik der Phagozytose.

Power law-Exponent β

Wie in Abschnitt 5.3.2.4 erläutert, ist der *power law*-Exponent β ein Maß für die Viskoelastizität des Systems. Als System wurden mit holografischen optischen Fallen getestete Zellen verwendet. In der Interpretation des aus den Messdaten bestimmten Systemparameters β wird davon ausgegangen, dass die Systemantwort bezüglich β von der Zellantwort dominiert ist. Ob es möglich ist, mittels Entfaltung oder angepasstem *fit*-Modell die Zellantwort von der - hauptsächlich durch den SLM beeinflussten (siehe Abschnitt 5.3.2.4) - Systemantwort zu trennen, wurde zum Zeitpunkt der hier präsentierten Arbeiten nicht untersucht. Über den aus den Messdaten bestimmten Systemparameter β lassen sich folgende Schlüsse ziehen.

Die in den Experimenten *Exp1-3* bei verschiedenen Laserleistungen ohne Inhibierung der Aktin-Polymerisierung bestimmten Exponenten stimmten im Rahmen ihrer Messunsicherheiten überein und wiesen keine Korrelation mit dem Verlauf der wirkenden optischen Kraft $F_{OT}(t)$ auf. β ist somit eine von der rücktreibenden Kraft F_{OT} unabhängige Größe. Die in den Experimenten bestimmten Exponenten betragen in den Fällen ohne Inhibierung der Aktin-Polymerisierung (CytoD = 0 μ M) im Mittel $\langle\beta\rangle = 0,25 \pm 0,02$, im Fall von Aktin Inhibierung durch mittlere CytoD-Konzentration (1 μ M) $\langle\beta_{1\mu M}\rangle = 0,26 \pm 0,03$ und im Fall starker Aktin Inhibierung (5 μ M) $\langle\beta_{5\mu M}\rangle = 0,40 \pm 0,06$ und lagen damit alle in den für Zellviskoelastizitäten typischen Größenordnungen [183, 222, 223].

Die Zunahme von β mit steigendem Grad der Inhibierung der Aktin-Polymerisation und der signifikant höhere Wert von $\langle\beta_{5\mu M}\rangle = 0,40 \pm 0,06$ im Vergleich zu den Kontrollexperimenten bei niedrigeren CytoD-Konzentrationen legt nahe, dass β nicht nur das reine Antwortverhalten des

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

SLMs, sondern auch tatsächlich Zelleigenschaften testet. Der Verlust der stabilisierenden Wirkung des kortikalen Aktins unter starkem CytoD-Einfluss sollte die Zellen messbar fluider werden lassen, wie beispielsweise in den Arbeiten von *Lenormand et al.* [230] gezeigt wird. Der höhere Wert von $\langle\beta_{5\mu\text{M}}\rangle$ entspricht somit dem erwarteten Verhalten. Aufgrund der in den Messungen bei CytoD = 5 μM nicht beobachteten Partikelauslenkung wird in diesen Fällen, wie oben diskutiert, von nicht stattfindender Phagozytose ausgegangen.

Im Fall niedriger CytoD-Konzentrationen (1 μM) konnte im Vergleich zum unbehandelten Fall (0 μM) kein signifikanter Unterschied der *power law*-Exponenten gemessen werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass bei 1 μM CytoD-Behandlung der Zellen das kortikale Aktin-Netzwerk noch nicht ausreichend gestört war, um messbare Unterschiede der zellulären Viskoelastizität hervorzurufen. Zur Bestätigung dieser Vermutung erscheint eine kleinschrittigere Durchführung der *blinking traps*-Experimente mit Störung der Aktin-Polymerisierung bei CytoD-Konzentrationen im Bereich zwischen 1 und 5 μM und vergleichbarer Stichprobengröße sinnvoll.

Eine temporäre Änderung der lokalen Zellviskoelastizität aufgrund von Aktinremodellierung (siehe Abschnitt 3.3.1) während der durch die Zelle induzierten Partikelauslenkung konnte mit den *blinking traps*-Experimenten nicht festgestellt werden, obwohl die gewählte zeitliche Auflösung in den für Aktin-Remodellierung erwarteten Größenordnungen lag (Aktin *turnover* \sim s, gemessen mit FRAP [173]). Eine mögliche Erklärung für zeitlich konstante Kurven von $\beta(t)$ kann dagegen in der auf die Größenordnung des Partikeldurchmessers (hier 2 μm) beschränkten räumlichen Auflösung der *blinking traps*-Experimente liegen. Durch Aktin-Dynamik hervorgerufene Änderungen in der Viskoelastizität finden möglicherweise innerhalb kleiner Volumina - die ungefähre Ausdehnung des Aktin-Kortex beträgt etwa 0,2 μm [231] - unterhalb der Kontaktfläche zwischen Partikel und Zellmembran und nicht notwendigerweise gleichzeitig entlang der gesamten Kontaktfläche statt. So ließen sich mit Hilfe von β zwar Aussagen über die Viskoelastizität der Zellregion der Partikelinternalisierung treffen, innerhalb kleinerer Maßstäbe variierende Änderungen der Aktin-Remodellierung ließen sich jedoch nicht mehr ausreichend diskriminieren. Ein experimenteller Ansatz, um diese Hypothese zu testen, besteht somit in der Verwendung von deutlich kleineren Partikeln.

Nachgiebigkeit j_0

Der Fitparameter j_0 in Gleichung (5.8) beschreibt die Nachgiebigkeit der Zelle und lässt sich als Maß für die inverse Steifigkeit der Zelle interpretieren. In den *blinking traps*-Experimenten ohne Störung der Aktin-Polymerisation (*Exp1-3*) konnte eine Abnahme von $j_0(t)$ mit fortschreitender Messdauer gemessen werden (Abbildung 5.17c, signifikant stark negative Korrelationskoeffizienten $R_{j_0,t}$ für *Exp1-3* in Tabelle 5.2). Dies deutet auf ein durch Aktin mediiertes *stress stiffening* der Zellregion der Partikelinternalisierung hin. Die Zeitskalen, in denen die Abnahme von $j_0(t)$ gemessen wurden, stimmten mit den von *Irmscher et al.* [17] quantifizierten Zeitskalen von $\Delta t \sim 100$ s überein, für die ein transients Anstieg für die Zellsteifigkeit der Rotation von phagozytierenden Zellen gemessen wurde.

Im Gegensatz zum *power law*-Exponenten β war ein inverser Zusammenhang zwischen j_0 und der im Experiment eingestellten Fallensteifigkeit κ erkennbar. Dies lässt sich biophysikalisch mit dem Modell von Zellen unter Vorspannung plausibel machen [182, 183]. Für die durchgeführten Experimente *Exp1-3* mit den Fallensteifigkeiten $\kappa_1 = 304 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$, $\kappa_2 = 124 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$, $\kappa_3 = 102 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$ lassen sich die wirkenden Vorspannungen σ abschätzen zu $\sigma \sim 10^1 - 10^2 \text{ Pa}$ (angenommen für den Fall eines zur Hälfte internalisierten, 2 μm großen Partikels mit entsprechender Kontaktfläche

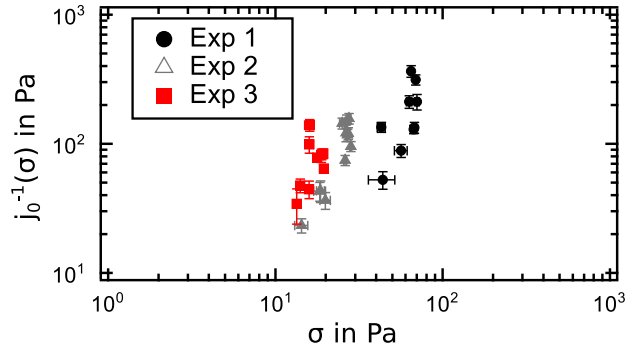


Abbildung 5.20.: Steifigkeit $1/j_0$ als Funktion der Vorspannung σ . Die Steifigkeiten $1/j_0$ wurde aus den in Abbildung 5.17c dargestellten Werten berechnet, die Vorspannungen σ aus den optischen Kräften F_{OT} (5.17b) abgeschätzt. Die berechneten Werte liegen in vergleichbaren Größenordnungen wie die Werte in [183] für Zellen oder in [182] für Aktin-Netzwerke *in vitro*.

$A = \pi r^2$). In Abbildung 5.20 sind die Steifigkeitswerte $1/j_0(\sigma)$ für *Exp1-3* als Funktion der Vorspannung σ aufgetragen. Ein Anstieg der Steifigkeit mit zunehmender Vorspannung ist deutlich erkennbar. Die Steifigkeitswerte $1/j_0$ stimmen mit entsprechenden $1/j_0$ -Werten von Zellen unter vergleichbaren Vorspannungen [183] sowie für von in Rheometern fixierten Aktin-Netzwerken [182] überein. In diesem Modell ist die Nachgiebigkeit j_0 - im Gegensatz zum Exponenten β - somit keine von der die Zelldehnung hervorrufenden Kraft (hier F_{OT}) unabhängige Größe. Eine Vergrößerung der Vorspannung in den Experimenten *Exp1-3* hat eine Vergrößerung der Steifigkeit $1/j_0$ zur Folge. Im Gegensatz zu den in [182, 183] zitierten Quellen wurde in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten allerdings nur über einen deutlich kleineren Bereich an Vorspannungen gemessen, so dass ein entsprechend erwarteter nichtlinearer Zusammenhang von $1/j_0$ und σ nicht erkennbar ist, genaue Details zu den jeweiligen experimentellen Arbeiten finden sich in den Originalpublikationen.

In den Messungen mit Störung der Aktin-Polymerisation durch CytoD wurden keine zeitlichen Änderungen von $j_0(t)$ gemessen (Abbildung 5.18c). Die Nachgiebigkeit $\langle j_{0,5\mu M} \rangle$ für die Messungen bei hoher CytoD-Konzentration war jedoch mit $\langle j_{0,5\mu M} \rangle = 30,9 \pm 11,9 \text{ mPa}^{-1}$ signifikant größer als die gemittelten Vergleichswerte $\langle j_{0,0\mu M} \rangle = 15,8 \pm 7,0 \text{ mPa}^{-1}$ und $\langle j_{0,1\mu M} \rangle = 13,6 \pm 5,9 \text{ mPa}^{-1}$, die gemessenen Zellen bei CytoD = $5 \mu\text{M}$ waren damit signifikant weicher. Eine Inhibierung der Aktin-Polymerisierung durch CytoD resultiert nach der Interpretation gemäß des Modells von Zellen unter Vorspannung in einer Reduzierung der generellen Vorspannung des Aktin-Netzwerks, so dass in den Messungen unter CytoD-Einfluss keine zeitlichen Änderungen der inversen Steifigkeit $j_0(t)$ gemessen wurde. Eine wahrscheinliche Erklärung dafür, dass $j_0(t)$ in den Messungen bei CytoD = $1 \mu\text{M}$ bereits zu Beginn niedrig zu sein scheint (siehe Abbildung 5.18c), kann die gewählte Art der Zeitreskalierung und die damit verbundene Mittelung sein. In einigen Messungen bei CytoD = $1 \mu\text{M}$ fand für längere Zeiten Partikelauslenkung statt, welche unterhalb des Schwellwertes der Zeitreskalierung (siehe Abschnitt 5.3.2.5) lag. Die Messungen bei CytoD = $1 \mu\text{M}$ wiesen daher die längste mittlere Ruhephase und die größten Standardabweichungen bei der Berechnung der Ruhephasen auf. Die niedrigen $j_0(t)$ -Werte deuten darauf hin, dass in diesen Fällen die Partikelinternalisierung bereits weiter fortgeschritten war, als durch die anhand der Zeitreskalierung festgelegte Zeitachse angenommen wird.

Blinking mit *Live Tracking*-Routine

Um längere Messungen bei konstant gehaltenen rücktreibenden optischen Kräften zu ermöglichen, wurde die Erweiterung der *blinking traps*-Experimente durch das in Abschnitt 5.3.3 beschriebene *live tracking* mit Probenrückkopplung entwickelt.

Die vorgestellte Methode der *blinking traps*-Experimente mit *live tracking* und rückgekoppelter Probenpositionierung war jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgereift. In den bisher durchgeführten *live tracking*-Experimenten fiel auf, dass die durch Lasermodulation induzierten Partikelrelaxationen deutlich geringer ausgeprägte Amplituden aufwiesen, als im Fall der Experimente mit ruhender *piezo stage*. Vor allem im zeitlichen Verlauf einer Messung waren einzelne *blinking events* kaum zu erkennen oder kaum von der überlagerten Partikelbewegung aufgrund der fortschreitenden Phagozytose zu unterscheiden. Um diese Beobachtungen und mögliche Ursachen besser zu verstehen und eine Vergleichbarkeit mit den Messungen ohne *live tracking* zu gewährleisten, ist eine Optimierung der Messmethode und eine Quantifizierung des Einfluss der einzelnen Messparameter, wie zum Beispiel die Größen d_{ref} , d_{piezo} , n , das Verhältnis von aktiven zu passiven *live tracking*-Phasen oder die Geschwindigkeit der Probenpositionierung, auf die Qualität der Messergebnisse notwendig.

Eine mögliche Ursache für die geringe Zahl an auswertbaren *blinking*-Intervallen ist die Probenbewegung und die dadurch stärker ausgeprägte relative Partikelbewegung im Verhältnis zur Zelle. Im Vergleich zu den Experimenten mit ruhendem Probenstisch kann das Partikel in den *live tracking* Experimente über eine größere Zelloberfläche bewegt werden und dadurch möglicherweise entlang einer größeren Fläche an die Zelle anbinden. Die, durch konstant gehaltenen Abstand zur optischen Falle, geringen optischen Rückstellkräfte könnten somit nicht mehr ausreichen, um deutlich ausgeprägte Partikelrelaxationen zu induzieren. Ebenso ließe sich das Ausbleiben signifikanter *blinking*-Relaxationen zu späteren Messzeitpunkten durch eine zu dieser Zeit bereits weit fortgeschrittene oder abgeschlossene Phagozytose erklären.

Es ist plausibel, dass sich die Kräftebilanz der auf ein an die Zellmembran gebundenes Partikel wirkenden Kräfte von der eines Phagosoms unterscheidet [232]. Vollständig ausgebildete Phagosomen sind unter anderem durch Mikrotubuli-assoziierte Motoren an intrazelluläre Strukturen gebunden [31, 166]. Hier kann ein dem *blinking* vergleichbarer, um einen größeren Kraftbereich erweiterter, experimenteller Ansatz möglicherweise dazu beitragen, den Übergang zwischen abgeschlossener Partikelinternalisierung hin zur Phagosombildung genauer zu quantifizieren.

Wie in 5.3.2.5 diskutiert, konnte in den Messungen ohne *live tracking* bisher kein systematischer Zusammenhang zwischen Anbindezeitpunkt und einsetzender Partikelauslenkung erkannt werden. Die in den bisherigen Experimenten durchgeführte manuelle Annäherung des Partikels an die Zelle mit dem automatischen Mikroskoptisch ließ keine präzise Kontrolle über die Größe der Kontaktfläche zwischen Partikel und Zellmembran nach erfolgreichem Anbinden zu. Hier ist eine Anwendung der Echtzeit-Detektion denkbar. So ließe sich, in einer Realisierung der Partikelannäherung per *piezo stage* mit Rückkopplungsschleife, die Annäherung kontrolliert stoppen, sobald eine wohldefinierte Partikelauslenkung durch Partikelkontakt mit der Zellmembran erfolgt ist. Durch Variation der Parameter ließen sich, zum Beispiel durch gleichzeitige Fluoreszenzmarkierung der Zellmembran, Rückschlüsse auf die Größe der Kontaktfläche in Abhängigkeit der Partikelauslenkung bei Zellkontakt ziehen. Die Kenntnis dieser „Integrationsfläche“ der an der Partikelbindung beteiligten Membranrezeptoren kann möglicherweise dazu beitragen, die Variation der Zeitintervalle zwischen Partikelanbindung und sichtbarem Einsetzen der Phagozytose besser zu verstehen.

5.4. Beobachtung der Phagozytose im Profil

Ein alternativer experimenteller Ansatz, um die einzelnen Phasen der Phagozytose zu beobachten und möglicherweise Rückschlüsse auf die Entwicklung der Kontaktfläche zwischen phagozytischer Zelle und Zielobjekt während der Membranhüllung zu ziehen, besteht in der Beobachtung von Zellen von der Seite. Dies lässt sich zum Beispiel mit Hilfe von Mikropipetten-Experimenten [181] oder, wie in diesem Abschnitt beschrieben, durch Aussäen von Zellen auf senkrecht zur Beobachtungsebene orientierte Flächen realisieren. Im Gegensatz zur Messung mit Mikropipetten erfordert der hier diskutierte Ansatz keine aufwändige Versuchsanordnung und ermöglicht den zusätzlichen Einsatz optischer Pinzetten zur Partikelpositionierung und Kraftmessung.

5.4.1. Experimentelle Durchführung

Eine Skizze zur Probenpräparation zur Beobachtung der Zellen im Profil zeigt Abbildung 5.21. Autoklavierte, quadratische Deckgläser der Stärke #1 ($18 \times 18 \text{ mm}^2$) wurden in vier Teile zerschnitten. Die Bruchstücke wurden in *12-well plates* gegeben und entsprechend Abschnitt 5.1.1 mit einer Zellkulturlösung mit einer hohen Zellkonzentration (typischerweise 10^5 Zellen/ml) befüllt und inkubiert. Ein Teil der Zellen setzte sich somit an den Kanten der Bruchstücke

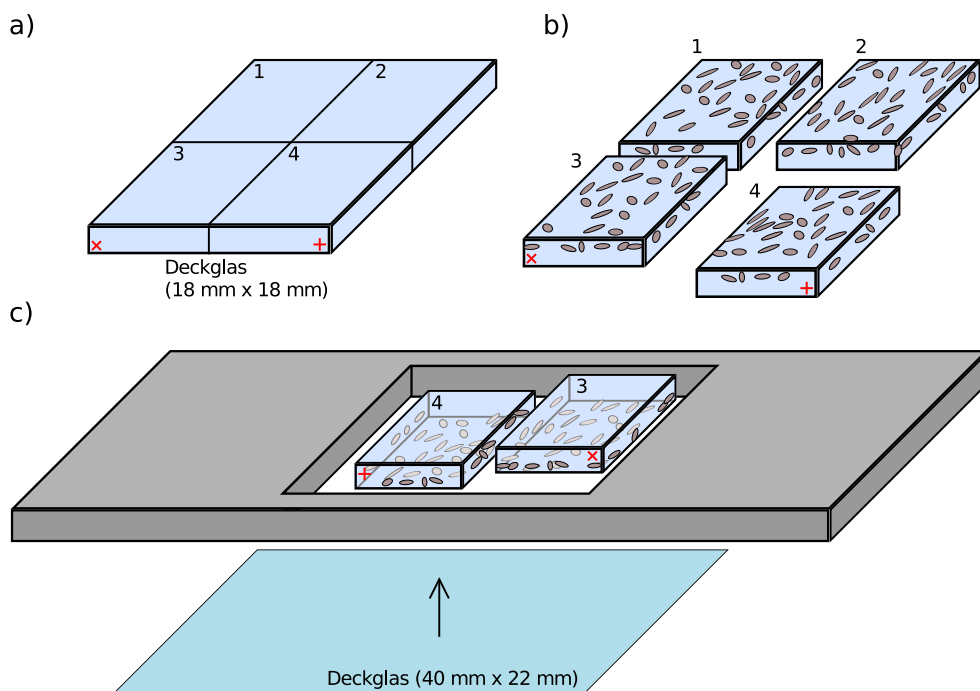


Abbildung 5.21.: Skizze zur Probenpräparation zur Beobachtung der Zellen im Profil. (a) Quadratische Deckgläser der Stärke #1 ($18 \times 18 \text{ mm}^2$) werden in vier Teile zerschnitten. (b) Auf den Deckglasstücken werden Zellen in einer hohen Konzentration ausgesät. Ein Teil der Zellen setzt sich somit auch an den Kanten der Bruchstücke ab und kann dort anhaften. (c) Als Probenhalter dienen geeignete Aluminiumhalter, die mit durch Vakuumfett (nicht gezeigt) versiegelten Deckgläsern der Stärke #1 ($40 \times 22 \text{ mm}^2$) verschlossen werden. Bis zu zwei Bruchstücke (hier 3 und 4) werden in den Probenhaltern positioniert, so dass die mit Zellen bewachsenen Oberflächen in Kontakt mit der Oberseite des als Boden dienenden Deckglases liegen (rote Kreuze zeigen die Orientierung der Bruchstücke an). So lassen sich die am Rand der Bruchstücke befindlichen Zellen in Deckglasnähe beobachten, ohne tief in die Probe fokussieren zu müssen.

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

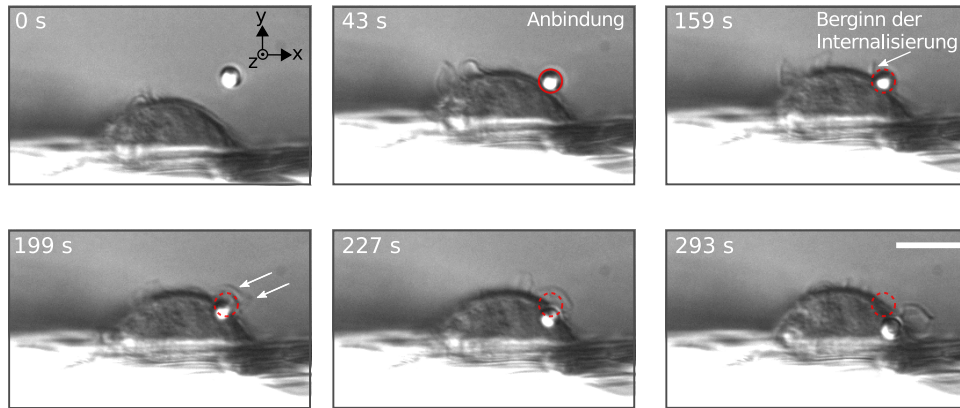


Abbildung 5.22.: DIC-Zeitserie eines Phagozytose-Experiments mit Beobachtung im Zellprofil. Ein mit IgG oberflächenfunktionalisiertes $2\ \mu\text{m}$ Partikel wurde mit der in Kapitel 4 beschriebenen optischen Falle (Orientierung des Laserstrahls in z -Richtung) gefangen und zum Zeitpunkt $t = 43\ \text{s}$ an eine *J-774A.1* Zelle am Rand eines Deckglasbruchstücks geklebt. Nach einer Ruhephase von etwa $116\ \text{s}$ bildeten sich nahe der Kontaktfläche Membranruffles (weiße Pfeile) heraus und das Partikel bewegte sich entlang der xy -Ebene in Richtung Deckglaskante ($t = 159 - 293\ \text{s}$). Aufgrund der Zellform erfolgte kein eindeutig sichtbarer Partikeltransport, weil sich das Partikel schon sehr nah am Zellkern befand. Die abgebildete Zelle befand sich am Rand eines Deckglasbruchstücks in einer Höhe von $20\ \mu\text{m}$ oberhalb der Probenunterseite, die Überbelichtung des unteren Bildrandes resultierte aus der Lichtstreuung an der Glaskante, so dass eine deutliche Abbildung der Unterseite der Zelle nicht möglich war, *scale bar* $10\ \mu\text{m}$.

ab und konnte dort anhaften. Als Probenhalter wurden für Kalibrationsmessungen der in Abschnitt 5.5 beschriebenen magnetischen Pinzette entwickelte Aluminiumhalter verwendet, als Probenboden und -deckel dienten mit Vakuumfett versiegelte $40 \times 22\ \text{mm}^2$ große Deckgläser (Stärke #1, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön). Die Probenhalter boten somit ausreichend Platz für bis zu zwei der mit Zellen bedeckten Bruchstücke. Weil die Zellen aufgrund der Probenpräparation überwiegend am oberen Rand der Bruchstückkanten anhafteten, wurden die Bruchstücke gedreht auf den Deckglasboden positioniert. So ließen sich die am Rand befindlichen Zellen in Deckglasnähe beobachten, ohne tief in die Probe fokussieren zu müssen. Unter diesen Bedingungen war optisches Fangen von $2\ \mu\text{m}$ PS-IgG Partikeln in der Nähe der Abbruchkanten möglich. Die Annäherung und das Anbinden der gefangenen Partikel an auf der Deckglasseite befindliche Zellen setzte jedoch eine möglichst glatte Kante voraus. Die Streuung des Laserstrahls an Glaskanten, welche sich in Ausbreitungsrichtung vor dem Fokus befanden, störte das Fangprofil sonst zu stark, so dass gefangene Partikel in diesen Fällen der Falle entwichen. Der gleiche Effekt trat auf, wenn sich unterhalb der Zelle im Laserstrahl bereits ausgedehnte Zellcluster befanden, welche weiter in die Probe herausragten als die Zielzelle. Zellen in geringem Abstand vom Boden der Probe erwiesen sich somit als am besten geeignet für Anbindeexperimente, da Streueffekte aufgrund von Glaskanten, welche in Strahlausbreitungsrichtung hinter der Fangenebene lagen, keine Auswirkungen auf die optische Falle zeigten. Der Einfluss der Deckglaskante auf die Fallensteifigkeit wurde in den hier diskutierten Experimenten nicht quantifiziert, weil die optische Falle als reines Positionierwerkzeug diente und auf präzise Kraftmessungen verzichtet wurde.

Aufgrund von Streueffekten des Beobachtungslichts an den Bruchstückkanten war die Bildgebung, insbesondere im DIC-Aufnahmemodus, stark beeinträchtigt. Die Ausrichtung und Beschaffenheit des jeweiligen beobachteten Kantenabschnitts beeinflussten die Kontrastgebung des DIC-Bildes, wobei sich die Ausrichtung der Abbruchkante in Richtung der DIC-Scherachse als am wenigsten störend erwies.

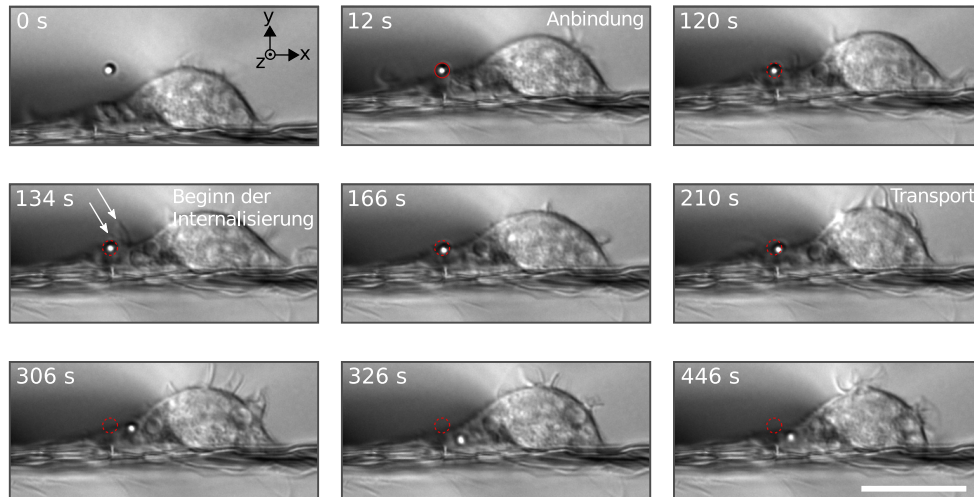


Abbildung 5.23.: DIC-Zeitreihe eines Phagozytose-Experiments mit Transportphase unter Beobachtung im Profil mit deutlichem Partikeltransport. Das Experiment erfolgte, wie in 5.4 beschrieben. Die abgebildete Zelle befand sich am Rand eines Deckglasbruchstücks in einer Höhe von $20\ \mu\text{m}$ oberhalb der Probenunterseite, die Bildartefakte (dunkle Bereiche in der linken Bildhälfte) resultierten aus der Inhomogenität der Abbruchkante. Die Partikelanbindung erfolgte zum Zeitpunkt $t = 12\ \text{s}$. Nach einer Ruhephase von etwa $122\ \text{s}$ bildeten sich nahe der Kontaktfläche Membranruffles (weiße Pfeile) heraus und das Partikel bewegte sich überwiegend entlang der Zellmembran in x -Richtung ($t = 134 - 306\ \text{s}$). Danach erfolgte die Partikelbewegung entlang der xy -Ebene ohne Änderung der z -Position und gleichzeitig konstant bleibendem Partikelkontrast ($t = 306 - 446\ \text{s}$), scale bar $20\ \mu\text{m}$.

5.4.2. Ergebnisse und Diskussion

Die größte experimentelle Herausforderung der Messreihe zur Beobachtung der Zellen während der Phagozytose im Profil bestand im Auffinden geeigneter Zellen und gleichzeitig mit der optischen Falle zugänglicher Positionen. Die Zellen waren aufgrund der oben beschriebenen Aussäsmethode gleichmäßig über den gesamten Randbereich der Deckgläser verteilt und wiesen ihre typische Morphologie auf. Die Orientierung der Zellen hatte also keinen Einfluss auf die Zellmorphologie. Aufgrund der stark variierenden Oberflächenbeschaffenheit der Deckglaskanten und der damit verbundenen Streueffekte waren in vielen Fällen nicht die kompletten Zellausmaße ersichtlich und somit nicht die gesamte Zelloberfläche mit der optischen Pinzette zugänglich, wie an der in Abbildung 5.22 gezeigten Messung deutlich wird. Der ausgedehnte den Nukleus enthaltende zentrale Bereich der Zelle zeichnete sich in der dargestellten Zelle deutlich von der Deckglaskante ab, die dünneren Ausläufer der Zelle hingegen waren aufgrund der starken Lichtstreuung nicht zu erkennen. Die Partikelanbindung in Abbildung 5.22 erfolgte nicht am Rand der Zelle, wie in den in Abschnitt 5.3 diskutierten Experimenten, sondern bereits in Kernnähe. Ein möglicher Partikeltransport zum Nukleus war in diesen Fällen nicht eindeutig zu identifizieren, weil der Partikelabstand zum Nukleus sich nicht stark änderte. Trotz dieser Einschränkungen war die Beobachtung der Partikelbewegung und die Ausbildung von Filopodien und Membranruffles entlang der Kontaktfläche (weiße Pfeile in Abbildung 5.22) mit gutem Kontrast möglich. Im Falle einer glatten Abbruchkante waren die gesamten Zellprofile beobachtbar, wie anhand der in Abbildung 5.23 gezeigten Messung dargestellt ist. Hier erfolgte die Partikelanbindung in einem Abstand von $20\ \mu\text{m}$ vom Nukleusmittelpunkt entfernt, so dass die in Folge der Phagozytose einsetzende Partikelauslenkung aus der optischen Falle ($t = 134 - 306\ \text{s}$ in Abbildung 5.23) deutlich sichtbar war.

Im Gegensatz zur Beobachtung von oben waren bei der Profilbeobachtung Membranruffling und

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

die Bildung von Filopodien entlang der Zelloberfläche deutlich zu erkennen, welche in vielen der beobachteten Fällen mit der Partikelinternalisierung einhergingen (weiße Pfeile in den Abbildungen 5.22 und 5.23). In den beiden gezeigten Fällen setzte die Internalisierung nicht instantan, sondern nach einer Ruhephase von etwa 120 s nach Partikelanbindung ein. Wie im Fall der *blinking traps*-Experimente wurde in Experimenten auf einen Nachweis der Partikelinternalisierung verzichtet, weil der Fokus in erster Linie auf dem Test der Methode lag. Der in Abbildung 5.23 während der Partikelbewegung innerhalb der xy -Ebene ($t = 306 - 446$ s) gleichbleibende Partikelkontrast deutet allerdings auf eine Bewegung ohne z -Komponente hin, und damit auf Phagosomtransport im Zellinneren.

Eine Zunahme der Kontaktfläche zwischen Partikel und Zellmembran entsprechend des *active zipper* Modells wurde in den experimentell bestimmten DIC-Zeitserien mit Seitenbeobachtung in der bisherigen Realisierung nicht beobachtet. Aufgrund der erschwerten Bildgebung im DIC-Kanal war eine Abbildung der Zellmembran und eine Quantifizierung der zeitlichen Entwicklung der Kontaktfläche in Partikelnähe nicht möglich. Die Wahl deutlich größerer Partikel kann hier möglicherweise bereits eine Verbesserung der Bildgebung erzielen. Zur genauen Quantifizierung ist eine Erweiterung der hier präsentierten Seitenbeobachtungsexperimente mit zusätzlicher fluoreszenter Färbung von Zellmembran oder Aktinkortex und gleichzeitiger Konfokalmikroskopie ein vielversprechender Ansatz.

5.5. Messung des Aktin-Einflusses auf den Phagosomtransport

Nach erfolgreicher Partikelinternalisierung wird das vollständig ausgebildete Phagosom mit Hilfe von assoziierten Motorproteinen entlang des Mikrotubuli-Netzwerks in Richtung Zellkern transportiert und erfährt dabei eine schrittweise Fusionierung mit Endosomen und Lysosomen [160]. Zeitgleich mit dieser Arbeit wurde von Steve Keller in der Arbeitsgruppe eine Doktorarbeit mit dem Schwerpunkt der Charakterisierung des Phagosomtransports nach erfolgreicher Partikelinternalisierung durchgeführt. Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeiten ist das Auffinden einer starken Abhängigkeit des Phagosomtransport von der Größe des zu transportierenden Partikels. Der Transport von großen Phagosomen ($3\ \mu\text{m}$) verläuft gerichtet, effizient und stark persistent von der Zellperipherie (+ Ende der Mikrotubuli) in Richtung Zellzentrum (- Ende der Mikrotubuli), kleine Phagosomen ($1\ \mu\text{m}$) hingegen weisen neben kurzen gerichteten Transportphasen ein charakteristisches bidirektionales Transportverhalten auf. Zur Klärung der Ursachen der Richtungsabhängigkeit wurden unter anderem der Einfluss molekularer Motoren auf den Transport entlang der Mikrotubuli sowie deren räumliche Verteilung entlang der Phagosomoberfläche untersucht. Ergänzend dazu dienten die im folgenden Abschnitt diskutierten Experimente der zusätzlichen Charakterisierung der Rolle von Aktin während des Phagosomtransports. Die Ergebnisse wurden in einer gemeinsamen Veröffentlichung publiziert [121].

5.5.1. Experimenteller Aufbau

Die in dieser Arbeit verwendete magnetische Pinzette (*magnetic tweezers*, MT, Abbildung 2.5) wurde im Rahmen einer Master-Arbeit aufgebaut und für die Messung an biologischen Proben optimiert. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Komponenten findet sich in Quelle

[119]. Wesentlicher Bestandteil zur Erzeugung des magnetischen Feldes war ein angespitzter Metallstab (Vakuumschmelze GmbH, Hanau), der mit einer Zylinderspule (Wicklungszahl 1420) aus Kupferdraht ummantelt war. Der Spulenstrom wurde mit einem Strom-Spannungs-Generator (Elektro-Automatik, Viersen) gesteuert. Mit Hilfe eines in der Arbeitsgruppe entwickelten Positioniersystems konnte die magnetische Spitze in die zu vermessende Zellprobe hinabgesenkt und mikrometergenau in allen drei Raumrichtungen positioniert werden. Für Langzeitmessungen an lebendigen Zellen bei 37 °C Umgebungstemperatur wurde ein im Rahmen einer Masterarbeit für das Mikroskop maßgefertigter, beheizbarer Probenhalter in Kombination mit einer Spritzenpumpe (*LA-30*, Landgraf Laborsysteme HLL, Langenhagen) verwendet. Die Spritzenpumpe kompensierte die durch Probenheizung und offene Probengeometrie beschleunigte Evaporation des Probenmediums durch kontinuierliches Nachfüllen von deionisiertem sterilisiertem Wasser und verhinderte somit das Austrocknen der Probe. Zusätzlich wurde der Bereich um die Probe und magnetische Spitze mit einer in der Arbeitsgruppe entwickelten Heizbox aus Acrylglas umschlossen und das Mikroskopobjektiv mit einer Objektivheizung beheizt, um einen starken thermischen Gradienten an der Kontaktfläche zwischen Probe und Objektiv zu vermeiden. Die Experimente zur Charakterisierung des Aktin-Einflusses auf den Phagosomtransport wurden an einem invertierten Mikroskop (*Nikon Eclipse Ti-U*, Nikon, Düsseldorf) unter Verwendung eines Öl-Immersionsobjektivs (*CFI Plan Apochromat Lambda 60x Oil*, N.A.= 1,40, *Nikon Lambda S series*) mit 60× Vergrößerung durchgeführt. Die verwendete CMOS Kamera (*Orca-flash 4.0 v2*, Hamamatsu, Herrsching am Ammersee) besaß einen *pixelpitch* von 6,5 µm und eine maximale Auflösung von 2048 × 2048 Pixel².

5.5.2. Experimentelle Durchführung

Als magnetische Partikel wurden superparamagnetische carboxylierte sphärische Partikel in den Größen 1 µm (*Dynabeads MyOne*, ThermoFisher) und 2,8 µm (*Dynabeads M-270*, ThermoFisher) verwendet. Superparamagnetische Partikel weisen im Gegensatz zu ferromagnetischen Partikeln nur bei angelegtem Magnetfeld ein magnetisches Moment auf und besitzen in der Regel eine große Sättigungsmagnetisierung [233]. Die magnetischen Partikel wurden, wie in Abschnitt 5.1.2 beschrieben, mit primären Antikörpern (IgG) oberflächenfunktionalisiert.

Zur Experiment-Vorbereitung wurden *J-774A.1*-Zellen in einer Konzentration von $3 - 4 \cdot 10^4$ Zellen/ml auf 40×22 mm² großen Deckgläsern (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön) ausgesät (siehe Abschnitt 5.1.1). 30 Minuten vor den Experimenten wurden die Zellproben gewaschen, das die magnetischen Partikel enthaltende *imaging medium* hinzugefügt und die Proben unter Kulturbedingungen im Inkubator gelagert. So wurde garantiert, dass zu Experimentbeginn der Großteil der Partikel bereits sedimentiert war und von den Zellen phagozytiert wurde (gemäß der in Abschnitt 5.2 diskutierten Experimente liegt die Phagozytose-Effizienz der *J-774A.1*-Zellen nach 30 min Inkubationszeit bei etwa 50 %). Nach einem Waschschrift wurden die Proben mittels Vakuumfett von unten in die speziell für Zelleexperimente optimierte Probenhalterung eingeklebt und die Probenkammer mit dem Probenmedium befüllt. Dieses bestand in den Experimenten zur Messung des Phagosomtransports aus einer *Cytochalasin D* (CytoD) Lösung in den Konzentrationen 0, 1 und 2 µM in *imaging medium*.

In Abbildung 5.24 sind das Prinzip der Messreihe (Abb. 5.24a) sowie eine typische Messung (Abb. 5.24b-e) dargestellt. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 15 Minuten unter CytoD-Einfluss wurden in den Zellen am Nukleus befindliche magnetische Partikel lokalisiert und die magnetische Spitze in einem Abstand von 20 - 30 µm zum Partikel positioniert. Aufgrund der nicht rotierba-

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

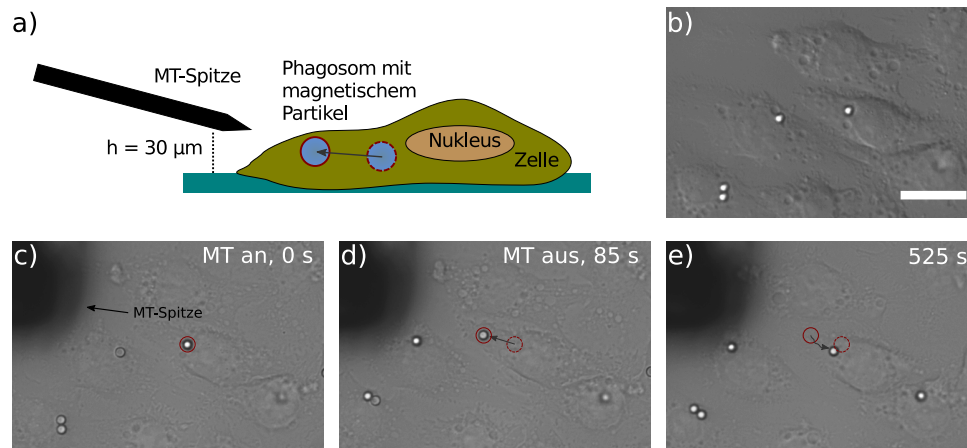


Abbildung 5.24.: Design der *magnetic tweezers* Experimente zur Phagosomauslenkung und Messung des Phagosomtransports. (a) Prinzipskizze des Experiments (nicht maßstabsgetreu). Ein bereits zum Zellkern der Makrophage transportiertes Phagosom, welches ein magnetisches Partikel enthält, wird durch das von der Spitze der *magnetic tweezers* (MT) erzeugte Magnetfeld aus seiner perinuklearen Position in Richtung Zellperipherie gezogen. (b) DIC-Aufnahme von *J-774A.1* Makrophagen mit internalisierten $2,8 \mu\text{m}$ magnetischen *Dynabeads M-270* Partikeln vor Beginn einer Messung, *scale bar* $20 \mu\text{m}$. (c-e) Zeitserie eines typischen Experiments der Phagosomauslenkung und anschließenden Messung des Phagosomtransports anhand der in (b) gezeigten Zelle. Der Schattenwurf am oberen linken Bildrand zeigt die Position der magnetischen Spitze oberhalb der Zellebene an und resultiert aus der diaskopischen Mikroskopbeleuchtung. (c) Zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ s}$ wurde die magnetische Falle eingeschaltet. Das am Kern befindliche, das magnetische Partikel enthaltende Phagosom erfuhr somit eine magnetische Kraft in Richtung MT-Spitze, welche es bis zum Zeitpunkt des Ausschaltens (d) der magnetischen Falle zum Zeitpunkt $t = 85 \text{ s}$ zur Zellperipherie auslenkte. (e) Nach Ausschalten der magnetischen Falle wurde die Partikelbewegung aufgenommen. In diesem Fall wurde das Phagosom zurück zum Kern transportiert und erreichte diesen zur Zeit $t = 525 \text{ s}$.

ren Probe und der Geometrie des experimentellen Aufbaus kamen für Messungen nur Zellen in Frage, welche Partikel an der der magnetischen Spitze zugewandten Seite des Nukleus enthielten und gleichzeitig eine ungefähre Ausrichtung in Richtung Spitze besaßen. Zellform und Viabilität wurden durch DIC-Aufnahmen vor (Abbildung 5.24b) und nach der Messung kontrolliert. Durch Anlegen des Magnetfeldes (Stromstärke $0,1 \text{ A}$, Spulenspannung $0,7 \text{ V}$) wurden die Partikel von der perinuklearen Region in Richtung Zellperipherie ausgelenkt (Abbildung 5.24c). Nach Ausschalten des Magnetfeldes wurde die Partikelbewegung für mindestens 300 s aufgenommen, 5.24d-e). Die Messung wurde gestoppt, wenn der Partikeltransport zum Nukleus nach Ermessen des Experimentators beendet war. Für die Messungen mit $2,8 \mu\text{m}$ großen Partikeln wurden die Partikelauslenkung und die konsekutive Partikelbewegung nach Ausschalten der magnetischen Pinzette in jeweils 2 separaten Videos gespeichert. Für die Messungen mit $1 \mu\text{m}$ großen Partikeln wurden Auslenkung und Transport der Partikel zusammen in einer Videoaufnahme gespeichert. Weil für die Analyse der Partikeltrajektorien nur der Teil der Partikelbewegungen nach Ausschalten der magnetischen Pinzette verwendet wurde, sind beide Arten der Videoaufnahme gleichwertig. Für die Messungen mit $2,8 \mu\text{m}$ Partikeln wurde für die zur Auswertung verwendeten Aufnahmen eine Bildrate von $0,1 \text{ fps}$, für die Messungen mit $1 \mu\text{m}$ Partikeln eine Bildrate von 1 fps verwendet.

5.5.3. Auswertung

Die Partikelbewegungen in den Videos wurden mit dem in Abschnitt 5.1.3 beschriebenen *tracking*-Algorithmus bestimmt. Zusätzlich zur Partikelposition wurde anhand der Hellfeld-Videoaufnahmen

die Position des Zellkerns als Funktion der Zeit durch manuelle Auswahl des Nukleusmittelpunktes alle 60 s und lineare Interpolation zwischen den einzelnen gewählten Punkten abgeschätzt. Der Abstand $d(t)$ zwischen Phagosom und Nukleus als Funktion der Zeit ergab sich somit pro Bild aus der Differenz von Partikel- und Nukleusposition. In Abbildung 5.25 ist die für die in Abbildung 5.24 dargestellte Messung berechnete Trajektorie $d(t)$ dargestellt.

Die Auswertung der Trajektorien erfolgte in *MatLab*. Die Auswertintervalle zur Charakterisierung des Phagosomtransports wurden für jede Trajektorie individuell festgelegt. Als Startpunkt des Auswertintervalls wurde der Punkt nach Ausschalten der magnetischen Pinzette gewählt, an dem $d(t)$ maximal war, als Endpunkt entsprechend der Punkt mit minimalen $d(t)$ (rot hinterlegter Bereich in Abbildung 5.25). Die Auswahl des Intervalls erfolgte per manueller Auswahl in der *MatLab*-Routine.

Anhand dieser Intervalle der Abstandskurven wurden die Phagosomenbewegungen wie folgt analysiert. Zur Bestimmung der verschiedenen Transportphasen und der instantanen Geschwindigkeit wurde das Intervall in 30 s Segmente unterteilt. Im Falle von innerhalb eines Segments zurückgelegten Distanzen mit $|\Delta d| \leq 400$ nm wurde das Segment als passive Transportphase (schwarze Bereiche in 5.25), für größere Distanzen mit $|\Delta d| > 400$ nm als aktive Transportphase gewertet (rote Bereiche in 5.25). Aktiver Transport konnte in Richtung Nukleus ($\Delta d > 0$) oder in Richtung Peripherie ($\Delta d < 0$) erfolgen.

Die Konstanz der Bewegung ρ_{akt} für ein aktives Segment wurde definiert als der Anteil der Partikelbewegung, in dem keine Richtungsänderung der Bewegung gemessen wurde. Die Konstanz der Bewegung ρ der gesamten Phagosombewegung berechnete sich aus der Mittellung über alle ρ_{akt} und ist somit ein Maß für den Grad der gerichteten Bewegung.

Die instantane Geschwindigkeit v_{inst} pro Segment wurde aus den *fits* der jeweiligen Segmentsteigungen und Mittellung über alle aktiven Segmente pro Trajektorie berechnet. Der Quotient aus der Summe der innerhalb der aktiven Segmente zurückgelegten Distanzen und der Summe der entsprechenden Zeiten wurde als effektive Geschwindigkeit v_{eff} interpretiert. Signifikanztests der berechneten Mittelwerte wurden mittels des Hypothesentests *Student's t-test* [225] für kleine Stichproben überprüft, der Signifikanzwert betrug $P = 0,05$.

5.5.4. Ergebnisse

Die Anzahl ausgewerteter Trajektorien betrug im Fall der untersuchten kleinen Partikel (1 μm , *Dynabeads MyOne*) 49, von denen 16 bei 0 μM , 17 bei 1 μM und 16 bei 2 μM CytoD-Konzentration gemessen wurden. Im Falle der großen Partikel (2,8 μm , *Dynabeads M-270*) wurden 83 Trajektorien ausgewertet (21 bei 0 μM , 40 bei 1 μM , 22 bei 2 μM CytoD-Konzentration). Tabelle 5.3 zeigt eine Übersicht der gemäß Abschnitt 5.5.3 berechneten Größen zur Charakterisierung des Phagosomtransports für die untersuchten Fälle. Eine grafische Übersicht der Ergebnisse zeigt Abbildung 5.26.

In allen Fällen unterschiedlich starker CytoD-Behandlung der Zellen ließen sich die 1 μm großen Partikel im Mittel um eine größere Distanz auslenken als die 2,8 μm großen Partikel. Nach Ausschalten der magnetischen Pinzette wurde für alle untersuchten Partikelgrößen in allen Fälle unterschiedlich starker CytoD-Behandlung der *J-774A.1*-Zellen aktiver Phagosomtransport von der Zellperipherie in Richtung Nukleus beobachtet. Die Transportgeschwindigkeiten der kleinen Phagosomen (1 μm) waren hierbei insgesamt höher als die Geschwindigkeiten für große Phagosomen

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

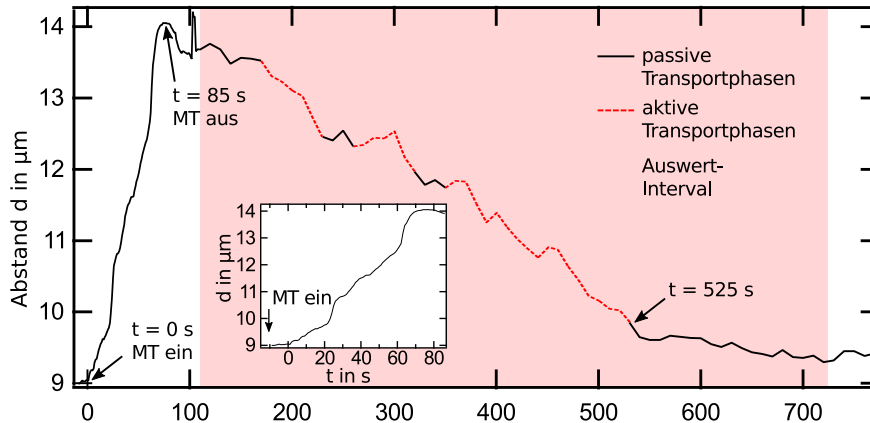


Abbildung 5.25.: Abstandskurve des in Abbildung 5.24 gezeigten *magnetic tweezers* Experiments zur Messung des Phagosomtransports. Dargestellt ist der Abstand $d(t)$ zwischen getrackter Partikelposition und gemittelter Nukleusposition als Funktion der Messzeit t . Die mit den Pfeilen markierten Zeitpunkte entsprechen den in Abbildung 5.24c-e dargestellten Zeiten. Der hinterlegte Bereich wurde in diesem Fall zur Berechnung der in Abschnitt 5.5.2 beschriebenen charakteristischen Parameter verwendet und entspricht dem Zeitintervall zwischen dem Ausschalten der magnetischen Pinzette und dem Erreichen des Nukleus. Die rot markierten Bereiche der Abstandskurve geben die 30s-Intervalle an, die in der Auswert-Routine als aktiver Transport gewertet wurden. Die Spitze in der Partikelbewegung bei $t = 103$ s resultierte aus inkorrekt bestimmten Partikelpositionen aufgrund einer manuellen Korrektur der Fokusebene während der Messung. Die Einfügung zeigt den vergrößerten Ausschnitt der ersten Sekunden der Partikelauslenkung nach Einschalten der magnetischen Falle.

(2,8 μm). Der Partikeltransport in Richtung Nukleus erfolgte im gleichen Zeitintervall entsprechend für die 1 μm großen Partikel über eine größere mittlere Distanz.

In allen durchgeführten Messungen fiel auf, dass die Partikelauslenkung in Folge des Einschaltens des Magnetfeldes zweistufig verlief. Am Anfang wurde das in der perinuklearen Region befindliche Phagosom nur langsam ausgelenkt (für die Trajektorie in Abbildung 5.25 entspricht dies den ersten 20s der Messung, wie in der Abbildung anhand der Einfügung gezeigt ist), danach verlief die Partikelauslenkung mit größerer Geschwindigkeit.

Die anhand der Partikel-Nukleus-Abstandskurven $d(t)$ berechneten prozentualen Segmentverteilungen der Transportphasen sind in Abbildung 5.26a dargestellt. Die prozentuale Segmentverteilung p_{Nuk} für aktiven Transport in Richtung Nukleus nahm unter CytoD-Einfluss für beide untersuchte Partikelgrößen 1 μm und 2,8 μm geringfügig ab. Signifikant messbar war diese Abnahme bei Zellen in einer 1 μM CytoD-Konzentration und Verwendung von 2,8 μm Partikeln. Die prozentuale Segmentverteilung p_{Per} für aktiven Transport in Richtung Zellperipherie änderte sich unter CytoD Einfluss für die beiden untersuchten Partikelgrößen 1 μm und 2,8 μm nicht signifikant. Der Anteil an passiven Phasen p_{pass} nahm unter CytoD Einfluss bei beiden Partikelgrößen zu, für die 1 μm Partikel von $p_{\text{pass}, 0 \mu\text{M}} = 15,5 \pm 1,0 \%$ auf $p_{\text{pass}, 1 \mu\text{M}} = 26,5 \pm 1,0 \%$ und $p_{\text{pass}, 2 \mu\text{M}} = 26,1 \pm 1,0 \%$, für die 2,8 μm Partikel von $p_{\text{pass}, 0 \mu\text{M}} = 21,1 \pm 1,0 \%$ auf $p_{\text{pass}, 1 \mu\text{M}} = 43,6 \pm 1,0 \%$ und $p_{\text{pass}, 2 \mu\text{M}} = 35,3 \pm 1,0 \%$. Im Mittel nahm die Pausenwahrscheinlichkeit des Phagosomtransports innerhalb der Zellen in einer CytoD-Umgebung damit um einen Faktor $1,8 \pm 0,3$ bezüglich der Kontrollgruppe zu. Signifikant messbar war dieser Anstieg an passiven Transportphasen im Fall der 2,8 μm Partikel.

Die über alle Trajektorien gemittelte Konstanz der Bewegung ρ der aktiven Partikelbewegungen (siehe Abbildung 5.26b) änderte sich unter CytoD-Einfluss nicht signifikant.

Die aus den Abstandskurven berechneten Geschwindigkeiten der Transportbewegung sind in den

Charakterisierung des Phagosomtransports			
Partikelgröße	1 μm		
CytoD-Konzentration	0 μM	1 μM	2 μM
Messungen	16	17	16
Mittlere Auslenkung [μm]	$10,3 \pm 3,6$	$6,4 \pm 2,4$	$4,8 \pm 2,5$
Mittlere Transportdistanz [μm]	$8,9 \pm 4,1$	$6,0 \pm 3,1$	$5,2 \pm 3,0$
P_{nuk} [%]	72 ± 25	63 ± 19	67 ± 25
P_{per} [%]	13 ± 13	11 ± 12	7 ± 9
P_{pause} [%]	15 ± 19	26 ± 18	26 ± 24
Konstanz der Bewegung [%]	77 ± 7	75 ± 5	75 ± 5
v_{inst} [$\mu\text{m min}^{-1}$]	$5,1 \pm 0,8$	$3,1 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,2$
v_{eff} [$\mu\text{m min}^{-1}$]	$4,3 \pm 0,9$	$2,4 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,3$
Partikelgröße	2,8 μm		
CytoD-Konzentration	0 μM	1 μM	2 μM
Messungen	21	40	22
Mittlere Auslenkung [μm]	$3,3 \pm 2,1$	$2,9 \pm 2,2$	$1,7 \pm 0,9$
Mittlere Transportdistanz [μm]	$4,7 \pm 1,7$	$3,1 \pm 1,4$	$2,8 \pm 1,2$
P_{nuk} [%]	74 ± 21	52 ± 26	63 ± 23
P_{per} [%]	5 ± 9	4 ± 7	6 ± 5
P_{pause} [%]	21 ± 19	44 ± 25	35 ± 24
Konstanz der Bewegung [%]	63 ± 8	66 ± 7	64 ± 8
v_{inst} [$\mu\text{m min}^{-1}$]	$2,5 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,3$
v_{eff} [$\mu\text{m min}^{-1}$]	$2,1 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$

Tabelle 5.3.: Charakterisierung des Phagosomtransports. Zur Definition der aufgeführten Größen siehe Abschnitt 5.5.3.

Abbildungen 5.26c-d dargestellt, die Fehlerbalken bezeichnen den Standardfehler (*standard error of the mean*, s.e.m.).

Die gemessenen instantanen Transportgeschwindigkeiten für Phagosomen von 1 μm großen magnetisierbaren Partikeln ($v_{\text{inst}, 1 \mu\text{m}} = 5,2 \pm 0,8 \mu\text{m min}^{-1}$ für den unbehandelten Fall) waren tendenziell größer als vergleichbare Transportgeschwindigkeiten von Phagosomen mit nicht magnetisierbaren Partikeln ($v_{\text{inst}, 1 \mu\text{m}} \approx 2,5 \mu\text{m min}^{-1}$, siehe [121]). Zur Kontrolle wurden entsprechende Messungen ohne die Verwendung einer magnetischen Pinzette durchgeführt, so dass ein Einfluss der Messapparatur auf die Geschwindigkeiten ausgeschlossen werden konnte.

In allen betrachteten Fällen war die effektive Geschwindigkeit v_{eff} niedriger als die instantane Geschwindigkeit v_{inst} . Alle Transportgeschwindigkeiten reduzierten sich unter CytoD Behandlung.

Die instantane Geschwindigkeit $v_{\text{inst}, 1 \mu\text{m}}$ für 1 μm große Partikel verringerte sich von $v_{\text{inst}, 0 \mu\text{M}} = 5,2 \pm 0,8 \mu\text{m min}^{-1}$ signifikant auf $v_{\text{inst}, 1 \mu\text{M}} = 3,1 \pm 0,6 \mu\text{m min}^{-1}$ in einer CytoD-Konzentration von 1 μM und auf $v_{\text{inst}, 2 \mu\text{M}} = 2,5 \pm 0,5 \mu\text{m min}^{-1}$ in einer CytoD-Konzentration von 2 μM .

Die effektive Geschwindigkeit $v_{\text{eff}, 1 \mu\text{m}}$ für 1 μm große Partikel verringerte sich von $v_{\text{eff}, 0 \mu\text{M}} = 4,3 \pm 0,9 \mu\text{m min}^{-1}$ auf $v_{\text{eff}, 1 \mu\text{M}} = 2,4 \pm 0,4 \mu\text{m min}^{-1}$ in einer CytoD-Konzentration von 1 μM und auf $v_{\text{eff}, 2 \mu\text{M}} = 2,4 \pm 0,3 \mu\text{m min}^{-1}$ in einer CytoD-Konzentration von 2 μM . Signifikant messbar (Signifikanzwert $P = 0,05$) war die Verringerung von $v_{\text{eff}, 1 \mu\text{m}}$ für die CytoD-Konzentration von 2 μM , im Fall der CytoD-Konzentration von 1 μM kann die Nullhypothese mit einer Wahrscheinlichkeit von 94,5% abgelehnt werden, was einem Signifikanzwert von $P = 0,055$ entspricht.

Die instantane Geschwindigkeit $v_{\text{inst}, 2,8 \mu\text{m}}$ für große Partikel mit Durchmesser 2,8 μm verringerte sich signifikant von $v_{\text{inst}, 0 \mu\text{M}} = 2,5 \pm 0,3 \mu\text{m min}^{-1}$ auf $v_{\text{inst}, 1 \mu\text{M}} = 1,7 \pm 0,2 \mu\text{m min}^{-1}$ und nicht signifikant auf $v_{\text{inst}, 2 \mu\text{M}} = 2,0 \pm 0,3 \mu\text{m min}^{-1}$.

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

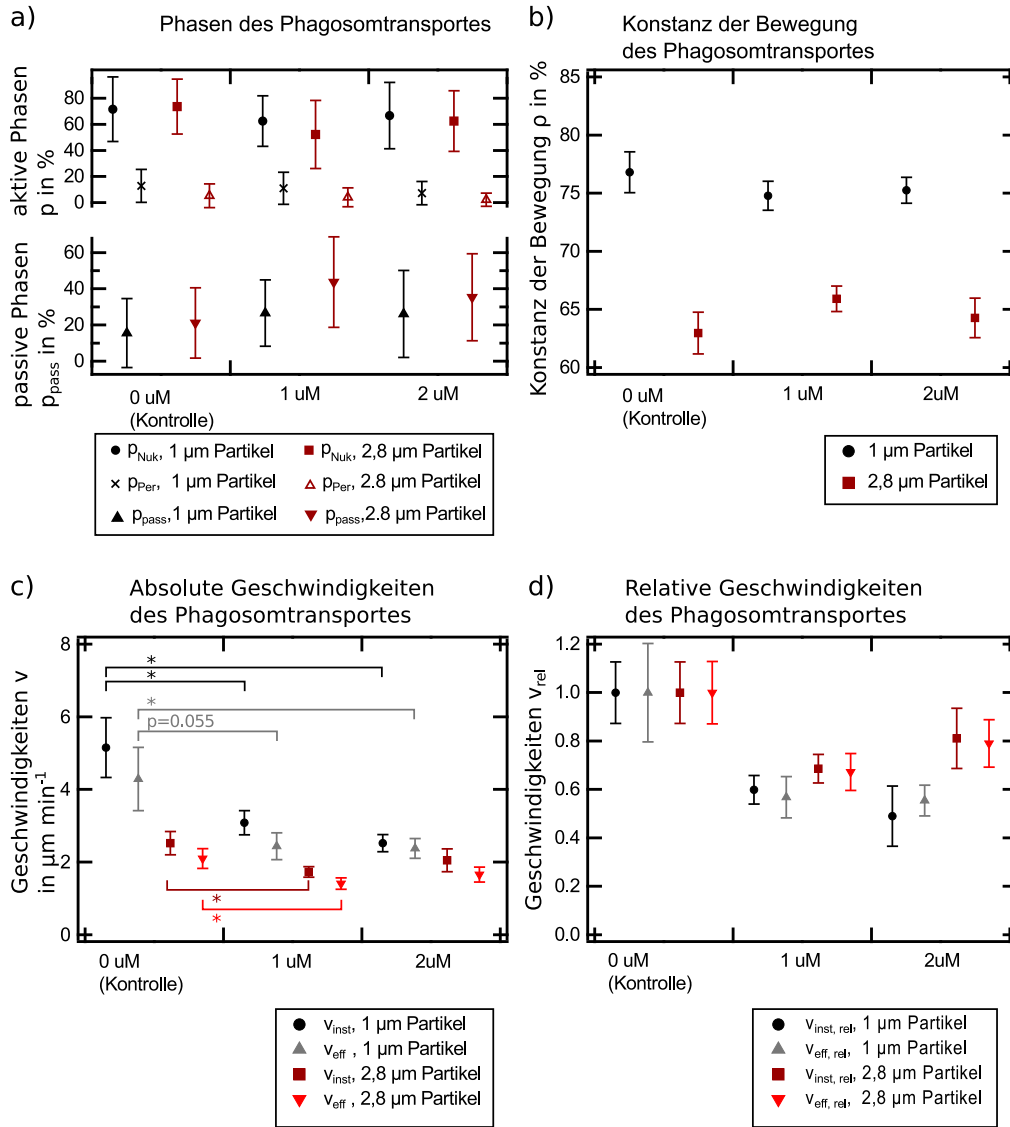


Abbildung 5.26.: Phagosomtransport unter CytoD-Einfluss. (a) Segmentverteilung der Transportphasen (nicht maßstabsgetreu). **(b)** Konstanz der Bewegung. **(c)** Absolute Geschwindigkeiten. **(d)** Relative Geschwindigkeiten.

Die effektive Geschwindigkeit $v_{\text{eff}, 2,8 \mu\text{m}}$ für Partikel mit 1 μm Durchmesser verringerte sich signifikant von $v_{\text{eff}, 0 \mu\text{M}} = 2,1 \pm 0,3 \mu\text{m min}^{-1}$ auf $v_{\text{eff}, 1 \mu\text{M}} = 1,2 \pm 0,4 \mu\text{m min}^{-1}$ und nicht signifikant auf $v_{\text{eff}, 2 \mu\text{M}} = 1,7 \pm 0,2 \mu\text{m min}^{-1}$. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 5.26d die relativen Änderungen der Geschwindigkeiten dargestellt.

5.5.5. Diskussion

Die untersuchten Partikelgrößen zeigten das charakteristische Transportverhalten, welches im Rahmen der Doktorarbeit von Steve Keller, Doktorand der AG Kress, charakterisiert wurde [121]. So wurde in den Trajektorien der kleinen Partikel mit einem Durchmesser von 1 μm im Gegensatz zu den 2,8 μm Partikeln sowohl retro- und anterograder Transport, als auch eine starke Positionsfluktuation bezüglich der z-Position beobachtet. Dies machte die automatisierte Positionsbestimmung per *tracking*-Algorithmus in vielen Fällen fehlerhaft oder undurchführbar, so dass die Position ma-

5.5. Messung des Aktin-Einflusses auf den Phagosomtransport

nuell bestimmt werden musste. Eine subpixelgenaue Partikeldetektion war daher nicht möglich. Aufgrund der verwendeten relativ niedrigen Kameraaufnahmeraten sowie der Auswertung und Mittelung anhand 30 s Intervallen fiel dies allerdings nicht ins Gewicht. Eine Charakterisierung des Transportverhaltens von Partikeln mittlerer Größe war in den vorliegenden Studien nicht möglich, da zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten magnetische Partikel in Zwischengrößen um 2 μm und mit einer vergleichbaren Magnetisierung nicht erwerbbar waren.

Die in [121] aus dem charakteristischen Transportverhalten unterschiedlich großer Phagosomen resultierende größenabhängige, mit der Partikelgröße zunehmende Persistenz der Bewegung konnte mit den vorliegenden Experimenten aufgrund des Experimentdesigns nicht bestätigt werden. Im vorliegenden Fall wurden zur Auswertung des Transportverhaltens und zur Berechnung der Konstanz der Bewegung ρ die manuell bestimmten Intervallbereiche zwischen den Punkten maximalen und minimalen Nukleusabstands verwendet (rot hinterlegter Bereich in Abbildung 5.25). Die Messzeiten waren nicht wie in *Keller et al.* [121] für alle Messungen identisch und somit nicht geeignet, das Langzeitverhalten der Phagosomen nach Erreichen des Kerns zu analysieren. Dieses Langzeitverhalten wurde in [121] explizit zur Berechnung der Persistenz berücksichtigt.

Die gemessenen instantanen Transportgeschwindigkeiten für Phagosomen von 1 μm großen magnetisierbaren Partikeln mit $v_{\text{inst}, 1\mu\text{m}} = 5,2 \pm 0,8 \mu\text{m min}^{-1}$ sind tendenziell größer als vergleichbare Transportgeschwindigkeiten von Phagosomen mit nicht magnetisierbaren Partikeln ($v_{\text{inst}, 1\mu\text{m}} \approx 2,5 \mu\text{m min}^{-1}$, siehe [121]). Bis zu diesem Zeitpunkt konnte der Unterschied in den gemessenen Geschwindigkeiten nicht erklärt werden. Eine mögliche Abhängigkeit des Phagosomtransports von der Materialabhängigkeit und/oder der Magnetisierbarkeit des internalisierten Partikels kann somit nicht ausgeschlossen werden. Zum Verständnis der Ursachen der Geschwindigkeitsunterschiede sind daher weitere systematische Studien notwendig.

Die in Tabelle 5.3 aufgeführten Kenngrößen der Transportgeschwindigkeiten und Pausenphasen des Phagosomtransports bei CytoD-Konzentrationen von 1 und 2 μM stimmen im Rahmen ihrer Standardabweichungen überein. Die durch CytoD in diesen Konzentrationen in *J-774A.1* Zellen hervorgerufenen Störungen auf die Aktin-Polymerisierung waren damit insgesamt nicht signifikant messbar voneinander verschieden und hatten dieselben Effekte. Die in Abschnitt 5.1.4 diskutierten Konformationsänderungen sowie die Messungen der Phagozytose-Effizienz (Abschnitt 5.2) bestätigen die geringen Unterschiede des Zellverhaltens in 1 μM und 2 μM CytoD-Umgebungen. Beide Konzentrationen werden daher als gleichwertige moderate Störung der Aktin-Polymerisierung interpretiert. Auf eine Anwendung von hohen CytoD-Konzentrationen (5, 10 μM) wurde verzichtet, um die Zellmorphologie nicht stark zu beeinflussen und ein Abrunden der Zellen (siehe Abbildung 5.4) zu vermeiden. In stark abgerundeten Zellen war die Partikelauslenkung über größere Distanzen aufgrund der geometrischen Limitierung nicht möglich. Die Folgen der Inhibierung der Aktin-Polymerisierung durch entsprechend moderate CytoD-Konzentrationen auf das phagosomale Transportverhalten lassen sich wie folgt interpretieren.

Im Falle von mit CytoD (1, 2 μM) behandelten Zellen erhöhte sich der Anteil an passiven Transportphasen (Pausen), im Vergleich zum unbehandelten Fall, im Mittel um einen Faktor $1,8 \pm 0,3$ (Abb. 5.26a).

Alle Transportgeschwindigkeiten des Phagosomtransports reduzierten sich unter CytoD Behandlung mit mittleren CytoD-Konzentrationen. Im Falle der kleinen 1 μm Partikel fand im Vergleich zu großen 2,8 μm Partikeln eine stärkere Geschwindigkeitsreduzierung von v_{inst} und v_{eff} statt. Für die kleinen Phagosomen (1 μm) reduzierte sich v_{inst} um $40 \pm 22\%$ in einer CytoD Umgebung von

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

1 μM und um $51 \pm 22\%$ in einer CytoD Umgebung von 2 μM , für die großen Phagosomen (2,8 μm) reduzierte sich v_{inst} hingegen um $31 \pm 19\%$ in einer CytoD Umgebung von 1 μM und um $19 \pm 18\%$ in einer CytoD Umgebung von 2 μM (siehe Abb. 5.26d).

Somit lässt sich folgern, dass das Aktin-Netzwerk einen von der Phagosomgröße abhängigen Einfluss auf das Transportverhalten hat. Dieser Einfluss ist auf kleine Phagosomen am größten.

Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten lässt sich aus den verschiedenen Funktionsweisen der am Phagosomtransport beteiligten Motorproteine ableiten, welche sich hauptsächlich den Familien der Mikrotubuli-assoziierten Dyneinen und Kinesinen sowie der Familie der Aktin-assoziierten Myosinen zuordnen lassen [160]. Dyneine sorgen hierbei für einen gerichteten *Cargo*-Transport in Richtung der minus-Enden der Mikrotubuli und können dabei im Gegensatz zu Kinesinen - welche hauptsächlich für gerichteten Transport in Richtung der plus-Enden der Mikrotubuli verantwortlich sind - entlang der Phagosommembran sogenannte Dynein-Cluster bilden [166]. Durch Kooperation der geclusterten Dynein-Motoren können starke kollektive Kräfte ~ 10 pN erzeugt werden [184]. Ein Einfluss der Phagosomgröße auf die Zahl der anbindenden Motoren und damit auf das Dynein-Clustering ist wahrscheinlich [234, 184], wurde bisher allerdings noch nicht experimentell bestätigt. So könnte ein aufgrund der kleineren Partikeloberfläche weniger stark ausgeprägtes Dynein-Clustering an 1 μm Phagosomen eine im Vergleich zu großen Phagosomen deutlich niedrigere Dynein-Aktivität zur Folge haben. Durch geringere Beteiligung von Dynein am Phagosomtransport könnten somit andere Effekte, wie zum Beispiel Aktin-basierte Motor-Aktivität durch Myosine oder eine stärkere Kopplung an den durch Myosin getriebenen retrograden Aktinfluss [193, 194, 195, 196], deutlicher in den Vordergrund treten und das Transportverhalten beeinflussen. Eine detaillierte Charakterisierung des Phagosomtransports sowie die Untersuchung des Einflusses von Dyneinen und Kinesinen auf das Transportverhalten sind Gegenstand der Publikation [121].

Die beobachtete zweistufige Auslenkung der Phagosomen in der perinuklearen Region in Folge der durch die magnetische Pinzette ausgeübten Zugkraft bietet Ansätze für weitere Untersuchungen. Eine mögliche Erklärung der beobachteten zwei Stufen ist das Lösen der Bindungen zwischen Phagosom und Mikrotubuli-Netzwerk. Eine langreichweitige Phagosomauslenkung kann erst nach vollständiger Lösung des Phagosoms von der assoziierten Netzwerk-Struktur erfolgen. Das Einsetzen der schnelleren Partikelauslenkung kann somit als Zeitpunkt der vollständigen Ablösung des Phagosoms interpretiert werden. Eine Analyse der während der ersten kurzreichweitigen Phagosomauslenkung wirkenden magnetischen Kräfte in Bezug auf die Partikelgröße ließe daher Rückschlüsse über die maximalen Bindungskräfte der Phagosom-Mikrotubuli-Bindung zu. Wie in Abschnitt 2.2 dargelegt, wurde in der durchgeführten Versuchsreihe auf eine Kalibrierung der magnetischen Falle verzichtet und der Zusammenhang zwischen Partikelauslenkung und wirkender Zugkraft im Rahmen dieser Arbeit somit bisher nicht weiter untersucht.

5.6. Zusammenfassung der Experimente und Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die in diesem Kapitel präsentierten Experimente und die sich darauf ergebenden Erkenntnisse kurz zusammengefasst. Abbildung 5.27 zeigt hierzu eine grafische Übersicht der Experimente und der wichtigsten Ergebnisse.

Mit dem Großteil der in diesem Kapitel präsentierten Experimenten wurde der Einfluss von Aktin auf verschiedene Phasen der $Fc\gamma$ -medierten Phagozytose untersucht. Konkret wurden hierzu die Entwicklung der zellulären Viskoelastizität und der Zellsteifigkeit während der individuellen Partikelinternalisierung (Abschnitt 5.3), der Phagosomtransport nach erfolgter Internalisierung (Abschnitt 5.5) sowie die globale Phagozytose-Effizienz (Abschnitt 5.2) bei verschiedenen Graden der Inhibierung der Aktin-Polymerisierung bestimmt. Die Inhibierung von Aktin erfolgte hierbei mit dem fungalen Toxin *Cytochalasin D* (CytoD). Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinie *J-774A.1* erwiesen sich CytoD-Konzentrationen von 1 und 2 μM als geeignet, um geringfügige Störungen der Aktin-Polymerisierung zu erzielen. Hohe CytoD-Konzentrationen (5 und 10 μM) riefen hingegen starke Änderungen der Zell-Morphologie hervor.

Messungen der Phagozytose-Effizienz

Die Phagozytose-Effizienz wurde mittels Nachweis erfolgreicher Partikelinternalisierung per sekundärer Antikörperfärbung für Inkubationszeiten von $t = 0, 15, 30$ und 60 min bestimmt (Abschnitt 5.2). Die Auswertung erfolgte hierbei an fixierten Zellproben. In allen untersuchten Fällen (CytoD-Konzentrationen 0, 1, 2, 5, 10 μM) konnten nichtverschwindende Anteile erfolgreich internalisierter 2 μm -Partikel detektiert werden. Die Wahrscheinlichkeit für erfolgreiche Partikelinternalisierung P sank mit zunehmender CytoD-Konzentration. So reduzierten sich die Aufnahmewahrscheinlichkeiten für Phagozytose unter CytoD-Einfluss nach 1 Stunde Inkubationszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe (0 μM) auf die in Abbildung 5.27 dargestellten Prozentwerte.

Messungen der Zellmechanik während der Partikelinternalisierung

Die Messungen zur Charakterisierung der lokalen Viskoelastizität und der Zellsteifigkeit während der fortschreitenden Membranhüllung und Partikelinternalisierung erfolgten mit den in Abschnitt 5.3 diskutierten *blinking traps* Experimenten. Die *blinking traps* Experimente basierten auf der Analyse der mit der Partikelauslenkung aufgrund fortschreitender Phagozytose überlagerten Partikelrelaxationen, welche durch temporäre Intensitätsmodulation der optischen Falle induziert wurden. Die Experimente wurden für verschiedene Fallensteifigkeiten ($\kappa_1 = 304 \pm 2 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$, $\kappa_2 = 124 \pm 1 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$, $\kappa_3 = 102 \pm 3 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$) und bei verschiedenen CytoD-Konzentrationen (0, 1, 5 μM) durchgeführt.

Im Falle von hoher CytoD-Konzentration (5 μM) wurde keine Partikelauslenkung beobachtet, was ein Anzeichen von nicht stattfindender Phagozytose ist (Phagozytose-Wahrscheinlichkeit für den Zeitpunkt der Experimente gemäß Abschnitt 5.2 bei 10 - 15 %). In den anderen Fällen niedriger CytoD-Konzentrationen (1 μM) und ohne CytoD (*Exp1-3* bei 0 μM), in denen während der Messungen Partikelauslenkungen aus der Falle beobachtet wurden, verliefen diese mit einer mittleren Geschwindigkeit von $\frac{\Delta d}{\Delta t} = 4,1 \pm 0,3 \text{ nm s}^{-1}$, unabhängig von der jeweils entgegenwirkenden optischen Kraft F_{OT} .

Die Auswertung der *blinking*-Relaxationen erfolgte mit einem *power law*-Ansatz. Der resultierende

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

power law-Exponent β wurde hierbei im Rahmen der experimentellen Limitierungen als Maß der Viskoelastizität des untersuchten Systems interpretiert, der Vorfaktor j_0 als Maß für die Nachgiebigkeit beziehungsweise für die inverse Steifigkeit des Systems. Als System wurden mit holografischen optischen Fallen getestete Zellen verwendet. Zellen unter starkem CytoD-Einfluss ($5\ \mu\text{M}$) wiesen mit $\langle\beta_{5\ \mu\text{M}}\rangle = 0,40 \pm 0,06$ ein signifikant stärker viskoses Verhalten auf als im Falle ohne Störung der Aktin-Polymerisation mit $\langle\beta_{0\ \mu\text{M}}\rangle = 0,25 \pm 0,02$ oder bei schwacher Störung durch CytoD mit $\langle\beta_{1\ \mu\text{M}}\rangle = 0,26 \pm 0,03$. Die Größe β war hierbei unabhängig von der optischen Kraft. Eine temporäre Änderung der lokalen Zellviskoelastizität $\beta(t)$ aufgrund von Aktinremodellierung oder anderen aktiven Prozessen während der Partikelinternalisierung konnte allerdings mit der aktuellen Realisierung der *blinking traps*-Experimente nicht festgestellt werden.

Die *blinking traps*-Experimente ohne Störung der Aktin-Polymerisation (*Exp1-3*) wiesen eine Abnahme der Nachgiebigkeit $j_0(t)$ mit fortschreitender Messdauer auf. Ebenfalls wurde ein inverser Zusammenhang zwischen der Nachgiebigkeit j_0 und der in den Experimenten verwendeten Fallensteifigkeit κ festgestellt. In den Messungen mit Störung der Aktin-Polymerisation durch CytoD wurde dagegen keine zeitliche Änderung von $j_0(t)$ gemessen. Hier war die Nachgiebigkeit für Zellen unter starkem CytoD-Einfluss ($5\ \mu\text{M}$) mit $\langle j_{0,5\ \mu\text{M}} \rangle = 30,9 \pm 11,9\ \text{mPa}^{-1}$ signifikant höher als für Zellen unter geringem CytoD-Einfluss ($1\ \mu\text{M}$) mit $\langle j_{0,1\ \mu\text{M}} \rangle = 13,6 \pm 5,9\ \text{mPa}^{-1}$.

Messungen des Phagosomtransports

Der Einfluss von Aktin auf den intrazellulären Phagosomtransport wurde mit Hilfe einer magnetischen Pinzette charakterisiert (Abschnitt 5.5). Bereits internalisierte und zum Nukleus transportierte superparamagnetische Partikel in den Größen 1 und $2,8\ \mu\text{m}$ wurden mittels magnetischer Pinzette zur Zellperipherie gezogen und das nachfolgende Transportverhalten der die Partikel enthaltenden Phagosomen analysiert. Die Experimente erfolgten bei geringen CytoD-Konzentrationen ($1 - 2\ \mu\text{M}$), um die Zellmorphologie nicht zu stark zu beeinflussen und genügend Zellvolumina zur Partikelauslenkung zur Verfügung zu haben.





Unter geringem CytoD Einfluss reduzierten sich die Transportgeschwindigkeiten, und der Anteil an passiven Transportphasen nahm im Mittel um einen Faktor $1,8 \pm 0,3$ bezüglich der Kontrollgruppe zu. Diese Einflüsse auf das Transportverhalten waren bei den kleinen Partikeln (Partikeldurchmesser $1\ \mu\text{m}$) am größten. Diese Ergebnisse belegen einen direkten Einfluss von Aktin Filamenten auf den Phagosomtransport und sind Teil der Veröffentlichung [121].

Aktin-Einfluss auf die untersuchten Phasen der Phagozytose


Die Rolle von Aktin während der $\text{Fc}\gamma$ -medierten Phagozytose von *J-774A.1*-Zellen wurde in den oben zusammengefassten Experimenten mit Hilfe der Inhibierung der Aktin-Polymerisation durch *Cytochalasin D* (CytoD) untersucht. Die in den Experimenten verwendeten CytoD-Konzentrationen von $1\ \mu\text{M}$ und $2\ \mu\text{M}$ wurden hierbei zu einer Erzeugung einer schwachen Störung der Aktin-Polymerisation, die Konzentrationen von $5\ \mu\text{M}$ und $10\ \mu\text{M}$ zur Erzeugung einer starken Störung

Abbildung 5.27. (nächste Seite): Übersicht der Experimente und Ergebnisse dieses Kapitels. Aufgrund der nicht signifikanten Unterschiede der berechneten Geschwindigkeiten v und Pausen-Phasen p_{pass} bei den gemessenen mittleren CytoD-Konzentrationen $1\ \mu\text{M}$ und $2\ \mu\text{M}$ in den Messungen zum Phagosomtransport sind in der Darstellung die über beide Konzentrationen gemittelten Werte gezeigt, die entsprechenden Einzel-Werte finden sich in Abschnitt 5.5.

Übersicht der Experimente und Ergebnisse

Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose	keine Inhibierung der Aktin-Polymerisierung Kontrolle (0 μM) 	Inhibierung der Aktin-Polymerisierung durch Cytochalasin D	
		mittlere Konzentration (1 μM , 2 μM) 	hohe Konzentration (5 μM , 10 μM) 
Phagozytose Effizienz (Abschnitt 5.2.) P = Aufnahme-wahrscheinlichkeit (1 Stunde Inkubation) 	$P_{0 \mu\text{M}} = 51 \pm 5\%$	$P_{1 \mu\text{M}} = 44 \pm 5\%$ $P_{2 \mu\text{M}} = 38 \pm 2\%$	$P_{5 \mu\text{M}} = 25 \pm 5\%$ $P_{10 \mu\text{M}} = 24 \pm 4\%$

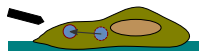

Mit steigender Inhibierung der Aktin-Polymerisation nimmt Phagozytosewahrscheinlichkeit P ab

Partikelinternalisierung (Abschnitt 5.3.) j_0 = Nachgiebigkeit β = power law Exponent 	$j_0(t)$ nimmt mit Messzeit ab β nicht zeitabhängig $\langle \beta \rangle = 0,25 \pm 0,03$	1 μM : keine Änderung von $j_0(t)$ $\langle j_0 \rangle = 13,6 \pm 5,9 \text{ mPa}^{-1}$ keine Änderung von $\beta(t)$ $\langle \beta \rangle = 0,26 \pm 0,03$	5 μM : keine Änderung von $j_0(t)$ $\langle j_0 \rangle = 30,9 \pm 11,9 \text{ mPa}^{-1}$ keine Änderung von $\beta(t)$ $\langle \beta \rangle = 0,40 \pm 0,06$
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Im ungestörten Fall nimmt $j_0(t)$ mit der Zeit ab, Zunahme der lokalen Zellsteifigkeit j_0^{-1}

β ist Maß für Viskoelastizität, mit steigender Inhibierung der Aktin-Polymerisation wird Zelle viskoser (β nimmt zu)

keine zeitliche Änderung von β während der Partikelinternalisierung messbar

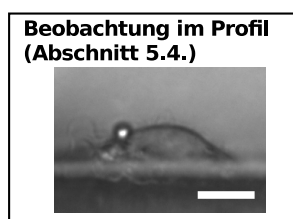
Phagosomtransport (Abschnitt 5.5.) p_{pass} = Anteil Pause-Phasen v_{inst} = instantante Geschwindigkeit v_{eff} = effektive Geschwindigkeit 	0 μM : $p_{\text{pass}, 1 \mu\text{m}} = 15,5 \pm 1\%$ $p_{\text{pass}, 2,8 \mu\text{m}} = 21,1 \pm 1\%$ $v_{\text{inst}, 1 \mu\text{m}} = 5,2 \pm 0,8 \mu\text{m min}^{-1}$ $v_{\text{inst}, 2,8 \mu\text{m}} = 2,5 \pm 0,3 \mu\text{m min}^{-1}$ $v_{\text{eff}, 1 \mu\text{m}} = 4,3 \pm 0,9 \mu\text{m min}^{-1}$ $v_{\text{eff}, 2,8 \mu\text{m}} = 2,1 \pm 0,3 \mu\text{m min}^{-1}$	1 μM , 2 μM (gemittelt): $p_{\text{pass}, 1 \mu\text{m}} = 26,3 \pm 3\%$ $p_{\text{pass}, 2,8 \mu\text{m}} = 40,1 \pm 8\%$ $v_{\text{inst}, 1 \mu\text{m}} = 2,8 \pm 0,4 \mu\text{m min}^{-1}$ $v_{\text{inst}, 2,8 \mu\text{m}} = 1,9 \pm 0,2 \mu\text{m min}^{-1}$ $v_{\text{eff}, 1 \mu\text{m}} = 2,4 \pm 0,4 \mu\text{m min}^{-1}$ $v_{\text{eff}, 2,8 \mu\text{m}} = 1,5 \pm 0,4 \mu\text{m min}^{-1}$	 (nicht durchgeführt)
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Mit steigender Inhibierung der Aktin-Polymerisation nimmt Anteil an Pausen um Faktor $1,8 \pm 0,3$ zu

Reduzierung der Transportgeschwindigkeiten bei Inhibierung der Aktin-Polymerisation

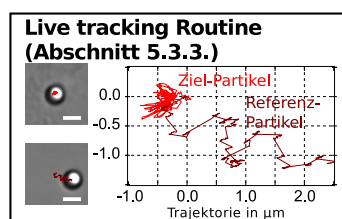
Aktin-Einfluss ist auf kleine Phagosomen am größten

Zusätzliche Experimente



Aussäen der Zellen auf Deckglaskanten ermöglicht Seitenbeobachtung der Phagozytose

Kombination mit optischen Pinzetten



Kontrolle der Partikelposition durch live tracking und Probenrückkopplung per piezo stage erfolgreich

5. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

verwendet. Die Experimente lassen die folgenden Schlüsse auf die Rolle von Aktin während der untersuchten Phasen der Phagozytose zu.

Die Wahrscheinlichkeiten für erfolgreiche Phagozytose reduzieren sich mit zunehmender Inhibierung der Aktin-Polymerisierung durch CytoD, wie die Phagozytose-Effizienz Messungen (Abschnitt 5.2) zeigten. Für eine möglichst effiziente Phagozytose ist also eine intakte Aktin-Struktur notwendig.

Die in den *blinking traps*-Experimenten bei ungestörtem Aktin-Netzwerk gemessene Zunahme der Zellsteifigkeit $j_0(t)^{-1}$ während der Partikelauslenkung deutet auf ein durch Aktin mediiertes *stress stiffening* der Zellregion der Partikelinternalisierung hin. Ein entsprechender Effekt konnte bei Inhibierung der Aktin-Polymerisierung nicht beobachtet werden. Die gemessenen Zeitskalen der Abnahme von $j_0(t)$ liegen in der Größenordnung $\Delta t \sim 10^2$ s, für die in früheren Studien bereits ein transienter Anstieg in der Zellsteifigkeit der Rotation während der Phagozytose gemessen wurde [17]. Der inverse Zusammenhang zwischen $j_0(t)$ und der Fallensteifigkeit lässt sich mit dem Modell von Zellen unter Vorspannung erklären [182, 183].

In den *blinking traps*-Experimenten bei starker Störung der Aktin-Polymerisierung (CytoD=5 μ M) wurde keine signifikante Partikelauslenkung beobachtet. Es kann also gefolgert werden, dass für eine messbare Partikelauslenkung, welche im Rahmen der *blinking traps*-Experimente als Indiz für Phagozytose angesehen wurde (siehe hierzu die Diskussion von j_0 in Abschnitt 5.3.5), ein intaktes Aktin-Netzwerk notwendig ist. Allerdings basiert diese Schlussfolgerung auf einer geringen Statistik. Ebenfalls ist anzumerken, dass die Partikelauslenkung kein zwingendes Kriterium für Phagozytose ist, wie in Abschnitt 3.1 diskutiert wurde. So erklärt sich, dass trotz starker Aktin-Inhibierung Phagozytose mit einer geringen Wahrscheinlichkeit stattfindet, wie unter anderem in den Effizienz-Messungen (Abschnitt 5.2) quantifiziert wurde.

Eine zeitliche Änderung der *power law*-Exponenten $\beta(t)$ während der Phagozytose konnte mit Hilfe der *blinking traps*-Experimente nicht festgestellt werden. Es wurden allerdings signifikant höheren Werte von $\langle \beta_{5 \mu\text{M}} \rangle = 0,40 \pm 0,06$ und $\langle j_{0,5 \mu\text{M}} \rangle = 30,9 \pm 11,9 \text{ mPa}^{-1}$ bei starker Störung der Aktin-Polymerisierung gemessen im Vergleich zu den entsprechenden Werten bei ungestörter beziehungsweise schwacher Störung. Zellen in einer 5 μ M CytoD-Umgebung waren messbar fluider und weicher als die entsprechenden Zellen in einer Kontroll-Umgebung (0 μ M).

Aufgrund der Resultate der Messungen zum Phagosomtransport (Abschnitt 5.5) lässt sich ein direkter Aktin-Einfluss auf den Phagosomtransport nachweisen. Für Phagosomtransport bei schwacher Inhibierung der Aktin-Polymerisierung reduzierten sich insbesondere für kleine 1 μ m Partikel die Transportgeschwindigkeiten, und der Anteil an passiven Transportphasen nahm zu. Aktin hat somit einen starken Einfluss auf den Transport kleiner Phagosomen, was sich zum Beispiel durch eine stärkere Kopplung des Phagosomtransports an den durch Myosin getriebenen retrograden Aktinfluss [193, 194, 195, 196] plausibel machen lässt.

Zusätzliche Experimente

Neben den oben diskutierten Experimenten ergaben sich während der experimentellen Arbeiten durch die kontinuierliche Verbesserung des experimentellen Aufbaus sowie durch neue Ideen zusätzliche Experimentansätze, welche dazu beitragen können, insbesondere die Entwicklung der zellmechanischen Eigenschaften während der Partikelinternalisierung genauer zu spezifizieren.

Mit Hilfe von an den Rändern von Deckglasbruchstücken ausgesäten Zellen konnte eine relativ

5.6. Zusammenfassung der Experimente und Ergebnisse

einfache, mit Standard-Mikroskopen realisierbare Technik zur Beobachtung der Phagozytose im Zellprofil realisiert werden (Abschnitt 5.4). Trotz nicht optimaler Bildgebung durch starke Lichtstreuung an den Deckglaskanten erlaubt diese Art der Probenpräparation weiterhin den Gebrauch optischer Fallen zur Positionierung und kontrollierten Anbindung der zu phagozytierenden $2\ \mu\text{m}$ Partikel. Für präzise Kraftmessungen ist allerdings pro Messung eine angepasste Kalibrationsmessung unter Berücksichtigung der durch die Beschaffenheit der Deckglaskante bedingten Randeffekte notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde des Weiteren eine computergesteuerte *piezo stage* in den experimentellen Aufbau implementiert. Eine direkte Anwendung wurde durch die Erweiterung der *blinking traps*-Experimente mit *live tracking* der Partikelposition in Kombination mit einer rückgekoppelten Probenpositionierung durch die *piezo stage* realisiert (Abschnitt 5.3.3). Diese Erweiterung der *blinking traps* ermöglicht im Prinzip die Durchführung längerer Messreihen bei konstant gehaltener optischer Rückstellkraft. Bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit konnte die erweiterte *blinking traps*-Experimentreihe allerdings noch nicht ausreichend optimiert und charakterisiert werden, so dass erste Testmessungen noch nicht vergleichbar mit den ursprünglichen Messdaten der Experimente ohne *live tracking* waren.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich in einen konzeptionellen und einen experimentellen Teil einordnen. Konzeptionelles Ziel war die Entwicklung und Charakterisierung einer Arbeitsstation für optische Mikromanipulation und Lebendzell-Studien, insbesondere der Phagozytose (Kapitel 4). Die experimentellen zellmechanischen Studien der Phagozytose hatten das Ziel des Nachweises und der Quantifizierung des Einflusses von Aktin auf die Phagozytose (Kapitel 5).

6.1. Arbeitsstation zur Quantifizierung der Phagozytose

Ein Großteil der in dieser Abhandlung diskutierten konzeptionellen und experimentellen Arbeiten bestand in der Entwicklung einer Arbeitsstation für zellmechanische Phagozytosestudien in Kombination mit einer holografischen optischen Pinzette (Kapitel 4). Wesentliche Merkmale des integrierten Mikroskops sind hierbei die weitgehende Automatisierung, die Möglichkeit zur Bildaufnahme mit hoher zeitlicher Auflösung und hoher Sensitivität, das *perfect focus system* und die Kapselung durch eine thermische Inkubationskammer, welche zusammen ideale Bedingungen für quantitative Langzeitstudien der Phagozytose bieten. Ein dreidimensional ansteuerbarer Piezotisch ermöglicht die genaue Positionierung der Probe im nm-Bereich.

Die holografische optische Pinzette wurde mit Hilfe einer per Rückkopplungsschleife stabilisierten Fanglasers der Wellenlänge $\lambda = 1064 \text{ nm}$ und einem Flächenlichtmodulator (SLM) erzeugt. Die Ansteuerung des SLMs erfolgte mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten *MatLab*-Programm. Die Berechnung der SLM-Phasenmuster basierte auf dem *Gratings and Lenses*-Algorithmus. Dreidimensionale optische Mikromanipulation von mit IgG oberflächenfunktionalisierten Polystyrol-Partikeln ermöglichte das kontrollierte Anbinden der Partikel an die in dieser Arbeit verwendeten *J-774A.1* Makrophagen und damit eine präzise Kontrolle über Startpunkt und -ort der Phagozytose. Das vollständige nichtlineare Kraftprofil der optischen Falle wurde anhand der Partikelbewegung in einem hochviskosen Medium im Bereich des Fangpotentials kalibriert [81]. Durch Vergrößerung des Abstands zwischen angebundenem Partikel und optischer Falle lassen sich demnach in der aktuellen Realisierung bei einer Laserleistung von 500 mW (gemessen nach Reflexion am SLM-Display) und bei Verwendung von Polystyrol-Partikeln mit einem Durchmesser von 2 μm rücktreibende optische Kräfte von bis zu 50 pN (70 pN im Fall von 3 μm Partikeln) erzeugen. Die maximale Laserleistung des Fanglasers wurde jedoch bisher nicht ausgereizt, so dass die Erzeugung größerer Kräfte prinzipiell möglich ist.

6.2. Experimente zur Charakterisierung der Phagozytose

Phagozytose bezeichnet den Vorgang der zellulären Internalisierung und, falls möglich, sukzessiven Zersetzung von Fremdkörpern, wie Pathogenen oder Bakterien [8, 9, 10], und ist ein aktiv durch Aktin-Remodellierung mediierter Prozess [129, 130, 12]. Mit dem Einsetzen der Phagozytose wird ein Aufbrechen der durch Transmembranproteine mit der Zellmembran verankerten ursprünglichen Netzwerkstruktur des kortikalen Aktins notwendig [139]. So können sich entlang der Kontaktfläche des zu internalisierenden Objektes mehr Rezeptoren sammeln und neue Aktin-Filamente zur Ausbildung der *phagocytic cup* polymerisieren. Nach erfolgreicher Internalisierung wird das entstandene Phagosom während der Phagosomreifung in Richtung Nukleus transportiert [160]. Neben den Mikrotubuli-assoziierten Dyneinen und Kinesinen spielen hierbei unter anderem die Aktin-assoziierten Myosine eine Rolle [193, 194].

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob mit der Aktin-Remodellierung messbare Änderungen der zellmechanischen Eigenschaften der phagozytierenden Zelle einhergehen. Die zur Beantwortung dieser Frage im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Phagozytose-Studien (Kapitel 5) beschäftigten sich mit der Quantifizierung des Einflusses von Aktin auf die Phasen der Fc γ -medierten Phagozytose von *J-774A.1*-Zellen. Konkret wurden hierzu die globale Phagozytose-Effizienz (Abschnitt 5.2), die Entwicklung der Zellsteifigkeit während der Phase der Membranhüllung und sukzessiven Partikelinternalisierung (Abschnitt 5.3) sowie der Phagosomtransport nach erfolgter Internalisierung (Abschnitt 5.5) bei verschiedenen Graden der Inhibierung der Aktin-Polymerisierung untersucht. Die Inhibierung der Aktin-Polymerisierung erfolgte mit dem Pilz-Toxin *Cytochalasin D* (CytoD). In den Experimenten mit nah beieinander liegenden CytoD-Konzentrationen zeigten nicht alle Fälle signifikante Unterschiede der Messgrößen. Nah beieinander liegende CytoD-Konzentrationen waren somit nicht in allen Fällen unterschiedlich genug, um messbare Änderungen des Zellverhaltens hervorzurufen. CytoD-Konzentrationen von 1 und 2 μM wurden daher zusammenfassend als schwache Störung und Konzentrationen von 5 und 10 μM als starke Störung der Aktin-Polymerisation interpretiert. Auf die Anwendung von mittleren Konzentrationen von 2 - 5 μM wurde entsprechend verzichtet.

Die Bestimmung der Phagozytose-Effizienz erfolgte durch Nachweis der Partikelinternalisierung von mit primären Antikörpern der Gruppe G (Immunglobulin G, IgG) oberflächenfunktionalisierten Polystyrol-Partikeln in *J-774A.1*-Zellen. Der Nachweis erfolgte durch sekundäre Antikörperfärbung der nicht internalisierten Partikel (Abschnitt 5.2), Zellfixierung und automatisierte Partikel- und Zelldetektion. In allen untersuchten CytoD-Konzentrationen wurde erfolgreiche Partikelinternalisierung gemessen. Der Einfluss von Aktin auf die Phagozytose-Effizienz ließ sich anhand der reduzierten Zahl internalisierter Partikel mit zunehmender Inhibierung der Aktin-Polymerisierung durch CytoD nachweisen. Für eine effiziente Phagozytose ist somit eine intakte Aktin-Struktur notwendig. Allerdings deuten die nicht verschwindenden Anteile internalisierter Partikel bei starker Störung der Aktin-Polymerisation darauf hin, dass Phagozytose in *J-774A.1* Makrophagen zum Teil durch Internalisierung ohne aktive Aktin-Beteiligung stattfinden kann. Es ist zudem möglich, dass durch CytoD-Behandlung zwar die Aktin-Polymerisierung inhibiert wird, bereits vorhandene Aktin-Filamente und ihre Querverbindungen allerdings weiterhin teilweise erhalten bleiben [150]. Die raumzeitliche Charakterisierung der zellmechanischen Eigenschaften während der unter anderem durch Aktin-Remodellierung medierte Partikelinternalisierung und Membranhüllung war Ziel der *blinking traps*-Experimente (Abschnitt 5.3). Mit der holografischen optischen Pinzette wur-

den mit IgG oberflächenfunktionalisierte Partikel in Einzelexperimenten kontrolliert an *J-774A.1*-Zellen angebunden. Nachdem eine sichtbare Auslenkung der Partikel erfolgte, wurden durch periodisches Aus- und Einschalten (0,25 Hz) der optischen Falle Partikelrelaxationen des Partikels induziert. Die Relaxationen des Partikels beim Einschalten der optischen Falle wurden mit dem Modell für Spannungs-Dehnungs-Kurven (*creep compliance relaxations*) ausgewertet [179, 183]. Die optische Kraft fungierte hierbei als der die Zelldehnung erzeugende Stimulus. Die Interpretation der Messdaten gestaltete sich aufgrund folgender Gründe als nicht trivial. Es konnte kein Zusammenhang zwischen den Zeitpunkten des kontrollierten Anbindens des Partikels und Beginn der Partikelauslenkung festgestellt werden, so dass zum Vergleich der Partikelauslenkungen die Trajektorien zeitrekaliert wurden. Die untersuchte Partikelinternalisierung ist ein aktiver Prozess. In den verwendeten Modellen wurden der Einfluss der Zellkraft und die Entwicklung der Kontaktfläche zwischen Partikel und Zellmembran jedoch bisher vernachlässigt. Aufgrund der limitierenden Schaltfrequenz des SLMs, welcher zur Modulation der optischen Falle verwendet wurde, beschreibt der Kurvenverlauf in den Trajektorien die Faltung der Zellantwort mit der Übertragungsfunktion des experimentellen Aufbaus, so dass die erhaltenen Größen nicht das reine Zellverhalten beschreiben. Unter diesen Limitierungen konnten mit den *blinking traps*-Experimenten folgende Aussagen getroffen werden. In den zeitreskalierten Kurven verlief die Auslenkung des Partikels mit einer mittleren Geschwindigkeit $\frac{\Delta d}{\Delta t} = 4,1 \pm 0,3 \text{ nm s}^{-1}$, unabhängig von der jeweils entgegenwirkenden optischen Kraft F_{OT} . Für die Messungen bei starker Störung der Aktin-Polymerisation konnte keine signifikante Auslenkung des Partikels beobachtet werden. Für eine messbare Partikelauslenkung, welche im Rahmen der *blinking traps*-Experimente als Indiz für Phagozytose angesehen wurde, ist daher ein intaktes Aktin-Netzwerk notwendig. Die Messungen ohne Störung der Aktin-Polymerisation zeigten eine Zunahme der lokalen Steifigkeit j_0^{-1} des Systems mit der Messzeit. Die Zeitskalen dieser Änderungen stimmen mit vergleichbaren Zeitskalen für die transiente Änderung der Zellsteifigkeit der Rotation (gemessen mit *magnetic twisting cytometry* (MTC), [17]) überein. Ebenfalls wurde ein inverser Zusammenhang zwischen der Nachgiebigkeit j_0 und der in den Experimenten verwendeten Fallensteifigkeit κ festgestellt, welcher sich mit dem Modell von Zellen unter Vorspannung erklären lässt [182, 183]. Bei Inhibierung der Aktin-Polymerisation durch CytoD (1 und 5 μM) konnte keine zeitliche Änderung von $j_0(t)$ gemessen werden. Eine temporäre Änderung der Viskoelastizität β des Systems konnte in den *blinking traps*-Experimenten nicht gemessen werden, im Falle einer starken Störung der Aktin-Polymerisation (CytoD = 5 μM) war der mittlere *power law*-Exponent $\langle\beta_{5\mu\text{M}}\rangle = 0,40 \pm 0,06$ jedoch signifikant höher als im ungestörten Fall ($\langle\beta_{0\mu\text{M}}\rangle = 0,250 \pm 0,030$) oder im Fall einer geringen Störung ($\langle\beta_{1\mu\text{M}}\rangle = 0,26 \pm 0,03$). Zellen bei starker Störung der Aktin-Polymerisierung wiesen damit ein stärker viskoses Verhalten auf als bei geringer oder keiner Störung.

Die Quantifizierung der Rolle von Aktin während des Partikeltransports war Ziel der in Abschnitt 5.5 beschriebenen *magnetic tweezers*-Studien. Bereits internalisierte am Nukleus befindliche Phagosomen der Größe 1 und 2,8 μm wurden mit einer magnetischen Pinzette in Richtung Zellperipherie ausgelenkt und die Phagosombewegungen nach Ausschalten der magnetischen Pinzette analysiert. Es ließ sich ein direkter Aktin-Einfluss auf den Phagosomtransport nachweisen. Für Phagosomtransport bei schwacher Inhibierung der Aktin-Polymerisierung (CytoD=1 und 2 μM) reduzierten sich insbesondere für kleine Phagosomen mit einem Durchmesser von 1 μm die Transportgeschwindigkeiten, und der Anteil an passiven Transportphasen nahm zu. Aktin hat somit einen starken Einfluss auf den Transport kleiner Phagosomen.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Experimenten wurden im Rahmen der Arbeit eine experi-

6. Zusammenfassung und Ausblick

mentelle Technik zur Beobachtung der Phagozytose im Zellprofil präsentiert und erfolgreich implementiert (Abschnitt 5.4) und mit Hilfe der *piezo stage* eine Erweiterung der *blinking traps*-Experimente durch Echtzeit-Partikeltracking und rückgekoppelte Probenpositionierung erfolgreich durchgeführt. Eine ausführlichere Zusammenfassung der Studien dieser Arbeit und ihrer zentralen Ergebnisse findet sich in Abschnitt 5.6.

6.3. Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute und charakterisierte Arbeitsstation für zellmechanische Phagozytosestudien in Echtzeit und die Resultate der durchgeführten experimentellen Arbeiten bieten viele Ansatzpunkte für spannende Folgestudien oder experimentelle Erweiterungen.

So bietet die holografische optische Pinzette Raum für Modifikationen. Mit alternativen Algorithmen zum implementierten *Gratings and Lenses*-Algorithmus ließen sich SLM-Phasenmuster ohne unerwünschte lokale Intensitätsmaxima in höheren Beugungsordnungen („Geisterfallen“) erzeugen [103, 105] oder zusätzlich Drehimpulse auf die optisch gefangenen Objekte übertragen [207]. Letzteres bietet Raum für Folgestudien der Phagozytose von kontrolliert rotierenden Objekten, um gleichzeitig die Zellsteifigkeit der Translation und Rotation zu messen, vergleichbar mit auf MTC basierenden Experimenten [17].

Wie in Abschnitt 5.3 ausführlich diskutiert, beschreiben die Trajektorien der *blinking traps*-Experimente aufgrund der experimentellen Limitierungen ein gefaltetes Signal der Zellantwort und der Übertragungsfunktion des Systems. Als System wurden mit holografischen optischen Fallen getestete Zellen verwendet. Eine sich aus dieser Tatsache ergebende direkte Fragestellung ist, ob sich Zellantwort und Systemantwort prinzipiell voneinander trennen lassen. Ein Ansatz zur Beantwortung dieser Frage mittels analytischer Entfaltung ist Gegenstand aktueller Arbeiten. Ein experimenteller Ansatz, um den Einfluss des Systems zu minimieren, kann durch die Verwendung einer schnelleren Modulation der Laserintensität realisiert werden. Im bestehenden Aufbau eignet sich hierfür im Prinzip der akusto-optische Modulator (AOM) bei einer alternativen Ansteuerung durch einen externen Frequenzgeber.

Aufgrund des Experiment-Designs wurde in den *blinking traps*-Experimenten in erster Linie die Anfangsphase der Phagozytose, welche unter anderem durch die einsetzende Partikelinternalisierung beschrieben wird, charakterisiert. Für eine Charakterisierung der Zellmechanik während der Phagozytose über den Zeitraum der vollständigen Partikelinternalisierung bieten sich daher weitere Experimente an. Weil insbesondere lange Messungen ohne Entweichen des Partikels aus der optischen Falle möglich werden, kann, wie in Abschnitt 5.3.5 dargelegt, eine Optimierung der im Rahmen dieser Arbeiten entwickelten *live tracking* Routine mit rückgekoppelter *piezo stage* Ansteuerung dazu beitragen, den Übergang zwischen den Phasen der Partikelinternalisierung hin zur vollständigen Phagosombildung zu quantifizieren. Durch die Analyse vergleichbarer *blinking*-Relaxationen von Partikeln, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht internalisiert werden [152], und von vollständig internalisierten Partikeln ließen sich einzelne Trajektorien möglicherweise systematischer unterscheiden.

Ein generelles Problem zellmechanischer Messungen ist die große Zahl nicht oder nur schwer zu kontrollierender Parameter, wie zum Beispiel der Ort der Messung (nah am Nukleus oder in der Zellperipherie), der Grad der Zellaktivierung, die Anzahl etablierter Rezeptor-Liganden Bindungen, die biochemische Zusammensetzung der Zellmembran, die Dichte und Vernetzung des Aktin-Kortex

oder der Grad der Motor-Aktivität, aufgrund derer Zellmessungen starken Schwankungen unterliegen. Ein Beispiel hierfür ist die in den *blinking traps*-Experimenten beobachtete stark variierende Länge der Ruhepausen zwischen Anbindezeitpunkt des Partikels und einsetzender Partikelaußenlenkung. Eine Kontrolle der Zahl der während des Partikelanbindens initiierten Rezeptorbindungen kann möglicherweise helfen, Rückschlüsse über die Variationen der Zeitintervalle zwischen Partikelanbindung und sichtbarem Einsetzen der Phagozytose zu ziehen. Eine Möglichkeit zur experimentellen Kontrolle der Rezeptorzahl ist die Verwendung von Partikeln mit variabler Anzahl an Antikörpern auf ihrer Oberfläche [227, 152].

Bisher ebenfalls vernachlässigt wurde in den *blinking traps*-Experimenten der rein geometrische Einfluss der durch Partikelrelaxationen hervorgerufenen Deformation der Zellmembran. Zur Unterscheidung zwischen geometrischen Effekten durch Membranverformung und/oder Eindellung und aktiv durch die Zelle hervorgerufenen zellmechanischen Eigenschaften können sich erweiterte theoretische Modellierungen der Zellmembran [150, 17] als hilfreich erweisen. Ein Ansatz zur Vorhersage der energetischen Voraussetzungen für die Membrankrümmung während der Phagozytose basiert auf dem sogenannten Helfrich-Modell [228, 229], mit dem sich für deformierte Flächen die Krümmungsenergien pro gekrümmter Einheitsfläche bestimmen lassen. Ein experimenteller Ansatz zur Validierung entsprechender Modelle besteht in der Kontrolle der Kontaktfläche zwischen phagozytischer Zelle und zu phagozytisiertem Objekt, beispielsweise durch konfokale Mikroskopie der fluoreszentgefärbten Zellmembran oder des Aktinkortex während der Phagozytose (vergleichbar den in Abbildung 3.2 gezeigten Aufnahmen, wobei es sich hierbei allerdings um fixierte Zellproben handelte). Eine Kombination mit der in Abschnitt 5.4 diskutierten Profilbeobachtung kann hierbei besonders hilfreich sein, um beispielsweise Membranprotrusionen infolge der *zipper formation* von Filopodien oder Membranruffling zu unterscheiden. Insbesondere in den Experimenten zur Beobachtung der Phagozytose im Profil (Abschnitt 5.4) fiel auf, dass Membranruffling in vielen Fällen stark an der Partikelinternalisierung beteiligt zu sein scheint. Eine systematische Untersuchung dieser Beobachtung - zum Beispiel mit Hilfe von Makropinozytose-Blockern wie *EIPA*, welche unter anderem Membranruffling inhibieren [235] - kann zu einem besseren Verständnis der bisher erst ansatzweise untersuchten Rolle von Membranruffling während der Phagozytose [236, 237, 238] beitragen.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Rolle von Aktin während des Partikeltransports mit magnetischen Pinzetten zusammen mit den in *Keller et al.* [121] publizierten Charakteristiken des Phagosomtransports legen die Existenz eines zellulären Sortiermechanismus nahe, welcher den Transport großer Phagosomen in Richtung Nukleus unterstützt [121]. Die durch Dyneine, Kinesine und Myosine während des Transports aufgebrauchten Kräfte wurden bisher nicht quantifiziert. Die Charakterisierung und Diskriminierung dieser Kräfte mit Hilfe einer verbesserten magnetischen Pinzette sind Gegenstand aktueller Forschungsprojekte in der Arbeitsgruppe des Autors. Hierbei bietet die beobachtete zweistufige Phagosomauslenkung von Phagosomen in der perinuklearen Region einen Ansatz für Rückschlüsse über die maximalen Bindungskräfte zwischen Phagosom und Mikrotubuli-Netzwerk.

Mikroskopobjektive, Kameras und technische Details des *Ti-E*-Mikroskops

Eine Übersicht der Mikroskopobjektive des in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Mikroskops *Nikon Eclipse Ti-E* und ihrer Eigenschaften liefert Tabelle A.1. In Tabelle A.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Kameras aufgelistet. Tabelle A.3 fasst die wichtigsten Komponenten des *Nikon Eclipse Ti-E* Mikroskops zusammen.

Bezeichnung	Typ	Magn.	N.A.	W.D. in mm	D.D. in mm
<i>CFI Plan Fluor DL 10x</i>	Fl, Ph1	10x	0,3	15,2	1,2
<i>CFI S Plan Fluor ELWD ADM 20xC</i>	Fl, Ph1	20x	0,45	8,2 - 6,9	0 - 2
<i>CFI Apo LWD 40x WI λS</i>	WI, DIC	40x	1,15	0,6	0,15 – 0,19
<i>CFI Plan Apo IR 60xWI</i>	WI, DIC	60x	1,27	0,17	0,15 - 0,19

Tabelle A.1.: Übersicht der Mikroskopobjektive des *Nikon Eclipse Ti-E* Mikroskops und ihrer Eigenschaften. Magn.: Vergrößerung, N.A.: Numerische Apertur, W.D.: Arbeitsabstand, D.D.: maximale Deckglasdicke, im Falle variabler Angaben besitzt das Objektiv eine Deckglaskorrektur, Fl: geeignet für Fluoreszenz-Mikroskopie, Ph1: Phasenkontrastobjektiv, WI: Wasserimmersionsobjektiv, DIC: geeignet für DIC-Mikroskopie.

Bezeichnung	Typ	max. Auflösung in Pixeln	pixelpitch in μm	Bittiefe in bit	max. fps
<i>Andor Luca r</i>	EMCCD	1004 × 1002	8	14	10
<i>Andor DU-897</i>	EMCCD	512 × 512	16	16	56
<i>IDT Nx4-S2</i>	CMOS	1024 × 1024	13,68	10	2000
<i>pco.pixelfly usb</i>	CCD	1392 × 1040	6,45	14	12
<i>Orca-flash 4.0 v2</i>	CMOS	2048 × 2048	6,5	0,17	30

Tabelle A.2.: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Kameras und ihrer Eigenschaften. max. fps: Maximale Bildrate bei maximaler Auflösung.

A. Mikroskopobjektive, Kameras und technische Details des *Ti-E*-Mikroskops

Komponente	Typenbezeichnung, (<i>Hersteller</i>), evtl. technische Details
Mikroskop	Nikon Eclipse Ti-E, (<i>Nikon</i> , Düsseldorf), invertiertes Mikroskop, enthält automatisierte z-Positionierung des Objektivs (Ti-Z Drive), automatisierte Objektiv- und Filterrevolver
Netzteil	Nikon TI-PS-100W/A, (<i>Nikon</i>)
Mikroskoptisch	Nikon XY Drive, (<i>Nikon</i>)
Controller Mikroskoptisch	Nikon TI-S-CON, (<i>Nikon</i>)
Joystick	Nikon TI-S-EJOY, (<i>Nikon</i>)
<i>perfect focus system</i>	Nikon TI-ND6-PFS, (<i>Nikon</i>), PFS version 1.0, spezifiziert für $\lambda = 340 - 800$ nm
Controller PFS	Nikon TI-PFS-CON, (<i>Nikon</i>)
Fluoreszenzeinheit	Nikon Intensilight C-HGFI, (<i>Nikon</i>)
Shutter 1	IQ35-1959, (<i>Sutter Instrument</i> , Novato, California, USA), Shutter Hellfeldbeleuchtung
Controller Shutter 1	Nikon NI-SH-CON, (<i>Nikon</i>)
Shutter 2	Nikon NI-SH-E, (<i>Nikon</i>), Shutter Fluoreszenzbeleuchtung
Controller Shutter 2	Lambda SC Smart Shutter, (<i>Sutter Instrument</i>)
Software	Nikon NIS Elements Advanced Research, (<i>Nikon</i>), version 4.20.03 64bit, Build 995
Fluoreszenzfilter:	
DAPI	Typ UV-2E/C, (<i>Nikon</i>), Ex: 340 – 380 nm, Dm: 400 nm, Em: 435 – 485 nm
GFP-L	GFP-L, (<i>Nikon</i>), Ex: 460 – 500 nm, Dm: 505 nm, Em: 510 nm
YFP-HQ	YFP-HQ, (<i>Nikon</i>), Ex: 490 – 500 nm, Dm: 510 nm, Em: 520 – 560 nm
G-2A	G-2A, (<i>Nikon</i>), Ex: 510 – 560 nm, Dm: 565 nm, Em: 590 nm
Tex Red	Typ Y-2E/C, (<i>Nikon</i>), Ex: 540 – 580 nm, Dm: 590 nm, Em: 600 – 660 nm
Infrarotfilter	HQ960SP25, <i>LOT Quantum Design</i> , Darmstadt), Transmission > 90 % bei 470 – 940 nm, Block OD6 bei 990 - 1200 nm

Tabelle A.3.: Komponenten des *Nikon Eclipse Ti-E* Mikroskops und technische Details. Ex: Anregungswellenlänge, Dm: *cut-off*-Wellenlänge des dichroitischen Spiegels, Em: Emissionswellenlänge.

Bauteile und Justage des experimentellen Aufbaus

Abbildung B.1 zeigt eine Skizze des vollständigen Messaufbaus der in dieser Arbeit verwendeten holografischen optischen Falle. Der vollständige Aufbau enthält zusätzlich zu den in Abbildung 4.1 dargestellten Komponenten einen weiteren Strahlengang für einen Ersatzlaser sowie zusätzliche optische Komponenten zur Anpassung der Strahlprofile und Verwendung alternativer Strahlengänge (mit/ohne SLM). Nicht dargestellt sind zusätzlich benötigte Steuergeräte und zusätzliche Kameras an den weiteren optischen Mikroskopausgängen (siehe 4.1). Die Auflistung in Tabelle B.1 beinhaltet die im experimentellen Aufbau verwendeten optischen Bauteile und zugehörige elektro-optischen Komponenten mit Herstellerangaben. Die Reihenfolge und Bezeichnung der Bauteile entspricht ihrer Reihenfolge entlang des Strahlenganges in Abbildung B.1.

Zur Justage des Laser Strahlengangs wurden eine Infrarot-Detektor Karte (*Thorlabs VCR2*) und ein Stahlprofil-Detektor (*scanning-slit optical beam profiler BP209-IR*, Thorlabs) zur Kontrolle der Strahlkollimation entlang des gesamten Strahlengangs verwendet. Die gerade Einkopplung des Laserstrahls in das Mikroskop erfolgte durch gleichzeitige Zentrierung des Lasers auf vorher abgemessene Zielpunkte vor und hinter dem Mikroskop. Der Referenzpunkt nach dem Mikroskopdurchgang befand sich hierfür an der Labordecke und wurde präzise mittels Lot auf die Mitte des Mikroskopobjektivs abgestimmt. Der Strahlengang wurde mit Hilfe der Spiegel justiert, bis alle Referenzpunkte zentriert getroffen wurden.

B. Bauteile und Justage des experimentellen Aufbaus

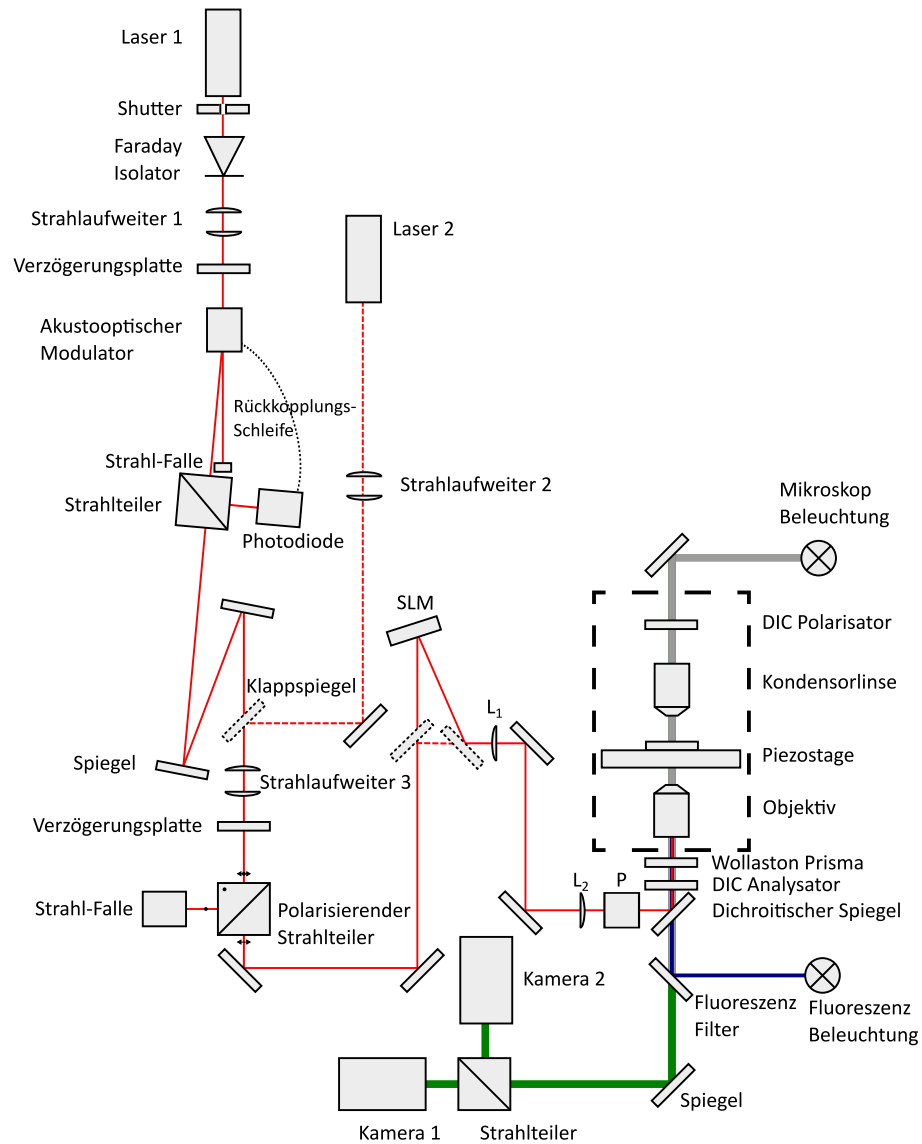


Abbildung B.1.: Vollständiger experimenteller Aufbau. Prinzipskizze des Strahlengangs der holografischen optischen Pinzette und der verwendeten Bauteile. Zusätzlich zur Darstellung in Abbildung 4.1 ist der alternative Strahlengang für den Ersatzlaser (rot gestrichelt) sowie zusätzlich zur Anpassung des Strahlengangs benötigte Komponenten (Strahlaufweiter, Spiegel, Periskop) gezeigt. Die gestrichelten grauen Rechtecke symbolisieren Klappspiegel zur Einkopplung des alternativen Lasers und/oder des SLM. P bezeichnet das Periskop zur Einkopplung des Laserstrahls in das Mikroskop. Der Strahlengang des Fanglasers ist in rot, der Strahlengang der Hellfeld-Beleuchtung des Mikroskops in grau, der Strahlengang der Fluoreszenz-Beleuchtung in blau und der gemeinsame Strahlengang für die Bildgebung in grün dargestellt. Das gestrichelte Rechteck zeigt die von der Inkubationskammer eingeschlossenen Bauteile an.

Komponente	Typenbezeichnung, (<i>Hersteller</i>), evtl. technische Details
Laser 1	IPG YLM-5-LP-SC, (<i>IPG Laser GmbH</i> , Burbach, Deutschland), $\lambda = 1064$ nm Dauerstrich, max. Leistung 5,9 W, Strahldurchmesser 1,6 mm, Strahldivergenz 0,94 mrad
Laser Controller	IGP Laser Driver, (<i>IPG Laser GmbH</i> , Burbach, Deutschland)
Shutter	SH05/M, (<i>Thorlabs</i> , Dachau, Deutschland), Controller KSC001
Faraday Isolator	IO-10-1064-VHP, (<i>Thorlabs</i>)
Strahlaufweiter 1	S6EXP0015/328, (<i>Sill Optics</i> , Wendelstein, Deutschland), 1, 5x, $\lambda = 1030 - 1090$ nm
Verzögerungsplatte	WPH10M-1064, (<i>Thorlabs</i>)
Akustooptischer Modulator	MT110-A1.5-1064, (<i>AA Opto Electronics</i> , Orsay, Frankreich, [221]), Angesteuerung durch RF Generator
RF Generator	MODA110-D4-34, (<i>AA Opto Electronics</i> , Orsay, Frankreich), Teil des Rückkopplungskreises
NoiseEater	NoiseEater 3.2, (<i>TEM Messtechnik</i> , Hannover, Deutschland), Regelelektronik des Rückkopplungskreises
Strahlteiler	—, (<i>TEM Messtechnik</i> , Hannover, Deutschland), zur Ansteuerung der Photodiode, Teil des Rückkopplungskreises
Photodiode	PDR-S, (<i>TEM Messtechnik</i> , Hannover, Deutschland)
Strahlfalle	LB2/M, (<i>Thorlabs</i>)
Spiegel	BB05-E03, klein, BB1-E03, NB1-K14 groß(<i>Thorlabs</i>)
Strahlaufweiter 2	S6EXZ5076/328, (<i>Sill Optics</i> , Wendelstein, Deutschland), 1 – 8x, bei $\lambda = 1030 - 1090$ nm
Polarisierender Strahlteiler	PBS253, (<i>Thorlabs</i>)
SLM	BNS XY Phase Series, (<i>Meadowlark Optics</i> , Colorado, USA), Modell P512-1064, 512×512 Pixel Display, AR-beschichtet, Beugungseffizienz 90 – 95 %
Linsen L1, L2	AC508-500-C-ML, AC508-750-C-ML, (<i>Thorlabs</i>)
Periskop	Newport 75 Post, Newport 670-RSC (<i>Newport</i> , Darmstadt, Deutschland), zur Anpassung der Strahlhöhe an das Mikroskop
Piezostage	PI nano XZY, (<i>Physik Instrumente</i> , Karlsruhe, Deutschland), Controller E-545.3RD
DualCameraPort	TuCam, (<i>Andor</i> , Belfast, Irland), 2x Vergrößerung an den beiden Ausgängen
Optischer Tisch	SmartTable UT2, (<i>Newport</i> , Darmstadt, Deutschland), Füße Newport S-2000 Series
Laser 2 (Ersatzlaser)	M9-A64-0300, (<i>Thorlabs</i>), Diodenlaser, $\lambda = 1064$ nm Dauerstrich, max. Leistung 300 mW, Strahlformung mit Linse C230TME-C (<i>Thorlabs</i>) und Prisma PS881-B (<i>Thorlabs</i>)
Laser 2 Controller	LDC205C, (<i>Thorlabs</i>), Ansteuerung für Laser 2
Temperatur Controller	TED200C, (<i>Thorlabs</i>), für Laser 2
Temperatur Controller Mount	TCLDM9, (<i>Thorlabs</i>), für Laser 2

Tabelle B.1.: Komponenten des experimentellen Aufbaus.

Technische Details der SLM-Ansteuerung

Der SLM (*BNS XY Phase Series*, Modell P512-1064, *Meadowlark Optics, Colorado*, [200]) wird vom Computer als externe PCIe16 Karte angesteuert, entsprechend muss die SLM-Stromversorgung vor Einschalten des PC gewährleistet sein, damit der SLM vom PC erkannt wird. In der Ansteuerungsart per PCI-Treiber kann der SLM 2^8 verschiedene Phasenstufen darstellen, 2^{16} Phasenstufen lassen sich in einer alternativen Ansteuerung via DVI-Treiber realisieren. Die Schaltfrequenz (Ansprechzeit) des SLM ist durch die Grafikkarte des verwendeten Computers bedingt und beträgt in der aktuellen Realisierung $\nu_{\text{SLM}} = 60 \text{ Hz}$ ($\tau_{\text{SLM}} = 16,7 \text{ ms}$). Laut Herstellerangaben ermöglichen die Verwendung von einer entsprechend angepassten Grafikkarte und optimierten Systemeinstellungen Ansprechzeiten bis zu 200 Hz [200]). Die Phasenmusterberechnung und die Ansteuerung des SLMs erfolgt mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Programm *SLMControl*, welches in einer *MatLab*-Version sowie in einer *MatLab/LabVIEW*-Hybrid Version mit grafischer Benutzeroberfläche vorliegt. Der Einfachheit halber wird im Folgenden nur auf die objektorientierte *MatLab*-Version eingegangen.

Die SLM-Bedienung und Phasenmusterberechnung ist in der *MatLab* Klasse *SLM.m* strukturiert. Nach der Initialisierung des SLM durch die *constructor*-Funktion *SLM()* erfolgt in der Funktion *newPhaseMask()* die Wahl der Fanggeometrie, welche per Auswahl von Koordinatenpunkten entlang eines in einem separaten Fenster geöffnetem Koordinatensystems getätigt wird (Funktion *drawPhaseMaskGrid()*). Das Koordinatensystem funktioniert hierbei als Datenmaske der realen Fangebene und wird durch die Eingangsparameter *rho*, *beta*, *alpha*, *step_size* und *grid_points* festgelegt. In den Standardeinstellungen (*rho=0*, *beta=0*, *alpha=0*, *step_size=0*, *grid_points=5*) entspricht der Koordinatenursprung der Position der nullten Beugungsordnung (bzw. der Position des Lasers bei ausgeschaltetem SLM), die Koordinatenachsen entsprechend den Kameraachsen und haben die Skalierung $1 \mu\text{m}/\text{Skalenteil}$. In den Standardeinstellungen entspricht die Auswahl des Koordinatenpunkts (5/5) somit einer Fangposition im Abstand $\rho = \sqrt{(5 \mu\text{m})^2 + (5 \mu\text{m})^2} = 7,07 \mu\text{m}$ vom Ursprung und unter einem Winkel von 45° zur *x*-Achse. Durch Variation der Eingangsparameter lässt sich das Koordinatensystem drehen, verschieben und skalieren, eine genaue Beschreibung der einzelnen Parameter findet sich im Programmcode. Die Anzahl der gewählten optischen Fallen sowie ihre jeweiligen Positionen und entsprechenden Fallenparameter fungieren als Übergabeparameter für nachfolgende Funktion.

Die Berechnung der Phasenmuster anhand der gewählten Fangpositionen erfolgt, wie in Abschnitt 2.1.3.2 beschrieben, wobei der Zusammenhang der absoluten Auslenkung des Laserfokus in der

C. Technische Details der SLM-Ansteuerung

Fangebene und Gitterperiodizität durch die Gleichung

$$\rho = f_{\text{eff}} \cdot \tan\left(\arcsin\frac{\lambda}{2\Lambda}\right) \quad (4.3)$$

und die Abhängigkeit der axialen Verschiebungen Δz von der Brennweite der Fresnel-Linse f_{fresnel} durch die Gleichung

$$\Delta z = f_{\text{MO}}^2 \cdot \left(\frac{1}{f_{\text{MO}} - f_{\text{fresnel}} \left(\frac{f_2}{f_1}\right)^2} \right) \quad (C.1)$$

beschrieben wird. (4.3) und (C.1) ergeben sich aus geometrischer Optik, eine Herleitung findet sich in Quelle [201]. Die Berechnung der Phasenmuster erfolgt in den Funktionen *calculatePhase-maskSettings* und *generateTrapsFromList_LensesAndGratings*.

Damit der SLM die Phasenmuster lesen und auf dem Flüssigkristall-Display darstellen kann, müssen die berechneten 8Bit Grauwert-Phasenmuster mit der Auflösung 512×512 Pixel in eindimensionale Pseudo-16bit-Arrays umgewandelt werden. Hierzu werden die einzelnen Grauwerte in 16Bit Zahlen (von 2^0 bis 2^{16} in 2^8 -Schritten) hochskaliert und die resultierenden 16Bit Werte in zwei 8Bit Zahlen der Struktur *most significant byte-least significant byte* umgewandelt. Die *most significant byte* Dezimalzahl ergibt sich hierbei aus den acht höchsten Stellen der Binärdarstellung der resultierenden 16Bit Zahl, die *least significant byte* Zahl entsprechend aus den acht niedrigsten Stellen. Die *least significant byte* Zahl besitzt somit im vorliegenden Fall der hochskalierten 8Bit Phasenmuster immer den Wert 0, das *least significant byte* ist nur für den Fall von 16Bit Phasenmustern von Null verschieden. Die Konvertierung zwischen Dezimal- und Binärdarstellung erfolgt durch die *MatLab* Funktionen *SLM_de2bi()*, beziehungsweise *SLM_bi2de()*. Das gesamte Array zur SLM-Adressierung hat eine Länge von $512 \times 512 \times 2 = 524288$ Bytes und wird mit der Funktion *writeToSLM()* an den SLM gesendet.

Die eigentliche Steuerung der optischen Fallen (bewegen, rotieren, ein-, ausschalten) beruht auf der Modifikation des zum Steuerbefehl zugehörigen Fallenparameters (siehe die jeweilige spezifische Funktion), der anschließenden Berechnung des Phasenmusters aus den modifizierten Parametern (Funktion *updateSLMPattern()*) und Senden des neuen Phasenmusters an den SLM (Funktion *writeToSLM()*). Für eine einfache Bedienbarkeit wurde eine Gamepad-Ansteuerung implementiert (Funktion *joystickControl()*), so dass sich die häufigsten Steuerbefehle komfortabel per Gamepad ausführen lassen.

Zur Kalibration der optischen Falle

Zur Kontrolle der mittels *step response* Methode bestimmten Fallensteifigkeiten $\kappa_{\text{Kraftprofil}}$ (Abschnitt 4.5) wurden die Fallensteifigkeiten ebenfalls mittels Varianzanalyse und Leistungsspektrum (Herleitung siehe Abschnitt 2.1.2) berechnet, wie im Folgenden beschrieben.

Als Partikel wurden sphärische Polystyrolpartikel (*micromod*) mit den Partikeldurchmessern 2 μm und 3 μm verwendet. Die Partikelbewegungen wurden mit der Hochgeschwindigkeitskamera und mit einer Aufnahme­rate von 37 kHz aufgenommen. Dies ist die maximale Bildrate, mit der die Partikel noch vollständig aufgenommen werden können, weil sich aufgrund der Kamerabauart zeitliche und räumliche Auflösung antiproportional bedingen. Zwei typische eindimensionale Trajektorien von in der optischen Falle an der Stelle (5/5) mit einer Laserleistung von 460 mW (Probenebene) in einer Höhe von $h = 3 \mu\text{m}$ oberhalb des Deckglasbodens gefangenen Partikeln zeigt Abbildung D.1a (Zur Berechnung der Trajektorien siehe Abschnitt 5.1.3). Alle Messungen erfolgten bei einer Umgebungstemperatur von 37°, ausgeschalteter Heizbox und ausgeschalteten Kameralüftern.

Zur Bestimmung der transversalen Fallensteifigkeit wurden in jeder Trajektorie Intervalle ausgewählt, in denen die Partikelfluktuationen möglichst gering waren. Durch histogrammische Auftragung dieser Partikelfluktuationen (Abbildung D.1b) und *fit* mit einer Normalverteilung ergaben sich aus den Varianzen gemäß Gleichung 2.12 die entsprechenden Fallensteifigkeiten $\kappa_{\text{Equipartition}}$.

Aus den zu den Partikelbewegungen zugehörigen Leistungsspektren $S(\nu)$ lassen sich gemäß (2.13) die charakteristischen Frequenzen ν_C bestimmen, aus denen sich die Fallensteifigkeitswerte κ_{PSD} ergeben. Die zu den in Abbildung D.1a dargestellten Trajektorien berechneten Leistungsspektren sowie ihre *fit*-Kurven gemäß (2.13) sind in Abbildung D.1c dargestellt.

Eine Übersicht aller berechneten Steifigkeitswerte liefert Tabelle D.1. Zur Diskussion und Einordnung der Ergebnisse siehe Abschnitt 4.6.

Fallensteifigkeit κ in $\text{pN } \mu\text{m}^{-1}$			
Orientierung	$\kappa_{\text{Equipartition}}$	κ_{PSD}	$\kappa_{\text{Kraftprofil}}$
2 μm , x Richtung	65 ± 2	69 ± 2	104 ± 5
2 μm , y Richtung	68 ± 2	58 ± 2	101 ± 6
3 μm , x Richtung	44 ± 1	52 ± 2	44 ± 1
3 μm , y Richtung	48 ± 1	61 ± 2	47 ± 1

Tabelle D.1.: Fallensteifigkeiten κ der verwendeten optischen Falle. $\kappa_{\text{Equipartition}}$ wurde mittels Varianzanalyse, κ_{PSD} anhand des Leistungsspektrums und $\kappa_{\text{Kraftprofil}}$ mit der *step response* Methode zur Bestimmung des Kraftprofils berechnet.

D. Zur Kalibration der optischen Falle

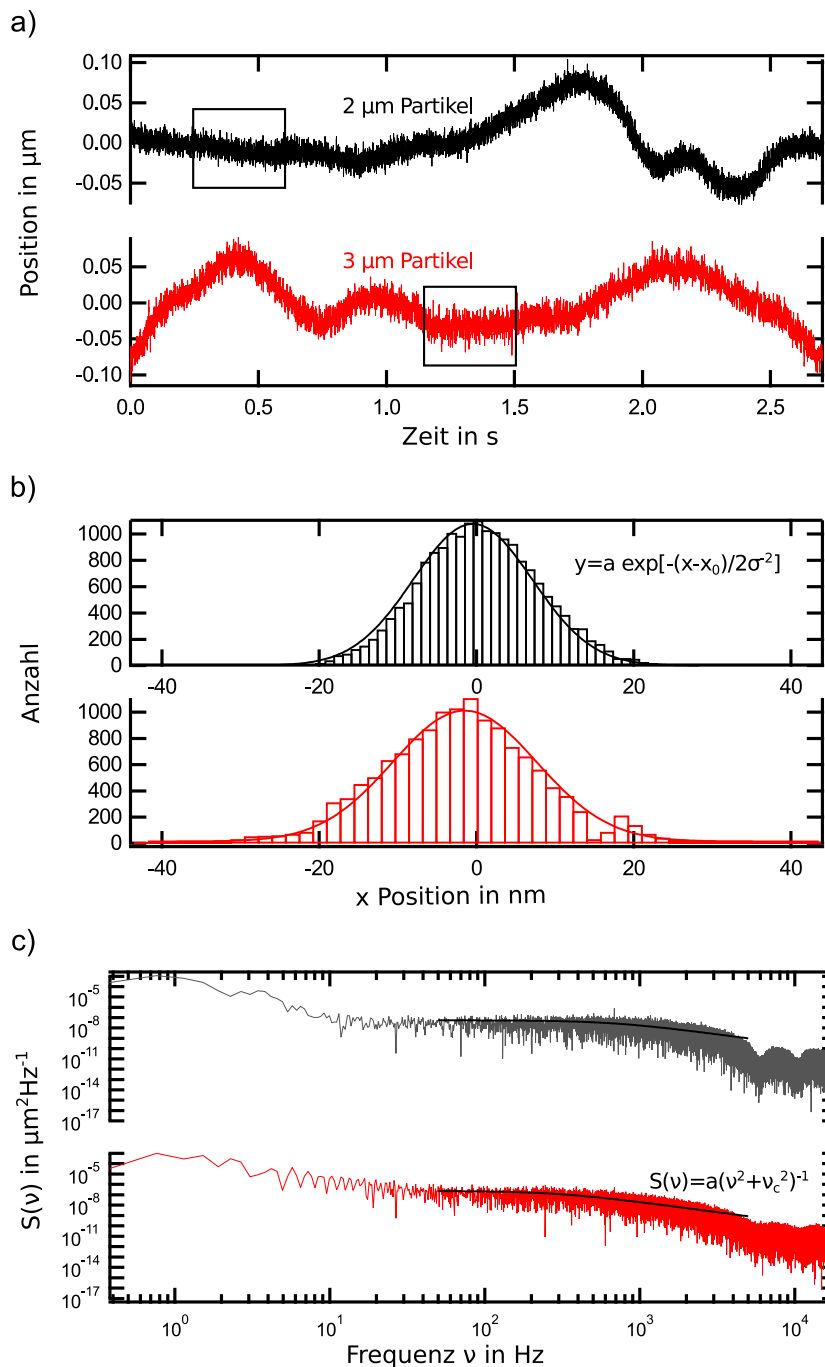


Abbildung D.1.: Kalibration der optischen Falle mittels Varianzanalyse und Berechnung des Leistungsspektrums. (a) Eindimensionale Partikelbewegung in $+x$ -Richtung von optisch gefangenen $2\ \mu\text{m}$ (oben, schwarz) bzw. $3\ \mu\text{m}$ Partikeln (unten, rot), aufgenommen mit $37\ \text{kHz}$. Die Trajektorien wurden mit dem in Abschnitt 5.1.3 beschriebenen Kreuzkorrelationsalgorithmus ermittelt. (b) Auftragung der Positionsfluktuationen der Partikelbewegungen in den in (a) skizzierten Intervallen (Quadrate) und *fit* mittels Normalverteilung. (c) Leistungsspektren der Partikelbewegungen in (a) und *fits* gemäß 2.13.

Zur Bestimmung der Präzision des *tracking*-Algorithmus

Die Genauigkeit des verwendeten *particle tracking*-Algorithmus wurde mit Hilfe von simulierten Partikeltrajektorien abgeschätzt, wie in Abbildung E.1 dargestellt ist. Die Partikelabbildungen wurden mit einer 2D-sinc Funktion mit

$$F(\rho) = a + b \cdot \text{sinc}(c \cdot \rho) \quad (\text{E.1})$$

berechnet (Abb. E.1b und d), wobei $\rho = (x^2 + y^2)^{1/2}$ ist. Die Parameter a, b, c wurden anhand der Messdaten angepasst und betragen $a = 50 + r_{rand,1}, b = 75, c = 4,5\pi^{-1}$. $r_{rand,1}$ ist eine an das Bildrauschen angepasste Zufallszahl zwischen 0 und 5. Die Partikelbewegungen in x bzw. y -Richtung wurden nach *Grassia et al.*[216] mit dem Algorithmus für randomisierte Brownsche Bewegung simuliert mit

$$x_{i+1} = x_i + \frac{\Delta t}{\gamma} \left[r_{rand,2} (24\gamma k_B T \Delta t^{-1})^{1/2} + F_{\text{ext}} \right]. \quad (\text{E.2})$$

Δt ist hierbei das Zeitintervall der Simulation, $r_{rand,2}$ eine Zufallszahl mit $-0,5 \leq r_{rand,2} \leq 0,5$ und γ der viskose Zugkoeffizient für die realen experimentellen Bedingungen. F_{ext} beschreibt eventuelle zusätzlich wirkende Kräfte (z.B. für optisch gefangene Partikel mit $F_{\text{ext}} = -\kappa \cdot (x_i - x_0)$). Für den vorliegenden Fall frei diffundierender Partikel wurde $F_{\text{ext}} = 0$ gesetzt. Die simulierten Partikelbewegungen wurden mit dem *tracking*-Algorithmus getrackt und die erhaltenen Partikelpositionen mit den ursprünglichen Positionen verglichen. Die Abweichung der per *tracking*-Algorithmus rekonstruierten Partikelpositionen von den tatsächlichen Positionen der simulierten Bewegungen betragen hierbei im Mittel nicht mehr als $\delta = 1,3 \pm 0,5 \text{ nm} (0,012 \pm 0,005 \text{ Pixel})$. δ kann somit als Abschätzung der Genauigkeit für den günstigsten Fall angenommen werden, nicht berücksichtigt wurden Partikelfluktuationen in z -Richtung und damit verbundene Helligkeits- und Kontraständerungen.

E. Zur Bestimmung der Präzision des tracking-Algorithmus

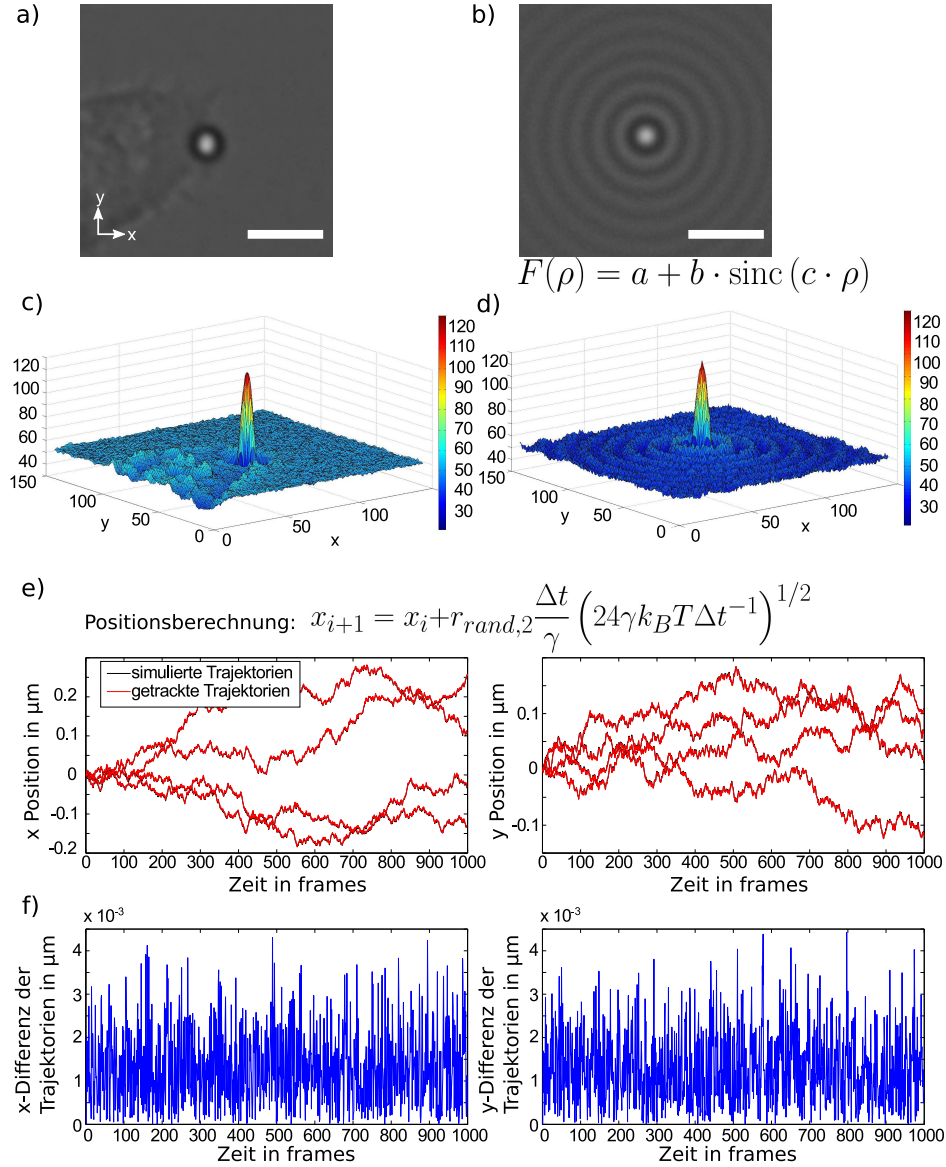


Abbildung E.1.: Bestimmung der Präzision des tracking-Algorithmus. (a) Ausschnitt eines typischen *blinking traps*-Experiments, bei dem ein $2 \mu\text{m}$ Partikel verwendet wurde, scale bar $5 \mu\text{m}$. (b) Abbildung eines mittels 2D-sinc Funktion simulierten $2 \mu\text{m}$ Partikels, scale bar $5 \mu\text{m}$. (c-d) Grauwertverteilungen der Abbildungen (a) und (b). Die Parameter a, b, c der sinc Funktion (E.1) wurden entsprechend der charakteristischen Grauwertverteilung eines realen Partikels (c) angepasst. (e) Darstellung von 4 mittels (E.2) simulierten Partikeltrajektorien (schwarze Kurven) und die entsprechenden resultierenden Trajektorien nach Anwendung des Partikeltrackings auf die simulierten Datensätze (rote Kurven). (f) Abweichung der getrackten von den simulierten Partikelpositionen für die in (e) gezeigten Trajektorien.

Berechnung der Phagozytose-Effizienz

Zur Berechnung der Phagozytose-Effizienz wurde ein von Wolfgang Groß, Doktorand der AG Kress, geschriebenes *Matlab* Programm verwendet. Das Programm basiert im Kern auf einer Kombination des *tracking*-Algorithmus zur automatischen Detektion der Zellkonturen in DIC-Bildern, welcher in Quelle [90] ausführlich beschrieben wird, mit einem auf 2D-Faltung basierenden Partikeldetektionsalgorithmus und einer Routine zur Berechnung der maximalen Intensitätsprojektion anhand der z-Ebenen der Fluoreszenz-Kanal-Bilder. Abbildung F.1 zeigt die grafische Benutzeroberfläche zur Kontrolle der Routine.

Die relativen Helligkeitsverteilungen I_{rel} für jedes detektierte Partikel wurden aus der maximalen Intensitätsprojektion (Abb. F.1b) berechnet mit

$$I_{\text{rel}} = \frac{I_{\text{P}}}{I_{\text{BG}}} , \quad (\text{F.1})$$

wobei I_{P} die Partikelhelligkeit und I_{BG} die Hintergrundhelligkeit bedeuten. Im Fall der verwendeten $2\ \mu\text{m}$ großen Partikel wurde I_{P} aus der Summe der Pixelwerte der kreisförmigen Fläche $A_{r_{\text{int}}}$ mit Radius $r_{\text{int}} = 10$ Pixel (Kreis in F.1b) berechnet. I_{BG} wurde aus den Pixelwerten des Bereichs $A_{l_{\text{BG}}} - A_{r_{\text{int}}}$ berechnet, wobei $A_{l_{\text{BG}}}$ eine um das Partikel zentrierte rechteckige Fläche mit Kantenlänge $l_{\text{BG}} = 50$ Pixel (Quadrat in F.1b) ist.

Anhand der histografischen Auftragung der Helligkeitsverteilungen von Partikeln mit Zellkontakt und Partikeln ohne Zellkontakt, welche in der Messung mit $0\ \mu\text{M}$ CytoD Konzentration zur Zeit $t_{\text{ink}} = 60$ min detektiert wurden (Abbildung 5.6), konnte der Schwellwert I_{Int} für erfolgreiche Partikelinternalisierung auf $I_{\text{Int}} = 1,15$ festgelegt werden. Partikel, die in der maximalen Intensitätsprojektion eine relative Helligkeit von $I_{\text{rel}} < I_{\text{Int}}$ aufwiesen, wurden entsprechend als internalisiert, Partikel mit $I_{\text{rel}} \geq I_{\text{Int}}$ als nicht internalisiert gewertet.

Eine grafische Übersicht der zur Effizienzbestimmung detektierten absoluten Partikelzahlen für die untersuchten Fälle ist in Abbildung F.2 dargestellt.

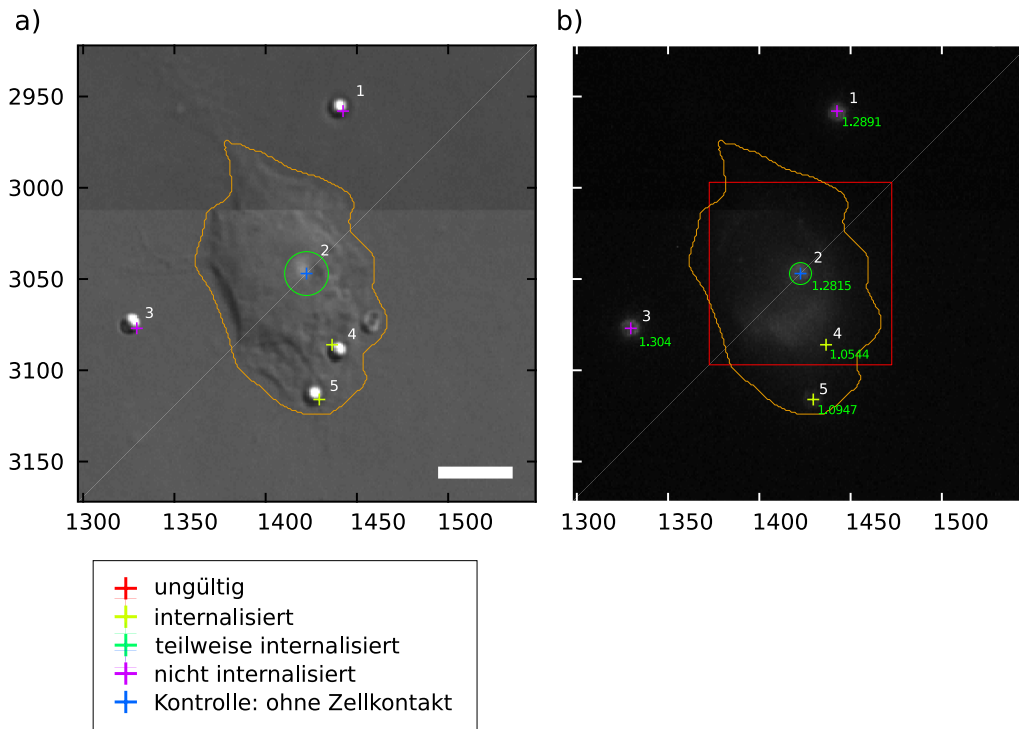


Abbildung F.1.: Grafische Benutzeroberfläche der verwendeten *MatLab*-Routine zur Zell- und Partikeldetektion. (a) Ausschnitt einer DIC-Abbildung mit einer detektierten Zelle und 5 detektierten Partikeln der Größe $2\mu\text{m}$, *scale bar* $10\mu\text{m}$. (b) Abbildung der zu (a) gehörigen maximalen Intensitätsprojektion. Die Intensitätsprojektion entspricht der Summe der Pixelwerte der in der Messung aufgenommenen 15 z-Ebenen der GFP-L Fluoreszenz-Aufnahmen. Für das ausgewählte Partikel 2 in der Bildmitte geben der grüne Kreis die Fläche $A_{r_{int}}$ und das rote Quadrat die Fläche $A_{I_{BG}}$ an, anhand derer die relative Intensität $I_{rel,2}$ berechnet wurde. Die Zahlen geben die für die 5 Partikel berechneten relativen Intensitäten I_{rel} an. Die Partikel 1 und 3 wurden durch die *MatLab*-Routine als nicht in Zellkontakt (lila Kreuze), das Partikel 2 ($I_{rel,2} > 1,15$, blaues Kreuz) als nicht internalisiert, die Partikel 4 und 5 ($I_{rel,4}, I_{rel,5} < 1,15$, gelbe Kreuze) als internalisiert gewertet.

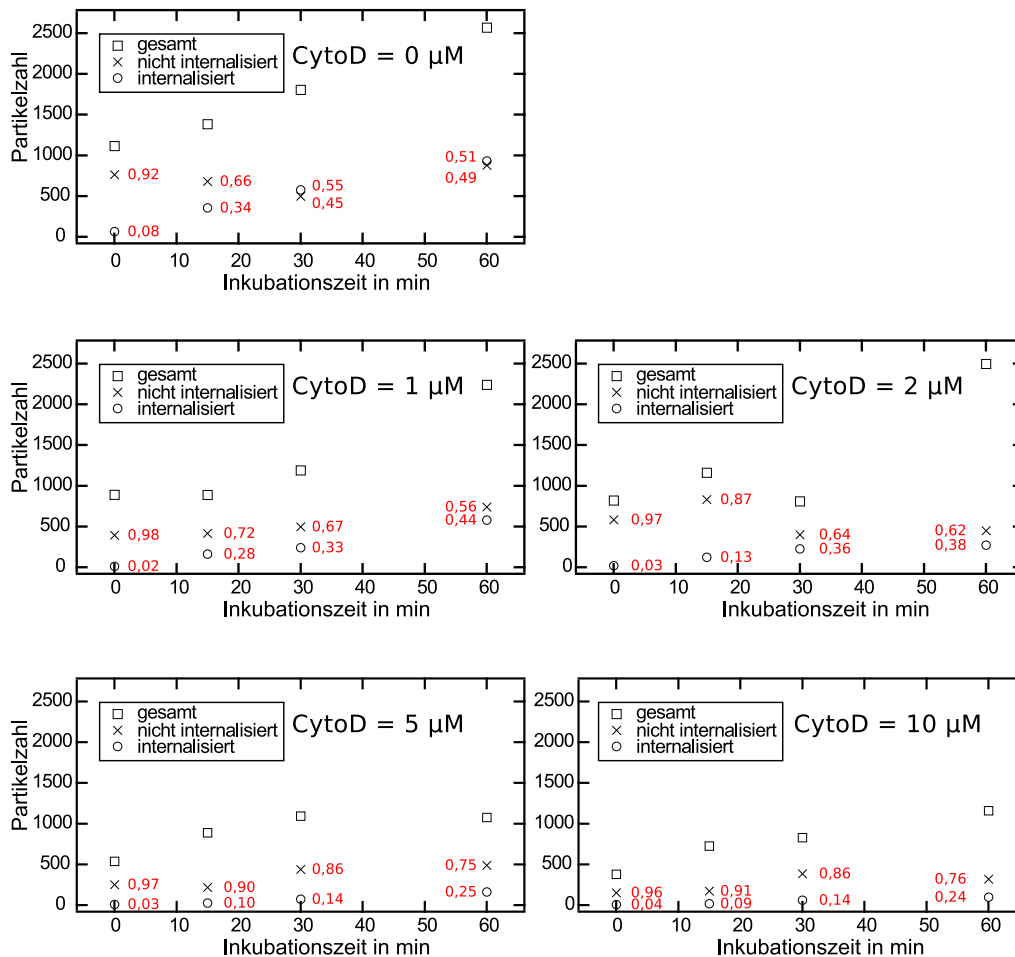


Abbildung F.2.: Absolute Partikelzahlen zur Berechnung der Phagozytose-Effizienz. Die Summen aus internalisierten (Kreise) und nicht internalisierten Partikel (Kreuze) geben die Gesamtzahlen der in den jeweiligen Messungen per *tracking*-Algorithmus detektierten Partikel mit Zellkontakt an, die roten Zahlen entsprechen den Anteilen der internalisierten und der nicht internalisierten Partikel an der Gesamtzahl der Partikel mit Zellkontakt. Die in Abbildung 5.7 dargestellten Phagozytose-Effizienzen entsprechen hierbei den jeweiligen Verhältnissen von internalisierten Partikeln zur Gesamtzahl der Partikel mit Zellkontakt. Die absoluten Partikelzahlen (Quadrate) berechnen sich aus den Partikeln mit Zellkontakt und den Partikeln ohne Zellkontakt (Kontrolle).

Zur Auswertung der *blinking traps* Experimente

G.1. Ruhephasen der Partikeltrajektorien für $d=0,2 \mu\text{m}$

Abbildung G.1 zeigt die Verteilung der Ruhephasen als Funktion des Abstandes der Partikel zum Nukleus für eine durch $d_{\text{start}} = 0,2 \mu\text{m}$ definierte Ruhephase. Aufgrund des kleineren Werts für d_{start} im Vergleich zu den in Abbildung 5.14 dargestellten Resultaten, ergaben sich insgesamt kürzere Ruhephasen, ein systematischer Zusammenhang zwischen Anbindezeitpunkt und dem Beginn der Partikelauslenkung konnte auch bei Variation von d_{start} nicht festgestellt werden.

G.2. Zeitreskalierung der *blinking traps* Trajektorien

In Abbildung G.2 ist das in Abschnitt 5.3.2.5 beschriebene Vorgehen zur Zeitverschiebung der *blinking traps* Trajektorien in detaillierter Form dargestellt. Die Quantifizierung der Zeitskalierung erfolgte anhand der DIC-Bilderserien, da diese - im Gegensatz zu den hochfrequenten Hellfeld-Zeitserien - die gesamten Partikeltrajektorien enthielten. Ab einer Mindestauslenkung $d_{\text{thres}} = 0,15 \mu\text{m}$ verringerten sich die mittleren Standardabweichungen nicht mehr und erreichten ein Plateau. Reskalierungen anhand dieser Plateauwerte wiesen damit sehr ähnliche Verläufe der gemittelten Kurven aus und sind gleichwertig. Als Referenzauslenkung für die Zeitreskalierung wurde mit $d_{\text{thres}} = 0,4 \mu\text{m}$ ein Wert gewählt, bei dem sichergestellt war, dass das Plateau der d_{thres} -Werte erreicht wurde.

Abbildung G.3 zeigt die aus der Auswertung resultierenden Fitparameter j_0, β als Funktion der Zeit für verschiedene Zeitreskalierungen. Die Zeitreskalierungen wurden für Mindestauslenkungen $d_{\text{thres}} = 0,1 - 0,6 \mu\text{m}$ durchgeführt. Der generelle Trend der über alle Werte gemittelten Zellsteifigkeitswerte als Funktion der Zeit änderte sich für die in Abschnitt 5.3.2 diskutierten Experimente bei verschiedenen Mindestauslenkungen d_{thres} nicht wesentlich. Die Zeitreskalierung hatte damit keinen direkten Einfluss auf die Auswertung bzgl. j_0, β .

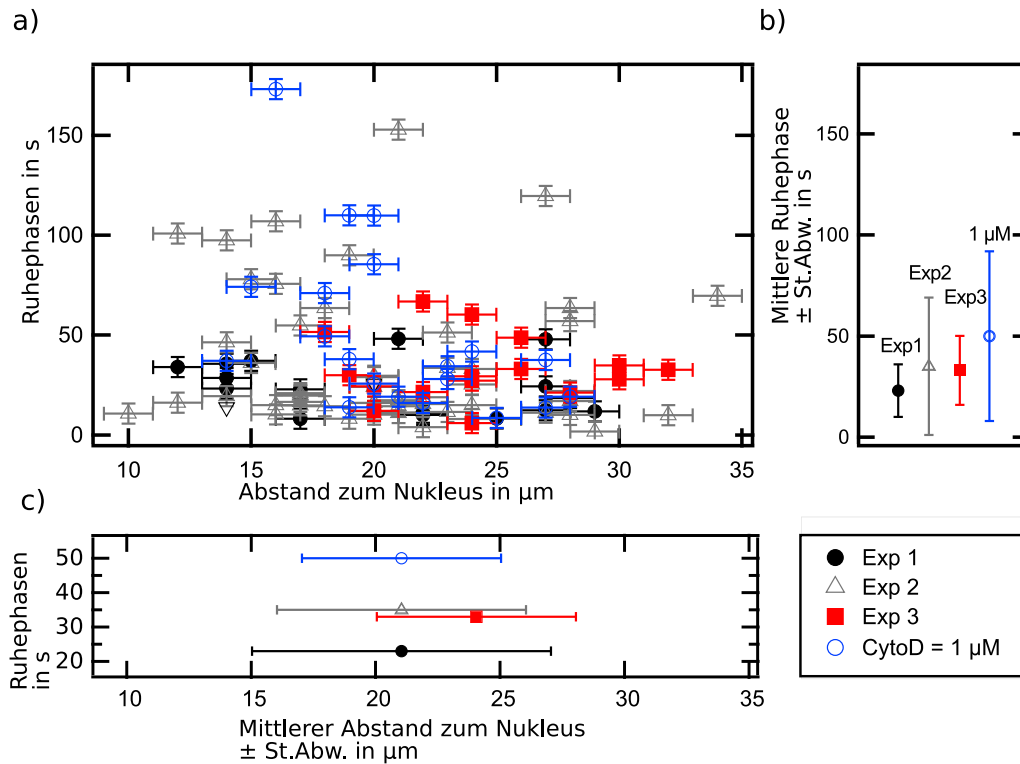


Abbildung G.1.: Ruhephasen der Partikeltrajektorien für geringere Partikelauslenkung. (a) Ruhephasen der Partikel als Funktion des Abstands zum Nukleus. Als Ruhephase wurde die Zeit zwischen dem Anbindezeitpunkt und der Zeit, zu der das Partikel um $d = 0,2 \mu\text{m}$ aus der optischen Falle ausgelenkt war, definiert. Der Partikelabstand zum Nukleus wurde anhand der DIC-Bilder zu Beginn der jeweiligen Messung per Augenmaß mit einer Genauigkeit von \pm dem Partikelradius abgeschätzt. Im Gegensatz zu den Messdaten in Abbildung 5.14 wurden also deutlich kürzere Ruhephasen gemessen, ein systematischer Zusammenhang zwischen Länge der Ruhephase und Abstand zum Nukleus konnte auch hier nicht quantifiziert werden. (b) Mittelwerte der Ruhephasen \pm Standardabweichungen. (c) Mittlere Abstände zum Nukleus \pm Standardabweichungen.

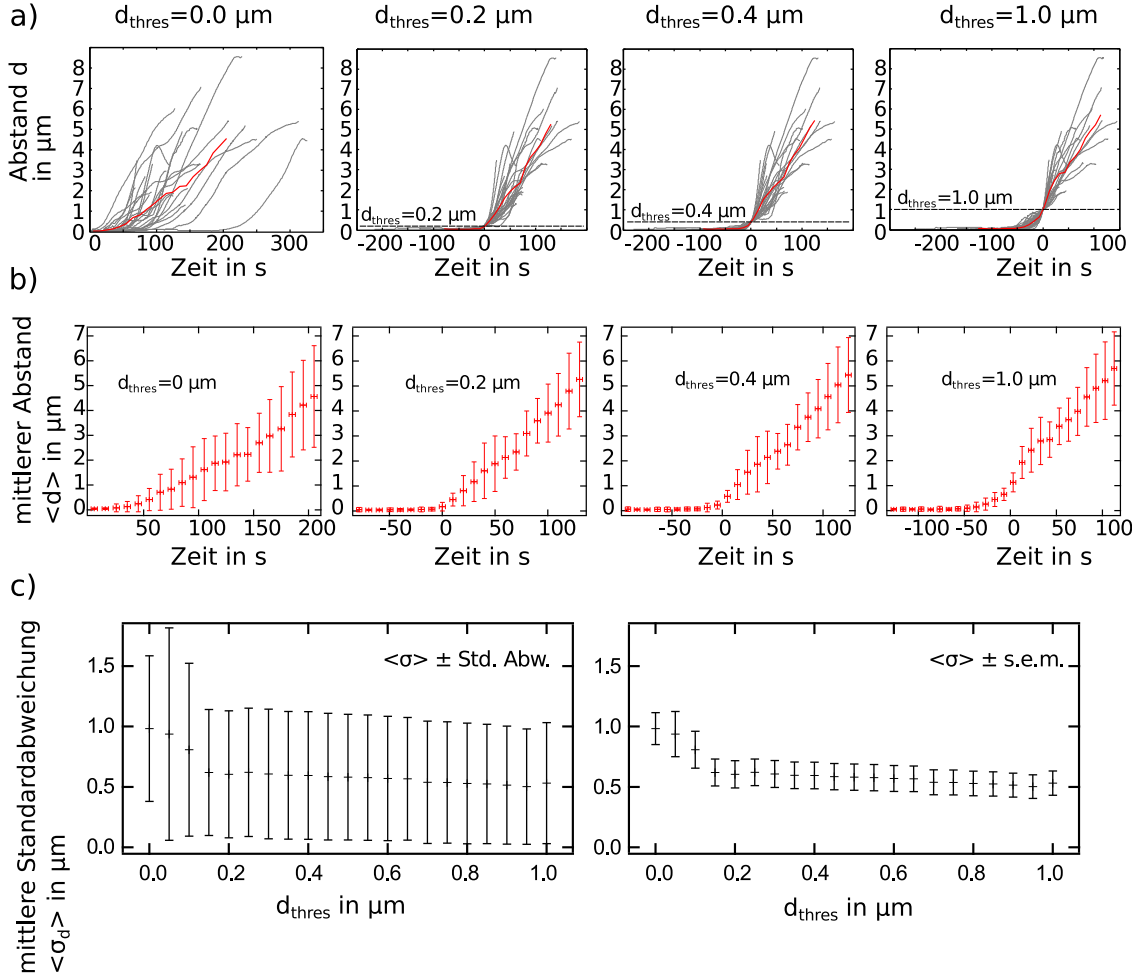
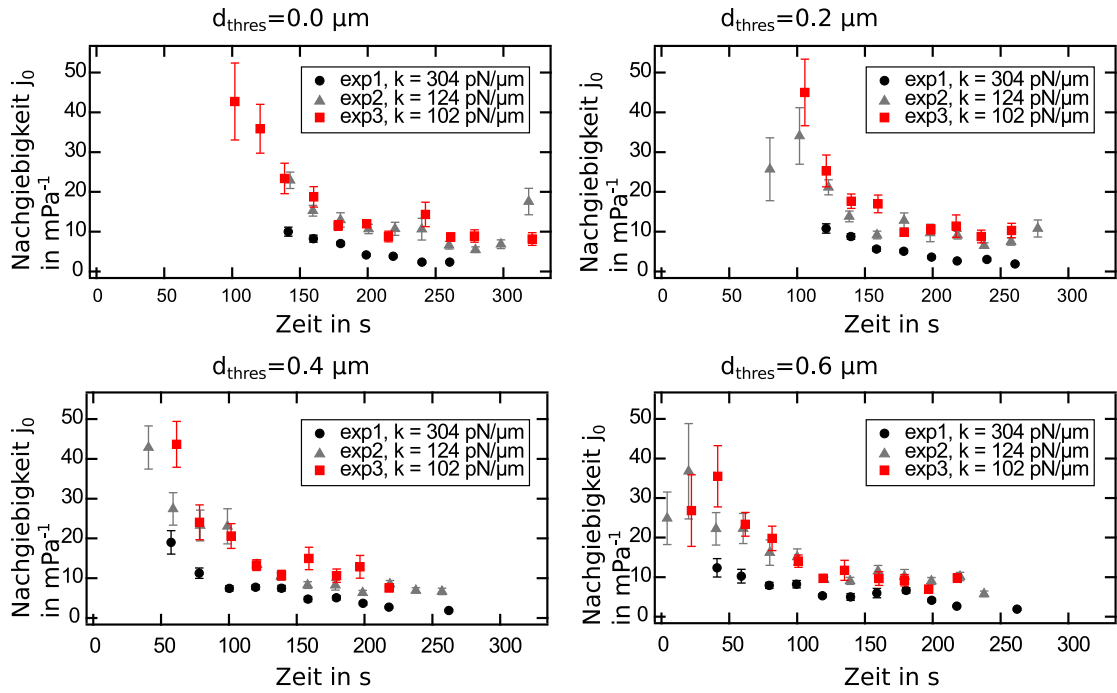


Abbildung G.2.: Zeitreskalierung der *blinking traps* Trajektorien gemäß Abschnitt 5.3.2.5. (a) Darstellung der Referenztrajektorien nach Anwendung der Zeitreskalierung für die Mindestauslenkungen $d_{\text{thres}} = 0, 0,2, 0,4$ und $1,0 \mu\text{m}$. Für die Zeiten $t = 0$ gilt $d(0) = d_{\text{thres}}$ (gestrichelte Linien), für $d_{\text{thres}} = 0 \mu\text{m}$ fand keine Reskalierung statt und die Zeiten $t = 0$ entsprechen den Anbindezeitpunkten. Die roten Kurven entsprechen den über alle Kurven gemittelten Abstandstrajektorien $\langle d \rangle$. (b) Vergrößerte Darstellung der gemittelten Abstandskurven $\langle d \rangle$ für die in (a) gezeigten Fälle $d_{\text{thres}} = 0, 0,2, 0,4$ und $1,0 \mu\text{m} \pm$ Standardabweichungen. Die Mittelung erfolgte in 10 s Intervallen, es wurde pro Intervall mindestens über 100 Einzelerste gemittelt, bei der niedrigsten verwendeten Bildrate von 1 Hz entspricht dies somit einer Mittelung über mindestens 10 Trajektorien. (c) Mittlere Standardabweichungen $\langle \sigma_d(d_{\text{thres}}) \rangle$ als Funktion der Mindestauslenkung d_{thres} , dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (linker Graph) und als Mittelwerte \pm Standardfehler (rechter Graph). Die $\langle \sigma_d(d_{\text{thres}}) \rangle$ Werte wurden aus der Summe der Standardabweichungen aller Intervalle geteilt durch die Anzahl der Intervalle berechnet. Ab einer Mindestauslenkung $d_{\text{thres}} = 0,15 \mu\text{m}$ ändert sich die Streuung der Referenztrajektorien nicht mehr wesentlich und die $\langle \sigma_d(d_{\text{thres}}) \rangle$ -Kurve erreicht einen ungefähren Plateauwert. Als Referenzwert für die Zeitreskalierung wurde anhand dieser Analyse der Wert $d_{\text{thres}} = 0,4 \mu\text{m}$ gewählt, bei welchem das Erreichen des Plateaus sichergestellt war.

a) Nachgiebigkeit j_0



b) Exponent β

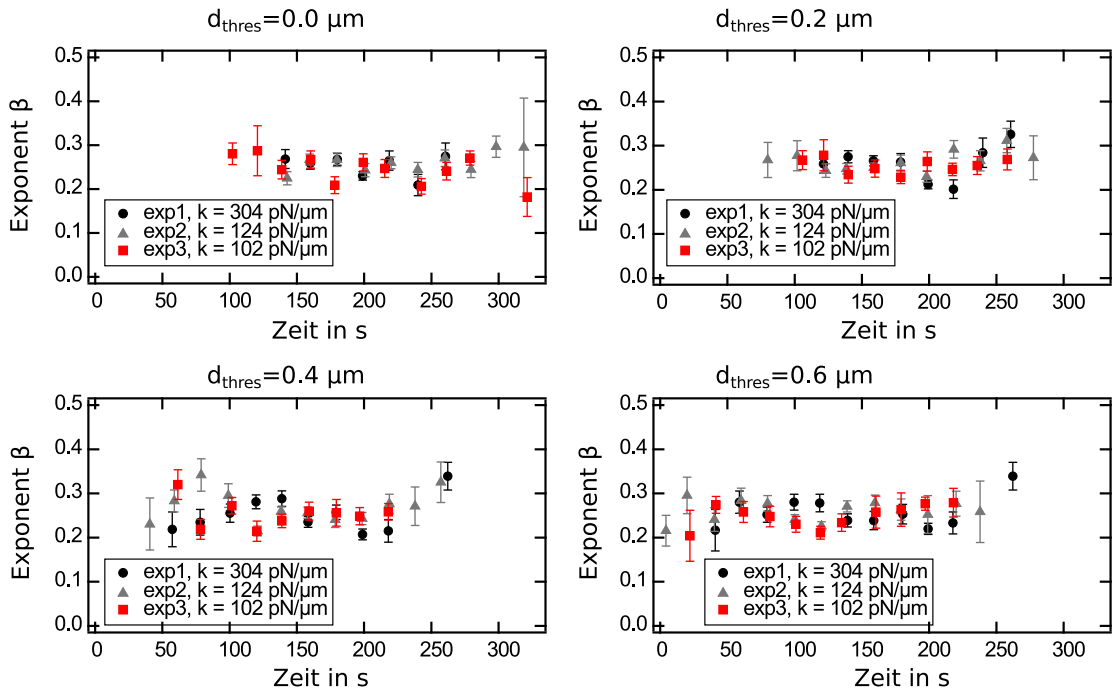


Abbildung G.3.: Power Law-Auswertung für verschiedene Zeitreskalierungen. Die berechneten Werte für Nachgiebigkeit (a) und *power law*-Exponenten (b) als Funktion der Zeit änderte sich für die in Abschnitt 5.3.2 diskutierten Experimente bei verschiedenen Mindestauslenkungen d_{thres} als Referenz für die Zeitreskalierung nicht wesentlich.

Abkürzungsverzeichnis

- OT** *Optical traps, optical tweezers*, optische Fallen, optische Pinzetten
- MT** *Magnetic traps*, magnetische Fallen
- AFM** *Atomic force microscope*, Rasterkraftmikroskop
- MTC** *Magnetic twisting cytometry*
- DIC** *Difference Interference Contrast*, Differenz-Interferenz-Kontrast Mikroskopie
- FRAP** *Fluorescence recovery after photobleaching*
- MP** *micro pipette*, Mikropipette
- N.A.** Numerische Apertur
- DOE** *Diffraction optical element*, diffraktives optisches Element
- SLM** *spatial light modulator*, räumlicher Licht-Modulator, Flächenlichtmodulator
- GS** *Gerchberg-Saxton-Algorithmus*
- GL** *Gratings And Lenses-Algorithmus*
- CytoD** *Cytochalasin D*
- AOM** *Acousto-optical modulator*, akustooptischer Modulator
- PFS** *Perfect Focus System*
- OFT** Optische Fourier-Transformation
- IgG** Immunoglobuline G, Antikörper der Gruppe G
- DPBS** *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*
- ROI** *Region of interest*, Referenzbild

Abbildungsverzeichnis

2.1. Techniken zur Mikromanipulation von Zellen und ihre wesentlichen Merkmale . . .	7
2.2. Prinzipskizze einer <i>single beam gradient trap</i>	8
2.3. Übersicht der Methoden zur Fallenkalibration	11
2.4. Erzeugung von Mehrfach-Fanggeometrien mittels GL-Algorithmus	16
2.5. Experimenteller Aufbau der magnetischen Pinzette	18
3.1. Skizze der Phasen der Fc γ -medierten Phagozytose	21
3.2. Aktinremodellierung und Rezeptormobilität während der Phagozytose	26
4.1. Experimenteller Aufbau der holografischen optischen Falle	30
4.2. Funktionsprinzip der mit einem SLM realisierten holografischen optischen Pinzette	35
4.3. Kalibration des SLM	37
4.4. Kraftprofil der optischen Falle	39
5.1. Zeitliche Entwicklung der Zellkonzentration auf den Deckgläsern	45
5.2. Qualitative Kontrolle der Partikel-Funktionalisierung	47
5.3. Prinzip des <i>tracking</i> -Algorithmus	48
5.4. Messreihe zur Bestimmung geeigneter CytoD-Konzentrationen	49
5.5. Prinzip der Messungen zur Bestimmung der Partikelinternalisierung	50
5.6. Bestimmung des Schwellwerts I_{Int} für erfolgreiche Partikelinternalisierung	51
5.7. Phagozytose-Effizienz der <i>J-774A.1</i> Zellen während der Phagozytose von 2 μm großen Partikeln	52
5.8. Prinzip der <i>blinking traps</i> Experimente	55
5.9. Zeitreihe eines <i>blinking traps</i> Experiments	56
5.10. Trajektorien des <i>blinking traps</i> Experiments aus Abbildung 5.9	59
5.11. Gleichzeitige Messung von Lasermodulation und Partikelrelaxation	61
5.12. Flussdiagramm der durch <i>live tracking</i> und <i>piezo stage</i> -Rückkopplung erweiterten <i>blinking traps</i> -Experimente	65
5.13. Phasen der <i>blinking traps</i> Experimente	67
5.14. Ruhephasen der Partikeltrajektorien	68
5.15. <i>blinking traps</i> Trajektorien	68
5.16. Zur Berechnung der Geschwindigkeiten $\Delta d(t)/\Delta t$ der <i>offset</i> -Werte $d_0(t)$	70
5.17. Ergebnisse der <i>blinking traps</i> -Experimente bei verschiedenen Fallensteifigkeiten . .	72
5.18. Ergebnisse der <i>blinking traps</i> -Experimente unter CytoD-Einfluss	73
5.19. <i>Blinking traps</i> -Experiment mit Erweiterung durch <i>live tracking</i> und <i>piezo stage</i> - Rückkopplung	74

Abbildungsverzeichnis

5.20. Steifigkeit $1/j_0$ als Funktion der Vorspannung σ	79
5.21. Skizze zur Probenpräparation zur Beobachtung der Zellen im Profil	81
5.22. DIC-Zeitserie eines Phagozytose-Experiments mit Beobachtung im Zellprofil	82
5.23. DIC-Zeitserie eines Phagozytose-Experiments mit Transportphase unter Beobachtung im Profil mit deutlichem Partikeltransport	83
5.24. Design der <i>magnetic tweezers</i> Experimente zur Phagosomauslenkung und Messung des Phagosomtransports	86
5.25. Abstandskurve des in Abbildung 5.24 gezeigten <i>magnetic tweezers</i> Experiments zur Messung des Phagosomtransports	88
5.26. Phagosomtransport unter CytoD-Einfluss	90
5.27. Übersicht der Experimente und Ergebnisse	94
B.1. Vollständiger experimenteller Aufbau	108
D.1. Kalibration der optischen Falle mittels Varianzanalyse und Berechnung des Leistungsspektrums	114
E.1. Bestimmung der Präzision des <i>tracking</i> -Algorithmus	116
F.1. Grafische Benutzeroberfläche der verwendeten <i>MatLab</i> -Routine zur Zell- und Partikeldetektion	118
F.2. Absolute Partikelzahlen zur Berechnung der Phagozytose-Effizienz	119
G.1. Ruhephasen der Partikeltrajektorien für geringere Partikelauslenkung	122
G.2. Zeitreskalierung der <i>blinking traps</i> Trajektorien	123
G.3. <i>Power Law</i> -Auswertung für verschiedene Zeitreskalierungen	124

Tabellenverzeichnis

2.1. Ausgewählte Kräfte auf der zellulären Ebene	6
4.1. Spezifikationen des SLM	34
5.1. Übersicht der blinking traps Experimentreihen	57
5.2. Korrelationskoeffizienten der Fitparameter der <i>blinking traps</i> -Experimente	73
5.3. Charakterisierung des Phagosomtransports	89
A.1. Übersicht der Mikroskopobjektive des <i>Nikon Eclipse Ti-E</i> Mikroskops und ihrer Eigenschaften	105
A.2. Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Kameras und ihrer Eigenschaften	105
A.3. Komponenten des <i>Nikon Eclipse Ti-E</i> Mikroskops und technische Details	106
B.1. Komponenten des experimentellen Aufbaus	109
D.1. Fallensteifigkeiten κ der verwendeten optischen Falle	113

Literaturverzeichnis

- [1] Albert Einstein. Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt. *Annalen der Physik*, 322(6):132–148, 1905. 1
- [2] Albert Einstein. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, 322(8):549–560, 1905. 1
- [3] Albert Einstein. Zur Elektrodynamik bewegter Körper. *Annalen der Physik*, 322(10):891–921, 1905. 1
- [4] Albert Einstein. Ist die Trägheit eines Körpers von seinem Energieinhalt abhängig? *Annalen der Physik*, 323(13):639–641, 1905. 1
- [5] Albert Einstein. Über Gravitationswellen. *Königlich Preußische Akademie der Wissenschaften (Berlin)*, pages 154–167, 1918. 1
- [6] Abbott et al. Observation of gravitational waves from a binary black hole merger. *Physical Review Letters*, 116(6):1–16, 2016. 1
- [7] Elias Metchnikoff. *Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation*. 1893. 1, 19
- [8] Alan Aderem and David M. Underhill. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology*, 17:593–623, 1999. 1, 2, 19, 20, 21, 22, 100
- [9] Joel A. Swanson. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(8):639–649, 2008. 1, 2, 19, 100
- [10] David M. Richards and Robert G. Endres. How cells engulf: a review of theoretical approaches to phagocytosis. *Rep. Prog. Phys.*, 80:1–20, 2017. 1, 2, 19, 23, 24, 100
- [11] Carlos Rosales and Eileen Uribe-Querol. Phagocytosis: A fundamental process in immunity. *BioMed Research International*, 2017, 2017. 2, 25, 76
- [12] Ronald S. Flannagan, Valentin Jaumouillé, and Sergio Grinstein. The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1):61–98, 2012. 2, 19, 21, 22, 100
- [13] Pablo Rougerie, Veronika Miskolci, and Dianne Cox. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunological Reviews*, 256(1):222–39, 2013. 2
- [14] Hans D. Ochs and Adrian J. Thrasher. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(4):725–738, 2006. 2, 28
- [15] Shigeru Tsuboi and Jennifer Meerloo. Wiskott-Aldrich syndrome protein is a key regulator of the phagocytic cup formation in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 282(47):34194–34203, 2007. 2, 28

- [16] Marc Herant, Volkmar Heinrich, and Micah Dembo. Mechanics of neutrophil phagocytosis: experiments and quantitative models. *Journal of cell science*, 119(4):1903–1913, 2006. 2, 5, 22, 24, 26
- [17] Matthias Irmscher, Arthur M. De Jong, Holger Kress, and Menno W. J. Prins. A method for time-resolved measurements of the mechanics of phagocytic cups. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(82):20121048, 2013. 2, 17, 24, 27, 28, 53, 74, 78, 96, 101, 102, 103
- [18] Pere Roca-Cusachs, Vito Conte, and Xavier Trepap. Quantifying forces in cell biology. *Nature Cell Biology*, 19(7):742–751, 2017. 5
- [19] Thomas Iskratsch, Haguy Wolfenson, and Michael P. Sheetz. Appreciating force and shape—the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12):825–833, 2014. 5
- [20] Paloma Rodríguez-Sevilla, Lucía Labrador-Páez, Daniel Jaque, and Patricia Haro-González. Optical trapping for biosensing: Materials and applications. *Journal of Material Chemistry B*, 5:9085–9101, 2017. 5
- [21] Devrim Kilinc and Gil U. Lee. Advances in magnetic tweezers for single molecule and cell biophysics. *Integrative Biology*, 6(1):27–34, 2014. 5, 17
- [22] Daniel J. Müller and Yves F. Dufrêne. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends in Cell Biology*, 21(8):461–469, 2011. 5
- [23] Yves F. Dufrêne, Toshio Ando, Ricardo Garcia, David Alsteens, David Martinez-Martin, Andreas Engel, Christoph Gerber, and Daniel J. Müller. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology*, 12(4):295–307, 2017. 5
- [24] Gerd Binnig, Calvin F. Quate, and Christoph Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56(9):930–933, 1986. 5
- [25] Martin Benoit and Hermann E. Gaub. Measuring cell adhesion forces with the atomic force microscope at the molecular level. *Cells Tissues Organs*, 172(3):174–189, 2002. 5
- [26] Ning Wang, James P. Butler, and Donald E. Ingber. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260(5111):1124 – 1127, 1993. 5, 17
- [27] Ben Fabry, Geoffrey N. Maksym, James P. Butler, Michael Glogauer, Daniel Navajas, Nathan A. Taback, Emil J. Millet, and Jeffrey J. Fredberg. Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Physical Review E*, 68(4):41914, 2003. 5
- [28] Jin-Yu Shao and Robert M. Hochmuth. Micropipette suction for measuring piconewton forces of adhesion and tether formation from neutrophil membranes. *Biophysical Journal*, 71(5):2892–2901, 1996. 5
- [29] Zheming Xia, Harry L. Goldsmith, and Theo G. M. van de Ven. Flow-induced detachment of red blood cells adhering to surfaces by specific antigen-antibody bonds. *Biophysical Journal*, 66(4):1222–1230, 1994. 5
- [30] Mark F. Coughlin, David D. Sohn, and Geert W. Schmid-Schönbein. Recoil and stiffening by adherent leukocytes in response to fluid shear. *Biophysical Journal*, 94(3):1046–1051, 2008. 5
- [31] Roop Mallik, Arpan K. Rai, Pradeep Barak, Ashim Rai, and Ambarish Kunwar. Teamwork in microtubule motors. *Trends in Cell Biology*, 23(11):575–582, 2013. 6, 23, 80
- [32] Matthew J. Footer, Jacob W. J. Kerssemakers, Julie A. Theriot, and Marileen Dogterom.

- Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7):2181–2186, 2007. 6
- [33] Steven M. Block, Charles L. Asbury, Joshua W. Shaevitz, and Matthew J. Lang. Probing the kinesin reaction cycle with a 2D optical force clamp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5):2351–2356, 2003. 6
- [34] Fang Kong, Andrés J. García, A. Paul Mould, Martin J. Humphries, and Cheng Zhu. Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *The Journal of Cell Biology*, 185(7):1275 – 1284, 2009. 6
- [35] Jason Wu, Raman Goyal, and Jörg Grandl. Localized force application reveals mechanically sensitive domains of Piezo1. *Nature Communications*, 7:12939, 2016. 6
- [36] David G. Glass, Niall McAlinden, Owain R. Millington, and Amanda J. Wright. A minimally invasive optical trapping system to understand cellular interactions at onset of an immune response. *PLOS ONE*, 12(12):e0188581, 2017. 6
- [37] Michelle D. Wang, Mark J. Schnitzer, Hong Yin, Robert Landick, Jeff Gelles, and Steven M. Block. Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science*, 282(5390):902 – 907, 1998. 6
- [38] Vincent T. Moy, Ernst L. Florin, and Hermann E. Gaub. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science*, 266(5183):257 – 259, 1994. 6
- [39] Gil U. Lee, Linda A. Chrisey, and Richard J. Colton. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science*, 266(5186):771– 773, 1994. 6
- [40] Michel Grandbois, Martin Beyer, Matthias Rief, Hauke Clausen-Schaumann, and Hermann E. Gaub. How strong is a covalent bond? *Science*, 283(5408):1727 – 1730, 1999. 6
- [41] Ben Fabry, Anna H. Klemm, Sandra Kienle, Tilman E. Schäffer, and Wolfgang H. Goldmann. Focal Adhesion Kinase stabilizes the cytoskeleton. *Biophysical Journal*, 101(9):2131–2138, 2011. 6, 17
- [42] Arthur Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical Review Letters*, 24(4):24–27, 1970. 6, 8
- [43] Arthur Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and Steven Chu. Observation of a single-beam gradient-force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, 11(5):288, 1986. 6, 8, 10
- [44] Stephanie H. Jones, Martin D. King, and Andrew D. Ward. Determining the unique refractive index properties of solid polystyrene aerosol using broadband Mie scattering from optically trapped beads. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(47):20735–20741, 2013. 6, 46, 58
- [45] Boris N. Khlebtsov, Vitaly A. Khanadeev, and Nikolai G. Khlebtsov. Spectroturbidimetric determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles. *Optics and Spectroscopy*, 105(5):732–738, 2008. 6
- [46] Arthur Ashkin, J. M. Dziedzic, and T Yamane. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330(6150):769–771, 1987. 6
- [47] Arthur Ashkin and J. M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235(4795):1517–1520, 1987. 6
- [48] Matthew J. Lang and Steven M. Block. Resource Letter: LBOT-1: Laser-based optical tweezers. *American Journal of Physics*, 71(3):201–215, 2003. 6
- [49] David G. Grier. A revolution in optical manipulation. *Nature*, 424(6950):810–816, 2003. 6, 8

- [50] Keir C. Neuman and Steven M. Block. Optical trapping. *The Review of Scientific Instruments*, 75(9):2787–2809, 2004. 6, 10, 11, 12, 13, 40
- [51] Holger Kress. *Cell mechanics during phagocytosis studied by optical tweezers-based microscopy*. Cuvillier, Göttingen, 2006. 6, 26
- [52] Anita Jannasch, Ahmet F. Demirörs, Peter D. J. van Oostrum, Alfons van Blaaderen, and Erik Schäffer. Nanonewton optical force trap employing anti-reflection coated, high-refractive-index titania microspheres. *Nature Photonics*, 6(June):469–473, 2012. 6
- [53] Steven M. Block, David F. Blair, and Howard C. Berg. Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers. *Nature*, 338:514, 1989. 6
- [54] Mark J. Schnitzer and Steven M. Block. Kinesin hydrolyses one ATP per 8 nm step. *Nature*, 388(July):386–390, 1997. 6
- [55] Holger Kress, Ernst H. K. Stelzer, Daniela Holzer, Folma Buss, Gareth Griffiths, and Alexander Rohrbach. Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(28):11633–11638, 2007. 6, 26
- [56] Hong Yin, Michelle D. Wang, Karel Svoboda, Robert Landick, Steven M. Block, and Jeff Gelles. Transcription against an applied force. *Science*, 270(5242):1653–1657, 1995. 8
- [57] Steven Chu, J. E. Bjorkholm, A. Ashkin, and A. Cable. Experimental observation of optically trapped atoms. *Physical Review Letters*, 57(3):314–317, 1986. 8
- [58] Mike Woerdemann, Konrad Berghoff, and Cornelia Denz. Dynamic multiple-beam counter-propagating optical traps using optical phase-conjugation. *Optics Express*, 18(21):22348, 2010. 8
- [59] Mike Woerdemann. *Structured light fields: Applications in optical trapping, manipulation, and organisation*. Springer Berlin Heidelberg, 2012. 8
- [60] Jennifer E. Curtis, Brian A. Koss, and David G. Grier. Dynamic holographic optical tweezers. *Optics Communications*, 207(1-6):169–175, 2002. 8, 13, 14, 15
- [61] Jesper Glückstad and Darwin Palima. *Light robotics: Structure-mediated nanobiophotonics*. Elsevier, 2017. 8
- [62] Arthur Ashkin and J. M. Dziedzic. Optical levitation by radiation pressure. *Applied Physics Letters*, 19(8):283–285, 1971. 8
- [63] Arthur Ashkin. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical Journal*, 61(2):569–582, 1992. 8, 10, 13
- [64] Arne Gennerich. *Optical tweezers methods and protocols*. Humana Press, 2017. 9
- [65] Yasuhiro Harada and Toshimitsu Asakura. Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime. *Optics Communications*, 124(5):529–541, 1996. 9
- [66] Alexander Rohrbach. Stiffness of optical traps: Quantitative agreement between experiment and electromagnetic theory. *Physical Review Letters*, 95(16):1–4, 2005. 9
- [67] Bahaa E. A. Saleh and Malvin C. Teich. *Fundamentals of photonics*. John Wiley & Sons, 2nd edition, 2007. 9, 14, 15, 33
- [68] Pavel Zemanek, Alexandr Jonas, Libor Sramek, and Miroslav Liska. Optical trapping of nanoparticles and microparticles. *Optics Letters*, 24(21):1448–1450, 1999. 10
- [69] Alexander Rohrbach and Ernst H. K. Stelzer. Trapping force, force constant, and poten-

- tial depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations. *Applied Optics*, 41(13):2494–2507, 2002. 10
- [70] Patrick C. Chaumet. Comment on “Trapping force, force constant, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations”. *Applied Optics*, 43(9):1825–1826, 2004. 10
- [71] Alexander Rohrbach, Holger Kress, and Ernst H. K. Stelzer. Reply to comment on “Trapping force, force constant, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations”. *Applied Optics*, 43(9):1827–1829, 2004. 10
- [72] Craig F. Bohren and Donald R. Huffman. *Absorption and scattering of light by small particles*. Wiley-VCH Verlag GmbH, New York, NY, 1998. 10
- [73] Gustav Mie. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*, 330(3):377–445, 1908. 10
- [74] Kishan Dholakia and Peter Reece. Optical micromanipulation. *Nano Today*, 1(August 2007):18–27, 2006. 10
- [75] David C. Appleyard, K. Y. Vandermeulen, H. Lee, and Matthew J. Lang. Optical trapping for undergraduates. *American Journal of Physics*, 75:5, 2007. 10
- [76] Frederick Reif. *Fundamentals of statistical and thermal physics*. McGraw-Hill, New York, 1965. 11
- [77] Frederick Gittes and Christoph F. Schmidt. Signals and noise in micromechanical measurements. *Methods in Cell Biology*, 55:129–156, 1998. 12
- [78] Norbert Wiener. Generalized harmonic analysis. *Acta Math.*, 55:117–258, 1930. 12
- [79] Kirstine Berg-Sørensen and Henrik Flyvbjerg. Power spectrum analysis for optical tweezers. *Review of Scientific Instruments*, 75(3):594–612, 2004. 12
- [80] Simon F. Nørrelykke and Henrik Flyvbjerg. Power spectrum analysis with least-squares fitting: amplitude bias and its elimination, with application to optical tweezers and atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 81(7):75103, 2010. 12
- [81] Robert M. Simmons, Jeffrey T. Finer, Steven Chu, and James A. Spudich. Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophysical Journal*, 70(April):1813–1822, 1996. 12, 13, 99
- [82] Nunzia Malagnino, Giuseppe Pesce, Antonio Sasso, and Ennio Arimondo. Measurements of trapping efficiency and stiffness in optical tweezers. *Optics Communications*, 214(1-6):15–24, 2003. 12, 13
- [83] John Happel and Howard Brenner. *Low reynolds number hydrodynamics*. Springer Netherlands, 1965. 12
- [84] Monica Tanase, Nicolas Biais, and Michael Sheetz. Magnetic tweezers in cell biology. *Methods in Cell Biology*, 83(07):473–493, 2007. 12, 17
- [85] Hilding Faxén. Der Widerstand gegen die Bewegung einer starren Kugel in einer zähen Flüssigkeit, die zwischen zwei parallelen ebenen Wänden eingeschlossen ist. *Annalen der Physik*, 373(10):89–119, 1922. 12
- [86] Ming-Tzo Wei, Jack Ng, C. T. Chan, and H. Daniel Ou-Yang. Lateral optical binding between two colloidal particles. *Scientific Reports*, 6:38883, 2016. 13
- [87] Jeffrey T. Finer, Robert M. Simmons, and James A. Spudich. Single myosin molecule me-

- chanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 368:113, 1994. 13
- [88] Mike Woerdemann, Stefan Gläser, Florian Hörner, André Devaux, Luisa D. De Cola, and Cornelia Denz. Dynamic and reversible organization of zeolite I crystals induced by holographic optical tweezers. *Advanced Materials*, 22(37):4176–4179, 2010. 13
- [89] Holger Kress, Jin-Gyu Park, Cecile O. Mejean, Jason D. Forster, Jason Park, Spencer S. Walse, Yong Zhang, Dianqing Wu, Orion D. Weiner, Tarek M. Fahmy, and Eric R. Dufresne. Cell stimulation with optically manipulated microspheres. *Nature Methods*, 6(12):905–909, 2009. 13, 27
- [90] Konrad Berghoff, Steve Keller, Wolfgang Gross, Lisa Gebhardt, and Holger Kress. Application of optical tweezers for biochemical and thermal cell stimulation. In Jesper Glückstad and Darwin Palima, editors, *Light Robotics: Structure-Mediated Nanobiophotonics*, pages 385–410. Elsevier, 2017. 13, 51, 117
- [91] R. Erik Holmlin, Michele Schiavoni, Clifford Y. Chen, Stephen P. Smith, Mara G. Prentiss, and George M. Whitesides. Light-driven microfabrication: assembly of multicomponent, three-dimensional structures by using optical tweezers. *Angewandte Chemie International Edition*, 39(19):3503–3506, 2000. 13
- [92] Koen Visscher and Steven M. Block. Versatile optical traps with feedback control. *Methods in Enzymology*, 298:460–489, 1998. 13
- [93] William H. Guilford, Joshua A. Tournas, Dragos Dascalu, and Douglas S. Watson. Creating multiple time-shared laser traps with simultaneous displacement detection using digital signal processing hardware. *Analytical Biochemistry*, 326(2):153–166, 2004. 13
- [94] Erik Faellman and Ove Axner. Design for fully steerable dual-trap optical tweezers. *Applied Optics*, 36(10):2107–2113, 1997. 13
- [95] René L. Eriksen, Paul C. Mogensen, and Jesper Glückstad. Multiple-beam optical tweezers generated by the generalized phase-contrast method. *Optics Letters*, 27(4):267, 2002. 13
- [96] Mike Woerdemann, Frank Holtmann, and Cornelia Denz. Holographic phase contrast for dynamic multiple-beam optical tweezers. *Journal of Optics A*, 11(3):34010, 2009. 13
- [97] Eric R. Dufresne and David G. Grier. Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics. *Review of Scientific Instruments*, 69(5):1974, 1998. 13
- [98] David G. Grier and Eric R. Dufresne. Apparatus for applying optical gradient forces - PATENT, 2000. 13
- [99] Marcus Reicherter, Thomas Haist, E. U. Wagemann, and Hans J. Tiziani. Optical particle trapping with computer-generated holograms written on a liquid-crystal display. *Optics Letters*, 24(9):608–610, 1999. 14
- [100] Jan Liesener, Marcus Reicherter, Tobias Haist, and Hans J Tiziani. Multi-functional optical tweezers using computer-generated holograms. *Optics Communications*, 185(1-3):77–82, nov 2000. 14, 15
- [101] Ralph W. Gerchberg and W. Owen Saxton. A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, 35(2), 1972. 14, 15
- [102] Michael A. Seldowitz, Jan P. Allebach, and Donald W. Sweeney. Synthesis of digital holograms by direct binary search. *Applied Optics*, 26(14):2788–2798, 1987. 14, 15
- [103] Christina Hesselring, Mike Woerdemann, Andreas Hermerschmidt, and Cornelia Denz. Con-

- trolling ghost traps in holographic optical tweezers. *Optics Letters*, 36(18):3657–3659, 2011. 15, 16, 102
- [104] Jennifer E. Curtis, Christian H. J. Schmitz, and Joachim P. Spatz. Symmetry dependence of holograms for optical trapping. *Optics Letters*, 30(16):2086–2088, 2005. 16
- [105] Mario Montes-Usategui, Encarnación Pleguezuelos, Jordi Andilla, and Estela Martín-Badosa. Fast generation of holographic optical tweezers by random mask encoding of Fourier components. *Optics Express*, 14(6):2101–2107, 2006. 16, 102
- [106] Timothy H. Boyer. The force on a magnetic dipole. *American Journal of Physics*, 56(8):688–692, 1988. 17
- [107] Francis H. C. Crick and Arthur F. W. Hughes. The physical properties of cytoplasm: A study by means of the magnetic particle method Part I. Experimental. *Experimental Cell Research*, 1(1):37–80, 1950. 17
- [108] Francis H. C. Crick. The physical properties of cytoplasm. A study by means of the magnetic particle method. Part II. Theoretical treatment. *Experimental Cell Research*, 1(4):505–533, 1950. 17
- [109] Philip Kollmannsberger and Ben Fabry. High-force magnetic tweezers with force feedback for biological applications. *Review of Scientific Instruments*, 78(11):1–6, 2007. 17, 76
- [110] Charbel Haber and Denis Wirtz. Magnetic tweezers for DNA micromanipulation. *Review of Scientific Instruments*, 71(12):4561–4570, 2000. 17
- [111] Terence R. Strick, Vincent Croquette, and David Bensimon. Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature*, 404(6780):901–904, 2000. 17
- [112] Ben Fabry, Geoffrey N. Maksym, James P. Butler, Michael Glogauer, Daniel Navajas, and Jeffrey J. Fredberg. Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters*, 87(c):1–4, 2001. 17
- [113] Peter A. Valberg and Henry A. Feldman. Magnetic particle motions within living cells. Measurement of cytoplasmic viscosity and motile activity. *Biophysical Journal*, 52(4):551–561, 1987. 17
- [114] Andreas R. Bausch, Florian Ziemann, Alexei A. Boulbitch, Ken Jacobson, and Erich Sackmann. Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophysical Journal*, 75(October):2038–2049, 1998. 17, 27
- [115] Hayden Huang, Jeremy Sylvan, Maxine Jonas, Rita Barresi, Peter T. C. So, Kevin P. Campbell, and Richard T. Lee. Cell stiffness and receptors: evidence for cytoskeletal subnetworks. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 288(1):72 – 80, 2005. 17, 27
- [116] Shashank Shekhar, Alessandra Cambi, Carl G. Figdor, Vinod Subramaniam, and Johannes S. Kanger. A method for spatially resolved local intracellular mechanochemical sensing and organelle manipulation. *Biophysical Journal*, 103(3):395–404, 2012. 17
- [117] Laurent Vonna, Agnès Wiedemann, Martin Aepfelbacher, and Erich Sackmann. Local force induced conical protrusions of phagocytic cells. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 5):785–790, 2003. 17, 26
- [118] Claudia Danilowicz, Derek Greenfield, and Mara Prentiss. Dissociation of ligand receptor complexes using magnetic tweezers. *Analytical Chemistry*, 77(10):3023–3028, 2005. 17
- [119] Christina Zahn, Steve Keller, M. Toro-Nahuelpan, Philipp Dorscht, Wolfgang Gross, Matthias Laumann, Stephan Gekle, Walter Zimmermann, Dirk Schüler, and Holger Kress. Measure-

- ment of the magnetic moment of single *Magnetospirillum Gryphiswaldense* cells by magnetic tweezers. *Scientific Reports*, 7(1):3558, 2017. 17, 18, 85
- [120] Matthias Irmscher, Arthur M. De Jong, Holger Kress, and Menno W. J. Prins. Probing the cell membrane by magnetic particle actuation and Euler angle tracking. *Biophysical Journal*, 102(3):698–708, 2012. 17
- [121] Steve Keller, Konrad Berghoff, and Holger Kress. Phagosomal transport depends strongly on phagosome size. *Scientific Reports*, 7(1):17068, 2017. 17, 84, 89, 90, 91, 92, 94, 103
- [122] Peter W. Reddien and H. Robert Horvitz. The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1):193–221, 2004. 19
- [123] Agnieszka M. Lichanska and David A. Hume. Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Experimental Hematology*, 28(6):601–611, 2000. 19
- [124] G. Vogel, L. Thilo, H. Schwarz, and R. Steinhart. Mechanism of phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*: phagocytosis is mediated by different recognition sites as disclosed by mutants with altered phagocytotic properties. *The Journal of Cell Biology*, 86(2):456–465, 1980. 19
- [125] Stefan H. E. Kaufmann. Immunology’s foundation: The 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nature Immunology*, 9(7):705–712, 2008. 19
- [126] Roman Volchenkov, Florian Sprater, Petra Vogelsang, and Silke Appel. The 2011 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Scandinavian Journal of Immunology*, 75(1):1–4, 2012. 19
- [127] Y Ishida, Y Agata, K Shibahara, and T Honjo. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal*, 11(11):3887–3895, nov 1992. 19
- [128] D R Leach, M F Krummel, and J P Allison. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5256):1734–1736, mar 1996. 19
- [129] Robin C. May and Laura M. Machesky. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 6):1061–1077, 2001. 19, 100
- [130] Sylvain Tollis, Anna E. Dart, George Tzircotis, and Robert G. Endres. The zipper mechanism in phagocytosis: energetic requirements and variability in phagocytic cup shape. *BMC Systems Biology*, 4(1):149, 2010. 19, 22, 24, 26, 28, 53, 74, 76, 100
- [131] Gregory J. Cannon and Joel A. Swanson. The macrophage capacity for phagocytosis. *Journal of Cell Science*, 101:907–913, 1992. 19
- [132] Andrew J. Rees. Monocyte and macrophage biology: An overview. *Seminars in Nephrology*, 30(3):216–233, 2010. 19
- [133] Michel Rabinovitch. Professional and non-professional phagocytes: An introduction. *Trends in Cell Biology*, 5(March):85–87, 1995. 20
- [134] Emil R. Unanue. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annual Review of Immunology*, (2):395–428, 1984. 20
- [135] Alan Aderem. Phagocytosis and the inflammatory response. *The Journal of Infectious Diseases*, 187:340 – 5, 2003. 20
- [136] William F. Martin, Aloysius G. M. Tielens, Marek Mentel, Sriram G. Garg, and Sven B. Gould. The physiology of phagocytosis in the context of mitochondrial origin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(3):e00008—17, 2017. 20

- [137] Andreas F. Schimper. *Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper*, volume 41. 1883. 20
- [138] William F. Martin, Sriram Garg, and Verena Zimorski. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1678), 2015. 20
- [139] Spencer A. Freeman and Sergio Grinstein. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological Reviews*, 262:193–215, 2014. 20, 22, 25, 26, 76, 100
- [140] Peter Antal-Szalmas, Jos A. Strijp, Annemarie J. Weersink, Jan Verhoef, and Kok P. Van Kessel. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 61(6):721–728, 1997. 21
- [141] Malini Raghavan and Pamela J. Bjorkman. Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12:181–220, 1996. 21
- [142] Karen A. Beningo and Yu-li Wang. Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *Journal of Cell Science*, 115:849–856, 2002. 21, 23, 24, 26
- [143] Erick García-García and Carlos Rosales. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 72:1092–1108, 2002. 21
- [144] Gestur Vidarsson, Gillian Dekkers, and Theo Rispens. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5:520, oct 2014. 21
- [145] Eileen Uribe-Quero and Carlos Rosales. Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Frontiers in Immunology*, 8(OCT):1–23, 2017. 21
- [146] Timothy J Foster. Immune evasion by staphylococci. *Nature Reviews Microbiology*, 3:948, 2005. 21
- [147] Siddhartha Jaiswal, Catriona H. M. Jamieson, Wendy W. Pang, Christopher Y. Park, Mark P. Chao, Ravindra Majeti, David Traver, Nico van Rooijen, and Irving L. Weissman. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*, 138(2):271–285, 2009. 21
- [148] Frank M. Griffin, Johanna A. Griffin, Judith E. Leider, and Samuel C. Silverstein. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *Journal of Experimental Medicine*, 142(5):1263–1282, 1975. 22
- [149] Elaine F. Corbett-Nelson, David Mason, John G. Marshall, Yves Collette, and Sergio Grinstein. Signaling-dependent immobilization of acylated proteins in the inner monolayer of the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 174(2):255–265, 2006. 22
- [150] Jeroen S. van Zon, George Tzircotis, Emmanuelle Caron, and Martin Howard. A mechanical bottleneck explains the variation in cup growth during FcγR phagocytosis. *Molecular systems biology*, 5(298):298, 2009. 22, 24, 26, 27, 28, 53, 77, 100, 103
- [151] Frank M. Griffin, Johanna A. Griffin, and Samuel C. Silverstein. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with Anti-Immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 144(3):788–809, 1976. 22
- [152] Lucero Sanchez, Yi Yi, and Yan Yu. Effect of partial PEGylation on particle uptake by macrophages. *Nanoscale*, 9(1):288–297, 2017. 22, 76, 102, 103

- [153] Julie A. Champion and Samir Mitragotri. Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13):4930–4934, 2006. 22, 24, 26
- [154] Julie A. Champion, Amanda Walker, and Samir Mitragotri. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharmaceutical Research*, 25(8):1815–1821, 2008. 22, 24, 26
- [155] David M. Richards and Robert G. Endres. The mechanism of phagocytosis: Two stages of engulfment. *Biophysical Journal*, 107(7):1542–1553, 2014. 22, 24
- [156] Roni Levin, Sergio Grinstein, and Johnathan Canton. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. *Immunological Reviews*, 273(1):156–179, 2016. 23, 24
- [157] Joel A. Swanson, Melissa T. Johnson, Karen Beningo, Penny Post, Mark Mooseker, and Nobukazu Araki. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *Journal of Cell Science*, 112(3):307 – 316, 1999. 23
- [158] Lee-Ann H. Allen and Alan Aderem. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(3):829–840, 1995. 23
- [159] Alan Pitt, Luis S. Mayorga, Philip D. Stahl, and Alan L. Schwartz. Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. *Journal of Clinical Investigation*, 90(5):1978–1983, 1992. 23
- [160] Otilia V. Vieira, Roberto J. Botelho, and Sergio Grinstein. Phagosome maturation: aging gracefully. *The Biochemical journal*, 366(Pt 3):689–704, 2002. 23, 24, 28, 43, 84, 92, 100
- [161] Isabelle Vergne, Patricia Constant, and Gilbert Lan elle. Phagosomal pH determination by dual fluorescence flow cytometry. *Analytical Biochemistry*, 255(1):127–132, 1998. 23
- [162] Jason M. Kinchen and Kodi S. Ravichandran. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(10):781–795, 2008. 23
- [163] Philip D’Arcy Hart, Jane A. Armstrong, Carolyn A. Brown, and Philip Draper. Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria. *Infection and Immunity*, 5(5):803–807, 1972. 23, 24
- [164] Markus A. Horwitz. The Legionnaires’ disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 158(6):2108–2126, 1983. 23, 24
- [165] Michel Desjardins, Lukas A. Huber, Robert G. Parton, and Gareth Griffiths. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *Journal of Cell Biology*, 124(5):677–688, 1994. 23, 43
- [166] Ashim Rai, Divya Pathak, Shreyasi Thakur, Shampa Singh, Alok Kumar Dubey, and Roop Mallik. Dynein clusters into lipid microdomains on phagosomes to drive rapid transport toward lysosomes. *Cell*, 164(4):722–734, 2016. 23, 80, 92
- [167] Atsuko Toyohara and Kozo Inaba. Transport of phagosomes in mouse peritoneal macrophages. *Journal of Cell Science*, 94 (Pt 1):143–153, 1989. 23, 24
- [168] Winfried M ller, Iku Nemoto, Takeo Matsuzaki, Thomas Hofer, and Joachim Heyder. Magnetic phagosome motion in J774A.1 macrophages: influence of cytoskeletal drugs. *Biophysical Journal*, 79(2):720–730, 2000. 23, 24
- [169] Andrea Jahraus, Morten Egeberg, Bernhard Hinner, Anja Habermann, Erich Sackman, Arnd

- Pralle, Heinz Faulstich, Vladimir Rybin, Hélène Defacque, and Gareth Griffiths. ATP-dependent membrane assembly of F-Actin facilitates membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 12(1):155–170, 2001. 23, 24
- [170] Alaa Amash, Lin Wang, Yawen Wang, Varsha Bhakta, Gregory D. Fairn, Ming Hou, Jun Peng, William P. Sheffield, and Alan H. Lazarus. CD44 antibody inhibition of macrophage phagocytosis targets Fcγ Receptor– and Complement Receptor 3– dependent mechanisms. *The Journal of Immunology*, 196(8):3331 – 3340, 2016. 24
- [171] Mauricio Alvarez and Arturo Casadevall. Phagosome extrusion and host-cell survival after cryptococcus Neoformans phagocytosis by macrophages. *Current Biology*, 16(21):2161–2165, 2006. 24
- [172] Cameron C. Scott, Roberto J. Botelho, and Sergio Grinstein. Phagosome maturation: A few bugs in the system. *The Journal of Membrane Biology*, 193(3):137–152, 2003. 24
- [173] Marco Fritzsche, Alexandre Lewalle, Tom Duke, Karsten Kruse, and Guillaume Charras. Analysis of turnover dynamics of the submembranous actin cortex. *Molecular Biology of the Cell*, 24(6):757–767, 2013. 25, 78
- [174] Akihiro Kusumi and Yasushi Sako. Cell surface organization by the membrane skeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 8(4):566–574, 1996. 25, 26
- [175] Akihiro Kusumi, Takahiro K. Fujiwara, Rahul Chadda, Min Xie, Taka A. Tsunoyama, Ziya Kalay, Rinshi S. Kasai, and Kenichi G. N. Suzuki. Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: Commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson’s fluid-mosaic model. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1):215–250, 2012. 25
- [176] Volkmar Heinrich. Controlled one-on-one encounters between immune cells and microbes reveal mechanisms of phagocytosis. *Biophysical Journal*, 109(3):469–476, 2015. 26
- [177] Holger Kress, Ernst Stelzer, Gareth Griffiths, and Alexander Rohrbach. Control of relative radiation pressure in optical traps: Application to phagocytic membrane binding studies. *Physical Review E*, 71(6):1–10, 2005. 26
- [178] Schanila Nawaz, Paula Sánchez, Kai Bodensiek, Sai Li, Mikael Simons, and Iwan A. T. Schaap. Cell visco-elasticity measured with AFM and optical trapping at sub-micrometer deformations. *PLOS ONE*, 7(9):e45297, 2012. 27
- [179] Philip Kollmannsberger and Ben Fabry. Linear and nonlinear rheology of living cells. *Annual Review of Materials Research*, 41(1):75–97, 2011. 27, 53, 62, 77, 101
- [180] Hiroaki Kojima, Akihiko Ishijima, and Toshio Yanagida. Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26):12962–12966, 1994. 27
- [181] Marc Herant, Volkmar Heinrich, and Micah Dembo. Mechanics of neutrophil phagocytosis: behavior of the cortical tension. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 9):1789–1797, 2005. 27, 81
- [182] Margaret L. Gardel, Fumihiko Nakamura, John H. Hartwig, John C. Crocker, Thomas P. Stossel, and David A. Weitz. Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(6):1762–1767, 2006. 27, 54, 77, 78, 79, 96, 101
- [183] Philip Kollmannsberger, Claudia Tanja Mierke, and Ben Fabry. Nonlinear viscoelasticity of

- adherent cells is controlled by cytoskeletal tension. *Soft Matter*, 7(7):3127–3132, 2011. 27, 53, 54, 62, 77, 78, 79, 96, 101
- [184] Arpan K. Rai, Ashim Rai, Avin J. Ramaiya, Rupam Jha, and Roop Mallik. Molecular adaptations allow dynein to generate large collective forces inside cells. *Cell*, 152(1-2):172–182, 2013. 27, 92
- [185] John A. Cooper. Effects of cytochalasin on actin filaments. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 37(0):585–593, 1987. 28, 48
- [186] Kazuyasu Shoji, Kazumasa Ohashi, Kaori Sampei, Masato Oikawa, and Kensaku Mizuno. Cytochalasin D acts as an inhibitor of the actin-cofilin interaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424(1):52–57, 2012. 28, 48
- [187] Tetsuro Wakatsuki, Bill Schwab, Nathan C. Thompson, and Elliot L. Elson. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *Journal of Cell Science*, 114(5):1025–1036, 2001. 28, 48
- [188] Drazen Raucher and Michael P. Sheetz. Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophysical Journal*, 77(4):1992–2002, 1999. 28
- [189] Bruno Pontes, Nathan B. Viana, Leonarde T. Salgado, Marcos Farina, Vivaldo Moura-Neto, and H. Moyses Nussenzveig. Cell cytoskeleton and tether extraction. *Biophysical Journal*, 101(1):43–52, 2011. 28
- [190] Palo Alto. Inhibition of phagocytosis and plasma membrane mobility of the cultivated macrophage by cytochalasin B. Role of subplasmalemmal microfilaments. *Journal of Cell Biology*, 62(7):647–659, 1974. 28
- [191] Jack Taunton, Brian A. Rowning, Margaret L. Coughlin, Michael Wu, Randall T. Moon, Timothy J. Mitchison, and Carolyn A. Larabell. Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-Wasp. *The Journal of Cell Biology*, 148(3):519 – 530, 2000. 28
- [192] Jack Taunton. Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(1):85–91, 2001. 28
- [193] Fangliang Zhang, Frederick S. Southwick, and Daniel L Purich. Actin-based phagosome motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 53(2):81–88, 2002. 28, 92, 96, 100
- [194] Nobukazu Araki. Role of microtubules and myosins in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library*, 11:1479–1490, 2006. 28, 92, 96, 100
- [195] Thierry Soldati and Manfred Schliwa. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7:897, 2006. 28, 92, 96
- [196] Chihung H. Lin, Enilza M. Espreafico, Mark S. Mooseker, and Paul Forscher. Myosin drives retrograde F-Actin flow in neuronal growth cones. *Neuron*, 16(4):769–782, 1996. 28, 92, 96
- [197] Wolfgang Groß. *Implementierung von Zugkraftmikroskopie mithilfe von Polyacrylamidgelen*. Master thesis, University of Bayreuth, 2014. 31
- [198] Lisa Gebhardt. *Implementierung Fluoreszenz-basierter Mikrothermometrie zur Untersuchung von Zellen in Temperaturgradienten*. Master thesis, University of Bayreuth, 2015. 31
- [199] Keir C. Neuman, Edmund H. Chadd, Grace F. Liou, Kevin Bergman, and Steven M. Block. Characterization of photodamage to escherichia coli in optical traps. *Biophysical Journal*, 77(5):2856–2863, 1999. 32

- [200] BNS. *SLM XY Phase Series - data sheet*. www.bnonlinear.com, 2018. 34, 111
- [201] Adal Sabri. *Cellular decision making during phagocytosis*. Master thesis, University of Bayreuth, 2015. 36, 37, 112
- [202] Nikon. *CFI Apochromat λ S Serie - data sheet*. www.nikoninstruments.com, 2018. 38
- [203] Magdalena Haaf. *Optimierung und Charakterisierung einer magnetischen Pinzette zur Messung intrazellulärer Transportkräfte*. Bachelor thesis, University of Bayreuth, 2017. 38
- [204] Wilhelm Oswald. *Grundriss der allgemeinen Chemie*. Engelmann, W., Leipzig, 1890. 38
- [205] Nian-Sheng Cheng. Formula for the viscosity of a glycerol - water mixture. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(7):3285–3288, 2008. 38
- [206] Halina Rubinsztein-Dunlop, Timo A. Nieminen, Marlies E. J. Friese, and Norman R. Heckenberg. Optical trapping of absorbing particles. In *Advances in Quantum Chemistry*, volume 30, pages 469–492. Academic Press, 1998. 40
- [207] Florian Hoerner, Mike Woerdemann, Stephanie Mueller, Berenike Maier, and Cornelia Denz. Full 3D translational and rotational optical control of multiple rod-shaped bacteria. *Journal of Biophotonics*, 3(7):468–475, 2010. 40, 102
- [208] Peter Ralph, John Prichard, and Melvin Cohn. Reticulum cell sarcoma: An effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. *The Journal of Immunology*, 114(2 Part 2):898 – 905, 1975. 43
- [209] Peter Ralph and Ilona Nakoinz. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature*, 257:393, 1975. 43
- [210] Jonathan Lam, Marc Herant, Micah Dembo, and Volkmar Heinrich. Baseline mechanical characterization of J774 macrophages. *Biophysical Journal*, 96(1):248–254, 2009. 43
- [211] DSMZ. *J-774A.1 cellline - data sheet*. www.dsmz.de, 2018. 43
- [212] Simona C Baicu and Michael J Taylor. Acid–base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature: new parameters for comparing buffer capacity and efficiency. *Cryobiology*, 45(1):33 – 48, 2002. 44
- [213] Charles A. Janeway Jr, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J. Shlomchik. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. Garland Science, New York, 2001. 46
- [214] David Karlsson, Guido Zacchi, and Anders Axelsson. Electronic speckle pattern interferometry: A tool for determining diffusion and partition coefficients for proteins in gels. *Biotechnology Progress*, 18(6):1423–1430, 2002. 46
- [215] John P Lewis. Fast template matching. *Vision Interface*, 95:120–123, 1995. 47
- [216] Paul S. Grassia, E. John Hinch, and Ludwig C. Nitsche. Computer simulations of Brownian motion of complex systems. *Journal of Fluid Mechanics*, 282(-1):373–403, 1995. 47, 115
- [217] Gareth Loy and Alexander Zelinsky. Fast radial symmetry for detecting points of interest. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 25(8):959–973, 2003. 48
- [218] Coralie Fouquet, Jean-François Gilles, Nicolas Heck, Marc Dos Santos, Richard Schwartzmann, Vidjeacoumary Cannaya, Marie-Pierre Morel, Robert Stephen Davidson, Alain Trembleau, and Susanne Bolte. Improving axial resolution in confocal microscopy with new high refractive index mounting media. *PLOS ONE*, 10(3):e0121096, 2015. 52
- [219] Huajian Gao, Wendong Shi, and Lambert B Freund. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

- 102(27):9469–9474, 2005. 53
- [220] John G. Proakis and Dimitris K. Manolakis. *Digital signal processing*. Pearson Education Limited, 2013. 58, 64
- [221] AA Opto-Electronic. *MT110 AOM - data sheet*. www.aaoptoelectronic.com, 2018. 62, 109
- [222] Martial Balland, Nicolas Desprat, Delphine Icard, Sophie Féréol, Atef Asnacios, Julien Browaes, Sylvie Hénon, and François Gallet. Power laws in microrheology experiments on living cells: Comparative analysis and modeling. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 74(2):1–17, 2006. 62, 77
- [223] Pinggen Cai, Yusuke Mizutani, Masahiro Tsuchiya, John M. Maloney, Ben Fabry, Krystyn J. Van Vliet, and Takaharu Okajima. Quantifying cell-to-cell variation in power-law rheology. *Biophysical Journal*, 105(5):1093–1102, 2013. 62, 77
- [224] Ludwig Fahrmeir, Christian Heumann, Rita Künstler, Iris Pigeot, and Gerhard Tutz. *Statistik - Der Weg zur Datenanalyse*. Springer Berlin Heidelberg, 8 edition, 2016. 63
- [225] Student. The probable error of a mean. *Biometrika*, 6(1):1–25, 1908. 63, 87
- [226] Astrid Magenau, Carola Benzing, Nicholas Proschogo, Anthony S. Don, Leila Hejazi, Denuja Karunakaran, Wendy Jessup, and Katharina Gaus. Phagocytosis of IgG-coated polystyrene beads by macrophages induces and requires high membrane order. *Traffic*, 12(12):1730–1743, 2011. 74
- [227] Tania Patiño, Jorge Soriano, Leonard Barrios, Elena Ibáñez, and Carme Nogués. Surface modification of microparticles causes differential uptake responses in normal and tumoral human breast epithelial cells. *Scientific Reports*, 5(May):1–12, 2015. 76, 103
- [228] Wolfgang Helfrich. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Zeitschrift für Naturforschung. Teil C: Biochemie, Biophysik, Biologie, Virologie*, 28(11):693–703, 1973. 77, 103
- [229] Achim Guckenberg and Stephan Gekle. Theory and algorithms to compute Helfrich bending forces: A review. *Journal of Physics Condensed Matter*, 29(20), 2017. 77, 103
- [230] Guillaume Lenormand, Emil Millet, Ben Fabry, James P. Butler, and Jeffrey J. Fredberg. Linearity and time-scale invariance of the creep function in living cells. *Journal of the Royal Society Interface*, 1(1):91–97, 2004. 78
- [231] Andrew G. Clark, Kai Dierkes, and Ewa K. Paluch. Monitoring actin cortex thickness in live cells. *Biophysical Journal*, 105(3):570–580, 2013. 78
- [232] Andreas R. Bausch, Winfried Möller, and Erich Sackmann. Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophysical Journal*, 76(1):573–579, 1999. 80
- [233] Geir Fønnum, Christer Johansson, Astrid Molteberg, Steen Mørup, and Elin Aksnes. Characterisation of Dynabeads® by magnetization measurements and Mössbauer spectroscopy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1):41–47, 2005. 85
- [234] Robert P. Erickson, Zhiyuan Jia, Steven P. Gross, and Clare C. Yu. How molecular motors are arranged on a cargo is important for vesicular transport. *PLoS Computational Biology*, 7(5), 2011. 92
- [235] Regina Pacitto, Isabella Gaeta, Joel A Swanson, and Sei Yoshida. CXCL12-induced macrophage pinocytosis modulates two distinct pathways to activate mTORC1 in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(3):683–692, 2017. 103

- [236] Dianne Cox, Peter Chang, Qing Zhang, P Gopal Reddy, Gary M. Bokoch, and Steven Greenberg. Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(9):1487–1494, 1997. 103
- [237] Keiko Ohsawa, Y Imai, H Kanazawa, Y Sasaki, and S Kohsaka. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *Journal of Cell Science*, 113:3073–3084, 2000. 103
- [238] Prerna C. Patel and Rene E. Harrison. Membrane ruffles capture C3bi-opsonized particles in activated macrophages. *Molecular Biology of the Cell*, 19(11):4628–4639, 2008. 103

Die Zahlen nach dem Jahr der Veröffentlichung am Ende der jeweiligen Quellenangabe zeigen die Seitenzahlen der Seiten dieser Arbeit an, auf denen die entsprechende Quelle referenziert wurde.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen

Steve Keller, Konrad Berghoff und Holger Kress

Phagosomal transport depends strongly on phagosome size

Scientific Reports, 7(1):17068, 2017

Konrad Berghoff, Steve Keller, Wolfgang Gross, Lisa Gebhardt und Holger Kress

Application of Optical Tweezers for Biochemical and Thermal Cell Stimulation

Light Robotics: Structure-Mediated Nanobiophotonics, Seiten 385–410. Elsevier, 2017

Mike Woerdemann, Konrad Berghoff und Cornelia Denz

Dynamic multiple-beam counterpropagating optical traps using optical phase-conjugation

Optics Express, 18(21):22348, 2010

Ausgewählte Konferenzbeiträge

Konrad Berghoff, Steve Keller und Holger Kress

Investigating actin mechanics during phagocytic uptake and transport

Poster, Biophysical Society 61th Annual meeting, New Orleans, USA (2017)

Konrad Berghoff, Steve Keller und Holger Kress

Cellular mechanics at the onset of phagocytosis

Poster, DPG-Frühjahrstagung 2015, Berlin (2015)

Konrad Berghoff, Yoko Nakano, Patricia Dankers, Leo van IJzendoorn, Bert Meijer und Holger Kress

Actin and membrane contributions to the micromechanics of cell adhesions

Vortrag, DPG-Frühjahrstagung 2013, Regensburg (2013)

Publikationen und Konferenzbeiträge

Konrad Berghoff, Yoko Nakano, Patricia Dankers, Leo van IJzendoorn, Bert Meijer und Holger Kress

Mechanics of Integrin Bonds and Integrin-bound Cytoskeleton and Membrane Structures

Poster, DPG Summer school on actin dynamics 2012, Bad Honnef (2012)

Konrad Berghoff, Mike Woerdemann und Cornelia Denz

Multiple Traps and Complex Trapping Geometries by Dynamic Phase-Conjugate Counter-Propagating Optical Traps

Poster, Annual Dutch meeting on Molecular and Cellular Biophysics, Veldhoven, Niederlande (2011) und JPK 10th Annual International Symposium on SPM & Optical Tweezers for Life Sciences, Berlin (2011)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist das Ergebnis einer Vielzahl von Diskussionen, Kooperationen und Ratschlägen, von Unterstützung und Motivation und wäre ohne diese niemals entstanden!

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Holger Kress für eine kreative, produktive und angenehme Arbeitsatmosphäre, zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen und neue Ideen. Vielen Dank, Holger, für die Möglichkeit, an spannender wissenschaftlicher Forschung mitzuwirken, für deine Unterstützung und dein Vertrauen! Danke, dass mir die Ehre gebührt, dein erster promovierter Doktorand zu sein!

Ebenfalls möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Matthias Weiss für unkomplizierte Labor- und Mikroskopnutzung, kurze Dienstwege und klare Worte bedanken. Lieber Matthias, vielen Dank für die Zweitbegutachtung meiner Doktorarbeit!

Ich bedanke mich außerdem bei Prof. Dr. Stephan Gekle und Prof. Dr. Axel Enders für das aufrichtige Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Vorsitzenden und des dritten Prüfers für meine Verteidigung.

Unseren technischen Assistentinnen Christina, Andrea und Kathrin danke ich für schnelle Hilfe und tatkräftige Unterstützung im ständigen Kampf um das Wohlergehen unserer Zellen. Fast immer haben wir gewonnen!

Ein riesiger Dank geht an die Doktoranden der Arbeitsgruppe Biologische Physik! Lieber Steve, vielen Dank für die unzähligen gemeinsam im Labor verbrachten Stunden mit Auf- und Umbauen, Justieren, Kalibrieren, Experimentieren, Messen, Fehlersuchen und -beheben! Auch in unserem Büro konnten wir uns stets tatkräftig bei der Belehrung, Erziehung und nötigenfalls auch beim Tadeln diverser Bachelor-, Master-, oder anderweitiger Studenten unterstützen. Lieber Wolfgang, vielen Dank für lange Diskussionen über Blinking und Co. und das „mal eben schnelle“ Lösen von MatLab-Problemen! Lieber Adal, vielen Dank für das gemeinsame Lüften der Geheimnisse der SLM-Ansteuerung und die Geduld bei den Kalibrationsmessungen! Lieber Manuel, vielen Dank für die Unterstützung im Labor und in der Zellkultur! In deiner Aufgabe als HOT-Super-User wirst du dich deines Vorgängers als würdig erweisen! Liebe Anja, vielen Dank für das Vertreten des biologischen Standpunktes unter lauter Physikern und fürs „Zellen Machen“! Lieber Simon, vielen Dank für die Unterstützung bei der Arbeit an der magnetischen Pinzette und für Diskussionen über Physik oder Musik!

Danke, liebe langjährige und ehemalige Lehrstuhlkollegen, insbesondere Lorenz, Rolf, Struntz, Genot, Julia, Olli, Andi, Claudia, Specki, Pierre, Mithun! Aus den weit entfernten Niederlanden kommend konnte ich in der oberfränkischen Provinz schnell Anschluss finden und viele neue, weit über die Arbeit hinausgehende Freundschaften schließen. Allen meinen im weiten Sinne „bayreuther“ Freunden danke ich für gelegentliche Ablenkung und gemeinsame Unternehmungen.

Danksagung

Ganz besonders danke ich meinen Eltern Anne und Josef Berghoff. Ihr habt mich in allen Phasen der Promotion unterstützt, an mich geglaubt und hattet offene Ohren für die Sorgen und Nöten eines Doktoranden. Danke!

Liebe Silvie, vielen Dank für deine Motivationskunst, das Kümmern um mein leibliches und seelisches Wohl und dafür, dass du dir auch noch den x-ten Probevortrag mit guter Laune über dich hast ergehen lassen! Ich liebe dich.

Versicherung an Eides statt

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 beziehungsweise -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.

Bayreuth, den 21.11.2018

Konrad Berghoff