

**Zellbiologische Aspekte der Motilität von
Trypanosoma brucei unter Berücksichtigung
der Interaktion mit der Mikroumwelt**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Niko Heddergott

geboren in München

Würzburg, Dezember 2010



Eingereicht am: 20.01.2011

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Engstler

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: 18.05.2011

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsübersicht	Seite
1. Summary / Zusammenfassung	7
2. Verwendete Abkürzungen	10
3. Thematischer Hintergrund	13
3.1 Cilien und Flagellen dienen nicht nur der Motilität von Zellen	13
3.2 Der molekulare Aufbau von Cilien und Flagellen	13
3.3 Modelle der Regulation des Flagellarschlages	16
3.4 Ciliendefekte sind assoziiert mit zahlreichen Krankheiten	17
3.5 Die Auswirkungen der kleinen Reynoldszahlen	18
3.6 Trypanosomen als Modellsystem	19
3.7 Besonderheiten des Flagellums der Trypanosomen	22
3.8 Die Motilität ist essentiell für Trypanosomen	24
3.9 Das Herz-Kreislauf-System - der Lebensraum der Trypanosomen	25
3.10 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke	27
4. Motivation der Arbeit	30
5. Ergebnisse	31
5.1 Entwicklung einer Methode zur Analyse der Bewegung basierend auf automatisierter Fluoreszenzmikroskopie	31
5.2 Quantitatifizierung der Bewegung von Trypanosomenpopulationen	39
5.2.1 Die Mehrzahl der Blutstromformen taumelt in Zellkulturmedium	39
5.2.2 Geschwindigkeitsverteilung innerhalb einer Population	40
5.2.3 Messung der Persistenz	41
5.2.4 Ermittlung der Direktionalität	43
5.2.5 Taumelphasen führen zu einer Umorientierung und Änderung der Schwimmrichtung	43
5.2.6 Analyse des Ausbreitungsverhaltens	44
5.2.7 Ausbreitung im dreidimensionalen Raum ohne Vorzugsrichtung	45
5.2.8 Modellierung des Ausbreitungsverhaltens	47

5.3 Analyse der Bewegung mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung	48
5.3.1 Gerichtet schwimmende BSF Trypanosomen rotieren entlang ihrer Längsachse	48
5.3.2 Die Ursache des Taumelns ist eine Umkehr der Flagellarschlagrichtung	59
5.4 Herstellung rekombinanter Zelllinien	61
5.5 Die Rolle des Flagellums bei Zellzyklus und Entwicklung	64
5.6 Vergleich der Motilität verwandter Trypanosomenarten	67
5.7 Der Einfluss der Mikroumwelt auf die Bewegung	68
5.7.1 Blutstromformen schwimmen persistent in Blut und taumeln in Zellkulturmedium	68
5.7.2 Gerichtetes Schwimmen bei hoher Erythrozytenkonzentration	70
5.7.3 Blutstromformen schwimmen schneller in Blut als in Zellkulturmedium	72
5.7.4 Vergleich der Viskosität von Zellkulturmedium und Blut	72
5.7.5 Die Zugabe von Methylcellulose erhöht die Motilität der Blutstromformen	75
5.7.6 Ein Zellkulturmedium für die Untersuchung der Motilität	79
5.7.7 Die Motilität der Insektenstadien ist besser an nieder-viskoses Medium angepasst als bei den Blutstromformen	80
5.7.8 Der Einfluss der Temperatur auf das Schwimmverhalten	81
5.7.9 Untersuchung der Motilität in Kollagennetzwerken	82
5.7.10 Untersuchung der Bewegung in Anordnungen von Mikrostrukturen	84
5.7.11 Ausschluss der Trypanosomen aus dichten Pillarwäldern	89
5.7.12 Die Mikroumgebung bestimmt die Schwimmrichtung	89
5.7.13 Direktionale Bewegung in engen Mikrokanälen	91
5.8 Der Einfluss hydrodynamischer Effekte	95
5.8.1 Orientierung der Trypanosomen relativ zur Flussrichtung	95
5.8.2 Laterale Verteilung von Trypanosomen und Erythrozyten im Mikrokanal unter Flussbedingungen	98
6. Diskussion	101
6.1 Wie schwimmen Trypanosomen?	101

6.1.1 Schnell und gerichtet schwimmende Trypanosomen rotieren um ihre Längsachse	102
6.1.2 Der Vorteil einer nicht-reziproken Rotationsbewegung	103
6.1.3 Frei schwimmende Trypanosomen zeigen kein kooperatives Schwimmverhalten	104
6.2 Der Einfluss der Mikroumwelt auf die Motilität der Trypanosomen	105
6.2.1 Der Einfluss der Viskosität	105
6.2.2 Der Einfluss der Mikroumwelt auf die Schwimmrichtung	106
6.2.3 Der Einfluss der Temperatur auf die Bewegung	107
6.3 Die Hydrodynamik des Blutes	108
6.3.1 In vivo sind Trypanosomen starken Scherkräften ausgesetzt	109
6.4 Warum schwimmen Trypanosomen?	112
6.4.1 Ausbreitung im Wirt	112
6.4.2 Strömungsinduzierte Sortierung von Membranproteinen	113
6.5 Trypanosomen als Modellsystem für die Evolution zellulärer Motilität	117
7. Material und Methoden	118
7.1 Material	118
7.1.1 Verwendete Kameras für die Mikroskopie	118
7.1.2 Verwendete Zellen	118
7.1.3 Materialien für die Klonierung	120
7.1.4 Standard-Pufferlösungen	121
7.1.5 Antikörper	122
7.1.6 Chemikalienliste	123
7.2 Methoden	125
7.2.1 Ermittlung von Trajektorien, Geschwindigkeiten und Distanzen	125
7.2.2 Chemische Färbung von Trypanosomen	126
7.2.3 Herstellung transgener Fluoreszenz-markierter Zelllinien	126
7.2.4 Zellzyklusanalyse	127
7.2.5 Immobilisierung von Zellen auf beschichteten Objektträgern	127

7.2.6 Photolithographische Herstellung von PDMS-Mikrostrukturen	128
7.2.7 Mikrofluidische Experimente	130
7.2.8 Experimente mit geordneten Mikrostrukturen (Pillars)	132
7.2.9 Holographie	133
7.2.10 Selektion auf gerichtet schwimmende Zellen	134
7.2.11 Isolierung von Blutzellen	135
8. Literaturverzeichnis	136
9. Anhang	148
9.1 Erklärungen gem. §4 (3) der Promotionsordnung	149
9.2 Publikationsliste	150
9.3 Lebenslauf	151
9.4 Danksagung	152

1. Summary / Zusammenfassung

Summary

Trypanosomes are protozoa causing fatal diseases in livestock and man. The cells show vivid motility, driven by a single flagellum that runs along the cell body, attached to the cell surface. Even in cell culture, trypanosomes never stop moving and ablation of functional components of the flagellum is lethal for bloodstream-forms. Motility has been shown to be essential for cell division, organelle positioning and infectivity. This renders trypanosomes valuable model organisms for studying motility. But, surprisingly little is known about motility in trypanosomes, as well as in protozoa, in general. Recently, motility of trypanosomes therefore has gotten into the spotlight of interest which brought some new insights, but many essential points are still a matter of debate, for example how the flagellar beat is regulated or how it is propagated along the cell body. In this work, the effects of the micro-environment of blood-stream form trypanosomes on motility were investigated. In their natural habitat, trypanosomes find themselves in a crowded environment. This is not only the case in the blood circulatory system, but also in extra-tissue space. The high concentration of cells and extra-cellular networks might be regarded as a kind of obstacle to cellular motion. This work shows that the mode of motility of bloodstream form trypanosomes instead is adapted to the viscosity of blood. Also a mechanistic model is presented which elucidates how this adaptation works. This also explains why most trypanosomes are tumbling in low-viscous cell culture medium, lacking other cellular components. Addition of Methylcellulose at a concentration of about 0.5% (w/v) was found to be a potent substitute for blood, providing optimal conditions for trypanosome motility. Also different types of obstacles like beads and molecular networks, as well as arranged pillar microstructures were used as a tool to mimic interaction with a solid matrix. In presence of these, the swimming speed as well as the percentage of persistent swimming cells was increased. Cells inhabiting an open-ranged environment (like *Euglena* or *Chlamydomonas*) are efficiently propelled by a planar flagellar wave. Trypanosomes in contrast, had to evolutionary adapt to a crowded environment, which would infer with any extensive planar wave. The three-dimensional flagellar beat of the attached flagellum allows trypanosomes to harness any rigid matrix for effective propulsion, in all directions equally. Trypanosomes achieve this by a rotational counter-clockwise motion of their whole cell body. Another environmental aspect for trypanosome motility that had not been studied before is the influence of hydrodynamic flow, which trypanosomes are subjected to, when swimming in the blood circulatory system. For studying this, in this work, the motility of trypanosomes was analyzed in microfluidic devices. To extend our understanding of trypanosomal motility from 2D, like in standard microscopy based live-cell imaging analysis, to 3D, a imaging technique known as holography was used, in addition. Microfluidics as well as Holography both are emerging, high-potential techniques in biology, which had not been used for the motility analysis of trypanosomes before and establishing this therefore only got possible due to interdisciplinary collaborations. In addition, a custom fully automated, software-controlled, fluorescence microscopic system was developed in this work, which is able to track and

follow single cells for motility analysis in real-time without the need for user input. The motion of the flagellar beat and the cell itself was investigated at high spatio-temporal resolution using highspeed fluorescence microscopy.

Zusammenfassung

Trypanosomen sind Protozoen, die Krankheiten bei Mensch und Tier verursachen, die unbehandelt infaust verlaufen. Die Zellen sind hoch motil, angetrieben von einem einzelständigen Flagellum, welches entlang des Zellkörpers angeheftet ist. Selbst in Zellkultur hören Trypanosomen niemals auf sich zu bewegen und eine Ablation funktioneller Bestandteile des Flagellarapparates ist letal für Blutstromformen. Es wurde gezeigt, dass Motilität notwendig ist für die Zellteilung, Organellenpositionierung und Infektiosität. Dies macht Trypanosomen zu besonders geeigneten Modellorganismen für die Untersuchung der Motilität. Dennoch ist erstaunlich wenig über die Motilität bei Trypanosomen bekannt. Dies gilt auch noch genereller für die Protozoen. Unlängst ist dieses Gebiet allerdings in den Fokus vieler Arbeiten gerückt, was bereits erstaunliche, neue Erkenntnisse hervorgebracht hat. Doch Vieles ist noch nicht abschliessend geklärt, so z.B. wie der Flagellarschlag genau reguliert wird, oder wie sich der Schlag des Flagellums entlang des Zellkörpers ausbreitet. Die vorliegende Arbeit befasst sich besonders mit den Einflüssen, die die Mikroumgebung auf die Motilität von Blutstromform-Trypanosomen ausübt. In ihrem natürlichen Lebensraum finden sich Trypanosomen in einer hoch komplexen Umgebung wieder. Dies gilt sowohl für den Blutkreislauf, als auch für den Gewebezwischenraum in ihrem Säugerwirt. Die hohe Konzentration von Zellen, Gewebeverbänden und extrazellulären Netzwerken könnte man als Ansammlung von Hindernissen für die Fortbewegung auffassen. Diese Arbeit zeigt dagegen, dass der Mechanismus der Bewegung eine Adaptation an genau diese Umweltbedingungen darstellt, so z.B. an die Viskosität von Blut. Es wird auch ein Bewegungsmodell vorgestellt, das erläutert, worin diese Adaption besteht. Dies erklärt auch, warum die Mehrheit der Zellen einer Trypanosomenkultur eine ungerichtete Taumel-Bewegung aufweist in niederviskosem Medium, das keine solchen "Hindernisse" enthält. Die Zugabe von Methylcellulose in einer Konzentration von ca. 0,5% (w/v) erwies sich als geeigneter Ersatz von Blut, um optimale Bedingungen für gerichtetes Schwimmen von Blutstromform-Trypanosomen zu erreichen. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Arten von Hindernissen, wie Mikroperlen (Beads) oder molekulare Netzwerke, sowie artifizielle, geordnete Mikrostrukturen verwendet, um die Interaktion mit einer festen Matrix zu untersuchen. In deren Anwesenheit war sowohl die Schwimgeschwindigkeit, als auch der Anteil an persistent schwimmenden Trypanosomen erhöht. Zellen, die frei schwimmend in Flüssigkeiten vorkommen (wie *Euglena* oder *Chlamydomonas*), werden effizient durch einen planaren Schlag des Flagellums angetrieben. Trypanosomen hingegen mussten sich evolutionär an eine komplexe Umgebung anpassen, die mit einer zu raumgreifenden Welle interferieren würde. Der dreidimensionale Flagellarschlag des,

an die Zelloberfläche angehefteten, Flagellums erlaubt den Trypanosomen eine effiziente Fortbewegung durch die Interaktion mit Objekten in jedweder Richtung gleichermassen. Trypanosomen erreichen dies durch eine hydrodynamisch verursachte Rotation ihres Zellkörpers entlang ihrer Längsachse, entgegen dem Uhrzeigersinn. Der Einfluss der Mikroumgebung wurde in früheren Untersuchungen bisher vernachlässigt, ist zum Verständnis der Motilität von *T. brucei* jedoch unerlässlich. Ein weiterer, bisher nicht untersuchter Aspekt der Beeinflussung der Motilität durch die Umwelt sind hydrodynamische Strömungseffekte, denen Trypanosomen im kardiovaskulären System ausgesetzt sind. Diese wurden in dieser Arbeit mittels Mikrofluidik untersucht. Um unser Verständnis der Motilität von Trypanosomen von 2D, wie üblich in der Motilitätsanalyse mittels Lebend-Zell-Mikroskopie, auf drei Dimensionen auszudehnen, wurde als bildgebendes Verfahren auch die Holographie eingesetzt. Mikrofluidik und Holographie sind beides aufkommende Techniken mit großem Anwendungspotential in der Biologie, die zuvor noch nie für die Motilitätsanalyse von Trypanosomen eingesetzt worden waren. Dies erforderte daher interdisziplinäre Kooperationen. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit auch ein vollständig automatisiertes und Software-gesteuertes Fluoreszenzmikroskopiesystem entwickelt, das in der Lage ist, einzelne Zellen durch entsprechende Steuerung des Mikroskoptisches autonom zu verfolgen und somit eine Bewegungsanalyse in Echtzeit ermöglicht, ohne weitere Benutzerinteraktion. Letztendlich konnte dadurch auch die Bewegung der schlagenden Flagelle und des gesamten Zellkörpers mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung mittels Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenzmikroskopie aufgeklärt werden.

2. Verwendete Abkürzungen

Viele Fachbegriffe und die davon abgeleiteten Abkürzungen entstammen der englischen Sprache und haben sich so weit in der Wissenschaft durchgesetzt, dass es oftmals zu sprachlichen Unklarheiten führt, wenn an deren Stelle entsprechende Übersetzungen verwendet werden. Daher wurden gängige englische Fachbegriffe direkt in dem folgenden Text übernommen.

AMCA-Sulfo-NHS Sulfosuccinimidyl-7-amino-4-methylcoumarin-3-acetate; blauer Fluoreszenzfarbstoff; für die Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie geeignet, aber phototoxisch

AOI Engl. “area of interest”; ausgewählter Teilbereich eines Bildes

API Engl. “advanced programming interface”; Dokumentation der Schnittstellen in der Software-Entwicklung

base-to-tip Flagellarschlagrichtung, bei der sich die Flagellarwelle von der Flagellenbasis in Richtung der Flagellarspitze ausbreitet

Bead Artifizuell hergestelltes Kügelchen mit wenigen Mikrometern Durchmesser (Mikroperle)

BSF Blutstromformen; vorherrschendes Lebensstadium von *T. brucei* im Blut des Säugerwirtes (in Abgrenzung zu dem Insektenstadium in der Fliege)

CAD Engl. “computer assisted design”; Sammelbegriff für Software mit der Konstruktionspläne erstellt werden; in dieser Arbeit für den Entwurf von PDMS-Mikrostrukturen verwendet

CCD Engl. “charge coupled device”; gängiger digitaler Bildsensor

CI Engl. “confidence interval”; gibt einen Bereich an, in dem ein bestimmter Wert mit der angegebenen Wahrscheinlichkeit liegt, z.B. 95% CI

CMOS Engl. “complementary metal-oxide semiconductor”; siehe auch sCMOS

DAPI 4'6-Diamidino-2-PhenylIndole; DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff (nicht für Lebendzellmikroskopie geeignet, da nicht membrangängig)

DNA Engl. “desoxy ribonucleic acid”: Desoxyribonukleinsäure (DNS)

DNS Desoxyribonukleinsäure

EDTA Engl. “ethylene-diamine tetraacetic acid”: Ethylendiamin Tetraessigsäure; Antikoagulans; bindet zweiwertige Ionen

EM Elektronenmikroskopie

EtBr Ethidiumbromid; Kanzerogen, das in die DNA interkaliert und als Farbstoff für eine Fluoreszenzfärbung von DNA verwendet wird. Wegen der guten Membrangängigkeit auch in lebenden Zellen.

FCS Engl. “fetal calf serum”: fötales Kälberserum (FKS)

- FM1-43FX** Fluoreszenzmarker, der in die Plasmamembran integriert (auch für die Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie geeignet)
- FRAP** Engl. “fluorescence recovery after photobleaching”; eine Technik um die Motilität Fluoreszenz-markierter Moleküle zu untersuchen
- GFP** grün fluoreszierendes Protein; genutzt um einzelne Moleküle zu markieren; auch geeignet für die Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie
- GPI** Glycosylphosphatidylinositol; lipophile Ankergruppe des VSG
- Knock-down** Herabregulation der Expression eines Genproduktes
- LED** Engl. “light emitting diode”; Kaltlichtquelle, bei Durchlichtaufnahmen in der Mikroskopie verwendet
- MITat** Engl. “Molteno institute antigene type”; eine numerische Nomenklatur für die Charakterisierung unterschiedlicher Trypanosomenstämme anhand ihres Oberflächenproteins (VSG)
- mRNA** Engl. “messenger RNA”: Boten-RNA
- MT** Mikrotubuli
- NHS** Reaktive Gruppe, die mit primären Aminen eine kovalente Esterbindung eingeht
- PCF** Engl. “procyclic form”: prozyklisches Insektenstadium von *T. brucei* (in der Tsetsefliege)
- PCR** Engl. “polymerase chain reaction”: Polymerasekettenreaktion
- PIV** Engl. “particle image velocimetry”; ein Verfahren bei dem, die (Fluss-)Geschwindigkeit einzelner Partikel bestimmt wird, anhand deren Translation über zeitlich versetzt aufgenommene Bilder
- PDMS** Polydimethylsiloxan; ein Kunststoff-Polymer aus dem sich Mikrostrukturen gießen lassen (Mikrofabrikation)
- Pillars** Mikrostrukturen mit Zylinderform und wenigen Mikrometern Durchmesser, gegossen aus dem Kunststoff PDMS
- Pillarwälder** Regelmäßige Anordnung von Pillars mit definiertem Abstand und Durchmesser
- RAID** Engl. “redundant array of independent disks”: Zusammenschluss mehrerer Festplatten zu einem Verbund, genutzt um die Gesamtspeicherkapazität und / oder die Schreib-/Lese-Geschwindigkeit zu erhöhen
- Re** Reynoldszahl; ein Mass für das Verhältnis von Trägheit zu viskosen Kräften
- RFU** Engl. “relative fluorescence units”: gemessene Fluoreszenzlichtintensität
- RLU** Engl. “relative light units”: gemessene Lichtintensität
- RNA** Ribonukleinsäure (RNS)

RNAi RNA-Interferenz; Methode zur sequenzspezifischen Herabregulation eines Gens, durch spezifische Degradation der entsprechenden mRNA

RNS Ribonukleinsäure

ROI Engl. “region of interest”: Teilbereich eines Bildes

sCMOS Engl. “scientific CMOS”; Verbesserung des CMOS-Chips durch Ausstattung mit Mikrolinsen, was die Lichtsensitivität (Quanteneffizienz) erhöht

Screen Test auf ein bestimmtes Merkmal, meist mit dem Ziel, einen hohen Durchsatz zu erreichen

SD Engl. “standard deviation”: Standardabweichung

SDK Engl. “software development kit”: Entwicklungswerkzeuge und Schnittstellen für die Programmierung

SEM Engl. “standard error of the mean”: Standardfehler des Mittelwertes

Stack Serie von Einzelbildern; meist als Zeitserie mit konstantem Intervall aufgenommen; eine Abwandlung davon ist der Z-Stack (s. dort)

TB Terabyte: 10^{12} Bytes an Daten (entspricht tausend Gigabyte)

TIFF Engl. “tagged image file format”; ein unkomprimiertes Dateiformat für die verlustfreie Speicherung von Bilddaten, in dem auch Bildsequenzen (Multi-TIFF) gespeichert werden können

Tracking Ermitteln der Koordinaten eines sich bewegenden Objektes über die Zeit

tip-to-base Flagellarschlagrichtung, bei der sich die Flagellarwelle von der Flagellarspitze in Richtung der Flagellenbasis ausbreitet

Trigger (Elektrischer) Impuls, der zur Synchronisation von Geräten verwendet wird

v.l.n.r von links nach rechts

VSG Engl. “variant surface glycoprotein”: variables Oberflächenglykoprotein, das in millionenfacher Kopie die Oberfläche der Blutstromform-Trypanosomen fast vollständig abschirmt und die molekulare Grundlage für die antigene Variation darstellt

wt Wildtyp

YFP Engl. “yellow fluorescent protein”: gelb fluoreszierendes Protein; eine Variante des GFP (s. dort)

Z-Stack Serie von Einzelbildern, die jeweils um eine konstante Schrittweite in der Z-Achse versetzt aufgenommen wurden

3. Thematischer Hintergrund

3.1 Cilien und Flagellen dienen nicht nur der Motilität von Zellen

Die meisten Arten von Zellen besitzen die Fähigkeit sich fortzubewegen. Oftmals wird die Motilität dabei von einem oder mehr Flagellen bzw. Cilien vermittelt. Beispiele hierfür kennen wir sowohl bei Bakterien, wie z.B. *Helicobacter pylori* (verursacht Magengeschwüre), *Vibrio cholerae* (Erreger der Cholera), aber auch von Eukaryoten wie beispielsweise den Grünalgen *Chlamydomonas* und *Euglena* oder dem Pantoffeltierchen *Paramecium*. Auch Vielzeller nutzen Flagellen und Cilien zur Fortbewegung. Im Körper eines Vertebraten finden sich diese z.B. an Spermien oder in großer Anzahl (etwa eine Milliarde Cilien pro Quadratzentimeter) in den Epithelien, die die Atemwege und Eileiter auskleiden, zum Transport von Schleim (Mucus), Partikeln und Zellen.

Nicht immer wird die Motilität von Zellen durch Cilien oder Flagellen vermittelt. Auch beim Auswachsen von Neuronen oder bei der Wundheilung beispielsweise findet eine Bewegung einzelner Zellen statt. Die Fortbewegung beruht hierbei jedoch auf dem gezielten Umbau von (Actin-) Zytoskelettnetzwerken - ein im Vergleich zum Schlag des Flagellums relativ langsamer Prozess (Pollard und Cooper, 2009). Die Geschwindigkeit motiler Zellen zeigt daher eine große Spannweite, je nach der verwendeten Fortbewegungsart, von amöboider Bewegung mit oft nur wenigen Mikrometern pro Stunde bis hin zu der schnellen Bewegung, die durch Cilien und Flagellen vermittelt wird, wie z.B. bei *Chlamydomonas* oder Spermien, die sich mit einer Geschwindigkeit von etwa $100 \mu\text{m s}^{-1}$ fortbewegen können.

Cilien und Flagellen sind nicht nur an der Motilität von Zellen entscheidend beteiligt. In Form sog. primärer Cilien kommen sie in praktisch jeder Zelle eines Vertebraten vor, teils nur vorübergehend während der Entwicklung. Das primäre Cilium wächst nach einer mitotischen Teilung in der Zelle aus. Es ist selbst jedoch nicht beweglich, sondern hat eine sensorische Funktion übernommen, z.B. als Photorezeptor im Auge, als Chemorezeptor in olfaktorischen Sinneszellen, als Mechanorezeptor oder zur Messung von Strömungsgeschwindigkeiten der Körperflüssigkeiten. Während der Embryogenese nutzen verschiedene Zellen eines vielzelligen Organismus (Metazoa) ihr primäres Cilium als Sensor für die Kommunikation mit ihrer jeweiligen Umwelt für die korrekte Zelldifferenzierung (Colantonio *et al.*, 2009).

3.2 Der molekulare Aufbau von Cilien und Flagellen

Die Bezeichnung Flagellum stammt aus dem Lateinischen und bedeutet etwa so viel wie Peitsche oder Geißel. Zwischen den Flagellen und Cilien der Eukaryoten besteht kein

grundlegender Unterschied. Lediglich ihre Länge unterscheidet sich und Cilien kommen in der Regel nicht einzeln vor, sondern meist in großer Zahl. Cilien sind im Grunde nur kurze Flagellen, die wegen ihrer geringeren Länge nicht wie die Flagellen mehrere Undulationen gleichzeitig ausbilden können. Die Begriffe Flagelle, bzw. Geißel und Cilie werden daher im Folgenden äquivalent gebraucht. Die Flagellen der Pro- und Eukaryoten dagegen sind nicht homolog, trotz der gleichen Benennung. Bei Eukaryoten ist die zentrale, funktionelle Struktur des Flagellums (das Axonem) hauptsächlich aus Mikrotubuli und Dynein aufgebaut, während das Flagellum der Prokaryoten aus Multimeren des Proteins Flagellin besteht (Silflow und Lefebvre, 2001).

Das Axonem besteht aus einer radialen Anordnung von neun Mikrotubuli-Dubletten. Der molekulare Aufbau ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Die Mikrotubuli-Dubletten sind aus der Verschmelzung zweier Mikrotubuli hervorgegangen, wobei das eine aus den üblichen 13 Tubulin Protofilamenten besteht und auch als A-Mikrotubulus bezeichnet wird, das andere aus nur 10 Protofilamenten (B-Mikrotubulus). Zusätzlich befindet sich im Zentrum des Axonems i.d.R. ein Paar aus zwei einzelnen Mikrotubuli, was damit den sogenannten "9+2" Grundtyp des Axonems darstellt.

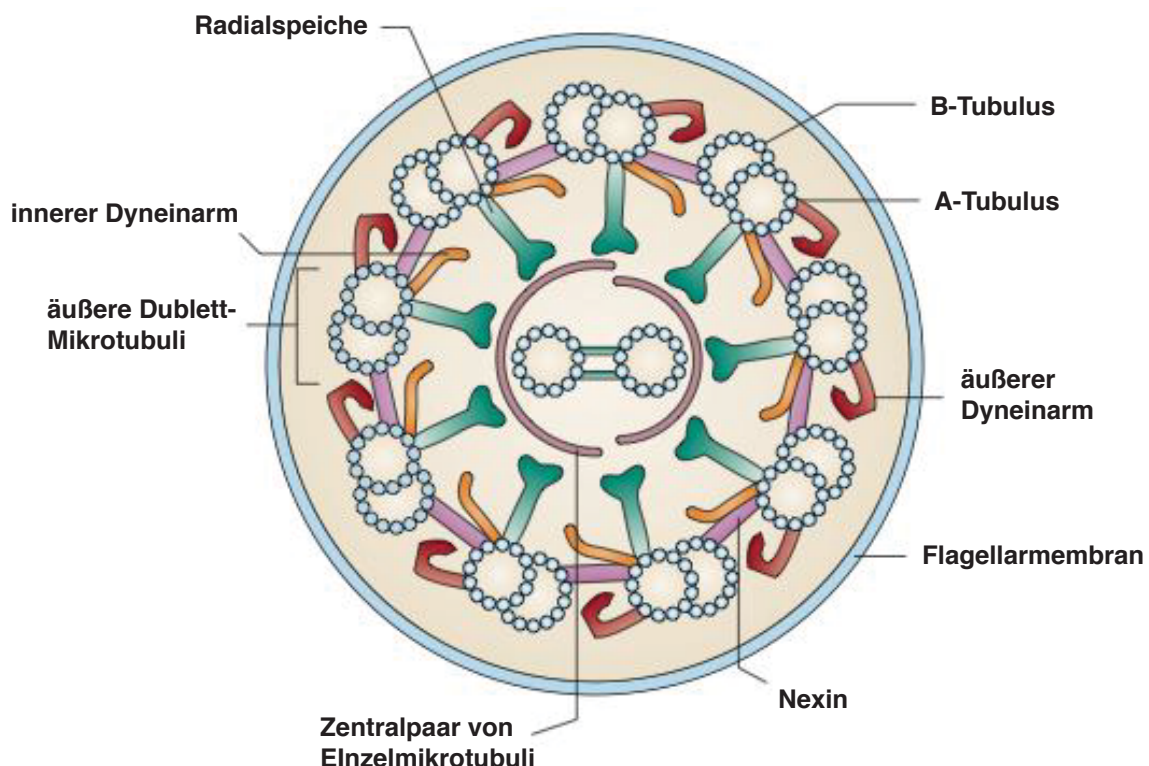


Abb. 1 | Molekularer Aufbau des Axonems in Flagellen und Cilien der Eukaryoten. Dargestellt ist ein typisches Axonem nach dem "9+2" Grundmuster mit etwa 150 nm Durchmesser. Abbildung in leicht abgewandelter Form übernommen (Ginger *et al.*, 2008).

Die treibende Kraft der Bewegung wird bei den Eukaryoten durch eine relative Verschiebung benachbarter Mikrotubuli gegeneinander, durch die dazwischen liegenden Dynein-Motorproteine entlang der gesamten Länge des Flagellums erzeugt (Satir, 1968; Wargo, 2004). Das Flagellum der Prokaryoten dagegen wird durch eine Art Miniaturmotor, an der in die Zellwand eingebetteten Basis, in eine Rotationsbewegung versetzt, ähnlich einem Propeller (Berg und Anderson, 1973; Berg und Turner, 1993). Die Gegebenheit diese unabhängig voneinander entstandenen und sehr unterschiedlichen Organellen der Pro- und Eukaryoten beide als Flagellen zu bezeichnen, ist daher unglücklich. Im weiteren Text wird, solange nicht ausdrücklich darauf hingewiesen wird, nur mehr von den Flagellen der Eukaryoten die Rede sein.

Die Dynein-Motorproteine befinden sich zwischen den einzelnen Mikrotubuli-Dubletten. Jedes Doublett trägt jeweils ein inneres und ein äußeres Dynein, wie sich auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennen lässt. Der Abstand benachbarter Dyneine entlang der Längsachse des Axonems beträgt 24 nm. Der Durchmesser eines Axonems ist mit rund 200 nm bei fast allen Spezies nahezu gleich, nur die Länge des Axonems variiert, von wenigen Mikrometern bei Cilien bis zu hunderten Mikrometern bei langen Flagellen.

Benachbarte radiäre Mikrotubuli werden zum einen durch Nexin quervernetzt und zum anderen durch Radialspeichen mit den zentralen Mikrotubuli verbunden (Yang *et al.*, 2006). Nexin wird als ein elastisches Element verstanden, das nach aktiver Verschiebung benachbarter MT gegeneinander das Axonem wieder in den Ausgangszustand zurückversetzt. Heuser und Kollegen folgerten aus Kryo-elektronenmikroskopischen Tomogrammen, dass es sich bei Nexin tatsächlich um den Dynein regulatorischen Komplex (DRC) handelt (Heuser *et al.*, 2009). Beide werden jedoch in der aktuellen Literatur nach wie vor als getrennte Strukturen betrachtet (Kabatutu *et al.*, 2010).

Das Axonem entspringt dem Basalkörper, einer Struktur, die dem Aufbau nach der Zentriole entspricht. Der Basalkörper verankert das Flagellum über das Zytoskelett innerhalb der Zelle. Es muss die Kräfte, die das Flagellum bei seinem Schlag erzeugt ausgleichen können. Der Basalkörper besteht aus 9 Mikrotubuli-Tripletts in radialer Anordnung. Jedes dieser Tripletts besteht aus jeweils einem vollständigen Mikrotubulus und zwei unvollständigen Mikrotubuli. Weitere Komponenten halten die neun Mikrotubuli-Tripletts durch Quervernetzung in Position. Wie die Teilung eines Basalkörpers bei der Mitose genau abläuft ist bisher nicht bekannt (Dawe *et al.*, 2007).

Flagellen besitzen damit einen komplexen Aufbau aus mehr als 650 unterschiedlichen Proteinen (Fliegauß *et al.*, 2007). Flagellen wachsen jedoch nicht von der Seite des Basalkörpers her, sondern an der Spitze. Deshalb müssen alle zum Aufbau benötigten Komponenten vom Zytoplasma durch das Flagellum transportiert werden. Dieser als

intraflagellarer Transport (IFT) bezeichnete Prozess wurde zuerst bei *Chlamydomonas* in der Gruppe von Rosenbaum beschrieben (Sloboda und Rosenbaum, 2007).

3.3 Modelle der Regulation des Flagellarschlages

Entlang des Axonems reihen sich etwa 750 Dynein-Motorproteine pro Mikrometer Flagellenlänge, wie sich leicht aus dessen regelmässigen Grundaufbau ableiten lässt. Wären alle zeitgleich aktiv, so würde dies zu einer krampfartigen Starre führen (Hill, 2003). Daher müssen die einzelnen Dyneine zeitlich genau reguliert und abgestimmt werden, um insgesamt eine effektive Bewegung zu erreichen. Das wohl erste und einfachste Modell nahm dabei eine Krümmungs-induzierte Aktivierung der Dyneine an (Brokaw, 1982; Brokaw, 2002), was dazu führt, dass nur benachbarte Dyneine der gleichen Seite des Axonems gemeinsam aktiv werden. Die Ausbreitung der Krümmung entlang des Flagellums führt dann automatisch zur weiteren Aktivierung der benachbarten Dyneine.

Das zentrale Mikrotubuli-Paar fehlt bei den immotilen primären Cilien, die eine Rolle als Sensoren übernommen haben. Hier spricht man von einem "9+0 Axonem", in Abgrenzung zu dem "9+2" Grundtyp des Axonems. Daher wurde eine regulatorische Funktion des zentralen Mikrotubuli-Paares für die Steuerung der Aktivität der Dynein Motorproteine angenommen (Yagi und Kamiya, 1995), zumal bei einigen Organismen eine Rotation der zentralen Mikrotubuli gefunden wurde, z.B. bei *Paramecium* (Omoto *et al.*, 1999) und *Chlamydomonas* (Kamiya *et al.*, 1982). Dies ist jedoch bei Trypanosomen nicht der Fall, was anhand einer invarianten Lage des zentralen Mikrotubuli-Paares in einer Vielzahl von elektronenmikroskopischen Aufnahmen gefunden wurde (Branche *et al.*, 2006; Gadelha *et al.*, 2006). Bei den meisten Organismen ist bisher nicht bekannt, ob das zentrale Mikrotubulipaar rotiert. Bei den Metazoen gibt es jedoch bislang nur Beispiele von nicht-rotierenden zentralen MT, was stark gegen eine universelle regulatorische Funktion der zentralen MT für den Flagellarschlag spricht (Lindemann und Lesisch, 2010). Stattdessen deutet vieles auf eine biochemische Regulation des Flagellarschlages hin. So führt bei *Paramecium* eine Erhöhung der Ca^{2+} Konzentration zu einer erhöhten Schwimgeschwindigkeit und bei *Chlamydomonas* wurde eine Umkehr der Richtung der Ausbreitung der Wellenbewegung beobachtet, die kontrolliert wird durch die intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} Ionen. Zudem wurde beobachtet, dass eine Erhöhung der K^+ Konzentration die Frequenz des Flagellarschlages erhöht.

Neueste Impulse für ein Verständnis der Regulation des Flagellarschlages stammen daher, die einzelnen Komponenten als einfache physikalische Grundeinheiten zu betrachten: Eine Kombination aus Federn, starren Elemente und Nanomotoren, die zu einer stabilen Oszillation führen und durch mathematische Modelle beschrieben werden können (Mitchison und Mitchison, 2010). Interessanterweise tauchen in dieser vereinfachten, rein physikalischen Sichtweise z.B. Ca^{2+} Ionen überhaupt nicht mehr auf,

obwohl sie wahrscheinlich die biologisch-chemische Grundlage der Regulation darstellen (Miles und Holwill, 1971).

3.4 Ciliendefekte sind assoziiert mit zahlreichen Krankheiten

Es sind heute zahlreiche Krankheiten bekannt, die durch defekte Cilien oder Flagellen verursacht werden. Diese Ciliopathien können unterschiedliche Organe betreffen, da Cilien in nahezu allen Zelltypen des Menschen vorkommen und unterschiedlichste Aufgaben übernommen haben. Immotile Cilien sind u.a. assoziiert mit Bronchiectasis, Sinusitis, Dextrocardia (situs inversus) und Infertilität (Afzelius, 1999). Auf die einzelnen Zusammenhänge wird nachfolgend eingegangen, wobei die Krankheitssymptome eine direkte Folge des Fehlens der normalen Funktion der Cilien sind.

Die motilen Cilien der Epithelzellen, die die Atemwege auskleiden, bewegen den Mucus fort und halten die Atemwege damit frei von schädlichen Partikeln. Im ZNS bewirken die, mit Cilien besetzten Ependymzellen, welche die Hirnflüssigkeit vom Hirnnervengewebe trennen, einen Flüssigkeitsstrom der Hirnflüssigkeit (liquor cerebrospinalis). Ein motiles Flagellum treibt das Spermium an und die Cilien des Epithels der Eileiter helfen beim Transport der befruchteten Eizelle in den Uterus.

Die wichtigsten Folgen einer Dysfunktion der motilen Cilien sind daher, wie man sich aus deren Funktion leicht ableiten kann, (i) eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Erkrankungen der Atemwege, da die Cilien der Epithelgewebe schädliche Stoffe nicht mehr abtransportieren können, (ii) die Ausbildung eines Hydrocephalus (eine krankhafte Erweiterung der liquorgefüllten Ventrikel des ZNS) als Folge des gestörten Transports der Hirnflüssigkeit und (iii) Infertilität wegen unbeweglicher Keimzellen (Dawe *et al.*, 2007).

Die immotilen primären Cilien des menschlichen Körpers haben sensorische Funktionen übernommen. Dabei stehen die Cilien wie Antennen von der Zelle ab und die Membran des Ciliums inkorporiert spezifische Rezeptoren, Ionenkanäle oder Signalmoleküle. So steht z.B. ein primäres Cilium aus der apikalen Oberfläche der Epithelzellen hervor, die die Nierentubuli auskleiden und misst durch die passive Beugung den Flüssigkeitsstrom. Vererbte Defekte bei der Ausbildung dieser Cilien verursachen daher Erkrankungen der Nieren (polycystic kidney disease, PKD) (Afzelius, 2004). Störungen des intraflagellaren Transports (IFT) des primären Ciliums in den Photorezeptoren des Auges führen zu einer Degeneration der Retina. Beim Usher-Syndrom liegt Taubheit und eine Störung des Gleichgewichtssinnes vor, als Folge defekter Kinocilien. Eine Dysfunktion der olfaktorischen Cilien führt zu einem Verlust des Geruchssinnes.

Bemerkenswert ist auch, dass eine Dysfunktion von Cilien auch eine Umkehrung der Rechts-Links Körperachse bewirken kann. Die asymmetrisch angelegten Organe sind dabei spiegelbildlich vertauscht (*situs inversus*, oder Kartagener-Syndrom). Denn bei der

Entwicklung sorgen Cilien durch ihren Schlag für eine Strömung, die einen Gradienten von Botenstoffen ausbildet, der die Ausbildung der Körperachse determiniert. Diese Strömung wird wiederum über immotile primäre Cilien auf der linken Seite des Embryos gemessen und bewirkt eine intrazelluläre Erhöhung der Konzentration von Ca^{2+} Ionen. Ob dies direkt über die mechanische Beugung der Cilien oder aber indirekt über die ungleichmäßige Verteilung weiterer Botenstoffe durch die Strömung erfolgt, ist noch ungeklärt (Fliegauß *et al.*, 2007). Das Kartagener-Syndrom wird verursacht durch Defekte im Axonem, meist sind dabei die Dyneine oder die Mikrotubuli betroffen. Eine Umkehr der Links-Rechts-Asymmetrie der Körperachse tritt nur bei der Hälfte der Betroffenen auf, da deren Ausbildung in Abwesenheit des Gradienten zufällig erfolgt. Zudem werden mit defekten Cilien auch Entwicklungsstörungen des ZNS, des Skelettes und der Organe assoziiert. Die Ursache ist meist eine Störung des IFT.

Der Auf- und Abbau des primären Ciliums spielt bei Vertebraten auch eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. So führt die Herunter-Regulierung (Knockdown) von IFT27 zu Cytokinese-Defekten und einer Elongation des Zellzyklus. Eine Überexpression von IFT88 verhindert den Übergang von der G1 in die S-Phase (Fliegauß *et al.*, 2007). Bei Trypanosomen dagegen wächst das Flagellum kontinuierlich weiter und es scheint entsprechend dazu auch keinen entsprechenden Checkpoint im Zellzyklus zu geben.

3.5 Die Auswirkungen der kleinen Reynoldszahlen

Die Reynoldszahl (Re) ist in der Strömungsphysik das Maß des Verhältnisses zwischen den wirkenden Trägheits- und Viskositätskräften. Sie wurde nach dem Physiker Osborne Reynolds benannt und hat keine Einheit. Eine praktische Anwendung findet die Reynoldszahl z.B. bei Versuchen im Strömungskanal. Will man die aero- oder hydrodynamischen Eigenschaften z.B. eines Flugzeuges testen, so verwendet man in der Regel ein verkleinertes Modell. Man erhält dabei vergleichbare Ergebnisse, falls der Versuch bei der selben Reynoldszahl durchgeführt wird. Verringert man die Größe des Modells, so muss man im Gegenzug die Strömungsgeschwindigkeit entsprechend erhöhen, um die Reynoldszahl konstant zu halten.

Die Reynoldszahl (und damit der Anteil der Trägheitskraft) verhält sich direkt proportional zu der Viskosität des Mediums und indirekt proportional zu Objektgröße und Geschwindigkeit. Bei sehr kleinen Reynoldszahlen ($Re \ll 1$), wie sie in der Größenskala einzelner Zellen vorliegen, spielt die Trägheit daher kaum eine Rolle. Ein Mikrometer großes Objekt mit einer Anfangsgeschwindigkeit von $10 \mu\text{m s}^{-1}$ wird durch die Stokes'sche Reibung innerhalb von $1 \mu\text{s}$ auf einer Wegstrecke von $0,01 \mu\text{m}$ abgebremst (Purcell, 1977).

Im Reich der kleinen Reynoldszahlen gelten einige unserer Alltagserfahrungen nicht. Der Vorwärtsschub, den eine Muschel mit ihren unelastischen Schalenhälften durch ein reziprokes Bewegungsmuster erzeugt, entstammt der Trägheit. Da die Trägheit bei sehr kleinen Reynoldszahlen jedoch vernachlässigbar ist, könnte sich ein Einzeller durch ein solches Bewegungsmuster überhaupt nicht fortbewegen. Der Trägheitsterm der Navier-Stokes-Gleichung kann im Bereich der sehr kleinen Reynoldszahlen in erster Näherung einfach weggelassen werden. Dies ist der einzige Teil der Strömungsgleichungen, in denen die Zeit vorkommt. Im Bereich der kleinen Reynoldszahlen heben sich alle zeitinvertierbaren Bewegungen gegenseitig auf, weil auch die entwickelten Kräfte genau gegensätzlich verlaufen. Daher kann sich ein Mikroorganismus in Wasser nur fortbewegen, wenn er eine nicht-reziproke, periodische Schlagbewegung ausführt, also eine Bewegung, die bei Zeitumkehr nicht dieselbe ist.

Bei Cilien unterscheidet man einen Propulsionsschlag und den langsameren Regenerationsschlag (Burgess *et al.*, 2003). Bei beiden Bewegungen muss das Cilium zusätzlich unterschiedlich geformt sein, um eine Netto-Fortbewegung zu ermöglichen, da nur nicht-reziproke Bewegungen bei kleinen Reynoldszahlen zu einem effektiven Vortrieb führen. Zudem endet der Vorwärtsschub praktisch in dem Moment, in dem die Bewegung aufhört. Diese enge zeitliche Kopplung zwischen der Bewegung und der daraus resultierenden Propulsion bietet aber auch den Vorteil, dass direkt am Bewegungsverlauf abgelesen werden kann, welche Bewegungsart zu welchem Vortrieb führt.

3.6 Trypanosomen als Modellsystem

Trypanosomen sind begeißelte, einzellige Parasiten, die in zahlreichen Säugetierarten vorkommen. Sie zeichnen sich durch eine lange Anpassung und Koevolution an ihren Wirt aus (Gull, 2003). Über einen Insektenvektor können einige Trypanosomenarten jedoch auch auf den Menschen übertragen werden und schwere Krankheiten verursachen. So verläuft die, von der Tsetsefliege (*Glossina spec.*) übertragene, Afrikanische Schlafkrankheit unbehandelt ausnahmslos tödlich (Barrett, 1999). Nur wenige Medikamente stehen zur Behandlung zur Verfügung, welche zudem gravierende Nebenwirkungen haben. Glücklicherweise ist die Zahl der Neuinfektionen seit Jahren rückläufig. Gerade in diesem Rückgang könnte eine Chance liegen, dieser alten "Geißel der Menschheit" endgültig beizukommen (Barrett, 2006). Dennoch sind nach wie vor viele Millionen Menschen südlich der Sahara von der Afrikanischen Schlafkrankheit schwer bedroht. In der Vergangenheit sind alternierende Phasen von Ausbreitung und Eindämmung dokumentiert. Ausbreitungsphasen fallen dabei auffallend oft zusammen mit Phasen von besonderem sozialem Leid, wie Hungersnöten und Vertreibungen. Die humane Afrikanische Schlafkrankheit (Trypanosomiasis) zählt heute zu den vergessenen Krankheiten, im Schatten von Malaria und HIV.



Abb. 2 | Der Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*. Die Afrikanischen Trypanosomen werden während eines Infektionszyklus von der Tsetsefliege (*Glossina spec.*) durch die Blutmahlzeit von einem Säugerwirt auf den nächsten übertragen. Man unterscheidet daher die Blutstromformen (BSF), die im Säugerblut vorkommen und die Insektenstadien (PCF). Abbildung in überarbeiteter Form übernommen von (Lee *et al.*, 2007).

An Trypanosomen wurde u.a. Transsplicing und RNA-Editing entdeckt, sowie der molekulare Mechanismus der antigenen Variation aufgeklärt. Sie könnten jedoch in vielerlei Hinsicht auch als Modellsystem für die Untersuchung der Motilität von Zellen eine wertvolle Rolle übernehmen.

Die Motilität von Gewebezellen, z.B. bei der Einwanderung neuer Zellen in geschädigtes Gewebe im Zuge der Wundheilung oder bei der Immunantwort, liegt typischerweise in der Größenordnung von einigen Mikrometern pro Stunde (Parkhurst und Saltzman, 1994). Trypanosomen dagegen bewegen sich um mehrere Größenordnungen schneller, mit mehreren Mikrometern pro Sekunde. Daher sind Trypanosomen im Vergleich besser als Modellsystem für zelluläre Bewegung geeignet, wegen der kürzeren Zeit für die einzelnen Experimente. Dies zahlt sich besonders aus bei der Analyse auf Einzelzellebene in Echtzeit - ein Prozess den man automatisieren kann, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Je schneller die Zellen sich bewegen, desto schneller erreicht man mit automatisierten Verfahren statistisch relevante Aussagen, da das Verhältnis der Trajektorienlänge zum Fehler der Positionsbestimmung bei schnellerer Bewegung günstiger ist.

Der produktive Schlag von Cilien und Flagellen breitet sich bei allen motilen Eukaryoten immer von der Basis des Flagellums in Richtung der Flagellenspitze aus (base-to-tip). Trypanosomen bilden hiervon die einzig bekannte Ausnahme. Der Schlag ihrer Zuggeißel breitet sich ausgehend von der Flagellarspitze in Richtung des Basalkörpers aus (tip-to-base). Trypanosomen bieten damit als Modellsystem einmalige Möglichkeiten für das Studium der Regulation des Flagellarschlages. Allerdings ist der genaue zeitliche und räumliche Ablauf ihres Bewegungsmusters nach wie vor nicht abschließend geklärt (Hill, 2010; Rodríguez *et al.*, 2009).

Eine weitere Besonderheit der Trypanosomen ist, dass bei ihnen nahezu alle Organellen in nur einer Kopie vorhanden sind, z.B. pro Zelle nur ein Mitochondrium, Lysosom, Golgi, ER und nur ein endosomaler Apparat mit strikt lokalisierter Endozytose (Overath und Engstler, 2004). Lediglich bei teilenden Zellen wird vorübergehend jeweils eine zweite Kopie dieser Organellen in strikter zeitlicher Abfolge angelegt. Auch besitzen die Zellen nur ein einzelnes Flagellum. Ein Zweites wird nur während der binären Teilung angelegt.

Die motile, einzellige Alge *Chlamydomonas* stellt heute das wohl meist untersuchte Modellsystem für Motilität dar. Trypanosomen sind mit ihrem einzelständigen Flagellum weniger komplex aufgebaut als *Chlamydomonas*, welche zwei Flagellen besitzt, deren Schlag koordiniert werden muss (Goldstein *et al.*, 2009). Die Regulation des Flagellenschlages sollte sich bei Trypanosomen daher leichter verstehen lassen. Der Umstand, dass *Chlamydomonas* als Modellsystem der Motilität heute so weit verbreitet ist, stellt gewissermaßen einen historischen Zufall dar. So wurde z.B. der intraflagellare Transport (IFT) bei *Chlamydomonas* entdeckt (Sloboda und Rosenbaum, 2007), ist inzwischen aber auch bei Trypanosomen bekannt (Bastin *et al.*, 1999a). Auch sind heute mehrere hundert Gene, die am molekularen Aufbau des Flagellums von *T. brucei* beteiligt sind, bekannt (Baron *et al.*, 2007b). Reverse genetische Techniken zur Untersuchung der Funktion einzelner Gene, wie RNA-Interferenz, Knockout, Überexpression, oder die Herstellung von (markierten) Fusionsproteinen sind lange etablierte Techniken zur Untersuchung von Trypanosomen (Bastin *et al.*, 2000). Zudem ist auch das komplette Genom mehrerer Trypanosomenarten sequenziert und frei zugänglich (Berriman *et al.*, 2005; Briggs *et al.*, 2004a). Auch lassen sich die Zellen relativ einfach in Zellkultur vermehren, was z.B. bei Spermien, die ein weiteres, intensiv untersuchtes Modellsystem zellulärer Bewegung darstellen, nicht ohne Weiteres möglich ist. Die Verdopplungszeit einer exponentiell wachsenden Trypanosomenkultur ist zudem relativ kurz (ca. 5 - 6 h beim Wildtyp) und da die Zellen in Suspensionskultur gehalten werden können, sind auch Experimente, die eine hohe Zellzahl benötigen, in kurzer Zeit durchführbar. Dies alles trägt zur Attraktivität von Trypanosomen als Modellsystem für zelluläre Motilität bei.

3.7 Besonderheiten des Flagellums der Trypanosomen

Das Flagellum von *Trypanosoma brucei* entspringt dem Basalkörper am posterioren Ende der Zelle, nahe der Flagellartasche. Direkt benachbart liegt der Kinetoplast, ein Zellorganell welches die mitochondriale DNA enthält und charakteristisch ist für die *Kinetoplastidae*, zu denen die Trypanosomen gehören. Das Flagellum der Trypanosomen ist entlang der Längsachse der Zelle angeheftet. Nur der äußerste Teil der Flagellarspitze ist auf einer Länge von wenigen Mikrometern nicht angeheftet (etwa 3-4 μm bei den Blutstromformen von *T. brucei*). Ein Trypanosom, welches sich nicht teilt, besitzt nur ein Flagellum. Während der binären Zellteilung wächst ein zweites Flagellum aus. Das Auswachsen des Flagellums selbst stellt eine Art Taktgeber der einzelnen Zellzyklusphasen dar (Vaughan *et al.*, 2003). Tatsächlich kann die Länge des auswachsenden Flagellums zur genaueren Bestimmung der Zellzyklusphase herangezogen werden, da das Flagellum über die Zeit linear auswächst. Der erste erkennbare Vorgang der Zellteilung ist die Anlage eines neuen Flagellums und die Teilung des Kinetoplasten. Gemeinsam mit dem Tochterkinetoplast wird auch der neue Basalkörper angelegt. Die Trennung der beiden Kinetoplasten ist eine Folge der Auseinanderbewegung der beiden Basalkörper durch das Auswachsen des Tochterflagellums (Absalon *et al.*, 2007). Die spätere Teilungsachse verläuft genau zwischen den beiden Flagellen (Vaughan und Gull, 2008; Vaughan, 2010).

Trypanosomen besitzen als Besonderheit eine parakristalline Struktur innerhalb ihres Flagellums, die dicht neben dem eigentlichen Axonem liegt. Diese wird bezeichnet als PFR (von engl. "paraflagellar rod"). Das PFR durchzieht das gesamte Flagellum und fehlt nur im Bereich der Flagellartasche. Auch wenn das PFR selbst einzigartig ist bei Trypanosomen, so gibt es doch im Flagellum von Spermien ähnliche Strukturen, die als "outer dense fibers" (ODF) bezeichnet werden (Oberholzer *et al.*, 2007). Jede der 9 Mikrotubulidoubletten ist in Säugerspermien mit einem ODF assoziiert. Es wurde vermutet, dass diese Strukturen bei der Biegung des Flagellums unterstützend wirken (Lindemann, 1996) und durch einen erhöhten inneren Widerstand die Wellenlänge des Flagellarschlages vergrößern bzw. die Schlagfrequenz verringern, was für die Zelle von Vorteil sein könnte. Man kann sich leicht vorstellen, dass eine gewisse passive Elastizität von Nutzen ist, um die Zelle nach geleisteter Verformungsarbeit wieder in die Ausgangsposition zurückzuführen. Wie der RNAi-vermittelte Knockdown der PFR-Untereinheiten gezeigt hat, übernimmt das PFR bei den Kinetoplastiden jedoch mehr als nur eine mechanische Funktion zur Aussteifung, denn die entsprechenden Mutanten waren komplett immotil (Santrich *et al.*, 1997; Bastin *et al.*, 1998; Branche *et al.*, 2006; Portman und Gull, 2009). Daher wird auch eine regulatorische Rolle des PFR für den Schlag des Flagellums von Trypanosomen postuliert. Das PFR besteht hauptsächlich aus PFR-A und PFR-C Proteinen (Bastin *et al.*, 1999b). Noch sind jedoch nicht alle molekularen Bestandteile des PFR bekannt.

Das Axonem ist über das PFR indirekt mit der Zellmembran und dem Zytoskelett der Zelle verbunden (Robinson *et al.*, 1991). Dabei spielen vier spezialisierte Mikrotubuli eine wichtige Rolle. Das Flagellum ist daher nicht völlig frei, sondern parallel zu den subpellikulären Mikrotubuli, welche das Zytoskelett bei Trypanosomen bilden, verankert. Das schlagende Flagellum übt daher starke mechanische Kräfte auf das Zytoskelett aus und verformt dabei die Zelle mit jedem Schlag. Die undulierende Membran, die das Flagellum umschließt, lässt diesem jedoch einen gewissen Spielraum während des Flagellenschlages. Diese, das Flagellum umgebende Membran, stellt trotz der vermeintlichen Kontinuität mit der restlichen Zelloberfläche eine der drei eigenständigen Domänen der Plasmamembran dar: (i) Zelloberfläche, (ii) undulierende Membran und (iii) Flagellartasche. Das Flagellum tritt durch die Flagellartasche in das Innere der Zelle ein. Die Flagellartasche ist der einzige Bereich der Zelloberfläche, an dem die Plasmamembran nicht von der zytoplasmatischen Seite her durch ein dichtes subpellikuläres Zytoskelett abgeschirmt wird und daher ist dies auch der einzige Bereich an dem Endo- und Exozytose stattfinden kann.

Ein Zusammenhang zwischen dem Schlag des Flagellums und der Endozytose wurde bei *T. brucei* seit langem vermutet. Absalon und Kollegen konnten zeigen, dass die Endozytoserate bei den Insektenstadien (PCF) deutlich reduziert ist, wenn diese kein funktionelles Flagellum mehr besitzen (Absalon *et al.*, 2008). Der Schlag des Flagellums bewirkt eine Deformation der Membran in der Flagellartasche, was auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen ist. Diese Verformung der Membran könnte die Bildung von Clathrin coated pits (CCP) erleichtern, da Clathrin eine Präferenz für gekrümmte Membranen besitzt (Hinrichsen *et al.*, 2006; McMahon und Gallop, 2005). Die Abwesenheit des PFR im Bereich der Flagellartasche dürfte dort die Elastizität des Flagellums erhöhen.

Flagellen wachsen am distalen Ende, also der Flagellarspitze. Das Minus-Ende der Mikrotubuli befindet sich auf der Seite des Basalkörpers. Daher müssen die Untereinheiten der Mikrotubuli von der Basis zur Spitze des Flagellums transportiert werden, da das Flagellum durch die Flagellarmembran vom Zytoplasma abgetrennt wird. Dieser Transport erfolgt innerhalb des Flagellums und wird daher auch als intraflagellarer Transport (IFT) bezeichnet. Bei Trypanosomen wurden bereits zahlreiche IFT Proteine charakterisiert (Bastin *et al.*, 1999a). Zudem ist eine 55 Aminosäuren lange N-terminale Signalsequenz bekannt, die für die Lokalisation unterschiedlichster Proteine ins Flagellum verantwortlich ist (Pullen *et al.*, 2004; Ersfeld und Gull, 2001). Die molekularen Motoren weisen eine intrinsische Direktionalität auf. Kinesine wandern entlang von MT in anterograder Richtung auf das Plus-Ende zu, d. h. in Richtung der Flagellarspitze, wohingegen Dyneine, die auch den Schlag des Flagellums bewirken, in die umgekehrte (retrograde) Richtung zum Basalkörper hin wandern. Der intraflagellare Transport von MT-Untereinheiten zur wachsenden Flagellarspitze hin, wird daher von Kinesin vermittelt.

Obwohl der grundlegende molekulare Aufbau des Axonems hoch konserviert ist und sich die Dynein Motorproteine, die die treibende Kraft für den Flagellarschlag sind, immer nur in dieselbe Richtung entlang der MT-Doubletten bewegen können, ist eine weitere Eigenart des Flagellums der Trypanosomen eine Umkehr der effektiven Schlagrichtung (tip-to-base statt base-to-tip), im Vergleich zu den Flagellen anderer Eukaryoten. Bei Trypanosomen gibt es zudem Hinweise darauf, dass an der Flagellarspitze ein Ankerpunkt vorhanden ist, der die Verschiebung der Dyneine gegeneinander in die Bewegung des Flagellums umsetzt (Woolley *et al.*, 2006). Die beschriebenen Eigenheiten des Flagellums der Trypanosomen mögen darin begründet sein, dass diese auf einem evolutionsbiologischen Zweig liegen, der sich schon früh von anderen Eukaryoten abgespalten hat. Aus einem möglichst detaillierten Gesamtverständnis des molekularen Aufbaues der ausgefeilten Struktur des Flagellums könnten sich gerade dadurch neue Erkenntnisse mit allgemeiner Gültigkeit über dessen Funktionsweise ableiten lassen (Bastin *et al.*, 2000; Wickstead und Gull, 2007).

3.8 Die Motilität ist essentiell für Trypanosomen

Selbst in Zellkultur hören Trypanosomen niemals auf sich unablässig zu bewegen. Offenbar wirkt ein starker Selektionsdruck auf die Erhaltung der Motilität. Jede bisher bekannte Mutation, die die Motilität beeinträchtigt ist letal für die Blutstromformen von *T. brucei*. Bemerkenswerterweise wurde für Trypanosomen jedoch bis dato kein (chemo-)taktisches Verhalten beschrieben, auch wenn dessen Existenz schon lange vermutet wird (Hill, 2003). *Trypanosoma brucei* zirkuliert extrazellulär frei vorkommend im Blutkreislauf des Säugerwirtes. Im Blutkreislauf, ist es jedoch unwahrscheinlich, dass sich stabile chemotaktische Gradienten ausbilden können. Deshalb macht Chemotaxis unter diesen Bedingungen wenig Sinn. Stattdessen wurde gezeigt, dass die Motilität bei Trypanosomen essentiell ist für die Organellenpositionierung (Robinson und Gull, 1991), Zellteilung (Broadhead *et al.*, 2006) und Infektiosität (Griffiths *et al.*, 2007). Allerdings ist noch wenig bekannt über die Motilität bei Trypanosomen und auch generell bei Protozoen (Hill, 2003). Dieser Aspekt rückt nun aber zunehmend in den Fokus des Interesses, da immer mehr Hinweise auf die essentielle Rolle des Flagellums für Trypanosomen gefunden werden.

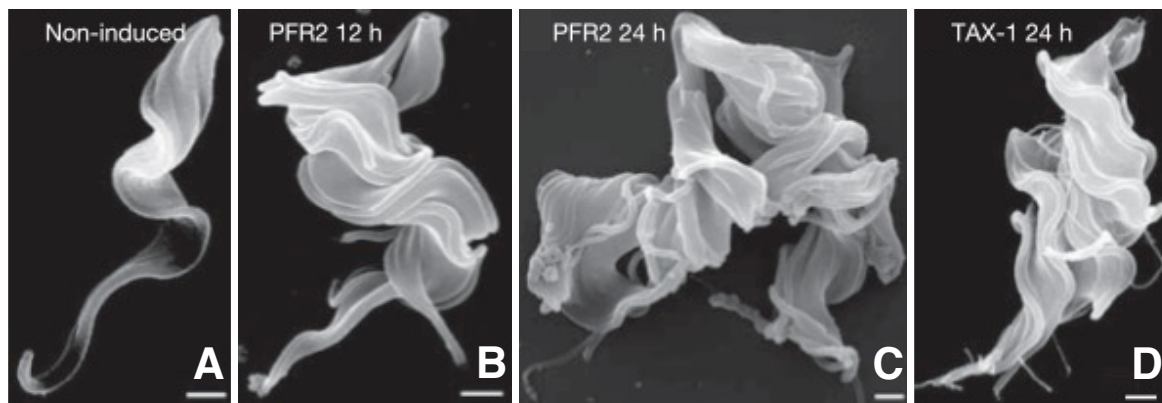


Abb. 3 | Ein Knockdown unterschiedlicher Flagellarproteine führt zu letalen Zytogenesedefekten bei der Blutstromform von *T. brucei*. PFR2 und TAX-1 sind Proteine, die am Aufbau des Flagellums der Trypanosomen beteiligt sind. **A** Die nicht-induzierte Kontrolle zeigt eine normale Zellmorphologie. **B** Die induzierte Zelllinie, in der PFR2 durch induzierbare RNA-Interferenz für 12 h herunterreguliert wurde, ist unfähig, sich nach erfolgter Verdopplung der Organellen in zwei Tochterzellen zu trennen. **C** Auch nach 24 h Induktion setzt sich die Organellenverdopplung in den nicht korrekt geteilten Tochterzellen fort. Der Knockdown von TAX-1 führte nach 24 h zu dem gleichen Phänotyp, der auch als "Monster" bezeichnet wird. Abbildung übernommen von (Broadhead *et al.*, 2006). Die Größenbalken entsprechen jeweils 1 µm.

Anders als andere Parasiten, die sich innerhalb von Wirtszellen verstecken, sind die Afrikanischen Trypanosomen dem Immunsystem des Wirtes direkt ausgesetzt. *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria, *Trypanosoma cruzi*, Erreger der Chagas Krankheit, oder *Leishmania major*, Erreger der Leishmaniose, sind Beispiele solcher intrazellulär vorkommenden Parasiten. Erwähnenswert ist dabei auch, dass deren intrazelluläre Stadien ihr Flagellum wieder verlieren, während *T. brucei* in jedem Stadium ein funktionsfähiges Flagellum besitzt. Im Laufe der Evolution mussten die extrazellulär im Blut lebenden Trypanosomen zusätzliche Verteidigungsmechanismen entwickeln um in ihrer feindlichen Umwelt überleben zu können.

Tatsächlich sind Trypanosomen so "erfolgreich" in dieser Umwelt, dass die afrikanische Schlafkrankheit beim Menschen unbehandelt immer fatal verläuft. Dies zeigt auch die Notwendigkeit der Existenz eines zusätzlichen Wirtsreservoirs, in welchem die Trypanosomen langfristig persistieren können.

3.9 Das Herz-Kreislauf-System - der Lebensraum der Trypanosomen

Die Umweltbedingungen der Trypanosomen in ihrem natürlichen Habitat (dem Blutssystem) unterscheiden sich beträchtlich von denen in Zellkultur: "alles ist im Fluss (πάντα ῥεῖ)". Die zahlreichen Zellen des Säugerkörpers müssen ständig versorgt werden mit Nährstoffen, wie Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren und Elektrolyten, Sauerstoff und Hormonen. Zudem müssen Abfallprodukte des Stoffwechsels und CO₂ abtransportiert

werden. Deshalb durchzieht ein engmaschiges Netz aus Blutgefäßen den gesamten Organismus. Eine Kapillare ist von der nächsten in der Regel nicht mehr als 50 µm entfernt.

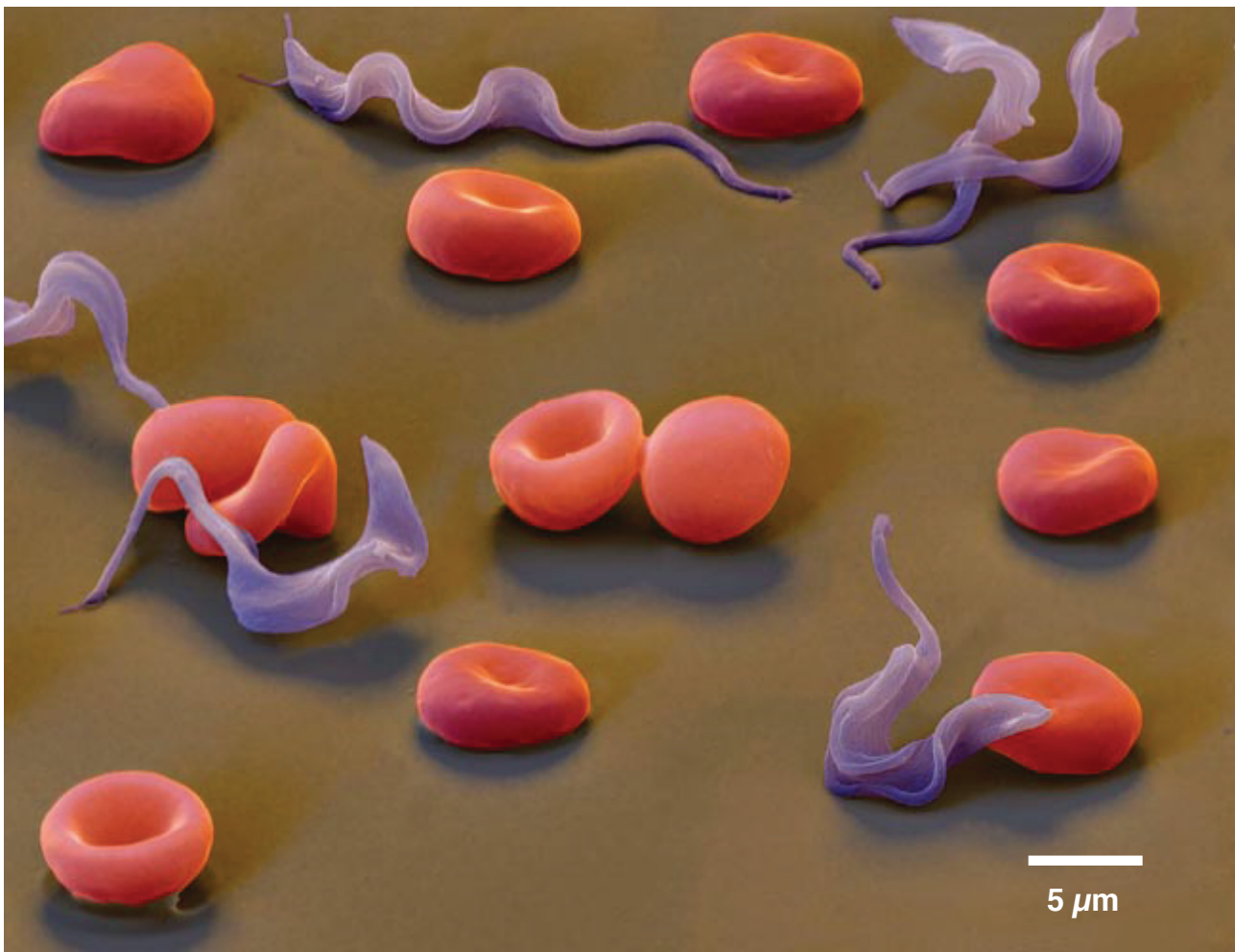


Abb. 4 | Nachkolorierte elektronenmikroskopische Aufnahme von Trypanosomen in einem Blutausstrich (Berriman *et al.*, 2005)

Das Blutssystem hält die weitgehende Homöostase von Temperatur und pH-Wert im Körper aufrecht. Auch die Abwehr von Krankheitserregern geschieht über das Blut. Trypanosomen breiten sich im Laufe der Infektion in sämtlichen Geweben des Wirtskörpers aus. Das Blutssystem ist mit dem lymphatischen System durch Poren und Spalten im Endothel der Kapillaren verbunden, gebildet aus den Lymphknoten und den Lymphgefäßen, durch die die Lymphflüssigkeit fließt (Brown, 2005). Blutplasma und Lymphe können somit miteinander gelöste Stoffe austauschen über ein Wechselspiel von hydrostatischem und osmotischen Druck. Erythrozyten, Blutplättchen und Plasmaproteine dagegen können die Kapillarwände nicht passieren. Ob Trypanosomen intakte Gefäßwände passieren können, ist nicht bekannt. Vertebraten besitzen ein geschlossenes Blutkreislaufsystem, d. h. das Blut verlässt niemals die Blutgefäße, während es z.B. in der Tsetsefliege offen die Leibeshöhle durchfließt, angetrieben von

einem schlauchförmigen Herzen. Bei den Mammalia kann man einen kleinen und einen großen Blutkreislauf unterscheiden, da linkes und rechtes Herzventrikel durch ein Septum getrennt sind. Im kleinen Blutkreislauf, dem Lungenkreislauf, wird das Blut vom rechten Herzventrikel zu den Lungen gepumpt, wo es mit Sauerstoff angereichert wird und dann über die Lungenvene zurück zum linken Herzen fließt. Von dort wird es über die linke Herzseite und die Aorta durch den gesamten Körper gepumpt. Nur etwa 1,5% des im Blut enthaltenen Sauerstoffes kommt physikalisch gelöst, frei vor, während die große Mehrheit chemisch an Hämoglobin gebunden ist. Gase und Nährstoffe können aus den Blutgefäßen in die interstitielle Gewebsflüssigkeit diffundieren.

Das lymphatische System ist nicht geschlossen. Auch das Lymphsystem ist einem hydrodynamischen Fluss unterworfen, allerdings ist dieser langsamer und sporadischer, da dort nicht aktiv gepumpt wird und es kein geschlossenes System darstellt, wie das Blutkreislaufsystem (Fischer *et al.*, 1996). Die Strömung der Lymphflüssigkeit wird hervorgerufen durch die peristaltische Kontraktion glatter Muskulatur, die Kontraktion von nahe gelegener Skelettmuskulatur und arteriellem Puls und ist zum Herzen hin gerichtet, durch die Aktivität von Klappen in den Lymphgefäßen.

Die physikalischen Bedingungen in den Arterien, Venen, Kapillaren und Venolen variieren beträchtlich. Die roten Blutkörperchen machen einen großen Anteil des Blutes aus. Dieser liegt bei etwa 45 % (v/v). Die zellulären Bestandteile machen Blut zu einer nicht-Newton'schen Flüssigkeit.

3.10 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine physiologische Barriere, die bei allen Tetrapoden das Blutkreislaufsystem vom Zentralnervensystem (ZNS) trennt. Trypanosomen zählen zu den wenigen Krankheitserregern, die in der Lage sind, diese Barriere zu überwinden und das Zerebrospinalfluid zu infizieren (Lee *et al.*, 2007). Dieser Umstand erschwert nicht nur die Therapierbarkeit der afrikanischen Schlafkrankheit, sondern erklärt auch die neurodegenerativen Symptome im späten Stadium des Krankheitsverlaufes (Barret, 1999; Kristensson *et al.*, 2009).

Die Blut-Hirn-Schranke wird durch eine Schicht von Endothelzellen (Monolayer) gebildet, die die Blutkapillaren umschließen und durch eine Kombination von Tight-junctions und Adherens-Junctions dicht abschließen. Diese Endothelzellen sind verantwortlich für den messbaren hohen transendothelialen elektrischen Widerstand (TER: "transendothelial electrical resistance"), der charakteristisch für die Blut-Hirn-Schranke ist (Nikolskaia *et al.*, 2006). Dadurch wird der systemische Blutkreislauf nahezu komplett abgetrennt vom zentralen Nervensystem. Es entstehen eigenständige Kompartimente, worüber reguliert wird, welche Substanzen ins ZNS gelangen können. Dies geschieht über hochselektive,

spezifische Rezeptoren, die gezielt Nährstoffe zum ZNS hin zuführen und im Gegenzug katabole Stoffwechselprodukte abführen. Das Gehirn hat einen sehr hohen Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff. Obwohl es nur etwa 2% der Körpermasse ausmacht, verbraucht es etwa 20% der Ruheenergie. Deshalb bilden die zerebralen Blutkapillaren ein dichtes Netz aus mit einem mittleren Abstand von etwa 40 μm , wie man in Gewebeschnitten sehen kann.

Die Trennung von ZNS und Blutkreislauf dient der Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS und dessen Schutz vor Umwelteinflüssen. Zudem werden sowohl die meisten Arten von Krankheitserregern, Toxinen, Botenstoffen, aber auch die meisten therapeutischen Wirkstoffe vom ZNS abgehalten und es entsteht ein unabhängiges chemisches Milieu im ZNS (Barret, 1999). Einige wenige Hormon-produzierende Hirnareale (u.a. die Neurohypophyse) bilden die einzige Ausnahme, denn hier ist die Blut-Hirn-Schranke nicht vollständig dicht, sondern es sind Fenestrierungen vorhanden, um auf bestimmte Substanzen reagieren zu können und selbst Hormone in den Blutkreislauf ausschütten zu können.

Die Blut-Hirn-Schranke der zerebralen Kapillaren besteht nicht nur aus den Endothelzellen selbst, sondern diese sind von einer kontinuierlichen Schicht aus Proteinen, der Basallamina, auch als extrazelluläre Matrix bezeichnet (ECM), umgeben, sowie von Perizyten und Astrozyten (Kristensson *et al.*, 2009). Die peripheren Kapillaren dagegen sind zwar auch benachbart mit Perizyten, allerdings in sehr viel geringerem Verhältnis, nicht jedoch mit Astrozyten und sind relativ permeabel, da sie Fenestrierungen und Intrazellulärspalten aufweisen. Die Fenestrierungen sind nicht größer als 50 nm, die Intrazellulärspalten jedoch können bis zu einem Mikrometer weit sein. Letzterer Wert liegt in der Größenordnung des Zelldurchmessers eines Trypanosoms (ca. 2,5 - 3 μm). Von den Perizyten nimmt man an, dass sie die Permeabilität des Endothels regulieren. Die sternförmigen Astrozyten kommen nur im ZNS vor, sezernieren eine Reihe von Botenstoffen und induzieren dadurch in den Endothelien die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke, wie man aus Transplantationsstudien weiss.

Es wurde gezeigt, dass die Blut-Hirn-Schranke trotz ihrer Durchdringung durch Trypanosomen intakt bleibt (Nikolskaia *et al.*, 2006). Dies wurde anhand des elektrischen Widerstands gemessen, der sich bei einer Öffnung einer dichten Endothel-Zellschicht zwar kurzzeitig verringert, dann aber wieder regeneriert. Dies erklärt auch, weshalb die nicht-ZNS-gängigen Therapeutika auch im späteren Verlauf der Krankheit nicht ins ZNS gelangen können. Der genaue Mechanismus der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch Trypanosomen ist noch nicht komplett aufgeklärt, wenn auch publiziert wurde, dass der Ca^{2+} -Signalweg in den Endothelzellen dabei eine Rolle spielt (Nikolskaia *et al.*, 2006; Kristensson *et al.*, 2009). Allerdings liegt auch der Gedanke nahe, dass auch der Schlag der Zuggeißel dabei beteiligt sein könnte (Griffiths *et al.*, 2007).

Neben der Blut-Hirn-Schranke gibt es auch weitere Abgrenzungen zwischen den einzelnen Körperkreisläufen. Dabei unterscheidet man die Blut-Liquor-Schranke, die Blut-Plazenta-Schranke, die Blut-Hoden-Schranke, die Blut-Harn-Schranke, die Blut-Retina-Schranke, die Blut-Thymus-Schranke sowie die Blut-Luft-Schranke. Trypanosomen sind in der Lage nicht nur die Blut-Hirn-, sondern auch die Blut-Liquor-, die Blut-Plazenta- und die Blut-Hoden-Schranke zu überwinden (Claes *et al.*, 2009). Man kennt Störungen der Blut-Hirn-Schranke als Folge von neurodegenerativen Erkrankungen, Toxinen, Tumoren, oder Gehirnverletzungen, aber auch als Folge von Diabetes oder Entzündungen. Bei erhöhter Temperatur wird die Blut-Hirn-Schranke ebenfalls durchlässiger. Zu den Pathogenen, die die Blut-Hirn-Schranke passieren können gehören *Vibrio cholerae* und *Neisseria meningitidis*. Über die Rolle der afrikanischen Trypanosomen und deren Abbauprodukten während des Krankheitsverlaufes ist bekannt, dass alle pathogenen Spezies eine Aggregation der Blutplättchen bewirken. Die Aggregation von Blutplättchen ist wahrscheinlich das erste Stadium von Blutgerinnungskrankheiten und Gewebeschäden, die signifikante pathologische Effekte der Trypanosomiasis sind.

4. Motivation der Arbeit

Da rezente Veröffentlichungen zunehmend auf die Bedeutung der Motilität von Trypanosomen hinweisen, aber dennoch kaum Literatur zu dem Modus ihrer Fortbewegung existiert, zielt diese Arbeit darauf ab, das Schwimmverhalten der Trypanosomen quantitativ zu erfassen.

Trypanosomen durchlaufen einen Wirtswechsel, bei dem morphologisch unterscheidbare Stadien innerhalb einer Trypanosomenart auftreten (Matthews, 2005). Wie sich die Unterschiede der einzelnen Zellzyklusstadien auf deren Motilität auswirken, ist bisher nicht bekannt. Die bisherigen Erkenntnisse wurden meist aus den Fliegenstadien der Trypanosomen gewonnen. Die Motilität hat jedoch gerade bei den infektiösen Blutstromformen eine besondere Bedeutung, da diese ohne ein aktiv schlagendes Flagellum weder in Zellkultur, noch im Säugerwirt lebensfähig sind. Daher gilt das besondere Augenmerk in dieser Arbeit der Motilität der Blutstromformen.

Nahe liegende Parameter, die man messen kann, um die Fortbewegung von Zellen quantitativ zu beschreiben sind Maximalgeschwindigkeit, Durchschnittsgeschwindigkeit, oder Minimalgeschwindigkeit. Betrachtet man eine Population von Trypanosomen unter dem Mikroskop, so fällt jedoch auf, dass einzelne Zellen starke Unterschiede bei ihrer Fortbewegung aufweisen. Viele der Zellen zeigen kaum Netto-Fortbewegung. Die Minimalgeschwindigkeit geht also gegen Null. Auch die Zellen, die sich fortbewegen, machen über die Zeit gesehen keinen konstanten Eindruck. Daher reicht es nicht, nur einzelne Zellen zu betrachten, sondern ich werde die Betrachtungsweise auf eine größere Anzahl von Zellen, bzw. auf Zellpopulationen ausdehnen.

Zudem befasst sich diese Arbeit erstmalig mit der Rolle der Umweltbedingungen auf die Motilität der Trypanosomen. Die natürliche Umwelt der Trypanosomen (das Blutssystem des Säugerwirts) unterscheidet sich stark von den Zellkulturbedingungen, unter denen frühere Erkenntnisse über die Motilität der Trypanosomen gewonnen wurden. Tatsächlich spielen in der Größenordnung einzelner Zellen die viskosen Kräfte eine viel dominierendere Rolle, als wir sie aus unserer Alltagserfahrung her kennen. Zudem sind die Zellen im Blutstrom starken Scherkräften unterworfen und bisher ist nicht geklärt, wie Trypanosomen den auftretenden Kräften widerstehen können, oder wie die Bewegung der Zellen von der Strömung oder der Interaktion mit Grenzflächen und anderen Objekten beeinflusst wird. In dieser Arbeit finden Mikrofabrikationstechniken Anwendung, mit denen sich Mikrokanäle und andere Mikrostrukturen herstellen lassen. Dies stellt einen komplett neuen Ansatz für die Untersuchung der Motilität der Trypanosomen dar, bei dem physiologische Bedingungen *in vitro* nachgestellt, aber auch systematisch variiert werden können.

5. Ergebnisse

5.1 Entwicklung einer Methode zur Analyse der Bewegung basierend auf automatisierter Fluoreszenzmikroskopie

Ergebnis: Um den Durchsatz der Experimente zu erhöhen, statistisch relevante Datenmengen zu erreichen und die Analyse möglichst von dem durchführenden Experimentator unabhängig zu gestalten, wurde in dieser Arbeit ein komplett Software-gesteuertes System entwickelt, welches auf Fluoreszenzmikroskopie basiert und Experimente in Echtzeit autonom durchführen und auswerten kann. Um systematische Fehler auszuschliessen, wurden diese Ergebnisse durch semiautomatisch durchgeführte Experimente ergänzt und validiert. Zu dem Zeitpunkt dieser Arbeit war kein kommerzielles Mikroskopsystem erhältlich, das eine vollständige Automatisierung für das Tracking von Zellen in Echtzeit in Kombination mit einer, für die Untersuchung der Motilität der Trypanosomen ausreichend hohen Bildrate erlaubt. Deswegen wurde die nötige Steuerungssoftware (JMic) eigenständig entwickelt.

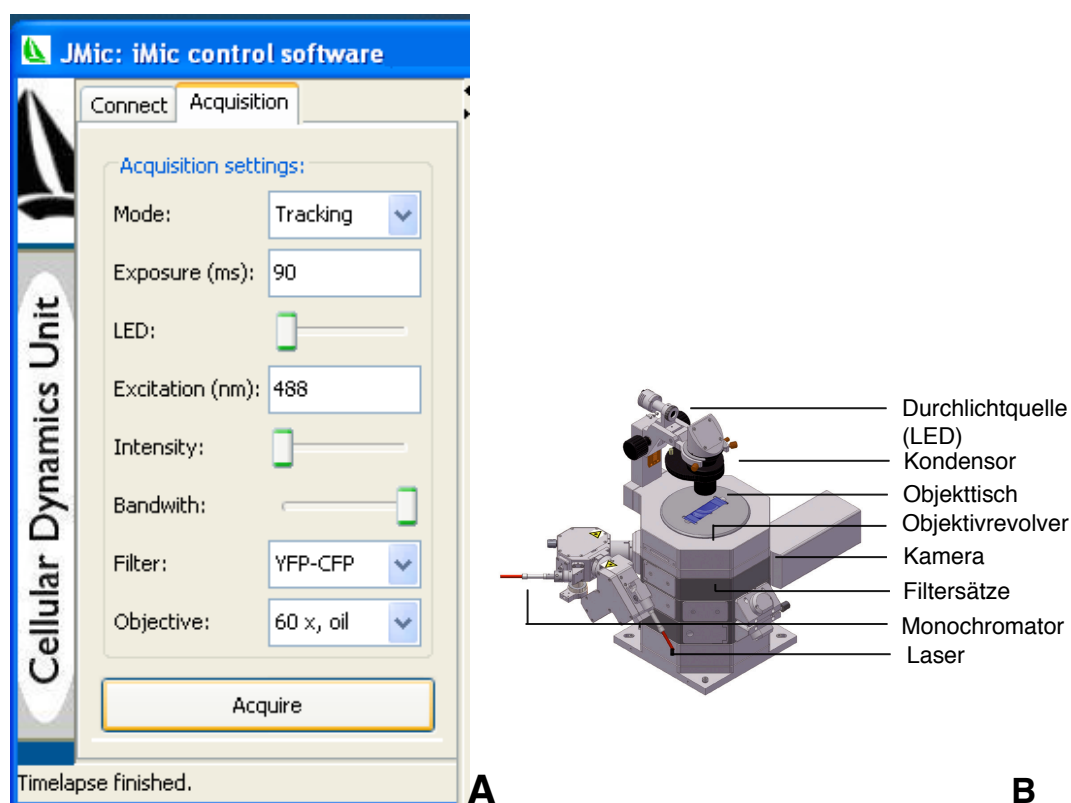


Abb. 5 | Entwicklung einer Software für das autonome Tracking von Zellen in Echtzeit. **A** Bildschirmausdruck der graphischen Benutzeroberfläche der JMic Software, die gezielt für die Motilitätsexperimente dieser Arbeit selbst entwickelt wurde. **B** Die Software steuert alle Komponenten eines vollständig automatisierten Mikroskopsystems (iMic; TILL Photonics, Gräfelfing) autonom und reagiert auf die Bewegung der zu verfolgenden Zellen. Die Umsetzung erfolgte in der plattformunabhängigen und objektorientierten Programmiersprache Java.

Analyse: Die entwickelte JMic-Software erlaubt es aus automatischen Aufnahmen in Echtzeit die Anzahl und Position der Zellen in dem aufgenommenen Bildausschnitt zu ermitteln. Das verwendete Verfahren zur Erkennung der Zellen kommt ohne eine komplexe Mustererkennung aus. Daher sind vergleichsweise wenige Rechenoperationen nötig, so dass die Analyse in Echtzeit parallel zu den Aufnahmen abläuft. Das automatisierte System kann daher direkt auf Veränderungen reagieren, so z.B. wenn sich das Objekt aus dem Fokus oder dem Bildbereich bewegt. Sind zu wenige oder zu viele Zellen in dem Bildbereich, so kann die Software gleich einen anderen Bereich auf dem Objektträger anfahren oder ganze Objektträger absuchen.

Bei höheren Vergrößerungen, die nötig sind um Details der Zellmorphologie aufzulösen, ist der Bildausschnitt auch bei voller Bildausnutzung der CCD-Kamera nur in der Größenordnung von 100 - 200 μm im Quadrat. Bei einer Schwimmggeschwindigkeit von 10 $\mu\text{m s}^{-1}$ und mehr benötigt ein gerichtet schwimmendes Trypanosom daher nur wenige Sekunden, um den Bildausschnitt wieder zu verlassen. Dies ist zu kurz für verlässliche Aussagen über das genaue Bewegungsmuster auf Einzelzellebene. Durch die vollständige Automatisierung in Kombination mit Tracking einzelner Zellen in Echtzeit, konnte der Beobachtungszeitraum bei maximaler optischer und zeitlicher Auflösung entscheidend verlängert werden. Die JMic-Software erkennt dabei einzelne Zellen in Echtzeit und verfolgt jeweils eine spezifische Zelle über einen längeren Zeitraum automatisch, durch Steuerung eines motorisierten Mikroskoptisches, so dass die Zelle immer im dynamischen Bildausschnitt bleibt (Abb. 6).

Ergebnis: Die selbstentwickelte Steuersoftware ermittelt in Echtzeit die Trajektorien durch die Positionsbestimmung der Zelle in X, Y und Z Koordinaten. Die Anpassung des dynamischen Bildausschnittes in dem sich die Zelle befindet, sowie eine Autofokussierung erfolgte dabei mit einer zeitlichen Auflösung von 125 ms (8 Hz). Die Algorithmen zur Mustererkennung sowie der Hardwaresteuerung, Auswertung der Bewegung und der graphischen Darstellung für den Benutzer wurden eigens dafür in der Programmiersprache Java entwickelt. Einige besonders zeitkritische Teile der Steuerungssoftware, die die Synchronisation der einzelnen Geräte übernehmen, wurden wegen der höheren Ausführungsgeschwindigkeit von nativen Programmen in der relativ maschinennahen Sprache C programmiert und über JNI (Java native interface) als Schnittstelle eingebunden.

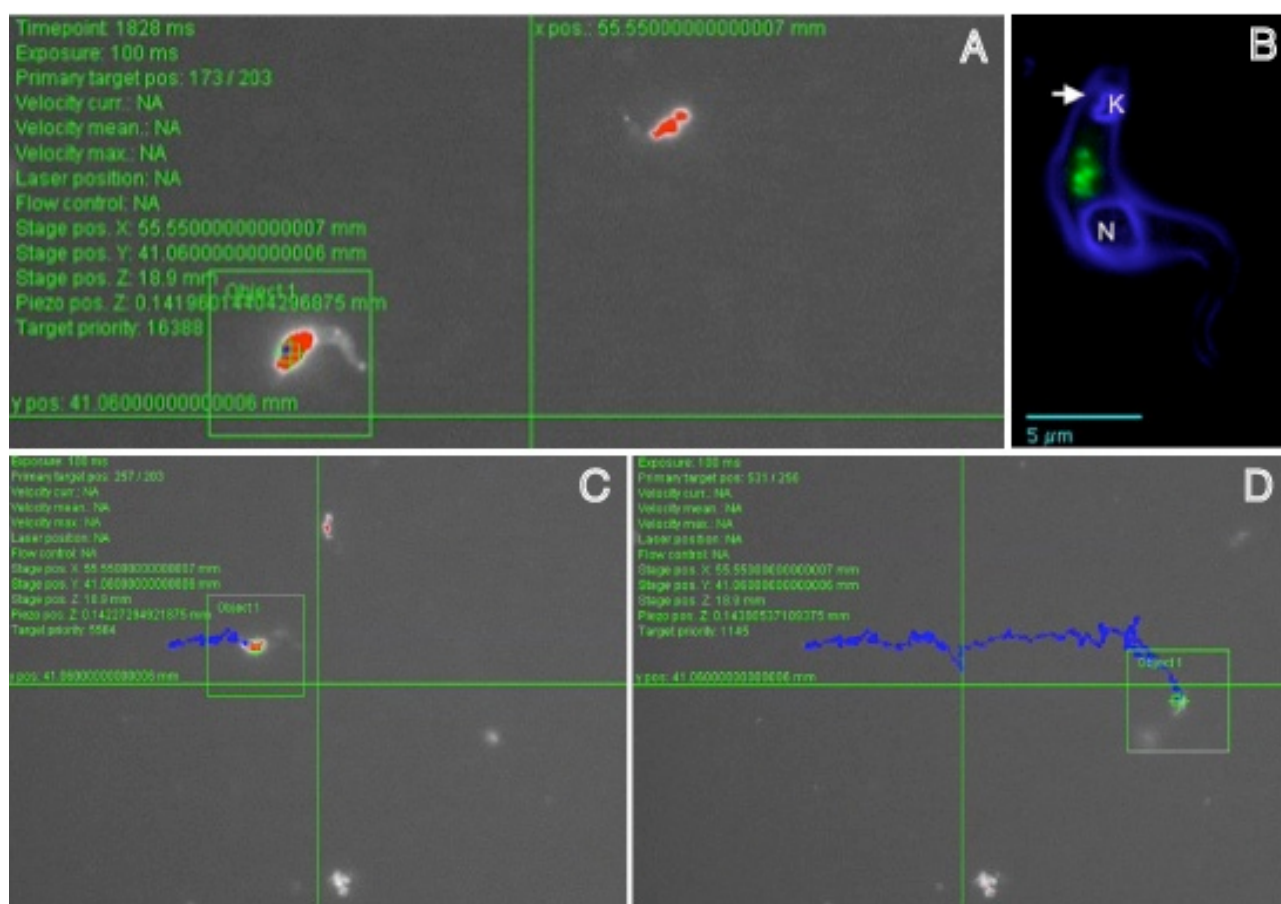


Abb. 6 | Automatische Erkennung und Verfolgung (Tracking) schwimmender Trypanosomen. A, C, D Bildschirmausdruck der selbst entwickelten Steuersoftware JMic, der ein Fluoreszenz-gefärbtes Trypanosom zeigt, das von dem autonom agierenden Mikroskopsystem verfolgt wird. Bereits während dem laufenden Experiment wird die aktuelle Position der Zelle (rot) als X/Y/Z Koordinate, der dynamische Bildausschnitt (grün) sowie der bisher zurückgelegte Weg (blau) dargestellt. B Durch die Verwendung fluoreszierender Markerproteine (grün) konnte die Positionsbestimmung der Zelle weiter verbessert werden.

Analyse: Das prinzipielle Vorgehen bei der Erkennung einzelner Zellen ist, aus dem zweidimensionalen Bild eine eindimensionale Projektion auf eine Achse (z.B. X-, Y- oder aber eine beliebige andere Achse, wie z.B. die Bilddiagonale) zu errechnen, indem die einzelnen Werte aller Pixel auf der jeweiligen Projektionsgeraden gemittelt werden, vergleiche dazu Rabut und Ellenberg (2004). Um die Berechnung unabhängig von der Größe des Bildausschnittes zu gestalten, wird die Signalstärke jeweils auf die Pixelanzahl normiert. Sind die Zellen heller als der Hintergrund, so repräsentiert jeder lokale Maximalwert in der Projektion genau eine Zelle. Diese, vom Rechenaufwand her, hoch effiziente, wenn auch nicht ganz intuitive Herangehensweise ist in Abb. 7 veranschaulicht.

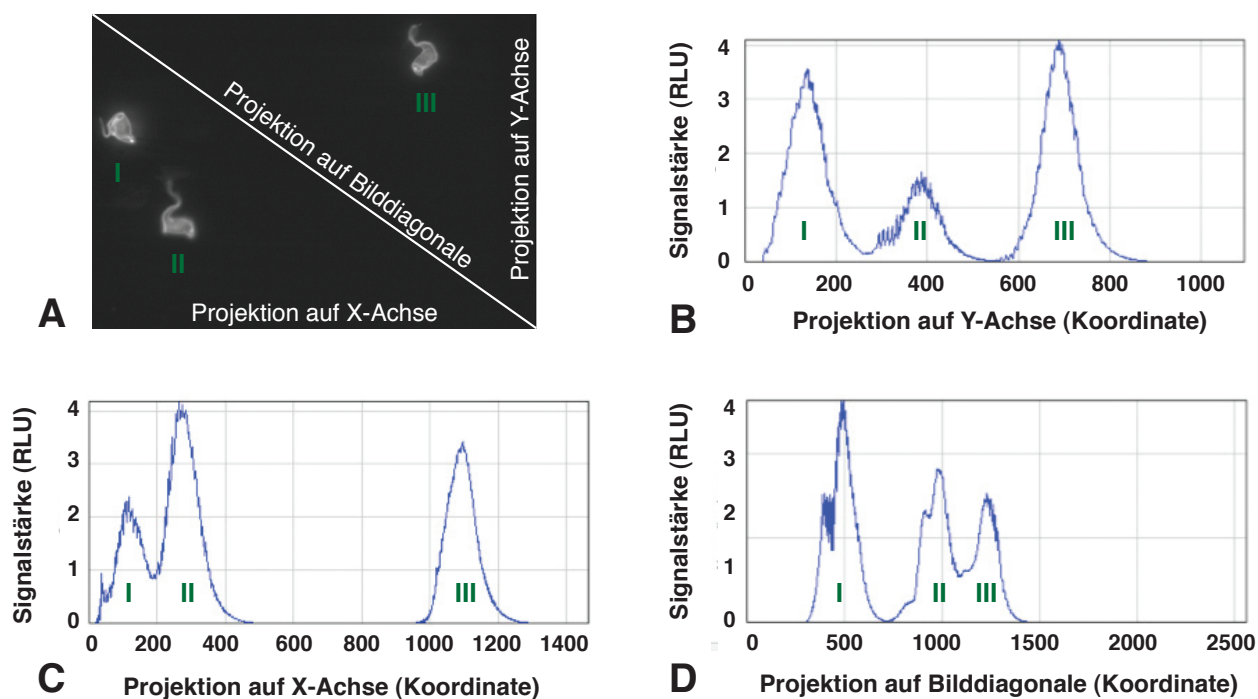


Abb. 7 | Automatisierte Detektion von Zellen unter Verwendung von Achsenprojektionen. (A) In der Fluoreszenzaufnahme sind drei Zellen zu finden (als I, II und III markiert). Zur Veranschaulichung sind zusätzlich die X- und Y-Achse, sowie die Bilddiagonale eingezeichnet. In den Diagrammen (B, C, D) sind die relativen mittleren Intensitätsverteilungen in unterschiedlichen Projektionen auf die X-, Y- bzw. die Bilddiagonale dargestellt. Die Anzahl an lokalen Maxima der Kurven der einzelnen Projektionen spiegelt die Anzahl der im Bildausschnitt enthaltenen Zellen wieder. Dementsprechend zeigen die jeweiligen Projektionen der Originalaufnahme (A) auf die Y-Achse (B), die X-Achse (C) bzw. auf die Bilddiagonale (D) auch jeweils drei lokale Maxima. Die Koordinaten der Maxima in der X-/bzw. Y-Projektion spiegeln direkt die X- und Y-Positionen der einzelnen Zellen wieder. Für die eindeutige Zuordnung jeder einzelnen X-Koordinate zu der entsprechenden Y-Koordinate wird eine zusätzliche Projektion auf die Bilddiagonale (D) verwendet.

Dieser Algorithmus ist unabhängig von Form, Lage und Größe der einzelnen Zellen und dadurch für die komplex geformten Trypanosomen in der praktischen Anwendung robuster und mit weniger Rechenaufwand realisierbar, als Verfahren, die auf einer Mustererkennung beruhen. Im Vergleich zu Berechnungen, die auf den tatsächlichen Bildpunkten eines Bildes mit 1000 x 1000 Pixeln beruhen, ist die Anzahl der benötigten Rechenoperationen bei Verwendung der Projektionen um fast drei Größenordnungen geringer, was die Verfolgung einzelner Zellen bei hoher zeitlicher Auflösung in Echtzeit erlaubt.

Ergebnis: Zusätzlich zu der Positionsbestimmung in X und Y wird auch die Z-Position der Zelle im laufenden Experiment dynamisch bestimmt. Dabei wird ein ebenfalls durch die JMIC-Software gesteuertes Piezoelement verwendet, das unterschiedliche Z-Positionen für Schichtaufnahmen innerhalb von maximal 3 ms präzise ansteuern kann. Aus der Verteilung der Fluoreszenzsignalintensität wird über die bekannte Punktspreizfunktion (PSF) das Intensitätsmaximum und damit die Position der Zelle in der Z-Achse berechnet (Abb. 8).

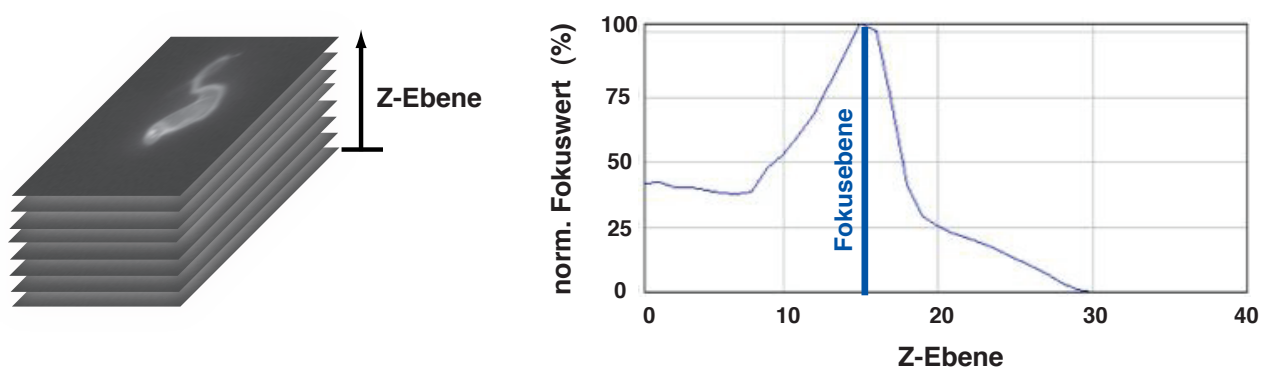


Abb. 8 | Ermittlung der Z-Position durch die Punktspreizfunktion (PSF). Das berechnete Intensitätsmaximum des normierten Fokuswertes entspricht dabei der Position der Zelle in der Z-Ebene.

Automatisierte Erkennung von Trypanosomen durch Bewegungsfilter

Ergebnis / Durchführung: Trypanosomen in mikroskopischen Aufnahmen durch Mustererkennung automatisch zu detektieren ist kein leichtes Unterfangen, da der Schlag des angehefteten Flagellums den gesamten Zellkörper verformt, und die Zellform daher sehr stark variiert. Doch gerade diese Bewegung der Zellen kann genutzt werden, um diese zu detektieren. Die Bewegung der Zellen bewirkt in aufeinander folgenden Aufnahmen eine lokal erhöhte Varianz der Signalintensität. Ein Kamerachip kann als Messinstrument betrachtet werden, das Millionen von Messungen gleichzeitig durchführen kann (eine für jeden Pixel). Die Intensitäten der entsprechenden Pixel aus mehreren Einzelbildern stellen wiederholte Messungen dar, aus denen Mittelwerte, Standardabweichungen und Varianzen für jeden einzelnen Pixel errechnet werden können. Auf die Varianz der Werte wurde eine Grenzwertprüfung (Threshold) angewendet, wodurch ein vereinfachtes, binäres Bild entsteht. Anschliessend wurden alle Pixel mit Werten ungleich Null zu zusammenhängenden Bereichen zusammengefasst. Hatten diese Bereiche die, für ein Trypanosom erwartete Größe, so wurden diese jeweils als Zelle gewertet (Abb. 9).

In der einfachsten Form wird durch diesen Bewegungsfilter ein Differenzbild aus zwei Einzelbildern gebildet. Dieses ist allerdings stark von Rauschen oder besonders einer Verwackelung der Kamera betroffen. Daher wurden hier nicht nur zwei, sondern möglichst viele Einzelbilder (mindestens 10) genutzt um verlässliche Werte für den Mittelwert eines jeden Pixels und des Hintergrundsignals zu errechnen. Das Hintergrundsignal wird in der aktuellen Aufnahme von jedem Pixel abgezogen, wodurch das Signal vom Hintergrund abgegrenzt wird. Ist der dabei entstehende Wert negativ, so wird dieser auf Null gesetzt. Je mehr Einzelbilder dabei mit einbezogen werden, desto eher wird statistisches Rauschen entfernt.

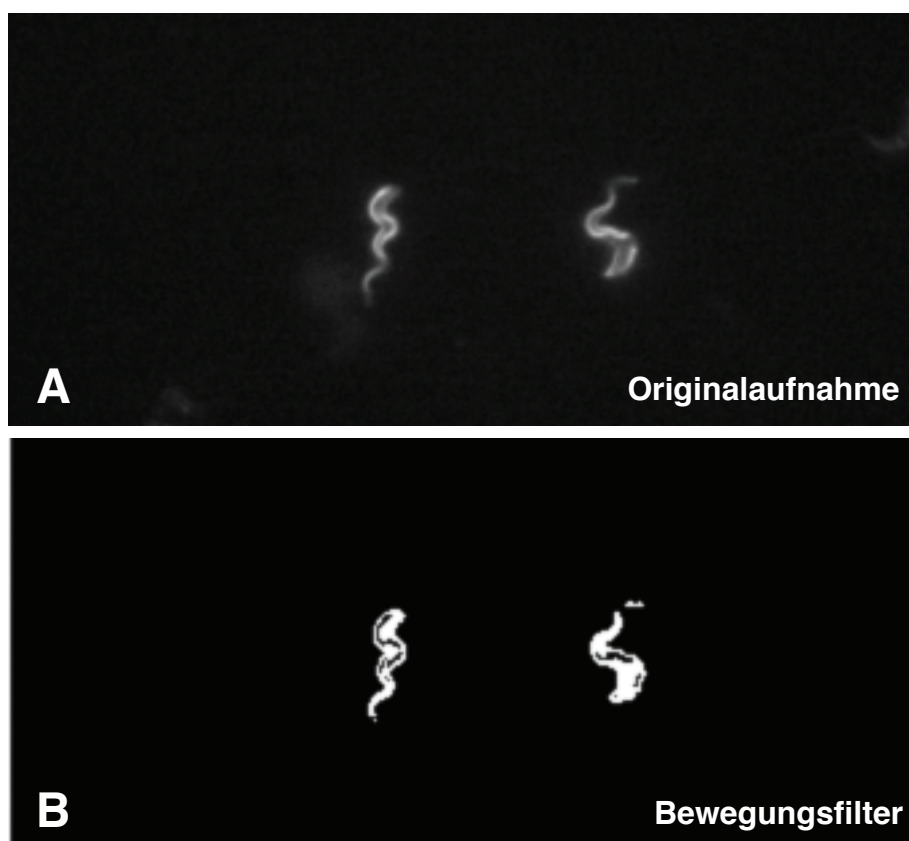


Abb. 9 | Ein Bewegungsfiler für die Detektion motiler Zellen. **A** Einzelaufnahme, die zwei lebende und mehrere tote Trypanosomen, sowie Verschmutzungen des Objektträgers zeigt, die alle ein Fluoreszenzsignal im Bild ergeben. **B** Aus mehreren sequentiell aufgenommenen Einzelbildern berechnete Varianz nach Anwendung einer Schwellwertoperation. Unbewegliche Objekte, wie tote Zellen oder Staubpartikel wurden durch diesen Filter entfernt.

Um Signale, die über dem Mittelwert liegen weiter zu amplifizieren, wurden die Werte von Signal und Hintergrund quadriert bevor sie voneinander subtrahiert werden. Als neuer Wert wird dem entsprechenden Pixel dann die Wurzel der quadrierten Differenz zugewiesen. Damit ist sichergestellt, dass der errechnete Wert nicht höher werden kann, als die Farbtiefe des Bildes es zulässt (z.B. maximal 255 Graustufen bei 8 bit Auflösung).

Analyse der Geschwindigkeit der Zellen

Um die Geschwindigkeit einer motilen Zelle bestimmen zu können, ist es nötig, die zurückgelegte Strecke und die dafür benötigte Zeit zu kennen. Die Strecke zwischen zwei Positionen $\{(x, y), (x', y')\}$ wurde als euklidische Distanz in Pixeln aus den Einzelkoordinaten berechnet:

$$d = \sqrt{(x-x')^2 + (y-y')^2}$$

Die Umrechnung der Distanzen und Geschwindigkeiten von Pixeln auf eine absolute Größe, wurde unter Berücksichtigung des ausgewählten Objektivs und der jeweiligen Kamera direkt in der Software realisiert. Da der Abstand von einem Pixel zum Nächsten (p) in einem CCD Chip konstant ist, gilt folgende allgemeine Beziehung, mit der der Pixelabstand (d') in den realen Abstand (d) umgerechnet werden kann, unter Berücksichtigung vom Binningfaktor (b) und der optischen Gesamtvergrößerung (v):

$$d = \frac{d' \cdot b \cdot p}{v}$$

Unter Binning versteht man das Zusammenfassen benachbarter Pixel zu einem Pixel, beim Auslesen des Kamerachips. Wird kein Binning angewendet, so hat der Binningfaktor den Wert eins. So war zum Beispiel der mittlere Abstand zwischen zwei horizontal angrenzenden Pixeln in einer Aufnahme bei einer Pixelgröße der CCD Kamera von $6,4 \mu\text{m}$ (p), einer Vergrößerung von $60 \times$ (v) und einem Binning von 2 (b) in diesem Fall: $d = 213,3 \text{ nm}$.

Die Korrektheit der berechneten Abstände wurde überprüft durch Vermessung von Objekten mit genau bekannter Größe, so z. B. den regelmäßig angeordneten Gitternetzlinien einer Neubauer-Zählkammer. Der tatsächlich zurückgelegte Weg einer motilen Zelle wird aber immer höher liegen als die Summe der Einzeldistanzen, da immer nur eine begrenzte Anzahl von Einzelpositionen zu einer limitierten Anzahl an Zeitpunkten berücksichtigt wird. Die ermittelte Geschwindigkeit ein und derselben Zelle fällt daher mit höherer Bildaufnahme und Auswerterate höher aus.

Optimierung der Bildrate

Für das, in dieser Arbeit verwendete automatisierte Fluoreszenzmikroskopsystem iMIC (TILL Photonics, Gräfelfing) stand von Herstellerseite her nur Software und Hardware zur Verfügung, die die eine maximale Bildrate von etwa 10 Hz erlaubte. Gemäß dem Nyquist-Shannon-Theorem können bei dieser Bildrate nur Bewegungen mit einer Frequenz $< 5 \text{ Hz}$ gemessen werden. Dies ist nicht ausreichend, um die schnelle Bewegung des Flagellums von Trypanosomen zeitlich aufzulösen. Daher war es unerlässlich die Bildrate zu verbessern um das genaue Bewegungsmuster der Trypanosomen zu untersuchen.

Ergebnis: Durch Computergesteuerte Begrenzung des, von der Kamera ausgelesenen Bildbereiches, der sich jeweils mit der motilen Zelle in Echtzeit dynamisch mitbewegt, konnte die Bildrate um mehr als Faktor zwei erhöht werden. Dazu musste als Teil dieser Arbeit die Steuerung und Synchronisation der Geräte selbst programmiert werden. Hierzu wurde die, von der Herstellerfirma pco bereitgestellte, Programmierschnittstelle (pco SDK) verwendet und in der maschinennahen Sprache C programmiert, um die maximale

Performanz der Kamera zu nutzen. Darüber hinaus war es für die Entwicklung einer maximal performanten Steuerungssoftware nötig, Algorithmen zu finden, mit denen eine möglichst effiziente Abstimmung der einzelnen Geräte erreicht wird. Einige dieser Vorgänge sollten sich zeitlich überlappen, um maximale Performanz zu erreichen, z.B. das Auslesen eines Teils des Kamerachips mit gleichzeitiger Belichtung eines anderen Bereiches der Kamera für das folgende Bild, oder aber die Korrektur der Position in X/Y/Z über den motorisierten Objektisch oder den Piezogesteuerten Z-Trieb nach der Objekterkennung, während bereits das nächste Bild ausgelesen wird. Andere Hardware-Steuerungen dürfen sich dabei jedoch nicht zeitlich überlappen, da sonst z.B. kein neues Bild ausserhalb der Hardware-limitierten Taktfrequenz ausgelesen werden kann. Die Realisierung dieser Steuerung erfolgte in der Programmiersprache Java. Die einzelnen Hardware-Komponenten wurden dabei, wie es beim objektorientierten Programmieransatz üblich ist, durch entsprechenden Klassen und Methoden repräsentiert. Dies erlaubt in Kombination mit dem verwendeten Realtime-Controller "ICU" (TILL Photonics, Gräfelfing) eine konzertierte Steuerung aller Komponenten in Echtzeit durch elektrische Spannungsimpulse (Trigger). Dadurch konnte das Leistungsspektrum aller Komponenten voll ausgeschöpft werden.

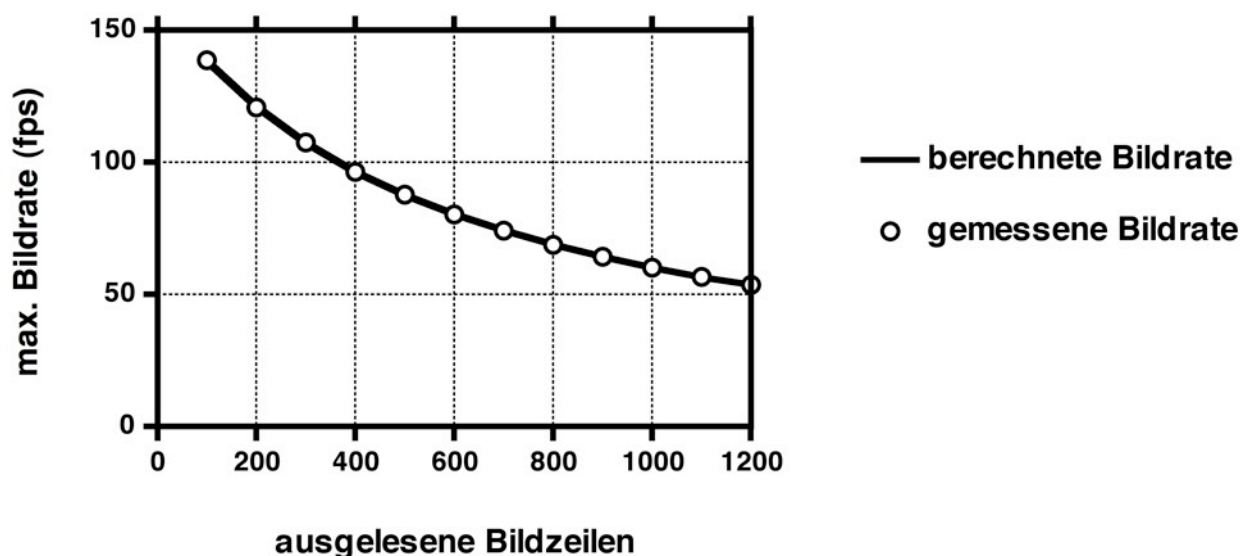


Abb. 10 | Maximale Bildfrequenz als Funktion der ausgelesenen Bildzeilen für die Kamera pco.1600. Die Anzahl an ausgelesenen Zeilen des CCD-Chips ist gegen die dabei maximal erreichte Bildrate aufgetragen (bei 2x Binning). Die größte Abweichung von experimentell gemessener und berechneter maximaler Bildrate betrug 0,3%. Die Leistungsfähigkeit der Komponenten des Mikroskopsystems wurden durch den verwendeten Steuerungsalgorithmus der JMic-Software damit nahezu optimal genutzt.

Um mit Hochgeschwindigkeitsaufnahmen den schnellen Schlag des Flagellums der Trypanosomen zu analysieren, wurden Kameras eingebunden, die eine Bildrate von 1.000 fps im Durchlicht bzw. 200 fps bei Fluoreszenzaufnahmen erlaubten. Eine Auflistung der

verwendeten Kameras und ihrer Eigenschaften ist im Kapitel Material und Methoden (Tabelle 8) zu finden.

Fazit: Die Analyse der schnellen Bewegung des Flagellums der Trypanosomen wurde erst ermöglicht durch die Verwendung eines automatisierten Mikroskopsystems und die Entwicklung der entsprechenden Steuersoftware, speziell für die jeweiligen Experimente.

5.2 Quantifizierung der Bewegung von Trypanosomenpopulationen

5.2.1 Die Mehrzahl der Blutstromformen taumelt in Zellkulturmedium

Ergebnis: Der Anteil an gerichtet schwimmenden Zellen in einer Trypanosomenpopulation wurde bestimmt als $26,8 \pm 8,7\%$ ($n = 1.000$). Die Standardabweichung wurde dabei aus den gewichteten Mittelwerten dreier unabhängiger Experimente ermittelt, mit insgesamt 1000 Zellen. Eine schwimmende Zelle ist dabei definiert als eine Zelle, die in einem Beobachtungsintervall von 30 Sekunden einen Bewegungsradius von mehr als $60 \mu\text{m}$ aufweist, was in etwa 3 Zelllängen entspricht. Man benötigt solche Definitionen, um die Ergebnisse möglichst objektiv zu gestalten und auch automatisierbar, d.h. durch Algorithmen auswertbar zu machen.

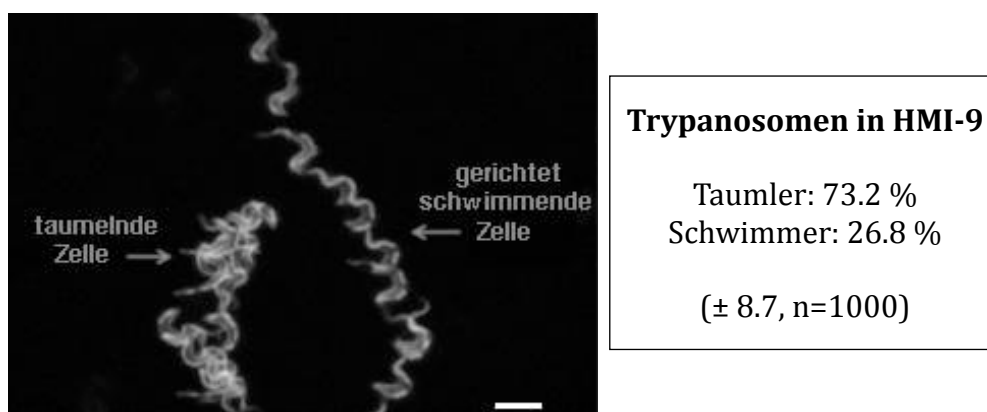


Abb. 11 | Die Mehrheit der Blutstromform Trypanosomen taumelt in dem Zellkulturmedium (HMI-9). Fluoreszenzmikroskopische Einzelbilder wurden als Zeitserie aufgenommen, mit einem zeitlichen Abständen von jeweils 1 Sekunde, und die Einzelbilder dann durch eine Z-Maximalwertprojektion überlagert. Links im Bild befindet sich ein taumelndes und rechts davon ein gerichtet schwimmendes BSF Trypanosom. Die Oberflächenfluoreszenz der Zellen stammt von der Autofluoreszenz des VSG'Y' Oberflächenproteins (Engstler, unveröffentlicht), das bei 390 nm Wellenlänge im DAPI-Filtersatz angeregt wurde. Größenbalken: $10 \mu\text{m}$

Es konnten Unterschiede bei der Motilität unterschiedlicher Zelllinien beobachtet werden. So war die transgene 13-90 Zelllinie mit nur etwa 10% persistent schwimmenden Zellen deutlich weniger motil als der Wildtyp. Wegen ihrer Expression von T7-Polymerase und Tet-Repressor ist 13-90 eine Standardzelllinie für die Herstellung rekombinanter BSF Trypanosomen (Ngô *et al.*, 1998).

Für einzelne, persistent schwimmende BSF-Trypanosomen wurden Geschwindigkeiten von bis zu $20 \mu\text{m s}^{-1}$ gemessen. Taumelnde Zellen hatten dagegen Geschwindigkeiten $\leq 5 \mu\text{m s}^{-1}$. Die Geschwindigkeit der Zellen wurde jeweils über eine Strecke von $250 \mu\text{m}$ bestimmt, in HMI-9 Zellkulturmedium.

Analyse / Interpretation: Betrachtet man eine Trypanosomenkultur unter dem Mikroskop, so fällt auf, dass zu jedem Zeitpunkt nur ein Teil der Zellen gerichtet schwimmt, während der größere Teil der Population unkoordinierte Bewegungen vollführt, die an Taumeln erinnern. Dies erklärt die großen Unterschiede der gemessenen Geschwindigkeit einzelner Zellen. Repräsentative Videoaufnahmen sind im Begleitmaterial zu finden. Damit eine freie Bewegung der Zellen sichergestellt war, wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer mit $100 \mu\text{m}$ Höhe bzw. in Kanälen mit einer Höhe von $800 \mu\text{m}$ mikroskopiert, was jeweils einem Vielfachen der Zelllänge entspricht ($20 - 25 \mu\text{m}$).

5.2.2 Geschwindigkeitsverteilung innerhalb einer Population

Ergebnis: Das Taumeln der Mehrheit einer Trypanosomenpopulation hat zur Folge, dass die Durchschnittsgeschwindigkeit der Population von der mehrheitlichen Taumlerfraktion bestimmt wird. Die gemessene Durchschnittsgeschwindigkeit lag daher mit $\leq 6 \mu\text{m s}^{-1}$ deutlich unter der Maximalgeschwindigkeit (etwa $20 \mu\text{m s}^{-1}$) in Standardzellkulturmedium (HMI-9). Aus den einzelnen Geschwindigkeiten einer ausreichend großen Anzahl von Zellen ($n = 979$) wurde eine Häufigkeitsverteilung erstellt (Abb. 12).

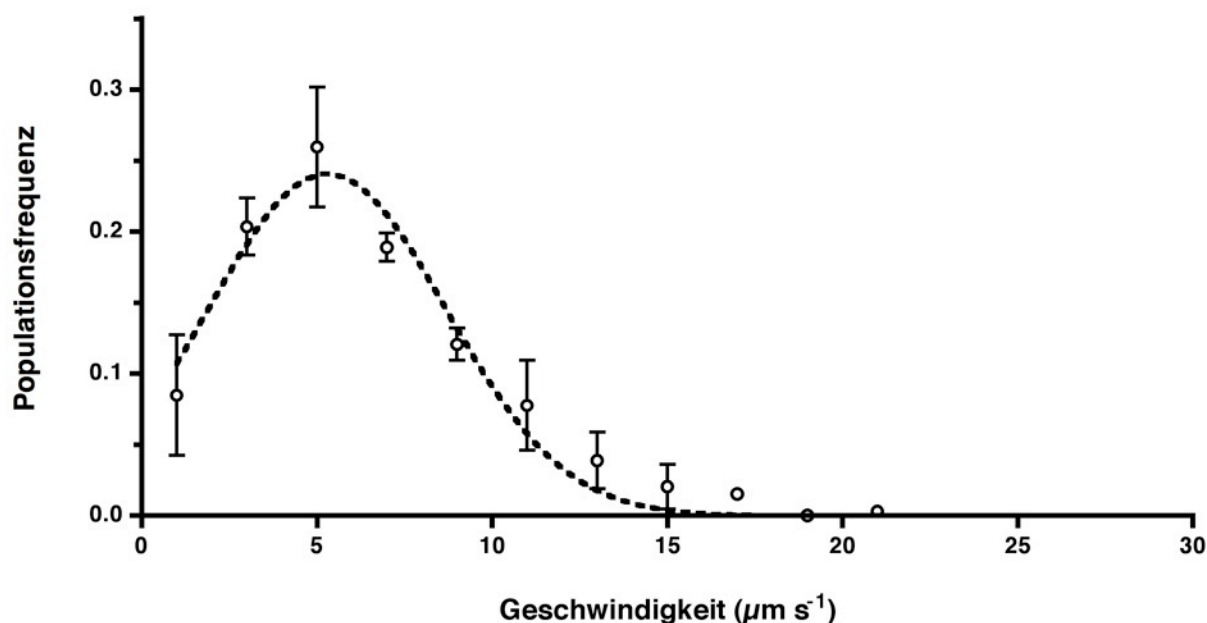


Abb. 12 | Geschwindigkeitsverteilung von BSF Wildtyp Trypanosomen in Zellkulturmedium (HMI-9). Die Häufigkeitsverteilung der Schwimgeschwindigkeit einer BSF Wildtyppopulation wurde bestimmt durch mikroskopische schrittweise Analyse der euklidischen Distanz aufeinander folgender Positionen des Massenschwerpunktes der Zelle, bei 1 Hz zeitlicher Auflösung. Es sind jeweils die Mittelwerte mit der zugehörigen Standardabweichung aus drei Experimenten gezeigt. Die gestrichelte Kurve zeigt die Näherung der einzelnen Werte durch eine Gaußverteilung. Die mittlere Geschwindigkeit der Population in HMI-9 betrug $5,7 \mu\text{m s}^{-1} \pm 0,11 \text{ SEM}$ ($n = 979$).

Analyse / Interpretation: Die gemessene Verteilung der Geschwindigkeiten innerhalb einer Trypanosomenpopulation kann durch eine Gauß- oder Normalverteilung angenähert werden. Einzelne Zellen schwammen jedoch deutlich schneller als nach dieser Verteilung zu erwarten wäre (bis zu $20 \mu\text{m s}^{-1}$). Dies weist darauf hin, dass mehrere Subtypen der Motilität innerhalb einer Population existieren. Die Abweichung ist aber, über alle Werte gesehen, nicht signifikant ($p = 0,61$). Auf einen möglichen Einfluss des verwendeten Mediums auf die Motilität der Trypanosomen wird in Kapitel 5.7 näher eingegangen.

5.2.3 Messung der Persistenz

Ergebnis / Beobachtung: Aktiv schwimmende *T. brucei brucei* BSF Zellen gehen vom gerichteten Schwimmen nach einiger Zeit zu einer Taumelbewegung über. Die Persistenzstrecke einer Zelle ist hier definiert als diejenige Distanz an, die die Zelle während einer Phase des gerichteten Schwimmens zurücklegt, bevor die Zelle wieder zu einer Taumelphase übergeht. Die statistische Verteilung der Persistenzstrecken einer Population in Standardzellkulturmedium (HMI-9) betrug $143 \pm 20 \mu\text{m}$ (Abb. 13).

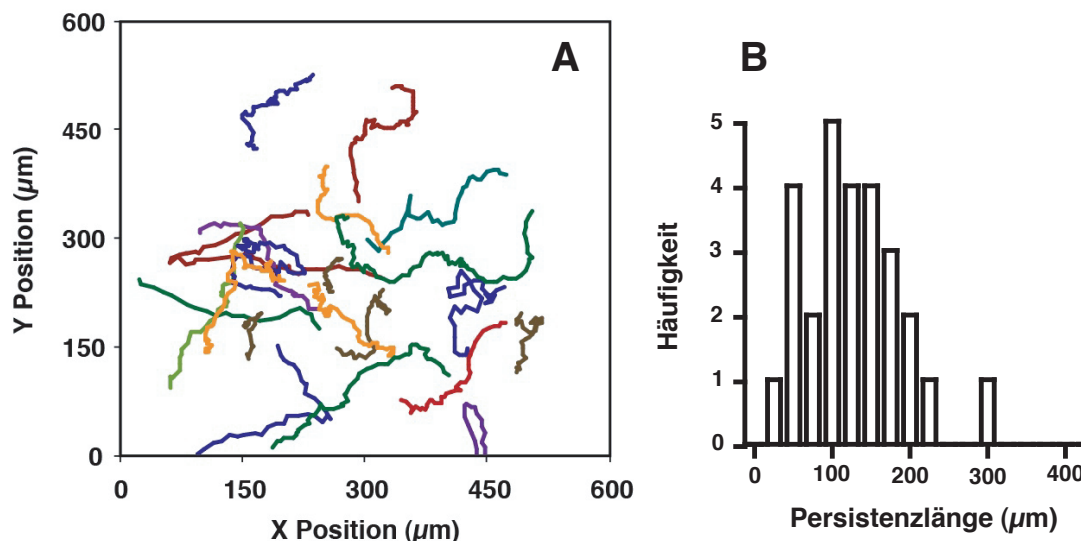


Abb. 13 | Persistenzanalyse bei gerichtetem Schwimmen. Für die in **A** abgebildeten Trajektorien von BSF Trypanosomen ($n=20$) wurde die Persistenz während einzelnen Phasen des gerichteten Schwimmens gemessen. Die statistische Verteilung der Persistenzlänge ist in **B** dargestellt. Eine typische Phase des gerichteten Schwimmens liegt in der Größenordnung von $100 \mu\text{m}$ und mehr. Die durchschnittliche Länge von klar unterscheidbaren Phasen des gerichteten Schwimmens, gefolgt von einer Taumelphase lag bei $143 \pm 20 \mu\text{m}$ (SEM, $n=27$).

Die Phase des Taumelns kann über Minuten anhalten, bis die Zellen wieder in die nächste Phase des gerichteten Schwimmens übergehen. Während des Taumelns wechseln die Zellen sehr schnell die Orientierung des Flagellums. Wenn die Zellen anschliessend wieder zum gerichteten Schwimmen übergehen, können sie ihre Bewegung dadurch in eine andere Richtung fortsetzen. Die durchschnittliche Dauer einer Phase des gerichteten Schwimmens lag durchschnittlich bei $11,6 \pm 10,4$ Sekunden ($n=50$) in HMI-9 Medium. Die Messung erfolgte in einer Probenkammer mit $100 \mu\text{m}$ Höhe, um eine freie Bewegung der Zellen zu gewährleisten.

Interpretation / Analyse: Die gemessene Schwimgeschwindigkeit während einer Phase des gerichteten Schwimmens ($10 - 20 \mu\text{m s}^{-1}$), multipliziert mit der gemessenen Persistenzdauer (etwa 10 Sekunden) passt gut zu der gemessenen mittleren Persistenzstrecke von ca. $150 \mu\text{m}$. Die Varianz der zurückgelegten Schwimmdistanz einzelner Zellen ist sehr hoch, was wiederum konsistent ist mit der hohen Varianz der Persistenzdauer. Diese hohe Varianz auf Einzelzellebene weist auf eine stochastische Verteilung der Taumelphasen hin. Die zwischengeschalteten Taumelphasen können sehr kurz sein und einzelne Taumelphasen können daher leicht unbemerkt bleiben.

5.2.4 Ermittlung der Direktionalität

Ergebnis: Die durchschnittliche Direktionalität gerichtet schwimmender Zellen betrug 0,60 gemessen über eine Dauer von jeweils 80 Sekunden. Die Direktionalität von taumelnden Zellen lag dagegen bei nur etwa 0,1 - 0,3. Zellen in der letzten Phase der Zellteilung, die zwei gegenständige Flagellen besitzen, zeigten eine besonders geringe Direktionalität (von ca. 0,1).

Analyse / Interpretation: Die Direktionalität einer Zelle ist hier definiert als deren maximal zurückgelegte Distanz vom Startpunkt geteilt durch die insgesamt zurückgelegte Strecke. Aufgrund dieser Definition besitzt die Direktionalität keine Einheit und kann nur Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Die geringe Direktionalität der sich teilenden Zellen lässt sich darauf zurückführen, dass sich die Zugkräfte der beiden gegenständigen Flagellen gegenseitig neutralisieren.

5.2.5 Taumelphasen führen zu einer Umorientierung und Änderung der Schwimmrichtung

Ergebnis: Das Taumeln der Trypanosomen führt zu einer Umorientierung der Zelle, die dann mit einer anschließenden Phase des gerichteten Schwimmens in die neue Richtung weiterschwimmt. Die entsprechende Winkeländerung nach Taumelphasen wurde experimentell gemessen. Dabei ergab sich eine breite Verteilung der einzelnen Winkel mit einem Mittelwert von ca. 60°. Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Winkel ist in Abb. 14 dargestellt.

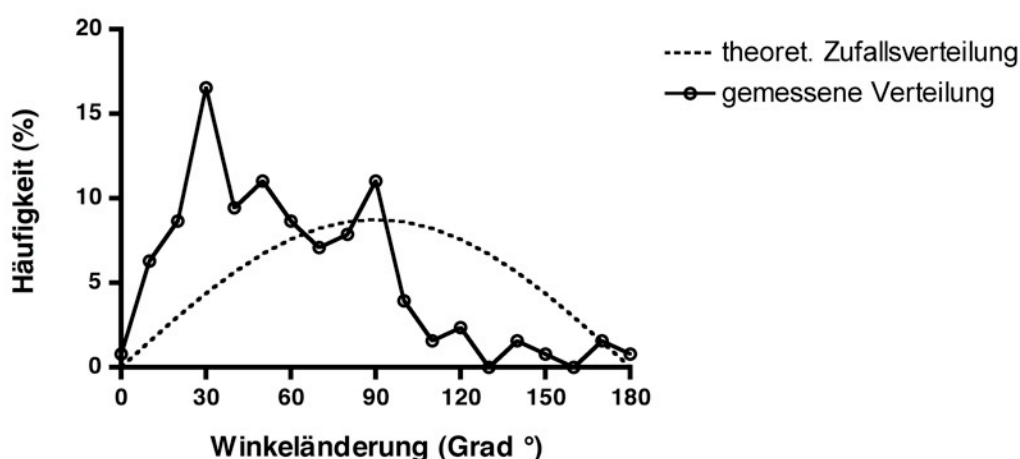


Abb. 14 | Die eingeschlagene Richtung nach einem Richtungswechsel ist bei *T. brucei* nicht zufallsverteilt. Gezeigt ist die Häufigkeitsverteilung der Richtungswechsel in Abhängigkeit des Winkels, die aus Trajektorien ermittelt wurden (schwarze Linie, n=127). Eine Winkeländerung um ca. 30° nach einer kurzen Taumelphase war häufig zu beobachten. Richtungswechsel mit einem Winkel von mehr als 100° sind selten bei gerichtet schwimmenden BSF Trypanosomen. Da bei Richtungswechseln nicht zwischen links und rechts unterschieden wurde, liegen die möglichen Winkel zwischen 0 und 180°. Ein Winkel von 180° entspricht einer kompletten Umkehr der Schwimmrichtung. Bei einer zufälligen Verteilung der Winkel würde man ein Maximum um 90° herum erwarten (gestrichelte Linie).

Analyse / Interpretation: Jenseits von 90° fällt die Häufigkeit stark ab. Bei einer reinen Zufallsverteilung würde man jedoch gerade in dem Bereich um 90° ein Maximum erwarten, vgl. dazu auch Beltman *et al.* (2009).

5.2.6 Analyse des Ausbreitungsverhaltens

Ergebnis: Die mittlere quadrierte Entfernung (MSD, von englisch: “mean squared distance”) zum Startpunkt (Zeitpunkt T_0), die aus 20 Einzeltrajektorien von gerichtet schwimmenden Blutstromform Trypanosomen experimentell bestimmt wurde, ist in Abb. 15 gegen die Zeit aufgetragen. Die MSD entspricht dabei dem mittleren quadrierten Ausbreitungsradius (r^2). Auf der Stelle taumelnde Zellen wurden dabei von der Analyse ausgeschlossen. Auch wenn sich Trypanosomen nicht passiv durch Diffusion fortbewegen, so kann ihre radiale Ausbreitung dennoch durch Diffusionsgleichungen angenähert werden, denn auch bei der Diffusion kommt es zu einem linearen Anstieg des quadrierten Ausbreitungsradius (MSD) mit der Zeit, wie in der Abbildung für Trypanosomen zu sehen ist. Dabei spielt es aus mathematischer Sicht keine Rolle, ob es sich dabei um eine aktive oder passive Bewegung handelt, solange diese keine Vorzugsrichtung aufweist. Der mittlere Diffusionskoeffizient der Zellen lag bei etwa $30 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, innerhalb der beobachteten Zeitskala. Ein hoher Anteil an taumelnden Zellen verringert den Diffusionskoeffizienten deutlich. Zum Vergleich beträgt der Diffusionskoeffizient von Glucose in Wasser etwa $650 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (Zhang und Fang, 2005).

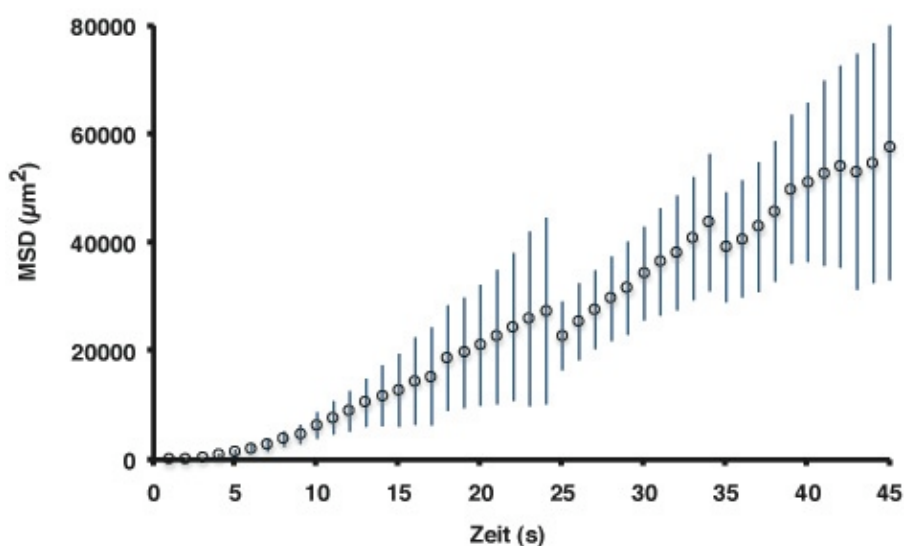


Abb. 15 | MSD-Analyse der Bewegung von *T. brucei brucei* Blutstromformen. Dargestellt ist die mittlere quadrierte zurückgelegte Distanz innerhalb eines Zeitfensters von 45 Sekunden, ermittelt aus der Trajektorienanalyse ($n=20$ Zellen). Diese gemittelte quadrierte Distanz, auch bezeichnet als MSD für englisch “mean squared distance” ist die quadrierte mittlere Distanz “in Luftlinie” von der Startposition zum Zeitpunkt T_0 . Die Standardabweichung der einzelnen Zeitpunkte ist jeweils als vertikale Linie eingezeichnet.

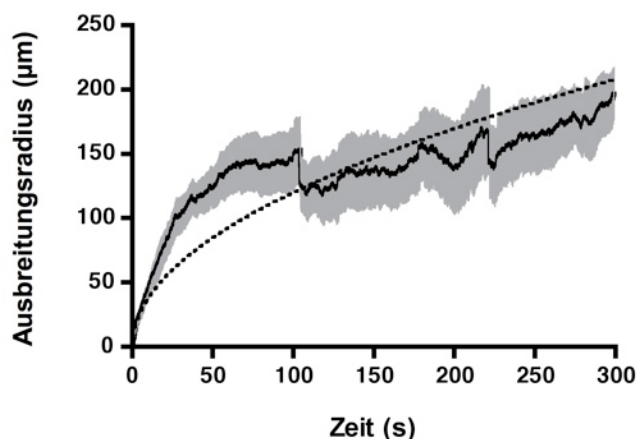


Abb. 16 | Der Radius der Ausbreitung der motilen *T. brucei* Blutstromformen in Medium nimmt über die Zeit immer langsamer zu. Der experimentell gemessene mittlere Ausbreitungsradius (schwarze Linie) der Zellen ist mit SEM (grauer Bereich) gezeigt. Die Werte basieren auf 16 zufällig ausgewählten Zellen, deren X/Y-Koordinaten jeweils 4 mal pro Sekunde bestimmt wurden. Diesen Daten liegen damit mehr als tausend Einzelkoordinaten pro Zelle zugrunde. Die gestrichelte Linie zeigt die Annäherung der mittleren Ausbreitung der Zellen, durch die Gleichung $\sqrt{t} \cdot 12 \mu\text{m s}^{-1}$, was einem Diffusionskoeffizienten von $36 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ im zweidimensionalen Raum entspricht.

Analyse / Interpretation: In Abb. 16 ist der experimentell ermittelte mittlere Ausbreitungsradius von BSF Trypanosomen über die Zeit dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt eine Näherung durch die Diffusionsgleichung. Die Abweichung von der Kurve lässt sich mit dem Auftreten unterschiedlicher Schwimmmodi (gerichtetes Schwimmen, unterbrochen durch Taumelphasen) erklären. Die Daten zeigen, dass sich eine Population von Trypanosomen innerhalb kurzer Zeit (etwa 1 min) in einem Radius von 100 - 150 μm ausbreitet. In diesem Bereich zeigen gerichtet schwimmende Zellen Superdiffusion. Dann verlangsamt sich die radiale Ausbreitung deutlich und der weitere Kurvenverlauf gleicht sich der normalen Diffusion an. Dies liegt daran, dass die Zellen nach einer Taumelphase die Richtung wechseln. Deshalb wird es mit zunehmender Zeit immer unwahrscheinlicher, dass die Zelle weiter in die anfängliche Richtung weiter schwimmt. Für die nächsten 150 μm in dieselbe Richtung würden die Zellen daher sehr viel länger brauchen.

Fazit: Bei einer zufälligen Bewegung (ohne Taxis) würde man eine Bewegung wie bei der Diffusion erwarten. Dies wurde durch die MSD-Analyse bestätigt.

5.2.7 Ausbreitung im dreidimensionalen Raum ohne Vorzugsrichtung

Ergebnis: Durch holographische Messungen wurden Trajektorien der schwimmenden Trypanosomen in drei Dimensionen über die Zeit ermittelt (s. Material und Methoden; Kapitel 7.2.9). Anhand dieser 3D Trajektorien wurde untersucht, ob es eine Vorzugsrichtung der Bewegung von Wildtyp Trypanosomen im dreidimensionalen Raum gibt. Wie in Abb. 17 exemplarisch dargestellt, zeigten die einzelnen *T. brucei* BSF Zellen keinerlei Vorzugsrichtung für gerichtetes Schwimmen im dreidimensionalen Raum.

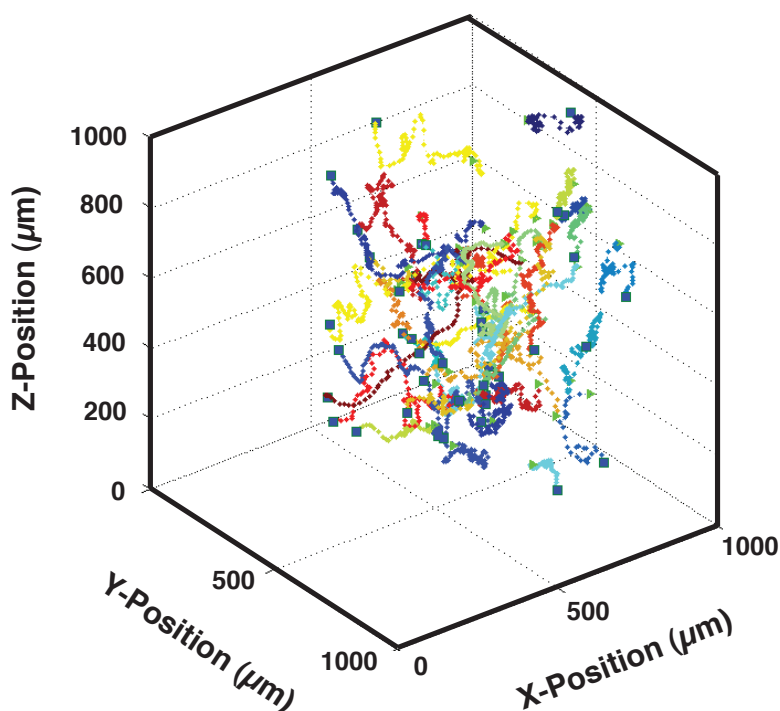


Abb. 17 | Im dreidimensionalen Raum zeigen Trypanosomen keine Vorzugsrichtung der Bewegung. Die Trajektorien von BSF Trypanosomen wurden mit Hilfe von digitaler In-line-Holographie bei 37°C über einen Zeitraum von 15 Minuten gemessen (in Kooperation mit der AG Rosenhahn). Dazu wurden aus den rekonstruierten Bildserien nachträglich die X/Y/Z-Koordinaten der einzelnen Zellen im dreidimensionalen Raum über die Zeit ermittelt. Der dargestellte Volumenausschnitt zeigt eine zufällige Auswahl repräsentativer Trajektorien von Wildtyp BSF Trypanosomen. Die einzelnen Zellen sind durch unterschiedliche Farben hervorgehoben. Die Zellen wurden in einem kommerziellen 800 µm hohen Kanal holographiert (ibidi, München). Da die Kanalhöhe etwa 40 Zelllängen entspricht, können Wandeffekte dabei ausgeschlossen werden.

Analyse / Interpretation: Bei der angewendeten digitalen In-line-Holographie wird ein Objekt durch einen parallelen, aufgeweiteten Laserstrahl beleuchtet (Kreuzer *et al.*, 2001). An dem Objekt, in diesem Fall, den einzelnen Trypanosomen, wird das Laserlicht gebeugt und eine Objektwelle erzeugt. Das ungebeugte Licht dient im Folgenden als Referenzwelle. Referenzwelle und Objektwelle interferieren miteinander und erzeugen so ein Hologramm, das auf einem CCD-Chip in Form einer konkreten Intensitätsverteilung detektiert wird. Dieses aufgenommene Bild hat keine direkte Ähnlichkeit mit der Abbildung des aufgenommenen Objektes im Realraum, aber kann rechnerisch (nach Fourier-Transformation) anhand der bekannten Referenzwelle zu einem realen Bild rekonstruiert werden. Jeder einzelne Punkt eines Objektes erzeugt im Hologramm eine Abfolge von konzentrischen Kreisen aus Maxima und Minima. Der entscheidende Vorteil dieser Methode ist, dass in dem Abstand zwischen den einzelnen Intensitätsmaxima zugleich auch die Information über den Abstand zur Kamera enthalten ist.

Aus der Verteilung der Intensitätsmaxima in den holographischen Aufnahmen kann die Z-Koordinate (z) einer Zelle durch folgende Gleichung berechnet werden:

$$z = \frac{r^2}{2\lambda}$$

wobei: z = Abstand zum Detektor
 r = Abstand des ersten Nebenmaximums zum Hauptmaximum
 λ = Wellenlänge des verwendeten Lichtes

Bei einem Abstand zwischen den ersten beiden Maxima niedrigster Ordnung von 245 Mikrometern z.B. ergibt sich demnach ein Z-Abstand von 5 mm des lichtstreuenden Objektes zum Detektor. Die Auflösung in Z-Achse ist gerade dann besonders gut, wenn der Abstand des Detektors (CCD-Chip) zur Probe möglichst gering ist. Deshalb wurde beim experimentellen Aufbau der Kamerachip möglichst dicht hinter der Probenkammer in den aufgeweiteten Laserstrahl platziert. Aus den rekonstruierten Bildern wurden die Koordinaten der Zellen im dreidimensionalen realen Raum bestimmt (X / Y / Z). Die X und Y-Koordinaten einzelner Zellen erhält man aus einer Mittelpunkt-Berechnung der rekonstruierten Aufnahmen, ganz ähnlich wie bei der Mikroskopie. Zusätzlich wurde die Z-Koordinate aus den Abständen der Intensitätsmaxima in den Interferenzbildern berechnet. Über die Zeitserien der Einzelaufnahmen erhält man damit dreidimensionale Trajektorien (Xu *et al.*, 2003).

5.2.8 Modellierung des Ausbreitungsverhaltens

Das Levy-Flight-Modell stellt eine Weiterentwicklung des “random walk” Modells dar. Der Hauptunterschied zu dem normalen random walk (auch bekannt als Diffusion oder Brown’sche Molekularbewegung) ist, dass bei dem einfachen Diffusionsmodell von konstanten Schrittweiten der Einzelschritte ausgegangen wird, während beim Levy-Flight auch Sprünge von sehr viel größerer Schrittweite zugelassen werden (Codling *et al.*, 2008). Letztere sind jedoch relativ selten im Vergleich zu den kürzeren Schritten (Abb. 18). Die Taumelphasen der Trypanosomen entsprechen hier dem Random Walk, während die Phasen des gerichteten Schwimmens eher den Sprüngen im Levy-Modell entsprechen.

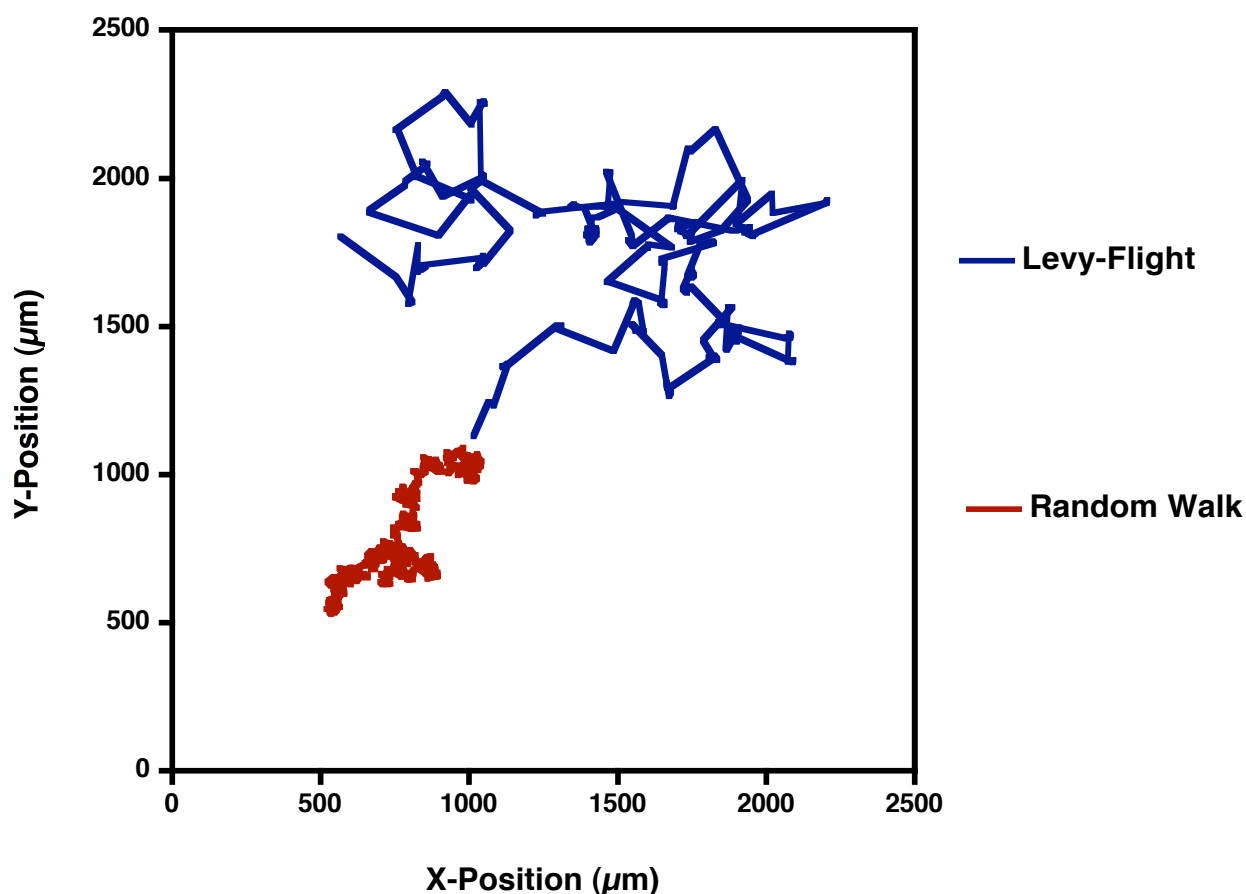


Abb. 18 | Computersimulation der Bewegung von Trypanosomen mit dem klassischen Random Walk Modell sowie dem erweiterten Levy-Modell. Simulation durch einfachen Random walk (rot) und durch ein Levy-Flight-Modell (blau). Dabei sind die experimentell ermittelten Werte für den Übergang von Taumeln zu gerichteter Bewegung ($p=0.25$) mit einer Persistenzlänge von durchschnittlich $150 \mu\text{m}$ berücksichtigt, jeweils für einen Zeitraum von 1000 s . (Simulation in Java programmiert, Darstellung mit Prism).

5.3 Analyse der Bewegung mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung

5.3.1 Gerichtet schwimmende BSF Trypanosomen rotieren entlang ihrer Längsachse

Ergebnis / Beobachtung: In einer zweidimensionalen Projektion der Trajektorien von allen schnell und gerichtet schwimmenden Trypanosomen wurden bei ausreichend hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung regelmässige Wellenmuster sichtbar (Abb. 19). Die Zellen waren dabei räumlich nicht eingeschränkt, sondern konnten sich frei in Kanälen mit $800 \mu\text{m}$ Höhe (ibidi GmbH, München) bewegen.

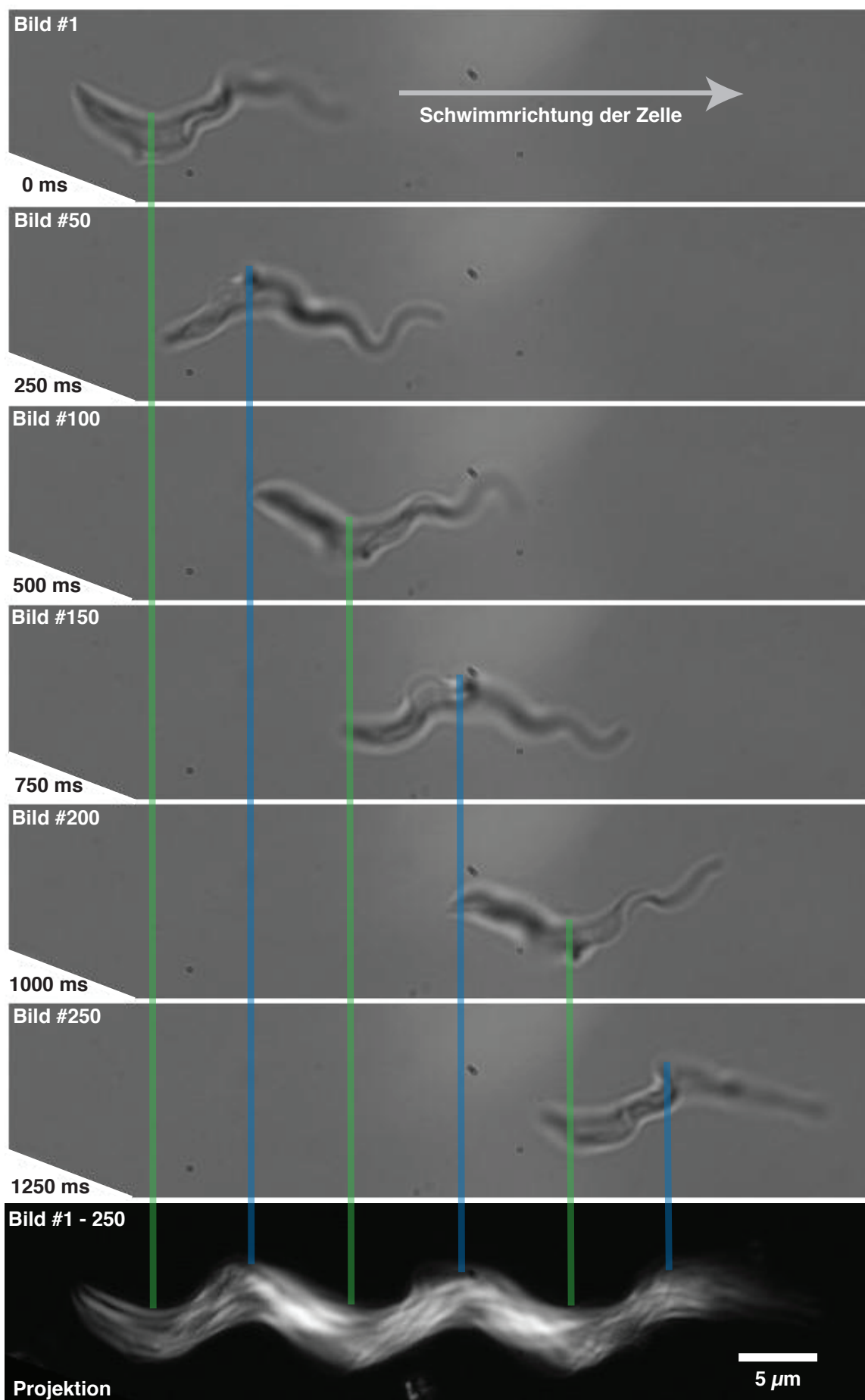


Abb. 19 | Der Zellkörper gerichtet schwimmender BSF Trypanosomen vollführt eine helikale Rotationsbewegung um die Längsachse. Die Abbildung zeigt eine Auswahl von Einzelaufnahmen eines repräsentativen, gerichtet schwimmenden M1.6 wt Trypanosoms, aufgenommen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Der besseren Anschaulichkeit wegen ist nur jedes 50. Einzelbild gezeigt, was einer Zeitdifferenz von jeweils 250 ms entspricht. Die Projektion aller Einzelbilder über die Zeitachse zeigt ein kontinuierliches und periodisches Bewegungsmuster der Zelle. Die Zelle schwamm mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $28 \mu\text{m s}^{-1}$ v.l.n.r. und rotierte dabei um ihre Längsachse mit einer Frequenz von $2,1 \pm 0,3 \text{ Hz}$, einer Wellenlänge von $14,4 \pm 1,2 \mu\text{m}$ und einer Amplitude von $3,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$. Dem Medium war 0,5% (w/v) Methylcellulose beigelegt, um eine physiologische Viskosität zu erreichen (s. Kapitel 5.7.5). Die, der Projektion zugrunde liegenden Bildserien wurden mit einer Phantom v.91 "High-Speed" Kamera (Vision Research Inc., Wayne, USA) mit 200 Bildern pro Sekunde und einem 100 x Objektiv (NA = 1,4, Olympus) aufgenommen.

Dass dieses Bewegungsmuster bei allen Zellen unabhängig von ihrer räumlichen Orientierung zu sehen war, zeigt, dass diese Bewegung der Zelle unabhängig vom Betrachtungswinkel ist. Dies bedeutet nichts anderes, als dass es sich dabei um eine regelmäßige helikale Bewegung im dreidimensionalen Raum handeln muss. Eine unregelmäßige Bewegung dagegen würde nur in Ausnahmefällen, aus einem bestimmten Winkel betrachtet zu dem gleichen Muster führen, nicht jedoch in allen Fällen. Insgesamt wurden für diese Analyse Hochgeschwindigkeitsaufnahmen (mit einer Bildrate von 200 - 1000 fps) von mehr als 100 gerichtet schwimmenden Zellen ausgewertet.

Der Zellkörper beschreibt durch seine Rotation eine dreidimensionale, sinusoidal helikale Bewegung mit einer mittleren Frequenz von $2,8 \pm 0,4 \text{ Hz}$ (n=58). Es wurde auch geprüft, ob die Rotationsfrequenz von der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Zelle abhängt. Es zeigte sich jedoch, dass die Rotationsfrequenz nur geringfügig mit der Schwimgeschwindigkeit der Zelle steigt (Abb. 21-B).

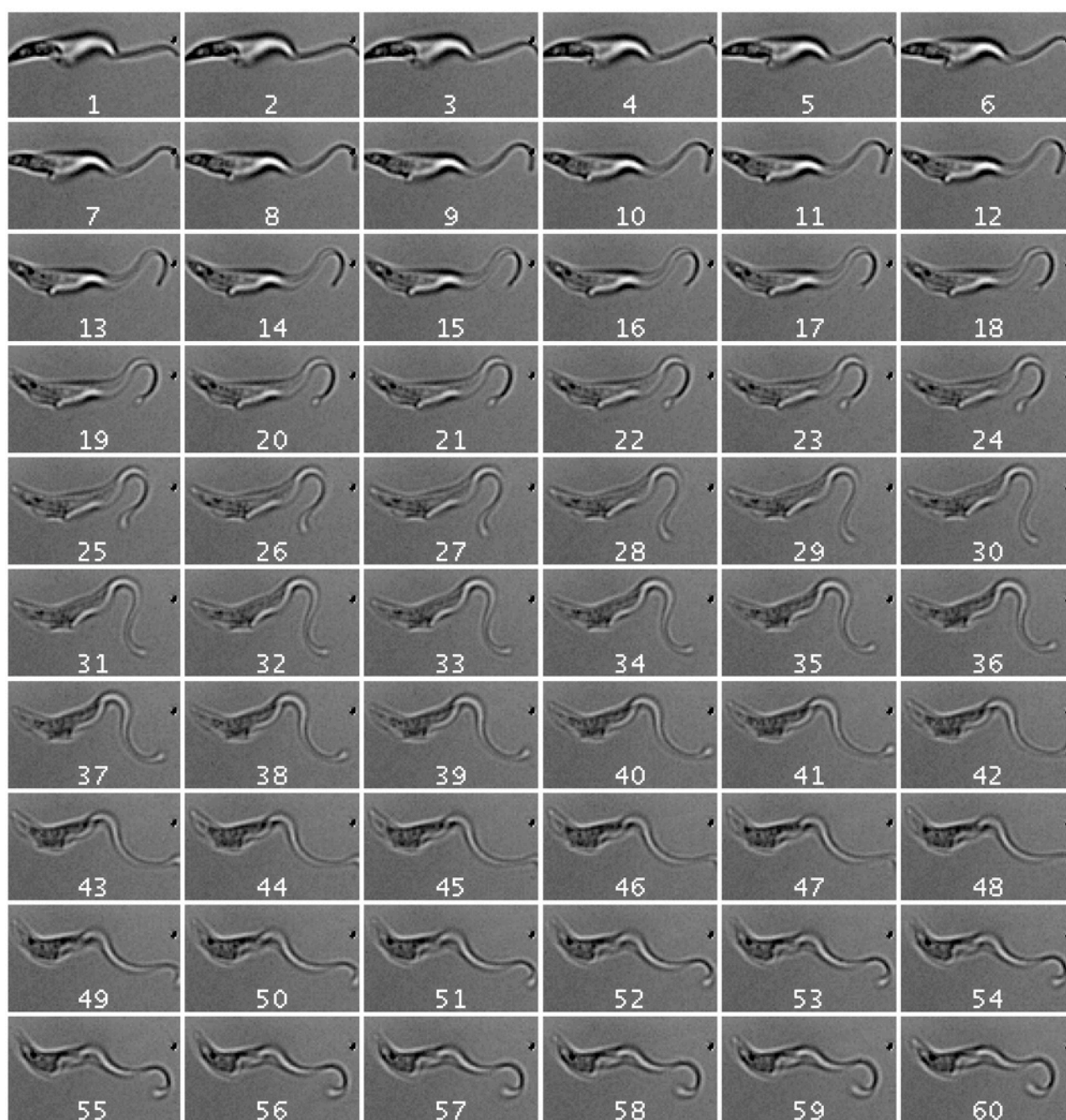
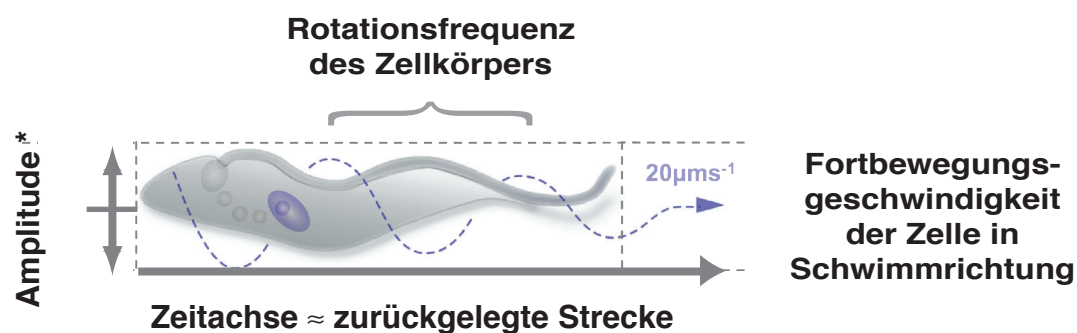
10 μm

Abb. 20 | Hochgeschwindigkeitsaufnahmen mit einer zeitlichen Auflösung von 1 ms.

Gezeigt ist eine Einzelbildserie eines repräsentativen, gerichtet schwimmenden BSF Trypanosoms. Die Einzelbilder sind gemäß ihrer zeitlichen Abfolge durchnummeriert. Da die Bildrate bei der Aufnahme 1000 fps betrug, entspricht diese Nummerierung zugleich dem relativen Zeitpunkt in ms. Ein Schlagzyklus der freien Flagellarspitze bestehend aus Abschlag (Bild 1-24) und Aufschlag (Bild 25-48), bis zum nächsten Abschlag (ab Bild 49) dauerte knapp 50 ms, was einer Schlagfrequenz von etwa 20 Hz entspricht. Die Zeitserie wurde im Durchlicht mit einer Phantom v9.1 Kamera aufgenommen, unter Verwendung eines iMic Mikroskopsystems, gesteuert durch die JMik-Software. Entsprechende Videoaufnahmen sind im Begleitmaterial zu finden.



A * entspricht der räumlichen Position der Zelle senkrecht zur Schwimmrichtung

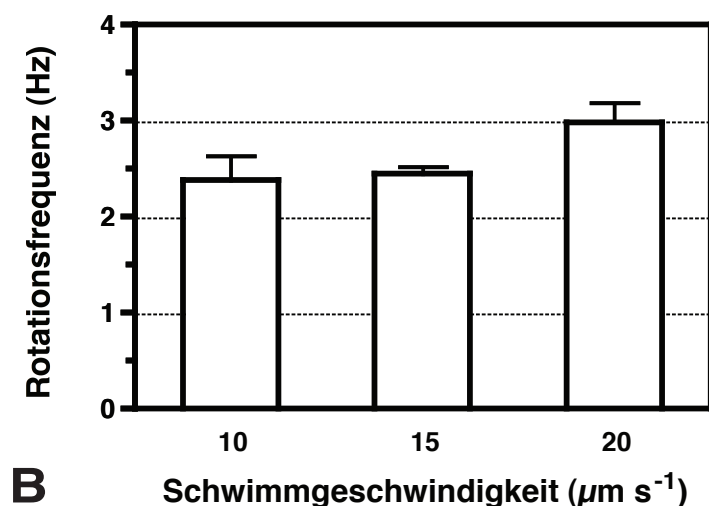


Abb. 21 | Vergleich der Rotationsfrequenz gerichtet schwimmender BSF Trypanosomen bei unterschiedlicher Schwimmgeschwindigkeit. **A** Schematische Darstellung der Fortbewegung des Zellkörpers über die Zeit. **B** Das Diagramm zeigt jeweils die gemessenen Mittelwerte der Rotationsfrequenz (mit Standardabweichung) in Abhängigkeit von der Schwimmgeschwindigkeit. Gerichtet schwimmende BSF Trypanosomen in HMI-9 Kulturmedium rotierten mit einer Frequenz von 2 - 3 Hz um ihre Längsachse. Dies erzeugt den namensgebenden Korkenzieher-artigen Eindruck ihrer Bewegung. Die Rotationsgeschwindigkeit nahm mit der Schwimmgeschwindigkeit der Zelle zwar leicht zu, beide Werte sind jedoch nicht direkt proportional zueinander.

Analyse / Interpretation: Eine Zelle, die mit $20 \mu\text{m s}^{-1}$ schwimmt, rotiert nicht doppelt so schnell um ihre Längsachse, wie eine, die mit $10 \mu\text{m s}^{-1}$ schwimmt. Dies weist darauf hin, dass die Effizienz der Kraftübertragung bei der Bewegung langsamerer Zellen für die Schwimmgeschwindigkeit limitierend ist. Es reicht daher nicht aus, nur diese beiden Eigenschaften der Zelle zu betrachten, sondern es muss vielmehr auch die Wellenlänge als dritte Variable mit berücksichtigt werden.

Es besteht ein direkter mathematischer Zusammenhang zwischen Frequenz (f), Wellenlänge (λ) und Schwimmgeschwindigkeit (v) für jedes gerichtet schwimmende Trypanosom über die Wellengleichung:

$$v = f \cdot \lambda$$

In der Projektion des, sich fortbewegenden Zellkörpers über die Zeit, zeigt sich für beliebige gerichtet schwimmende Trypanosomen daher die Form einer stehenden Welle, für die die Wellengleichung gilt. Für unterschiedlich schnell schwimmende Zellen zeigte sich im Experiment, dass der Unterschied der Schwimmgeschwindigkeit in viel stärkerem Maße auf Unterschiede der Wellenlänge zurückzuführen ist, als auf Unterschiede der Frequenz der helikalen Rotationsbewegung (Abb. 21-B).

Ergebnis: Die dreidimensionale Rotation schwimmender Trypanosomen zeigt sich zum Zweiten auch dadurch, dass die Zelle neben der schlängelnden Auf- und Abwärtsbewegung in der X/Y-Ebene auch eine zyklische Bewegung mit der selben Frequenz in der Z-Achse, also in und aus der Fokusebene beschreibt. Dies spiegelt sich wider in einer periodischen Zu- und Abnahme der Signalintensität in der Projektion der Maximalwertverteilung (in Abb. 22-A durch Falschfarben dargestellt), die aufgrund der Punktspreizfunktion (PSF) der Z-Position der Zelle entspricht.

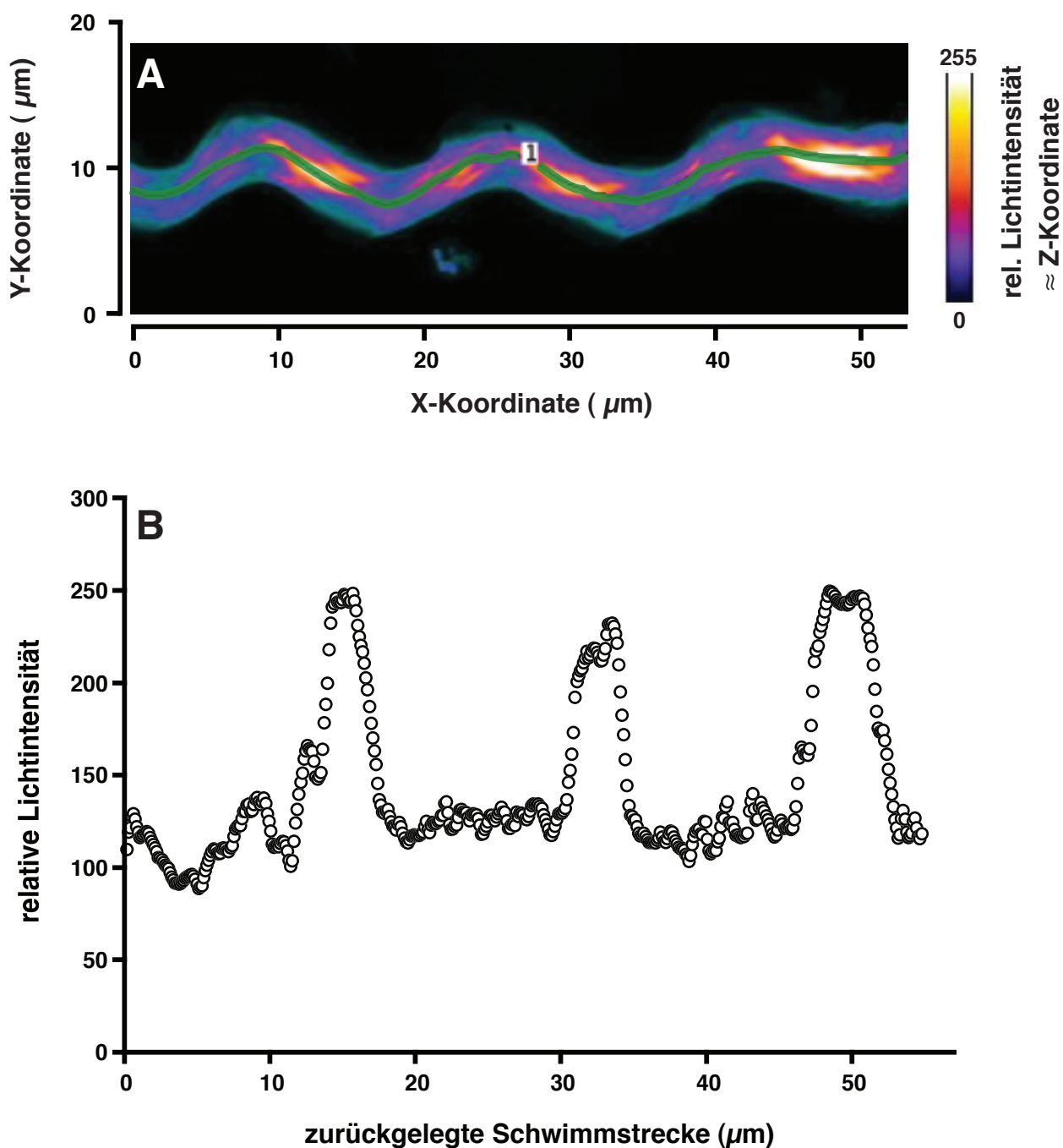


Abb. 22 | Die periodische helikale Rotationsbewegung des Zellkörpers zeigt sich neben der X/Y-Ebene auch in der Z-Ebene. A zeigt eine Projektion des Bewegungsmusters einer gerichtet schwimmenden MITat1.6 wt Zelle auf die X/Y-Ebene. Entlang der eingezeichneten grünen Linie (1), die dem Schwerpunkt der Zelle ("centre of mass") über die Zeit folgt, wurde die Intensitätsverteilung in der Fokusebene gemessen (**B**). Diese Intensitätsverteilung korreliert mit der Z-Position, die durch die Punktspreizfunktion (PSF) ermittelt werden kann. Die gemessene Intensitätsverteilung zeigt ein periodisches Muster in der Z-Achse mit der selben Frequenz und Wellenlänge wie die Projektion auf die X/Y-Ebene. In Kombination bedeutet dies, dass die Zelle eine periodische dreidimensionale helikale Bewegung ausgeführt haben muss.

Drittens und vielleicht am intuitivsten zeigt sich die Rotation des gesamten Zellkörpers um die Längsachse, wenn man die Lage des Flagellums in Zeitlupenaufnahmen betrachtet, die mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen wurden. Das Flagellum ist über die flagellare Anheftungszone (FAZ) fest mit dem Zytoskelett verbunden. Innerhalb der undulierenden Membran hat das Flagellum zwar einen gewissen Bewegungsspielraum, ist aber immer auf ein und derselben Seite der Zelle verankert. Daher kann man das Flagellum als Positionsmarker verwenden, um die relative Lage und Orientierung des Zellkörpers zu bestimmen. In Abb. 23 ist eine repräsentative Bildsequenz eines gerichtet schwimmenden Trypanosoms zu sehen, das mit 200 Hz aufgenommen wurde. Der Übersichtlichkeit halber ist davon nur jedes 8. Bild dargestellt, was 40 ms Intervallen entspricht. Die Bereiche des Flagellums, die sich in der Fokusebene befinden, sind durch eine helle Linie nachgezeichnet. In den ersten acht Einzelbildern bewegt sich das Flagellum in der Tendenz entgegen dem Uhrzeigersinn (0 - 280 ms). In den folgenden Bildern ist das Flagellum in der Fokusebene nicht mehr zu sehen, da es sich in die selbe Richtung weiterbewegt hat und nun auf der abgewandten Rückseite der Zelle befindet. Ab dem Zeitpunkt 440 ms wandert das Flagellum wieder in die Fokusebene. Entscheidend ist dabei, dass das Flagellum wieder aus der selben Richtung, also entgegen dem Uhrzeigersinn, in das Bild kommt und sich auf der entgegengesetzten Seite aus der Fokusebene herausbewegt. Als Folge der Rotation der Zelle verschwindet das Flagellum auf der einen Seite der Zelle, bewegt sich ausserhalb der Fokusebene hinter der Zelle weiter und taucht an der gegenüberliegenden Seite wieder auf. Das Flagellum bewegt sich also immer in nur eine Richtung, auch wenn vorbeilaufende Flagellarwellen das Flagellum vorübergehend lokal in die eine oder andere Richtung biegen. Somit muss die Zelle eine dreidimensionale Rotationsbewegung vollführen, statt einer Hin- und Her-Bewegung, wie von (Rodríguez *et al.*, 2009) vorgeschlagen. Letztere würde dazu führen, dass das Flagellum immer wieder von der gleichen Seite aus in die Fokusebene zurückkehren müsste, auf der sie diese auch verlassen hat. Dies war nicht zu beobachten. Die zeitliche Abfolge der Bewegung der Zelle in Abb. 23 entspricht einer Rotationsfrequenz von etwas über 2 Hz. Dies ist konsistent mit dem Wert, der mit der zuvor beschriebenen Methode unabhängig ermittelt wurde.

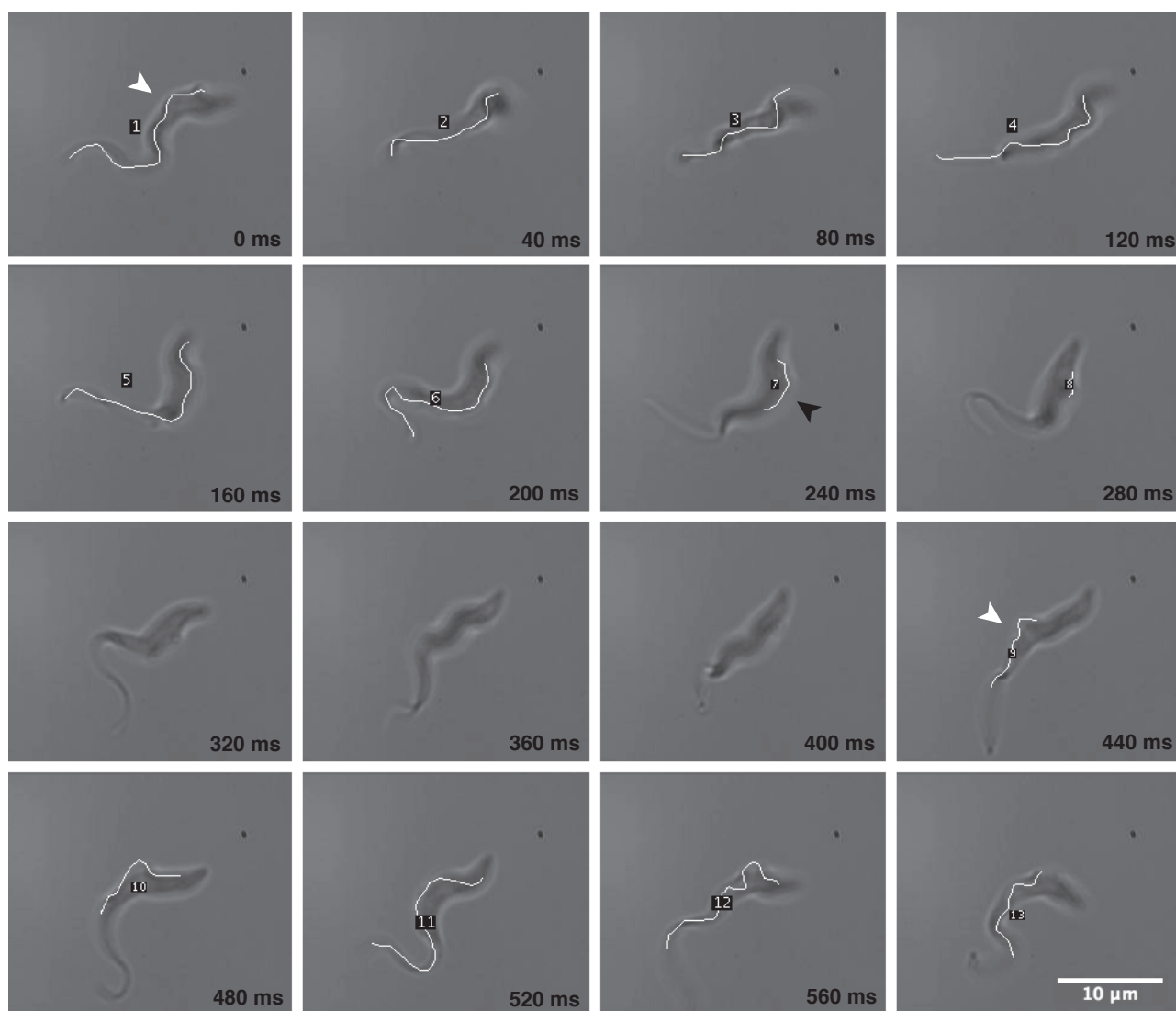


Abb. 23 | Der Zellkörper schnell und gerichtet schwimmender Trypanosomen rotiert in Bewegungsrichtung entgegen dem Uhrzeigersinn. Die Abbildung zeigt eine Auswahl von Einzelbildern aus einer Hochgeschwindigkeits-Zeitserie eines gerichtet schwimmenden BSF Trypanosoms. Das Flagellum ist zur besseren Anschaulichkeit weiß hervorgehoben. Die Zelle schwimmt mit dem Flagellum voran. Das an den Zellkörper angeheftete Flagellum bewegt sich auf der, dem Betrachter zugewandten Seite, immer von oben nach unten und auf der abgewandten Seite (wo es defokussiert erscheint) von unten nach oben. Nach jedem Zyklus taucht das Flagellum immer von der selben Seite wieder auf. Das, in die Fokusebene eintretende Flagellum ist durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Bei dem Zeitpunkt 280 ms verlässt es die Fokusebene wieder und ist durch einen schwarzen Pfeil markiert. Bei den Zeitpunkten 280 - 400 ms befindet sich das Flagellum auf der Rückseite der Zelle und ist deshalb in der Fokusebene nicht klar zu erkennen. Die Rotationsfrequenz der dargestellten Zelle lag bei etwa 2 Hz.

Ergebnis: Die dreidimensionale Rotationsbewegung der Zelle ist durch die überlagerte Bewegung des schlagenden Flagellums für das ungeübte Auge selbst in Zeitlupen-Aufnahmen nicht leicht zu erkennen. Deshalb wurde in den Einzelbildern der Hochgeschwindigkeitsaufnahmen (500 bzw. 1.000 fps) jeweils der Zellumriss und das Flagellum nachgezeichnet (Segmentierung: Ai Wei).

Aus diesen zweidimensionalen Formen konnte dann die dreidimensionale Form durch Tomographie rekonstruiert werden (Abb. 24), unter der Annahme, dass die Zelle eine vollständige Rotation ausgeführt hat. Ein Rotationszyklus von 360° dauerte exakt 6 Flagellarschläge. Mit jedem Flagellarschlag dreht sich der Zellkörper demnach um 60° um die eigene Achse. Schnell und gerichtet schwimmende Zellen zeigten eine Flagellarschlagfrequenz von etwa 18 Hz und eine komplette Rotation der Zelle geschieht damit mit einer Frequenz von ca. 3 Hz. Dies bestätigt die unabhängig davon mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelten Werte.

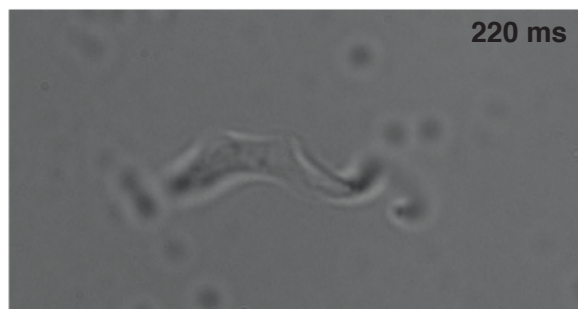


Abb. 24 | Ein neues Modell der Bewegung von Trypanosomen. Das vorgestellte Modell der helikalen Rotationsbewegung beruht direkt auf Originaldaten aus der Hochgeschwindigkeitsmikroskopie. Das dreidimensionale Modell der Zellen (rechte Seite) wurde mittels Tomographie aus Einzelbildern der Originalaufnahmen einer Zeitserie eines gerichtet schwimmenden Blutstromform Trypanosoms (linke Seite) rekonstruiert. Die Zelle schwamm gerichtet mit einer Geschwindigkeit von ca. $30 \mu\text{m s}^{-1}$ (v.l.n.r.) in HMI-9 Medium, dem 0,5% Methylcellulose zugesetzt war. Die Aufnahmen wurden mit einem automatisierten iMic Mikroskop (TILL Photonics, München) aufgenommen, unter Verwendung der selbstentwickelten Steuerungssoftware JMic, einer Phantom Kamera (Vision Research) und einem 100x Objektiv (Olympus, NA=1,4).

Analyse / Interpretation: Um aus den zweidimensionalen Einzelbildern die dreidimensionale Struktur der Zelle zu rekonstruieren wurde die Software 3D Max Pro verwendet. Aufgrund der vorausgegangenen Analysen, war die Annahme, dass die Zelle etwa 2-3 vollständige Rotationen von 360° pro Sekunde beschreibt. Dies entspricht einer Winkelgeschwindigkeit von 1.000 Grad pro Sekunde. Die segmentierten Umrisse der Zelle wurden durch die Tomographie-Software nach Angabe des jeweils erwarteten Rotationswinkels in eine 3D-Konsensstruktur zurückgerechnet. Das Resultat war tatsächlich ein korrektes 3D-Modell der Zelle. Dies kann nur bedeuten, dass die Verformung und Bewegung der Zelle in einer periodischen, vollständigen Rotation mit der erwarteten Winkelgeschwindigkeit abläuft. Wegen der dreidimensionalen Rotationsbewegung der Zelle ist in der Zeitachse der Bildsequenz die fehlende Z-Information enthalten. Damit wurde im Umkehrschluss durch die tomographische Rekonstruktion die dreidimensionale Rotation des Zellkörpers entlang der Längsachse der schnell und gerichtet schwimmenden Trypanosomen bestätigt.

5.3.2 Die Ursache des Taumelns ist eine Umkehr der Flagellarschlagrichtung

Ergebnis: Zeitlich hochaufgelöste Aufnahmen von taumelnden und gerichtet schwimmenden Blutstromform Trypanosomen zeigten, dass während Phasen des Taumelns der Flagellarschlag anders war als während des gerichteten Schwimmens. Während Phasen des gerichteten Schwimmens zeigten alle schnell schwimmenden BSF Trypanosomen ($> 10 \mu\text{m s}^{-1}$) einen sehr einheitlichen Flagellarschlag, mit hoher Frequenz (16 - 20 Hz). Die Undulationen breiteten sich dabei mit konstanter Frequenz, aber sich ändernder Amplitude entlang des Flagellums in "tip-to-base" Richtung (von anterior zu posterior) aus. Während Taumelphasen dagegen war die Richtung der Flagellarwelle entweder umgekehrt in "base-to-tip" Richtung mit einer Frequenz von ca. 3 Hz, oder verlief unkoordiniert, mit teilweise aufeinander zulaufenden Wellen. Auch Blutstromformen, die sich in Teilung befinden, taumelten im Experiment nahezu immer, weil die beiden Tochterflagellen keine synchrone, konzertierte Bewegung ausführen.

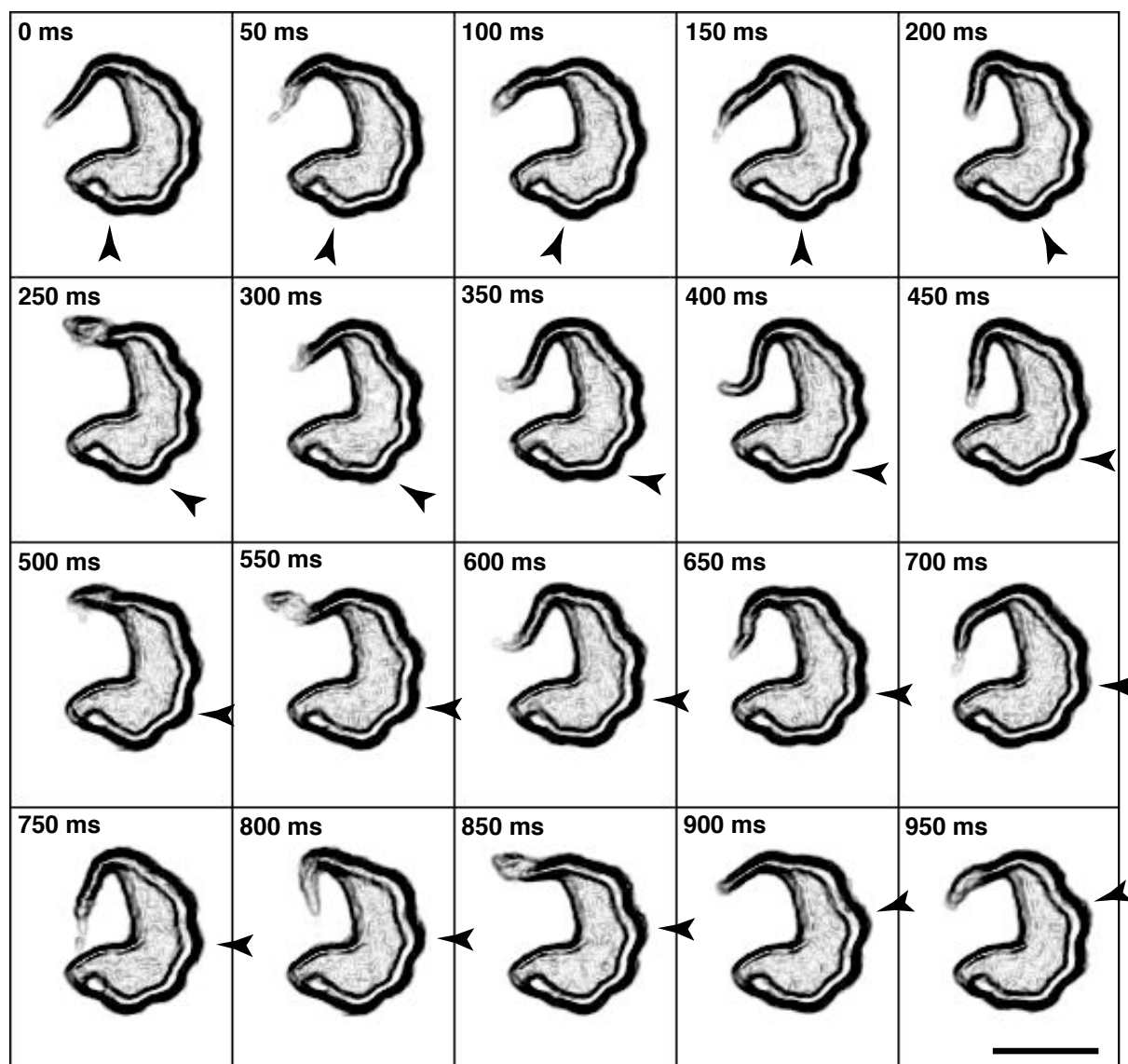


Abb. 25 | Fluoreszenzmikroskopische Zeitserie einer Zelle mit reverser Flagellarschlagrichtung. Die Ausbreitung einer einzelnen Undulation über die Zeit ist durch Pfeile markiert. Die Flagellarwellen bewegen sich in Richtung base-to-tip mit einer konstanten Frequenz von ca. 3 Hz. Die Zelle befindet sich auf einem Agar-beschichteten Objektträger (s. Material und Methoden; Kapitel 7.2.5) und durch einen Sobel-Kantenfilter ist das Flagellum zur besseren Erkennbarkeit hervorgehoben. Größenbalken: 5 μm

Analyse: Die Richtung des Flagellarschlages wurde mit hoher Bildaufnahmezeit von 200 - 1000 Bildern pro Sekunde sowohl mit Durchlichtmikroskopie, als auch mit Fluoreszenzmikroskopie mit bis zu 400 Bildern pro Sekunde untersucht, unter Verwendung der selbst entwickelten Steuerungssoftware JMic. Die Bildsequenzen wurden sowohl Bild für Bild analysiert, als auch bei unterschiedlichen Abspielgeschwindigkeiten, da abhängig von der Bildfrequenz leicht Artefakte auftreten (Nyquist-Shannon-Theorem). Insgesamt wurden dabei Hochgeschwindigkeitsaufnahmen von mehr als hundert Zellen untersucht.

Noch nie zuvor wurde Fluoreszenzmikroskopie lebender, motiler Zellen mit so hoher zeitlicher Auflösung durchgeführt. Dies wurde ermöglicht durch die Verwendung eines

Prototyps einer sCMOS Kamera (pco.edge). Die Fluoreszenzmikroskopie von Trypanosomen bietet den großen Vorteil, dass wegen dem guten Verhältnis von Signal zu Hintergrund das schlagende Flagellum der Zelle zu jedem Zeitpunkt eindeutig erkennbar ist. Die Oberfläche der Trypanosomen wurde mit den Fluoreszenzfarbstoffen Atto488-NHS und AMCA-Sulfo-NHS gefärbt (s. Kapitel 7.2.2), in einer finalen Konzentration von 1 mM. Beide Farbstoffe binden über Esterbindungen kovalent an die primären Amine der Oberflächenproteine und stören die Zellen nicht in ihrer Bewegung. Um phototoxische Effekte zu vermeiden wurde die Belichtungsdauer und Intensität so gering wie möglich gehalten.

Fazit: Wie die Regulation von Schwimm- und Taumelphasen bei Trypanosomen abläuft, war bisher nicht bekannt. Mit dieser Arbeit wird gezeigt, dass der Grund für das Taumeln eine Änderung der Schlagrichtung des Flagellums ist.

5.4 Herstellung rekombinanter Zelllinien

Ergebnis: Unter Anwendung gentechnischer Methoden konnte der Zusammenhang zwischen der Schlagrichtung des Flagellums und der Taumelbewegung der BSF Trypanosomen weiter untersucht werden. Dazu wurde eine transgene RNAi-Zelllinie hergestellt, in der durch Zugabe von Tetrazyklin zum Medium, die Genexpression der intermediären Kette von Dynein (DIC) abgeschaltet wird (Zelllinie 13-90/pZJM.DIC). Dabei bewirkt die Zugabe von Tetrazyklin die Abspaltung des Tet-Repressors von zwei gegenläufig angeordneten T7-Operatoren und damit die Expression eines doppelsträngigen RNA-Transkriptes, durch die T7-Polymerase (Ngô *et al.*, 1998). Durch die zelleigene RNA-Interferenz Maschinerie kommt es dann zur sequenzspezifischen Degradation des Zielgenes. Die daraus hervorgegangene transgene Zelllinie war, genau wie dies für Insektenstadien mit einem vergleichbaren Konstrukt gegen die leichte Kette von Dynein schon gezeigt worden war (Branche *et al.*, 2006), nicht mehr zu einem tip-to-base, sondern nur mehr zu dem umgekehrten Flagellarschlag (base-to-tip) in der Lage. Dies führte nach Induktion der RNA-Interferenz bei den Zellen zu einem Verlust der effektiven Vorwärtsbewegung an deren Stelle eine kontinuierliche Taumelbewegung trat. 12 h nach Induktion betrug die Durchschnittsgeschwindigkeit der Population nur noch $4,0 \mu\text{m s}^{-1}$, was der Schwimmgeschwindigkeit taumelnder Zellen entspricht ($< 5 \mu\text{m s}^{-1}$). Der Knockdown von Dynein war letal für die Zellen, welche mit vergleichbarer Kinetik wie bei einem Knockdown von Actin abstarben (Abb. 26), jedoch langsamer als nach Knockdown von Clathrin, welches für die Endozytose essentiell ist. Die Induktion der RNA-Interferenz gegen die mittlere Kette von Dynein bewirkte zudem einen Zytokinesedefekt der Zellen (vgl. Kapitel 3.8; Abb. 3). Der Anteil an Zellen mit mehr als zwei Zellkernen lag 23 h nach Induktion bei 64% (n=119).

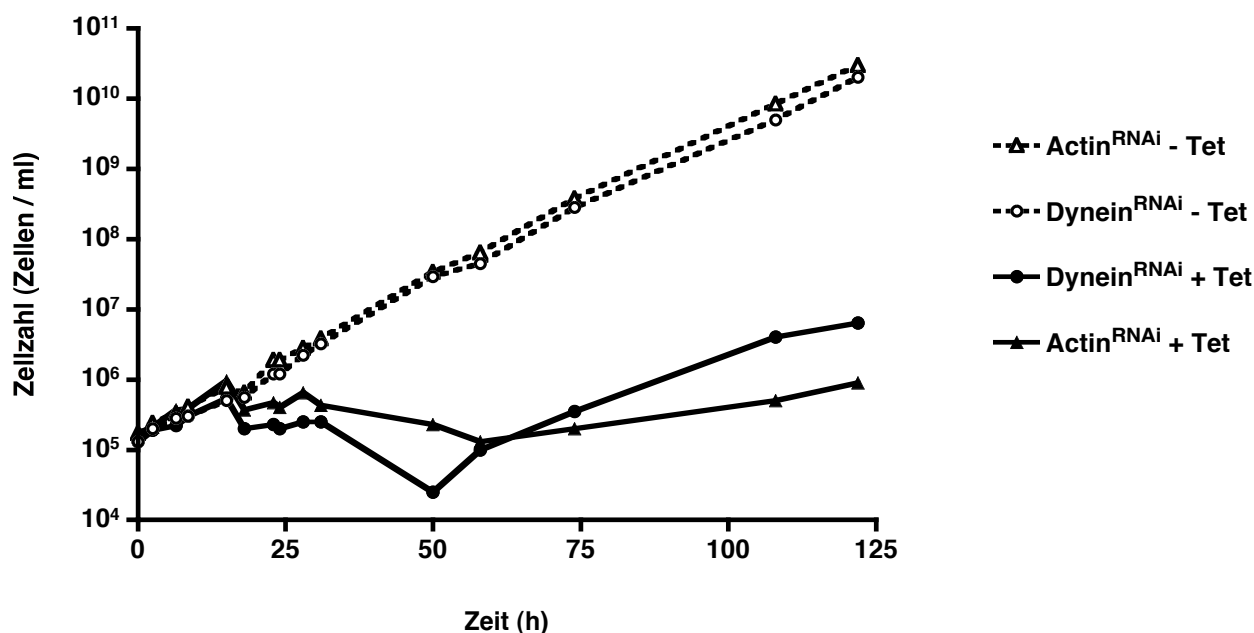


Abb. 26 | Wachstumsanalyse von BSF Trypanosomen nach Knockdown von Dynein bzw. Actin. Gezeigt sind Wachstumskurven klonaler RNAi-Zelllinien gegen Actin bzw. die mittlere Kette von Dynein, jeweils induziert (+ Tet: 1 µg/ml Tetrazyklin zum Zeitpunkt T_0 zugegeben) bzw. nicht-induziert (- Tet). Nach Induktion bricht das Wachstum sowohl bei Knockdown von Dynein als auch von Actin ein und die Mehrheit der Zellen stirbt mit vergleichbarer Kinetik ab, bis nach 2-3 Tagen die Induzierbarkeit des Phänotyps nachlässt. Die nicht-induzierten Zellen wuchsen dagegen exponentiell mit einer durchschnittlichen Populationsdopplungszeit von 7,0 h (Actin^{RNAi} - Tet) bzw. 7,1 h (Dynein^{RNAi} - Tet). Die Zellen wurden während der gesamten Wachstumsanalyse bei Bedarf so mit frischem Medium verdünnt, dass die Zelldichte zu keinem Zeitpunkt über 5×10^5 Zellen/ml lag, um ein Überwachsen der Kulturen zu verhindern. Die angegebene Zellzahl berücksichtigt diesen Verdünnungsfaktor.

Weitere transgene Zelllinien wurden hergestellt, um durch die Expression von fluoreszierenden Markerproteinen das automatisierte Tracking zu verbessern. Die Expression der Markerproteine und die Induzierbarkeit der RNAi-Zelllinien wurden standardmäßig durch Immunfluoreszenzmikroskopie, oder Northern bzw. Western Blot überprüft.

Fazit: Mit den transgenen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass das Bewegungsmuster der Trypanosomen (Taumeln bzw. persistente Bewegung) eine direkte Konsequenz der Richtung des Schlages ihres Flagellums ist.

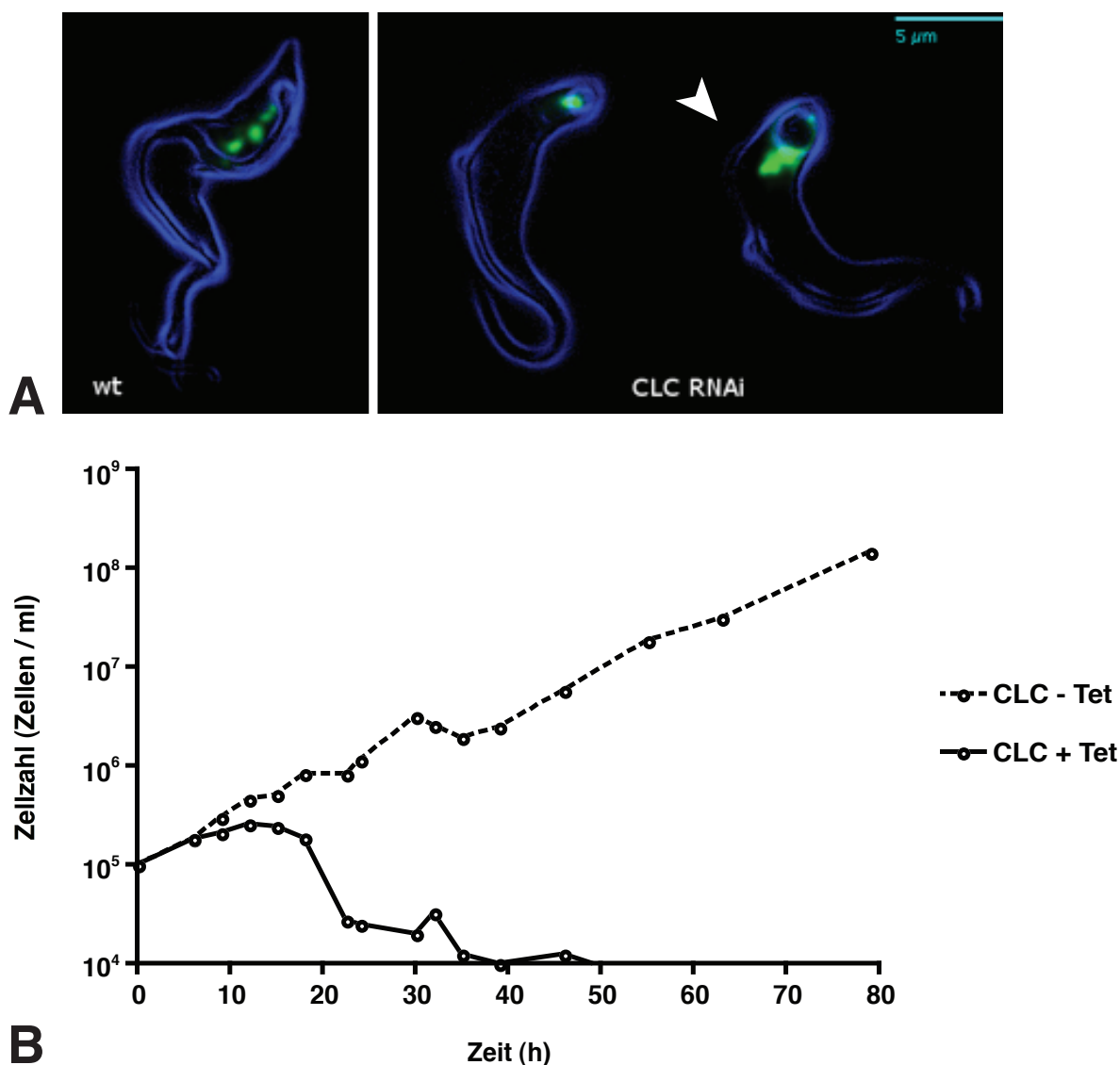


Abb. 27 | Knockdown von Clathrin durch RNA-Interferenz führt zu einer vollständigen Blockade der Endozytose bei *T. brucei*. **A** Die Flagellartasche schwillt mit zunehmender Dauer der Induktion der RNA-Interferenz gegen die leichte Kette von Clathrin (CLC, clathrin light chain) durch Tetrazyklin-Zugabe an (Pfeil), bis die Zellen innerhalb von ca. 24 h absterben. Der Lipidfarbstoff FM1-43FX (grün) zeigt die Aufnahme von Lipiden der Plasmamembran in das endosomale System im Wildtyp (linke Zelle), während die Aufnahme in den transgenen Zellen (rechte Seite) über die Flagellartasche blockiert ist. Die Proteine der Zelloberfläche sind mit AMCA-Sulfo-NHS (blau) gefärbt. **B** Die zugehörige Wachstumskurve zeigt das Absterben der Zellen nach Induktion der RNA-Interferenz durch Zugabe von Tetrazyklin (+ Tet) im Vergleich zu der Kontrolle ohne Tetrazyklin (- Tet).

Bezeichnung	Anmerkung	Quelle
p2675.CLC	CLC::eYFP Fusionsprotein, Tracking, posteriorer Teil der Zelle gefärbt	diese Arbeit
p2T7.CLC	RNAi gegen Clathrin light chain	diese Arbeit
p2T7.CHC	RNAi gegen Clathrin heavy chain	M. Günzel (dieses Labor)
PZJM.DIC	RNAi gegen Dynein intermediate chain	P. Bastin (Paris)
p2T7.flal	RNAi gegen das flagellar attachment protein	LaCount <i>et al.</i> (2002)
p2T7.Actin	RNAi gegen Actin	diese Arbeit
PZJM.Actin	RNAi gegen Actin	D. Nolan (Dublin)
pLew82ΔOp.VSG'Y'	konstitutive Expression des fluoreszierenden VSG'Y' Oberflächenproteins (Engstler, unveröffentlicht)	diese Arbeit

Tabelle 1 | Rekombinante Zelllinien

5.5 Die Rolle des Flagellums bei Zellzyklus und Entwicklung

Ein Einfluss des Zellzyklusstadiums auf die Motilität der Trypanosomen wird in der Literatur diskutiert (Walmod *et al.*, 2004), jedoch stellte das Fehlen einer Möglichkeit Trypanosomen im Zellzyklus zu synchronisieren bisher ein Hindernis für die experimentelle Überprüfung der Hypothese dar. Erst durch die Etablierung einer chemischen Zellzyklusarretierung durch Hydroxyurea wurde eine Zellzyklussynchronisation bei Trypanosomen möglich (Forsythe *et al.*, 2009).

Ergebnis: Die Zellzyklussynchronisation der Trypanosomen durch Hydroxyurea wurde genutzt, um die Motilität der unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass Zellen in der späten Teilungsphase (2K2N) mit nur etwa 10% persistent schwimmenden Zellen deutlich weniger motil sind als nicht-synchronisierte Kulturen, bei denen etwa 25% der Zellen persistent schwimmen (Abb. 28). Bei Verlust der Synchronisation nach mehreren Zellteilungen (16 - 28 h) war die volle Motilität der Population wieder hergestellt.

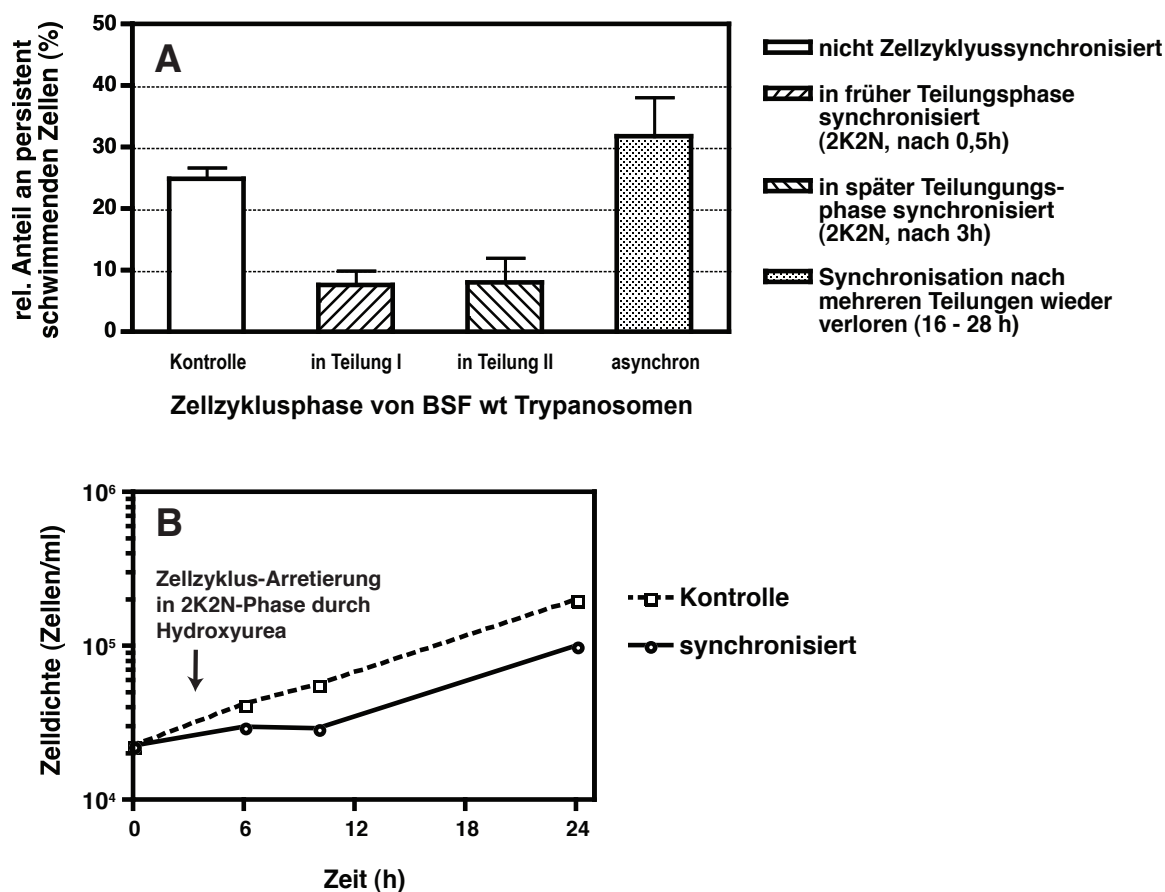


Abb. 28 | Die Motilität von Trypanosomen hängt ab vom Zellzyklusstadium. Eine Kultur von Blutstromform Trypanosomen wurden im Zellzyklus arretiert durch Zugabe von 10 µg/ml Hydroxyurea für 6 Stunden und synchronisiert. Nach zweimaligem Herauswaschen des Hydroxyurea in HMI-9 Medium, wurde der Anteil gerichtet schwimmender Zellen zu den in **A** angegebenen Zeitpunkten bestimmt für jeweils mehr als 500 Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± 95% CI (n=754, 519, 524, bzw. 526 Zellen v.l.n.r.). Die zugehörige Wachstumskurve ist in **B** abgebildet. Die Zellzahl nahm in den ersten drei Stunden nach Ende des Zellzyklusarrestes durch Hydroxyurea nicht zu. Danach wuchsen die Zellen mit einer Verdopplungszeit von unter 7 Stunden, genau wie die Kontrollzellen, zu denen kein Hydroxyurea gegeben worden war.

Interpretation: Die experimentell gemessene verringerte Motilität der Zellen in Teilung ist nicht unbedingt zu erwarten, da diese zwei anstelle von nur einem aktiv schlagenden Flagellum besitzen. Die beiden Flagellen schlagen jedoch nicht synchron und sind zudem gegenständig angeordnet, so dass sich ihre Kräfte gegenseitig aufheben.

Lässt sich umgekehrt auch die unterschiedliche Motilität nutzen, um gezielt einzelne Zellzyklusstadien aus einer nicht-synchronisierten Population anzureichern? Die wenig motilen Zellen einer Kultur wurden durch Sedimentation am Boden einer Zellkulturflasche angereichert. Durch vorsichtiges Abpipettieren wurde die Kultur in Überstand und Sediment getrennt und anschliessend die Zellzyklusverteilung in den beiden Fraktionen untersucht.

Anhand der Anzahl der Kinetoplasten und Zellkerne wurden einzelne Zellen eingeteilt in 1K1N (Zellen mit jeweils nur einem Kinetoplast und Nukleus), 2K1N (Zellen, bei denen bereits zwei getrennte Kinetoplasten vorliegen, der Zellkern jedoch noch nicht komplett getrennt ist) und 2K2N Zellen, bei denen sowohl Kinetoplast als auch Zellkern bereits getrennt vorliegen. 1K2N Zellen kommen normalerweise nicht vor, da sich der Kinetoplast stets vor dem Zellkern teilt.

Ergebnis: Zellen, die sich nicht in Teilung befanden (1K1N Zellen), waren im Überstand überrepräsentiert, während teilende Zellen (2K1N und 2K2N Zellen) dort unterrepräsentiert waren (Abb. 29). Daraus kann man schließen, dass 1K1N Zellen, die nur ein Flagellum besitzen, die persistenteren Schwimmer sind.

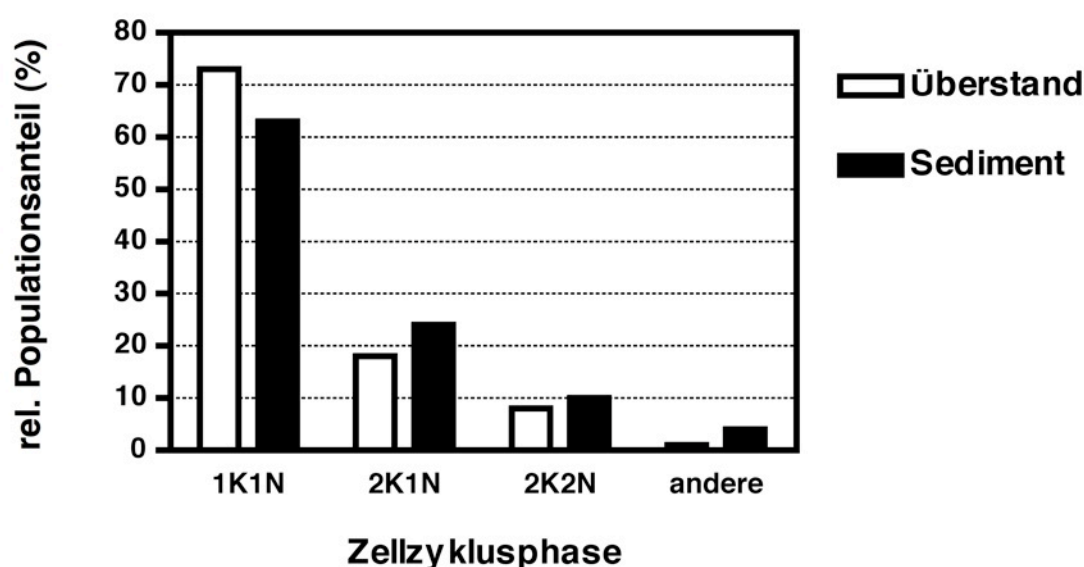


Abb. 29 | Zellzyklusanalyse nach Sedimentation einer nicht-synchronisierten Kultur von Trypanosomen. BSF Trypanosomen wurden in einer aufrecht stehenden 100 ml-Kulturflasche für 16 Stunden sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen durch Abpipettieren in Überstand und Sediment fraktioniert, über Nacht in 4% Formaldehyd fixiert und mit dem DNA-Farbstoff DAPI gefärbt. Durch Fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden zufällig ausgewählte, repräsentative Zellen aus beiden Fraktionen gemäß der Anzahl ihrer Nuclei (N) und Kinetoplasten (K) in das entsprechende Zellzyklusstadium eingeteilt (n=195, bzw. 164). Zellen mit mehr als zwei Zellkernen sind als "andere" bewertet und waren in der sedimentierten Fraktion angereichert. Zellen, bei denen die Teilung des Kinetoplasten noch nicht komplett abgeschlossen war (V- oder Hantel-förmiger Kinetoplast) wurden in dieser Analyse als 1K1N Zellen bewertet.

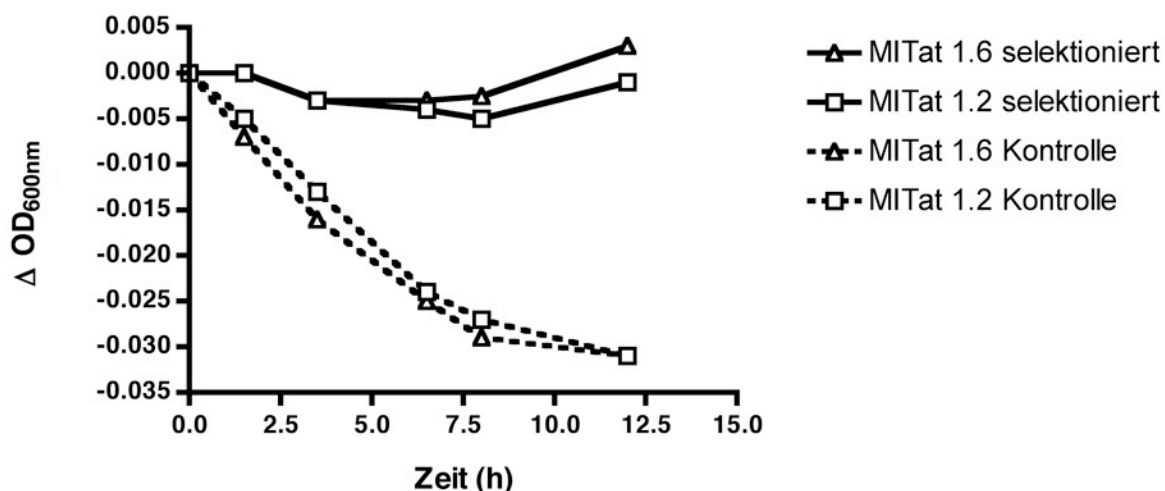


Abb. 30 | Motile Zellen, die über einige Runden der Sedimentation aufgereinigt wurden zeigen eine erhöhte Motilität und dadurch ein verringertes Sedimentationsverhalten. Die optische Dichte (OD) bei 600 nm Wellenlänge wurde photometrisch bestimmt für BSF Trypanosomen in HMI-9 Medium nach Sedimentation in einer aufrecht stehenden Küvette für die angegebenen Zeiten. Die Messungen wurden doppelt durchgeführt und gemittelt. Die Zellen in diesem Experiment waren MITat1.2 wt und MITat1.6 wt BSF-Populationen, die jeweils 30 Runden durch Selektion gegangen waren (selektioniert; s. Material und Methoden) bzw. 0 Runden (Kontrolle). Die optische Dichte (Y-Achse) wurde normiert auf den Startzeitpunkt T_0 . Die weniger motilen Zellen sedimentieren schneller, was sich in einer schnelleren Abnahme der optischen Dichte im mittleren Teil der Küvette niederschlägt. Während der Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wuchsen die Zellen weiter. Daher stammt die relative Zunahme der optischen Dichte bei den späten Zeitpunkten der selektionierten Zellen.

5.6 Vergleich der Motilität verwandter Trypanosomenarten

Ergebnis: Als evolutionär verwandte Art wurde in dieser Arbeit exemplarisch auch die Motilität von *Trypanoplasma borelli* untersucht und mit der von *Trypanosoma brucei* verglichen. *T. borelli* besitzt zwei Flagellen pro Zelle - das eine angeheftet (wie bei *T. brucei*) und das andere komplett frei. Die Frequenz der Flagellarwelle am angehefteten Flagellum von *T. borelli* war deutlich niedriger als bei *T. brucei* (Tabelle 2). Dagegen war bei dem Flagellarschlag von *T. borelli* die Amplitude deutlich ausgeprägter. Zudem verläuft der propulsive Flagellarschlag in die umgekehrte Richtung, verglichen mit *T. brucei*. Der Schlag des angehefteten Flagellums von *T. borelli* geht vom Basalkörper aus, setzt sich in Richtung der Flagellarspitze fort (base-to-tip) und bewirkt daher eine Fortbewegung der Zelle mit dem freien Flagellum voran und dem angehefteten Flagellum nachfolgend.

	<i>T. brucei</i>	<i>T. borelli</i> *
Effektive Schwimmrichtung	Flagellum voran	Flagellum folgt
Produktive Flagellarschlagrichtung	tip-to-base	base-to-tip
Flagellarfrequenz	18,3 ± 2,5 Hz	7,9 ± 0,7 Hz
Amplitude (angeheftetes Flagellum)	0,53 ± 0,08 µm	1,9 ± 0,5 µm

Tabelle 2 | Vergleich des Flagellarschlages von *T. brucei* mit dem von *T. borelli*. * Die für *T. borelli* experimentell gemessenen Werte beziehen sich jeweils auf das angeheftete Flagellum (n=170).

5.7 Der Einfluss der Mikroumwelt auf die Bewegung

5.7.1 Blutstromformen schwimmen persistent in Blut und taumeln in Zellkulturmedium

Ergebnis: In Blut aus infizierten Ratten lag der Anteil angerichtet schwimmenden BSF Trypanosomen bei 90% (Engstler *et al.*, 2007) und in nicht-infiziertem Blut war dieser mit 86 ± 9 % praktisch genau so hoch. Die Trypanosomen, die zu dem nicht-infizierten Blut gegeben wurden, waren zuvor in Standardzellkulturmedium (HMI-9 + 10% FCS) kultiviert worden. In diesem lag der Anteil an gerichtetem schwimmenden Zellen bei nur 26,8 ± 8,7 % (n = 1000). Der flüssige Bestandteil von Blut (Blutserum) wurde aufgereinigt durch Zentrifugation nach Agglutination der zellulären Bestandteile. Eine Analyse der Motilität von BSF Trypanosomen in Blutserum zeigte im Gegensatz zu Vollblut keinen signifikanten Unterschied zu Zellkulturmedium. Dies zeigt die Bedeutung der zellulären Bestandteile für die Motilität der BSF Trypanosomen.

Interpretation / Analyse: Den Grund für dieses unterschiedliche Verhalten zu finden war eine der zentralen Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit. Einerseits könnte das Medium selbst dafür verantwortlich sein, es könnte jedoch auch an einer Konditionierung des Mediums liegen, d. h. dass ein Stoff von den Zellen ins Medium abgegeben wird, der von den Trypanosomen wahrgenommen wird und diese darauf mit gesteigerter Bewegung reagieren. Ein Beispiel für eine solche Konditionierung ist der sogenannte SIF (“stumpy induction factor”), der von Trypanosomen ins Medium abgegeben wird und dazu dient die Zellkonzentration zu messen, was man auch als “quorum sensing” bezeichnet. Der SIF ist zwar molekular bislang nicht genau charakterisiert, man kann aber einen Wechsel des Entwicklungsstadiums von “long slender” Blutstromformen hin zu “short stumpy” einleiten, wenn konditioniertes Medium zugegeben wird.

Wie unterscheiden sich Blut und Zellkulturmedium? Selbstverständlich gibt es zwangsläufige Unterschiede in der exakten chemischen Zusammensetzung. Allerdings ist auch das Zellkulturmedium (HMI-9) chemisch nicht exakt definiert, da in dem FCS-Anteil

(10% v/v) nicht näher charakterisierte Bestandteile enthalten sind, ohne die die Trypanosomen nicht wachsen. Es bestehen aber eindeutige physikalische Unterschiede zu Blut. Dazu zählen der Anteil an zellulären Bestandteilen, die erhöhte Viskosität, sowie Flussbedingungen und Grenzflächeneffekte im Blutkreislaufsystem *in vivo*. Eine Auflistung der Umweltbedingungen aus physikalischer Sicht, denen Trypanosomen im Blutstrom ausgesetzt sind, ist in Tabelle 3 zu finden. Die Zellkulturbedingungen stimmen nur hinsichtlich der Temperatur (37°C) und dem CO₂ Partialdruck (5%) angemessen überein. Viskosität, hydrodynamische Scherkräfte, Grenzflächeneffekte und die Komplexität durch Anwesenheit anderer Zellen und einer extrazellulärer Matrix werden dagegen nicht berücksichtigt. Tatsächlich variiert aber auch die Sauerstoff- und CO₂ Konzentration entlang des Blutsystems.

	Blut	Zellkultur
Temperatur	37 °C	37 °C
Viskosität	> 4 mPa s	< 1 mPa s
Scherkräfte	++	-
Reynoldszahl	hoch variabel (10 ⁻⁴ - 10 ³)	ca. 10 ⁻⁴
Grenzflächeninteraktion	++	-
Zell-Zell-Interaktion	++	-
O₂ / CO₂ Gehalt	variiert stark	konstant (5% CO ₂)

Tabelle 3 | Vergleich der physiko-chemischen Umweltbedingungen der Trypanosomen in Blut und Zellkultur.

	<i>T. brucei</i> (BSF)	Erythrozyten (human)	Leukozyten (human)
Zellform	elongiert	scheibenförmig, bikonkav	sphärisch
Größe	20 x 2,5 µm	7,5 x 2 µm	7 - 12 µm Ø *
physikalische Dichte (relativ)	+	++	+
Konzentration	bis zu 10 ⁹ /ml	4 - 6 · 10 ⁹ /ml	4 - 10 · 10 ⁶ /ml
motil:	++	-	-

Tabelle 4 | Übersicht über die physikalischen Zelleigenschaften von Trypanosomen und Zellen des Blutsystems. * Man kann zwar bei den Leukozyten, den Zellen des Immunsystems, eine ganze Reihe von Unterarten unterscheiden, die hier angegebenen Eigenschaften treffen jedoch für die große Mehrheit der Zellen zu. Zudem machen diese im Vergleich zu den Erythrozyten nur einen sehr kleinen Anteil der Gesamtheit der Zellen im Blutkreislauf aus.

5.7.2 Gerichtetes Schwimmen bei hoher Erythrozytenkonzentration

Ergebnis: Die Zugabe von isolierten, mit Formaldehyd fixierten Rindererythrozyten in einer finalen Konzentration von 10⁹ Zellen / ml bewirkte eine schnelle und gerichtete Motilität bei MITat 1.6 wt Zellen. Dabei wurden 55% der Zellen als Schwimmer bewertet (n=600). Der Anteil der gerichtet schwimmenden Trypanosomen nahm weiter zu, wenn die Erythrozyten in höherer Konzentration zugegeben wurden. Für den positiven Effekt auf die Motilität war die lokale Konzentration von Erythrozyten um die Trypanosomen herum entscheidend. Da die Erythrozyten nicht komplett homogen verteilt zu liegen kommen, gibt es immer auch einzelne Bereiche auf dem Objektträger, in denen kaum Zellen liegen. Dort betrug der Anteil an gerichtet schwimmenden Zellen nicht mehr, als im Standardzellkulturmedium (25,5 ± 16,7%), welches auch keine zellulären Bestandteile enthält. Allerdings schwammen auch bei physiologisch hoher Erythrozytenkonzentration etwa 10% der Zellen nicht gerichtet, sondern zeigten eine abwechselnde Vorwärts- und Rückwärtsbewegung in den Zwischenräumen der Erythrozyten, mit nur marginaler Netto-Fortbewegung.

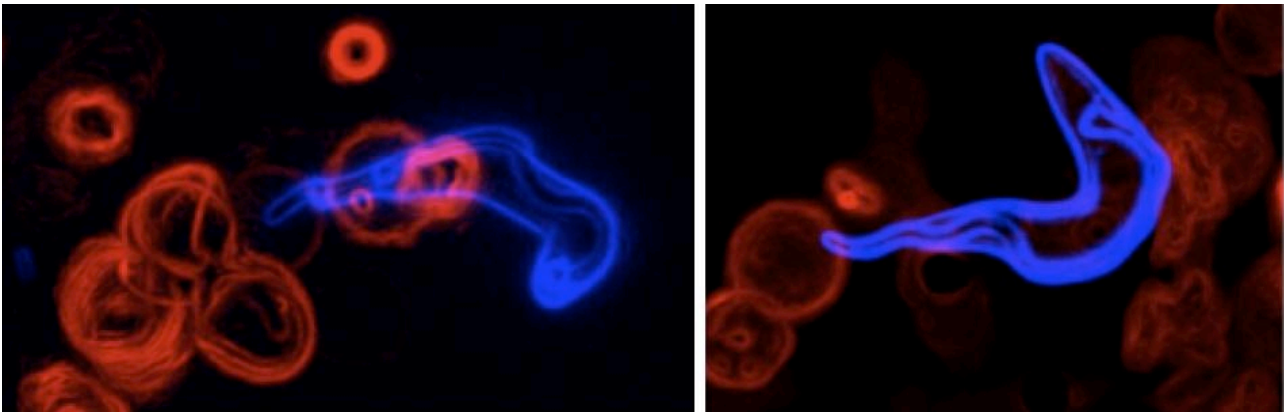


Abb. 31 | Untersuchung der Bewegung von Trypanosomen (blau) in Gegenwart von Erythrozyten (rot) in unterschiedlicher Konzentration. Die Trypanosomen wurden mit AMCA-Sulfo-NHS und die isolierten Blutzellen mit Rhodamin-Sulfo-NHS angefärbt. Je dichter die Partikelkonzentration, desto höher lag der Anteil an gerichtet schwimmenden BSF Trypanosomen. Die Trypanosomen interagieren mit den Blutzellen und erreichen dadurch eine schnelle und persistente Fortbewegung.

Durchführung: Das Fixans (Formaldehyd) wurde vor Zugabe der Trypanosomen ausgiebig herausgewaschen, mit mindestens 6 Waschschritten in isotonischer NaCl-Lösung (0,9% w/v), um die Vitalität und Motilität der Trypanosomen nicht zu beeinflussen. Für den eigentlichen Versuch wurden die fixierten Erythrozyten und Trypanosomen pelletiert und in TDB (Trypanosoma dilution buffer) überführt. Da bei der hohen Konzentration von Zellen einzelne Zellen unter dem Mikroskop nicht auseinander gehalten werden können, wurden Trypanosomen verwendet, die auf unterschiedliche Weise fluoreszenzmarkiert waren (s. Material und Methoden).

Analyse / Interpretation: Die physiologische Konzentration entspricht einem Hämatokrit von etwa $4,5 \times 10^9$ Zellen / ml. Da die Erythrozyten komplett fixiert waren (24 h in 4% PFA), können chemische Signalstoffe, die eventuell von diesen ausgehen, als Ursache praktisch ausgeschlossen werden. Vielmehr ist es die physikalische Anwesenheit der Zellen, die die gesteigerte Motilität bei den Trypanosomen hervorruft. Die in Blut bei ca. 10% der Zellen beobachtete abwechselnde Vorwärts- und Rückwärtsbewegung wurde auch für *Plasmodium* in Hautgewebe berichtet (Amino *et al.*, 2005). Durch räumlich und zeitlich hoch auflösende Mikroskopie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese Vor- und Zurückbewegung der Trypanosomen verursacht wurde durch eine wechselnde Umkehr der Schlagrichtung des Flagellums (s. Kapitel 5.3.2).

5.7.3 Blutstromformen schwimmen schneller in Blut als in Zellkulturmedium

Ergebnis: Die durchschnittliche Geschwindigkeit der BSF Trypanosomen in einer lokalen Umgebung mit hoher Dichte an isolierten Erythrozyten lag bei $33,5 \pm 2,1 \mu\text{m s}^{-1}$. Dies ist um ein Vielfaches höher als die Durchschnittsgeschwindigkeit ($< 6 \mu\text{m s}^{-1}$) und sogar deutlich höher als die Maximalgeschwindigkeit ($20 \mu\text{m s}^{-1}$) der gleichen Zellen in Zellkulturmedium.

Durchführung / Analyse: Die Geschwindigkeit wurde dabei anhand von Trajektorien, d.h. des insgesamt zurückgelegten Weges, ermittelt, als die Summe der euklidischen Distanzen zwischen den einzelnen Positionen bei 6 Hz zeitlicher Auflösung, geteilt durch die Gesamtdauer. Um den Messfehler gering zu halten, wurde die mittlere Geschwindigkeit der einzelnen Zellen über eine zurückgelegte Distanz von mindestens $100 \mu\text{m}$ gemessen. Um eine Beeinträchtigung der Zellen durch die mikroskopische Messung selbst auszuschließen (z.B. durch Phototoxizität), wurden die einzelnen Experimente jeweils innerhalb von nicht mehr als 10 Minuten durchgeführt, aufgenommen und erst nachträglich ausgewertet und validiert.

5.7.4 Vergleich der Viskosität von Zellkulturmedium und Blut

Ergebnis: Der Vergleich der Viskositäten von Wasser, Standardzellkulturmedium (HMI-9), Serum und Blut zeigt, dass sich Wasser, Medium und Serum nicht stark unterscheiden, während Blut deutlich viskoser ist (Abb. 32-A). Nachfolgend sind die experimentell bestimmten Viskositäten unterschiedlicher Lösungen gezeigt, die in dieser Arbeit für die Untersuchung des Einflusses der Viskosität auf die Motilität von Trypanosomen verwendet wurden. Das verwendete Blut wurde durch eine Kanüle steril einem Rind entnommen und in, mit Heparin beschichteten Probenröhrchen (Sarstedt) gesammelt, um die Koagulation zu verhindern. Der Hämatokrit wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und betrug $4,4 (\pm 0,2) \times 10^9$ Zellen ml^{-1} .

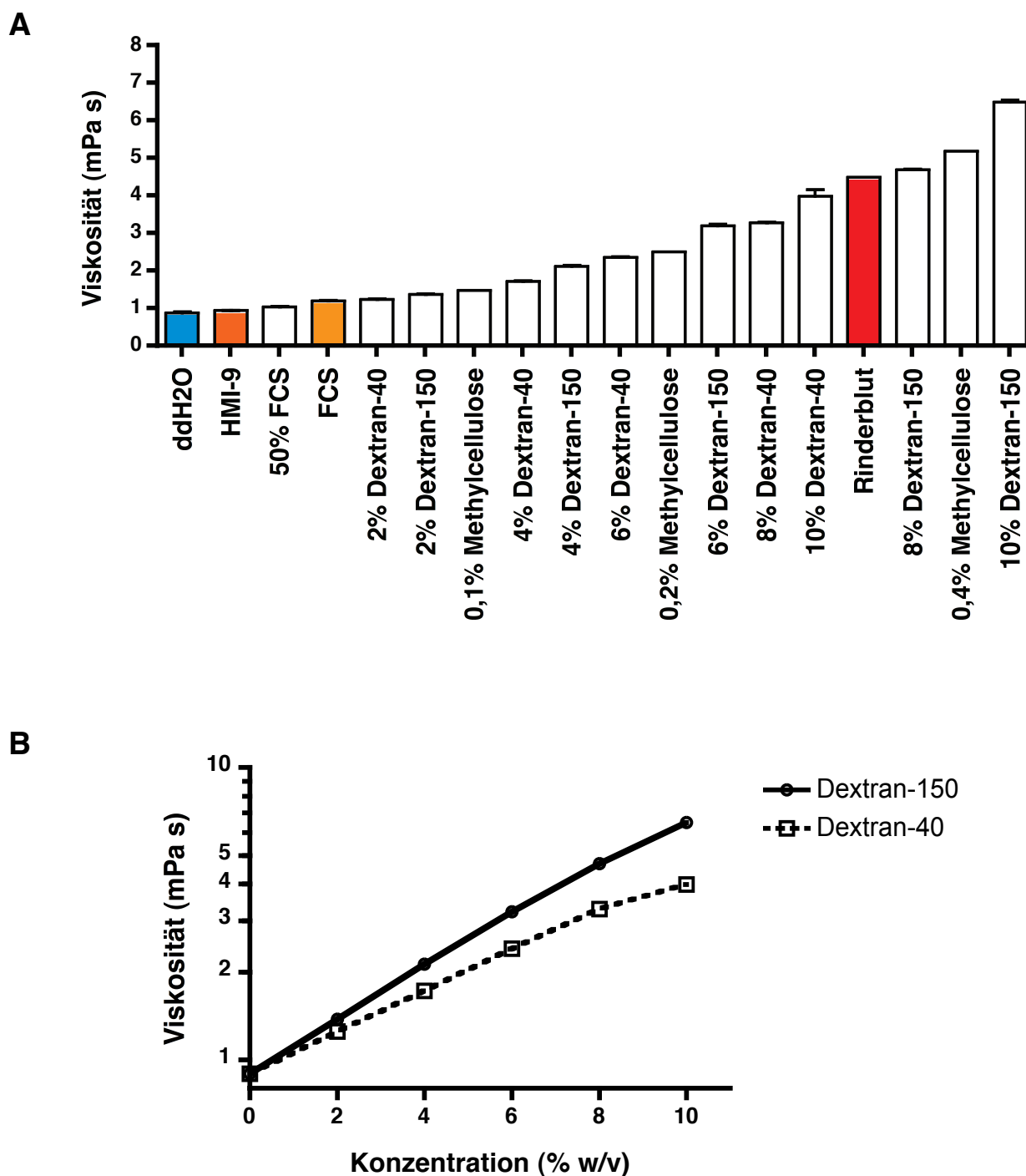


Abb. 32 | Kinematische Viskosität unterschiedlicher Medien. **A** Die Viskosität von Zellkulturmedium (HMI-9) und Blutserum (FCS) unterscheidet sich kaum von Wasser (ddH₂O). Blut ist jedoch um etwa Faktor 5 viskoser (rot hervorgehoben). Durch Zusatz von Dextran bzw. Methylcellulose kann die Viskosität von Vollblut nachgestellt werden. Diese Medien wurden auch für die Moitlitätsanalysen verwendet. Jede Messung wurde mindestens 6 mal mit einem Kapillarviskosimeter durchgeführt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gezeigt. **B** Die Viskosität wächst exponentiell mit der Konzentration von Dextran, wie in der semi-logarithmischen Auftragung deutlich wird.

Durchführung: Die Viskosität wurde mit Hilfe eines Kapillarviskosimeters experimentell ermittelt. Dabei wird die Zeit gemessen, die ein bestimmtes Volumen der zu messenden Flüssigkeit benötigt, um durch eine Kapillare zu fließen. Diese hängt bei gegebener Temperatur nur ab von der Viskosität der Lösung. Sind die benötigte Zeit und die physikalischen Eigenschaften der Kapillare bekannt, so kann daraus direkt die Viskosität errechnet werden. Jede Messung wurde mindestens vier mal wiederholt, um die Genauigkeit der Messungen zu erhöhen. Bei der Viskositätsbestimmung spielt das dabei verwendete Gerät eine entscheidende Rolle bei den gemessenen Absolutwerten. Daher sind in dem Diagramm alle Werte auf Wasser normiert. Alle Messungen wurden bei 22° C vorgenommen, da dies der Temperatur entsprach, bei der auch die Motilitätsmessungen der Zellen durchgeführt wurden. Die Viskosität von Rinderblut dagegen wurde bei 37°C bestimmt, um die Viskosität unter physiologischen Bedingungen zu ermitteln. Allerdings ist die Viskosität auch stark indirekt abhängig von der Temperatur, d. h. mit steigender Temperatur sinkt die Viskosität. Abb. 33 ist die starke Abhängigkeit der dynamischen Viskosität von Wasser von der Temperatur zu entnehmen.

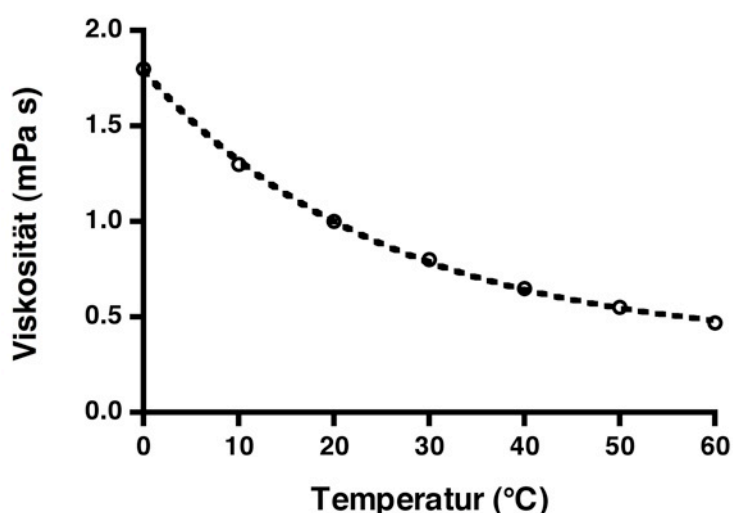


Abb. 33 | Dynamische Viskosität von Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur.

Analyse / Interpretation: Standardzellkulturmedium und Wasser unterscheiden sich kaum hinsichtlich der Viskosität. Auch Blutserum ist nur geringfügig viskoser als HMI-9 Medium (< 40%), wohingegen Blut um etwa 500% viskoser ist. Der viskositätserhöhende Anteil in Serum ist Albumin. Da Serum jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Motilität der Trypanosomen hatte, wurden höher viskose Substanzen verwendet, um die physiologische Viskosität von Blut *in vitro* nachzustellen.

Dextran ist ein verzweigtes Polysaccharid, das aus einzelnen Glucosemolekülen aufgebaut ist. Löst man Dextran in Wasser, so erhöht sich die Viskosität der Lösung. In dieser Arbeit wurde Dextran verwendet, um den Effekt unterschiedlicher Viskosität auf die

Motilität von Trypanosomen zu untersuchen. Dextran ist kommerziell erhältlich in einem breiten Bereich unterschiedlicher Molekulargewichte. Mit dem Molekulargewicht steigt auch die Viskosität, bei gleicher Konzentration der Lösung. In dieser Arbeit wurde Dextran-150 mit einem Molekulargewicht von 100 - 200 kDa und Dextran-40 mit einem Molekulargewicht von 40 kDa verwendet. Dextranlösungen finden auch in der Medizin Verwendung, als Blutvolumenersatz oder zur Senkung der Blutviskosität. Dafür wird normalerweise eine 6% (w/v) Dextran-40 Lösung intravenös verabreicht. Von Dextran wird in der Literatur zudem eine Antithrombotische Wirkung berichtet, indem es an Erythrozyten und Blutplättchen bindet und deren Aggregation durch Erhöhung ihrer Elektronegativität verhindert (Bernstein *et al.*, 1963; Jan und Chien, 1973).

Beobachtung: Im Gegensatz zu der Wirkung von Dextran auf Blutzellen, bewirkte die Zugabe von Dextran bei BSF Trypanosomen eine Aggregation der Zellen (MITat1.2 und MITat1.6 Zelllinien). Die Aggregation trat auf nach einigen Stunden Inkubation und die Aggregate vergrößerten sich mit der Zeit. Diese Aggregation war reversibel. Durch Auf- und Abpipettieren konnten die Aggregate wieder aufgelöst werden. Nach wenigen Stunden bildeten sich erneut Aggregate aus. Innerhalb der Aggregate hingen die einzelnen Trypanosomen lose aneinander. Einzelne Zellen konnten sich innerhalb der Aggregate fortbewegen. Auch die gesamten Aggregate als solches waren beweglich (langsame Formänderung).

Interpretation: Eine Alternative zu Dextran stellt Methylcellulose dar, die ebenfalls die Viskosität einer Lösung erhöht. Bei der Methylcellulose geschieht dies über eine Ausbildung von Quervernetzungen der Cellulosemoleküle. In Medium, das Methylcellulose enthielt war anders als bei Dextran keine störende Aggregatbildung der Trypanosomen zu beobachten. Daher wird im Weiteren vornehmlich nur auf Methylcellulose als viskositätserhöhender Zusatz näher eingegangen.

5.7.5 Die Zugabe von Methylcellulose erhöht die Motilität der Blutstromformen

Ergebnis: Die mikroskopische Untersuchung zeigte, dass die Zugabe von Methylcellulose einen starken positiven Effekt auf die Motilität von BSF Trypanosomen hat. Bereits bei einer Konzentration von 0,4% Methylcellulose war der Anteil an gerichtet schwimmenden Zellen verdoppelt (Abb. 35-C). Diese Konzentration entspricht in etwa der Viskosität von Blut (Abb. 32-A). Auch in einer 2%igen Lösung, die eine viel höhere Viskosität als Blut aufweist, bewegten sich die Zellen noch persistent, allerdings mit verringerter Geschwindigkeit (Abb 35-A). Eine 2%ige Lösung der verwendeten Methylcellulose hat eine Viskosität von etwa 3000 mPa·s. Die Geschwindigkeit von gerichtet schwimmenden Zellen in HMI-9 Medium lag bei $16,5 \pm 9,8 \mu\text{m s}^{-1}$ und war damit deutlich erhöht auf $28,9 \pm 12,1 \mu\text{m s}^{-1}$ nach Zugabe von Methylcellulose (0,5% finale Konzentration).

Die Geschwindigkeit von jeweils 10 gerichtet schwimmenden MITat1.6 wt Zellen wurde dabei in Intervallen von 1 Sekunde in mehr als 250 Einzelmessungen bestimmt. Die Beschränkung der Analyse auf gerichtet schwimmende Zellen stellt dabei eher die maximale Geschwindigkeit dar, als die durchschnittliche Geschwindigkeit einer Population. Auch die durchschnittliche Geschwindigkeit der gesamten Population, d.h. aller Zellen statt nur derer, die gerichtetes Schwimmen zeigen, war in dem höher viskosen Medium stark erhöht. Die durchschnittliche Geschwindigkeitsverteilung in Abhängigkeit von der Methylcellulose Konzentration ist in Abb. 35-A dargestellt. Dies zeigt, dass nicht nur die maximale Geschwindigkeit bei gerichtetem Schwimmen, sondern auch der Anteil an Zellen mit gerichtetem Schwimmen erhöht war (Abb. 35-C).

Eine weitere Zugabe von Methylcellulose auf eine absolute Konzentration von 1% erhöhte die Schwimgeschwindigkeit jedoch nicht weiter, sondern führte zu einer relativen Abnahme. Allerdings war die Geschwindigkeit auch hier noch deutlich höher als im niedrigviskosen Standardmedium.

Die Zugabe von 0,5% Methylcellulose zu dem Medium bewirkte neben der Erhöhung der durchschnittlichen Geschwindigkeit der Zellen auch eine Veränderung in deren helikalem Bewegungsmuster. Die Wellenlänge in den Projektionen des Zellkörpers war etwa verdoppelt, von 7 μm auf 15 μm . Die Rotationsfrequenz wurde dagegen durch die erhöhte äußere Viskosität etwas verringert (ca. 2 statt 3 Hz). Unter beiden Bedingungen galt jedoch die Wellengleichung unter Berücksichtigung der jeweiligen Maximalgeschwindigkeit von ca. 30 bzw. 20 $\mu\text{m s}^{-1}$ während Phasen des gerichteten Schwimmens:

$$v = f \cdot \lambda$$

$$(20 \mu\text{m s}^{-1} \approx 7 \mu\text{m} \cdot 3 \text{ s}^{-1}; \text{ bzw.: } 30 \mu\text{m s}^{-1} \approx 15 \mu\text{m} \cdot 2 \text{ s}^{-1})$$

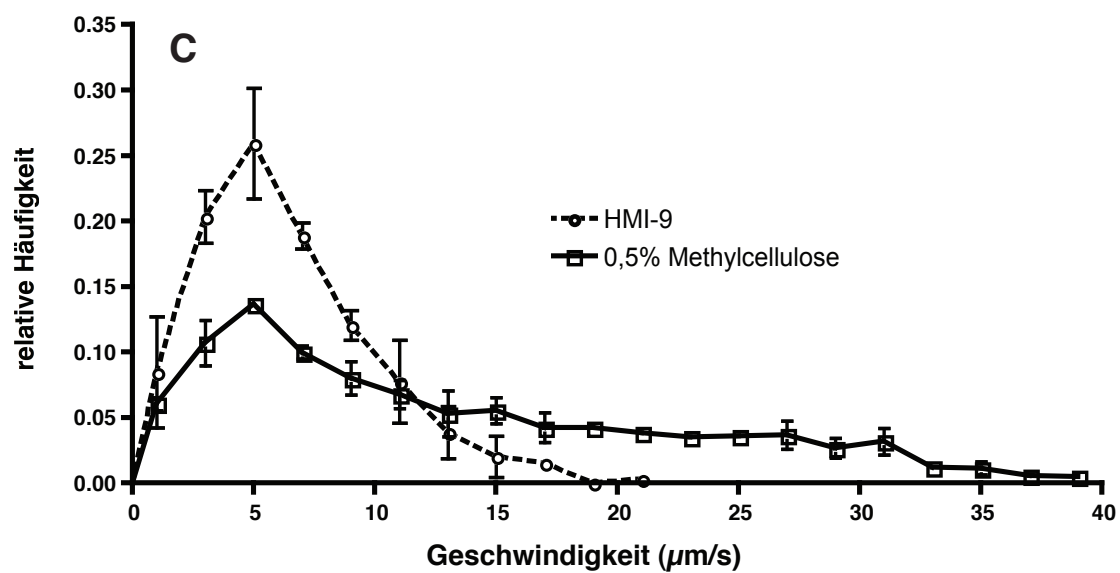
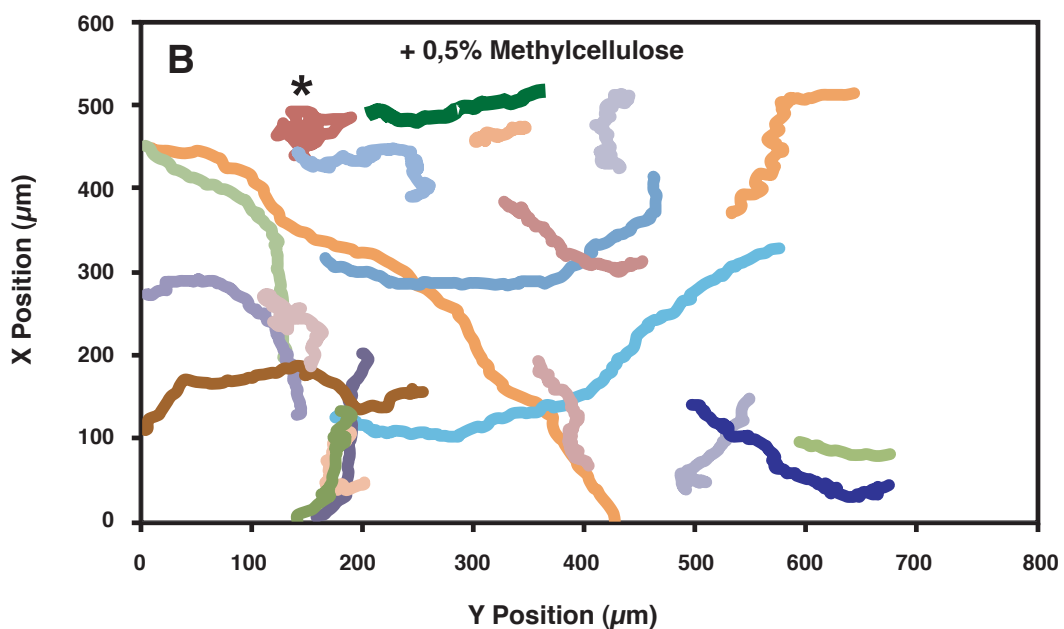
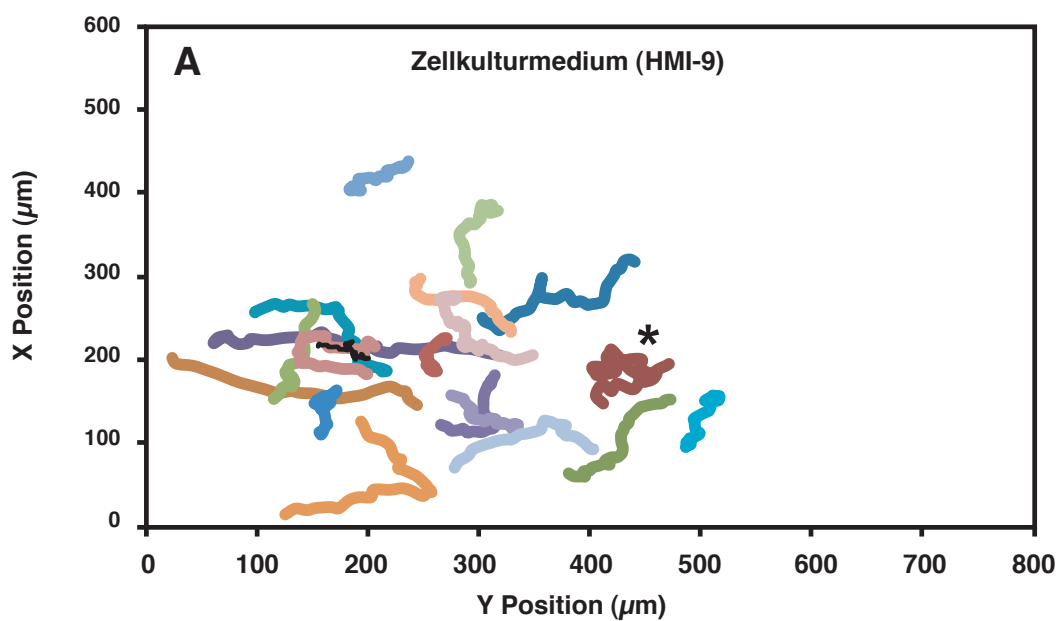


Abb. 34 | Die Zugabe von 0,5% Methylcellulose erhöht sowohl den Anteil, als auch die Geschwindigkeit der gerichtet schwimmenden BSF Trypanosomen.

A Typische Trajektorien von BSF Trypanosomen in Zellkulturmedium (HMI-9) wurden ermittelt über einen Zeitraum von 30 Sekunden, mit einer Abtastrate von 4 Hz. **B** Gleiche Bedingungen wie zuvor, jedoch wurden dem Medium 0,5% (w/v) Methylcellulose zugegeben. * Zellen in der letzten Phase der Zellteilung taumelten in beiden Medien. **C** Die Geschwindigkeit wurde wiederholt bestimmt in Intervallen von 1 Sekunde für 10 unterschiedliche MITat1.6 wt Zellen. Gezeigt ist die Häufigkeitsverteilung mit Standardfehler (SEM) der einzelnen Geschwindigkeiten im Medium ohne (gestrichelte Linie, n=979 Messungen) bzw. mit 0,5% Methylcellulose (durchgezogene Linie, n=1222 Messungen). Die mittlere Geschwindigkeit betrug in Medium ohne Methylcellulose $5,7 \pm 3,4 \mu\text{m s}^{-1}$ und stieg nach Zugabe der Methylcellulose auf $12,9 \pm 10,2 \mu\text{m s}^{-1}$ an.

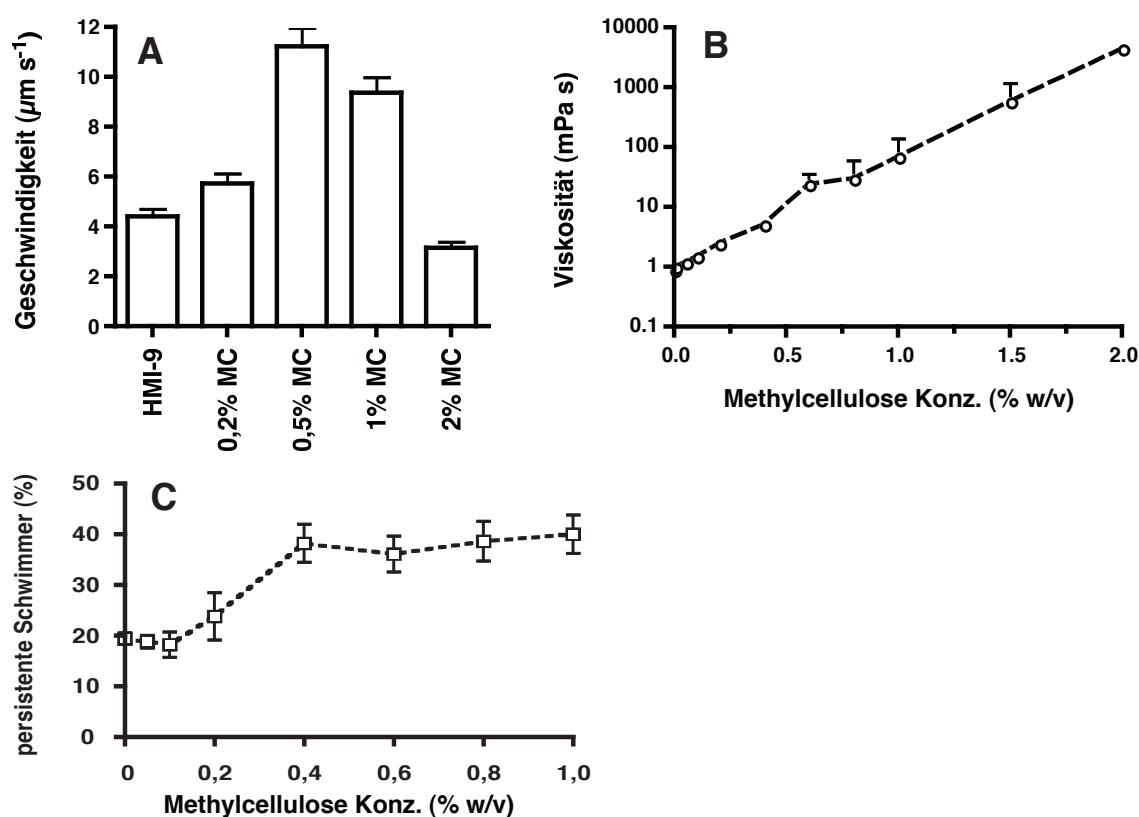


Abb. 35 | Es gibt für die Motilität von Blutstromform Trypanosomen eine optimale Viskosität.

A zeigt die durchschnittliche Populationsgeschwindigkeit von MITat1.6 wt Trypanosomen in Medium mit unterschiedlicher Konzentration an Methylcellulose. Die Balken zeigen jeweils die gemittelte Geschwindigkeit \pm SEM von jeweils mindestens 100 Zellen, über einen Zeitraum von 10 Sekunden gemessen. Für jede Bedingung wurde der Versuch insgesamt vier Mal durchgeführt. **B** zeigt die Viskosität in Abhängigkeit von der Konzentration an Methylcellulose. Die Viskosität wurde experimentell bestimmt mit einem Kapillarviskosimeter. Die semi-logarithmische Auftragung verdeutlicht, dass die Viskosität mit der Methylcellulosekonzentration exponentiell ansteigt. **C** Der Anteil an gerichtet schwimmenden Zellen steigt durch Zugabe von Methylcellulose. Als gerichtet schwimmende Zellen wurden hierbei diejenigen Zellen gewertet, die innerhalb von 30 s einen Radius von $100 \mu\text{m}$ um den Startpunkt herum verlassen haben.

Analyse / Interpretation: Bislang war nicht bekannt, welchen Effekt eine Erhöhung der Viskosität des Mediums auf das Schwimmverhalten von Trypanosomen hat. Aus unserer Alltagserfahrung kennen wir die abbremsende Wirkung auf eine Bewegung durch viskose Reibungsverluste. Methylcellulose wird als viskositätserhöhender Bestandteil in einigen Zellkulturmedien verwendet. Einige Trypanosomenstämme können sogar nur in Medium kultiviert werden, dem Methylcellulose beigesetzt wurde. So wird zum Beispiel für die Kultur von pleomorphen AnTat BSF Trypanosomen eine Methylcellulose Konzentration von 1,1% verwendet (Vassella *et al.*, 1997). Aus diesem Grund ist die Verwendung von Methylcellulose eine gute Wahl, um den Effekt der Viskosität des Mediums genauer zu untersuchen, ohne Artefakte durch eventuelle Zytotoxizität einzubringen.

Fazit: Hier wurde gezeigt, dass es für die Motilität von BSF Trypanosomen eine optimale Viskosität gibt, welche höher liegt als die, des Standardzellkulturmediums und etwa der Viskosität von Blut entspricht.

5.7.6 Ein Zellkulturmedium für die Untersuchung der Motilität

Ergebnis: Die Wachstumsanalyse in Medium mit Methylcellulose ergab kein verlangsamtes Wachstum (Abb. 36).

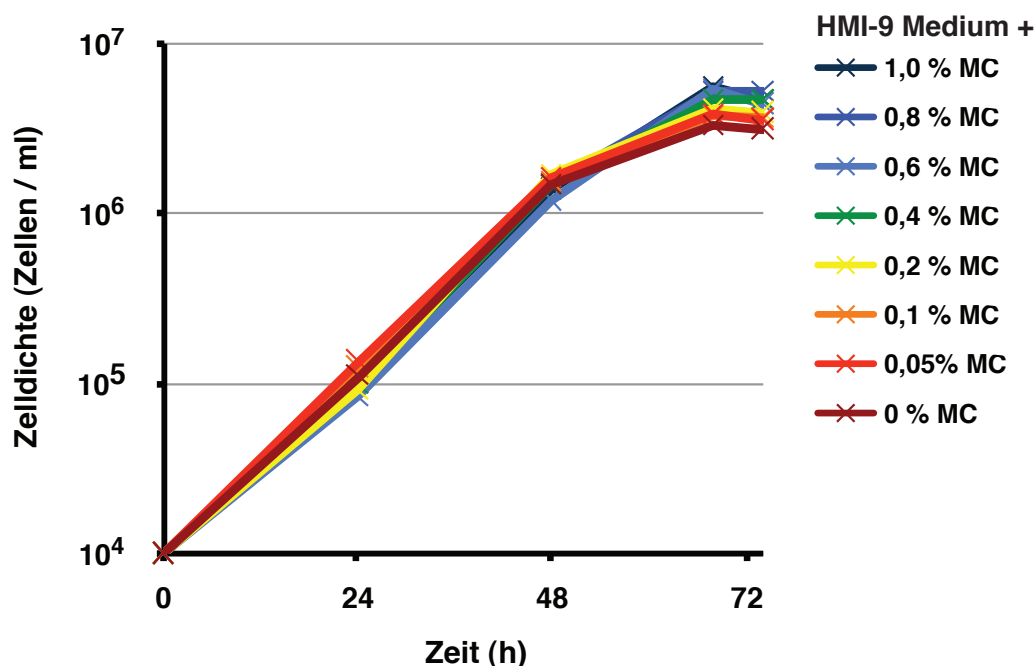


Abb. 36 | Wachstumsanalyse von Wildtyp BSF Trypanosomen in Medium mit unterschiedlicher Methylcellulosekonzentration (MC). Die Dopplungsrate der Population (PDT) unterscheidet sich nicht in den einzelnen Kulturmedien, was sich in einer gleichmäßigen Steigung im Bereich der linearen Wachstums widerspiegelt (0-48 h). Der Wachstumseinbruch, der nach 48 - 68 h deutlich wurde, stammt daher, dass das Medium während des Versuches nicht gewechselt wurde. Alle Ansätze wurden parallel mit 1×10^4 Zellen/ml der selben Startkultur zum Zeitpunkt $T_0 = 0h$ angeimpft. Es zeigt sich bei den späten Zeitpunkten (68 - 74 h), dass die Zellen in Medium mit Methylcellulose etwas dichter wachsen. In der Tendenz korreliert dies mit der Konzentration an zugesetzter

Methylcellulose. In reinem HMI-9 Standard-Zellkulturmedium erreichten die Trypanosomen eine maximale Zelldichte von $3,3 \times 10^6$ Zellen/ml und bei Zusatz von Methylcellulose erhöhte sich diese auf $5,4 \pm 0,2 \times 10^6$ Zellen/ml (bei 0,6 - 1,0 % MC w/v).

Die unterschiedlichen Kulturen mit verschiedener Konzentration an Methylcellulose, wurden alle mit der gleichen Zelldichte angeimpft (1×10^4 Trypanosomen / ml) und zeigten durchgehend exponentielles Wachstum mit nahezu identischer Verdopplungsrate. Der Wachstumseinbruch nach etwa zwei Tagen ist dadurch begründet, dass die Zellen absichtlich nicht weiter mit frischem Medium verdünnt wurden. Der Grund dafür ist, dass dadurch festgestellt werden sollte, ob die Zellen bei erhöhter Viskosität etwa weniger dicht wachsen können, da die Diffusion (z.B. von Sauerstoff) in höher viskosem Medium verlangsamt ist. Die Zellen wuchsen dennoch nicht weniger dicht, wie die Wachstumskurven zeigen. Alle Kulturen erreichten eine Zelldichte von mehr als 3×10^6 Zellen / ml. In der Tat waren sogar die Kulturen in dem Medium mit Methylcellulose allesamt dichter gewachsen als die Kontrollen (HMI-9). Jede einzelne Bedingungen wurde in drei Triplikaten gemessen, insgesamt enthält die Wachstumskurve die Daten aus 24 Kulturen. In HMI-9 lag die maximal erreichte Zelldichte nach 75 Stunden bei $3,2 \pm 0,2 \times 10^6$ Zellen/ml. Alle Ansätze, die zwischen 0,4 und 1,0% Methylcellulose enthielten lagen zu diesem Zeitpunkt bei mehr als 4×10^6 Zellen/ml. Die maximale Zelldichte wurde erreicht in Medium mit 0,8% Methylcellulose und lag bei $5,2 \pm 0,5 \times 10^6$ Zellen / ml.

Fazit: Diese Arbeit zeigt, dass der Zusatz von Methylcellulose geeignetes ist, um die Motilität der Trypanosomen unter realistischeren Bedingungen zu untersuchen, als Ersatz für das viskosere Blut. Es konnte auch eine eventuelle Zytotoxizität der Methylcellulose ausgeschlossen werden.

5.7.7 Die Motilität der Insektenstadien ist besser an nieder-viskoses Medium angepasst als bei den Blutstromformen

Ergebnis: In nieder-viskosem Medium hatten die prozyklischen Formen (PCF) einen höheren Anteil an gerichtet schwimmenden Zellen, sowie eine höhere mittlere Populationsgeschwindigkeit als die Blutstromformen (BSF). Bei den BSF schwammen hier weniger als 30% der Zellen gerichtet, bei den PCF dagegen lag der Anteil bei über 50%.

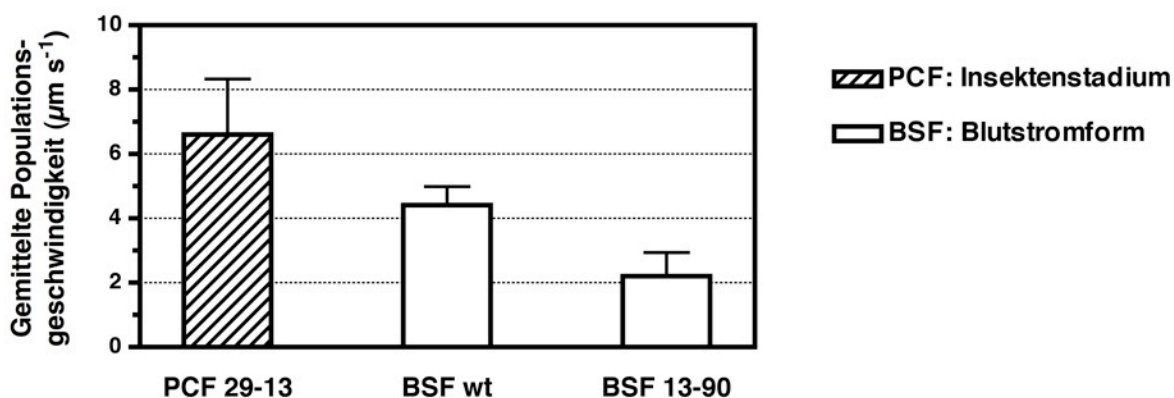


Abb. 37 | Die Motilität der Insektenstadien ist besser auf niedrig-viskoses Medium eingestellt als bei den Blutstromformen. Dargestellt ist ein Vergleich der durchschnittlichen Schwimgeschwindigkeit einer kleinen Population von Insektenstadium (PCF, Stamm 29-13) und Blutstromformen (BSF, Wildtyp bzw. Stamm 13-90). Die Durchschnittsgeschwindigkeit wurde für eine zufällige Auswahl von Zellen über eine Schwimmdistanz von mindestens 100 µm, oder aber über eine Zeit von mindestens 100 Sekunden berechnet (n= 21, 118, 36 v.l.n.r). Die Balken zeigen die Mittelwerte der Population und die Fehlerbalken geben den Bereich ± 95% CI an. Die transgene Zelllinie (BSF 13-90) war im Schnitt weniger motil als der Wildtyp (BSF wt).

Durchführung: Für die Untersuchung wurden die beiden Zelllinien 13-90 (BSF) und 29-13 (PCF) verglichen. Das dabei verwendete Medium war TDB (trypanosoma dilution buffer), um eine direkte Vergleichbarkeit zu gewährleisten, denn in TDB lassen sich sowohl die PCF als auch die BSF über mindestens mehrere Stunden halten, ohne beobachtete Verminderung der Vitalität. Der Puffer unterscheidet sich in der Viskosität nicht nennenswert von Wasser, enthält jedoch Glucose, damit die Zellen nicht durch eine Depletion von ATP immotil werden.

Analyse / Interpretation: Dies unterstreicht erneut die Bedeutung der Mikroumwelt für die effektive Motilität der Trypanosomen. Die BSF sind an ein hochviskoses Medium angepasst und zeigen daher unkoordiniertes Taumeln in nieder-viskosem Medium. Die Insektenformen besitzen dagegen ein Bewegungsmuster, das offenbar besser mit einer geringen äußeren Viskosität zurecht kommt.

5.7.8 Der Einfluss der Temperatur auf das Schwimmverhalten

Ergebnis: Bei einer Abkühlung von 37 °C auf 22 °C zeigten die Experimente für Blutstromformen eine Verringerung der durchschnittlichen Populationsgeschwindigkeit von 5,6 µm s⁻¹ auf 3,6 µm s⁻¹ (Abb. 38). Die durch Holographie ermittelte mittlere Populationsgeschwindigkeit bei 37°C war dabei konsistent zu dem, durch automatisierte Mikroskopie ermittelten Wert von 5,7 ± 0,11 µm s⁻¹ (n=979, ± SEM; Abb. 12).

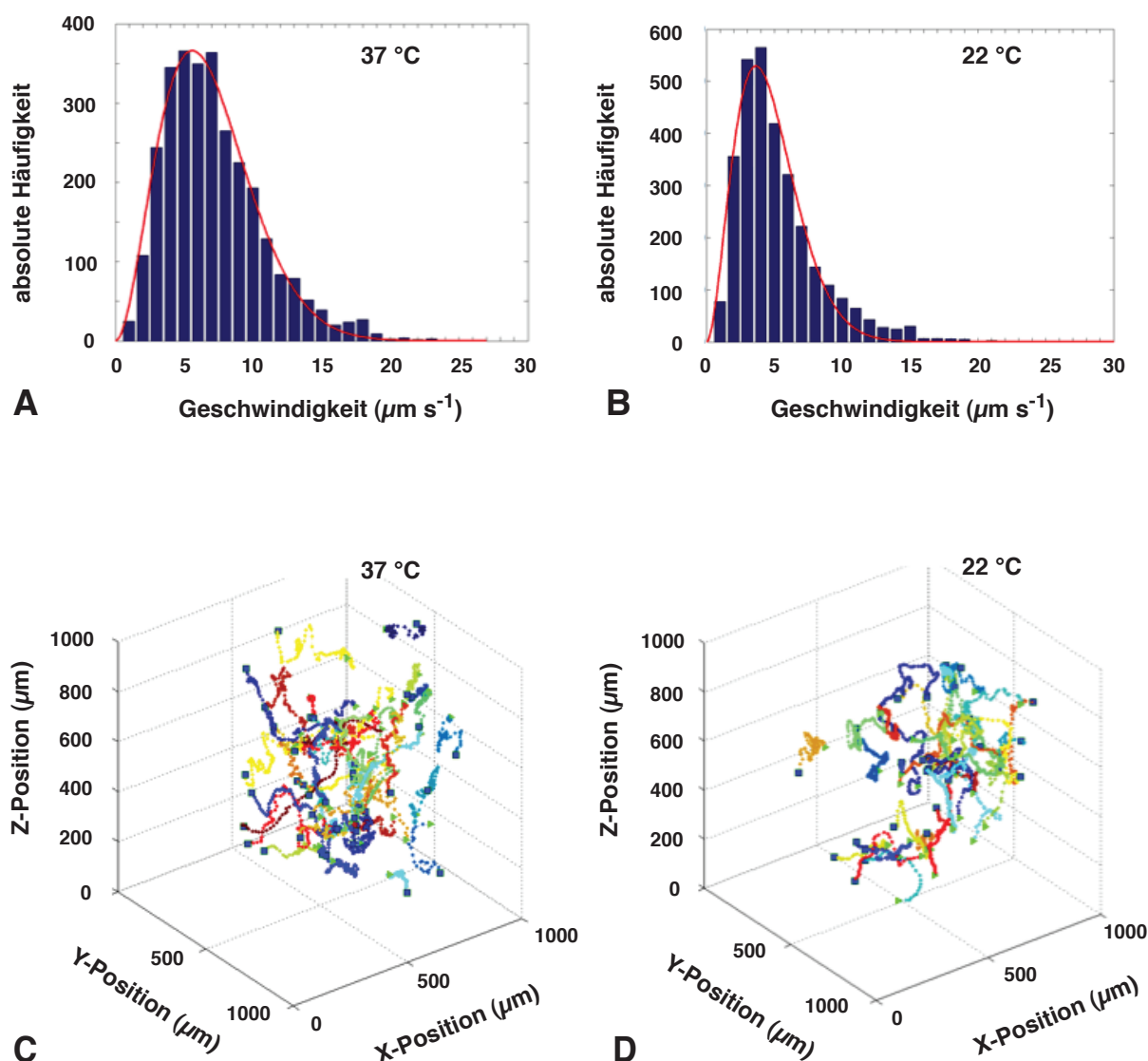


Abb. 38 | Die mittlere Geschwindigkeit von BSF Trypanosomen ist bei 37 °C, was der physiologischen Temperatur entspricht, höher als bei 22 °C. A Die mittlere Geschwindigkeit von *T. brucei* BSF betrug 5,6 $\mu\text{m s}^{-1}$ bei 37 °C. **B** Bei 22 °C war diese verringert auf 3,6 $\mu\text{m s}^{-1}$. Die zugehörigen Trajektorien im dreidimensionalen Raum sind in **C** für 37 °C bzw. in **D** für 22 °C dargestellt. (Auswertung durch Sebastian Weiße; die Experimente wurden gemeinsam geplant und durchgeführt).

5.7.9 Untersuchung der Motilität in Kollagennetzwerken

In vivo befinden sich die Trypanosomen auch ausserhalb des Blutkreislaufes in einer komplexen Umwelt im Gewebeszwischenraum. Dort sind sie umgeben von der extrazellulären Matrix (ECM), die ein dichtes Netzwerk darstellt. Deren Hauptbestandteil ist Kollagen, dessen Konzentration jedoch über den Säugerkörper stark variiert. Die extrazelluläre Matrix ist das verbindende Element, dass einzelne Gewebe zusammenhält und stellt eine Barriere für alle Zellen dar, die durch den Körper migrieren. Um den Einfluss dieses Netzwerkes auf die Motilität der Trypanosomen zu untersuchen, wurden lebende Trypanosomen in, sich ausbildende, Kollagennetzwerke eingeschlossen. Dabei wurde

ausgenutzt, dass Kollagen im Sauren als Monomer vorliegt und sich bei neutralem pH-Wert (nach Zugabe von NaOH) zu größeren Fasern zusammenlagert. Kollagen, als ein sehr wichtiger und abundanter Bestandteil der extrazellulären Matrix, dient hier als *in vitro* Modell für die Motilität der Trypanosomen im Gewebezwischenraum.

Ergebnis: Zwischen zwei Deckgläsern wurde ein Kollagennetzwerk ausgebildet. Die Schichtdicke der sich ausbildenden Kollagenmatrix lag dabei unter 10 μm . Wie die Videomikroskopie zeigte, waren die Zellen in der Lage, sich auch im Kollagennetzwerk noch fortzubewegen (s. Begleitmaterial). Dabei wurde die Verformungsarbeit ersichtlich, die die Zellen an den Kollagenbündeln verrichten. Die Zellen, die sich mit dem Flagellum voran ihren Weg durch das Kollagennetzwerk bahnen, stellen ein vereinfachtes Modell für diejenigen Trypanosomen dar, die den Blutkreislauf verlassen haben und sich durch den extrazellulären Raum bewegen. Dichtere Bereiche des Netzwerkes stellten dabei kein Hindernis dar. Im Gegenteil, waren die Trypanosomen gerade in den dichteren Bereichen in der Lage, sich entlang der Kollagenbündel gerichtet fortzubewegen. Kollagen in einer finalen Konzentration von 10 ng / ml führte dazu, dass die meisten Zellen gerichtet schwammen, mit einer Geschwindigkeit von bis zu 23 $\mu\text{m s}^{-1}$, was eine leichte Erhöhung gegenüber Medium ohne Kollagen bedeutet (ca. 20 $\mu\text{m s}^{-1}$).



Abb. 39 | Mikroskopische Analyse der Bewegung von BSF Trypanosomen in Kollagennetzwerken. Größenbalken: 10 μm

Konsistent mit den bisherigen Effekten von “Hindernissen” auf die Motilität von Trypanosomen, zeigte sich, dass schnelles und gerichtetes Schwimmen mit höherer Frequenz in lokalen Bereichen höherer Netzwerkdicke auftrat. Zudem zeigte sich auch auf Einzelzellebene ein Übergang von Taumeln hin zu gerichtetem Schwimmen, wenn Trypanosomen aus Bereichen geringerer Dichte in solche mit höherer Dichte gerieten. Allerdings steckten einzelne Zellen auch fest, in sehr dichten Bereichen mit einer Maschengröße von deutlich weniger als dem Zelldurchmesser. Die Trypanosomen bewegten sich oft in selbst geschaffenen Kanälen durch dieses Netzwerk, wobei ein Wechsel der Schwimmrichtung zu beobachten war, d. h. zum Teil mit dem Flagellum voran, aber auch mit dem Flagellum hinterherziehend. Diese vor- und zurück Bewegung resultierte daher in der Summe nicht in einer Netto-Fortbewegung. Ein ähnliches Verhalten ist auch für *Plasmodium* in Hautgewebe *in vivo* beschrieben worden (Amino *et al.*, 2005).

Analyse / Interpretation: Die feste Kollagenmatrix könnte als Widerstand dienen, gegen das das Flagellum Kraft ausüben kann um eine effizientere Fortbewegung zu erreichen als in nieder-viskosem Standardzellkulturmedium. Von ihrer gesamten Korkenzieher-förmigen Anatomie her scheinen sie perfekt an diese Umgebung angepasst zu sein. Da die Elastizität von Kollagenbündeln bekannt ist, könnte in einem homogenen Kollagennetzwerk, sogar anhand der Verformung des Kollagens durch das schlagende Flagellum die dabei aufgebrauchte Kraft ermittelt werden. Leider waren die ausgebildeten Kollagennetzwerke jedoch sehr heterogen, wie die mikroskopische Untersuchung zeigte. Durch Verwendung von Fluoreszenzmarkiertem Kollagen (FITC-gekoppelt, Sigma), konnten die einzelnen Kollagenfasern im Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden, obwohl die Faserdicke zum Teil unterhalb der optischen Auflösungsgrenze lag und damit mit Durchlichtmikroskopie nicht zu erkennen ist. Dabei zeigte sich, dass das Kollagennetzwerk lokal stark in der Dichte und Maschenweite der einzelnen Kollagenfasern variierte.

5.7.10 Untersuchung der Bewegung in Anordnungen von Mikrostrukturen

Suspensionen von Partikeln sollten viskose Fluide ergeben, die sich ähnlich wie Blut verhalten. In der Tat war darin eine gesteigerte Motilität der Zellen festzustellen. Es wurden unterschiedliche Arten von Partikeln verwendet, die sich in Größe (1-10 μm), Form und Dichte unterschieden (Dynabeads, Microspheres, Nanodiamonds und isolierte, fixierte Erythrozyten). Dennoch macht bei all diesen die Heterogenität und Selbstdurchmischung eine Quantifizierung nach wie vor schwierig. Deshalb wurde zu einem vereinfachten Modellsystem übergegangen, bei dem die einzelnen Partikel in einer festen und regelmäßigen räumlichen Anordnung vorliegen. Die Motilität der Trypanosomen wurde gemessen in Wäldern aus gleichmäßig angeordneten Säulen (Pillars) aus Poly-Dimethylsiloxan (PDMS), um die mechanische Interaktion mit den Erythrozyten im Blut zu simulieren. Abstände, Durchmesser und Form der Pillars können nach Belieben festgelegt werden, da die Pillarwälder aus Matrizen gegossen werden, die mittels Photolithographie hergestellt wurden. Die Photolithographie ist ein Verfahren aus der Halbleitertechnik, mit der aus lichtsensitiven Werkstoffen eine Form exakt nach einem Konstruktionsentwurf hergestellt werden kann.

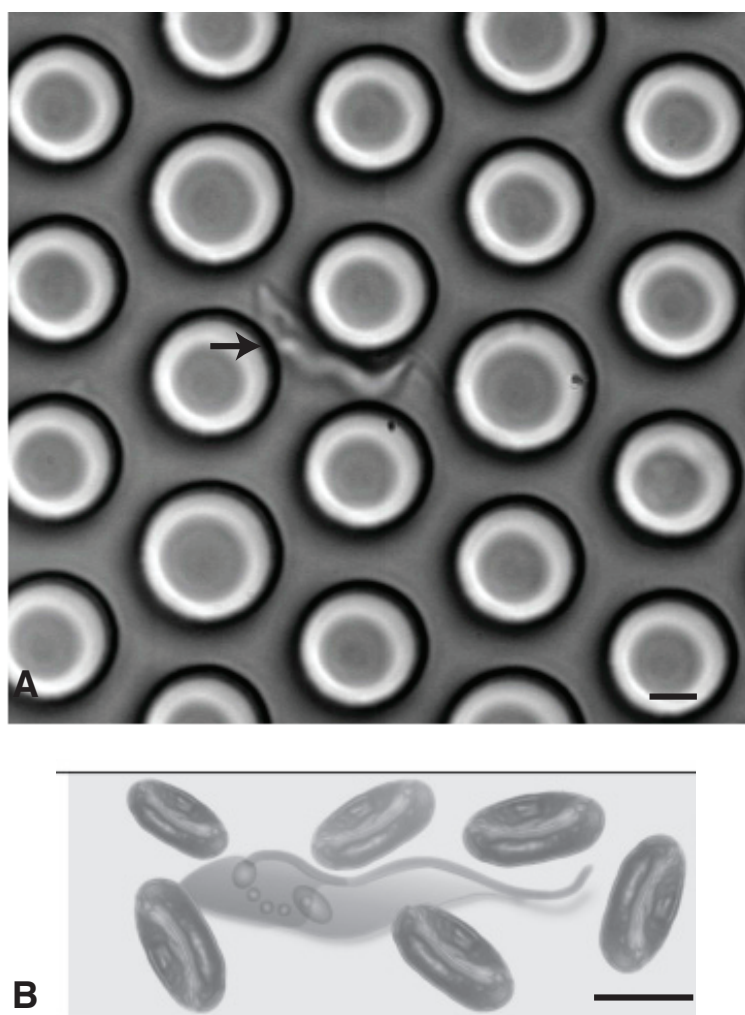


Abb. 40 | Durchlichtaufnahme eines Trypanosoms in einem Pillarwald, welcher die physikalischen Verhältnisse im Blut imitiert. A Ein Pillarwald bestehend aus photolithographisch hergestellten, zylindrischen Mikrostrukturen mit wenigen Mikrometern Durchmesser, in dem die Bewegung von Trypanosomen untersucht wurde. Ein Trypanosom, das sich in dem Pillarwald bewegt, ist durch einen Pfeil markiert. **B** Durch die Mikrostrukturen wird die Interaktion mit Erythrozyten nachgestellt. Allerdings können räumliche Anordnung und Durchmesser der künstlichen Mikrostrukturen (**A**) nach Belieben variiert werden, welche daher bestens geeignet sind für systematische Untersuchungen. Größenbalken: 5 μm

Ergebnis: In Pillarwäldern war der Anteil an persistent schwimmenden Zellen, sowie die durchschnittliche wie maximale Schwimmgeschwindigkeit erhöht, verglichen mit den selben Zellen ausserhalb der Pillarwälder (Abb. 41). Etwa 90% der Trypanosomen schwammen schnell und gerichtet, wenn sie mit Pillars interagierten, deren Durchmesser (8 μm) und mittlerer Abstand (4 μm) der durchschnittlichen Anordnung der Erythrozyten in Blut entspricht. Die gemessene Maximalgeschwindigkeit der BSF Trypanosomen lag in diesen Pillarwäldern bei knapp 40 $\mu\text{m s}^{-1}$, was doppelt so schnell ist, wie die Maximalgeschwindigkeit in Zellkulturmedium alleine. Auch die Durchschnittsgeschwindigkeit gerichtet schwimmender Zellen war mit $29,8 \pm 8,8 \mu\text{m s}^{-1}$ deutlich erhöht. Bei einem größeren Pillarabstand von 20 μm lag die Durchschnittsgeschwindigkeit der Trypanosomen mit 6,8 $\mu\text{m s}^{-1}$ dagegen nur knapp über

der ohne Pillars ($5,7 \mu\text{m s}^{-1}$). Zellen, die schnell und gerichtet ausserhalb der Pillars schwammen, wurden nach Eintritt in den Pillarwald sogar "aus dem Tritt gebracht" und auf eine Geschwindigkeit unter $10 \mu\text{m s}^{-1}$ abgebremst. Bei einem Abstand von $3 \mu\text{m}$ dagegen konnten die Zellen quasi nicht mehr anders, als sich an den Pillars entlang fortzubewegen, solange das Flagellum in einer koordinierten Wellenbewegung schlug.

Bei der Hochgeschwindigkeitsmikroskopie (bis 1.000 fps) zeigte sich, dass die schnell und gerichtet schwimmenden Zellen ein Bewegungsmuster aufweisen, dass genau an die Abstände zwischen den einzelnen Pillars angepasst ist. Der Zellkörper beschreibt eine helikale Bewegung in Schwimmrichtung. Die Geschwindigkeit der Zelle war dann maximal, wenn deren Bewegungsmuster exakt zu den Abständen zwischen den dicht stehenden Pillars passte. Dies war bei Pillars mit nur wenigen Mikrometern Abstand der Fall, was der Situation in Blut ähnelt. Diese Zellen hatten einen planaren Zugschlag der freien anterioren Flagellarspitze mit 16 - 19 Hz Schlagfrequenz. Die freie Flagellarspitze schlug dabei mit einer Amplitude von $3,3 \pm 0,7 \mu\text{m}$. Die Amplitude ist definiert als die maximale Auslenkung relativ zur Mittelposition. Dadurch kann die Zelle mit Objekten interagieren, die nur wenige Mikrometer entfernt sind. Für diese Experimente wurden verschiedene Pillarwälder verwendet, die sich durch den Pillarabstand unterschieden ($3 - 10 \mu\text{m}$). Nicht nur die Flagellarspitze, sondern der ganze Zellkörper verbog sich mit vergleichbarer Amplitude ($3,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$). Das selbe helikale Bewegungsmuster war auch in Abwesenheit der Pillars bei gerichtet schwimmenden Zellen in zu beobachten, allerdings war deren Geschwindigkeit ohne die Pillars nur etwa halb so schnell. Die Wellenlänge dieser helikalen Strukturen lag bei $8,6 \pm 0,8 \mu\text{m}$ und die Amplitude bei $3,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Diese Dimensionen entsprechen den Abständen von Erythrozyten bei physiologischen Bedingungen. Durch die Anwesenheit von Pillarwäldern mit eben diesen Dimensionen lassen sich Trypanosomen mechanisch in dieses besonders effiziente Bewegungsmuster zwingen, was zu gerichtetem Schwimmen führt.

Medium	Maximalgeschwindigkeit ($\mu\text{m s}^{-1}$)
HMI-9 *	21
HMI-9 + Kollagen (0,01 mg/ml)	23
HMI-9 + Methylcellulose (0,5 % w/v)	32
HMI-9 + Pillarwälder	39
Rinderblut	35

Tabelle 5 | Experimentell gemessene Maximalgeschwindigkeit von *T. brucei brucei* Blutstromformen (BSF) in unterschiedlichen Medien. Die Geschwindigkeit während einzelner Phasen des gerichteten Schwimmens wurde dabei jeweils über eine zurückgelegte Distanz von mehr als $100 \mu\text{m}$ gemessen. Die jeweils maximale Geschwindigkeit in dem entsprechenden Medium ist gezeigt. * HMI-9 ist das Standardmedium für die Kultivierung von BSF Trypanosomen.

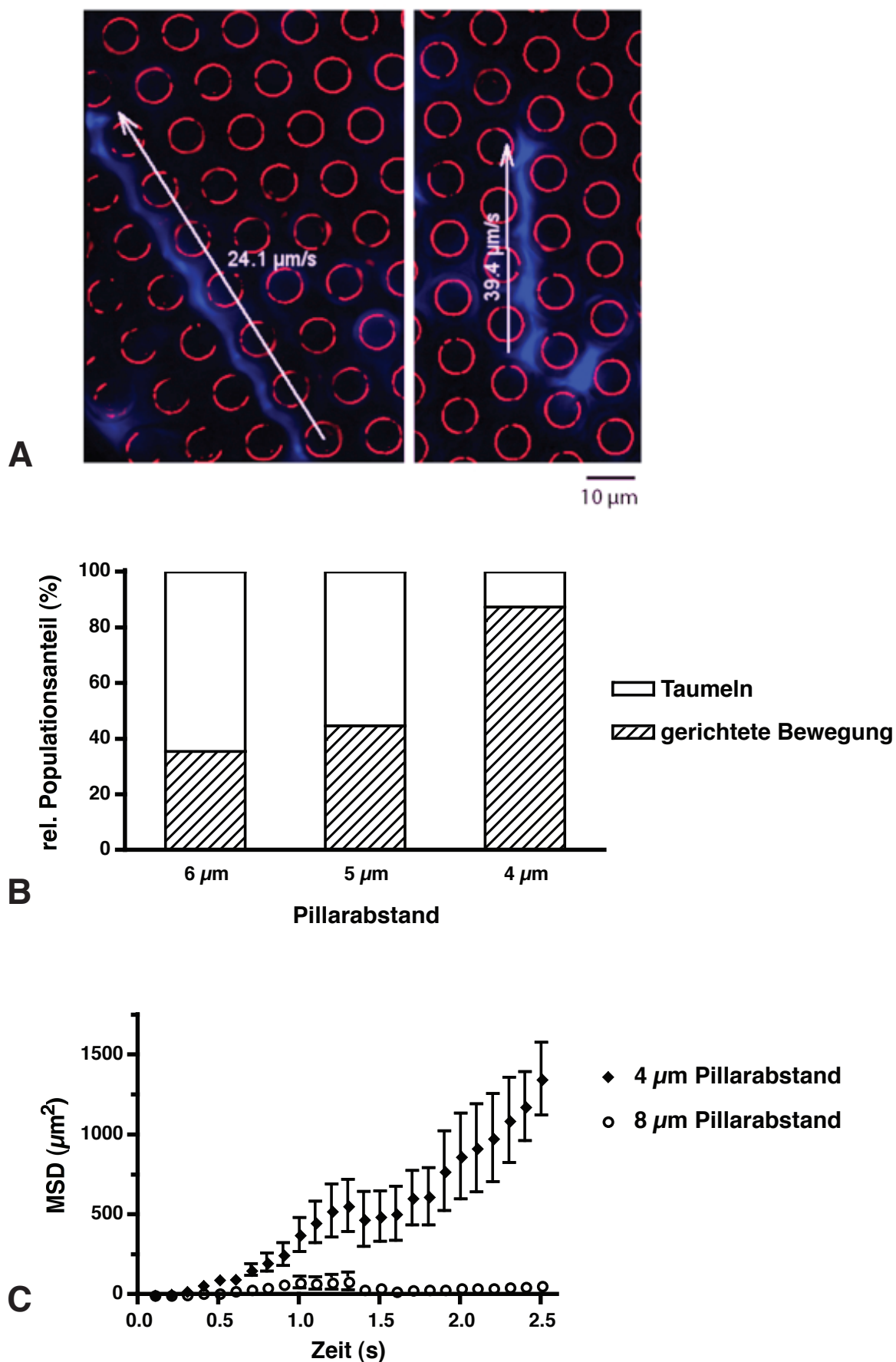


Abb. 41 | Pillarwälder mit regelmäßiger Anordnung unterstützen die schnelle und gerichtete Bewegung von BSF Trypanosomen. **A** Die Abbildung zeigt die Bewegungsmuster von fluoreszenzmarkierten Trypanosomen (blau) in Pillarwäldern (rot).

Die gemessene Maximalgeschwindigkeit lag bei knapp $40 \mu\text{m s}^{-1}$, was einer Verdopplung gegenüber Standardzellkulturmedium entspricht. **B** Analyse der Motilität von BSF Trypanosomen in Pillarwäldern mit unterschiedlichem Pillarabstand. Jede einzelne Zelle wurde gemäß ihrem Bewegungsmuster entweder als gerichtet schwimmende oder taumelnde Zelle klassifiziert und daraus wurde die relative Häufigkeitsverteilung für 150 Zellen ermittelt. Es wurden nur diejenigen Zellen in der Analyse berücksichtigt, die sich in der Fokusebene des Pillarwaldes bewegten. Der Anteil an gerichteter Bewegung war bei einem Pillarabstand von $4 \mu\text{m}$ deutlich höher als bei größerem Pillarabstand. **C** Die mittlere quadrierte Distanz vom Startpunkt (MSD, "mean squared displacement") ist gegen die Zeit aufgetragen. Der Anteil direktonaler Bewegung der BSF Trypanosomen war in engen Pillarwäldern ($4 \mu\text{m}$ Pillarabstand) erhöht gegenüber einem größeren Pillarabstand ($8 \mu\text{m}$). Es sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) aufgetragen für jeweils 12 zufällig ausgewählte Zellen.

Analyse / Interpretation: Daraus ist zu folgern, dass Objekte, die den Abmessungen und der Konzentration von Erythrozyten in Vollblut ähneln, notwendig und ausreichend sind, um die maximale Schwimmgeschwindigkeit der BSF Trypanosomen zu bewirken. Dies zeigt, dass der Modus der Motilität der Trypanosomen an die physiko-mechanischen und nicht die molekular-chemischen Eigenschaften des Blutes adaptiert ist. So kann man sich auch die Beobachtung erklären, warum Wälder mit größerem Pillarabstand ($6\text{-}8 \mu\text{m}$) kaum positiven Einfluss auf die Schwimmgeschwindigkeit hatten. Da Trägheit im Bereich der kleinen Reynoldszahlen praktisch keine Rolle spielt, müssen die Zellen kontinuierlichen Kontakt zu einer festen Matrix haben, um sich effizient daran entlang zu bewegen.

Pillars mit dem richtigen Durchmesser und Abstand bieten der Zelle eine feste Matrix, gegen die sie Kraft ausüben kann, was eine effizientere Fortbewegung ermöglicht. Dabei muss das Trypanosom für eine effiziente Fortbewegung abwechselnd mit Pillars auf gegenüberliegenden Seiten der Zelle Kontakt haben. Dies wird durch die Rotation des Zellkörpers während dem gerichteten Schwimmen ermöglicht. Dies verdeutlicht die Adaptation der BSF Trypanosomen an die ständige Gegenwart von Erythrozyten. In Pillarwäldern mit einem Pillarabstand von $6 \mu\text{m}$ war die Schwimmgeschwindigkeit der Trypanosomen im Vergleich zu einem Abstand von $3\text{-}4 \mu\text{m}$ deutlich verringert (Abb. 41), genau wie bei dem Vergleich von verdünntem mit unverdünntem Blut. Dies zeigt, dass es einen idealen Abstand der Zellen in Hinsicht auf maximale Motilität gibt. Zudem zeigte sich, in direkt aneinander angrenzenden Pillarwäldern mit unterschiedlichem Pillarabstand, dass die gerichtet schwimmenden Zellen "aus dem Tritt geraten" und beginnen zu Taumeln, wenn sie plötzlich in einen Pillarwald mit größerem Pillarabstand (z.B. von 4 auf $8 \mu\text{m}$) gerieten. Dies war auch der Fall bei regelmäßig angeordneten Pillarwäldern mit vereinzelt eingestreuten "Lichtungen", wenn gerichtet schwimmende Trypanosomen in eine dieser Lichtungen gerieten. Dies zeigt, dass das Bewegungsmuster von der Architektur der Trypanosomenzelle vorgegeben ist, also genetisch fixiert ist und die Mikroumgebung die Schwimmgeschwindigkeit bestimmt.

Fazit: Hier konnte durch die Verwendung von geordneten Mikrostrukturen (Pillarwälder) mit unterschiedlichem Pillarabstand erstmalig eine Adaptation des Modus der Bewegung von

Trypanosomen an ihre Mikroumwelt, auf Basis einer reinen biomechanischen Interaktion gezeigt werden.

5.7.11 Ausschluss der Trypanosomen aus dichten Pillarwäldern

Ergebnis / Beobachtung: Die verwendeten PDMS-Pillars stellen, im Gegensatz zu Beads oder Erythrozyten ein relativ starres Hindernis dar, das die Trypanosomen nicht zur Seite schieben können. Mit geringer werdendem Pillarabstand waren immer weniger Trypanosomen in den jeweiligen Pillarwäldern zu finden (Abb. 42). Nichtsdestotrotz waren einzelne Zellen aufgrund ihrer aktiven Bewegung in der Lage, selbst noch in Nischen einzudringen, die nicht breiter als ihr Zelldurchmesser waren.

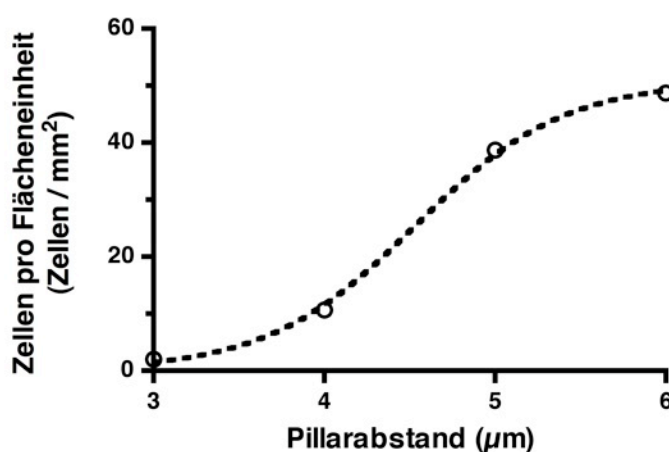


Abb. 42 | Mit abnehmendem Pillarabstand finden sich zunehmend weniger Trypanosomen innerhalb des Pillarwaldes. Aufgetragen ist die Anzahl an Trypanosomen (Y-Achse) in Flächen gleicher Größe gegen den Pillarabstand (X-Achse). Die experimentell gemessene Verteilung ist durch eine nicht-lineare sigmoide „dose-response“ Kurve approximiert.

Analyse / Interpretation: Den geringen Anteil an Zellen in dicht gestaffelten Pillarwäldern könnte man ausser durch einen rein sterischen Ausschluss auch damit erklären, dass die, bei kleinerem Pillarabstand gerichtet schwimmenden Zellen die, nach allen Seiten hin offenen Pillarwälder schneller wieder verlassen.

5.7.12 Die Mikroumwelt bestimmt die Schwimmrichtung

Ergebnis: Innerhalb der Pillarwälder war auch eine rückwärts gerichtete Schwimmbewegung zu beobachten, die ausserhalb der Pillarwälder nicht auftrat und für Wildtyp Trypanosomen in der Literatur noch nicht berichtet wurde. Die biomechanische Grundlage dafür war, wie hier durch Hochgeschwindigkeits-Videomikroskopie ermittelt

wurde, eine Umkehr der Schagrichtung. Die Flagellarwellen gingen in den rückwärts schwimmenden Zellen von der Seite des Basalkörpers aus und breiteten sich entlang der gesamten Zelle in Richtung der anterioren Flagellarspitze aus. Die Undulation lief also von posterior nach anterior. Dieses abnorme Schwimmverhalten war auch in Kollagenetzwerken und Gelatinegelen zu beobachten. Auch in Vollblut schwammen etwa 10% der Zellen in die umgekehrte Richtung. Dies wies auf einen Einfluß der Umwelt auf das Schwimmverhalten von Blutstromform Trypanosomen hin. Um die Rolle der Umwelt systematisch zu untersuchen, wurden unterschiedliche Pillarwälder verwendet, die sich in dem Abstand zwischen den einzelnen Pillars unterschieden. Der Anteil an Zellen mit reverser Schwimmrichtung hing von dem Pillarabstand ab (Abb. 43). Auch die rückwärts schwimmenden Zellen waren in der Lage sich direktional von Pillar zu Pillar fortzubewegen. Allerdings war die Geschwindigkeit der Fortbewegung rückwärts schwimmender Trypanosomen in allen Fällen deutlich langsamer. Dies galt sowohl für Pillarwälder als auch für Kollagenetzwerke. Dies ist auch konsistent mit der geringeren gemessenen Frequenz des Flagellarschlages bei rückwärts schwimmenden Zellen ($3,1 \pm 0,8$ Hz), bei denen die Flagellarwelle von posterior nach anterior lief, im Vergleich zu den vorwärts schwimmenden Zellen mit einer Flagellarwelle von anterior nach posterior ($18,3 \pm 2,5$ Hz).

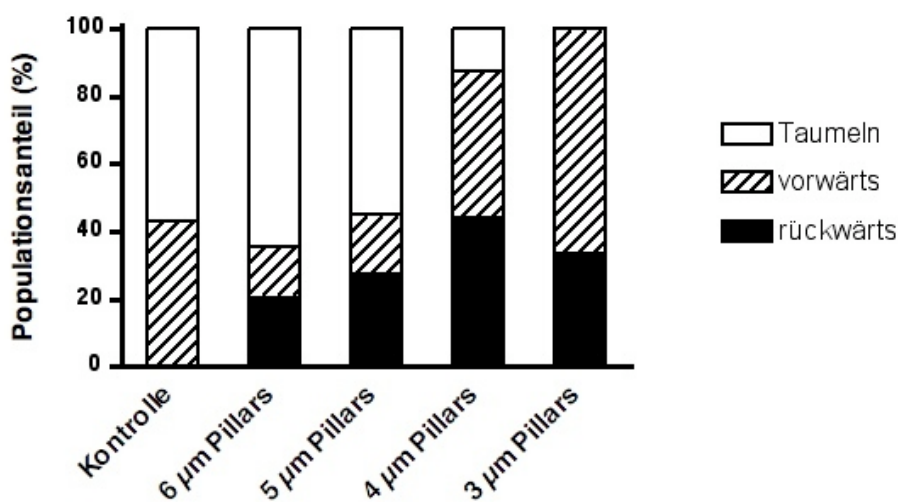


Abb. 43 | Umkehr der Schwimmrichtung in Abhängigkeit von der Mikroumgebung.

Dargestellt sind Häufigkeitsverteilungen der Bewegungsmuster von Blutstromform Trypanosomen in Pillarwäldern mit unterschiedlichem Pillarabstand. Die Zellen (n=150) wurden jeweils in eine von drei Gruppen eingeteilt: i) vorwärts schwimmend (mit dem Flagellum voran), ii) rückwärts schwimmend (das Flagellum wird nachgezogen), iii) taumelnd (die Zelle bewegt sich nicht direktional). Innerhalb der Pillarwälder traten rückwärts schwimmende Zellen auf, was in der Kontrolle (die selben Zellen, aber ohne Pillars) nicht der Fall war.

	tip-to-base	base-to-tip
Bewegungsmuster	vorwärts ¹⁾	Taumeln / rückwärts
Wellenlänge ²⁾	3 - 4 μm	4 - 5 μm
Amplitude ³⁾	0,53 \pm 0,08 μm (n=34)	0,83 \pm 0,07 μm (n=11)
Frequenz ⁴⁾	18,3 \pm 2,5 Hz (n=60)	3,1 \pm 0,8 Hz (n=58)

Tabelle 6 | Eigenschaften des Flagellarschlages von *T. brucei brucei* (BSF) in Abhängigkeit von der Flagellarschlagrichtung. Die beiden möglichen Richtungen des Flagellarschlages sind tip-to-base (Flagellarwelle verläuft von anterior nach posterior) und base-to-tip (von posterior nach anterior). Für die einzelnen Messungen wurde jeweils die Zelllinie MITat 1.6 Wildtyp verwendet. ¹⁾ vorwärts gerichtet, mit Flagellum voran, ²⁾ Wellenlänge des Flagellarschlages, ³⁾ Amplitude des angehefteten Flagellums, ⁴⁾ Flagellarschlagfrequenz

Analyse / Interpretation: Eine Umkehrung des Flagellarschlages trat auch in normalem Zellkulturmedium auf, führte hier jedoch nicht zu einer effektiven Fortbewegung, sondern zu einer Taumelbewegung. Durch die damit verbundene Umorientierung kann die Zelle den Winkel ändern, in dem sie nach Rückkehr zu dem normalen Vorwärtsschlag des Flagellums weiter schwimmt. Hier wurde gezeigt, dass das Rückwärtsschwimmen die mechanische Interaktion mit einer festen Matrix benötigt.

Was aber geschieht direkt vor der Umkehr der Flagellarschlagrichtung? Die Hochgeschwindigkeitsaufnahmen konnten aufdecken, dass dieser Wechsel nicht nahtlos vollzogen wird, sondern das Flagellum mehrere unkoordinierte Zwischenschläge vollführt, bevor sich die neue Schlagrichtung auf der gesamten Länge des Flagellums durchsetzt. So war bei einzelnen Zellen bei einer zeitlichen Auflösung von 1.000 Hz in Super-Zeitlupe zu sehen, dass die schwimmende Zelle stoppt, wenn sie vom Vorwärtsschlag umschaltet "in den Rückwärtsgang" und dann wieder beginnt weiter zu schwimmen, nachdem sie erneut zum Vorwärtsschlag zurückgekehrt ist. Bei zufälligem Kontakt zu einem Hindernis, wie einem Pillar oder anderen Zellen, wurde die Kontinuität des Flagellarschlages unterbrochen und damit auch die Phase des gerichteten Schwimmens.

5.7.13 Direktionale Bewegung in engen Mikrokanälen

Im Blutsystem sind Erythrozyten nicht die einzigen Hindernisse, auf die Trypanosomen treffen. Auch die Wände der Blutgefäße stellen eine Barriere und feste Matrix dar. Im vorausgehenden Kapitel wurde bereits darauf eingegangen, dass der Abstand zwischen den einzelnen Pillars, zwischen denen für die Zelle eine Art Mikrokanal gebildet wird, einen großen Einfluss auf die Motilität der Trypanosomen hat. Mit dieser Matrix können die

Zellen bei der Bewegung interagieren und so eine stärker direktionale Bewegung erreichen. Einen ähnlichen Einfluss könnte auch die räumliche Begrenzung in Kapillaren haben.

Ergebnis: In dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche, für die Zellkultur geeignete und transparente Kanäle (ibidi, München) für die Mikroskopie lebender Trypanosomen verwendet, welche den Trypanosomen genug Platz für eine uneingeschränkte Bewegung lassen. Ein Vergleich der Durchschnittsgeschwindigkeit von Populationen zwischen Deckglas und Objektträger (5-10 μm Abstand) mit den 800 μm hohen Kanälen zeigte jedoch keinen eindeutigen Unterschied. Bei beiden lag die Durchschnittsgeschwindigkeit unter $6 \mu\text{m s}^{-1}$ ($n=131$, bzw. 140 Zellen der Linie 13-90). Um die räumliche Begrenzung der kleineren Blutkapillaren ($\leq 20 \mu\text{m}$) zu imitieren, wurden Mikrokanäle mit unterschiedlichen Kanaldurchmessern photolithographisch hergestellt, da es hierfür noch keine kommerziell erhältliche Alternative gibt. Dies geschah in interdisziplinärer Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Strömungsphysik in Göttingen. In diesen Kanälen war zwar die Direktionalität der Zellen erhöht, da diese sich zwangsläufig entlang der Richtung des Mikrokanals bewegten, die Schwimmgeschwindigkeit lag aber ebenfalls bei ca. $6 \mu\text{m s}^{-1}$ (13-90 Zellen). Im Experiment konnte zudem gezeigt werden, dass Trypanosomen in der Lage waren, selbst in nur 1 μm schmale Mikrokanäle aktiv einzudringen. Dies ist höchst bemerkenswert, da der Zellkörper selbst breiter ist. Dies zeigt, dass ihr Zytoskelett sehr flexibel sein muss, sonst würden die Zellen dabei zerstört werden. Zudem konnten sich die Trypanosomen selbst in Kanälen noch umdrehen, die kaum breiter waren als die Zellen selbst. Diese Umkehr der Zellachse war kein seltenes Ereignis, sondern wurde in den Mikrokanälen häufig beobachtet (s. Video im Begleitmaterial).

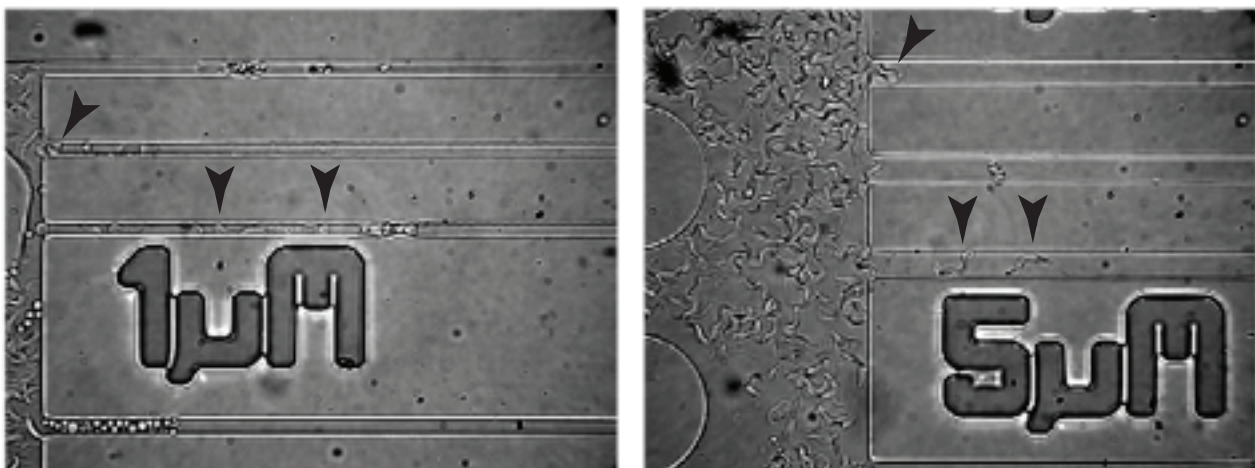


Abb. 44 | Trypanosomen sind in der Lage in Mikrokanäle einzudringen, die nicht breiter sind, als die Zellen selbst. Gezeigt sind PDMS-Mikrokanäle mit 1 μm Durchmesser (linke Seite), bzw. mit 5 μm Durchmesser (rechte Seite). BSF Trypanosomen waren in der Lage in beide aktiv einzuwandern (Pfeile).

Normiert auf die Verteilung von unbeweglichen Objekten (Partikel mit 1 μm Durchmesser) befanden sich mehr als 75% der Trypanosomen im Randbereich eines 40 μm breiten Mikrokanals. Der größte Teil der Zellen stand dabei über die Spitze des Flagellums in häufigem Kontakt mit der Kanalwand.

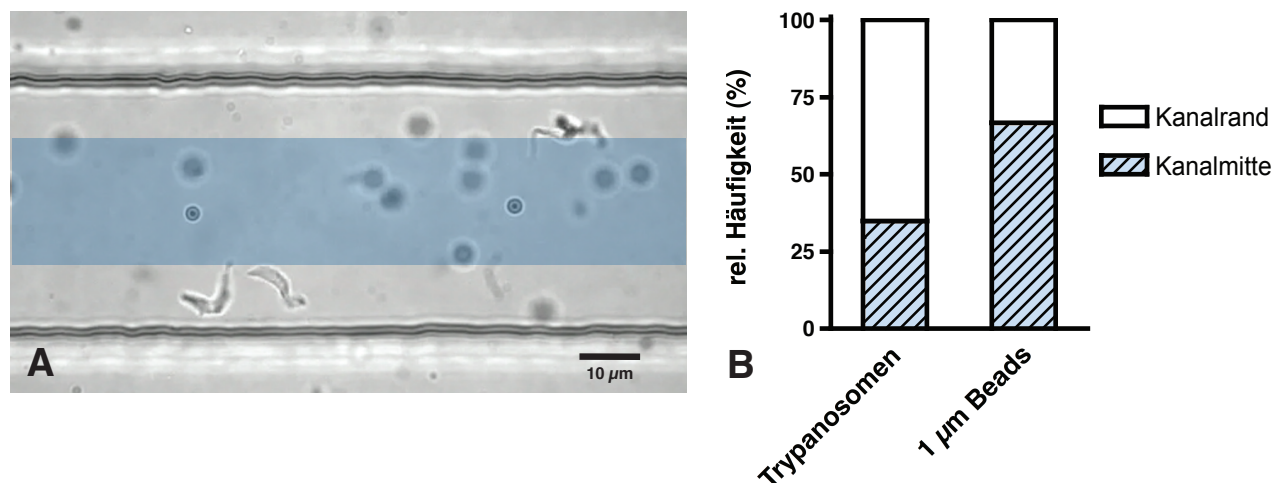


Abb. 45 | Die Mehrzahl der Trypanosomen befinden sich in den Randbereichen eines Kanals, ohne angelegten hydrodynamischen Fluss. **A** zeigt einen mikroskopischen Ausschnitt aus einem 40 μm breiten Mikrokanal, in den eine Suspension aus lebenden Trypanosomen und 1 μm durchmessenden Polystyren-Beads injiziert wurde. In **B** ist die Quantifizierung der Verteilung von Trypanosomen in der mittleren Hälfte des Kanals (der Bereich $\pm 10 \mu\text{m}$ um die Kanalmitte) und den restlichen Randbereichen des Kanals zu sehen, normiert auf die Verteilung der nicht aktiv beweglichen Kügelchen. 78,8 % der Trypanosomen waren in den Randbereichen, welche zusammen genau wie der mittlere Bereich jeweils 50% des Kanalinnenvolumens ausmachen ($n=20$ Trypanosomen und 42 Beads).

Durchführung: Um den Einfluss der Kanalbreite zu testen, wurden mikrofluidische PDMS-Kanäle hergestellt, die viele parallel laufende Mikrokanäle enthielten, jedoch in der Kanalbreite variierten (entworfen von E. Stellamanns und S. Uppaluri). Die Breite der einzelnen parallelen Mikrokanäle unterschied sich jeweils immer um nur einen Mikrometer, beginnend bei 1 bis 20 μm . Dieser Bereich erschien sinnvoll, da die Blutstromformen von *T. brucei* eine Zelllänge von etwa 20 μm und eine Breite von etwa 2,5 μm haben. Unterhalb einer Kanalbreite von 20 μm können die Zellen daher beide Kanalwände gleichzeitig berühren. Alle parallelen Einzelkanäle waren mit dem gleichen Einfüllkanal und Reservoir verbunden und daher mit der gleichen Probe beladen und direkt vergleichbar. Da gerade die sehr schmalen Mikrokanäle häufig verstopfen, waren diese zudem mehrfach redundant vorhanden.

Um die Interaktion mit der Kanalwand näher zu charakterisieren, wurde ein ein 40 μm breiter PDMS-Mikrokanal verwendet, der breit genug war, damit die Trypanosomen nicht auf beiden Seiten gleichzeitig Wandkontakt herstellen können. Darin war unter dem Mikroskop zu erkennen, dass Trypanosomen, die an eine der beiden Kanalwände stießen, oft an der Kanalwand blieben oder sich an ihr entlang bewegten. Der 40 μm

breite Mikrokanal wurde in einen mittleren und einen Randbereiche eingeteilt. Dies war zum einen die Kanalmitte (mittlere 20 μm) und zum anderen die beiden Kanalränder (die Bereiche bis jeweils 10 μm vom Rand). Die einzelnen Bereiche sind farblich hervorgehoben in Abb. 45, die einen etwa 130 μm langen Ausschnitt des etwa 3 cm langen Mikrokanals zeigt. Da der Kanal einen rechteckigem Querschnitt hatte, schlossen der mittlere Bereich und die addierten Randbereiche äquivalente Volumina ein. In den Kanal wurde eine Trypanosomensuspension in Glucose-haltigem Puffer (TDB), dem auch 1 μm durchmessende Polystyren-Kügelchen beigemischt waren, gegeben. Die Kügelchen dienten als Referenz, um zum einen die Verteilung der sich aktiv bewegenden Trypanosomen in Relation zu passiven Objekten untersuchen zu können und zum anderen um Strömungen im Kanal zu messen. Als Folge von Kapillarkräften und Ausgleichsströmungen liegt in einem Mikrokanal fast immer ein leichter hydrodynamischer Fluss an. In diesem Fall betrug die Flussgeschwindigkeit in der Kanalmitte 6 $\mu\text{m s}^{-1}$, also weniger als die Schwimmgeschwindigkeit gerichtet schwimmender Trypanosomen.

Interpretation: Die Grenzflächeneffekte zwischen Objektträger und Deckglas konnten keine signifikante Steigerung der Direktionalität des Schwimmens bewirken. In einer Kapillare stehen der Zelle jedoch weniger Freiheitsgrade für die Bewegung offen, da die Zellen dort in zwei Achsen eingeengt werden, unter dem Deckglas dagegen nur in der Z-Achse. Durch die räumliche Eingrenzung können Mikrokanäle die Bewegung in eine bestimmte Richtung lenken. Da sich die Schwimmgeschwindigkeit dabei jedoch nicht erhöhte, wie in Pillarwäldern mit geeigneter Anordnung, handelt es sich dabei wohl eher um einen passiven, unspezifischen Effekt.

Trypanosomen reichern sich durch ihre aktive Bewegung an den Randbereichen eines Kanals an - zumindest bei langsamer Flussrate. Dies stellt einen ersten und nötigen Schritt bei Auswanderung aus den Blutgefäßen (Extravasation) dar. Bei Spermien und *E. coli* kennt man einen vergleichbaren Effekt, der bewirkt, dass sich diese ebenfalls an Oberflächen ansammeln (Fauci und McDonald, 1995; Lauga *et al.*, 2006). Geht man davon aus, dass die Zellen so lange in dieselbe Richtung schwimmen, bis sie auf ein Hindernis treffen und dann beginnen zu Taumeln, so sollte dies genau diese Akkumulation von motilen Zellen an Grenzflächen ergeben.

Die hier gemachte Beobachtung, dass Trypanosomen in Mikrokanäle von nur 1 μm Breite eindringen können, zeigt erstmalig einen Weg auf, wie Trypanosomen die Blutgefäße auch wieder verlassen können, um in das interstitielle Gewebe einzudringen. Denn der Abstand von einem Mikrometer entspricht der Breite der Intrazellularspalten in den peripheren Blutkapillaren.

5.8 Der Einfluss hydrodynamischer Effekte

5.8.1 Orientierung der Trypanosomen relativ zur Flussrichtung

Ergebnis: Die Änderung der Strömungsgeschwindigkeit (Δv) im Mikrokanal unter physiologischen Bedingungen beträgt mindestens $150 \mu\text{m s}^{-1}$ über eine Strecke von $10 \mu\text{m}$ entlang des Kanalquerschnittes (Abb. 46-B). Selbst über eine Strecke von 15 nm - dies entspricht der Größe eines Antikörpers - beträgt die Geschwindigkeitsdifferenz der laminaren Schichten immer noch ca. $0,23 \mu\text{m s}^{-1}$. Die Scherkräfte, die in der Nähe der Kanalwand besonders stark sind, versetzten die Trypanosomen in eine Rotationsbewegung. Die Rotation ist dabei immer in Richtung der Kanalmitte gerichtet, d. h. bei einer Strömung von rechts nach links rotierten alle Zellen in Nähe der oberen Kanalwand immer im Uhrzeigersinn und in Nähe der unteren Kanalwand dementsprechend entgegen dem Uhrzeigersinn (Abb. 46-A). Diese Beobachtung konnte sowohl für Trypanosomen als auch für die immotilen Erythrozyten gemacht werden. Darüber hinaus führen die selben hydrodynamischen Kräfte dazu, dass die asymmetrisch geformten Trypanosomen über die Zeit gemittelt, tendenziell parallel zur Strömungsrichtung ausgerichtet werden. So waren 65 % der Trypanosomen in Einzelaufnahmen mit ihrer anterior/posterior Körperachse parallel zur Strömungsrichtung ausgerichtet und nur 25 % der Zellen im rechten Winkel dazu (Abb. 47-B).

Durchführung: Das Strömungsprofil wurde mit PIV (particle image velocimetry) bestimmt. Dabei wird das Strömungsprofil durch die Zugabe kleiner Kügelchen (Beads) sichtbar gemacht, deren passive Bewegung in Bildsequenzen gemessen wird. Die physikalische Dichte der hier verwendeten Beads entsprach mit $1,05 \text{ g / cm}^3$ der des Mediums, um das Flussfeld möglichst wenig zu beeinflussen.

Interpretation: Eine Zelle, die sich in nicht-paralleler Orientierung im Kanal befindetet, bietet eine einseitige Angriffsfläche für Scherkräfte, welche die Zelle in Rotation versetzen. Mit steigender Konzentration an Erythrozyten war diese Orientierung der Trypanosomen jedoch stärker zufällig verteilt. Die Gründe hierfür sind zum einen die physische Interaktion mit den Blutzellen und zum anderen die Beeinflussung des hydrodynamischen Flusses in nicht-trivialer Weise durch den hohen Anteil an Zellen.

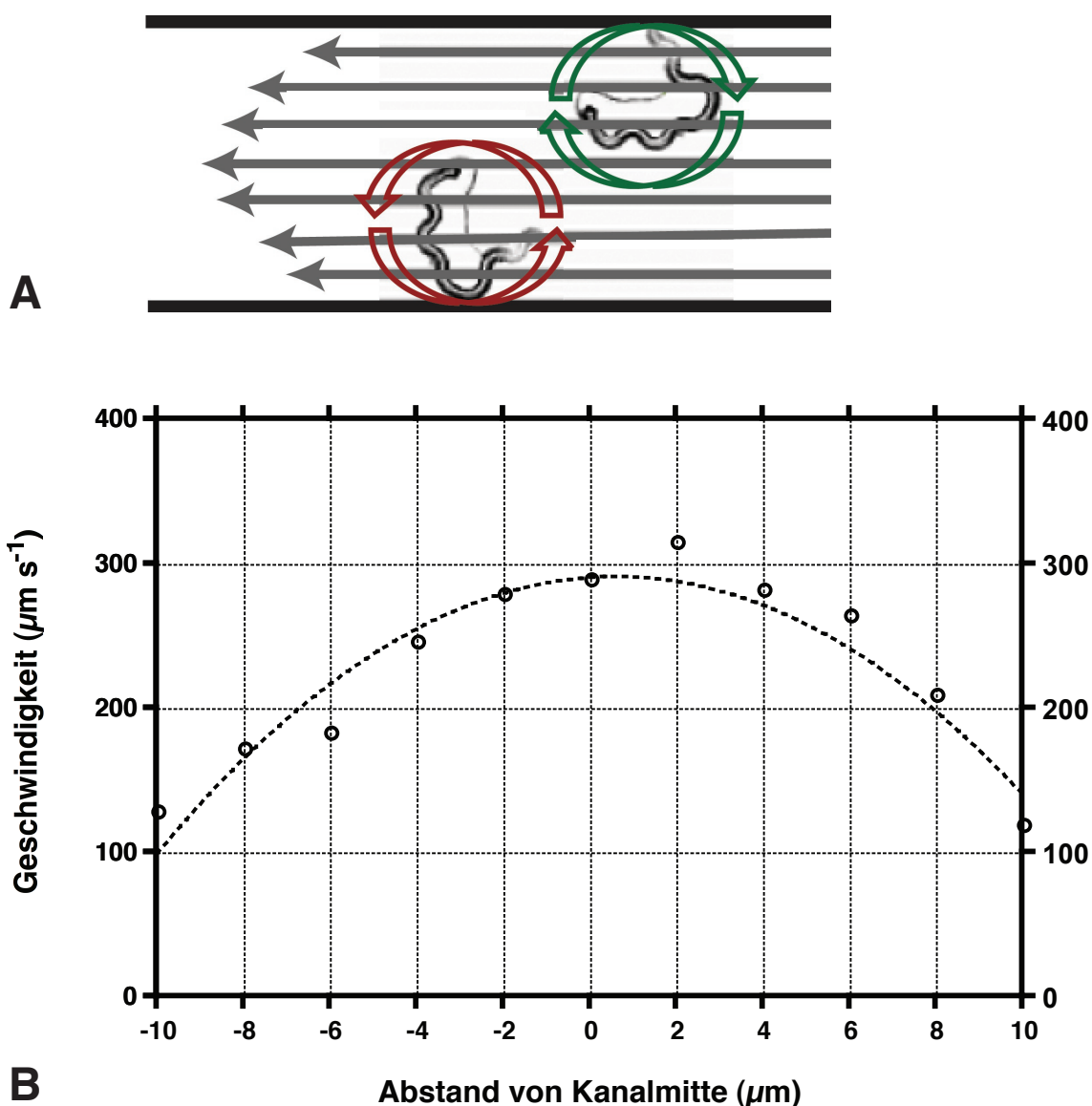


Abb. 46 | Im laminaren Strom führen die Scherkräfte dazu, dass die Zellen um ihre eigene Achse rotieren. A In der schematischen Illustration, die Trypanosomen in einem Mikrokanal zeigt, verläuft die hydrodynamische Strömung von rechts nach links, angedeutet durch die Strömungslinien. Mit jedem Schlag des Flagellums ragt die Spitze des Flagellums in eine andere laminare Flüssigkeitsschicht, die sich mit anderer Geschwindigkeit bewegt, als der restliche Zellkörper. In den mikrofluidischen Experimenten zeigte sich, dass die Trypanosomen dadurch im Fluss in eine Rotationsbewegung versetzt werden, da sich die Strömungsgeschwindigkeit auf gegenüberliegenden Seiten der Zelle unterscheidet. Die Scherkräfte sind besonders stark in den Wandregionen des Kanals. Alle Zellen in der oberen Hälfte des Kanals rotierten dabei im Uhrzeigersinn, während alle Zellen in der unteren Hälfte des Mikrokanals entgegen dem Uhrzeigersinn rotierten. Ein starker laminarer Strömungsgradient im Kanal war dafür massgeblich, da diese Rotation weder bei geringerer mittlerer Strömungsgeschwindigkeit, noch in breiteren Kanälen, bei gleicher Flussgeschwindigkeit, auftrat. Dort waren die Scherkräfte schwächer im Vergleich mit der Eigenbewegung der Zellen. **B** Das Strömungsprofil zeigt die laminare Natur der Strömung im Mikrokanal. Das Strömungsprofil in einem Mikrokanal mit $20 \mu\text{m}$ Breite und quadratischem Querschnitt wurde durch Messung der mittleren Geschwindigkeiten der Zellen (Erythrozyten und Trypanosomen) aus mikroskopischen Video-Aufnahmen, an unterschiedlichen lateralen Positionen im Kanal bestimmt. Diese sind im Vergleich zu $1 \mu\text{m}$ Polystyren-Beads in Nähe der Kanalwände aufgrund ihrer Größe noch deutlich der Strömung unterworfen. Theoretisch sollte in der Nähe der Kanalwände die Strömungsgeschwindigkeit gegen Null gehen.

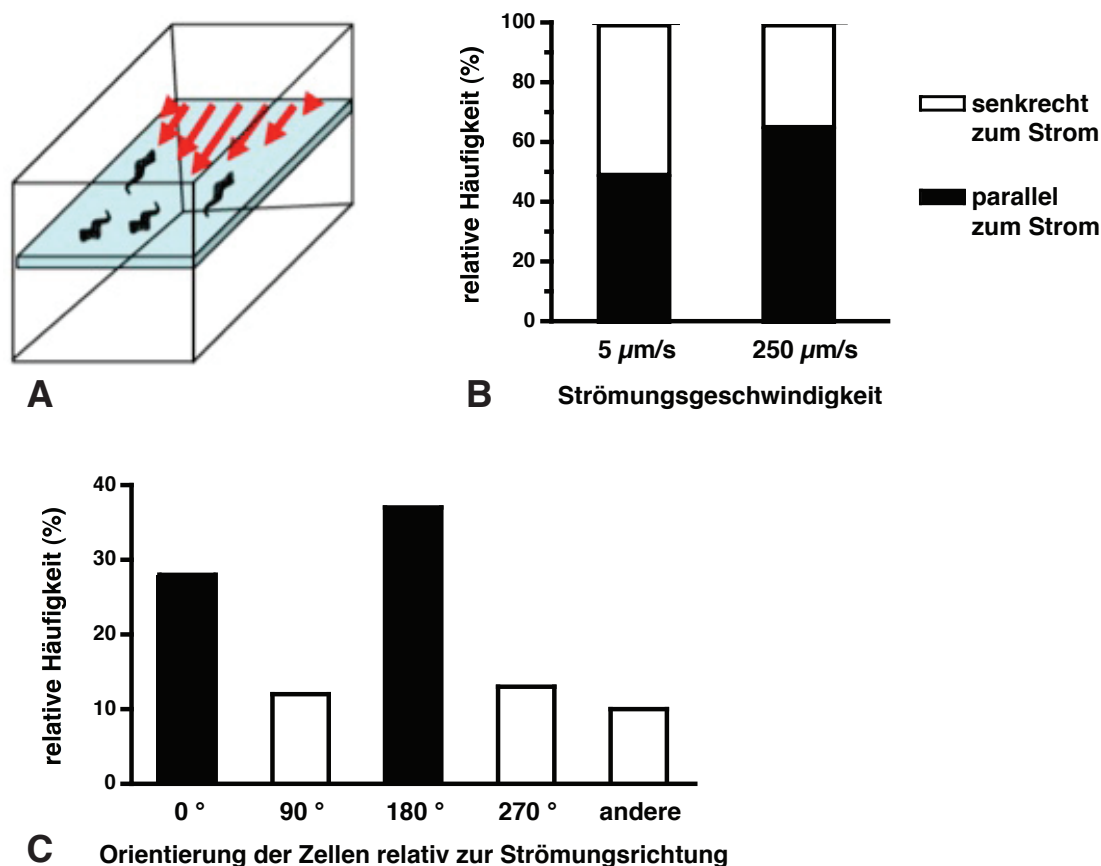


Abb. 47 | Durch hydrodynamische Kräfte werden Trypanosomen im Fluss parallel zur Strömungsrichtung im Mikrokanal ausgerichtet. **A** Schematische Illustration der mehrheitlich beobachteten Ausrichtung der Trypanosomen parallel zu den Strömungslinien. **B** In einem 20 μm breiten Mikrokanal, mit quadratischem Querschnitt, der Trypanosomen und Erythrozyten in physiologischer Konzentration enthielt, wurde eine Strömung von 5 bzw. 250 $\mu\text{m s}^{-1}$ angelegt und anhand von mikroskopischen Einzelbild-Aufnahmen wurde die räumliche Orientierung der einzelnen Zellen, relativ zur Flussrichtung bestimmt ($n=99$ bzw. 110). Bei geringer Strömung (5 $\mu\text{m s}^{-1}$) war die Anordnung der Zellen gleichmässig verteilt. **C** Bei einer laminaren Strömung von 250 $\mu\text{m s}^{-1}$ nahmen 37% der Zellen eine Orientierung gegen den Strom ein, 28% mit dem Strom und 13 % bzw. 12 % der Zellen nach oben oder unten, in Richtung der Kanalwände ($n=110$ Zellen). Die übrigen 10% der Zellen hatten eine nicht genau definierbare Orientierung. In der Summe waren damit 65% der Zellen parallel zur Strömung ausgerichtet und nur 25% senkrecht dazu. Die Orientierung parallel zur Kanalachse ist eine Folge der Scherkräfte, die auf die asymmetrisch geformten Zellen wirken.

5.8.2 Laterale Verteilung von Trypanosomen und Erythrozyten im Mikrokanal unter Flussbedingungen

Die Strömungsgeschwindigkeit in Blutkapillaren mit einem Durchmesser von 10 - 30 μm liegt bei 140 - 930 $\mu\text{m s}^{-1}$ (Stücker *et al.*, 1996). Diese physikalischen Bedingungen wurden hier mittels Mikrofluidik in PDMS-Kanälen nachgebildet. In diesen wurde dann die statistische laterale Häufigkeitsverteilung von Trypanosomen und Erythrozyten an unterschiedlichen Positionen anhand von mikroskopischen Hochgeschwindigkeitsaufnahmen ermittelt.

Ergebnis: In einem 20 μm breiten Mikrokanal, unter Flussbedingungen (etwa 250 $\mu\text{m s}^{-1}$), waren Trypanosomen genau wie die Erythrozyten häufiger in den zentralen Bereichen der Mikrokanäle zu finden (s. Abb 48).

Die auftretenden Flussgeschwindigkeiten in Kapillaren sind um ein Vielfaches höher, als die Schwimgeschwindigkeit der Trypanosomen. Daher können die Zellen nicht gegen den Strom ankommen. Allerdings konnten die Zellen durch ihre Motilität im Experiment ihre laterale Position im Kanal aktiv beeinflussen. Durch die Verformung der Zelle und die Verlagerung der freien Flagellarspitze in eine andere laminare Schicht, wurden die Zellen entweder abgebremst, oder beschleunigt. In Abb. 49 ist ein motiles Trypanosom in einem Mikrokanal mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 1,6 mm s^{-1} gezeigt. Die Zelle änderte ihre laterale Position um 8,0 μm innerhalb von 67,8 ms. Dabei wurde die Zelle 108,5 μm im Kanal weiter getragen. Die Geschwindigkeit der lateralen Positionsänderung betrug daher 118 $\mu\text{m s}^{-1}$ (senkrecht zur Strömungsrichtung!). Diese Geschwindigkeit liegt um ein Vielfaches über der maximalen Schwimgeschwindigkeit eines Trypanosoms und muss daher von hydrodynamischen Kräften verursacht sein, die auf das, sich asymmetrisch verformende Trypanosom einwirken.

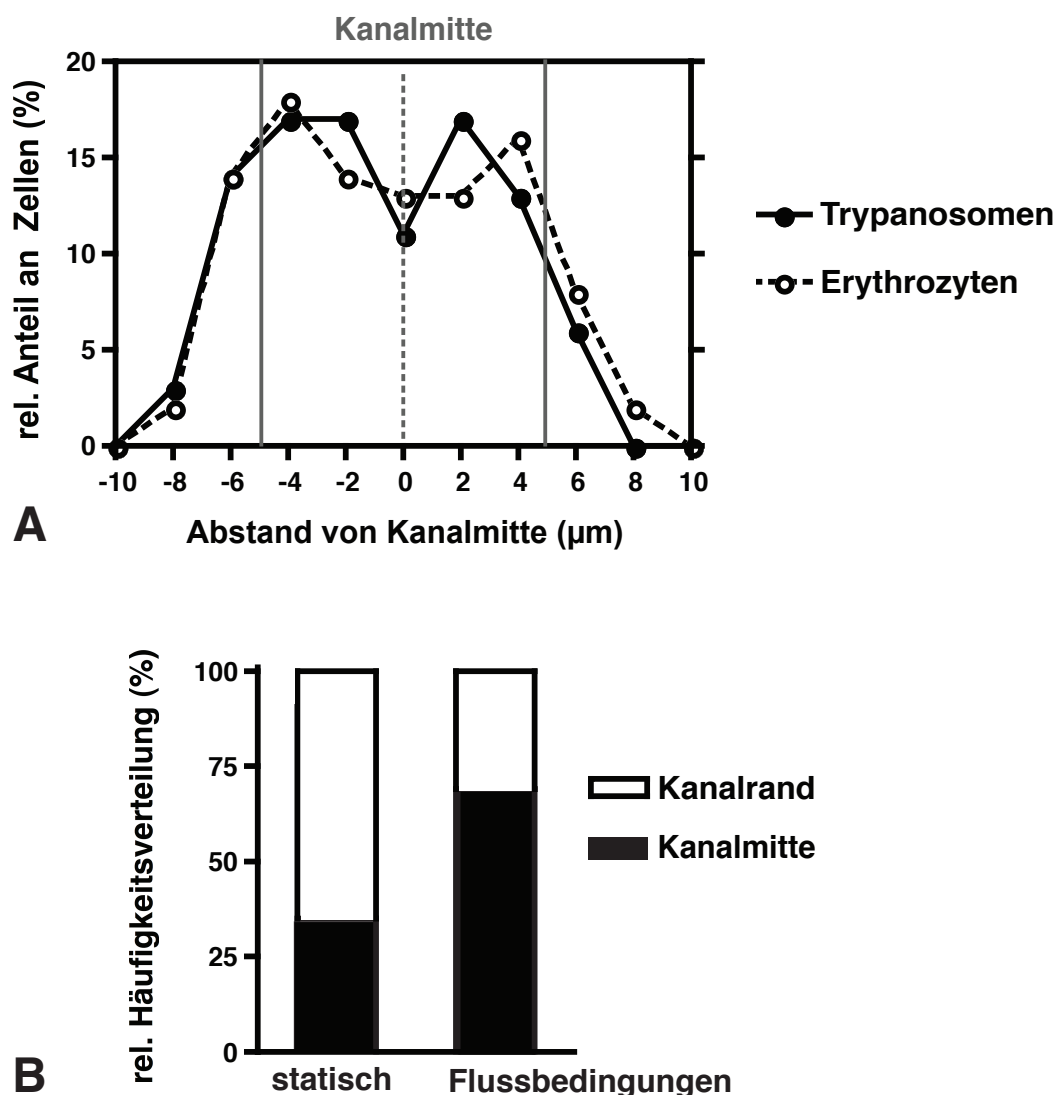


Abb. 48 | Vergleich der lateralen Verteilung im Kanal von Trypanosomen und Erythrozyten. **A** Das Diagramm zeigt die statistische laterale Häufigkeitsverteilung von Trypanosomen (durchgezogene Linie) und Erythrozyten (gestrichelte Linie) in einem 20 µm durchmessenden Mikrokanal mit quadratischem Querschnitt. Die laterale Position der einzelnen Zellen wurde bestimmt für 829 Erythrozyten und 327 Trypanosomen. Auf der X-Achse ist die Distanz in Mikrometern zur Kanalmitte aufgetragen. Da der Kanal eine Breite von 20 µm hat, reichen die möglichen Positionen von - 10 µm bis + 10 µm. Zur besseren Unterscheidbarkeit und um nur Zellen in der richtigen Fokusebene bzw. laminaren Schicht zu analysieren, waren die Trypanosomen zuvor durch einen DNA-Farbstoff (Hoechst 33342) fluoreszenzmarkiert worden. Der markierte Zellkern diente dabei gleichzeitig als einheitlicher Marker für die exakte laterale Position der einzelnen Trypanosomen im Kanal. Die Konzentration der Erythrozyten entsprach dabei physiologischen Bedingungen. Die Auswertung erfolgte mittels der frei verfügbaren Software imageJ, unter Verwendung selbstgeschriebener Plugins. **B** Durch hydrodynamische Effekte werden Trypanosomen in der Kanalmitte angereichert. Es ist die Häufigkeitsverteilung der Anordnung von Trypanosomen in der mittleren Kanalhälfte bzw. in den Kanalrandbereichen in Abhängigkeit von der angelegten Flussrate dargestellt. Unter Flussbedingungen sind mehr Zellen in der Kanalmitte angeordnet, als unter statischen Bedingungen (n=20, bzw. 327).

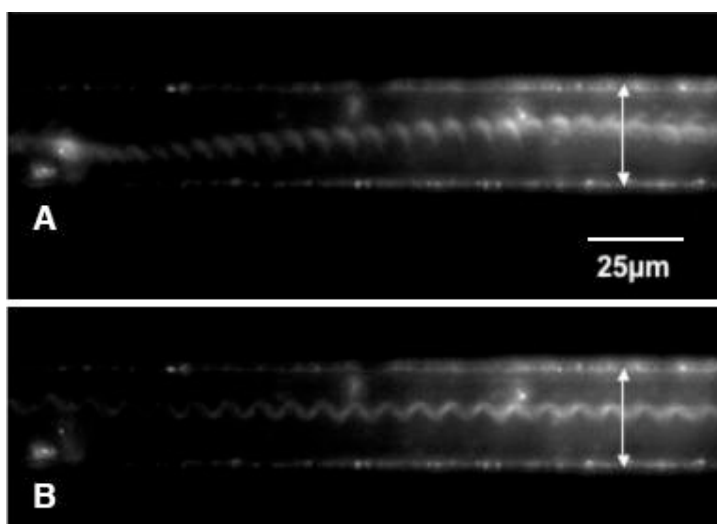


Abb. 49 | Trypanosomen können aufgrund ihrer Motilität aktiv die laterale Position im Mikrokanal unter Flussbedingungen ändern. Die Abbildung zeigt stroboskopische Mikroskopie-Aufnahmen eines lebenden (**A**) und eines toten (**B**) BSF Trypanosoms in einem 25 µm breiten Mikrokanal (Pfeile), bei angelegter Strömung von $1,6 \text{ mm s}^{-1}$. Dies liegt im Bereich der physiologischen Bedingungen im Blutsystem. Der Mikrokanal wurde für 10 ms mit 30 Lichtblitzen stroboskopisch beleuchtet (Aufnahmen von Eric Stellamanns, entstanden im Rahmen einer Kooperation).

Interpretation: Theoretisch könnte man eine parabolische Verteilung der Zellen in Kapillaren erwarten, die das laminare Strömungsprofil widerspiegelt (Abb. 46-B). Allerdings zeigte die Auswertung ein lokales Minimum in der Häufigkeitsverteilung in der ganz zentralen Position des Kanals (Abb. 48-A). Da die verwendeten Mikrokanäle einen quadratischen Querschnitt hatten, kann die ermittelte Verteilung auch leicht auf die dritte Dimension extrapoliert werden. Die hier experimentell gefundene Verteilung erinnert somit stark an die von (Segré und Silberberg, 1962) postulierte Verteilung von Erythrozyten in Kapillaren, bei der es zu einer radialen Anhäufung von Zellen an einer Position kommt, die dem 0,62 fachen des Radius entspricht. Die Verteilung von Erythrozyten und Trypanosomen war unter diesen Bedingungen sehr ähnlich. Allerdings konnten die Trypanosomen durch den Schlag ihres Flagellums und die damit einhergehende Verformung ihres Zellkörpers ihre laterale Position dynamisch ändern.

6. Diskussion

6.1 Wie schwimmen Trypanosomen?

Fast die gesamte Literatur über die Motilität von Trypanosomen behandelt ausschließlich die Insektenstadien. Daher wurde in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf die Biomechanik des Schwimmens von Blutstromformen und deren Interaktion mit ihrer Mikroumwelt gelegt. Um die schnelle und komplexe Bewegung des Flagellums von *T. brucei* aufzuklären, die sich seit vielen Jahrzehnten einer genauen Analyse erfolgreich widersetzt hatte, waren technische Neuerungen nötig (Gadelha *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe neuer Analysemethoden erstmalig für die Untersuchung der Motilität bei Trypanosomen eingeführt, darunter Mikrofluidik, Holographie und automatisierte Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit Hochgeschwindigkeitsmikroskopie. Letztere erlaubte es, die schnelle Bewegung des Flagellums mit der nötigen räumlichen und zeitlichen Auflösung zu untersuchen. Dabei fallen jedoch sehr große Datenmengen an. In dieser Arbeit waren es bei einer Aufnahmerate von 1000 fps (Bilder pro Sekunde) 4 GB/s. Dies entspricht der Speicherkapazität einer DVD mit jeder Sekunde Aufnahmedauer. Ein Grundproblem ist zudem, dass eine hohe Bildrate immer durch eine kurze Belichtungszeit erkauft werden muss und dementsprechend schwächer wird das detektierte Signal. Daher musste die Detektion der Zellen, sowie die Steuerung der einzelnen Geräte automatisiert und für die jeweiligen Experimente durch eigens dafür selbst entwickelte Software optimiert werden. Auf diese Weise konnten große Datenmengen (mehrere TB) von über tausend Zellen aufgenommen und ausgewertet werden.

Es zeigte sich, dass in Zellkulturmedium nur etwa ein Viertel der BSF Trypanosomen zu jedem Zeitpunkt gerichtet schwammen. Die restlichen Zellen ($73,2 \pm 8,7 \%$, $n=1000$) zeigten eine Taumelbewegung ohne effektive Netto-Fortbewegung. Die Maximalgeschwindigkeit lag bei etwa $20 \mu\text{m s}^{-1}$. Dieser Wert ist konsistent zu der, für die prozyklischen Insektenformen berichteten Maximalgeschwindigkeit von $20 \mu\text{m s}^{-1}$ (Bastin *et al.*, 1999). Diese Geschwindigkeit ist sehr viel höher als bei unbegeißelten Zellen, z.B. migrieren Leukozyten mit einer Geschwindigkeit von wenigen Mikrometern in der Minute (Parkhurst und Saltzman, 1994). Die Geschwindigkeit ist auch höher als z.B. bei Malaria Sporozoiten mit ca. $2 \mu\text{m s}^{-1}$ (Frischknecht, persönliche Kommunikation), aber geringer als bei Spermien, oder *Chlamydomonas* die sich mit bis zu $100 \mu\text{m s}^{-1}$ fortbewegen. Allerdings ist das Flagellum von Spermien um ein Vielfaches länger als das der Trypanosomen und *Chlamydomonas* besitzt zwei koordiniert schlagende Flagellen.

Wegen dem hohen Anteil an Trypanosomen mit ungerichteter Bewegung lag die Durchschnittsgeschwindigkeit der Gesamtpopulation bei nur $5,7 \mu\text{m s}^{-1}$ ($n=979$). Die Persistenzlänge lag bei $143 \pm 20 \mu\text{m}$ (SEM), mit einer Persistenzdauer von $11,6 \pm 10,4 \text{ s}$ (s. Kapitel 5.2.3). Der mittlere Winkel nach einem Richtungswechsel betrug ca. 60° (s.

Kapitel 5.2.5). Für *E. coli*, wurde ebenfalls eine durchschnittliche Winkeländerung von 60° bei Richtungswechseln berichtet (Berg und Brown, 1972). Auffallend häufig traten bei Trypanosomen hier jedoch auch Winkel um 30° auf. Von *E. coli* ist bekannt, dass durch das Hinauszögern des Übergangs von gerichtetem Schwimmen zum Taumeln eine chemotaktische Bewegung erreicht werden kann (Berg und Anderson, 1973; Berg und Brown, 1972).

6.1.1 Schnell und gerichtet schwimmende Trypanosomen rotieren um ihre Längsachse

Hutchings und Ludu berichteten von fünf unterschiedlichen Modi des Flagellarschlages, die sich bei ein und derselben Zelle über die Zeit abwechseln können (Fry *et al.*, 2003; Hutchings und Ludu, 2004). Diese Erkenntnisse entstammten jedoch der Untersuchung von Insektenstadien (PCF), die chemisch an Deckgläschen fixiert waren. Man darf erwarten, dass diese Fixierung die Bewegung der Zelle selbst beeinträchtigt. Zudem wurden die Zellen dabei mit einer Bildrate von nur 8 Hz aufgenommen und analysiert. Diese zeitliche Auflösung ist langsamer als die Frequenz des Flagellarschlages selbst und damit deutlich zu langsam um gemäß dem Nyquist-Shannon-Theorem eine Analyse der Bewegung zu erlauben. Als "4. Modus" wurde von Hutchings und Ludu die Ausbreitung von "depression waves", ohne symmetrische Folgewelle beschrieben, was später auch als "kinks" bezeichnet wurde (Rodríguez *et al.*, 2009). Allerdings tritt diese Form der Bewegung nur bei Zellen auf, die mit einer Geschwindigkeit von maximal $8 \mu\text{m s}^{-1}$ schwimmen (Fry *et al.*, 2003).

Hier wurde durch Hochgeschwindigkeitsmikroskopie in Verbindung mit der tomographischen Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur der Zelle gezeigt, dass schnell ($>10 \mu\text{m s}^{-1}$), gerichtet und frei schwimmende Trypanosomen eine vollständige Rotationsbewegung um die eigene Längsachse vollführen mit einer Frequenz von 2-3 Hz (s. Kapitel 5.3.1). Dabei schlug das Flagellum mit einer Frequenz von $18,3 \pm 2,5 \text{ Hz}$ ($n=60$) und die Flagellarwelle breitete sich mit konstanter Frequenz entlang des Flagellums aus. Dieser letzte Punkt steht im Gegensatz zu der von Chang und Miao (2009) berichteten Abnahme der Schlagfrequenz entlang des Flagellums bei der Fortbewegung durch "kinks".

Die schwimmenden Zellen bewegten sich nicht kontinuierlich fort, sondern schrittweise, mit jedem Schlag des Flagellums, da die Trägheitskraft bei kleinen Reynoldszahlen vernachlässigbar gering ist (Purcell, 1997). Die Asymmetrie des Zellkörpers versetzt die Zelle dabei in eine Rotationsbewegung. Mit jedem Schlag des Flagellums dreht sich die Zelle um ca. 60° weiter um die eigene Achse. Im Gegensatz dazu wurde in der Literatur auch eine reziproke Hin- und Her-Bewegung des Zellkörpers der Trypanosomen vorgeschlagen (Rodríguez *et al.*, 2009; Hill, 2010).

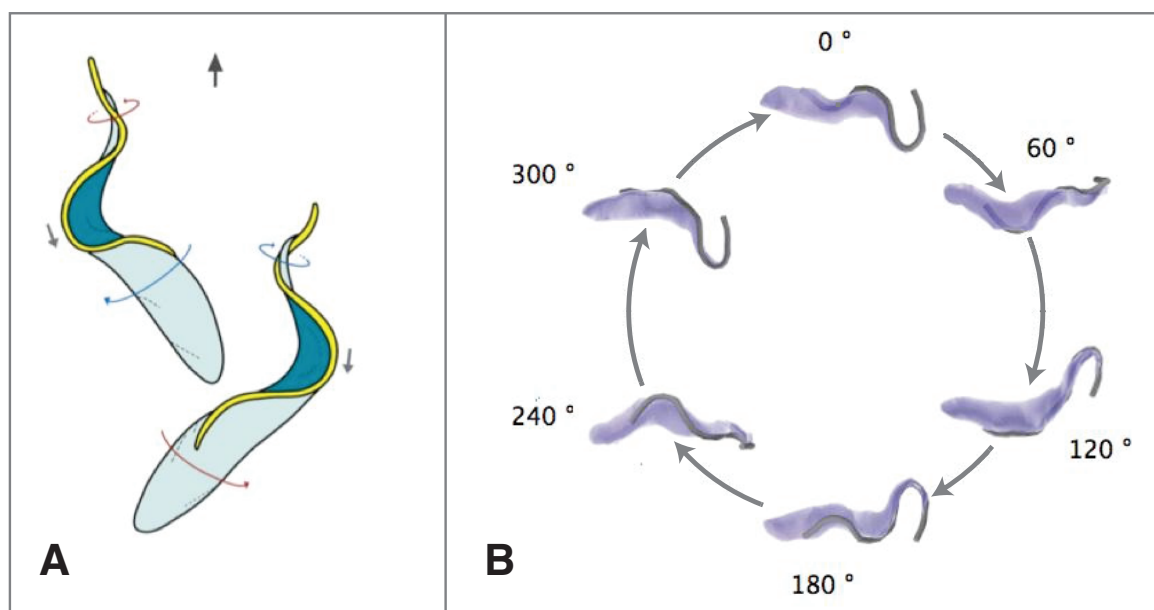


Abb. 50 | Vergleich der unterschiedlichen Modelle der Bewegung von Trypanosomen. **A** Modell, das eine Hin- und Her-Bewegung beschreibt, nach Hill und Kollegen (Rodríguez *et al.*, 2009). Der Pfeil deutet die Schwimmrichtung an. Die Zelle wird durch bihelikale "kinks" angetrieben. **B** In dem Modell dieser Arbeit, beschreibt die Zelle dagegen eine vollständige Rotation um die eigene Achse. Es ist jeweils die Situation nach einem vollständig abgeschlossenen Flagellarschlagzyklus gezeigt. Die dargestellten Zustände liegen jeweils ca. 55 ms auseinander.

6.1.2 Der Vorteil einer nicht-reziproken Rotationsbewegung

Welchen Unterschied macht es für die Zelle, ob sie eine Hin- und Her-Bewegung, oder eine vollständige Rotationsbewegung ausführt? Trypanosomen stehen unter dem Regime der kleinen Reynoldszahlen. Hier führen reziproke (d.h. sich über die Zeit umkehrende) Bewegungen nicht zu einem Nettovortrieb.

Die hier postulierte dreidimensionale, helikale Rotationsbewegung um die Zellachse dagegen ist nicht-reziprok und erlaubt *T. brucei* daher auch bei kleinen Reynoldszahlen eine effektive Fortbewegung. Bei Spermien wurde bereits eine solche nicht-reziproke Wellenbewegung gezeigt (Goldstein *et al.*, 1976). Auch Cilien vollführen eine nicht-reziproke Bewegung. Dort wechselt sich ein Propulsionsschlag mit einem Regenerationsschlag ab. Neben der Geschwindigkeit der beiden Schläge unterscheidet sich dabei auch die Krümmung des Ciliums.

Die Reynoldszahl eines Trypanosoms, das in einer 20 μm durchmessenden Kapillare mit einer Geschwindigkeit von 20 $\mu\text{m s}^{-1}$ schwimmt, beträgt: $\text{Re} \approx 10^{-4}$

$$\text{Re} = \frac{v \cdot L}{n}$$

$$\text{Re} = \frac{20 \cdot 10^{-6} \text{ m s}^{-1} \cdot 20 \cdot 10^{-6} \text{ m}}{4,5 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}} = 8,9 \cdot 10^{-5}$$

Dabei ist v die mittlere Strömungsgeschwindigkeit, L der Gefäßdurchmesser und η die Viskosität des Blutes. Für Blut wurde eine kinematische Viskosität von $4,5 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ bei 37°C gemessen (s. Kapitel 5.7.4). Da Blut aber eine nicht-Newton'sche Flüssigkeit ist, bleibt zu beachten, dass dessen Viskosität zusätzlich von der jeweiligen Flussgeschwindigkeit abhängt.

6.1.3 Frei schwimmende Trypanosomen zeigen kein kooperatives Schwimmverhalten

In der Literatur wurde "Swarming" nicht nur für viele Arten von Bakterien (Turner *et al.*, 2010), sondern auch für das Insektenstadium der Trypanosomen berichtet, wenn diese auf Agarplatten kultiviert werden (Oberholzer *et al.*, 2010). Eine koordinierte Bewegung der Zellen konnte in dieser Arbeit für frei in Lösung schwimmende Trypanosomen durch die Auswertung der großen Anzahl an Einzeltrajektorien ausgeschlossen werden (s. Kapitel 5.2.7). Weder die Blutstromformen noch die Insektenstadien von *T. brucei* zeigten eine Vorzugsrichtung der Bewegung im dreidimensionalen Raum.

Bei sehr dicht benachbarten Flagellen kann eine Synchronisation ihres Schlages durch hydrodynamische Kräfte auftreten (Reichert und Stark, 2004; Martin *et al.*, 2006). Die fehlende Synchronisation in Flüssigmedium könnte darauf zurückgeführt werden, dass diese durch die häufig auftretende Umkehr der Flagellarschlagrichtung und die damit verbundene Reorientierung der Zellen verhindert wird.

Wenn die Zellen keiner Vorzugsrichtung folgen, kann ihre Bewegung durch Diffusionsgleichungen beschrieben werden (Einstein, 1905/1906; Codling *et al.*, 2008). So zeigte Prizbran bereits 1913, dass die Diffusionsgleichungen auch die aktive Bewegung von *Paramecium* beschreiben (Selmeczi, 2008). Auch für Trypanosomen konnte hier ein, der Diffusion entsprechendes Ausbreitungsverhalten, gezeigt werden. Über kurze Strecken ($< 200 \mu\text{m}$) entsprach das Ausbreitungsverhalten jedoch einer Superdiffusion (Abb. 16). Da die Zellen nach einiger Zeit (im Schnitt ca. alle 15 Sekunden) eine Umorientierung der Zellachse durchmachen und dann in eine andere Richtung weiterschwimmen, verhalten sie sich über größere Distanzen, als würden sie ungerichtet diffundieren. Daher trifft hier das Levy-Modell besser zu, als reine Diffusion (Abb. 18). In der Literatur wurde die optimierte Strategie der Nahrungssuche als eine Kombination von Levy-Flights und Diffusion beschrieben (Humphries *et al.*, 2010; Viswanathan *et al.*, 1999; Viswanathan, 2010).

Charakteristisch für die Diffusion ist, dass die daraus resultierende mittlere Ausbreitung in alle Richtungen gleichmässig, also rotationssymmetrisch erfolgt und zwar direkt proportional zum Logarithmus der Zeit:

$$r^2 = 2 \cdot n_{\text{Dim}} \cdot D \cdot t$$

wobei: r = Ausbreitungsradius, t = Zeit, n_{Dim} = Anzahl an räumlichen Dimensionen, D = Diffusionskoeffizient

Aus diesem Grund sind Trypanosomen für die systemische Ausbreitung über den Säugerkörper auf den hydrodynamischen Fluss des Lymph- und Blutsystems angewiesen. Für eine Ausbreitung über große Distanzen ist eine Fortbewegung ohne Taxis nicht effektiv.

6.2 Der Einfluss der Mikroumwelt auf die Motilität der Trypanosomen

6.2.1 Der Einfluss der Viskosität

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die physikalische Interaktion mit der Mikroumwelt notwendig ist, für eine effektive Motilität der BSF Trypanosomen. Während in Medium nur ein Viertel der Zellen gerichtet schwamm, stieg dieser Anteil in Blut auf etwa 90%. In Anwesenheit einer hohen lokalen Dichte an Zellen war zudem auch die Schwimgeschwindigkeit erhöht ($\geq 30 \mu\text{m s}^{-1}$).

Für BSF Trypanosomen konnte ein Maximum der durchschnittlichen Populationsgeschwindigkeit bei einer Viskosität von ca. $5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ gemessen werden (Abb. 35). Dies liegt im Bereich der physiologischen Viskosität von Blut, welches mindestens um Faktor 5 viskoser ist als das Standardzellkulturmedium. Ein solcher Anstieg der mittleren Schwimgeschwindigkeit (etwa auf das Dreifache) mit steigender Viskosität wurde bisher noch nicht für eukaryotische, begeißelte Zellen gezeigt. Stattdessen wird davon ausgegangen, dass die Schwimgeschwindigkeit mit zunehmender Viskosität abnimmt (Brokaw, 1966; Brokaw und Benedict, 1968). Dies wurde mit einer geringeren kinetischen Effizienz durch den höheren äußeren hydrodynamischen Widerstand begründet (Katz *et al.*, 1978; Pate und Brokaw, 1980). Allerdings ist für einige Bakterien bekannt, dass ein leichter Anstieg der Viskosität auf etwa $2 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ die Schwimgeschwindigkeit erhöhen kann (Schneider und Doetsch, 1974; Greenberg und Canale-Parola, 1977; Atsumi *et al.*, 1996). Daher wurde hier eine gesteigerte Propulsionseffizienz mit erhöhter Viskosität vorgeschlagen (Magariyama und Kudo, 2002).

Unter den Bakterien sind die Spirochäten besonders gut an das Schwimmen in hochviskosen, Gel-artigen Medien angepasst. Sie sind von helikaler Zellform und besitzen periplasmatische Flagellen. Diese äußerlichen Analogien zu den Trypanosomen könnte

auf eine konvergente Adaptation an die Fortbewegung in einer hoch viskosen Umwelt hinweisen. BSF Trypanosomen waren im Experiment selbst noch in Medium, das um Faktor tausend viskoser ist als Blut (2% Methylcellulose) noch zu persistentem Schwimmen befähigt, wenn auch mit verminderter Geschwindigkeit (ca. $3 \mu\text{m s}^{-1}$). Bei dieser Viskosität sind die meisten motilen Bakterien bereits komplett immotil (Greenberg und Canale-Parola, 1977; Schneider und Doetsch, 1974). Biologisch macht es für Trypanosomen Sinn über einen weiten Viskositätsbereich motil zu sein, da die äußeren Bedingungen innerhalb des Gewebezwischenraumes über den Wirtskörpers stark variieren (Mwangi *et al.*, 1995).

6.2.2 Der Einfluss der Mikroumwelt auf die Schwimmrichtung

Durch eine, auf Versuch und Irrtum basierenden, Bewegung müssen sich die Trypanosomen im Wirtskörper durch die dichte extrazelluläre Matrix arbeiten. Diese Art der Bewegung erfordert die Fähigkeit sich vorwärts und rückwärts bewegen zu können, um dabei nicht in einer der zahlreichen "Sackgassen" stecken zu bleiben. Deshalb stellt es für die Zelle einen Vorteil dar, wenn nötig "den Rückwärtsgang einlegen" zu können. Ein solches Bewegungsmuster kennt man auch von den Sporozoiten des Malaria-Erregers *Plasmodium* (Amino *et al.*, 2006), oder als Teil einer Hindernis-Vermeidungs-Strategie von *B. subtilis* (Cisneros *et al.*, 2006). Dennoch ist die allgemein akzeptierte Meinung, dass *T. brucei* nur in eine Richtung schwimmen kann (Hill, 2003). Der produktive Vorwärtsschlag der Trypanosomen läuft vom freien Ende der Zuggeißel in Richtung ihrer Basis. Dies ist ein einzigartiges Merkmal der Trypanosomen (Ralston *et al.*, 2009).

Nach RNA-Interferenz gegen den äußeren Arm von Dynein kehrt sich die Richtung des Flagellarschlages um (Branche *et al.*, 2006; Baron *et al.*, 2007a). In dieser Arbeit wurde eine Umkehr der Schwimmrichtung auch bei Wildtyp BSF Trypanosomen beobachtet. In nieder-viskosem Medium führt die Umkehr der Flagellarschlagrichtung zum Taumeln der Zelle, wohingegen die Zellen in Pillarwäldern mit 4-5 μm Abstand rückwärts schwammen. Taumelnde Zellen wechseln in kurzen Intervallen die Richtung des Flagellarschlages, so dass sie keinen Netto-Vortrieb erzielen. Der reverse Flagellarschlag taumelnder Zellen hatte mit $3,1 \pm 0,8$ Hz eine deutlich verringerte Schlagfrequenz. Dieser Wert ist konsistent mit dem, von Branche *et al.* (2006) als 3-5 Hz angegebenen Wert. In Medium mit 0,5% Methylcellulose dominiert die Vorwärtsbewegung und der Anteil an taumelnden Zellen sinkt. *Crithidia oncopelti* hat ebenso wie *T. brucei* ein einzelständiges Flagellum und einen Flagellarschlag, der in Richtung von der Spitze zur Basis verläuft. Auch hier führt eine Umkehr der Richtung des Flagellarschlages zu einer Taumelbewegung mit anschließender Winkeländerung der Orientierung. Allerdings führt eine Erhöhung der Viskosität des Mediums bei *C. oncopelti* zu einer gesteigerten Taumelrate (Sugrue *et al.*, 1988).

Wie lässt sich der Einfluss der Mikroumgebung auf die Schwimmrichtung der Zelle erklären? Für den reversen Flagellarschlag wurde eine größere Amplitude als für den normalen tip-to-base Schlag gemessen (Tabelle 6). Daher können durch dieses Bewegungsmuster weiter auseinander liegende Pillars (4-5 μm) für eine effiziente, gerichtete Bewegung genutzt werden. Es ist bisher jedoch nicht bekannt, wie die Umkehr der Schlagrichtung funktioniert, da die Dyneine entlang der Mikrotubuli-Doubletten des Axonems nur in eine Richtung aktiv gleiten können (Mallik *et al.*, 2004). Sicher ist nur, dass die Aktivierungsreihenfolge hunderter Dyneine dabei strikt reguliert werden muss (Ralston *et al.* 2006).

Bei den Sporozoiten des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* dominiert in den selben Pillarwäldern eine kreisende Gleitbewegung um jeweils einen einzelnen Pillar herum (Hellmann und Frischknecht, persönliche Kommunikation; Amino *et al.*, 2005).

Es existieren einige Ähnlichkeiten bei der Motilität von *T. brucei* und *C. elegans*, eines der am meisten studierten Modellsysteme. Dies könnte damit zusammenhängen, dass beide an ein Leben in einer komplexen, strukturierten Umwelt mit vielen Hindernissen angepasst sind (Sznitman *et al.*, 2010). *C. elegans* ist ein etwa 1 mm langer Rundwurm, der im Erdreich lebt und sich durch eine schlängelnde, sinus-ähnliche Bewegung des Zellkörpers fortbewegt. In Flüssigmedium erreicht *C. elegans* nur eine Geschwindigkeit von etwa 0,1 mm s^{-1} , auf Agarplatten eine Geschwindigkeit von 0,5 mm s^{-1} und in Pillarwäldern bis zu 1,3 mm s^{-1} (Park *et al.*, 2008). Diese Geschwindigkeitssteigerung durch die Interaktion mit einer geeigneten Matrix ähnelt dem, was in dieser Arbeit für Trypanosomen gefunden wurde. Genau wie bei *T. brucei* gibt es auch bei *C. elegans* einen optimalen Pillarabstand für eine maximale Geschwindigkeit. Dieser liegt bei etwa 0,46 mm, was knapp die halbe Wellenlänge der Wellenbewegung des Zellkörpers beträgt. Auch bei Trypanosomen lag der optimale Pillarabstand knapp unter der Hälfte der Wellenlänge, die der Zellkörper bei der helikalen Rotationsbewegung vollführt.

6.2.3 Der Einfluss der Temperatur auf die Bewegung

Bei 37°C war die Durchschnittsgeschwindigkeit von BSF Trypanosomen höher als bei 22°C. Chemische Reaktionen laufen bei erhöhter Temperatur in der Regel schneller ab. Deshalb kann man erwarten, dass sich auch biochemische Prozesse entsprechend verhalten. Theoretisch würde man deshalb eine Verlangsamung der Zellen bei niedrigerer Temperatur erwarten. Ein Anstieg von Schwimmgeschwindigkeit und Flagellarfrequenz mit der Temperatur wurde in der Literatur bereits für einige Pro- und Eukaryoten gezeigt (Clary-Meinesz *et al.*, 1992; Schneider und Doetsch, 1977). Allerdings muss man dabei auch die optimalen Lebens- und Wachstumsbedingungen der Zellen beachten. Zu hohe Temperaturen werden nicht zu einer weiteren Zunahme des Stoffwechsels, sondern zum Absterben der Zellen führen. Dies war für BSF Trypanosomen bereits bei 42°C der Fall.

Sehr ähnlich verhielt es sich für prozyklische Trypanosomen, die ihr Wachstumsoptimum bei 27°C haben. Bei einer Temperaturerhöhung auf 37°C wurden auch diese deutlich weniger motil und langsamer. Somit kann das Schwimmverhalten von Trypanosomen bei, über das Wachstumsoptimum hinaus, erhöhter Temperatur nicht gemessen werden.

Die Temperatur von 37°C entspricht dem homöostatischen Säugerblut. Einen Temperaturabfall von 15 Grad Celsius werden die Zellen im Blut nie erfahren, wohl aber nachdem die Zellen bei der Blutmahlzeit von ihrem Insektenvektor, der wechselwarmen Tsetsefliege, aufgenommen wurden. Dieser Temperaturabfall ist daher einer der Schlüsselreize, die Blutstromformen dazu bringen zu einer, an die Fliegenform besser adaptieren Form zu differenzieren (Engstler und Boshart, 2004).

6.3 Die Hydrodynamik des Blutes

Die Blutgefäße des Menschen bilden ein dichtes Netzwerk aus, das mit einer Gesamtlänge von etwa 100.000 km den gesamten Körper durchzieht. Der Gefäßdurchmesser reicht von wenigen Mikrometern in den Kapillaren bis zu mehreren Zentimetern in der Aorta und den großen Venen. Viskose Kräfte und laminare Strömungen dominieren im Blutgefäßsystem, während turbulente Strömungen praktisch keine Rolle spielen.

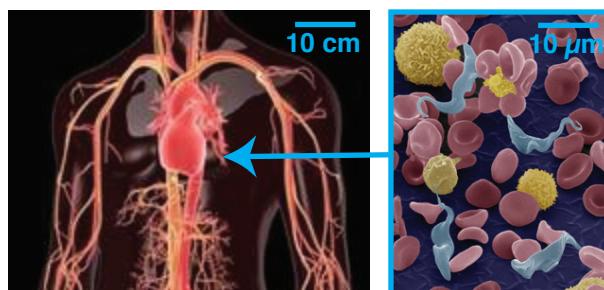


Abb. 51 | Schematische Darstellung des komplexen Lebensraums der afrikanischen Trypanosomen. Trypanosomen befinden sich im Blutkreislaufsystem in ständiger Gegenwart hydrodynamischer Kräfte, einer hohen Konzentration an Blutzellen bzw. extrazellulären Netzwerken.

Da bislang kein etabliertes Modell für Blutkapillaren existiert, ist über die Motilität der frei im Blut schwimmenden Trypanosomen unter physiologischen Bedingungen bisher praktisch nichts bekannt. Im Wirtskörper befinden sich Trypanosomen immer in der hydrodynamischen Strömung einer dynamischen Umwelt. Dies gilt sowohl im Blutkreislauf, als auch in der interstitiellen Flüssigkeit. Dabei variiert die Flussgeschwindigkeit in hohem Maße, und liegt dennoch um Größenordnungen höher als die eigene aktive Schwimmgeschwindigkeit der Trypanosomen, die gleichsam vom Strom mitgerissen

werden. In Anbetracht dieser Tatsache darf man sich fragen, warum Trypanosomen überhaupt schwimmen.

Um die hydrodynamischen Effekte auf die Parasiten zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit mikrofluidische Geräte hergestellt. In diesen künstlichen Kapillaren kann sowohl die Strömungsgeschwindigkeit als auch die (zelluläre) Zusammensetzung des Fluids frei eingestellt werden. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass sie den physiologischen Bedingungen in echten Blutkapillaren möglichst ähneln.

Gefäßtyp	Flussrate (m s ⁻¹)	Durchmesser (cm)	Volumen (cm ³)	Reynoldszahl	Flußtyp
Aorta (Systole)	1,2	1,2 cm	180	2727	turbulent
Aorta (Mittel)	0,4	1,2 cm	180	909	laminar
Arterie	0,1	1 cm	250	227	laminar
Arteriole	0,015	0,002	125	0,07	laminar
Kapillare	0,001	0,0008	300	0,002	laminar
Venole	0,01	0,00025	550	0,006	laminar
Vena cava	0,06	3	250	400	laminar

Tabelle 7 | Innerhalb des Blut-Kreislauf-Systems variieren Gefäßdurchmesser, Flussgeschwindigkeit und damit auch die auftretenden hydrodynamischen Kräfte beträchtlich. In der Tabelle sind diejenigen physikalischen Eigenschaften der unterschiedlichen Arten von Blutgefäßen aufgelistet, die aus hydrodynamischer Sicht eine Rolle spielen und für die Berechnung der Reynoldszahl (Re) verwendet wurden. Die Reynoldszahl ist ein Maß für das Verhältnis von Trägheits- zu viskosen Kräften und bestimmt darüber, ob laminare oder turbulente Strömungen vorherrschen.

Die Reynoldszahl ist ein Maß dafür, ob sich laminare oder turbulente Strömungen ausbilden. Turbulente Strömungen treten in einer Röhre nur oberhalb einer Reynoldszahl von etwa 2300 auf. In den kleinen Blutgefäßen dominieren viskose Kräfte und es liegen laminare Strömungen vor (Tabelle 7). Die Reynoldszahl reicht von 10^{-4} in den Kapillaren bis hin zu etwa 3×10^3 in der Aorta. In letzterer können daher auch turbulente Strömungen auftreten.

6.3.1 In vivo sind Trypanosomen starken Scherkräften ausgesetzt

Trotz der relativ geringen Strömungsgeschwindigkeit sind die Scherkräfte in der laminaren Strömung der Kapillaren aufgrund ihres geringen Durchmessers besonders hoch (Abkarian und Viallat, 2008). Die Erythrozyten sind daher besonders flexibel und

verformen sich in den Kapillaren (Korin *et al.*, 2007). Diese Scherkräfte müssen auch die Trypanosomen im Blutsystem aushalten können. In den teilweise unter 5 μm breiten artifiziiellen Mikrokanälen wurden die Trypanosomen im Experiment sogar noch größeren Scherkräften ausgesetzt, als sie unter natürlichen Bedingungen auftreten. Dass sie diesen widerstehen konnten, ist nur mit der bemerkenswerten Flexibilität ihres Zytoskelettes bestehend aus subpellikulären Mikrotubuli zu erklären.

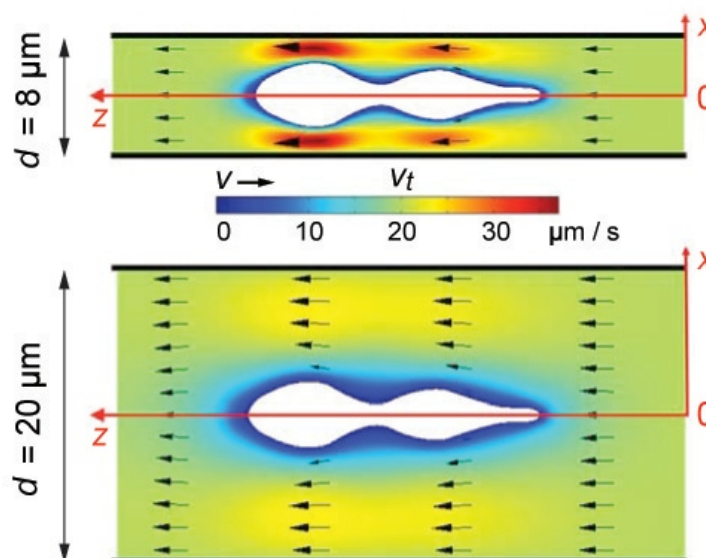


Abb. 52 | *In silico* FEM-Simulation der Strömung in Kapillaren mit 8 bzw. 20 μm Durchmesser. Je schmaler die Kapillaren, desto größer sind die auftretenden Geschwindigkeitsgradienten an der Zelle und damit die Scherkräfte (Engstler *et al.*, 2007).

Jede Flüssigkeit, die sich entlang einer stationären Grenzfläche bewegt, übt dort eine Scherkraft aus. Bei der “no-slip condition” geht man in der Strömungsphysik davon aus, dass die Flußgeschwindigkeit der Grenzschicht gleich Null ist. In einem Abstand von der Grenzschicht, dagegen kann sich das Fluid ungehindert bewegen. Die Region zwischen diesen beiden Punkten wird als Grenzschicht bezeichnet. Die dort auftretende Scherkraft (t) ist direkt proportional zum jeweiligen Geschwindigkeitsgradienten und kann berechnet werden durch:

$$t = \mu \cdot \frac{v}{h}$$

Dabei ist μ die dynamische Viskosität des Fluids, v die Geschwindigkeit des Fluids entlang der Grenzschicht, und h die Höhe der Grenzschicht.

Poiseuille entdeckte bereits 1836, dass sich unter Flussbedingungen um die Blutgefäßwände herum eine Plasmaschicht ausbildet, die frei von Erythrozyten ist. Dieser Effekt wurde 1931 von Fahräus und Lindquist bestätigt und als die Ursache der Abnahme der Viskosität des Blutes mit steigender Fließgeschwindigkeit erkannt (Matas *et al.*, 2004). Unter nicht-Flussbedingungen liegt die Viskosität des Blutes bei etwa 30 bis 70 mPa·s und bei einer Scherrate von mehr als 400 s⁻¹ sinkt diese auf 4 - 7 mPa·s (Sakai *et al.*, 2009). Tatsächlich erfahren alle nicht-rotationssymmetrischen Objekte in einem Fluss eine hydrodynamische Kraft, die sie in Richtung der geringeren Scherrate in die Kanalmitte treibt (Norman *et al.*, 2005; Sakai *et al.*, 2009). Allerdings hängt die laterale Anordnung im Kanal in nicht-trivialer Weise auch noch von weiteren Parametern, wie der spezifischen Dichte, Viskosität, Elastizität, Partikelgröße, Kanaldurchmesser, oder der Partikkonzentration ab (Matas *et al.*, 2004; Norman *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2007). Die Oberflächenbeschaffenheit der Kapillare spielt dagegen eine untergeordnete Rolle, da bei laminaren Strömungen im Bereich der kleinen Reynoldszahlen keine Turbulenzen auftreten können, die die Flussrate beeinflussen würden.

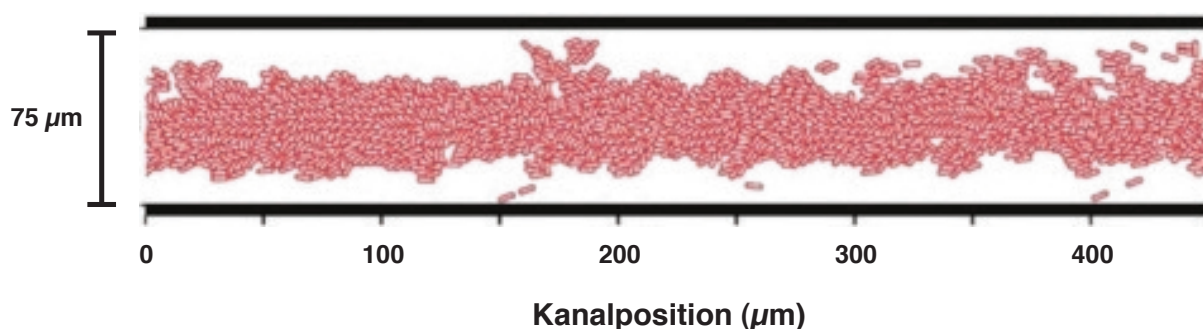


Abb. 53 | Auf die nicht-rotationssymmetrischen Erythrozyten wirkt unter Flussbedingungen eine hydrodynamische Kraft, die die Zellen in der Kanalmitte anreichert. Illustration modifiziert nach Tsubota *et al.* (2006).

In der Randregion bewirkten die Scherkräfte eine kreiselnde Bewegung der Trypanosomen, während die Zellen in der Kanalmitte tendenziell parallel zur Flussrichtung ausgerichtet wurden. Diese hydrodynamischen Effekte machen es aus physikalischer Sicht zu einer echten Herausforderung für ein Trypanosom in die Nähe der Kanalwand zu gelangen, im Fluss abzubremsen oder die Endothelwand der Gefäße zu überwinden (Extravasation). Eine Anheftung an bestimmte Gefäßwände, wie sie bei *T. cruzi* gefunden wurde, würde dies deutlich erleichtern (Kleshchenko *et al.*, 2004).

Die annähernd rotationssymmetrischen Leukozyten sind dagegen schon in der Lage, dicht in die Nähe der Kanalwände zu gelangen, was eine Grundvoraussetzung für deren "rollende Adhäsion" über Selektine und Integrine an der Gefäßwand und Extravasation in entzündetes Gewebe ist, um dort ihre Funktion ausführen zu können (Zarbock und Ley,

2009). Trypanosomen sind nicht rotationssymmetrisch und verhalten sich daher aus hydrodynamischer Sicht eher wie Erythrozyten. Die mikrofluidischen Experimente haben gezeigt, dass die motilen Trypanosomen dennoch aktiv ihre laterale Position beeinflussen können (Abb. 49) und so zumindest vorübergehend Kontakt zu der Kanalwand aufnehmen können. Die statistische Verteilung stellt somit ein sehr dynamisches Gleichgewicht der lateralen Verteilung dar. Auch für motile Algen wurde in der Literatur eine Wanderung in einer hydrodynamischen Strömung (Rheotaxis) gezeigt, die eine aktive Bewegung der Zellen voraussetzt (Kessler *et al.*, 1985).

Die hier *in vitro* durchgeführten Experimente könnten künftig ergänzt werden durch mikroskopische Untersuchungen direkt im Tiermodell. Zebrafische würden sich hierfür besonders eignen, da sie transparent sind und ihre Blutgefäße direkt mikroskopiert werden können. Es sollte daher möglich sein, Fluoreszenz-markierte Trypanosomen direkt im Blutkreislauf *in vivo* zu untersuchen.

6.4 Warum schwimmen Trypanosomen?

Die Notwendigkeit der Motilität ist offensichtlich beim Fliegenstadium, welches aktiv in der Tsetsefliege vom Fliegendarm in die Speicheldrüsen migrieren muss, um einen neuen Wirt infizieren zu können. Weniger offensichtlich ist dies bei den Blutstromformen, da diese im Wirt andauernd Strömungseffekten unterworfen sind, sei es im Blutkreislauf oder in der interstitiellen Flüssigkeit. Die Strömungsgeschwindigkeit ist dabei um Größenordnungen höher als die eigene Schwimgeschwindigkeit.

6.4.1 Ausbreitung im Wirt

Die afrikanischen Trypanosomen werden ausschließlich von der Tsetsefliege (*Glossina spec.*) übertragen. Diese gehört zu den Bissmücken (*Tabaniden*) und nicht zu den Stichmücken (*Culiciden*). Beim Biss der Tsetsefliege werden die Trypanosomen daher subkutan injiziert und sind in der frühen Phase der Infektion nicht im Blut direkt nachweisbar sondern nur im Kollagennetzwerk des Gewebezwischenraumes um die Infektionsstelle herum (Mwangi *et al.*, 1995). Das bedeutet nun auch, dass die Trypanosomen aus eigener Kraft in den Blutkreislauf gelangen müssen. Aufgrund des dichten Netzes kleinster Kapillaren im Körper des Säugerwirtes ist die nächste Kapillare der Haut nur wenige Zelllängen entfernt. Um solch kurze Distanzen zu überwinden, ist die Geschwindigkeit der Trypanosomen mehr als ausreichend.

Auch Erreger, die durch eine Stichmücke übertragen werden, wie z.B. die durch *Anopheles* übertragenen Malaria-Erreger, werden nicht direkt in die Blutbahn injiziert, da der austretende Blutstrom dies verhindert. Erst etwa eine Stunde nach der Infektion sind

die Sporozoiten in Blutkapillaren (70%) und in Lymphgefäßen (30%) zu finden (Amino *et al.*, 2005). Trypanosomen dagegen sind zuerst im Lymphsystem zu finden und können erst etwa eine Woche nach der Infektion im Blut nachgewiesen werden.

Für Plasmodium Sporozoiten wurde gezeigt, dass diese mit durchschnittlich $1 \mu\text{m s}^{-1}$ von der Einstichstelle aus aktiv durch das Hautgewebe migrieren, bevor die ersten Zellen in oberflächennahe Blutkapillaren eindringen (Frischknecht, persönliche Kommunikation). Als intrazellulär vorkommender Parasit ist *Plasmodium* in der Lage, Zellen zu traversieren. Ob Plasmodium dies nutzt um in das Blutgefäßsystem einzudringen ist nicht bekannt. Ebenso ist noch ungeklärt, ob Trypanosomen durch die Endothelzellen selbst in die Blutkapillaren einwandern können, oder aber eine Lücke zwischen den Zellen finden müssen. Der Gedanke liegt nahe, dass ihr spitz zulaufendes, kräftiges Zugflagellum dabei als Tastsensor funktioniert.

6.4.2 Strömungsinduzierte Sortierung von Membranproteinen

Bei der humoralen Immunantwort bildet der Säugewirt Antikörper, die spezifisch an die VSG-Oberflächenproteine der Blutstromform Trypanosomen binden. Die gebundenen Antikörper rekrutieren das Komplementsystem des Wirtes, welches eine Lyse der Antikörper-behafteten Zellen bewirkt (Forlenza *et al.*, 2009).

In gerade einmal 12,5 min kann ein Trypanosom jeweils ein komplettes Oberflächen-äquivalent endozytieren (Overath und Engstler, 2004). Damit besitzen Trypanosomen die höchste bisher beschriebene Endozytoserate. Bei der Endozytose werden auch gebundene Antikörper aufgenommen, abgespalten und im Lysosom degradiert, während die ebenfalls aufgenommenen VSG Oberflächenproteine wieder zurück auf die Oberfläche gebracht werden. Die Flagellartasche ist der einzige Bereich der Plasmamembran, der von der zytoplasmatischen Seite her nicht von dem dichten subpellikulären Mikrotubuli-Skelett abgeschirmt wird und daher für die Exo- und Endozytose genutzt werden kann. Gebundene Antikörper können daher nur im Bereich der Flagellartasche, die etwa 3% der Gesamtoberfläche ausmacht und am posterioren Ende der Zelle liegt, wieder entfernt werden. Allerdings können Antikörper an der gesamten Zelloberfläche binden und nicht nur am posterioren Ende.

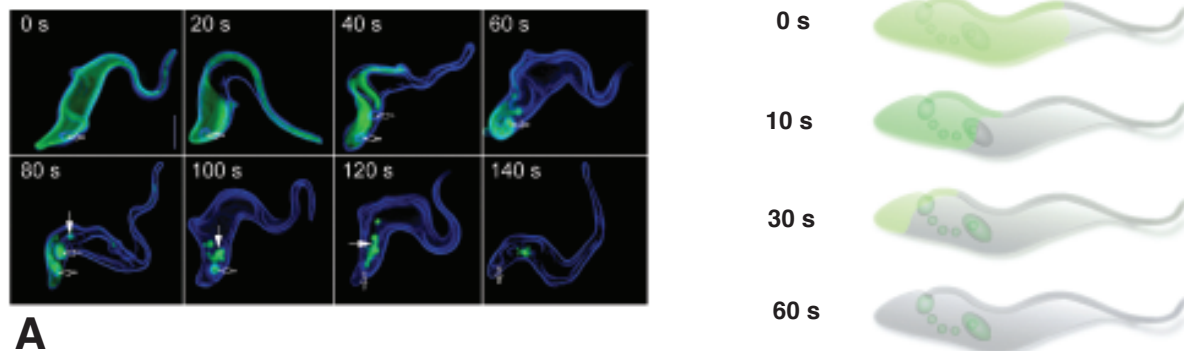
Wie aber gelangen die VSGs mit den gebundenen Antikörpern in die Nähe der Flagellartasche? Da VSGs über den GPI-Anker nur von der Aussenseite der Zelle her in der Plasmamembran stecken, ist es unwahrscheinlich, dass intrazelluläre Motorproteine daran beteiligt sind. Die laterale Diffusion der Membranproteine bleibt als naheliegende Erklärung. Da Diffusion jedoch immer ungerichtet ist, stellt diese über größere Strecken eine sehr ineffiziente Form der Bewegung dar. Overath und Kollegen bestimmten den Diffusionskoeffizienten der VSG-Oberflächenproteine auf immobilisierten Trypanosomen

durch FRAP-Messungen bei 37°C als $1 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Bülow *et al.*, 1988). Daraus kann die durchschnittliche Zeit errechnet werden, die die VSG Moleküle benötigen um von der einen Seite der Zelle zu der gegenüberliegenden zu diffundieren. Für eine Strecke (d) von 20 μm , was der Länge eines Trypanosoms entspricht, wären das bei diesem Diffusionskoeffizienten (D), eingesetzt in die, nach der Zeit (t) aufgelöste Gleichung für Diffusion im zweidimensionalen Raum etwa 10.000 Sekunden (fast 3 h):

$$t = \frac{d^2}{4D}$$

Damit ist die ungerichtete Diffusion viel zu langsam, um in der erforderlichen Zeit sämtliche, über die ganze Zelloberfläche verteilt gebundenen Antikörper in die Nähe der Flagellartasche zu transportieren, wo sie endozytiert werden können. Im Experiment war bereits nach ca. 60 s nach Zugabe Fluoreszenz-gefärbter spezifischer VSG-Antikörper das Fluoreszenzsignal im anterioren Teil der Zelle verschwunden (Abb. 54).

nach Erwärmung auf 37 °C:



A

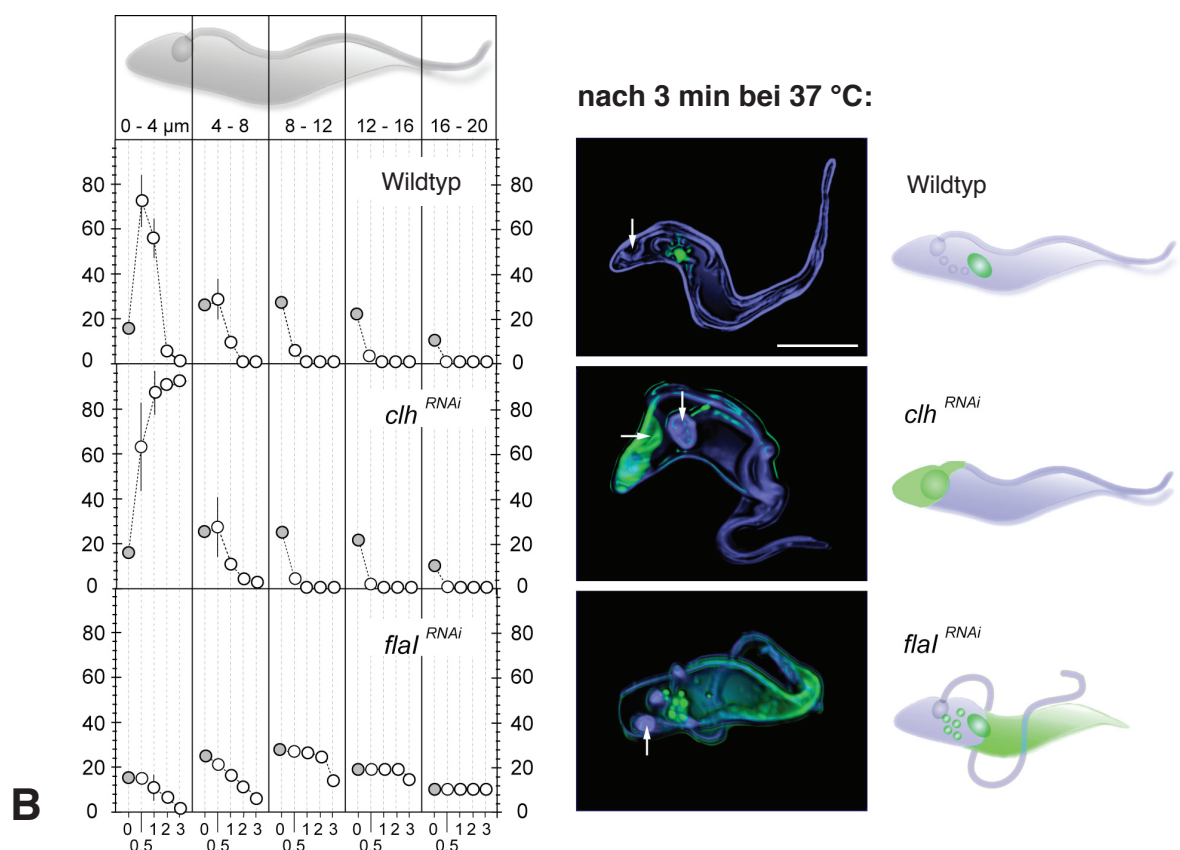


Abb. 54 | Beschleunigte Degradation gebundener Antikörper durch hydrodynamische Strömungseffekte. A Die Zelloberfläche von BSF Trypanosomen (blau durch AMCA-Sulfo-NHS angefärbt) wurde mit spezifischen Antikörpern gegen VSG gefärbt (grün). Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte auf geschmolzenem Eis. Nach Erwärmung auf 37 °C wandern die AK zunehmend in Richtung der posterioren Seite der Zelle, wo diese innerhalb nur einer Minute nahezu komplett endozytiert werden. **B** Nach 3 min sind in Wildtyp Trypanosomen die Antikörper vollständig im Lysosom lokalisiert. Bei der Endozytose-defizienten *clh*^{RNAi} Mutante, in der die schwere Kette von Clathrin mittels RNA-Interferenz herunterreguliert wurde, sind die Antikörper zwar nicht im endosomalen Apparat zu finden, aber dennoch am posterioren Pol der Zelloberfläche akkumuliert. In der immotilen Mutante *flal*^{RNAi} ist das Flagellum von der Oberfläche abgelöst. Hier sind nach 3 Minuten die gebundenen Antikörper auf der anterioren Seite der Zelloberfläche zu finden, während diese auf der posterioren Seite größtenteils durch Endozytose in den endosomalen Apparat aufgenommen wurden. Abbildung modifiziert nach (Engstler *et al.*, 2007); Größenbalken = 5 μm

Die gebundenen Antikörper werden durch hydrodynamische Kräfte wie “molekulare Segel” auf der Zelloberfläche gerichtet entgegen der Schwimmrichtung zur Flagellartasche getrieben (Engstler *et al.*, 2007). Um diese hydrodynamischen Effekte zu nutzen, ist die Motilität der Zellen eine Grundvoraussetzung. Durch die Kombination von gezielter Sortierung der gebundenen Antikörper hin zur posterioren Seite der Zelle in Kombination mit der dort extrem hohen, lokalisierten Endozytoserate kann so die Aufnahme von Antikörpern beschleunigt werden. Vor allem in der frühen Phase einer aufkommenden Immunantwort dürften die Trypanosomen davon profitieren und so die Chance auf einen erfolgreichen Wirtswechsel erhöhen.

Bei immotilen Mutanten, bei denen durch RNA-Interferenz gegen Fla1 (flagellar attachment protein) das Flagellum von der Zelloberfläche abgelöst ist (LaCount *et al.* 2002), trat keine solche Sortierung gebundener Antikörper auf. In Mutanten mit umgekehrter Schwimmrichtung (Kapitel 5.4), nach RNA-Interferenz gegen DIC (dynein intermediate chain) kam es zu einer Richtungsumkehr der Akkumulation der Antikörper, nun am anterioren Zellpol (Engstler *et al.*, 2007). Die Herabregulation von Clathrin und Aktin, welche für die Endozytose bei *T. brucei* essentiell sind (Overath und Engstler, 2004; García-Salcedo *et al.*, 2004), dagegen hatte keinen Einfluss auf die posteriore Akkumulation der Antikörper, verhinderte jedoch deren Internalisierung durch Endozytose an der Flagellartasche (Abb. 54; Engstler *et al.*, 2007; Dean und Matthews, 2007).

Die Art und Geschwindigkeit der Bewegung der Trypanosomen, die in dieser Arbeit untersucht wurde, ist ausreichend, um die postulierten hydrodynamischen Kräfte zu erzeugen. Dabei spielt es keine Rolle, in welche bestimmte Richtung die Zelle schwimmt. Demnach stören auch Richtungswechsel nicht, solange die Zelle mit ausreichender Persistenz mit dem Flagellum voran schwimmt.

Das Flagellum von *T. brucei* ist ein Organell mit multiplen Funktionen

Die aktive Motilität erlaubt es den Trypanosomen in Gewebe vorzudringen, die für das Immunsystem weniger leicht, oder gar nicht zugänglich sind - man spricht dabei auch von “immunoprivilegierten” Geweben. Das zentrale Nervensystem und die Gonaden zählen dazu. In beiden kommen Trypanosomen in späteren Phasen der Infektion vor (Claes *et al.*, 2009). Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke erschwert zudem die Medikation sehr, da sie für die meisten Medikamente nicht permeabel ist. Die Symptome der afrikanischen Schlafkrankheit sind ebenfalls eine Konsequenz der Infektion des ZNS.

Die motilitätsvermittelte Immunevasion ist ein großer Vorteil für Trypanosomen im Säugewirt. Es ist jedoch inzwischen zweifelsfrei geklärt, dass die Motilität für Blutstromformen auch in Zellkultur essentiell ist, obwohl hier eine Immunevasion gar nicht erforderlich ist.

Das Flagellum der Trypanosomen hat multiple Funktionen übernommen (Bastin *et al.*, 2000; Kohl *et al.*, 2003). Der Schlag des Flagellums dient nicht nur der Migration durch Wirt und Insektenvektor, sondern spielt auch eine Schlüsselrolle bei der Zytogenese in Blutstromformen (Broadhead *et al.*, 2006; Ralston *et al.*, 2006) und der korrekten Positionierung der Organellen (Robinson und Gull, 1991). Die Insektenstadien adhärrieren zudem mit ihrem Flagellum in der Fliege an die Epithelzellen der Speicheldrüsen (Tetley und Vickerman, 1985) um von dort bei der Blutmahlzeit einen neuen Säugerwirt zu infizieren.

6.5 Trypanosomen als Modellsystem für die Evolution zellulärer Motilität

Trypanosomen sind beinahe ubiquitär als Parasiten zu finden, von Fischen bis hin zu Vögeln. Da es unterschiedliche Arten von Trypanosomen gibt, die sich auf unterschiedliche Wirte spezialisiert haben, bieten diese die Möglichkeit die Entwicklung der Motilität im Zuge der Koevolution von Wirt und Parasit zu untersuchen. So besitzt *Trypanosoma brucei* ein angeheftetes Flagellum, *Leishmania major* ein freies Flagellum und *Trypanoplasma borelli* ein angeheftetes und zusätzlich noch ein freies Flagellum. Auch wenn sich die physikalischen Eigenschaften des Flagellarschlages der unterschiedlichen Arten in Frequenz, Amplitude und Schlagrichtung unterscheiden (Kapitel 5.6; Tabelle 2) sind diese in ihrer jeweiligen Umwelt doch hoch motil. Bei *Leishmania major*, die ebenfalls als Parasiten im Säugerwirt leben, steht das freie Zugflagellum von der anterioren Seite der Zelle ab und vollführt einen regelmäßigen planaren Schlag (Gadelha *et al.*, 2007). Allerdings kommen Leishmanien im Blut nicht extrazellulär vor, sondern intrazellulär in Makrophagen. Nach Aufnahme in die Makrophagen durch Phagozytose verlieren Leishmanien ihre Geißel, welche man dann als amastigote Form bezeichnet. Dies ist auch bei *Trypanosoma cruzi* der Fall, die intrazellulär in Erythrozyten vorkommen. *T. brucei* kommt dagegen strikt extrazellulär vor und besitzt daher in allen Stadien ein funktionsfähiges Flagellum.

Motile Zellen, die in niedrig-viskosen Flüssigkeiten leben, werden durch einen planaren Flagellenschlag effizient angetrieben. Die extrazellulär im Wirt frei vorkommenden Trypanosomen dagegen mussten sich an eine komplexe Mikroumwelt anpassen, die mit einem allzu raumgreifenden Schlag eines freien Flagellums interferieren würde. Die Korkenzieher-artige helikale Bewegung (Kapitel 5.3.1) erlaubt es *T. brucei*, die Hindernisse, die die Umwelt entgegenstellt sogar noch für eine effizientere Fortbewegung zu nutzen. Die Insektenstadien von *T. brucei* waren dagegen in nieder-viskosem Medium motiler als die Blutstromformen (Kapitel 5.7.7; Abb. 37). Dies zeigt die evolutionäre Anpassung der Trypanosomen an ihre Mikroumwelt. Insgesamt bieten die Kinetoplastiden damit eine hervorragende Sammlung von Studienobjekten, um die Evolution der Motilität zu untersuchen, zumal für diese bereits etablierte gentechnische Methoden und eine Reihe Motilitätsmutanten verfügbar sind.

7. Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Verwendete Kameras für die Mikroskopie

In Tabelle 8 sind die verwendeten Kameras aufgelistet. Die Aufnahmezeit einer CCD-Kamera hängt auch ab von der Größe des Bereiches, der vom Chip ausgelesen wird (AOI). Die in der Tabelle angegebenen Bildraten gelten für den maximalen Bildbereich. Je größer dieser Bereich, desto länger dauert zum einen die Auslesezeit selbst, aber auch die benötigte Zeit für die Übertragung der digitalen Daten von der Kamera in den Arbeitsspeicher des angeschlossenen Computers. Tatsächlich erwies sich diese Übertragungsgeschwindigkeit oft als limitierend, obwohl die schnellste verfügbare Übertragungsart (CamLink) verwendet wurde. Ein weiterer limitierender Faktor ist die Schreibgeschwindigkeit der Daten auf Festplattenspeicher, die langsamer ist, als die Datentransferrate via CamLink. Daher wurden besonders schnelle Festplatten verwendet, die zu einem RAID-Verbund zusammengeschlossen waren, so dass die Schreibgeschwindigkeit, durch Aufteilung der nötigen Schreibzugriffe auf mehrere verschiedene Festplatten gleichzeitig, erhöht wurde.

Kamera	Typ	Hersteller	Bildrate (fps)	Anmerkung
Phantom v9.1	CMOS	Vision Research	1000	für Hochgeschwindigkeitsaufnahmen
pco.1200 hs	CMOS	pco	491	für Mikrofluidik
pco.edge	sCMOS	pco	200	für Fluoreszenzaufnahmen
Pike	CCD	AVT	30	
pco.1600	CCD	pco	30	interner Speicher (4 GB)
Sensicam qe	CCD	pco	10	hohe Quanteneffizienz

Tabelle 8 | Verwendete Kameras

7.1.2 Verwendete Zellen

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche *T. brucei brucei* Wildtyp Blutstromform-Zelllinien für die Motilitätsexperimente verwendet, Stamm 427 (Cross, 1975); Molteno Institute Trypanozoon antigen type 1.2, 1.1 und 1.6. Für Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen fanden auch unterschiedliche transgene, Fluoreszenz-markierte Zelllinien Verwendung (s. Kapitel 5.4), basierend auf der Zelllinie 13-90. Ebenfalls auf der 13-90-

Ausgangszelllinie basierten die RNAi-Motilitätsmutanten pZJM.Actin, pZIM.DIC und p2T7.FlaI. Als prozyklische Zellen (Insektenstadien) wurde die Zelllinie 29-13 (Wirtz *et al.*, 1999) verwendet. Die Blutstromformen wurden in HMI-9 Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und die Insektenstadien in SDM-79 Medium bei 27°C in Anwesenheit der jeweils nötigen Selektion. *Trypanoplasma borelli* (s. Kapitel 5.6) und das entsprechende Zellkulturmedium nach Forlenza *et al.* (2009) wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G. Wiegertjes (Wageningen, Niederlande) bzw. N. Jones (dies Labor).

HMI-9-Medium zur Kultivierung von monomorphen BSF Trypanosomen

Basierend auf Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) dem pro Liter zugesetzt wurden: 3,024 g NaHCO₃; 136 mg Hypoxanthin; 82,2 mg Bathocuproinsulfonat; 0,2 mM β-Mercaptoethanol; 39 mg Thymidin; 100.000 Einheiten Penicillin; 100 mg Streptomycin; 182 mg Cystein; 10% FCS; nach Hirumi und Hirumi (1989) und modifiziert durch Vassella und Boshart (1996).

Kryokonservierung von Trypanosomen

Jeweils 4 x 10⁶ Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 1.400g, 4°C geerntet und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, das 10% (v/v) Glycerin enthielt. Die Zellen wurden langsam in einer Styroporbox auf -80°C gekühlt und dann bei -150°C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert.

Bakterienkultur

E. coli DH5α (Clontech, Heidelberg):

Genotyp F- deoR endA1 hsdR17 (rk- mk-) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(argFV196-lacZYA) φ80 lacZΔM15

LB-Medium (nach Luria und Bertani):

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l ddH₂O, pH 7.0

Für die Selektion von Transformanden wurde 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Für die Herstellung von Agarplatten wurden 17 g Agar zu je 1 l LB Medium hinzugefügt.

SOB (super optimal broth) Medium:

20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 600 mg NaCl, 200 mg KCl, 2 g MgCl₂, 2.5 g MgSO₄, ad 1 l ddH₂O, pH 7.0

Einfriermedium für Bakterien (2x konzentriert):

25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM MgSO₄, 65% Glycerol

7.1.3 Materialien für die Klonierung

Die Restriktionsverdauung, Ligation, Gelaufreinigung, Transformation in *E. coli* und Plasmidpräparation erfolgte gemäß den Standardprotokollen des jeweiligen Herstellers der verwendeten kommerziellen Kits und Enzyme, bzw. wie beschrieben in Engstler *et al.* (2005).

Kit	Hersteller
Jetquick PCR Clean-Up	Genomed (Löhne)
NucleoSpin Extract II	Machery & Nagel (Düren)
NucleoSpin Plasmid	Machery & Nagel (Düren)
NucleoBond PC100 und PC500	Machery & Nagel (Düren)
Aurum total RNA, mini	Bio-Rad (München)
BigDye Terminator, V3.1 sequencing	Applied Biosystems (Darmstadt)

Tabelle 9 | Verwendete Kits

Enzym	Hersteller
Calf intestinal phosphatase (CIP)	NEB
Klenow Polymerase, große Untereinheit der DNA Pol I	NEB
Phusion Polymerase	NEB
Restriktionsendonukleasen	NEB / Fermentas
T4 DNA Ligase	NEB
Taq Polymerase	NEB

Tabelle 10 | Verwendete DNA-modifizierende Enzyme

Vektor	Anmerkung	Hersteller
pBSK	high copy <i>E.coli</i> Plasmid	Stratagene (Heidelberg)
pLew82	starker Expressionsvektor in <i>T. brucei</i> ; integriert in die ribosomale Spacer Region	E. Wirtz and G. Cross (New York, USA)
pLew82ΔOp	wie pLew82, jedoch ist der Tet-Operator deletiert	A. Best (Darmstadt)
pTsaRib	Expressionsvektor in <i>T. brucei</i> ; integriert in rDNA Promotor Region	E. Pays (Brussels, Belgium)
pKD4f	Starker Expressionsvektor in <i>T. brucei</i> ; integriert in die 221 VSG expression site	M. Engstler and G. Cross (New York, USA)
pDEX377	Expressionsvektor in <i>T. brucei</i> ; integriert in die ribosomale Spacer Region	M. Carrington, (Cambridge, UK)
p2T7	RNAi Vektor für <i>T. brucei</i> ; integriert in die ribosomale Spacer Region	J. Donelson (Iowa City, USA)
p2675	Vektor für die Herstellung N-terminaler Fusionsproteine mit eYFP in situ	M. Carrington, (Cambridge, UK)

Tabelle 11 | Verwendete Vektoren für die Herstellung transgener Zelllinien

7.1.4 Standard-Pufferlösungen

Cytomix:

Cytomix wurde verwendet bei der Transfektion von *T. brucei* durch Elektroporation.
25 mM HEPES, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.6, 2 mM EGTA, 120 mM KCl, 150 μM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0.5% Glucose, 1 mM Hypoxanthin, 100 μg/ml BSA

TDB (trypanosome dilution buffer):

20 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, pH 7.7, 20 mM Glucose, 5 mM KCl, 80 mM NaCl, 1 mM MgSO₄

TAE:

Verwendet als Laufpuffer bei der Gelelektrophorese.
40 mM Tris-HCl, 40 mM Eisessig, pH 8.0, 1 mM EDTA

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA

Puffer für SDS-PAGE / Western-Blot

Trenngelpuffer:

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS

Sammelgelpuffer:

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% SDS

Acrylamid-Lösung:

30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)

Lämmillaufpuffer (10x):

250 mM Tris, pH 8.8, 1% SDS, 1.92 M Glycin

Lämmilladepuffer (2x):

200 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 10% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau

Anodenpuffer I:

300 mM Tris, pH 10.4, 20% Methanol

Anodenpuffer II:

25 mM Tris, pH 10.4, 20% Methanol

Kathodenpuffer:

25 mM Tris, pH 9.4, 40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % Methanol

7.1.5 Antikörper

α GFP:

Polyklonaler Antikörper (Kaninchen), Molecular Probes (Eugene, USA)

1:100 verdünnt für die Immunfluoreszenzmikroskopie

α Actin:

Polyklonaler Antikörper (Kaninchen), D. Nolan (Dublin, Irland)

1:1000 verdünnt für die Western Blot Quantifizierung

α VSG221:

Polyklonaler Antikörper (Kaninchen), G. Cross (New York, USA)

1:100 verdünnt für die Immunfluoreszenzmikroskopie

α PFR (Paraflagellar rod Protein):

Monoklonaler Antikörper (Maus), K. Gull (Oxford, UK)

1:5000 verdünnt für die Western Blot Quantifizierung

α p67:

Monoklonaler Antikörper (Maus), J. Bangs (Madison, USA)

1:1000 verdünnt für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Alexa FluorTM 488 α Maus-IgG Sekundärantikörper:

Polyklonaler anti-Maus-IgG Antikörper (aus der Ziege), Invitrogen

1:1000 verdünnt für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Alexa FluorTM 488 α Kaninchen-IgG Sekundärantikörper:

Polyklonaler anti-Kaninchen-IgG Antikörper (aus der Ziege), Invitrogen

1:1000 verdünnt für die Immunfluoreszenzmikroskopie

anti-Maus-IgG IRDye700-Konjugat:

Monoklonaler AK aus der Ziege, LI-COR

1:5000 verdünnt für die Western Blot Quantifizierung mit dem Odyssey-System (LI-COR)

anti-Kaninchen-IgG IRDye800-Konjugat

Monoklonaler AK aus der Ziege, LI-COR

1:5000 verdünnt für die Western Blot Quantifizierung mit dem Odyssey-System (LI-COR)

7.1.6 Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller	Verwendung
Agar	Applichem	Bakterienkultur
Agarose, NEEO Ultra-Qualität	Roth	Gelelektrophorese
AMCA-Sulfo-NHS	Pierce	Fluoreszenzmikroskopie
4',6-di-Amidino-2-phenylindol (DAPI)	Applichem	Fluoreszenzmikroskopie
6-Amino-hexansäure	Roth	SDS-PAGE
Ammoniumperoxodisulfat, p.a.	Roth	SDS-PAGE
Ampicillin Natriumsalz	Roth	Bakterienkultur
Bathocuproin	Serva	Zellkultur
Biotin	Sigma-Aldrich	Fluoreszenzmikroskopie
Biozym LE Agarose	Biozym	Gelelektrophorese
Bromphenolblau	Merck	Gelelektrophorese
BSA Fraktion V	GE Healthcare	Fluoreszenzmikroskopie
L-Cystein	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Dextran, 40 kDa	Sigma-Aldrich	Viskositätserhöhung
Dextran, 100 - 200 kDa	Sigma-Aldrich	Viskositätserhöhung
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth	RNA
di-Kaliumhydrogenphosphat, p.a.	Roth	Zellkultur
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	Fluoreszenzmikroskopie
Dinatriumhydrogenphosphat, p.a.	Roth	Zellkultur
Dinatriumsalz, p.a.	Roth	Zellkultur
Dithiothreitol (DTT)	Applichem	Klonierung
Ethanol, p.a.	Roth	Nukleinsäurefällung
Ethidiumbromid	Roth	Gelelektrophorese
Ethylenglycol-N,N'-tetraacetat (EGTA), p.a.	Roth	Zellkultur
Extran	Merck	Mikrofabrikation
FKS (fötales Kälberserum)	Sigma-Aldrich	Zellkultur
FM1-43FX	Invitrogen	Fluoreszenzmikroskopie
G418 (Neomycin) Disulfat	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Glukose	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Glycerin	Roth	Kryokonservierung
Glycin	Applichem	SDS-PAGE
Glycogen	Roche	Klonierung
Glyoxal	Sigma-Aldrich	RNA-Gelelektrophorese
Hefeextrakt	Roth	Bakterienkultur
Hemin	Serva	Zellkultur
HEPES	Roth	Zellkultur
Hexamin-cobalt(III)-chlorid	Sigma-Aldrich	Klonierung
Hoechst 33342	Molecular Probes	Fluoreszenzmikroskopie
Hygromycin B	Roth	Zellkultur

Chemikalie	Hersteller	Verwendung
Hypoxanthin	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Invitrogen	Zellkultur
Kaliumchlorid, p.a	Roth	Zellkultur
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a	Roth	Zellkultur
Magnesiumchlorid-hexahydrat, p.a.	Roth	Bakterienkultur
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Merck	Bakterienkultur
Mangan(II)-chlorid-tetrahydrat	Roth	Klonierung
MEM (minimum essential medium)	Sigma-Aldrich	Zellkultur
MEM Vitamine	Invitrogen	Zellkultur
β-Mercaptoethanol	Roth	Zellkultur
Methanol	Roth	Western Blot
L-Methionin	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Methocel	Dow Chemical	Viskositäts­erhöhung
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Applchem	RNA-Gelelektrophorese
Natriumacetat wasserfrei, p.a.	Roth	Klonierung
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Natriumchlorid	Roth	Basischemikalien
Natriumdihydrogenphosphat	Roth	Basischemikalien
Natriumhydroxid	Roth	Basischemikalien
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Omnicoat	Microchem	Photolithographie
Paraformaldehyd	Merck	Fluoreszenzmikroskopie
PDMS, Sylgard kit	Dow Corning	Mikrofabrikation
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen	Zellkultur
Phleomycin	Cayla	Zellkultur
Puromycin-dihydrochlorid	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Rhodamin-Sulfo-NHS	Pierce	Fluoreszenzmikroskopie
Saccharose, p.a.	Roth	SDS-PAGE
Salzsäure, 37%	Roth	Basischemikalien
SDS, 20%ige Lösung	Applchem	SDS-PAGE
Seaplaque-Agarose GTG	Biozym	Gelelektrophorese
Siliziumscheiben	Si-Mat	Photolithographie
SU-8 2005 Photoresist	Microchem	Photolithographie
SU-8 Developer	Microchem	Photolithographie
Tetramethyldiamin (TEMED)	Applchem	SDS-PAGE
Tetranatriumpyrophosphat	Roth	RNA-Gelelektrophorese
Tetrazyklin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Thymidin	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Trichloressigsäure (TCA)	Roth	RNA-Gelelektrophorese
Trinatriumcitrat-Dihydrat	Roth	RNA-Gelelektrophorese
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Applchem	Basischemikalien

Chemikalie	Hersteller	Verwendung
Trypton / Pepton, MB grade	Roth	Bakterienkultur
Tween-20	Roth	Western Blot
Wasserstoffperoxid	Roth	RNA-Gelelektrophorese
Xylencyanol	Appllichem	Klonierung

Tabelle 12 | Liste der verwendeten Chemikalien

7.2 Methoden

7.2.1 Ermittlung von Trajektorien, Geschwindigkeiten und Distanzen

Die relativen Positionen und Distanzen wurden aus mikroskopischen Digitalaufnahmen in Pixeln gemessen und dann in Mikrometer konvertiert. Dies ist möglich, da die Pixelgröße der verwendeten Kamera sowie die optische Vergrößerung des Objektivs bekannt ist. Bei 100-facher Vergrößerung und einem regelmäßigen Abstand der einzelnen Pixel auf dem Kamerachip zueinander von 6,4 μm , entspricht ein Pixel in dem aufgenommenen Bild einem Abstand von 64 nm. Dieser Wert liegt unterhalb der optischen Auflösungsgrenze, weswegen es in diesem Fall keinen Sinn macht, mit Subpixel Genauigkeit zu messen. Um einen größeren Bildausschnitt zu erhalten und damit längere Trajektorien der motilen Zellen, wurden auch geringere Vergrößerungen verwendet (10x, 20x und 60x). Um die Geschwindigkeiten valide zu messen, ist neben exakt bekannten Distanzen auch unabdingbar, dass der genaue Aufnahmezeitpunkt einzelner Bilder aus Zeitserien bekannt ist. Dies wurde einerseits sichergestellt, durch eine, auf Millisekunden genaue Trigger-Steuerung der Kamera durch eine Echtzeit-Steuereinheit (ICU, TILL Photonics) und zum anderen durch nachträgliche Kontrolle der einzelnen, von der Kamera übertragenen, Zeitstempel der Einzelbilder.

Für die Motilitätsanalysen wurden die lebenden Trypanosomen entweder auf Standard Objektträgern mit 24 x 60 mm Deckgläschen, oder aber in zellkulturgeeigneten Kanälen mit 800 μm Höhe (ibidi GmbH, München) mikroskopiert. Zwischen Objektträger und Deckglas war die Bewegungsfreiheit der Zellen auf zwei Dimensionen reduziert, während in den höheren Kanälen eine freie Bewegung in drei Dimensionen möglich war.

Für eine Kantendetektion, die den Umriss der Zellen bei der Hochgeschwindigkeitsmikroskopie betont, wurde ein Sobel-Filter verwendet. Dabei werden für jeden Pixel zwei Konvolutionen hintereinander ausgeführt, die die 8 direkten Nachbarpixel berücksichtigen. Die beiden 3 x 3 Matrices, sind nachfolgend dargestellt. Die beiden Matrices gleichen sich, allerdings sind sie jeweils um 90 Grad zueinander gekippt.

-1	-2	-1
0	0	0
+1	+2	+1

+

-1	0	+1
-2	0	+2
-1	0	+1

Die beiden Matrices verstärken jeweils entweder nur Kanten in X oder Y Orientierung. Für die automatische Erkennung von von Trypanosomen folgten Grenzwertprüfung (Thresholding), Segmentierung und Mustererkennung (Template matching).

7.2.2 Chemische Färbung von Trypanosomen

Lebende Trypanosomen wurden durch Atto488-NHS (Atto-Tec, Siegen), Rhodamin-Sulfo-NHS, oder AMCA-Sulfo-NHS (Pierce, Rockford, IL) gefärbt. Diese Färbungen beruhen auf der kovalenten Kopplung der reaktiven NHS-Gruppe an primäre Amine der Zelloberfläche über Esterbindung. Dies geschah für 10 Minuten auf geschmolzenem Eis bei einer finalen Konzentration von 0,01 mM (Rhodamin) bzw. 1 mM (AMCA, Atto488). Ungebundener Farbstoff wurde danach durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem TDB entfernt (Zentrifugation bei 2.000 g für 90 Sekunden). Da diese Farbstoffe phototoxische Wirkung auf die Zellen haben, wurden die Zellen im Dunklen gefärbt und aufbewahrt.

7.2.3 Herstellung transgener Fluoreszenz-markierter Zelllinien

Um die, bei der chemischen Färbung auftretenden, zytotoxischen Effekte und eine damit verbundene Beeinträchtigung der Motilität der Zellen zu vermeiden, wurden zusätzlich auch transgene Zelllinien für die Motilitätsexperimente hergestellt (Kapitel 5.4), die Fluoreszenz-markierte Fusionsproteine exprimieren, wie z.B. eine Fusion von GFP an die leichte Kette von Clathrin, oder die (induzierbare) Expression eines fluoreszierenden VSG-Oberflächenproteins. Diese wurden generiert durch Transfektion der Zelllinie 13-90 mit einem Expressionsvektor, der einen T7-Promotor vor dem Fusionsprotein trägt. Dieser Expressionsvektor funktioniert in der Zelllinie 13-90, da diese eine heterologe T7-Polymerase exprimiert. Zusätzlich exprimieren die Zellen auch einen heterologen Tet-Repressor, weswegen die erzeugte Zelllinie die Vorteile der genetischen Manipulierbarkeit durch RNAi- oder Expressions-Vektoren und einer deutlichen Fluoreszenzfärbung von Zelloberfläche, Flagellum und Flagellartasche vereint. Die Klonierung erfolgte mittels, durch PCR-Primer eingefügter, HindIII und XbaI Schnittstellen in pLew82, pLew82v4 bzw. pLew82ΔOp. Alle diese Vektoren integrieren über homologe Rekombination in den ribosomalen Spacer und vermitteln eine starke Expression. Der Vektor pLew82v4 bietet gegenüber pLew82 den Vorteil, dass die Expression induzierbar ist, durch Zugabe von

Tetrazyklin (1,0 µg/ml). Die Resistenz wird dabei durch einen zusätzlichen 10% Tet-Operator vor der Resistenzkassette vermittelt. In pLew82ΔOp wurde der Tet-Operator komplett deletiert und so wird sowohl die Resistenz, als auch das Reportergen, auch ohne Zugabe von Tetrazyklin exprimiert (Best *et al.*, 2005).

Die Transfektion erfolgte durch Elektroporation mit einem Strompuls bei 1,5 KV, 175 Ω und 25 µF. Zuvor wurden die Zellen geerntet und gewaschen in Cytomix durch Zentrifugation für 10 min bei 1.400 g bei 37°C. In Elektroporationsküvetten wurden 10 µg linearisierte DNA gelöst in 10 µl ddH₂O mit 10⁷ Trypanosomen in 400 µl Cytomix gemischt. 16-18 h nach der Transfektion wurde dann die entsprechende Selektion zugegeben; s. auch Engstler *et al.*, (2005).

Die fluoreszierende VSG-Variante VSG'Y' (Engstler, unveröffentlicht) bietet sich für die Lebendfärbung von Trypanosomen für Motilitätsexperimente in besonderem Maße an, da auch in Langzeitversuchen über viele Stunden weder Phototoxizität noch Bleichung des Fluorophors auftrat. Diese Zelllinie wurde daher für die Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung des schlagenden Flagellums bei hoher optischer Vergrößerung verwendet (Ölimmersionsobjektive von Olympus mit 60x bzw. 100x Vergrößerung und 1,45 bzw. 1,4 NA).

7.2.4 Zellzyklusanalyse

Die Zellen wurden mit 4% (w/v final) Formaldehyd, hergestellt aus Paraformaldehyd (PFA), in 0,1 M HEPES-Puffer über Nacht bei 4°C fixiert und dann mit dem DNA-bindenden Farbstoff DAPI in einer finalen Konzentration von 0,5 µg/ml angefärbt. Von den Zellen wurden dann mit der JMic-Software automatisiert Stack-Aufnahmen mehrerer hundert Bildausschnitte bei 375 nm Wellenlänge mit einem DAPI-Filter mit einem 60x Objektiv (1,45 NA, Olympus) aufgenommen und die gespeicherten Aufnahmen (Multi-TIFF) nachträglich in ImageJ ausgewertet. Dabei wurden die statistische Verteilung der Zellen gemäß der Anzahl ihrer Nuklei (N) und Kinetoplasten (K) in den Gruppen 1K1N, 2K1N, 2K2N und "andere" ermittelt, vgl. Siegel *et al.* (2008). In einer Wildtyp-Population, die exponentiell wächst ist diese statistische Verteilung immer gleich. Die Motilitätsmutanten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, zeigten deutliche Abweichungen von der normalen Verteilung und es traten übermäßig viele Zellen mit zwei oder mehr Nuklei auf.

7.2.5 Immobilisierung von Zellen auf beschichteten Objektträgern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein "Jugend forscht" Projekt betreut (Maximilian Strauch und Katharina Gottschalk; geteilter 1. Platz, Hessen 2008) bei dem eine Methode entwickelt wurde, Objektträger mittels eines "Eintunkverfahrens" (Dip coating) gleichmäßig mit Agarose zu beschichten, um darauf lebende Trypanosomen zu immobilisieren. Dies verhindert zwar, dass sich die Zellen von der Stelle bewegen, der Schlag ihres Flagellums

wird dadurch jedoch nicht unterbunden, solange es keinen direkten Kontakt zu der Agarschicht hat. Die Zellen werden in kleinem Flüssigkeitsvolumen auf den mit Low-Melting Agarose beschichteten Objektträgern appliziert und kurz angetrocknet. Danach muss die Schicht feucht gehalten werden, oder mit Deckglas versehen gleich mikroskopiert werden.

7.2.6 Photolithographische Herstellung von PDMS-Mikrostrukturen

Die Untersuchung der Motilität der Trypanosomen in artifiziiellen Kapillaren unter Flussbedingungen wurde durchgeführt in interdisziplinärer Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Strömungsphysik, Göttingen. Diese interdisziplinäre Zusammenarbeit ist wichtig, damit sowohl aus zellbiologischer Sicht, als auch aus physikalischer Sicht die Einhaltung physiologisch relevanter Bedingungen gewährleistet ist. Mikrofluidische Geräte können völlig frei mittels CAD-Software am Computer entworfen werden und kommen mit sehr kleinen Proben-Volumina aus. Dies macht sie auch für Hochdurchsatz-Anwendungen, wie DNA Microarrays und Kapillar-Elektrophorese so interessant. In der Technik findet die Mikrofluidik bereits seit längerem Verwendung (Armani *et al.*, 1999), z.B. in Tintenstrahldruckern, während ihr Potential im medizinischen und biologischen Bereich noch nicht ausgeschöpft ist. Die Mikrokanäle, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden aus PDMS (Poly-Dimethylsiloxan) hergestellt. Dieses Material hat den Vorteil durchlässig zu sein für den Gasaustausch für die Kultivierung von Zellen. Die Negative der Mikrokanäle wurden mittels Photolithographie nach einer CAD-Vorlage hergestellt - ein Verfahren das aus der Halbleitertechnik stammt - und dann in PDMS gegossen.

Dazu wurde zuerst eine runde Silizium-Scheibe (von Si-Mat) mit Omnicoat (von Microchem) vorbehandelt, um sie leichter beschichten zu können. Anschließend wurde eine dünne Schicht eines photo-sensitiven Lackes (SU-8 2005, von Microchem) auf die Silizium-Scheibe durch Zentrifugation im Vakuum in einem Spin-Coater gleichmässig aufgetragen. Die dabei verwendete Zentrifugalkraft bestimmt die Schichtdicke. Der Lack wurde dann leicht gehärtet durch Backen auf einem Heizblock bei 60°C für 1 Minute und direkt im Anschluss nochmals bei 95°C für 4 Minuten. Dann wurde der photo-sensitive Lack auf der Silizium-Scheibe mit UV-Licht in einem Mask aligner bestrahlt (365 nm Wellenlänge, 20 s Bestrahlungsdauer bei 15 mW/cm²), welches eine gemäß den CAD-Entwürfen gefertigte Licht-undurchlässige Matrize passierte. Das Negativ-Muster der Matrize gibt daher vor, welche Bereiche des Lackes belichtet werden. Die Polymerisation des Lackes ist licht-abhängig. Nach dem Belichten wurde der Lack wieder durch Backen gehärtet. Die unbelichteten Bereiche des Lackes polymerisieren nicht und bleiben daher löslich für organische Detergentien und können nach 3 minütiger Inkubation in der Entwickler-Lösung (SU-8 Developer, Microchem) mit Isopropanol gewaschen werden. Der verbliebene Lack kann anschließend durch Backen noch gehärtet werden. Das gehärtete SU-8 Negativ auf einer Silizium-Scheibe diente dann wiederum als Matrize zur

Herstellung einer Reihe von PDMS-Abgüssen. Dazu wurde das Sylgard kit (Dow Corning) verwendet, bei dem die Polymerisation des PDMS gestartet wird durch Mischen der beiden Ausgangskomponenten (im Verhältnis 1:10). In einer Petrischale wurde dann die Matrize auf der Silizium-Scheibe mit 10 ml des noch flüssigen PDMS übergossen und für 30 Minuten erstarren lassen. Dies geschah im Vakuum eines Exsiccators, um Einschlüsse kleiner Luftbläschen zu verhindern. Abschliessend wurde das PDMS für 4 Stunden bei 65° C inkubiert. Dies diente zum Einen dazu, das PDMS weiter zu härten und zum anderen verflüchtigten sich, wie in einer Versuchsreihe ermittelt wurde, dabei auch zytotoxische Verunreinigungen, die die Zellen in den Mikrokanälen sonst schädigen. Die in dieser Arbeit verwendeten Mikrokanäle hatten einen Durchmesser von 1 bis 40 µm. Die Kanalhöhe wurde durch entsprechende Wahl der Geschwindigkeit bei der Zentrifugation der Photosensitiven Beschichtung auf Silizium-Scheiben an die Kanalbreite angepasst, um definierte Strömungsprofile in den Kanälen zu erhalten. Alle Kanäle besaßen jeweils einen einzelnen Zu- und Ablauf, über den durch die angesteckten Schläuche ein steuerbarer hydrodynamischer Fluss angelegt werden konnte. Die Strömungsgeschwindigkeit in den Kanälen wurde über Computer-gesteuerte Spritzenpumpen geregelt (Eigenbau der Werkstatt in Göttingen). Da PDMS über einen breiten Wellenlängenbereich sehr Lichtdurchlässig ist, eignen sich die so erzeugten Mikrokanäle sowohl für die Durchlicht- als auch für die Fluoreszenzmikroskopie.

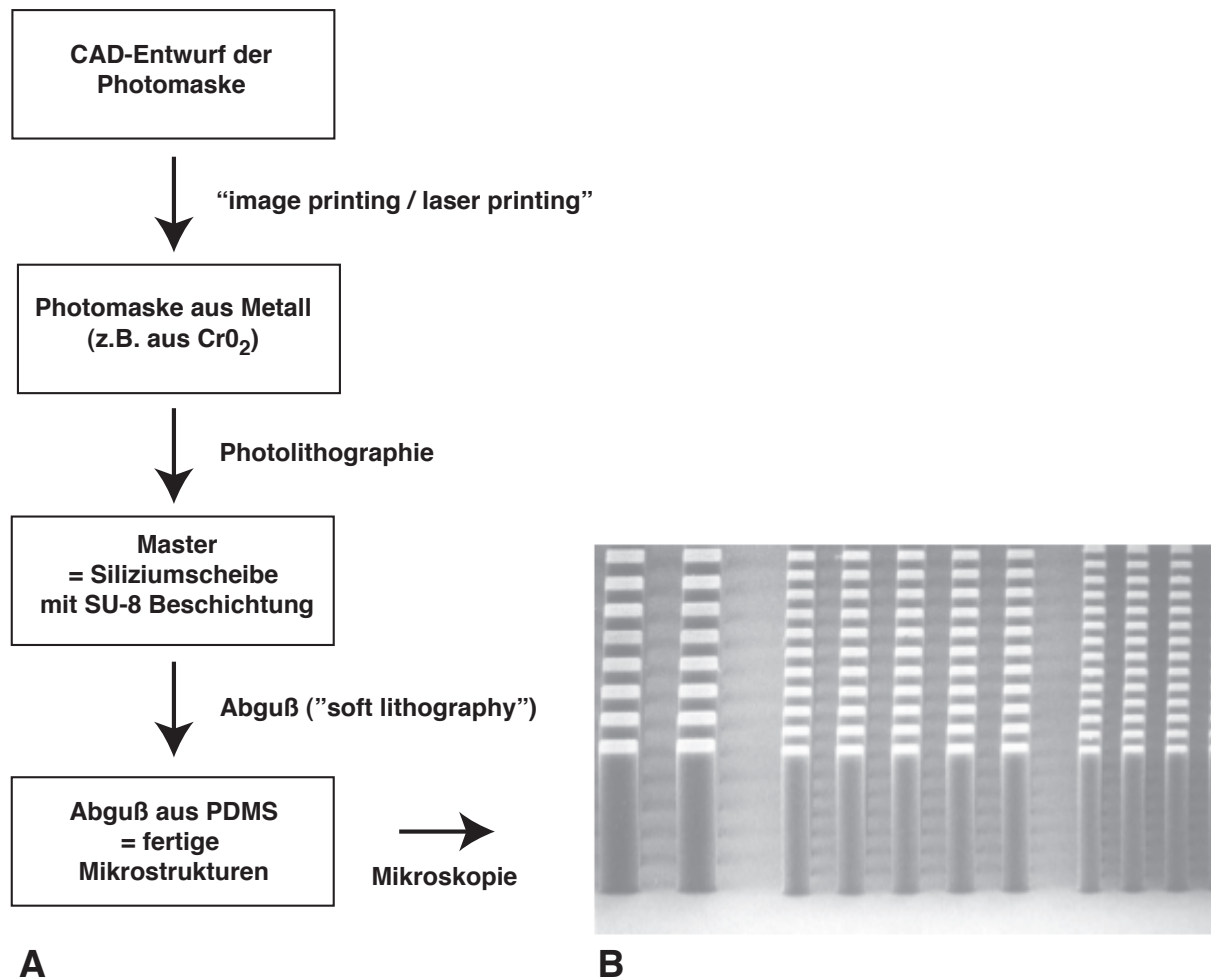


Abb. 55 | Herstellung von PDMS-Mikrostrukturen für die Motilitätsanalyse der Zellen in Gegenwart von Hindernissen. **A** Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der Herstellung von PDMS-Mikrostrukturen. Aus jedem Zwischenprodukt (Entwurf, Photomaske, bzw. Master) der Produktionskette können theoretisch beliebig viele Kopien der Folgeprodukte hergestellt werden. **B** Seitenansicht quaderförmiger PDMS-Mikrostrukturen mit einer Breite von wenigen Mikrometern. Dieses Beispiel demonstriert, wie exakt die Geometrien dank der Photolithographischen Herstellung vorgegeben werden können. In diesem Fall haben die Mikrostrukturen eine quadratischen Querschnitt mit 10 μm Kantenlänge und eine Höhe von 50 μm .

7.2.7 Mikrofluidische Experimente

Gerade für mikrofluidische Experimente mit hoher Strömungsgeschwindigkeit, ist eine kurze Belichtungszeit unerlässlich, da sonst die Bilder verschmiert sind. Sollen einzelne Objekte über mehrere Einzelbilder erkennbar sein, so sind zudem hohe Aufnahmeraten der Kamera nötig. Generell gilt, je höher die Strömungsgeschwindigkeit, desto kürzer muss die Belichtungszeit gewählt werden. Der Bildausschnitt einer gängigen Mikroskopkamera mit 2-3 Millionen Pixeln und einer Pixelgröße um 6 μm , liegt bei Verwendung eines Objektivs mit 100-facher optischer Vergrößerung bei etwa 100 μm . Nimmt man eine Strömungsgeschwindigkeit im aufgenommenen Kanal von gerade einmal 1 mm s^{-1} an, so bedeutet das, dass ein beliebiges Objekt im Strom in einer zehntel Sekunde durch den gesamten Bildbereich getrieben wird. Das bedeutet, dass bei einer

Belichtungszeit von 100 ms, was kein ungewöhnlicher Wert bei der Fluoreszenzmikroskopie ist, das Signal einer einzigen Zelle über die gesamte Breite des Bildes in Flussrichtung verschmiert. Auch bei einer Belichtungszeit von nur 10 ms, ist die Schmierbreite immer noch 10 μm . Um die Konturen der Zelle einigermaßen scharf aufzunehmen ist daher eine Belichtungszeit von maximal 1 ms nötig. Die Zelle erscheint dann allerdings noch immer um 1 μm verschmiert. Um überhaupt solch kurze Belichtungszeiten realisieren zu können, sind sehr stark emittierende Fluoreszenzfarbstoffe nötig. Für die Experimente, bei denen in dieser Arbeit die Orientierung und laterale Verteilung der Zellen unter Flussbedingungen in Mikrokanälen untersucht wurde, waren die Zellen daher mit dem DNA-bindenden Farbstoff Hoechst 33342 in hoher Konzentration gefärbt (bis zu 1 mg/ml). Die Färbung der Zellen erfolgte für 15 min auf geschmolzenem Eis. Die Zellen wurden vor den jeweiligen Experimenten frisch gefärbt und auf Eis im Dunkeln gehalten, um phototoxische Effekte zu minimieren. Im direkten Anschluss wurden die Zellen dreimal in TDB gewaschen (1.400 g, 10 min, 4°C). Bei Trypanosomen wird durch den DNA-Farbstoff der Zellkern und der Kinetoplast (DNA des Mitochondriums) angefärbt. Das Fluoreszenzsignal diente zum einen dazu, den Kontrast (Signal zu Hintergrund) zu erhöhen, was besonders bei den hohen Zelldichten in Anwesenheit der Erythrozyten nötig war, und zum anderen, um die Z-Position der Zellen eingrenzen zu können. Für die Experimente unter Flußbedingungen wurde die Fokusebene in die Kanalmitte gelegt und es wurden nur die Zellen in die Auswertung einbezogen, die sich in der Fokusebene befanden, da die Strömungsbedingungen auch über die Z-Position im Kanal variieren (parabolisches Strömungsprofil). Durch die bekannte Punktspreizfunktion (PSF) des Fluoreszenzsignales der Zellen kann die Z-Position grob ermittelt werden.

Für die Experimente mit hohen Flussraten wurde zum einen bei Durchlicht mikroskopiert unter Verwendung einer pco.1200 hs Kamera. Diese hat einen CMOS-Chip mit 1280 x 1024 Pixeln und einen integrierten Speicher mit 4 GB, der die Aufnahme von 491 Bildern pro Sekunde im Vollbildmodus erlaubt. Zum anderen fand für die Fluoreszenzaufnahmen eine pco.1600 QE CCD-Kamera Verwendung, da diese wegen ihrer höheren Quanteneffizienz bei schwächerer Lichtintensität die besseren Aufnahmen liefert. Es wurde eine sehr kurze Belichtungszeit von 46 μs verwendet, um die Zellen auch bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten noch scharf abzubilden. Die Orientierung und laterale Verteilung der Zellen im Mikrokanal wurde nachträglich anhand der aufgenommenen Bildsequenzen bestimmt. Die Aufnahmen entstanden am Ende der jeweiligen Mikrokanäle, welche eine Länge von 2,5 cm hatten. Diese Länge entspricht einem Vielfachen der Kanalbreite (1 - 40 μm), weswegen am Ende der Kanäle die endgültige hydrodynamische Anordnung erreicht sein sollte.

Die tatsächliche Strömungsgeschwindigkeit in den Mikrokanälen wurde auf zweierlei Weise ermittelt. Zum einen wurde die "Verschmier-Distanz" des Fluoreszenzsignals bei gegebener Belichtungszeit gemessen und daraus die Flussgeschwindigkeit errechnet (z.B.

beträgt die Flussgeschwindigkeit bei einer Schmierlänge von 50 μm und 100 ms Belichtungszeit 0,5 mm s^{-1}). Zum anderen wurde die Flussgeschwindigkeit über PIV (particle image velocimetry) gemessen. Dazu wurden 1 μm Polystyren-Beads verwendet, deren physikalische Dichte der des Fluids entsprach. Bei dieser Methode wird die Position vieler einzelner Partikel über die Zeit bestimmt und daraus die Geschwindigkeit in den entsprechenden laminaren Schichten berechnet.

7.2.8 Experimente mit geordneten Mikrostrukturen (Pillars)

Die Herstellung von regelmäßigen Anordnungen von PDMS-Pillars mit definiertem Abstand und Durchmesser (Pillarwälder) erfolgte analog zu den anderen mikrofluidischen Geräten. Allerdings wurden diese freundlicherweise bereits fertig von Janina Baade (AG Frischknecht, Uni Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Da PDMS hydrophob ist und die dichten Pillarwälder wegen des Lotus-Effektes aufgebrachte Flüssigkeiten abperlen lassen, wurde die PDMS-Oberfläche direkt vor den Experimenten hydrophiler gemacht durch Inkubation in einer 10% Extran-Lösung (v/v) für 30 Minuten. Das Detergens wurde anschließend durch 5 maliges Waschen mit ddH₂O wieder entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Pillars niemals austrockneten. Diese Vorbereitung der PDMS-Pillarwälder musste direkt vor jedem Experiment erneut durchgeführt werden, da die hydrophilen Eigenschaften des PDMS mit der Zeit wieder verloren gingen, selbst wenn diese in Wasser aufbewahrt wurden. Die Zellsuspension der Trypanosomen in TDB wurde in kleinem Volumen (wenige Mikroliter) direkt auf die Pillarwälder pipettiert. Ähnlich wie bei den Mikrokanälen wurden auch hier fluoreszenzgefärbte Zellen verwendet, um nur Zellen in der richtigen Fokusebene aufzunehmen, um störende Wandeffekte zu vermeiden. Die Zellen wurden bei zeitlich und optisch hoher Auflösung aufgenommen (60x Objektiv mit 1,45 NA, und mindestens 30 Hz Bildrate). Um die Pillars sichtbar zu machen, wurden zusätzlich auch Durchlichtaufnahmen des jeweiligen Bildausschnittes aufgenommen, in denen durch einen Sobel-Filter die Pillarkonturen verstärkt wurden, welche dann in Falschfarbe über die Trajektorien der Zellen gelegt wurden.

Da sich die Mehrzahl der Zellen nicht zwischen den nach oben offenen Pillars befand, sondern in der Flüssigkeitsschicht darüber, wurde vor den Experimenten mit einer Präzisionsspinzette eine Fluor-Karbon-Folie (lumox™ film, In Vitro Systems & Services GmbH) auf die Pillarwälder gelegt, die als Abdeckung der Pillars nach oben hin diente. Diese Folie wurde verwendet, da sie permeabel für Gase, jedoch nicht für Flüssigkeiten ist. Ein Deckglas hätte die empfindlichen PDMS-Pillars dagegen zerstört. Um die Beeinflussung der Bewegung durch Wandeffekte an den Pillarenden auszuschliessen, wurden fluoreszenzmarkierte Zellen verwendet und nur diejenigen Zellen in die Auswertung einbezogen, die sich in der Fokusebene befanden (Mitte der Pillars in Z-Achse).

7.2.9 Holographie

Die Bewegung von Trypanosomen im dreidimensionalen Raum wurde durch Holographie gemessen. Dies geschah in Kooperation mit der AG Rosenhahn (Uni Heidelberg). Der große Vorteil der Holographie ist, dass in jedem Hologramm die Information aller drei Raumachsen enthalten ist. Diese ist kodiert in Phase, Amplitude und Frequenz des aufgezeichneten Lichtes. In "gewöhnlichen" Mikroskopie-Aufnahmen dagegen ist nur eine zweidimensionale Projektion auf die X/Y Ebene enthalten. Betrachtet man eine dreidimensionale Bewegung von Zellen in nur zwei Dimensionen, so wird zwangsläufig die Geschwindigkeit unterschätzt. Schwimmt eine Zelle beispielsweise im 45° Grad Winkel zur Fokusebene, so würde die gemessene Geschwindigkeit um die Wurzel von zwei zu gering ausfallen, da alle Bewegungen senkrecht zur Fokusebene nicht mit berücksichtigt werden.

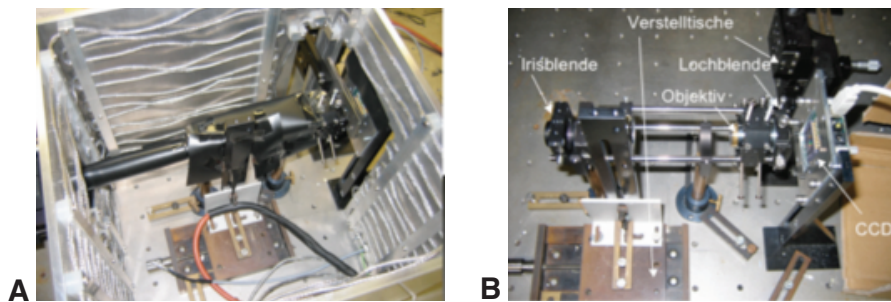


Abb. 56 | Messaufbau bei der Holographie. **A** Übersichtsaufnahme, die die beheizbare Isolationskammer um den Holographie-Aufbau zeigt. **B** Als Lichtquelle dient ein DPSS-Laser mit 532 nm Wellenlänge. Der Laserstrahl wird über Spiegel durch ein 20x Objektiv (NA = 0,4) geleitet, um die Photonendichte zu erhöhen und anschließend durch eine Lochblende (500 nm Durchmesser), um die Kohärenz zu verbessern. Die Probenkammer mit den zu vermessenden Zellen wird zwischen der Lochblende und einer CCD-Kamera (1280 x 1024 Pixel; 8,2 x 6,6 mm Detektorfläche; max. 15 fps) auf einem Verstellisch platziert.

Für die Holographie von lebenden Trypanosomen wurde ein In-line-Holographie Aufbau verwendet (Sebastian Weiße, Uni Heidelberg). Als Lichtquelle diente ein Dioden-Festkörper-Laser mit 532 nm Wellenlänge. Der Laser hatte nur wenige mW Leistung, die auf eine relativ große Fläche verteilt wurde, und daher die Zellen nicht in ihrer Vitalität und Motilität beeinträchtigte. Der parallele, aufgeweitete und kohärente Laserstrahl wurde durch ein 20 x Objektiv, welches nur eine geringe numerische Apertur brauchte (0,4 NA), durch eine Lochblende (500 nm) auf die Probenkammer fokussiert, in die die Zellsuspension eingebracht wurde. Dicht hinter der Probenkammer befand sich eine CCD-Kamera im Strahlengang, die das Interferenzbild (Hologramm) aufzeichnete (1280 x 1024 Pixel, 8,2 x 6,6 mm Chipgröße, max. 15,4 fps). Der gesamte Aufbau befand sich in einer beheizbaren Box, mit der die Temperatur konstant auf 37°C gehalten werden konnte. Der genaue Aufbau ist Abb. 56 zu entnehmen.

Da die Holographie jedoch zuvor noch nie für Trypanosomen angewendet worden war, gab es mehrere Probleme, die zuerst gelöst werden mussten. Zum einen musste die Vitalität der Zellen während den holographischen Messungen sicher gestellt werden, wozu sowohl die Materialien der verwendeten Probenkammer, als auch die Probenvorbereitung und die Messbedingungen selbst optimiert wurden. Die Vitalität und Motilität der mittels Holographie vermessenen Zellen wurde vor und nach jedem einzelnen Experiment mittels Mikroskopie überprüft. Es traten zudem anfangs störende Interferenz-Signale auf, die vermutlich von Schwebeteilchen im Zellkulturmedium verursacht wurden und deutlich reduziert werden konnten durch mehrfachen Mediumwechsel mit sterilfiltriertem Zellkulturmedium (0,22 µm Filter). Des Weiteren kann es zu einer Verfälschung der Messungen durch Konvektionsströmungen kommen. Dies konnte durch eine bessere thermische Isolierung und den erneuten Wechsel der Probenkammern verringert werden (unbeschichtete Luer-Kanäle mit 0,8 mm Höhe, ibidi, München). Auch eine Präinkubation von 30 - 60 min Dauer vor dem eigentlichen Beginn der Messung, um eine Äquilibration der Proben (Konzentrationen, Temperatur) zu erreichen, verringerte die auftretende Konvektion. Um bei der Auswertung gerichtetes Schwimmen und Taumeln eindeutig unterscheiden zu können, wurden für die Eichung Motilitätsmutanten verwendet, die nur noch zu einer Taumelbewegung imstande sind, nicht aber zu gerichtetem Schwimmen (13-90/pZJM.DIC) und mit den Wildtypzellen verglichen. Um den Anteil der Konvektion von aktiver Bewegung zu unterscheiden, wurden zur Kontrolle auch Microspheres, und durch Hitze abgetötete bzw. durch 2-Desoxyglucose energiedepletierte Trypanosomen vermessen.

7.2.10 Selektion auf gerichtet schwimmende Zellen

Die Motilitätsanalysen offenbarten teilweise große Unterschiede bei der Motilität unterschiedlicher Trypanosomen Zelllinien. Generell zeigten die prozyklischen Insektenstadien einen hohen Anteil gerichtet schwimmender Zellen mit einer Geschwindigkeit von bis zu 20 µm s⁻¹, was konsistent zur bestehenden Literatur ist. Bei den Blutstromformen jedoch war der Anteil an gerichtetem Schwimmen deutlich geringer, genau wie die Durchschnittsgeschwindigkeit der Population. Da für diese Arbeit vornehmlich die gerichtet schwimmenden Zellen von Interesse waren, wurde eine Reihe von Zelllinien untersucht mit dem Ziel eine Linie mit ähnlich hoher Motilität zu finden, wie frisch aus dem Blut isolierte Trypanosomen. Ein MITat 1.6 Wildtyp Stamm, der noch nicht über viele Passagen in Zellkultur gehalten worden war, tat sich dabei besonders hervor. Diese Zellen wurden dann weiter auf gerichtetes Schwimmen hin selektiert durch wiederholtes Sedimentieren für mindestens 6 h auf einer 24-well Platte, Abtrennung und Weiterkultivierung der Zellen aus dem Überstand. Der theoretische Hintergrund dieser Vorgehensweise ist, dass sich die weniger motilen Zellen auf dem Boden absetzen. Die Sedimentation wurde durch Abnahme der optischen Dichte durch photometrische Messung des Überstandes bei 600

nm überprüft. Mit den Zellen aus dem Überstand wurde dann in 1:10 Verdünnung eine neue Kultur angeimpft und die Sedimentation alle ein bis zwei Tage wiederholt, sobald wieder eine Zelldichte von $1 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml erreicht war. Insgesamt wurden die Zellen auf diese Weise über mehr als 100 Zyklen, also mehr als ein halbes Jahr lang auf gerichtetes Schwimmen hin selektioniert.

7.2.11 Isolierung von Blutzellen

Für die Motilitätsexperimente wurde Blut steril aus drei männlichen Rindern isoliert in EDTA- bzw. Heparin-beschichtete 10 ml Röhrchen (Sarstedt), um die Blutgerinnung (Koagulation) zu verhindern. Die Blutproben wurden dann bei 4°C aufbewahrt. Direkt vor den Experimenten, wurden die Zellen zweimal gewaschen in 0,9% (w/v) isotonischer Kochsalzlösung durch Zentrifugation bei 3.000 g für 5 Minuten. Die Unversehrtheit der Blutzellen wurde durch Mikroskopie überprüft. Unter isotonischen Bedingungen behalten die Erythrozyten ihre typische bikonkave Zellform. In hyperosmotischem Medium schrumpfen die Zellen, während sie in hypoosmotischem Medium anschwellen, sich abrunden und schliesslich platzen. Die Blutzellen wurden durch Zugabe von steriler Glucose-Lösung in einer finalen Konzentration von 10 mM versorgt. Für die Experimente wurden die gewaschenen Blutzellen zusammen mit den Trypanosomen in unverdünntem fötalem Kälberserum (Sigma, Hitze-inaktiviert) resuspendiert und der Hämatokrit nach einer Zellzählung, in einer Neubauer Zählkammer mit 0,02 mm Höhe, eingestellt. Unter diesen Bedingungen blieben die Zellen intakt und behielten ihre bikonkave Form und Flexibilität über mindestens einige Stunden. Die Motilitätsexperimente wurden so schnell wie möglich durchgeführt und die Zellen wurden vor jedem Experiment frisch präpariert, um Einbussen der Vitalität zu vermeiden.

8. Literaturverzeichnis

- Abkarian, M., and Viallat, A. (2008). Vesicles and red blood cells in shear flow. *Soft Matter* 4, 653.
- Absalon, S., Blisnick, T., Bonhivers, M., Kohl, L., Cayet, N., Toutirais, G., Buisson, J., Robinson, D., and Bastin, P. (2008a). Flagellum elongation is required for correct structure, orientation and function of the flagellar pocket in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 121, 3704-3716.
- Absalon, S., Blisnick, T., Kohl, L., Toutirais, G., Doré, G., Julkowska, D., Tavenet, A., and Bastin, P. (2008b). Intraflagellar Transport and Functional Analysis of Genes Required for Flagellum Formation in Trypanosomes. *Mol Biol Cell* 19, 929-944.
- Absalon, S., Kohl, L., Branche, C., Blisnick, T., Toutirais, G., Rusconi, F., Cosson, J., Bonhivers, M., Robinson, D., and Bastin, P. (2007). Basal body positioning is controlled by flagellum formation in *Trypanosoma brucei*. *PLoS ONE* 2, e437.
- Afzelius, B.A. (1999). Asymmetry of cilia and of mice and men. *Int J Dev Biol* 43, 283-286.
- Afzelius, B.A. (2004). Cilia-related diseases. *J Pathol* 204, 470-477.
- Amino, R., Ménard, R., and Frischknecht, F. (2005). In vivo imaging of malaria parasites--recent advances and future directions. *Curr Opin Microbiol* 8, 407-414.
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., and Ménard, R. (2006). Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nat Med* 12, 220-224.
- Armani, D., Liu, C., and Aluru, N. (1999). Re-configurable fluid circuits by PDMS elastomer micromachining. *IEEE Int Conf Micro Electro Mech Syst Tech Digest*.
- Atsumi, T., Maekawa, Y., Yamada, T., Kawagishi, I., Imae, Y., and Homma, M. (1996). Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* 178, 5024-5026.
- Baron, D.M., Kabututu, Z.P., and Hill, K.L. (2007a). Stuck in reverse: loss of LC1 in *Trypanosoma brucei* disrupts outer dynein arms and leads to reverse flagellar beat and backward movement. *J Cell Sci* 120, 1513-1520.
- Baron, D.M., Ralston, K.S., Kabututu, Z.P., and Hill, K.L. (2007b). Functional genomics in *Trypanosoma brucei* identifies evolutionarily conserved components of motile flagella. *J Cell Sci* 120, 478-491.
- Barrett, M.P. (1999). The fall and rise of sleeping sickness. *Lancet* 353, 1113-1114.
- Barrett, M.P. (2006). The rise and fall of sleeping sickness. *Lancet* 367, 1377-1378.
- Bastin, P., Ellis, K., Kohl, L., and Gull, K. (2000a). Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *J Cell Sci* 113 (Pt 18), 3321-3328.
- Bastin, P., MacRae, T.H., Francis, S.B., Matthews, K.R., and Gull, K. (1999a). Flagellar morphogenesis: protein targeting and assembly in the paraflagellar rod of trypanosomes. *Mol Cell Biol* 19, 8191-8200.
- Bastin, P., Pullen, T.J., Moreira-Leite, F.F., and Gull, K. (2000b). Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. *Microbes Infect* 2, 1865-1874.

- Bastin, P., Pullen, T.J., Sherwin, T., and Gull, K. (1999b). Protein transport and flagellum assembly dynamics revealed by analysis of the paralysed trypanosome mutant *snl-1*. *J Cell Sci* 112 (Pt 21), 3769-3777.
- Bastin, P., Sherwin, T., and Gull, K. (1998). Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature* 391, 548.
- Beltman, J.B., Marée, A.F., and de Boer, R.J. (2009). Analysing immune cell migration. *Nat Rev Immunol* 9, 789-798.
- Berg, H.C. (1971). How to track bacteria. *Review of Scientific Instruments*.
- Berg, H.C., and Anderson, R.A. (1973). Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature* 245, 380-382.
- Berg, H.C., and Brown, D.A. (1972). Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *naturecom*.
- Berg, H.C., and Turner, L. (1990). Chemotaxis of bacteria in glass capillary arrays. *Escherichia coli*, motility, microchannel plate, and light scattering. *Biophys J* 58, 919-930.
- Berg, H.C., and Turner, L. (1993). Torque generated by the flagellar motor of *Escherichia coli*. *Biophys J* 65, 2201-2216.
- Bernstein, E., Emmings, F., Evans, R., Castaneda, A., and Varco, R. (1963). Effect of low molecular weight dextran on red blood cell charge during clinical extracorporeal circulation. *Circulation* 27, 816-819.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., *et al.* (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416-422.
- Best, A., Handoko, L., Schlüter, E., and Göringer, H.U. (2005). In vitro synthesized small interfering RNAs elicit RNA interference in african trypanosomes: an in vitro and in vivo analysis. *J Biol Chem* 280, 20573-20579.
- Bisaggio, D., Campanati, L., Pinto, R., and Souto-Padrón, T. (2006). Effect of suramin on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: Changes on cell motility and on the ultrastructure of the flagellum-cell body attachment region. *Acta tropica* 98, 162-175.
- Borst, P. (2002). Antigenic variation and allelic exclusion. *Cell* 109, 5-8.
- Branche, C., Kohl, L., Toutirais, G., Buisson, J., Cosson, J., and Bastin, P. (2006). Conserved and specific functions of axoneme components in trypanosome motility. *J Cell Sci* 119, 3443-3455.
- Briggs, L.J., Davidge, J.A., Wickstead, B., Ginger, M.L., and Gull, K. (2004a). More than one way to build a flagellum: comparative genomics of parasitic protozoa. *Curr Biol* 14, R611-612.
- Briggs, L.J., McKean, P.G., Baines, A., Moreira-Leite, F., Davidge, J., Vaughan, S., and Gull, K. (2004b). The flagella connector of *Trypanosoma brucei*: an unusual mobile transmembrane junction. *J Cell Sci* 117, 1641-1651.
- Broadhead, R., Dawe, H.R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S.R., Portman, N., Shaw, M.K., Ginger, M.L., Gaskell, S.J., McKean, P.G., *et al.* (2006). Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature* 440, 224-227.
- Brokaw, C. (1982). Introduction: Generation of the bending cycle in cilia and flagella. *Cell Motil Cytoskeleton* 2.

- Brokaw, C.J. (1966). Effects of increased viscosity on the movements of some invertebrate spermatozoa. *J Exp Biol* 45, 113-139.
- Brokaw, C.J. (1970). Bending moments in free-swimming flagella. *J Exp Biol* 53, 445-464.
- Brokaw, C.J. (1972). Computer simulation of flagellar movement. I. Demonstration of stable bend propagation and bend initiation by the sliding filament model. *Biophys J* 12, 564-586.
- Brokaw, C.J. (1985). Computer simulation of flagellar movement. VI. Simple curvature-controlled models are incompletely specified. *Biophys J* 48, 633-642.
- Brokaw, C.J. (2002). Computer simulation of flagellar movement VIII: coordination of dynein by local curvature control can generate helical bending waves. *Cell Motil Cytoskeleton* 53, 103-124.
- Brokaw, C.J., and Benedict, B. (1968). Mechanochemical coupling in flagella. II. Effects of viscosity and thiourea on metabolism and motility of *Ciona* spermatozoa. *J Gen Physiol* 52, 283-299.
- Brown, J.M., Hardin, C., and Gaertig, J. (1999). Rotokinesis, a novel phenomenon of cell locomotion-assisted cytokinesis in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Cell Biol Int* 23, 841-848.
- Brown, P. (2005). Lymphatic system: unlocking the drains. *Nature* 436, 456-458.
- Bülöw, R., Overath, P., and Davoust, J. (1988). Rapid lateral diffusion of the variant surface glycoprotein in the coat of *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry* 27, 2384-2388.
- Burgess, S., Walker, M., Sakakibara, H., Knight, P., and Oiwa, K. (2003). Dynein structure and power stroke. *Nature* 421, 715-718.
- Chang and Miao (2009). A New Paradigm for Cell Motility in African Trypanosomes. *The Journal of Young Investigators* vol 19, issue 12.
- Chowdhury, A.R., Zhao, Z., and Englund, P.T. (2008). Effect of hydroxyurea on procyclic *Trypanosoma brucei*: an unconventional mechanism for achieving synchronous growth. *Eukaryotic Cell* 7, 425-428.
- Cisneros, L., Dombrowski, C., Goldstein, R.E., and Kessler, J.O. (2006). Reversal of bacterial locomotion at an obstacle. *Phys Rev E*.
- Claes, F., Vodnala, S.K., van Reet, N., Boucher, N., Lunden-Miguel, H., Baltz, T., Goddeeris, B.M., Büscher, P., and Rottenberg, M.E. (2009). Bioluminescent Imaging of *Trypanosoma brucei* Shows Preferential Testis Dissemination Which May Hamper Drug Efficacy in Sleeping Sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e486.
- Clary-Meinesz, C.F., Cosson, J., Huitorel, P., and Blaive, B. (1992). Temperature effect on the ciliary beat frequency of human nasal and tracheal ciliated cells. *Biol Cell*.
- Codling, E.A., Plank, M.J., and Benhamou, S. (2008). Random walk models in biology. *J R Soc Interface* 5, 813-834.
- Colantonio, J.R., Vermot, J., Wu, D., Langenbacher, A.D., Fraser, S., Chen, J.N., and Hill, K.L. (2009). The dynein regulatory complex is required for ciliary motility and otolith biogenesis in the inner ear. *Nature* 457, 205-209.
- Cross, G.A. (2010). Drug discovery: Fat-free proteins kill parasites. *Nature* 464, 689-690.
- Dawe, H.R., Farr, H., and Gull, K. (2007a). Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J Cell Sci* 120, 7-15.

- Dawe, H.R., Shaw, M.K., Farr, H., and Gull, K. (2007b). The hydrocephalus inducing gene product, Hydin, positions axonemal central pair microtubules. *BMC Biol* 5, 33.
- Dean, S.D., and Matthews, K.R. (2007). Restless gossamers: antibody clearance by hydrodynamic flow forces generated at the surface of motile trypanosome parasites. *Cell Host Microbe* 2, 279-281.
- Einstein, A. (1906) Zur Theorie der Brownschen Bewegung. *Ann. Phys.* 19, 371– 381. (doi: 10.1002/andp.19063240208).
- Einstein, A. (1906). *Ann Physik* 19, 289-306.
- Einstein, A. (1905). Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann. Phys.* 17, 549 – 560. (doi:10.1002/andp.19053220806).
- Eisenthal, R., and Panes, A. (1985). The aerobic/anaerobic transition of glucose metabolism in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett* 181, 23-27.
- Engstler, M., and Boshart, M. (2004). Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev* 18, 2798-2811.
- Engstler, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N., and Overath, P. (2007). Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* 131, 505-515.
- Engstler, M., Thilo, L., Weise, F., Grünfelder, C.G., Schwarz, H., Boshart, M., and Overath, P. (2004). Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 117, 1105-1115.
- Engstler, M., Weise, F., Bopp, K., Grünfelder, C.G., Günzel, M., Heddergott, N., and Overath, P. (2005). The membrane-bound histidine acid phosphatase TbMBAP1 is essential for endocytosis and membrane recycling in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 118, 2105-2118.
- Ersfeld, K., and Gull, K. (2001). Targeting of cytoskeletal proteins to the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 114, 141-148.
- Farr, H., and Gull, K. (2009). Functional studies of an evolutionarily conserved, cytochrome b5 domain protein reveal a specific role in axonemal organisation and the general phenomenon of post-division axonemal growth in trypanosomes. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 24-35.
- Fauci, L.J., and McDonald, A. (1995). Sperm motility in the presence of boundaries. *Bull Math Biol* 57, 679-699.
- Fischer, M., Franzeck, U.K., Herrig, I., Costanzo, U., Wen, S., Schiesser, M., Hoffmann, U., and Bollinger, A. (1996). Flow velocity of single lymphatic capillaries in human skin. *Am J Physiol* 270, H358-363.
- Fisher, P.R., Merkl, R., and Gerisch, G. (1989). Quantitative analysis of cell motility and chemotaxis in *Dictyostelium discoideum* by using an image processing system and a novel chemotaxis chamber providing stationary chemical gradients. *J Cell Biol* 108, 973-984.
- Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485-492.
- Fliegau, M., Benzing, T., and Omer, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 880-893.

- Fliegau, M., and Omran, H. (2006). Novel tools to unravel molecular mechanisms in cilia-related disorders. *Trends Genet* 22, 241-245.
- Forlenza, M., Nakao, M., Wibowo, I., Joerink, M., Arts, J.A., Savelkoul, H.F., and Wiegertjes, G.F. (2009). Nitric oxide hinders antibody clearance from the surface of *Trypanoplasma borreli* and increases susceptibility to complement-mediated lysis. *Mol Immunol* 46, 3188-3197.
- Forsythe, G.R., McCulloch, R., and Hammarton, T.C. (2009). Hydroxyurea-induced synchronisation of bloodstream stage *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 164, 131-136.
- Frearson, J.A., Brand, S., McElroy, S.P., Cleghorn, L.A., Smid, O., Stojanovski, L., Price, H.P., Guther, M.L., Torrie, L.S., Robinson, D.A., *et al.* (2010). N-myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. *Nature* 464, 728-732.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 188, 11-19.
- Friedrich, B.M., Riedel-Kruse, I.H., Howard, J., and Jülicher, F. (2010). High-precision tracking of sperm swimming fine structure provides strong test of resistive force theory. *J Exp Biol* 213, 1226-1234.
- Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thiberge, S., Olivo-Marin, J.C., Shorte, S.L., and Ménard, R. (2004). Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. *Cell Microbiol* 6, 687-694.
- Fry, Huchtings and Ludu (2003). arXiv:physics/0309026v2 [physics.bio-ph].
- Gadelha, C., Wickstead, B., and Gull, K. (2007). Flagellar and ciliary beating in trypanosome motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 64, 629-643.
- Gadelha, C., Wickstead, B., McKean, P.G., and Gull, K. (2006). Basal body and flagellum mutants reveal a rotational constraint of the central pair microtubules in the axonemes of trypanosomes. *J Cell Sci* 119, 2405-2413.
- García-Salcedo, J.A., Pérez-Morga, D., Gijón, P., Dilbeck, V., Pays, E., and Nolan, D.P. (2004). A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 23, 780-789.
- Ginger, M.L., Portman, N., and McKean, P.G. (2008). Swimming with protists: perception, motility and flagellum assembly. *Nature Reviews Microbiology*.
- Goldstein, R.E., Polin, M., and Tuval, I. (2009). Noise and synchronization in pairs of beating eukaryotic flagella. *Phys Rev Lett* 103, 168103.
- Goldstein, S.F. (1976). Form of developing bends in reactivated sperm flagella. *J Exp Biol* 64, 173-184.
- Greenberg, E.P., and Canale-Parola, E. (1977). Motility of flagellated bacteria in viscous environments. *J Bacteriol* 132, 356-358.
- Griffiths, S., Portman, N., Taylor, P.R., Gordon, S., Ginger, M.L., and Gull, K. (2007). RNA interference mutant induction in vivo demonstrates the essential nature of trypanosome flagellar function during mammalian infection. *Eukaryotic Cell* 6, 1248-1250.
- Grima, R. (2007). Directed cell migration in the presence of obstacles. *Theoretical biology & medical modelling* 4, 2.
- Grünfelder, C.G., Engstler, M., Weise, F., Schwarz, H., Stierhof, Y.D., Boshart, M., and Overath, P. (2002). Accumulation of a GPI-anchored protein at the cell surface requires sorting at multiple intracellular levels. *Traffic* 3, 547-559.

- Gull, K. (2003). Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies. *Curr Opin Microbiol* 6, 365-370.
- Hellmann, J.K., Münter, S., Wink, M., and Frischknecht, F. (2010). Synergistic and additive effects of epigallocatechin gallate and digitonin on *Plasmodium* sporozoite survival and motility. *PLoS ONE* 5, e8682.
- Heuser, T., Raytchev, M., Krell, J., Porter, M.E., and Nicastro, D. (2009). The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol* 187, 921-933.
- Hill, K. (2003). Biology and mechanism of trypanosome cell motility. *Eukaryotic Cell* 2, 200-208.
- Hill, K.L. (2010). Parasites in motion: flagellum-driven cell motility in African trypanosomes. *Curr Opin Microbiol*.
- Hinrichsen, L., Meyerholz, A., Groos, S., and Ungewickell, E.J. (2006). Bending a membrane: how clathrin affects budding. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 8715-8720.
- Hirumi, H., and Hirumi, K. (1989). Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J. Parasitol.* 75, 985–989.
- Holwill, M. Physical aspects of flagellar movement. *Physiological Reviews* 46, 696-785.
- Humphries, N.E., Queiroz, N., Dyer, J.R., Pade, N.G., Musyl, M.K., Schaefer, K.M., Fuller, D.W., Brunnschweiler, J.M., Doyle, T.K., Houghton, J.D., *et al.* (2010). Environmental context explains Lévy and Brownian movement patterns of marine predators. *Nature* 465, 1066-1069.
- Hutchings, N., and Ludu, A. (2004). A model for African trypanosome cell motility and quantitative description of flagellar dynamics. Arxiv preprint q-bioQM/0406033.
- Hutchings, N.R., Donelson, J.E., and Hill, K.L. (2002). Trypanin is a cytoskeletal linker protein and is required for cell motility in African trypanosomes. *J Cell Biol* 156, 867-877.
- Jan, K.M., and Chien, S. (1973). Role of surface electric charge in red blood cell interactions. *J Gen Physiol* 61, 638-654.
- Kabani, S., Waterfall, M., and Matthews, K.R. (2009). Cell-cycle synchronisation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* using Vybrant DyeCycle Violet-based sorting. *Mol Biochem Parasitol*.
- Kabututu, Z.P., Thayer, M., Melehani, J., and Hill, K.L. (2010). CMF70 is a subunit of the dynein regulatory complex. *J Cell Sci*.
- Kamiya, R., Nagai, R., and Nakamura, S. (1982). Rotation of the central-pair microtubules in *Chlamydomonas* flagella. In: *Biological Functions of Microtubules and Related Structures*, ed. H. Sakai, and H. Mohri, G. G. Borisy, New York: Academic Press, 189-198.
- Katz, D.F., Mills, R.N., and Pritchett, T.R. (1978). The movement of human spermatozoa in cervical mucus. *J Reprod Fertil* 53, 259-265.
- Kaya, T., and Koser, H. (2009). Characterization of hydrodynamic surface interactions of *Escherichia coli* cell bodies in shear flow. *Phys Rev Lett* 103, 138103.
- Kessler, John O. (1985). Hydrodynamic focusing of motile algal cells *Nature* 313, 218-220.

- Kleshchenko, Y.Y., Moody, T.N., Furtak, V.A., Ochieng, J., Lima, M.F., and Villalta, F. (2004). Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. *Infect Immun* 72, 6717-6721.
- Kohl, L., Robinson, D., and Bastin, P. (2003). Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO J* 22, 5336-5346.
- Korin, N., Bransky, A., and Dinnar, U. (2007). Theoretical model and experimental study of red blood cell (RBC) deformation in microchannels. *Journal of biomechanics* 40, 2088-2095.
- Kreuzer, H.J., Jericho, M.H., Meinertzhagen, I.A., and Xu, W. (2001). Digital in-line holography with photons and electrons. *Journal of Physics Condensed Matter*.
- Kristensson, K., Nygård, M., Bertini, G., and Bentivoglio, M. (2009). African trypanosome infections of the nervous system: parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. *Prog Neurobiol*.
- Lacomble, S., Vaughan, S., Gadelha, C., Morphew, M.K., Shaw, M.K., McIntosh, J.R., and Gull, K. (2010). Basal body movements orchestrate membrane organelle division and cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*.
- LaCount, D.J., Barrett, B., and Donelson, J.E. (2002). *Trypanosoma brucei* FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis. *J Biol Chem* 277, 17580-17588.
- Lauga, E. (2007). Floppy swimming: viscous locomotion of actuated elastica. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* 75, 041916.
- Lauga, E., DiLuzio, W.R., Whitesides, G.M., and Stone, H.A. (2006). Swimming in circles: motion of bacteria near solid boundaries. *Biophys J* 90, 400-412.
- Lee, S.H., Stephens, J.L., and Englund, P.T. (2007). A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. *Nature Reviews Microbiology* 5, 287-297.
- Lima, R., Wada, S., Takeda, M., Tsubota, K., and Yamaguchi, T. (2007). In vitro confocal micro-PIV measurements of blood flow in a square microchannel: the effect of the haematocrit on instantaneous velocity profiles. *Journal of biomechanics* 40, 2752-2757.
- Lindemann, C.B. (1996). Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell Motil Cytoskeleton* 34, 258-270.
- Lindemann, C.B. (2003). Structural-functional relationships of the dynein, spokes, and central-pair projections predicted from an analysis of the forces acting within a flagellum. *Biophys J* 84, 4115-4126.
- Lindemann, C.B., and Lesich, K.A. (2010). Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J Cell Sci* 123, 519-528.
- Magariyama, Y., and Kudo, S. (2002). A mathematical explanation of an increase in bacterial swimming speed with viscosity in linear-polymer solutions. *Biophys J* 83, 733-739.
- Malagnino, N., Pesce, G., Sasso, A., and Arimondo, E. (2002). Measurements of trapping efficiency and stiffness in optical tweezers. *Optics Communications*.
- Mallik, R., Carter, B.C., Lex, S.A., King, S.J., and Gross, S.P. (2004). Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature* 427, 649-652.
- Martin, S., Reichert, M., Stark, H., and Gisler, T. (2006). Direct observation of hydrodynamic rotation-translation coupling between two colloidal spheres. *Phys Rev Lett* 97, 248301.

- Matas, J.P., Morris, J.F., and Guazzelli, E. (2004). Lateral forces on a sphere. *Oil & Gas Science and Technology*.
- Matthews, K.R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 118, 283-290.
- McMahon, H.T., and Gallop, J.L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438, 590-596.
- Miles, C.A., and Holwill, M.E. (1971). A mechanochemical model of flagellar activity. *Biophys J* 11, 851-859.
- Minoura, I., Yagi, T., and Kamiya, R. (1999). Direct measurement of inter-doublet elasticity in flagellar axonemes. *Cell structure and function* 24, 27-33.
- Mitchison, T.J., and Mitchison, H.M. (2010). Cell biology: How cilia beat. *Nature* 463, 308-309.
- Moreira-Leite, F.F., Sherwin, T., Kohl, L., and Gull, K. (2001). A trypanosome structure involved in transmitting cytoplasmic information during cell division. *Science* 294, 610-612.
- Mulenga, C., Mhlanga, J.D., Kristensson, K., and Robertson, B. (2001). *Trypanosoma brucei brucei* crosses the blood-brain barrier while tight junction proteins are preserved in a rat chronic disease model. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27, 77-85.
- Munn, L.L., and Dupin, M.M. (2008). Blood cell interactions and segregation in flow. *Ann Biomed Eng* 36, 534-544.
- Mwangi, D.M., Hopkins, J., and Luckins, A.G. (1995). *Trypanosoma congolense* infection in sheep: ultrastructural changes in the skin prior to development of local skin reactions. *Vet Parasitol* 60, 45-52.
- Nascimento, J.M., Shi, L.Z., Meyers, S., Gagneux, P., Loskutoff, N.M., Botvinick, E.L., and Berns, M.W. (2008). The use of optical tweezers to study sperm competition and motility in primates. *J R Soc Interface* 5, 297-302.
- Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14687-14692.
- Nikolskaia, O.V., de A Lima, A.P., Kim, Y.V., Lonsdale-Eccles, J.D., Fukuma, T., Scharfstein, J., and Grab, D.J. (2006a). Blood-brain barrier traversal by African trypanosomes requires calcium signaling induced by parasite cysteine protease. *J Clin Invest* 116, 2739-2747.
- Nikolskaia, O.V., Kim, Y.V., Kovbasnjuk, O., Kim, K.J., and Grab, D.J. (2006b). Entry of *Trypanosoma brucei gambiense* into microvascular endothelial cells of the human blood-brain barrier. *Int J Parasitol* 36, 513-519.
- Norman, J.T., Nayak, H., and Bonnecaze, R. (2005). Migration of buoyant particles in low-Reynolds-number pressure-driven flows. *Journal of Fluid Mechanics*.
- Oberholzer, M., Bregy, P., Marti, G., Minca, M., Peier, M., and Seebeck, T. (2007). Trypanosomes and mammalian sperm: one of a kind? *Trends Parasitol* 23, 71-77.
- Oberholzer, M., Lopez, M.A., McLelland, B.T., and Hill, K.L. (2010). Social motility in african trypanosomes. *PLoS Pathog* 6, e1000739.
- Okuda, R., Sugii, Y., and Okamoto, K. (2003). Velocity Measurement of Blood Flow in a Microtube Using Micro PIV System. *Proceedings of PSFPIV-4 June*, 3-5.

- Omoto, C., Gibbons, I., Kamiya, R., Shingyoji, C., Takahashi, K., and Witman, G. (1999). Rotation of the central pair microtubules in eukaryotic flagella. *Mol Biol Cell* 10, 1.
- Overath, P., and Engstler, M. (2004). Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Mol Microbiol* 53, 735-744.
- Park, S., Hwang, H., Nam, S.W., Martinez, F., Austin, R.H., and Ryu, W.S. (2008). Enhanced *Caenorhabditis elegans* locomotion in a structured microfluidic environment. *PLoS ONE* 3, e2550.
- Parkhurst, M.R., and Saltzman, W.M. (1994). Leukocytes migrate through three-dimensional gels of midcycle cervical mucus. *Cell Immunol* 156, 77-94.
- Pate, E.F., and Brokaw, C.J. (1980). Movement of spermatozoa in viscous environments. *Journal of Experimental Biology*.
- Pfohl, T., Mugele, F., Seemann, R., and Herminghaus, S. (2003). Trends in microfluidics with complex fluids. *Chemphyschem* : a European journal of chemical physics and physical chemistry 4, 1291-1298.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212.
- Portman, N., and Gull, K. (2009). The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function. *Int J Parasitol*.
- Pullen, T.J., Ginger, M.L., Gaskell, S.J., and Gull, K. (2004). Protein targeting of an unusual, evolutionarily conserved adenylate kinase to a eukaryotic flagellum. *Mol Biol Cell* 15, 3257-3265.
- Purcell, E. (1997). The efficiency of propulsion by a rotating flagellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 11307-11311.
- Purcell, E.M. (1977). Life at low Reynolds number. *Am J Phys*.
- Rabut, G., and Ellenberg, J. (2004). Automatic real-time three-dimensional cell tracking by fluorescence microscopy. *J Microsc* 216, 131-137.
- Ralston, K.S., and Hill, K.L. (2006). Trypanin, a component of the flagellar Dynein regulatory complex, is essential in bloodstream form African trypanosomes. *PLoS Pathog* 2, e101.
- Ralston, K.S., and Hill, K.L. (2008). The flagellum of *Trypanosoma brucei*: new tricks from an old dog. *Int J Parasitol* 38, 869-884.
- Ralston, K.S., Kabututu, Z.P., Melehani, J., Oberholzer, M., and Hill, K.L. (2009). The *Trypanosoma brucei* Flagellum: Moving Parasites in New Directions. *Annual Review of Microbiology* 63, 335-362.
- Ralston, K.S., Lerner, A.G., Diener, D.R., and Hill, K.L. (2006). Flagellar motility contributes to cytokinesis in *Trypanosoma brucei* and is modulated by an evolutionarily conserved dynein regulatory system. *Eukaryotic Cell* 5, 696-711.
- Reichert, M., and Stark, H. (2004). Hydrodynamic coupling of two rotating spheres trapped in harmonic potentials. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* 69, 031407.
- Reichert, M., and Stark, H. (2005). Synchronization of rotating helices by hydrodynamic interactions. *The European physical journal E, Soft matter* 17, 493-500.

- Ridgley, E., Webster, P., Patton, C., and Ruben, L. (2000). Calmodulin-binding properties of the paraflagellar rod complex from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 109, 195-201.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.
- Robinson, D.R., and Gull, K. (1991). Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature* 352, 731-733.
- Robinson, D., P. Beattie, T. Sherwin, and K. Gull. 1991. Microtubules, tubulin, and microtubule-associated proteins of trypanosomes. *Methods Enzymol.* 196:285–299.
- Rodríguez, J.A., Lopez, M.A., Thayer, M.C., Zhao, Y., Oberholzer, M., Chang, D.D., Kisalu, N.K., Penichet, M.L., Helguera, G., Bruinsma, R., *et al.* (2009). Propulsion of African trypanosomes is driven by bihelical waves with alternating chirality separated by kinks. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Roper, J.R., Guther, M.L., Milne, K.G., and Ferguson, M.A. (2002). Galactose metabolism is essential for the African sleeping sickness parasite *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 5884-5889.
- Sakai, H., Sato, A., Okuda, N., Takeoka, S., Maeda, N., and Tsuchida, E. (2009). Peculiar flow patterns of RBCs suspended in viscous fluids and perfused through a narrow tube (25 microm). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H583-589.
- Sakakibara, H.M., Kunioka, Y., Yamada, T., and Kamimura, S. (2004). Diameter oscillation of axonemes in sea-urchin sperm flagella. *Biophys J* 86, 346-352.
- Santrich, C., Moore, L., Sherwin, T., Bastin, P., Brokaw, C., Gull, K., and LeBowitz, J.H. (1997). A motility function for the paraflagellar rod of *Leishmania* parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. *Mol Biochem Parasitol* 90, 95-109.
- Satir, P. (1968). Studies on cilia. 3. Further studies on the cilium tip and a "sliding filament" model of ciliary motility. *J Cell Biol* 39, 77-94.
- Schmitz, K., Holcomb-Wygle, D., Oberski, D., and Lindemann, C. (2000). Measurement of the force produced by an intact bull sperm flagellum in isometric arrest and estimation of the dynein stall force. *Biophys J* 79, 468-478.
- Schneider, W.R., and Doetsch, R.N. (1974). Effect of viscosity on bacterial motility. *J Bacteriol* 117, 696-701.
- Schneider, W.R., and Doetsch, R.N. (1977). Temperature effects on bacterial movement. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Segré, G. and Silberberg, A. (1962). *J. Fluid Mech.*, 14,136.
- Selmeçzi, D., Li, L., Pedersen, L.I., Nrrølykke, S.F., Hagedorn, P.H., Mosler, S., Larsen, N.B., Cox, E.C., and Flyvbjerg, H. (2008). Cell motility as random motion: A review. *The European Physical Journal - Special Topics* 157, 1-15.
- Selmeçzi, D., Mosler, S., Hagedorn, P.H., Larsen, N.B., and Flyvbjerg, H. (2005). Cell motility as persistent random motion: theories from experiments. *Biophys J* 89, 912-931.
- Siegel, T.N., Hekstra, D.R., and Cross, G.A. (2008). Analysis of the *Trypanosoma brucei* cell cycle by quantitative DAPI imaging. *Mol Biochem Parasitol* 160, 171-174.
- Silflow, C., and Lefebvre, P. (2001). Assembly and Motility of Eukaryotic Cilia and Flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 127, 1500-1507.

- Sleigh, M.A. (1991). Mechanisms of flagellar propulsion. *Protoplasma*.
- Sloboda, R.D., and Rosenbaum, J.L. (2007). Making sense of cilia and flagella. *J Cell Biol* 179, 575-582.
- Stücker, M., Baier, V., Reuther, T., Hoffmann, K., Kellam, K., and Altmeyer, P. (1996). Capillary blood cell velocity in human skin capillaries located perpendicularly to the skin surface: measured by a new laser Doppler anemometer. *Microvasc Res* 52, 188-192.
- Sugii, Y., Okuda, R., Okamoto, K., and Madarame, H. (2005). Velocity measurement of both red blood cells and plasma of in vitro blood flow using high-speed micro PIV technique. *Meas Sci Technol* 16, 1126-1130.
- Sugrue (1988). Flagellar wave reversal in the kinetoplastid flagellate *Crithidia oncopelti*. *Biology of the Cell*.
- Sznitman, R., Gupta, M., Hager, G.D., Arratia, P.E., and Sznitman, J. (2010). Multi-environment model estimation for motility analysis of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 5, e11631.
- Tani, T., and Kamimura, S. (1999). Dynein-ADP as a force-generating intermediate revealed by a rapid reactivation of flagellar axoneme. *Biophys J* 77, 1518-1527.
- Tetley, L., and Vickerman, K. (1985). Differentiation in *Trypanosoma brucei*: host-parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat. *J Cell Sci* 74, 1-19.
- Toetsch, S., Olwell, P., Prina-Mello, A., and Volkov, Y. (2009). The evolution of chemotaxis assays from static models to physiologically relevant platforms. *Integr Biol (Camb)* 1, 170-181.
- Tsubota et al. (2006). A Particle Method for Blood Flow Simulation. *J. Earth Sim.*, Vol. 5, Mar. 2006, 2-7.
- Turner, L., Zhang, R., Darnton, N.C., and Berg, H.C. (2010). Visualization of Flagella during Bacterial Swarming. *J Bacteriol*.
- Vassella, E., Reuner, B., Yutzy, B., and Boshart, M. (1997). Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J Cell Sci* 110 (Pt 21), 2661-2671.
- Vaughan, S. (2010). Assembly of the flagellum and its role in cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol*.
- Vaughan, S., and Gull, K. (2003). The trypanosome flagellum. *J Cell Sci* 116, 757-759.
- Vaughan, S., and Gull, K. (2008). The structural mechanics of cell division in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Trans* 36, 421-424.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., and Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.
- Viswanathan, G.M. (2010). Ecology: Fish in Lévy-flight foraging. *Nature* 465, 1018-1019.
- Viswanathan, G.M., Buldyrev, S.V., Havlin, S., da Luz, M.G., Raposo, E.P., and Stanley, H.E. (1999). Optimizing the success of random searches. *Nature* 401, 911-914.
- Walmod, P.S., Hartmann-Petersen, R., Prag, S., Lepekhn, E.L., Röpke, C., Berezin, V., and Bock, E. (2004). Cell-cycle-dependent regulation of cell motility and determination of the role of Rac1. *Exp Cell Res* 295, 407-420.

- Wargo, M. (2004). Analysis of microtubule sliding patterns in *Chlamydomonas* flagellar axonemes reveals dynein activity on specific doublet microtubules. *J Cell Sci* 117, 2533-2544.
- Waturi, N., and Larson, R.G. (2010). The Hydrodynamics of a Run-and-Tumble Bacterium Propelled by Polymorphic Helical Flagella. *Biophys J* 98, 12-17.
- Wickstead, B., and Gull, K. (2007). Dyneins across eukaryotes: a comparative genomic analysis. *Traffic* 8, 1708-1721.
- Woolley, D., Gadelha, C., and Gull, K. (2006). Evidence for a sliding-resistance at the tip of the trypanosome flagellum. *Cell Motil Cytoskeleton* 63, 741-746.
- Xu, W., Jericho, M.H., Kreuzer, H.J., and Meinertzhagen, I.A. (2003). Tracking particles in four dimensions with in-line holographic microscopy. *Optics letters*.
- Yagi, T., and Kamiya, R. (1995). Novel mode of hyper-oscillation in the paralyzed axoneme of a *Chlamydomonas* mutant lacking the central-pair microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* 31, 207-214.
- Yang, P., Diener, D.R., Rosenbaum, J.L., and Sale, W.S. (2001). Localization of calmodulin and dynein light chain LC8 in flagellar radial spokes. *J Cell Biol* 153, 1315-1326.
- Yang, P., Diener, D.R., Yang, C., Kohno, T., Pazour, G.J., Dienes, J.M., Agrin, N.S., King, S.M., Sale, W.S., Kamiya, R., *et al.* (2006). Radial spoke proteins of *Chlamydomonas* flagella. *J Cell Sci* 119, 1165-1174.
- Yang, X., Dillon, R.H., and Fauci, L.J. (2008). An integrative computational model of multiciliary beating. *Bull Math Biol* 70, 1192-1215.
- Yousaf, M.N. (2009). Model substrates for studies of cell mobility. *Curr Opin Chem Biol* 13, 697-704.
- Zarbock, A., and Ley, K. (2009). Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation* 16, 31-42.
- Zhang, T., and Fang, H.H. (2005). Effective diffusion coefficients of glucose in artificial biofilms. *Environ Technol* 26, 155-160.
- Zhao, Y., and Zhang, X. (2006). Cellular mechanics study in cardiac myocytes using PDMS pillars array. *Sensors & Actuators: A Physical*.

9. Anhang

Wir stolze Menschenkinder
Sind eitel arme Sünder,
Und wissen gar nicht viel.
Wir spinnen Luftgespinste
Und suchen viele Künste,
Kommen weiter von dem Ziel.

(Matthias Claudius)

Mich selbst, ganz wie ich da bin, auszubilden war
von früh'ster Jugend an mein Ziel.

(J. W. Goethe)

fin

9.1 Erklärungen gem. §4 (3) der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Diese Dissertation wurde betreut durch Prof. Dr. Markus Engstler und hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren bereits vorgelegen. Ein Verzeichnis der bisher veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten liegt bei.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich früher außer dem Studienabschluss an der LMU München mit dem Dipl. Biol. keine weiteren akademischen Grade erworben habe, oder zu erwerben versucht habe.

Niko Heddergott

Würzburg, den 10.01.2011

9.2 Publikationsliste

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Engstler am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Darmstadt im Zeitraum von August 2006 bis Juli 2009 begonnen und nach Umzug der Arbeitsgruppe an die Uni Würzburg (Zell- & Entwicklungsbiologie) im Zeitraum von August 2009 bis Dezember 2010 fortgesetzt. Die holographischen Messungen in dieser Arbeit wurden durchgeführt in Kooperation mit der AG Rosenhahn (Uni Heidelberg / Karlsruhe) und die mikrofluidischen Experimente in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Strömungsphysik in Göttingen, AG Pfohl (Göttingen / Basel).

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

Engstler, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N., and Overath, P. (2007). Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* 131, 505-515.

Heddergott, N. and Engstler, M. (in Vorbereitung). The microenvironment controls swimming direction of African trypanosomes. Manuskript liegt bei.

Heddergott, N. and Engstler, M. (in Vorbereitung). Trypanosomes are adapted to mammalian bloodstream. Manuskript liegt bei.

Uppaluri, S., Nagler, J., Stellamanns, E., Heddergott, N., Herminghaus, S., Engstler, M., Pfohl, T. (2010). Impact of microscopic motility on the swimming behavior of parasites: stiffer trypanosomes are more directional. Eingereicht bei PLoS Computational Biology.

weitere Publikationen ohne direkten Bezug zu dieser Arbeit:

Engstler, M., Weise, F., Bopp, K., Grünfelder, C.G., Günzel, M., Heddergott, N., and Overath, P. (2005). The membrane-bound histidine acid phosphatase TbMBAP1 is essential for endocytosis and membrane recycling in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 118, 2105-2118.

9.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Niko Heddergott
Geburtsdatum: 27. Februar 1980
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Werdegang

seit 01.08.2009 **Doktorand / wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Uni Würzburg** (Zell- & Entwicklungsbiologie; Umzug der Arbeitsgruppe an die Uni Würzburg)

01.08.2006 – 31.07.2009 **Doktorand / wissenschaftlicher Mitarbeiter an der TU Darmstadt** (Mikrobiologie & Genetik)

01.10.2000 – 26.04.2006 **Studium an der LMU München**
Abschluss: Diplom Biologe
Gesamtnote: 1,2

01.07.1999 – 30.04.2000 **Grundwehrdienst**

Sep. 1990 – Juni 1999 **Gymnasium WHG München**
Allgemeine Hochschulreife

Niko Heddergott

Würzburg, den 10.01.2011

9.4 Danksagung

Meinem Betreuer Prof. Dr. Markus Engstler möchte ich vor allem dafür danken, dass ich ein so spannendes Projekt bearbeiten durfte, bei dem man in vielen anregenden und hilfreichen Diskussionen merkte, dass daran auch einiges von seinem Herzblut hing.

Herrn Prof. Dr. Thomas Dandekar danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Norbert Wilken danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sowie zahlreiche Anregungen und Dr. Timothy Krüger danke ich für die Korrektur der Manuskripte der anstehenden Veröffentlichungen.

Ich möchte auch allen weiteren Mitgliedern unserer gesamten Arbeitsgruppe (sowohl Darmstadt, als auch Würzburg) danken für die stets freundschaftliche Unterstützung mit Rat und Tat. Besonders erwähnen möchte ich hierbei Dr. Nicola Jones, Dr. Mark Günzel, Christopher Batram, Andreas Hartel und Jamin Jung.

Prof. Dr. Thomas Pfohl (MPI Göttingen / Uni Basel), Sravanti Uppaluri, Eric Stellamanns und Prof. Dr. Stephan Herminghaus (MPI Göttingen) danke ich für die praktische und theoretische Einweisung in die Mikrofluidik, die angenehme Zeit in Göttingen, die gemeinsamen Experimente und viele anregende und kurzweilige Diskussionen.

Sebastian Weiße und Dr. Axel Rosenhahn (Uni Heidelberg / Karlsruhe) danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit bei den holographischen Messungen.

Bei Janina Hellmann und Dr. Friedrich Frischknecht (Universitätsklinikum Heidelberg) bedanke ich mich für die großzügige Versorgung mit PDMS-Pillarwäldern und hilfreiche Gespräche.

Allen Personen, die weitere Materialien (wie Antikörper, Vektoren, oder Konstrukte) oder den exklusiven Zugang zu Prototypen neuer Geräte (TILL Photonics; PCO) für diese Arbeit bereitgestellt haben, danke ich ebenfalls.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und Freunden für ihre Aufmunterung und dafür, dass ich mich einfach immer auf sie verlassen konnte.

Dieses Projekt wurde gefördert durch das DFG Schwerpunktprogramm SPP1207. Ich bedanke mich auch beim Graduiertenkolleg GRK1114 (Darmstadt / Heidelberg) für die Weiterbildung.