
**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg**

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Sebastian Alexander Weiße
geboren am 09.09.1981 in Baden-Baden

Tag der mündlichen Prüfung:
10.10.2011

**Quantitative Untersuchung der Motilität des
Blutparasiten *Trypanosoma brucei brucei*
durch 4D-Tracking mittels digitaler In-line
Holographie**

Gutachter: Prof. Dr. Michael Grunze
Prof. Dr. Joachim P. Spatz

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	1
Abstract.....	2
1 Der Modellorganismus: Afrikanische Trypanosomen	3
2 Bewegung bei kleinen Reynoldszahlen.....	7
2.1 Die Fortbewegung flagellierter Mikroschwimmer	9
2.2 Der Aufbau des Trypanosomenflagellums und seine Implikationen für postulierte Schwimmechanismen	13
2.2.1 Aufbau des Flagellums auf molekularer Ebene.....	13
2.2.2 Motorproteine	15
2.2.3 Rolle der Orientierung des zentralen Mikrotubulipaars	17
2.2.4 Das paraflagellar rod	17
2.2.5 Run-and-tumble-Modell der Trypanosomenbewegung	17
2.2.6 Regulation des Flagellenschlags.....	19
2.2.7 Alternativer Schwimmechanismus für Trypanosomen	20
3 Theoretische Grundlagen und Anwendungen der Holographie	23
3.1 Physikalische Grundlagen.....	23
3.2 Digitale in-line Holographie	25
3.2.1 Auflösung	27
3.2.2 Numerische Rekonstruktion	28
3.3 Stand der Technik	29
3.3.1 Physikalisch-technische Anwendungen	29
3.3.2 Holographische Anwendungen in der Biologie.....	29
4 Experimenteller Teil.....	31
4.1 Das holographische Mikroskop	31
4.2 Zellkultur von <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	34
4.3 Durchführung des Experiments	35
4.3.1 Auswahl der Probenkammer	35
4.3.2 Eignung des Aufbaus zur Vermessung von Trypanosomen: Ausschluss von Photo- und Chemotaxis	37
4.3.3 Allgemeines Messprotokoll.....	39

4.4	Datenanalyse	40
4.4.1	Hologrammvorbereitung und -rekonstruktion.....	40
4.4.2	Holographie in Umgebungen mit multiplen Medien [146].....	44
4.4.3	Datenauswertung	45
4.4.3.1	Trajektorienbestimmung	46
4.4.3.2	Bestimmung der Schwimmgeschwindigkeit.....	47
4.4.3.3	Bestimmung der Schwimmwinkel	48
4.4.3.4	Ausbreitungsanalyse.....	48
5	Ergebnisse.....	49
5.1	Geschwindigkeitsanalyse	53
5.1.1	Segmentierung von schaltenden Trajektorien	61
5.1.2	Detailanalyse des Schaltverhaltens.....	65
5.1.3	Korrelation der Geschwindigkeitsverteilungen schaltender Organismen mit den Ensembleverteilungen.....	67
5.2	Analyse des Schwimmwinkels	75
5.3	Ausbreitungsanalyse	79
5.4	Analyse der Segmentdauern	82
5.5	Externe Referenzsysteme für die Schwimmzustände	84
6	Diskussion	97
6.1	Run-and-tumble-Zwei-Zustands-Modell der Motilität von <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	97
6.2	Vergleich der charakteristischen Kenngrößen für die beobachteten Schwimmmodi	101
6.3	Temperaturabhängigkeit der relativen Population der Schwimmmodi von Blutstromformentrypanosomen.....	104
6.4	Die Lebenszyklusstadien von <i>Trypanosoma brucei brucei</i> sind auf die physiologischen Bedingungen optimiert	106
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	111
8	Anhang A.....	113
8.1	Segmentierung bimodal schaltender Trajektorien	113
9	Anhang B.....	117
9.1	Eigene Publikationen	117
9.2	Abkürzungs-und Fremdwortverzeichnis.....	118

9.3	Tabellenverzeichnis	120
9.4	Abbildungsverzeichnis.....	121
9.5	Literaturverzeichnis	130
	Danksagung	139

Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Motilität des Blutparasiten *Trypanosoma brucei brucei* untersucht. Dieser vor allem in Subsahara-Afrika verbreitete Organismus wird von der Tsetse-Fliege auf Menschen und Tiere übertragen und löst die unbehandelt tödlich verlaufende Afrikanische Schlafkrankheit aus. Nur wenige Medikamente sind bekannt, diese zeichnen sich jedoch meistens durch das Auftreten schwerer Nebenwirkungen aus. Der Organismus ist lange bekannt und seine Eigenmotilität wird seit langem mit seiner Pathogenität in Verbindung gebracht, trotzdem fehlen bislang weitgehend quantitative Untersuchungen zur Fortbewegung, vor allem der im infizierten Organismus vorkommenden Blutstromformen. Eine Strategie des Parasiten um die Immunantwort des Wirtes zu umgehen ist das „Abwaschen“ an der Zelloberfläche gebundener Antikörper durch gerichtetes Schwimmen. Desweiteren ist die Eigenbewegung von großer Bedeutung für die Zellteilung und damit erfolgreiche Vermehrung des Organismus sowie für die Verteilung im Wirt, da im Endstadium der Krankheit durch den Parasiten aktiv die Blut-Hirn-Schranke passiert wird. Die Kenntnis des zugrundeliegenden Fortbewegungsmechanismus ist also von grundlegender Bedeutung zum Verständnis der Pathogenese und damit zur Entwicklung von Strategien zur medikamentösen Bekämpfung des Erregers im infizierten Wirt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Motilitätsverhalten von Trypanosomen unterschiedlicher Lebenszyklusstadien bei verschiedenen Temperaturen mikroskopisch untersucht. Dazu wurde ein portables, holographisches Mikroskop entwickelt, das die Vermessung von Trypanosomen bei physiologischen Temperaturen mit hoher Auflösung und Stabilität erlaubt.

Die erhaltenen 3D-Daten erlauben erstmals eine quantitative Analyse frei schwimmender Trypanosomen über große Volumina und Zeiträume. Aus den Daten wurden zwei deutlich unterscheidbare Schwimmezustände abgeleitet, für die charakteristische Schwimmparameter, wie mittlere Schwimgeschwindigkeiten und –winkel sowie typische Ausbreitungsverhalten abgeleitet werden konnten. Die Schwimmezustände konnten durch Referenzmessungen mit Motilitätsmutanten und unter Verwendung spezieller Probenkammern erfolgreich zwei unterschiedlichen Bewegungsmodi der die Trypanosomen antreibenden Struktur, dem Flagellum, zugeordnet werden.

Die erhaltenen Daten zeigen deutlich die Adaption der Lebenszyklusstadien an ihre jeweils physiologische Temperatur und stützen eines der postulierten Modelle für die Trypanosomenbewegung, das run-and-tumble-Modell. Sie stellen somit einen wichtigen Beitrag zur Diskussion des Fortbewegungsmechanismus von Trypanosomen dar.

Abstract

In the given work the motility of the blood parasite *Trypanosoma brucei brucei* was investigated. The organism predominantly occurs in Sub Sahara Africa, where it is conducted to its human or mammalian hosts via the Tsetse fly, causing the African Sleeping Sickness, which is fatal unless treated. Drugs are rare and show severe side effects. The organism has been known for a long time and its active self-propulsion has been brought into context with its pathogenity, however quantitative data on the motility, especially of the blood stream forms in the infected hosts, are still widely missing. One known strategy of the parasite to evade the immune response is washing off surface bound antibodies by the shear forces occurring while directed swimming of the organism. Motility is also crucial for cell division and the distribution of the parasite in the host's organism, i.e. when it passes the blood brain barrier in late stages of the disease. Therefore a deeper understanding of *Trypanosoma's* underlying motility mechanisms is pivotal for developing new strategies to fight Sleeping Sickness.

In the course of this work the motility of different cell cycle states of *T. brucei* at different temperatures has been studied in 3D. To do so a portable holographic microscope with temperature control has been developed to track trypanosomes at their physiological temperatures with high stability and accuracy.

The resulting 3D data allow for the first time to quantitatively analyze free swimming trypanosomes over large volumes and long time spans. From the data two distinct swimming modes and their characteristic values for motility parameters such as swimming speed, angle and displacement could be derived. By conducting reference measurements with motility mutants and modified sample cuvettes, the two swimming states could be linked to two different beating modes of the trypanosomes' propulsion unit, the flagellum. Adaption of the two cell cycle states under investigation to their physiological temperatures could be shown and one of the motility models in discussion for trypanosomes, the run-and-tumble, could be further strengthened with the results of this work. Therefore this study is an important contribution to the ongoing discussion on trypanosome motility.

1 Der Modellorganismus: Afrikanische Trypanosomen

Die einzelligen Parasiten der Ordnung der Trypanosomatiden sind seit fast zwei Jahrhunderten Gegenstand intensiver Forschung. Bereits im Jahr 1843 beschrieben [1], wurde diesen allgegenwärtigen Mikroorganismen ihr Name „Bohrkörper“ (*trypanon*, griechisch für Bohrer; *soma*, griechisch für Körper) gegeben. Die Bezeichnung leitet sich von dem für diese Zellen postulierten korkenzieherartigen Bewegungsmuster ab. Trotz dieser Festlegung vor rund 170 Jahren ist der eigentliche Fortbewegungsmechanismus der Zellen noch immer Gegenstand heftiger Diskussion und es werden verschiedene Modelle angenommen [2-6], die in Abschnitt 2.2 näher diskutiert werden.

Trypanosomatiden treten in einer Vielzahl von Säugetieren als Erreger von Krankheiten auf [7], aber nicht nur in diesem Umfeld, sondern auch in sich davon stark unterscheidenden Umgebungen wie in Pflanzen (z.B. Kokosnüsse) [8] kommen sie vor. Trotz dieses breiten Vorkommens und den entsprechend grob unterschiedlichen Lebensräumen, weisen alle Trypanosomatiden Gemeinsamkeiten in Bau und Funktion der Zelle auf [7-8].

Diese Arbeit befasst sich mit Organismen vom Typ *Trypanosoma brucei brucei* von der Gattung der Trypanosomen. Hierbei handelt es sich um den Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit (Afrikanische Trypanosomiasis). Diese unbehandelt tödlich verlaufende Krankheit [7, 9] ist vor allem in Subsahara-Afrika verbreitet, wo sie neben den Auswirkungen auf die Bevölkerung auch das wirtschaftliche Wachstum hemmt. Zur Familie *Trypanosoma brucei* gehören drei Unterarten, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* und *T. b. brucei*. Während die ersten beiden humanpathogen sind, ist die dritte, in dieser Arbeit untersuchte Spezies, *Trypanosoma brucei brucei*, pathogen für Vieh. Aufgrund dieser Eigenschaft und der nahen Verwandtschaft zu den humanpathogenen Spezies wird sie häufig für Untersuchungen an sog. Blutstromformtrypanosomen, den im infizierten Organismus vorkommenden Lebenszyklusstadien, herangezogen.

Als Überträger des Parasiten auf den Wirtsorganismus fungiert die Tsetse-Fliege (*Glossina spec.*), deren Vorkommen auch das Verbreitungsgebiet der Krankheit bestimmt. Beim Stich übertragene Mikroorganismen wandern über das Hautgewebe in die Blutbahn, wobei sie einer Morphogenese unterworfen sind. Somit bilden sich aus im Fliegenspeichel vorkommenden Formen die Blutstromformen aus. Diese sind schließlich für den Ausbruch der Krankheit verantwortlich und attackieren im Endstadium der Erkrankung das zentrale Nervensystem des Wirtsorganismus [9]. Die Krankheit zeichnet sich durch lange Inkubationszeiten aus, was die Diagnose und Behandlung erschwert. Aktuell leben ca. 60 Millionen Menschen in ihrem Verbreitungsgebiet und es treten jährlich etwa 12000 Neuinfektionen auf. Ob ihrer räumlich beschränkten Verbreitung gehört die Trypanosomiasis zu den vernachlässigten Tropenkrankheiten. Nur wenige Medikamente sind bekannt, diese sind meist hochgradig toxisch und verursachen massive

Nebenwirkungen, ihre genauen Wirkmechanismen sind meist unbekannt [10]. Nach großen Epidemien im 19. Jahrhundert war die Krankheit in den 1960er Jahren durch Bekämpfung des Überträgers (Tsetse-Fliege) so gut wie ausgerottet, die Infektionszahl steigt jedoch seit den späten 1990er Jahren wieder massiv an. Dieser Anstieg ist unter anderem auf die fortschreitende Unabhängigkeit der betroffenen Staaten und den damit einhergehenden Zusammenbruch von zuvor durch Kolonialmächten etablierten Maßnahmen aus finanziellen und organisatorischen Gründen zurückzuführen [9].

Trotz der auf einer globalen Skala vernachlässigbaren Infektionszahl behindert die Trypanosomiasis in ländlichen Gebieten Afrikas massiv die Entwicklung und bewirkt unter anderem, dass fruchtbare Regionen innerhalb des Verbreitungsgebiets nicht genutzt werden können, da Infektionsgefahr für Mensch und Tier besteht. Desweiteren geht die WHO (World Health Organisation) davon aus, dass die Anzahl der Infektionen um den Faktor 3-4 unterschätzt wird, da die meisten Fälle in dörflichen Regionen auftreten, wo sie nicht korrekt diagnostiziert oder gemeldet werden [9].

Die Krankheit verläuft in zwei Stadien. Erste Anzeichen sind Fieber, Kopfschmerzen und Anschwellen der Lymphknoten. Im zweiten Krankheitsstadium werden häufig Schlafstörungen beobachtet, was der Krankheit ihren Namen einbrachte. Außerdem treten Tremor und Lähmungen sowie Verwirrtheit, Apathie und aggressives Verhalten auf. Diese Symptome werden durch das Überwinden der Blut-Hirnschranke durch die Trypanosomen und anschließende Schädigung des zentralen Nervensystems hervorgerufen, die schließlich zum Tod führt.

Die Blutparasiten sind typischerweise von länglicher Gestalt, wobei das einzeln vorhandene Flagellum entlang des Zellkörpers angeheftet ist.

Die Schwimmbewegung eines Trypanosoms erfolgt in einer Zellorientierung mit führendem Zugflagellum. Trypanosomen stellen ob dieses Aufbaus einen Spezialfall eines Mikroschwimmers dar, da die meisten uniflagellaten Mikroschwimmer kein Zug- sondern ein Druckflagellum aufweisen. Trotz dieser Unterschiede gehört der grundlegende Aufbau des Flagellums zu den genetisch konserviertesten Strukturen, die sich in eukaryotischen Zellen beobachten lassen [11-12]. Eine ausführliche Diskussion der Motilitätsmechanismen verschiedener Mikroorganismen findet sich in Abschnitt 2.1.

Die Hauptmotivation zur Untersuchung der Motilität von Trypanosomen liegt darin, dass ihre Eigenbewegung neben der Bedeutung etwa für die Zellteilung [6, 13-14] vor allen bei der Immunabwehr eine entscheidende Rolle spielt [15-16]. Engstler *et al.* publizierten 2007 den sog. „molecular sails“-Mechanismus [16], der beschreibt, wie Trypanosomen durch aktives „Abwaschen“ oberflächengebundener Antikörper einer Immunantwort des Wirtsorganismus entgehen können.

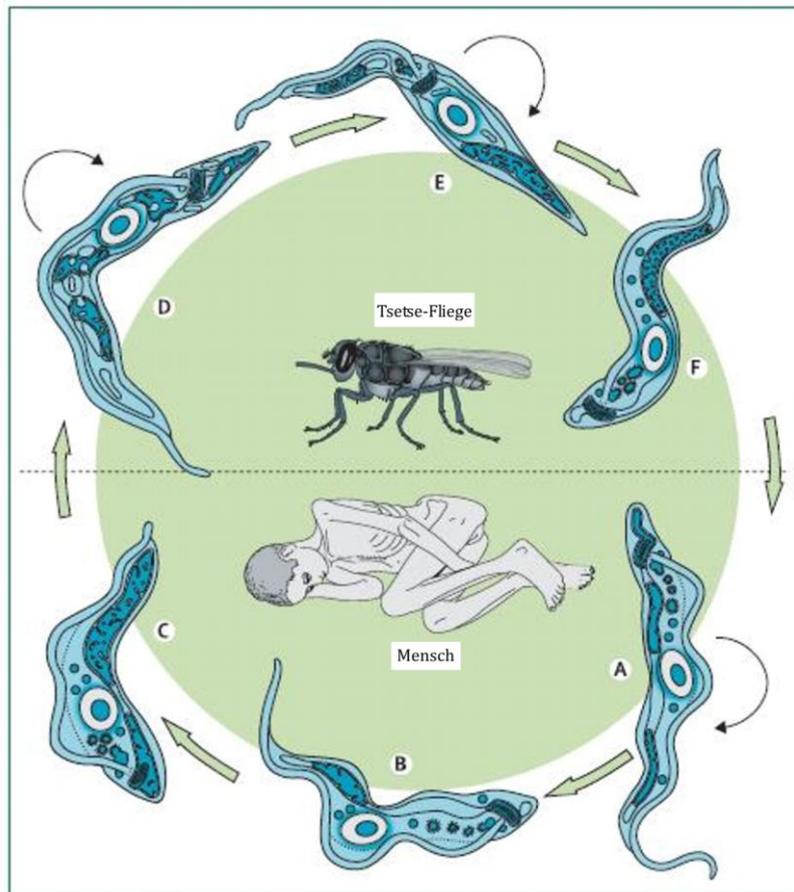


Abbildung 1: Lebenszyklus afrikanischer Trypanosomen, A-C) Blutstromformen (BSF, blood stream forms), D-F) Prozyklische Trypanosomen (PCF, procyclic forms). A) Teilungsaktive „slender“-BSF-Zelle, B) Intermediäre Form, C) „short stumpy“-Form, D) teilungsaktive Mitteldarm-PCF-Zelle, E) migrierende Epimastigote, F) Infektiöses metazyklisches Trypanosom [9].

Dieser Mechanismus existiert neben dem weit verbreiteten Konzept der antigenen Varianz [9], d.h. die Zelle kann je nach genetischem Programm unterschiedliche Zelloberflächenproteine, die sog. VSGs (variable surface glycoproteins) exprimieren. Durch diese Variation wird es dem Immunsystem erschwert den Parasiten zu detektieren, da je nach Oberflächenprotein ein anderer Antikörper benötigt wird, um die Zelle als körperfremd zu erkennen. Dieser Abwehrmechanismus ist allerdings langsam, da jede Zelle immer nur eine Art von Oberflächenprotein exprimieren kann. Ein weiterer wesentlich speziellerer und vor allem schnellerer Mechanismus ist das „Abwaschen“ oberflächengebundener Antikörper durch Scherkräfte. Hierbei macht sich die Zelle den hydrodynamischen Widerstand, den ein membrangebundenes Molekül gegenüber dem umgebenden Medium aufweist, zu Nutze. Schwimmt die Zelle in einer gerichteten Bewegung mit dem Flagellum in führender Position, so können gebundene Antikörper durch die auf der Zelloberfläche wirkende Scherkraft zum hinteren Zellende transportiert werden, wo sich ein spezielles Organell, die flagellare Tasche, befindet. Dies ist der einzige Ort an dem Trypanosomen Endo- und Exozytose betreiben können, also Stoffe ins

Zellinnere oder aus der Zelle heraus transportiert werden können [7]. Dort werden die Antikörper ins Zellinnere aufgenommen und schließlich enzymatisch verdaut, wodurch eine effektive Abwehrstrategie entsteht. Wie oben beschrieben und wie an Motilitätsmutanten gezeigt wurde [16], kann dieser Mechanismus jedoch nur so lange aufrecht erhalten werden, wie die Zelle sich in einer gerichteten Vorwärtsbewegung befindet. Über die Grundlagen der Eigenbewegung des Blutparasiten ist jedoch wenig bekannt. Viele Studien beziehen sich nicht auf die im befallenen Organismus vorkommenden Blutstromformen des Parasiten, sondern auf die im Überträger, der Tsetse-Fliege, vorkommenden Stadien, da diese Organismen einfacher zu kultivieren und zu handhaben sind [6, 17]. Generelle Mechanismen zur Motilität sind, soweit überhaupt Modelle vorhanden sind, immer noch ein Feld des wissenschaftlichen Disputs [3, 6, 18]. Ein Verständnis dieser Mechanismen ist jedoch ein grundlegend notwendiger Schritt für das Verständnis elementarer Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen, wie der Umgehung der Immunantwort durch Trypanosomen durch ihre hoch spezialisierte Motilität und somit die Grundlage zur Entwicklung von Strategien für die effektive Bekämpfung der Afrikanischen Schlafkrankheit.

2 Bewegung bei kleinen Reynoldszahlen

Die Reynoldszahl (Formelzeichen Re , vgl. Gleichung (1)) ist eine dimensionslose Kennzahl aus der Strömungsphysik. Sie beschreibt das Verhältnis von Trägheits- zu viskosen Reibungskräften und ist damit ein Maß für das Turbulenzverhalten eines Körpers der einem Fluidfluss ausgesetzt ist. Sie ist nach dem Physiker Osborne Reynolds benannt und wird folgendermaßen berechnet:

$$Re = \frac{\rho v d}{\eta} = \frac{v d}{\nu} \quad (1)$$

mit

$$\eta = \nu \rho. \quad (2)$$

Hierbei sind ρ die charakteristische Dichte des Fluids, v die charakteristische Strömungsgeschwindigkeit des Fluids gegenüber dem Körper, d die charakteristische Länge des Körpers, η die charakteristische dynamische Viskosität des Fluids und ν die charakteristische kinematische Viskosität des Fluids.

Man unterscheidet zwei Reynoldszahlregime, das laminare für kleine Reynoldszahlen und das turbulente Regime für Reynoldszahlen ab ungefähr 1000-2000 [19]. Der Übergang ins turbulente Regime ist von der Geometrie des betrachteten Systems abhängig, daher kann die kritische Reynoldszahl je nach Geometrie unterschiedlich sein. Im laminaren Bereich tritt im Gegensatz zum turbulenten keine Wirbelbildung auf.

Re ist umgekehrt proportional zur Viskosität des Mediums und proportional zur Größe des Objektes im Fluss. Sind für zwei geometrisch ähnliche Objekte die Reynoldszahlen identisch, so zeigen sie gleiches Turbulenzverhalten. Diese Tatsache ist beispielsweise für die Skalierung von Modellen für Windkanaluntersuchungen relevant.

Schwimmende Mikroorganismen zeichnen sich wegen ihrer geringen Größe durch besonders kleine Reynoldszahlen ($Re \ll 1$) aus, d.h. dass die Viskositätskräfte bei ihrer Bewegung dominieren und Trägheitskräfte keine Rolle mehr spielen. Zum Vergleich, ein Mensch, der in Wasser schwimmt, weist eine Reynoldszahl von ca. 10^4 , ein Goldfisch von 10^2 , ein Mikroorganismus hingegen von nur 10^{-4} - 10^{-5} auf [20]. Infolge dessen muss ein Mikroorganismus ständig aktiv sein, um sich von der Stelle zu bewegen. Ein sich bewegendes Objekt mit einer Ausdehnung in der Größenordnung eines Mikrometers, ein sog. Mikroschwimmer, der mit einer Geschwindigkeit von $30 \mu\text{m/s}$ schwimmt, kommt nahezu instantan zum Stillstand sobald er aufhört aktiv zu schwimmen. Dies geschieht auf einer Zeit- und Längenskala von $0,6 \mu\text{s}$ beziehungsweise $0,1 \text{ \AA}$ [20].

Eine weitere Besonderheit der Fortbewegung in diesem Regime liegt in der Tatsache, dass nur nicht-reziproke Bewegungen, also solche, die nicht invariant bezüglich der Umkehr der Zeitachse sind, zu einer aktiven Vorwärtspropagation führen. Der Grund hierfür liegt darin,

dass bei der Beschreibung der Bewegung durch die Navier-Stokes-Gleichung (Gleichung (3)), die Trägheitsterme und damit die Zeitabhängigkeit, wegfallen.

$$-\nabla p + \eta \nabla^2 \vec{v} = \rho \frac{\delta \vec{v}}{\delta t} + \rho (\vec{v} \nabla) \vec{v} \quad (3)$$

Somit bleibt nur noch der Term

$$\nabla^2 \vec{v} = \frac{p}{\eta}, \quad (4)$$

wobei p der Druck ist [20].

Das klassische, namensgebende Beispiel für dieses Theorem (scallop theorem nach Purcell [20]) ist eine Muschel, die nur über ein Gelenk verfügt, das ihre beiden Schalenhälften miteinander verbindet und somit nur eine zeitlich invariante Bewegung vollführen kann. D.h. betrachtet man eine Aufnahme der Klappbewegung der Muschel, so ist die Bewegung bei vorwärts laufender Aufnahme nicht von der bei rückwärts laufender Aufnahme zu unterscheiden (zeitliche Invarianz). Eine solche Art der Bewegung wird von Purcell als reziproke Bewegung bezeichnet.

Ein einfaches Beispiel für eine Konfiguration, die eine nicht-reziproke Bewegung erlaubt, also bei kleinen Reynoldszahlen zu einer effektiven Vorwärtspropagation führt, ist in Abbildung 2 dargestellt.

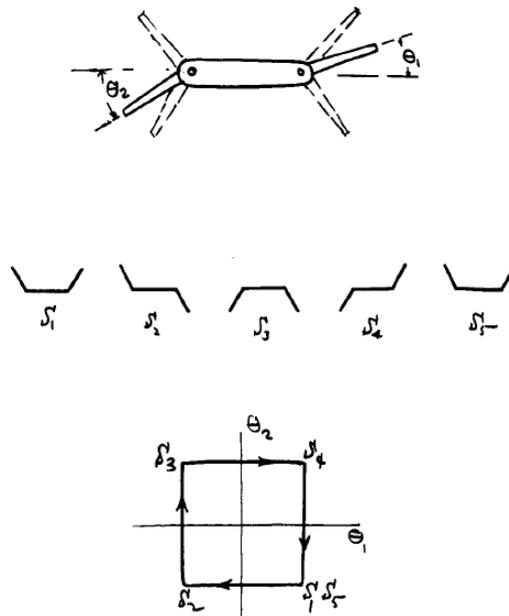


Abbildung 2: Beispiel für eine nicht-reziproke Bewegung eines Modells mit zwei Gelenken gemäß dem „scallop theorem“ nach E.M. Purcell [20]. Das Modell verfügt über zwei Gelenke, deren abwechselnde Aktion in einer nicht-reziproken Bewegung resultiert.

Mikroschwimmer, wie die in dieser Arbeit untersuchten Trypanosomen, müssen also einen nicht-reziproken Bewegungsablauf zeigen. Diese Bedingung wird in der Diskussion verschiedener postulierter Schwimmmechanismen wieder aufgegriffen werden (vgl. Kapitel 2.2).

2.1 Die Fortbewegung flagellierter Mikroschwimmer

Eine große Zahl Mikroorganismen ist zur aktiven Propulsion in einem Medium befähigt. Dazu gehören unter anderem begeißelte Bakterien [21-23], Algen [24-28], Spermien [29-31], Dinoflagellaten [32] und die in dieser Arbeit untersuchten Trypanosomen [3-7, 9, 12, 14-16, 18, 33-36]. Diese Organismen spannen ein breites Spektrum an Zellgrößen, Arten der Begeißelung, Lebensräumen und Schwimmustern auf. Dennoch sind einige Aspekte der Fortbewegung von Mikroschwimmern allgemein gültig und sollen anhand des Verhaltens von Modellorganismen im Weiteren beschrieben werden.

Die Geißeln, die Mikroorganismen das Schwimmen ermöglichen, werden, je nach ihrer Länge und Zahl, als Flagellen (lange Strukturen, einzeln oder in Paaren vorkommend) oder Cilien (kurze Strukturen in großer Anzahl und räumlicher Nähe) bezeichnet. Sie stellen eine entwicklungsbiologisch sehr alte und hochkonservierte Klasse von Zellorganellen dar, die sich sowohl in pro- wie auch in eukaryotischen Zellen finden [37-38]. Die Begriffe Flagelle und Cilie sind im Wesentlichen austauschbar, da der grundlegende Aufbau beider Strukturen identisch ist (vgl. Abschnitt 2.2). Obwohl sie den gleichen Namen tragen, unterscheiden sich Flagellen prokaryotischer Zellen jedoch wesentlich von denen eukaryotischer Zellen. So sind Flagellen bei Prokaryoten aus dem Protein Flagellin aufgebaut [37] und werden von Rotationsmotoren angetrieben [22], wohingegen eukaryotische Flagellen einem anderen Aufbau und Funktionsmechanismus folgen, der in Abschnitt 2.2 detailliert diskutiert wird.

Die wohl meistuntersuchten Mikroschwimmer sind das Bakterium *Escherichia coli* [21-23, 39-50] und die Grünalpengattung *Chlamydomonas* [26-28, 37, 51-61]. Diese beiden Modellorganismen werden daher im Weiteren diskutiert.

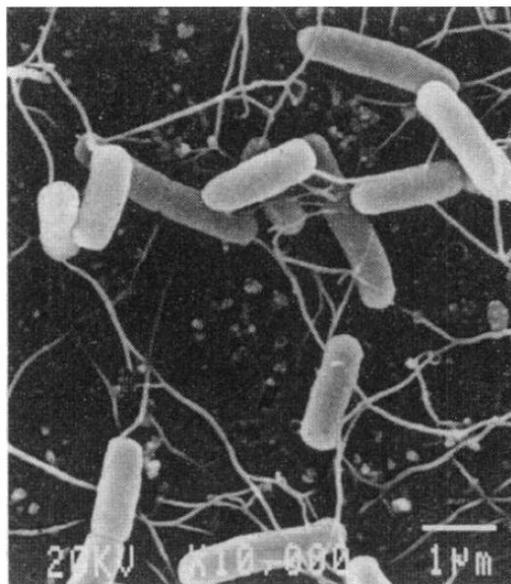


Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* [62].

E. coli sind stäbchenförmige Bakterien mit einem typischen Durchmesser von ca. 1 μm bei 2 μm Länge mit durchschnittlich vier Flagellen, die an willkürlichen Punkten aus dem Zellkörper austreten und selbst ein Mehrfaches der Zellkörperlänge erreichen [22-23]. Die Flagellen sind in diesem Fall Druckflagellen, d.h. sie treiben die Zelle beim Schwimmen von der Rückseite an. Sie unterscheiden sich damit von Zugflagellen, wie sie z.B. bei Algen und Trypanosomen auftreten, die beim Schwimmen nach vorne gerichtet sind und den Zellkörper hinter sich her ziehen. Ein weiterer Unterschied liegt in der Tatsache, dass jedes Flagellum von einem Rotationsmotor angetrieben wird, der seine Energie aus einem Protonengradienten bezieht [22], wohingegen die Algen- und Trypanosomenflagellen durch ATP-basierte Verschiebung von Mikrotubuli durch eine Vielzahl molekularer Motoren angetrieben werden [12]. *E. coli* bewegen sich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 30 $\mu\text{m/s}$ und zeigen dabei einen stetigen Wechsel zwischen Phasen des gerichteten Schwimmens (sog. „runs“) und Taumelphasen („tumbles“), in denen die Zelle keine effektive Vorwärtsbewegung zeigt. Schwimmphasen dauern typischerweise ca. 1 s, Taumelphasen 0,1 s [23]. Beide Phasen unterscheiden sich durch den Modus, in dem die die Flagellen antreibenden Motorproteine aktiv sind. Bei Schwimmphasen rotieren die Motoren, von der Flagellenspitze in Richtung des Zellkörpers gesehen, gegen den Uhrzeigersinn, bei Taumelphasen mit dem Uhrzeigersinn. Zusätzlich kommt es in den Schwimmphasen zu einer Bündelung der Flagellen. Das Bündel formt dabei eine Helix, was dieser Form von Flagellenrotation bzw. –schlag den deskriptiven Namen Korkenzieher oder engl. corkscrew einbrachte [20]. Zum Ausgleich des Drehmoments resultiert eine der Flagellenrotation entgegengesetzte Drehrichtung des Zellkörpers [63]. Durch die Abwechslung von Schwimm- und Taumelphasen vollführen die Bakterien einen dreidimensionalen random walk (vgl. Abbildung 4).

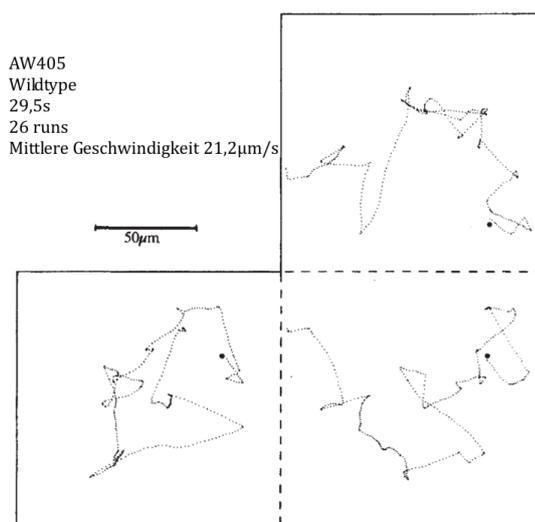


Abbildung 4: Projektionen einer 3D-Trajektorie einer im run-and-tumble-Modus schwimmenden Zelle von *E. coli*. Gezeigt sind Ebenenprojektionen mit einer Zeitauflösung von 12.6 Hz [23].

Die Taumelphasen dienen der Reorientierung des Organismus. Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Schwimmphasen wird eine mittlere Winkeländerung von 68° beobachtet. Daraus resultiert nach einer Taumelphase eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Fortsetzung der Trajektorien in den vorwärtsgerichteten Halbraum, als eine Richtungskehr. Durch Verlängerung der Schwimmphasen kann die Zelle chemischen Gradienten folgen. Schwimmt die Zelle entgegen dem Gradienten wird aber keine Verkürzung der Schwimmphasen im Vergleich zum Normalfall beobachtet. Daraus wird geschlossen, dass *E. coli* eine minimale Schwimmphasenlänge einhält, die gerade ausreichend ist, um schneller als die Diffusion im Medium zu sein. Diese minimale Wegstrecke ist nötig, um Gradienten zu detektieren, bevor diese durch Diffusion aufgehoben werden, ein Abtasten der Umgebung mit einer kleineren Rate ist somit unsinnig [20]. Der Explorationsmechanismus hat also eher einen zeitlichen als einen räumlichen Ursprung, da nicht die Schwimmrichtung, sondern die Länge der Schwimmphasen reguliert wird.

Das Umschalten zwischen den Rotationsrichtungen der Flagellen folgt einem Alles-oder-Nichts-Mechanismus, wobei keine intermediären Winkelgeschwindigkeiten beobachtet werden. Zur Umkehr der Drehrichtung der Motoren existieren mehrere Theorien. Ein frühes Modell geht davon aus, dass der elektrochemische Gradient nicht nur die Funktion hat, den Motor mit Energie zu versorgen, sondern auch regulatorischen Einfluss ausübt und somit das Verhältnis der beiden Rotationsrichtungen beeinflusst [64]. Heutzutage wird meist von einem Mechanismus ausgegangen, nach dem eine kooperative Konformationsänderung von Proteinen, die durch die Bindung eines Effektors ausgelöst wird (allosterischer Effekt), die Rotationsrichtung bestimmt [65]. Das Schaltverhalten wird hierbei im Wesentlichen durch eine chemotaktisch gesteuerte Signalkaskade ausgelöst. Dabei blockieren Chemoattraktoren die Bindung des Signalproteins, das die Rotation im Uhrzeigersinn auslöst und unterdrücken somit Taumelphasen [66]. Das Umschalten erfolgt auf Motorebene durch eine Konformationsänderung des sog. switch complex, einer ringförmigen Multiproteinstruktur am Flagellenmotor [67].

Neben diesem prokaryotischen Modellsystem für einen run-and-tumble-Mechanismus wurde ein ähnliches Verhalten auch für eukaryotische Zellen, genauer für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, gezeigt [28]. Aufbau und Konfiguration der Flagellen unterscheiden sich stark von der Situation in *E. coli*. Im Gegensatz zum prokaryotischen Flagellum, das aus einer Aneinanderreihung von Flagellinmolekülen aufgebaut ist [22, 37], zeigt das eukaryotische Flagellum einen komplexeren Aufbau, bestehend aus einem Mikrotubuligerüst, das durch die ATP-abhängige Aktion von Dynein-Motorproteinen in Bewegung versetzt wird. Eine genaue Diskussion des Aufbaus und der Funktionsweise des eukaryotischen Flagellums erfolgt in Abschnitt 2.2. *C. reinhardtii* verfügt über zwei Flagellen, die gemäß ihrer Anordnung relativ zum Photorezeptor der Zelle cis- (dem Photorezeptor zugewandt) bzw. trans-Flagellum (dem Photorezeptor abgewandt) genannt werden.

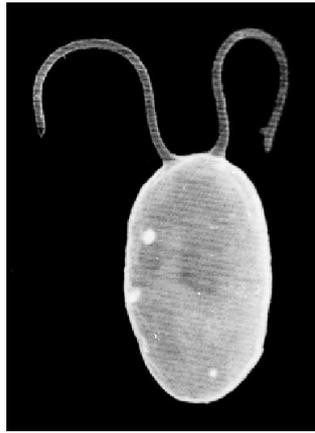


Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer *Chlamydomonas reinhardtii*-Zelle [68].

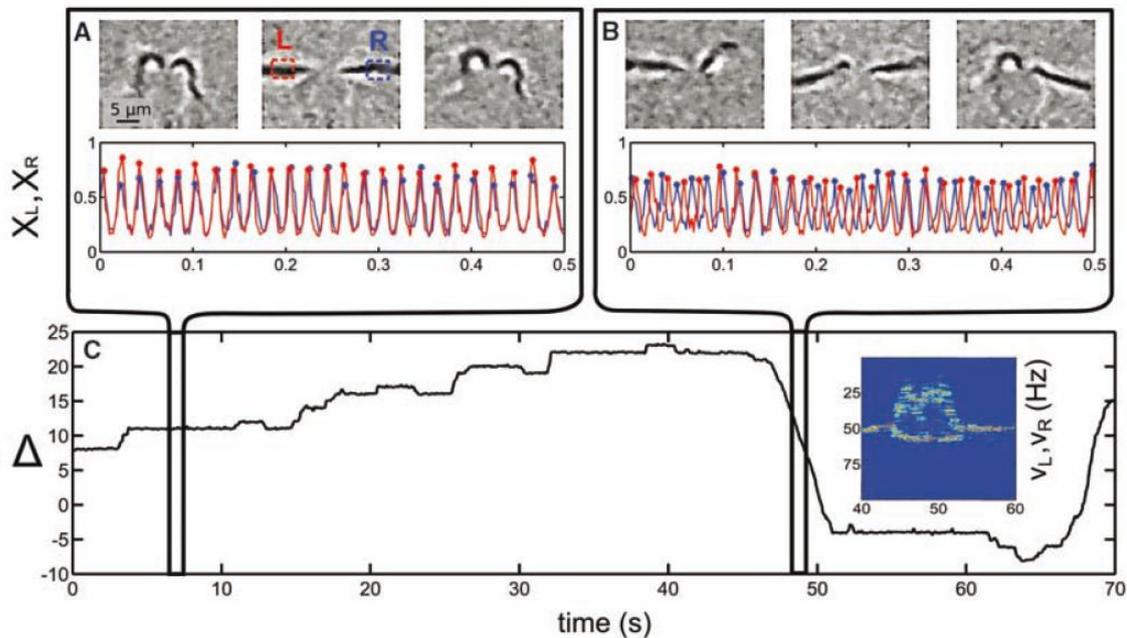


Abbildung 6: Darstellung des Umschaltverhaltens zwischen synchronem und asynchronem Flagellenschlagmuster bei *C. reinhardtii*. A) Darstellung des synchronen Flagellenschlags mit Auslenkungsdiagramm für linkes und rechtes Flagellum. B) Darstellung des asynchronen Flagellenschlags mit Auslenkungsdiagramm für linkes und rechtes Flagellum. C) Verlauf der Frequenzverschiebung Δ zwischen beiden Flagellen mit Umschaltvorgang bei ca. 50 s [28].

Werden die Algen in einer dunklen Umgebung, also unter Ausschluss der sonst bei diesen Organismen auftretenden Phototaxis, untersucht, so sind zwei Schwimmuster unterscheidbar. Die meisten Zellen zeigen eine Synchronisation der Schläge von cis- und trans-Flagellum und schwimmen ähnlich einem Brustschwimmer [69]. Wenige Zellen zeigen asynchronen Flagellenschlag mit Schlagfrequenzunterschieden zwischen den Flagellen von 10-30 % [28]. Das Umschalten zwischen diesen beiden Schwimmmodi findet stochastisch statt und es gibt keinen Vorzug für das cis- oder trans-Flagellum mit

einer höheren Frequenz angetrieben zu werden, als das jeweils andere Flagellum. Dies steht im Gegensatz zum Verhalten unter Lichteinfluss. Hier unterscheiden sich die phototaktischen Frequenzantworten beider Flagellen, wobei das trans-Flagellum zusätzliche Schläge ausführt [70-72]. Die Tatsache, dass Zellsuspensionen von *C. reinhardtii* im Dunklen diffusives Verhalten zeigen, stützt die Hypothese des stochastischen Schaltens.

Das Umschalten kann bei einzelnen Organismen, die auf Mikropipetten immobilisiert sind im Detail beobachtet werden [28]. Wie bei *E. coli* folgt auch hier der Wechsel zwischen den Zuständen einem Alles-oder-Nichts-Mechanismus und es treten keine intermediären Schwimmmodi auf. Der genaue Umschaltmechanismus auf molekularer Ebene ist auch hier unbekannt. Es wird von einer hydrodynamischen Kopplung der Flagellen ausgegangen [28, 73].

Der Aufbau des Bewegungsapparats der oben beschriebenen Modellorganismen unterscheidet sich in mehreren Aspekten von dem der Trypanosomen. Der augenscheinlichste Unterschied liegt darin, dass Trypanosomen nur über ein einzelnes Flagellum verfügen. Die Fortbewegungsart von Trypanosomen ist in der Natur einzigartig, da sie als bisher einziger bekannter Organismus eine Ausbreitung der Flagellarwelle von der Flagellenspitze zum Körper hin, sog. tip-to-base-beating, bei einem einzelnen, angehefteten Flagellum zeigen. Der strukturelle Aufbau des Trypanosomenflagellums und die Theorien zu seiner Funktionsweise werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

2.2 Der Aufbau des Trypanosomenflagellums und seine Implikationen für postulierte Schwimmmechanismen

2.2.1 Aufbau des Flagellums auf molekularer Ebene

Trypanosomen schwimmen durch die Bewegung eines einzelnen, an den Zellkörper angehefteten Flagellums (vgl. Abbildung 7). Trypanosomenflagellen entsprechen in einigen Aspekten typischen eukaryotischen Flagellen, z.B. durch ihre Grundstruktur, das 9+2-Axonem. Dieser Ausdruck bezeichnet eine Struktur aus neun Mikrotubulidubletts, die ringförmig um zwei starr miteinander verbundene Mikrotubuli, das sog. zentrale Mikrotubulipaar, angeordnet sind (vgl. Abbildung 8A). Sie weisen jedoch durch die Existenz spezieller Strukturen, wie beispielsweise des paraflagellar rods (PFR), auch Eigenheiten auf, wie sie nur bei diesen Organismen beobachtet werden.

Das Flagellum eines Trypanosoms verläuft entlang des Zellkörpers, wobei es am vorderen Zellende frei ist, hingegen am hinteren Zellende mit der sog. Flagellartasche in die Zelle mündet (vgl. Abbildung 7).

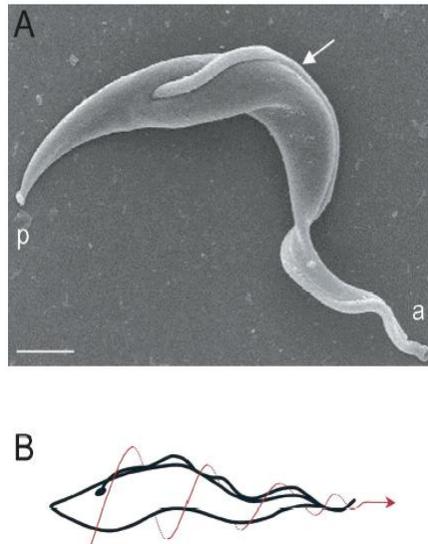


Abbildung 7: A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Trypanosoms, gekennzeichnet sind das anteriore (a) und posteriore (p) Zellende sowie das an die Zellmembran angeheftete Flagellum (Pfeil). B) Darstellung eines nach dem Korkenziehermechanismus vorwärts schwimmenden Trypanosoms [18].

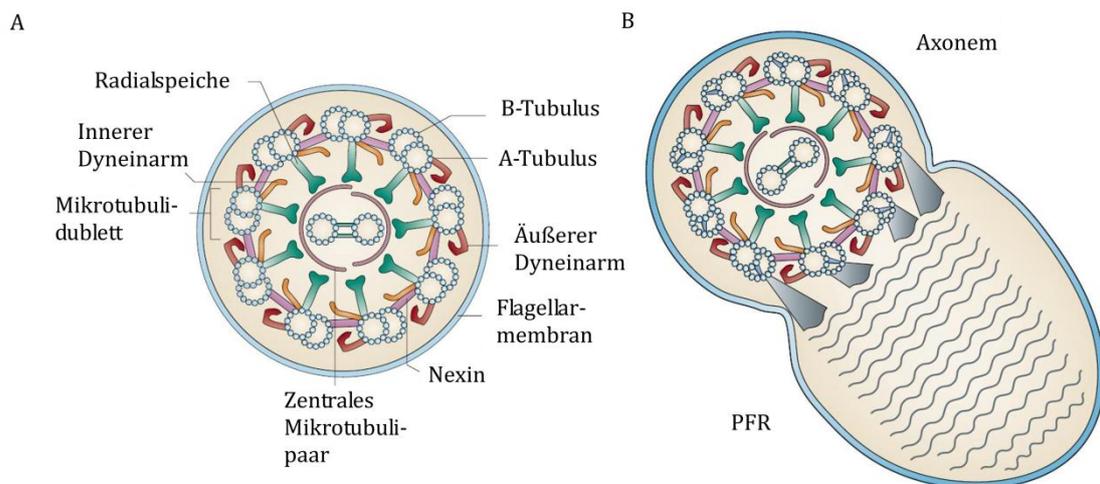


Abbildung 8: Schnitt durch ein Flagellum als schematische Darstellung. A) Klassisches 9+2-Axonem aus neun Mikrotubulidubletts und einem zentralen Mikrotubulipaar. Gekennzeichnet sind das zentrale Mikrotubulipaar sowie Mikrotubulidubletts, Nexin-Verbindungen und Radialspeichen sowie die Dyneinmotoren; B) Schnitt durch ein Trypanosomenflagellum, das zusätzlich zum Axonem ein paraflagellar rod (PFR) besitzt [12].

Die Grundstruktur des Flagellums wird vom 9+2-Axonem gebildet (vgl. Abbildung 8). Darunter versteht man eine Struktur aus zwei zentralen, fest miteinander verbundenen Mikrotubuli, die von neun Mikrotubulidubletts umgeben sind. Diese Organisationseinheit wird durch mehrere Bausteine zusammengehalten. Nexin wird als elastischer Baustein angesehen, der jeweils benachbarte Dubletts verbindet und dafür zuständig ist, Mikrotubuli

nach dem Durchgang einer Flagellarwelle wieder in ihre Ausgangsposition zu bringen. Die Radialspeichen verbinden die neun äußeren Dubletts mit dem zentralen Mikrotubulipaar.

2.2.2 Motorproteine

Neben diesen strukturgebenden Elementen treten molekulare Motoren, die Dyneine auf. Diese sind im Flagellum in Form von inneren und äußeren Dyneinarmen vorhanden [4, 6, 12, 14, 38]. Diese beiden Dyneinarten unterscheiden sich, trotz großer struktureller Ähnlichkeiten in ihrem molekularen Aufbau [51]. Die Motorproteine generieren eine Kraft, durch die benachbarte Mikrotubulidubletts gegeneinander verschoben werden. Durch die feste Verbindung des Axonems mit der Zelle über den Basalkörper, den Verankerungspunkt des Flagellums in der Zelle, und die Nexin-Verknüpfungen der Mikrotubuli, resultiert eine Krümmung des Flagellums [74]. Die Aktion der Dyneine ist nach Brokaw ATP-abhängig, wobei das ATP (Adenosintriphosphat) durch Diffusion zu den Motoren gelangt und von einer Quelle innerhalb der Zelle zur Verfügung gestellt wird [75]. Es ist daher anzunehmen, dass die Motoraktivität einerseits diffusionsabhängig ist, andererseits aber durch die Rate der ATP-Produktion durch die Zelle eine Regulationsmöglichkeit besteht. Der Aufbau des Flagellums würde prinzipiell sowohl einen kontraktile Mechanismus, bei dem sich eine lokale Kontraktion wellenförmig am Flagellum entlang ausbreitet sowie einen Mechanismus bei dem die Filamente gegeneinander verschoben werden (sliding filament model) erlauben, wie er z.B. auch für die Muskelkontraktion angenommen wird [76]. Im ersten Fall ist die Krümmung des Flagellums eine direkte Folge der mechanochemischen Kontraktion, d.h. beide Wellen sind phasengleich. Im zweiten Fall hingegen resultiert die Krümmung aus Scherkräften. Dies führt zu einer Phasenverschiebung um ein Viertel einer Wellenlänge zwischen der Koordinate an der sich die Amplitude der Flagellarwelle ausbildet und dem Punkt an dem die Dyneine aktiv sind [74]. Der sliding-Mechanismus wird unter anderem durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gestützt, bei denen für in verschiedenen Stadien des Schlagzyklus fixierten Flagellen keine Änderung in der relativen Filamentlänge der beteiligten Mikrotubuli beobachtbar ist [77]. Ebenso wurde beschrieben, dass sich bei Flagellen von Seeigelspermien, die mit Trypsin behandelt wurden, um die Flagellarmembran aufzulösen, die Mikrotubuli nach Gabe von ATP durch Verschiebung gegeneinander trennen. Dies wird durch Mikroskopieaufnahmen und Messung der Längen der resultierenden Filamente bestätigt [31]. Ein wichtiges Ergebnis dieses Modells ist die direkte Proportionalität von lokaler Krümmung des Flagellums zum Betrag der aktiven Verschiebung. D.h. es liegt eine krümmungsinduzierte Aktivierung der Motorproteine vor. Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist die Tatsache, dass eine Verschiebung in beide Richtungen entlang eines Mikrotubulus stattfinden kann [74]. Diese Voraussetzung wäre beispielsweise durch das Vorhandensein von Motorproteinen gewährleistet, die sowohl in Richtung der Flagellenspitze als auch der Flagellenbasis laufen können. Es ist jedoch

bekannt, dass Dyneine sich nur mit einer Vorzugsrichtung auf Mikrotubuli bewegen [11], was diese Erklärungsmöglichkeit ausschließt. Ein wahrscheinlicherer Erklärungsansatz berücksichtigt die Polarisation der Motorproteine. Davon ausgehend unterscheiden sich die Dyneine auf zwei gegenüberliegenden Seiten des Axonems bezüglich ihrer Orientierung relativ zur Krümmungsebene des Flagellums. Somit aktiviert Krümmung in die eine, zur Orientierung des Motorproteins passende, Richtung die Verschiebung und eine Krümmung in die entgegengesetzte Richtung deaktiviert sie. Die Motoraktivität ist also krümmungsinduziert [74].

Ähnliche Mechanismen finden sich auch in der neueren Literatur, so z.B. der „geometric clutch“-Mechanismus von Lindemann [78] wie in Abbildung 9 dargestellt.

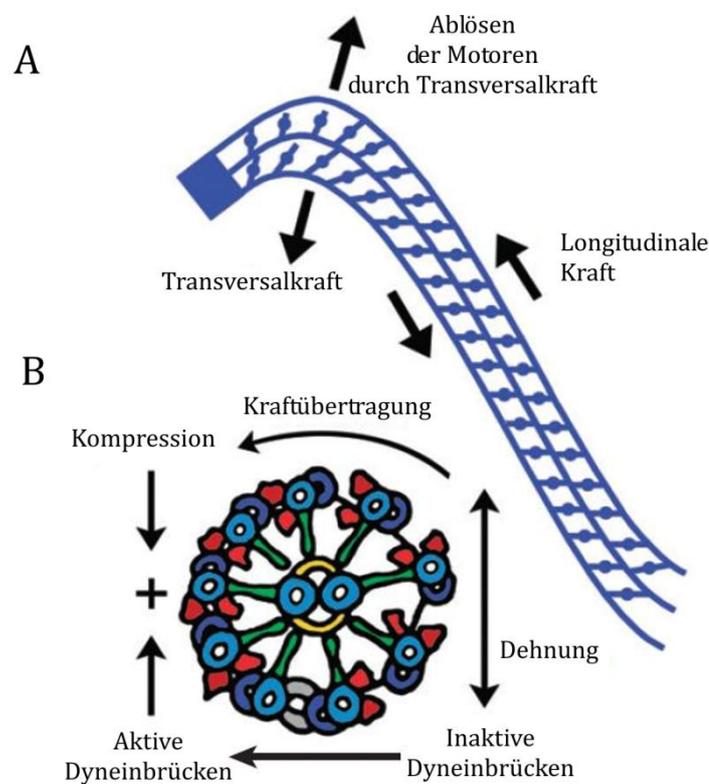


Abbildung 9: „Geometric clutch“-Mechanismus nach Lindemann [78]. A) Schematische Darstellung der Ausbildung der Krümmung des Flagellums, B) Ausbildung der Krümmung auf molekularer Ebene durch selektive Aktivität der Dyneinmotoren auf einer Seite des Axonems. Gezeigt ist ein Schnitt durch das Axonem.

Dieses Modell geht von einem intakten Axonem aus, in dem die Dyneine bei gestrecktem Flagellum einen definierten Abstand zu den benachbarten Mikrotubulidubletts haben. Es besteht eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass ein Dyneinpaar (äußerer und innerer Arm) an dieses binden und eine sog. Dyneinbrücke bilden. Die Wahrscheinlichkeit des Bindens eines Motorproteins an einen Mikrotubulus ist umgekehrt proportional zum Abstand der

beiden von einander. Eine Krümmung des Flagellums kann den Abstand zwischen benachbarten Mikrotubulidubletts verringern und somit zur Ausbildung einer solchen Brücke führen. Die gebundenen Motoren können dann ATP-basiert eine Kraft auf das Mikrotubulidublett ausüben die zur Krümmung führt. Wird die Krümmung zu groß, können die Motoren nicht weiter entlang des Mikrotubulus laufen, da der Abstand zu groß wird und sich die Bindung löst [78]. Auch hierbei liegt also ein kurvatorkontrollierter Mechanismus vor.

2.2.3 Rolle der Orientierung des zentralen Mikrotubulipaars

Neben der relativen Orientierung der Motorproteine wird in der Literatur auch diskutiert, welche Rolle die Orientierung des Axonems relativ zum Zellkörper auf den Flagellenschlag hat [6, 52, 74, 78]. Da die Struktur der äußeren Mikrotubulidubletts weitgehend symmetrisch ist, bietet sich zur Analyse der Axonemausrichtung das zentrale Mikrotubulipaar als Orientierung an. Die Rolle des zentralen Mikrotubulipaars bezüglich des Flagellenschlags ist umstritten. Es gibt sowohl Beispiele für eine Änderung von dessen Ausrichtung während des Flagellenschlags z.B. in *Chlamydomonas* [56], als auch Fälle in denen sich die Ausrichtung nicht ändert, wie etwa in Seeigelspermien [79] oder Trypanosomen [6]. In allen genannten Fällen ist die Motilität in Wildtypzellen vollständig ausgeprägt, was gegen eine allgemeine regulative Funktion der Ausrichtung des zentralen Mikrotubulipaars spricht.

2.2.4 Das paraflagellar rod

Eine weitere Struktur, die sich bei der Analyse des Flagellums als wichtig herausgestellt hat, ist das PFR (engl. paraflagellar rod). Hierbei handelt es sich um eine parakristalline Struktur, die entlang des Flagellums im Zellinneren verläuft und mit zwei Mikrotubulidubletts verbunden ist (vgl. Abbildung 8). Der Durchmesser des PFR ist mit dem des Axonems vergleichbar. Neben einer mechanischen, stützenden Wirkung, die dazu führt das Flagellum nach Durchlauf einer Welle wieder in eine elongierte Position zu bringen, scheint das PFR noch weitere Funktionen in der Zellmotilität zu haben, da Zellen mit intakter Axonemstruktur aber fehlendem PFR eine starke Reduzierung des Flagellenschlags sowie damit einhergehende Paralyse zeigen [80].

2.2.5 Run-and-tumble-Modell der Trypanosomenbewegung

Betrachtungen wie die voranstehenden sind von großer Bedeutung, um die Beobachtung von verschiedenen Translationsmodi bei Trypanosomen zu erklären. Mehrere Autoren beschreiben das Schwimmverhalten als ein „run-and-tumble“-Modell, in dem sich Phasen des gerichteten Schwimmens mit Taumelphasen zur Reorientierung der Zelle abwechseln

[6, 18]. Diese Beobachtung wurde von der Gruppe um Bastin, die prozyklische Trypanosomen untersuchte, mit zwei unterschiedlich verlaufenden Flagellarwellentypen in Verbindung gebracht. Hierbei wird eine von der Flagellenspitze zum Zellkörper laufenden Flagellarwelle (sog. tip-to-base beating) einer Schwimmphase zugeordnet, Taumelphasen werden mit der entgegengesetzten Schlagrichtung in Verbindung gebracht (base-to-tip). Die beiden Phasen unterscheiden sich in der Frequenz des Flagellenschlags, die für Schwimmphasen bei 12-14 Hz liegt, bei Taumelphasen jedoch nur 3-5 Hz beträgt. Außerdem weist Letztere eine breitere Verteilung der Flagellarwellenamplitude auf. Durch Experimente mit Mutanten, bei denen mittels der RNA-Interferenz-Technik (RNAi) [81] Gene, die für verschiedene Axonem-Bestandteile kodieren, in ihrer Expression unterdrückt wurden, lässt sich der Einfluss dieser auf die Motilität untersuchen.

Für Wildtyp-Trypanosomenzellen der Linie 29-13 (prozyklische Trypanosomen) wurde festgestellt, dass das zentrale Mikrotubulipaar stets in einer festgelegten Orientierung relativ zum Zellkörper verläuft [6]. Ein wie oben erwähnter Einfluss der Orientierung des Axonems selbst auf die Flagellenschlagrichtung erscheint demnach unwahrscheinlich. Eine größere Bedeutung kommt den äußeren Dyneinarmen zu. Zelllinien in denen mittels RNAi für äußere Dyneinarme kodierende Gene ausgeschaltet wurden, zeigten komplette Abwesenheit des tip-to-base Flagellenschlages, wohingegen der reverse Flagellenschlag weiterhin auftrat. Dabei wurden identische Schlagfrequenzen für Wildtypzellen und Mutanten gemessen. Die Zellen zeigten jedoch im Gegensatz zu anderen komplett immotilen Mutanten keine Veränderung der Ausrichtung des Flagellums relativ zum Zellkörper. Ebenso wurden intakte innere Dyneinarme sowie eine intakte Struktur des zentralen Mikrotubulipaares beobachtet. Desweiteren wiesen die Mutanten einen hochvariablen Winkel zwischen PFR und zentralem Mikrotubulipaar auf, was bei Wildtypzellen nicht beobachtet wurde. D.h., die feste räumliche Ausrichtung des Axonems relativ zum Zellkörper ist nicht mehr gegeben. Aufgrund dieser Beobachtungen identifizieren die Autoren die äußeren Dyneinarme als verantwortlich für den in Schwimmphasen auftretenden Vorwärtsschlag des Flagellums, wohingegen die inneren Dyneinarme durch Flagellenschläge entgegengesetzter Richtung Taumelphasen auslösen [6]. Ähnliche Beobachtungen zur Rolle der unterschiedlichen Dyneinstrukturen wurden für *Chlamydomonas* gemacht [26]. Diese Studie von Brokaw zeigt, dass Defekte innerer Dyneinarme zur kompletten Immotilität der Organismen führen. Mutationen, die die Abwesenheit oder strukturelle Defekte äußerer Dyneinarme zur Folge haben, führen zu verringerter Flagellenschlagfrequenz, die Organismen bleiben aber weiter motil. Desweiteren scheint die Existenz innerer Dyneinarme von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der axonemalen Struktur zu sein. Natürlich vorkommende, lebensfähige Mutanten ohne innere Dyneinarme sind nur in sehr kleiner Zahl existent und der Aufbau ihrer Flagellen weicht stark vom klassischen Strukturmodell ab [82]. Das Vorhandensein der inneren Dyneinarme scheint daher für jegliche Form von flagellengestützter Motilität obligatorisch für die Propagation der Krümmungswelle entlang

des Flagellums zu sein. Diese Ergebnisse stellen eine Übereinstimmung mit der Studie von Bastin *et al.* [6] dar und legen den Schluss nahe, dass den beiden im klassischen 9+2-Axonem vorkommenden Dyneinarten eigenständige Funktionen zugeordnet werden können.

2.2.6 Regulation des Flagellenschlags

Wie genau das Umschalten zwischen tip-to-base- und base-to-tip-Flagellenschlag abläuft ist unbekannt. Eine Regulation der koordinierten Aktion der molekularen Motoren scheint notwendig. Das Vorhandensein eines entsprechenden Mechanismus über den sog. DRC (engl. dynein regulatory complex) wurde postuliert [52]. Der DRC wird als großer Proteinkomplex in der Nähe einer bestimmten Radialspeiche innerhalb des Axonems angenommen [52, 54]. Die erste Beschreibung eines Regulationskomplexes dieser Art stammt von Huang *et al.* [52]. Sie resultiert aus der Beobachtung von *C. reinhardtii*-Zellen, die durch Mutation des zentralen Mikrotubulipaars oder der Radialspeichen paralysiert sind. In solchen Zellen wird beobachtet, dass bestimmte Mutationen zur Wiederherstellung des Flagellenschlags führen. Dies geschieht jedoch, ohne dass die für die Paralyse verantwortlichen Defekte in irgendeiner Form „repariert“ werden. Daraus wird das Vorhandensein eines Regulationssystems gefolgert, das die Generation von Flagellarwellen bei vorhandenen Defekten an Radialspeichen oder dem zentralen Mikrotubulipaar unterbindet. Die Herunterregulierung von Genen, die für Bestandteile dieses Systems kodieren führt somit im Rückschluss zur Wiederherstellung des Schlags, da das Kontrollsystem gestört ist [52]. Der Schluss, dass dieses Regulationssystem die Funktion der Dyneine regelt wird durch mehrere Tatsachen gestützt. Zum einen sind sie die einzigen Strukturen im Axonem, die den Flagellenschlag auslösen können, zum anderen wurde keine Mutante gefunden, die bei vorhandenen Dyneindefekten wieder eine korrekt ausgeprägte Flagellarwelle etablieren konnte. Die Eigenschaft der Wiederherstellung der Motilität in Zentralpaar- und Radialspeichenmutanten ist seit dem als eine Definition von DRC-Bestandteilen akzeptiert [13, 17, 83]. Bis jetzt sind jedoch nur zwei Bestandteile des DRC bekannt, die Proteine Trypanin in Trypanosomatiden [13, 17] bzw. dessen Homolog PF2 in *C. reinhardtii* [57] und CMF70 [83]. Aber auch die inneren Dyneinarme werden mit regulatorischen Aspekten in Verbindung gebracht [53-54]. Trypanin ist ein Protein, das für die Anhaftung des Flagellums an den Zellkörper verantwortlich ist und entlang des PFR lokalisiert ist. Das Fehlen von Trypanin führt zu einer teilweisen Ablösung des Flagellums vom Zellkörper, die mit der Änderung der Zellmotilität in Verbindung gebracht wird. Neben Trypanin sind noch andere Proteine für die Anheftung verantwortlich, die in Trypanin-herunterregulierten Zellen weiterhin ihre volle Funktionalität behalten [17]. Trypanin-defiziente Mutanten von Trypanosomen sind zwar in der Lage einen Flagellenschlag auszuführen, dieser verläuft aber unkoordiniert und resultiert nicht in einer effektiven Vorwärtsbewegung des Organismus [17], sondern führt

zu einer Taumelbewegung der Zellen. Die regulative Rolle des Trypanins scheint demnach in einer Beeinflussung der Art und Weise, wie der Flagellenschlag auf den Zellkörper übertragen wird und der gesamte Zellkörper sich im Rahmen dessen verformt, zu liegen. Der Einfluss von Trypanin unterscheidet sich jedoch zwischen prozyklischen Zellen und Blutstromformen. Während das Fehlen von Trypanin im ersten Fall zu verändertem Schwimmverhalten führt [17], ist im zweiten Fall der Zelltod durch fehlerhafte Zytokinese die Konsequenz [13]. Hierin kommt ein höherer Selektionsdruck bezüglich des Schwimmens auf Blutstromformen verglichen mit prozyklischen Formen zum Ausdruck. CMF70 scheint eine ähnliche Rolle zu spielen und wurde aufgrund seiner genetischen Ähnlichkeit zu Trypanin/PF2 sowieso aufgrund der Tatsache, dass ein Herunterregulieren des entsprechenden Gens ebenfalls zu Motilitätsstörungen führt, als DRC-Kandidat erkannt [83]. Desweiteren führt die Herunterregulierung beider Polypeptide dazu, dass durch Knockout von Proteinen des zentralen Mikrotubulipaares hervorgerufene Paralysen aufgehoben werden, was eine der Definitionen für einen DRC-Bestandteil ist [6, 52, 83]. Es werden für beide Proteine unterschiedliche Funktionen innerhalb des DRC angenommen, da ihr Fehlen zu unterschiedlichen Motilitätsmutanten führt. Im Falle von CMF70 tritt im Gegensatz zu Trypanin bei Herunterregulierung eine vollständige Paralyse der Zellen auf und es wird kein Zustandekommen einer vollständigen Flagellarwelle beobachtet [83]. Neue Theorien zum DRC postulieren aufgrund kryoelektronentomographischer Aufnahmen, dass die Nexinverbindungen der Mikrotubulidubletts nicht nur strukturgebende Eigenschaften haben, sondern das Nexin selbst den DRC darstellt, da es neben den Dyneinen die einzige axonemale Einheit darstellt, die die am Flagellenschlag beteiligten Mikrotubulidubletts miteinander verbindet. Desweiteren konnten in kryoelektronentomographischen Aufnahmen bekannter DRC-Mutanten Degenerationen der den Nexinverbindungen zugeordneten Strukturen beobachtet werden. Daher sprechen die Autoren auch von einem Nexin-DRC oder NDRC [61]. Gemäß dieser Theorie erfolgt die Regulation der Dyneinmotoren über eine räumliche Hinderung durch den NDRC, der genaue Mechanismus der Regulation ist jedoch noch unbekannt.

2.2.7 Alternativer Schwimmmechanismus für Trypanosomen

Alternativ zu dem Mechanismus der uniform entlang des Flagellums verlaufenden Wellen, die die Mikroschwimmer antreiben, wird auch ein Mechanismus diskutiert, nach dem die Propulsion durch zwei gegenläufige chirale Wellen, die von einem sog. „kink“ getrennt sind zustande kommt [3].

Hierbei ist die Händigkeit der Welle am anterioren und posterioren Ende des Flagellums nicht festgelegt, d.h. kinks können sowohl beim Übergang von linkshändigen zu rechtshändigen Helizes als auch umgekehrt auftreten, wobei keine Bevorzugung einer gegenüber der anderen Konfiguration beobachtet wird. Ebenso ist die Beobachtung laut

den Autoren sowohl für prozyklische, wie auch für Blutstromformzellen gültig. Beide Typen von kinks wandern vom vorderen zum hinteren Zellende, also entgegen der Schwimmrichtung, das Flagellum entlang. Im Gegensatz zum oben beschriebenen „Korkenzieher“-Modell, das von einer Rotation des Zellkörpers ausgeht, rotiert gemäß dem kink-Modell nur das vordere Zellende, also das freie Flagellum. Das posteriore Zellende hingegen vollführt eine Kipp- bzw. Schaukelbewegung. Somit ist nur die Bewegung des vorderen Zellteils nicht-reziprok, wie es für eine effektive Vorwärtsbewegung bei kleinen Reynoldszahlen nötig ist [20], wohingegen der hintere Zellteil einer reziproken Bewegung folgt. Die abgeleiteten Frequenzen der Bewegung der beiden Zellteile entsprechen dabei ungefähr denen für einen Vorwärtsschlag aus dem run-and-tumble-Modell für das vordere Zellende (19 Hz) bzw. für einen Rückwärtsschlag für das hintere Zellende (3 Hz). Das hier beschriebene Modell beschreibt jedoch nur die Vorwärtsbewegung von Trypanosomen und macht keine mechanistische Aussage über das Zustandekommen von Taumelphasen.

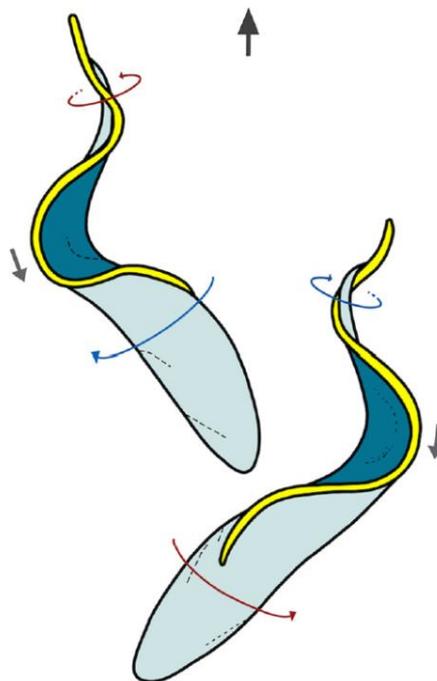


Abbildung 10: Vorwärtsbewegung eines Trypanosoms durch die Propagation von „kinks“ [3]. Gezeigt ist der Zellkörper (blau) mit dem Flagellum (gelb). Der schwarze Pfeil gibt die Schwimmrichtung an, die kleinen grauen Pfeile die Propagationsrichtung der „kinks“, die Region des Flagellums mit rechtshändiger Chiralität (rote Pfeile) von solchen linkshändiger Chiralität (blaue Pfeile), trennen.

3 Theoretische Grundlagen und Anwendungen der Holographie

In den folgenden Abschnitten werden die Holographie mit ihrem physikalischen Hintergrund sowie der aktuelle Stand der Technik dargestellt. Hierbei liegt der Fokus auf der Anwendung dieser Mikroskopiemethode im Bereich der Biologie, wo sie weite Verbreitung gefunden hat und durch zeitlich hochaufgelöstes 3D-Tracking neue Einblicke in die Welt der Mikroschwimmer erlaubt [24-25, 84-88].

3.1 Physikalische Grundlagen

Da in dieser Arbeit die optische Holographie mit Laserlicht im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums Anwendung fand, werden im Folgenden einige damit im Zusammenhang stehende physikalische Grundbegriffe kurz erläutert.

Gemäß dem Welle-Teilchen-Dualismus lässt sich Licht sowohl als Teilchen als auch als Welle beschreiben. Für das Verständnis der holographischen Methode kommt der Wellencharakter zum Tragen. Die allgemeine Wellenfunktion einer Lichtwelle lautet [89]

$$\Psi(\vec{r}) = A(\vec{r})\exp\{i\phi(\vec{r})\}. \quad (5)$$

Hierbei sind $A(\vec{r})$ die Amplitude und $\phi(\vec{r})$ die Phase der Welle. Die Intensität $I(\vec{r})$ ist definiert als das Betragsquadrat der Amplitude, d.h.

$$I(\vec{r}) = |\Psi(\vec{r})|^2. \quad (6)$$

Die Intensität ist das Charakteristikum einer Welle, das typischerweise von einem Detektor, wie einer digitalen Kamera oder einem photographischen Medium aufgenommen wird. Bei der holographischen Methode wird die Interferenz monochromatischer Strahlung, d.h. die Superposition zweier Wellen ausgenutzt [89-91]. Dabei wird die Objekt- mit einer Referenzwelle zur Interferenz gebracht (vgl. Abschnitt 3.2). Die resultierende Funktion ist eine Linearkombination der Wellenfunktionen der beiden sich überlagernden Wellen. Für monochromatische Wellen gleicher Polarisierung und den Phasen ϕ_a und ϕ_b ergibt sich somit eine Intensität von

$$I(\vec{r}) = |\Psi_a(\vec{r}) + \Psi_b(\vec{r})|^2 = I_a + I_b + 2\sqrt{I_a I_b} \cos(\phi_a - \phi_b), \quad (7)$$

wobei $2\sqrt{I_a I_b} \cos(\phi_a - \phi_b)$, der Interferenzterm ist. Der Term kann positiv oder negativ sein und bestimmt somit, ob es zu einer konstruktiven (Intensitätsverstärkung) oder destruktiven Interferenz (Intensitätsabschwächung) kommt. Die aus der Interferenz resultierende Signalmodulation führt zu den bekannten Mustern, bei denen sich Intensitätsmaxima und-minima abwechseln.

Bezogen auf den holographischen Fall mit der eingestrahlten Referenz- (Ψ_{ref}) und der am abzubildenden Objekt entstehenden Objektwelle (Ψ_{obj}) ergibt sich als Ausdruck für die Intensität auf dem Detektor [91]

$$\begin{aligned}
 I(x, y) &= |\Psi_{ref}(\vec{r}) + \Psi_{obj}(\vec{r})|^2 \\
 &= \Psi_{ref}(\vec{r})^* \Psi_{ref}(\vec{r}) + \Psi_{ref}(\vec{r})^* \Psi_{obj}(\vec{r}) + \Psi_{obj}(\vec{r})^* \Psi_{ref}(\vec{r}) + \\
 &\quad \Psi_{obj}(\vec{r})^* \Psi_{obj}(\vec{r}) \\
 &= A_{ref}^2 + A_{obj}^2 + 2A_{ref}A_{obj} \cos(\phi_{ref} - \phi_{obj}) \\
 &= I_{ref} + I_{obj} + 2\sqrt{I_{ref}I_{obj}} \cos(\phi_{ref} - \phi_{obj})
 \end{aligned} \tag{8}$$

wobei Ψ^* jeweils die komplex Konjugierten der entsprechenden Wellenfunktionen sind. Von besonderem Interesse sind nun die Terme $\Psi_{ref}(\vec{r})^* \Psi_{ref}(\vec{r})$, $\Psi_{ref}(\vec{r})^* \Psi_{obj}(\vec{r})$, $\Psi_{obj}(\vec{r})^* \Psi_{ref}(\vec{r})$, $\Psi_{obj}(\vec{r})^* \Psi_{obj}(\vec{r})$. Der erste Term entspricht der Quelle, also dem direkt transmittierten Anteil der Strahlung. Er kann durch Abzug eines Quellbildes, d.h. einer Aufnahme ohne Objekt im Strahlengang, eliminiert werden. Der zweite Term beschreibt das sog. twin-image. Hierbei handelt es sich um das reelle Bild, wohingegen der dritte Term das eigentliche Hologramm, das virtuelle Bild, darstellt. Der Hologramm- und der twin-image-Term rekonstruieren im gleichen Abstand zur Detektorebene, jedoch auf entgegengesetzten Seiten des selbigen. Durch die Überlagerung von Hologramm und twin-image kann es zur Beeinträchtigung der Bildqualität kommen. Es existieren allerdings Methoden dies zu umgehen (vgl. Kapitel 3.2). Der letzte Term entspricht der Selbstinterferenz der Objektwelle und ist typischerweise so klein, dass er vernachlässigt werden kann [91]. Ist dieses sog. Royer-Kriterium nicht erfüllt, ist eine korrekte Rekonstruktion des Hologramms kaum möglich [92].

Eine Voraussetzung um Interferenzphänomene beobachtet zu können, ist die Kohärenz der Lichtquelle. Darunter versteht man den festen Phasenzusammenhang zweier Wellen. Natürlich vorkommendes Licht weist eine zufällige Phasenbeziehung auf. Typische Quellen für kohärente Strahlung sind Laser [93], Freie-Elektronen-Laser [94] und Synchrotrons [95-96]. Man unterscheidet zwischen zeitlicher und räumlicher Kohärenz. Bei Ersterer werden die Amplituden an einem festen Punkt im Raum zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Das durchschnittliche Zeitintervall, in dem eine Lichtwelle in einer vorhersagbaren Weise schwingt wird hierbei als Kohärenzzeit bezeichnet. Die optische Weglänge, die das Licht während der Kohärenzzeit zurücklegt, wird als Kohärenzlänge bezeichnet. Typische Kohärenzlängen liegen im Bereich von Mikrometern für Sonnenlicht oder LEDs [97], im Millimeterbereich für Gasentladungslampen bzw. im Meter- bis Kilometerbereich für Laser [90]. Je länger die Kohärenzzeit, desto höher ist die zeitliche Kohärenz und damit die spektrale Reinheit, oder Monochromasie, der Strahlung. Von räumlicher Kohärenz spricht man, wenn die Schwingung der Welle bezogen auf zwei räumlich voneinander getrennte Punkte in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung in Phase bleibt [90].

Neben der Kohärenz und Interferenz ist für die Holographie die Beugung von Licht interessant. So bezeichnet man die Abweichung von der geradlinigen Ausbreitung des Lichts z.B. bei Wechselwirkung mit Grenzflächen oder Objekten deren Größe ungefähr der Wellenlänge des Lichts entspricht [19, 90, 98]. Dieses Phänomen tritt auf, wenn Licht auf ein Objekt von der Größe seiner Wellenlänge trifft und sich dabei Amplitude oder Phase ändern. Im Fall der optischen Holographie mit Lochblenden ist besonders die Beugung des Laserlichts an der Apertur relevant, da hierbei die ebene Wellenfront des Laserstrahls in eine divergente Wellenfront umgeformt wird, die es ermöglicht Mikroskopie zu betreiben. Nach dem Huygen'schen Prinzip kann jeder Punkt einer solchen Wellenfront als Punktquelle für eine Sekundärwelle angesehen werden. Daraus resultiert, dass die Wellenfront an jedem Punkt als kohärente Superposition von Sekundärwellen beschrieben werden kann [89].

3.2 Digitale in-line Holographie

Die digitale in-line Holographie ist eine linsenlose Abbildungstechnik. Sie folgt einem Grundprinzip, das in den 1940er Jahren vom britisch-ungarischen Physiknobelpreisträger Dennis Gábor entwickelt wurde [99]. Sein Ziel war es durch die Verwendung von Punktquellen die damals schlechte Qualität magnetischer Linsen in Elektronenmikroskopen und die damit verbundenen Abbildungsbeschränkungen zu umgehen. Mit diesem Ansatz stand er in Konkurrenz zu Theorien zur Korrektur von Elektronenlinsen [100], die später auch experimentell umgesetzt wurden [101].

Die Eignung der holographischen Methode als Mikroskopietechnik basierend auf Projektionsvergrößerung ergibt sich aus der Divergenz der von der Punktquelle ausgehenden Strahlung. Als Beispiele für die Elektronenholographie sind die Arbeiten von Kreuzer [102], Fink [103-104] und Götzhäuser [105-107] zu nennen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die optische in-line Holographie angewendet. Eine schematische Darstellung der Abbildungsmethode unter Verwendung von Laserlicht als Strahlungsquelle ist in Abbildung 11 gezeigt.

Bei Verwendung der in-line Holographie nach Gabor wird eine Probe mit einer divergenten, kohärenten elektromagnetischen Welle bestrahlt. Im Falle der optischen Holographie [108] verwendet man seit der Erfindung des Lasers durch Maiman [93] meist Laserlicht. Zur Generierung einer Punktquelle werden Lochblenden verwendet, deren Durchmesser ähnlich groß wie oder kleiner als die Wellenlänge der Strahlenquelle sind. Trifft die sphärische Wellenfront auf ein Objekt im Strahlengang, so entsteht neben der eingestrahlten Primär- oder Referenzwelle durch Beugung am Objekt eine Sekundär- oder Objektwelle. Das Interferenzmuster dieser beiden Wellen, das sog. Hologramm, kann digital mit CCD- (charge coupled device) oder CMOS- (complementary metal oxide semiconductor) Modulen aufgenommen werden [108-111]. Klassischerweise wurde es mit Photoplatten oder Filmen aufgezeichnet, die anschließend entwickelt wurden [99]. Der

Name in-line Holographie leitet sich von der Geometrie des Systems ab, die sich dadurch auszeichnet, dass alle optischen Elemente auf einer Achse liegen. Diese Art von Aufbau zeichnet sich durch seine Einfachheit aus, weißt jedoch auch Nachteile auf. So ist in dieser Geometrie das Bild von seinem konjugierten Bild, dem sog. twin-image überlagert, was die Bildqualität einschränken kann (vgl. Kapitel 3.1). Dieser Effekt reduziert sich stark wenn, wie im Falle dieser Arbeit, der Lochblende-Probe-Abstand wesentlich größer als die Wellenlänge der verwendeten Strahlung ist [108]. Die Bildinformation des twin-image tritt in diesem Fall in der Rekonstruktionsebene des Hologramms über einen breiten Tiefenbereich verschmiert auf und wird nicht mehr aufgelöst [108]. Eine weitere Möglichkeit das Problem zu umgehen ist die Verwendung der komplizierteren off-axis-Geometrie, bei der Objekt- und Referenzstrahl räumlich voneinander getrennt sind [112-114].

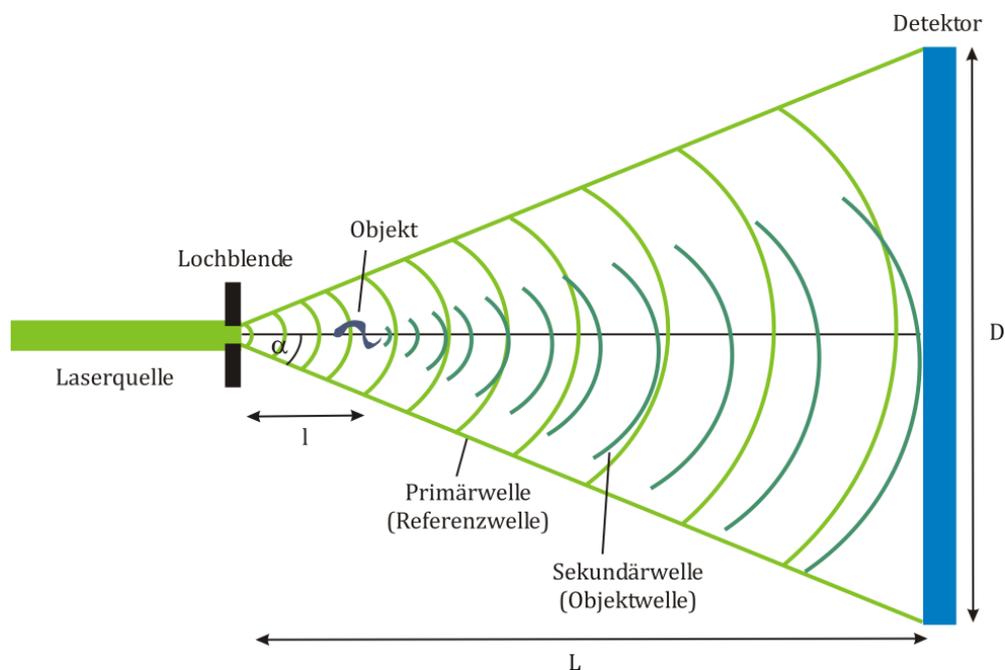


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Holographie in der in-line Geometrie nach Gabor unter Verwendung von sichtbarem Licht als Strahlungsquelle.

Der große Vorteil der holographischen Methode liegt in ihrer Fähigkeit, die komplette dreidimensionale Rauminformation des Objekts zu erfassen, da sowohl Amplituden- als auch Phaseninformation erhalten bleiben. Die Phaseninformation liegt dabei amplitudenkodiert im Streubild vor [109]. Klassische Abbildungstechniken wie die Photographie sind im Gegensatz hierzu nur amplitudensensitiv und können somit nur Projektionen abbilden.

Die Realrauminformation kann aus dem Streumuster durch Rekonstruktionsalgorithmen zurückgewonnen werden [108-111, 115-116]. Details hierzu und zum physikalischen Hintergrund finden sich in Kapitel 3.2.2.

Neben dem Erhalt der kompletten räumlichen Information zeichnet sich die Holographie auch dadurch aus, dass diese mit der Aufnahme eines einzelnen Bildes akquiriert wird,

ohne dass ein Rastern über die Probe nötig ist. Damit wird, bei der Verwendung geeigneter Kameras mit hohen zeitlichen Auflösungen und Lichtquellen mit ausreichender Leistung, die Aufnahme von Hologrammserien möglich. Hierbei wird ein vierdimensionaler Koordinatensatz, bestehend aus den drei räumlichen und einer Zeitkoordinate, generiert. Die Holographie eignet sich dadurch besonders gut für Trackinganwendungen in Biologie und Technik [24-25, 85-88, 117-124].

3.2.1 Auflösung

Die Auflösung eines holographischen Mikroskops ist durch seine Geometrie und die daraus resultierende numerische Apertur bestimmt. Bei Verwendung von sphärischen Wellen, einem Lichtquelle-Detektor-Abstand L und einem Lichtquelle-Probe-Abstand l ist die Vergrößerung V gegeben durch (vgl. Abbildung 11)[89]

$$V = \frac{L}{l}. \quad (9)$$

Daraus ergibt sich der Schluss, dass die Probe sich so nah wie möglich an der Lochblende befinden sollte, wenn eine starke Vergrößerung benötigt wird. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass das Bildfeld mit steigender Vergrößerung schrumpft. Bei der Wahl des Lichtquelle-Probe-Abstands l ist also ein Kompromiss zwischen gewünschter Vergrößerung und Bildfeldgröße zu suchen. Für den Lochblende-Kamera-Abstand L gilt gemäß Gleichung (9) das Gegenteil, je größer er gewählt wird, desto höher ist bei konstantem l die Vergrößerung. Limitierend kommt hierbei zum Tragen, dass mit steigendem Abstand der Lichtkegel größer wird und somit ab einem kritischen Wert nicht mehr gewährleistet werden kann, dass eine ausreichende Zahl Photonen den Detektor erreicht [125].

Die Berechnung des Auflösungsvermögens eines holographischen Mikroskops folgt Überlegungen, die analog zu anderen Mikroskopietechniken sind. Die Auflösung ist im Wesentlichen von der numerischen Apertur NA des Systems und der Wellenlänge des verwendeten Lichts λ abhängig. Die numerische Apertur ist allgemein durch den Brechungsindex n des Mediums und durch den halben Öffnungswinkel α des Lichtkegels definiert als [90]

$$NA := n \sin \alpha. \quad (10)$$

Im Fall des holographischen Mikroskops erhält man aus einer geometrischen Betrachtung für die numerische Apertur den Ausdruck [109]

$$NA = \frac{D/2}{\sqrt{(D/2)^2 + L^2}} \approx \frac{D}{2L} \quad (11)$$

mit der Detektorseitenlänge D . Ist der Detektor nicht vollständig ausgeleuchtet, so ist für D ein entsprechend korrigierter Wert zu benutzen. Unter der Annahme, dass $L \gg D$, vereinfacht sich der ursprüngliche Ausdruck gemäß Gleichung (11).

Basierend auf dieser Betrachtung ergeben sich die Auflösungsgrenzen analog zum Abbe'schen Auflösungskriterium zu [109]

$$\delta_{lateral} = \frac{\lambda}{NA} \quad (12)$$

und

$$\delta_{Tiefe} = \frac{\lambda}{2(NA)^2}. \quad (13)$$

3.2.2 Numerische Rekonstruktion

Die klassischen Hologrammaufnahmen auf Photoplatten wurden optisch rekonstruiert. Dazu beleuchtete man das Hologramm mit Licht derselben Wellenlänge, die auch für die Aufnahme des Hologramms verwendet wurde. Bei digitalen Hologrammen erfolgt die Rekonstruktion numerisch. Viele der frühen Rekonstruktionsalgorithmen führen zu Rekonstruktion schlechter Qualität, da Näherungen gemacht werden [126-130]. Die hier benutzte Form der Rekonstruktion folgt der Kreuzer-Implementierung der Kirchhoff-Helmoltz'schen Rekonstruktionsformel [108, 115, 131], die auf der Berechnung des Fresnel-Kirchhoff-Integrals (vgl. Gleichung (14)) beruht und die Wellenfront ohne Näherungen rekonstruiert.

$$K(\vec{r}) = \int_S I(\vec{\xi}) e^{i k \vec{\xi} \vec{r}} d^2 \xi \quad (14)$$

Hierbei ist $K(\vec{r})$ die Wellenfront, $\vec{r} = (X, Y, Z)$ der Ortsvektor, S die Detektorfläche mit den Detektor-Koordinaten $\vec{\xi} = (x, y, L)$, $I(\vec{\xi})$ das Kontrastbild und $k = 2\pi/\lambda$ die Wellenzahl. Die Funktion $K(\vec{r})$ ist nur im Bereich des Objekts signifikant strukturiert und verschieden von Null. Die Gleichung hat Gültigkeit für sphärische Wellen unter Annahme des Fraunhofer-Kriteriums $a^2 \ll l/\lambda$ wobei a die laterale Dimension des abzubildenden Objekts ist. Der Betrag $|K(\vec{r})|$ der komplexwertigen Funktion ist die Intensitätsverteilung in der XY-Rekonstruktionsebene. Eine Abbildung des Volumens kann durch Anfertigen eines Stapels dieser 2D-Rekonstruktionen entlang der optischen Achse durchgeführt werden.

Die Berechnungen sind durch die Nichtlinearität des Phasenfaktors zeitaufwendig, weshalb dieser im Kreuzer-Algorithmus durch eine Koordinatentransformation linearisiert wird. Dabei geht jedoch die Äquidistanz des Punktgitters, entsprechend den Pixeln auf dem Detektor, verloren. Es entsteht eine fassförmige Verzerrung. Dieses wird durch eine Interpolation des verzerrten Koordinatensystems auf ein überlagertes äquidistantes Gitter kompensiert [115]. Auf die so erhaltenen Daten können weitere mathematische Operationen zur Verbesserung der Rekonstruktionsqualität angewendet werden, hierzu zählen unter anderem die Graustufenanpassung, um den ganzen verfügbaren Dynamikbereich auszunutzen, die Verwendung einer Achsenversatzkorrektur, bei der ein

durchschnittlicher Intensitätswert dem Wert eines jeden Pixels abgezogen wird, um Drifteffekte zwischen Bild und Hintergrundintensität zu korrigieren und die Verwendung von Kosinus- oder anderen Filtern zur Kantenglättung und der Minimierung von Grenzflächeneffekten.

3.3 Stand der Technik

Die holographische Mikroskopie hat sich seit ihrer Erfindung zu einer weit verbreiteten Methode entwickelt, die in einigen aktuellen Übersichtsartikeln beschrieben wird [119, 132]. Im Folgenden wird ein kurzer Abriss über die jüngste technische Entwicklung und einige Anwendungen gegeben. In Kapitel 3.3.2 wird hierbei ein besonderer Fokus auf biologische Anwendungen gelegt.

3.3.1 Physikalisch-technische Anwendungen

Durch den Erhalt der Phaseninformation hat die optische Holographie unter anderem Anwendungen in der quantitativen Phasenmikroskopie [133] sowie in der Polarisationsmikroskopie gefunden [134-135]. Zur phasensensitiven Abbildung wurde auch andere Lichtquellen als Laser verwendet, um die Auflösung zu verbessern, darunter z.B. Freie-Elektronen-Laser und Synchrotronstrahlung [95-96, 136]. Auch Multiwellenlängen-Holographieanwendungen zur Erweiterung des abbildbaren Tiefenbereichs in Reflektionsgeometrien wurden entwickelt [137]. Die wohl breiteste Anwendung findet die holographische Methode im nicht-biologischen Bereich zur Zeit bei Flussuntersuchungen mittels HPIV (holographic particle image velocimetry) [117, 121-124, 138]. Hierbei wird die Bewegung kleiner Partikel in einem Flussfeld abgebildet, um so Aussagen über Verlauf und Charakteristika von z.B. Flussprofilen in Kanälen zu machen. Durch die Erweiterung dieser klassischen Technik mittels der Holographie ergeben sich Anwendungsvorteile aufgrund der intrinsischen Dreidimensionalität der Methode, wie beispielweise eine Verbesserung der Tiefenauflösung und eine Vergrößerung des abbildbaren Volumens. Durch Anwendung holographischer Mikroskopie lassen sich in mikrofluiden Umgebungen auch komplexere Abläufe, wie z.B. die Mischung von Stoffen abbilden [120]. Die Methode erlaubt so die Überwachung und Analyse solcher Prozesse.

3.3.2 Holographische Anwendungen in der Biologie

Mit der zunehmenden Verfügbarkeit bezahlbarer Lasersysteme und Computer zur Hologrammrekonstruktion und Datenauswertung sowie ausreichend großer Speichermedien für die anfallenden Datenmengen hat sich die Holographie zu einer weit verbreiteten Technik in der Untersuchung biologischer Fragestellungen entwickelt.

Als Beispiel sei die Meeresbiologie genannt, wo Unterwasserholographen [139] und Laboraufbauten [25] eingesetzt wurden, um das Schwimmverhalten verschiedener Algen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung zu untersuchen [24-25, 86, 88]. Neben diesen Untersuchungen des Schwimmverhaltens einzelner Mikroschwimmer wurden auch Experimente durchgeführt, die die Interaktion mehrerer Spezies abbilden. Beispielhaft sind die Studien von Sheng *et al.* zu nennen, der Jäger-Beute-Interaktionen von Mikroschwimmern holographisch aufnahm und aus diesen Daten verschiedene „Jagdstrategien“ von Mikroschwimmern ableiten konnte [85, 87].

Neben Trackinganwendungen wurde die Holographie im biologischen Bereich auch zur Brechungsindexbestimmung und zu morphometrischen Untersuchungen an Zellen eingesetzt [140].

4 Experimenteller Teil

4.1 Das holographische Mikroskop

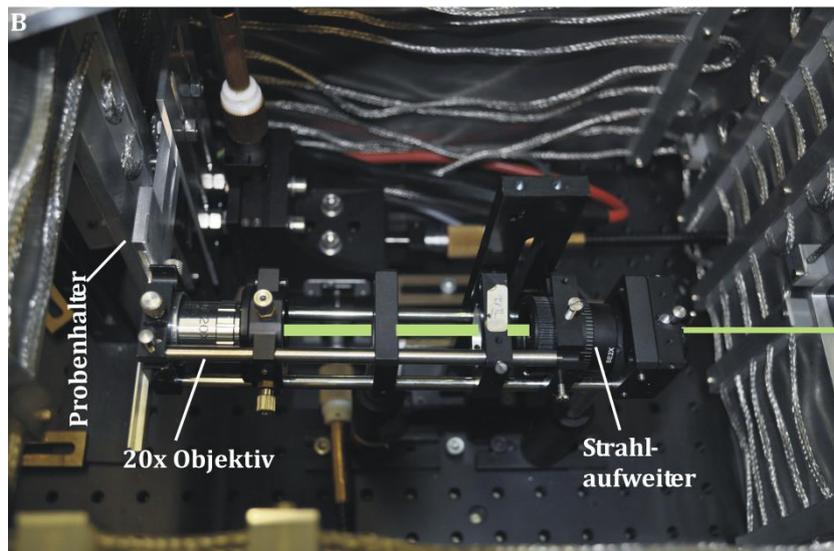
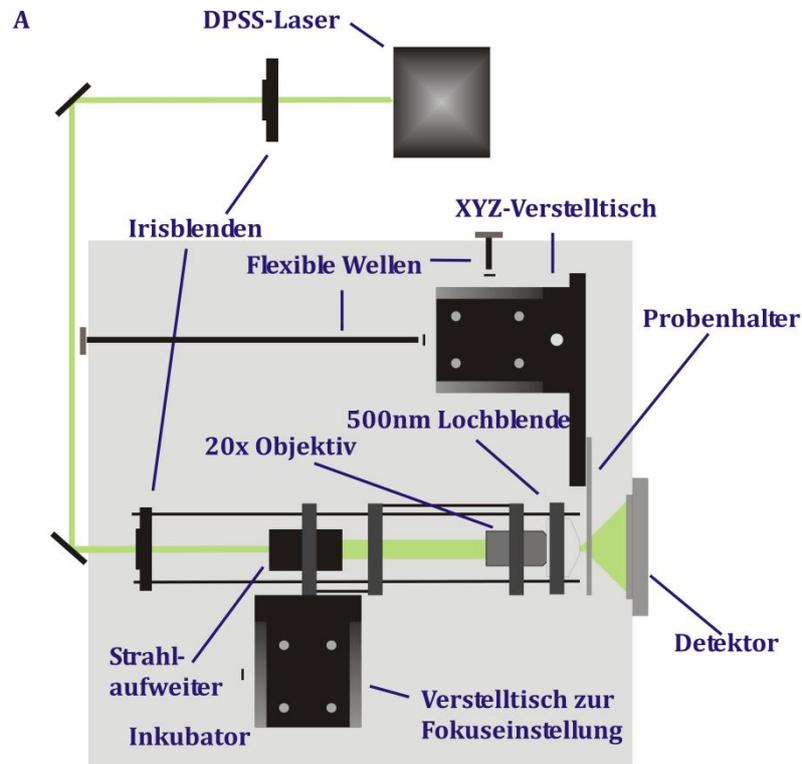


Abbildung 12: A) Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Aufbaus. B) Photographie des optischen Aufbaus im Inkubator.

Der Strahlengang des in dieser Arbeit verwendeten Aufbaus folgt direkt der Implementierung von Kreuzer und Kollegen [108]. Grundaufbauten dieses Typs wurden

bereits in anderen Arbeiten unserer Gruppe verwendet [141-143]. Der Aufbau folgt der in-line-Geometrie, d.h. alle optischen Bauteile, also Laser, Strahlaufler, Objektiv, Lochblende und Kamera liegen auf einer optischen Achse. Die optischen Elemente sind, mit Ausnahme des Lasers, in einem Inkubator untergebracht, der es erlaubt, Messungen bei definierten Temperaturen durchzuführen. Eine schematische Darstellung des Aufbaus ist in Abbildung 12 gezeigt.

Als Lichtquelle kommt ein diodengepumpter Festkörperlaser (IMM Messtechnologie, Deutschland) zum Einsatz. Der Laser emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 532 nm bei einer Leistung von 30 mW im Dauerstrichbetrieb. Art und Wellenlänge der Lichtquelle wurden so gewählt, dass neben ausreichender Kohärenzlänge genügend Leistung für eine gute Ausleuchtung der Probe zur Verfügung steht. Gleichzeitig wurde darauf geachtet, dass die emittierte Strahlung während der Messungen möglichst wenig vom Medium absorbiert wird und somit lokale Aufheizungen der Probe vermieden werden. Desweiteren wurde eine möglichst kurze Wellenlänge gewählt um die erreichbare Auflösung zu optimieren (vgl. Abschnitt 3.2.1). Der Laser beleuchtet nach Durchgang durch zwei Irisblenden, einen 2x Strahlaufler (Thorlabs, USA), ein 20x Objektiv ($NA = 0,4$, Euromex Microscopes, Niederlande) und eine Lochblende mit einem Durchmesser von 500 nm (National Apertures Inc., USA). Der Strahlaufler und die Irisblenden dienen der Strahlreinigung, während das Objektiv eine Bündelung des Strahls bewirkt, um Intensitätsverluste an der Lochblende zu minimieren.

Bei den hier beschriebenen Experimenten kamen zwei verschiedene Detektoren zum Einsatz. Zum einen ein CCD-OEM-Modul (Lumenera Corp., Kanada, 1280 x 1024 aktive Pixel, 8,3 x 6,6 mm² aktive Chipfläche, 8 bit Dynamik, max. Bildwiederholffrequenz 15,4 Hz), das über einen USB 2.0-Anschluss verfügt und typischerweise mit einer Bildwiederholffrequenz von 10 Hz betrieben wird. Zum anderen wurde der Aufbau um eine pco.1200s CMOS-Kamera (pco.imaging, Deutschland, 1280 x 1024 Pixel, 12,3 x 15,4 mm² Detektorfläche, 10 bit Dynamik, max. Bildwiederholffrequenz 636 Hz) erweitert. Diese Kamera wurde typischerweise mit 5 Hz betrieben. Diese Bildwiederholffrequenz erwies sich für das Tracking von Trypanosomen als ausreichend und stellt einen Kompromiss zwischen zeitlicher Auflösung des Datenmaterials und der erreichbaren Übertragungsrate zum Computer dar. Die Datenauswertung erfolgte bei einer kleineren Bildwiederholffrequenz, mit der Wahl der Aufnahmezeit sollte die Möglichkeit offen gehalten werden interessante Abschnitte auch mit höherer Zeitauflösung zu analysieren. In beiden Fällen wurde vor der Kamera ein IR-Kantenfilter mit einer Dicke von 5 mm installiert, um zu verhindern, dass Abwärme vom Kamerachip die Probe erwärmt. Der typische Abstand zwischen Kamera und Lochblende betrug je nach Experiment zwischen 18 und 20 mm. Daraus ergeben sich für die numerische Apertur (vgl. Gleichung (11)) typische Werte von $NA = 0,8$ bzw. $0,34$, je nach verwendeter Kamera und somit Werte von bis zu $\delta_{lateral} = 0,95 \mu\text{m}$ bzw. $\delta_{Tiefe} = 4,6 \mu\text{m}$ für die laterale und Tiefenauflösung (vgl. Kapitel 3.2.1). Die Auflösung ist also bei Weitem ausreichend um

Trypanosomen, deren kurze Zellachse ca. 3 μm und deren lange Körperachse ca. 20 μm messen, aufzulösen.

Das Gehäuse der Apparatur ist in Form eines Inkubators umgesetzt, um bei für Blutstromformen physiologischer Temperatur (37°C) arbeiten zu können. Die Temperaturstabilität des Systems wurde durch Kontrollmessungen innerhalb des Inkubators bestätigt. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass zwischen Vorder- und Rückseite der eigentlichen Messküvette kein Temperaturgradient auftritt, der während der Messung zu Artefakten durch Konvektionsströmungen führen würde. Zwischen diesen beiden Messpunkten wurden, nachdem sich ein thermisches Gleichgewicht im System eingestellt hatte, keine größeren Temperaturschwankungen als 0,1-0,2°C gemessen. Es ist daher davon auszugehen, dass das System temperaturstabil ist. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass bei der Durchführung der hier beschriebenen Messungen keine relevanten Konvektionseffekte sichtbar waren.

Außer dem Inkubator selbst wurden auch weitere Bestandteile des Aufbaus im Laufe der Arbeit optimiert. So wurden die Verstellische, die zur Bewegung der Probe im Strahlengang Verwendung finden, nach anfänglicher Positionierung außerhalb des Inkubators in dessen Inneres verlegt, um die Ausbildung von Wärmebrücken zu minimieren. Um die Funktion des Probenhalters weiterhin zu gewährleisten, wurden die Mikrometerschrauben der verwendeten Lineartische mit flexiblen Wellen (Haspa GmbH, Deutschland) verlängert, die aus dem Gehäuse herausgeführt wurden, um eine Bedienung des Probenhalters bei geschlossenem Inkubator zu ermöglichen.

Um eine direkte Wärmeübertragung von der Probe auf den Probenhalter und die daraus resultierenden Artefakte zu vermeiden, wurde ein Probenarm aus Delrin gefertigt. Dieser erwies sich jedoch als zu weich, wodurch es zur Drift während der Experimente kam. Der Probenarm wurde daher durch ein Aluminiumbauteil ersetzt.

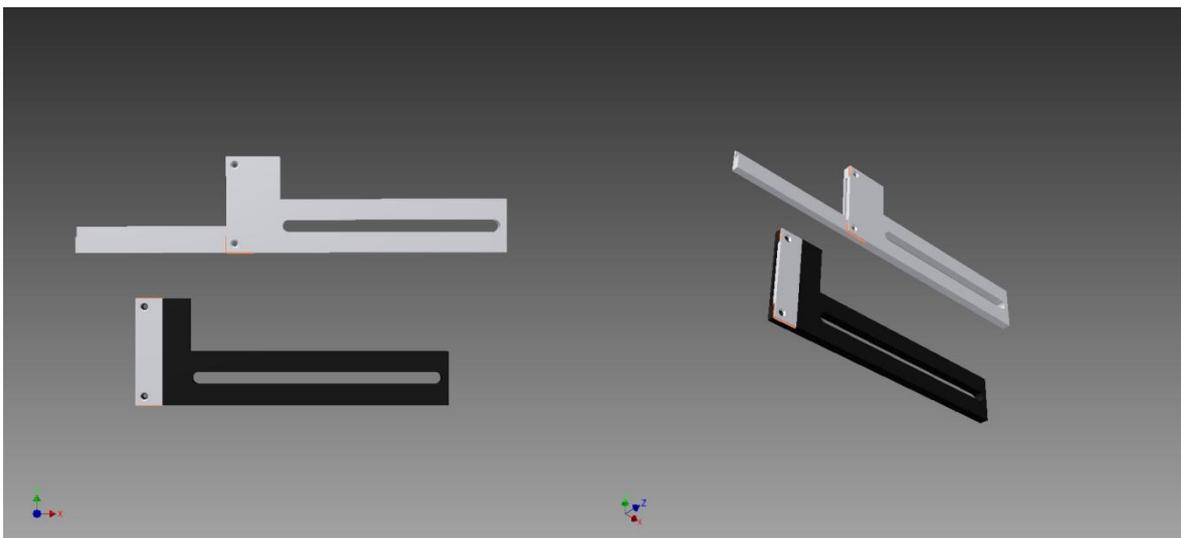


Abbildung 13: Delrinprobenhalter (unten) und überarbeitete Version des Probenhalters aus Aluminium (oben).

4.2 Zellkultur von *Trypanosoma brucei brucei*

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche *T. brucei brucei*-Zelllinien verwendet. Alle Zellen wurden durch das Labor von Prof. Dr. M. Engstler, Zoologie I, Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg zur Verfügung gestellt und dort kultiviert.

Untersuchungen an Blutstromformen wurden mit MiTat 1.2 und 1.6 (Molteno Institute Trypanozoon antigen type 1.2 und 1.6) Zellen durchgeführt. Die in dieser Arbeit gezeigten Blutstromformendaten stammen aus Experimenten mit MiTat 1.6-Zellen. Weil Letztere einer jüngeren Isolierung aus Rinderblut entstammen, unterlagen sie zum Zeitpunkt des Experiments weniger Passagen und waren schwächer an die Laborbedingungen adaptiert. Die MiTat 1.6-Zellen bilden daher das Verhalten der natürlichen Parasiten besser ab. Für die Untersuchungen an Insektenstadien (prozyklische Zellen), fand die Zelllinie 29-13 Verwendung, während die Messungen an Motilitätsmutanten an der Zelllinie 13-90/pZIM.DIC durchgeführt wurden. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, bei der durch einen Tetracyclin-induzierten Promotor die Expression von Genen, die für die intermediate chain der Dyneinmotoren kodieren, herunterreguliert wurde.

Blutstromformen wurden in HMI-9 Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, die Insektenstadien in SDM-79 Medium bei 27°C. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien ist im Tabelle 1 aufgeführt.

Medium	Zusammensetzung pro Liter
HMI-9 [2]	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) dem pro Liter zugesetzt wurden: 3,024 g NaHCO ₃ 136 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 (fetal calf serum)
SDM-79 [144]	7,0 g Minimum Essential Medium Eagle 2,0 g Medium 199 8,0 ml 50x MEM Essentielle Aminosäuren 6,0 ml 100x MEM Nichtesentielle Aminosäuren 1,0 g Glucose 8,0 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Natriumsalz 5,0 g 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure 2,0 g Natriumbicarbonat

	0,1 g Natriumpyruvat 200 mg DL-Alanin 100 mg L-Arginin 300 mg L-Glutamin 70 mg DL-Methionin 80 mg L-Phenylalanin 600 mg L-Prolin 60 mg DL-Serin 160 mg Taurin 350 mg DL-Threonin 100 mg L-Tyrosin 10 mg Guanodin 4 mg Folsäure 50 mg D(+)Glucosaminhydrochlorid 2 mg p-Aminobenzoesäure 0,2 mg Biotin
Puffer	Zusammensetzung
TDB (trypanosoma dilution buffer) [2]	20 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM NaH ₂ PO ₄ 20 mM Glucose, 5 mM KCl, 80 mM NaCl, 1 mM MgSO ₄

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer.

TDB ist in diesem Kapitel aufgeführt, da vergleichende Messungen von Blutstromformen und prozyklischen Trypanosomen in diesem Medium durchgeführt wurden. TDB ist kein Kulturmedium, sondern ein Puffer und somit nur für die Kurzzeithaltung von Trypanosomen geeignet. Der Puffer wurde für vergleichende Messung von Blutstromformen und prozyklischen Trypanosomen eingesetzt, da er sich für beide Lebenszyklusstadien eignet, die Kulturmedien jedoch nur jeweils für eines der beiden.

4.3 Durchführung des Experiments

4.3.1 Auswahl der Probenkammer

Die meisten in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden in kommerziell erhältlichen Flusskanälen der Firma ibidi durchgeführt (ibidi μ Slide I Luer 0.8, ibidi

GmbH, Deutschland) (vgl. Abbildung 14). Die Kanäle sind 800 μm hoch, 50 mm lang und 5 mm breit. Daraus resultiert ein nominales Volumen von 200 μl .

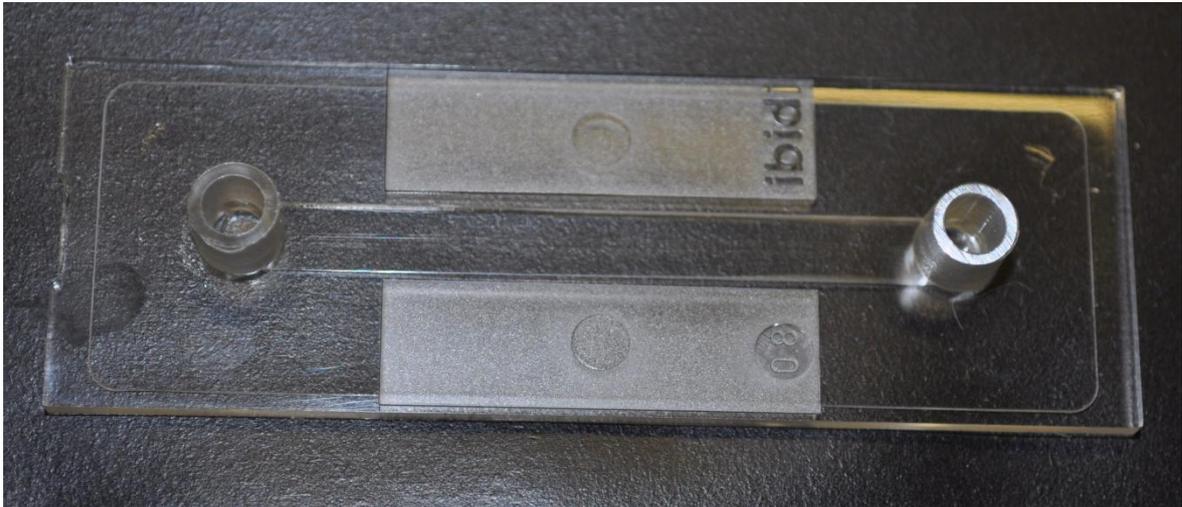


Abbildung 14: Photographie eines ibidi $\mu\text{Slide I}$ Luer Kanals, wie sie in dieser Arbeit als Probenkammern verwendet wurden.

Anfangs wurden selbst hergestellte Probenkammern aus verschiedenen Materialien getestet. So wurden Küvetten durch Aufkleben von Deckgläschen auf Metallteile hergestellt. Diese erwiesen sich jedoch schnell als ungeeignet, da der zum Verbinden der Bauteile benutzte Kleber teilweise von der Probenlösung ausgewaschen wurde und so mit den Zellen in Verbindung kam, die daraufhin abstarben. In einem weiteren Ansatz wurden Kammern auf Basis von Polydimethylsiloxan (PDMS) (Sylgard 184, Dow Corning GmbH, Deutschland) verwendet (siehe Abbildung 15).

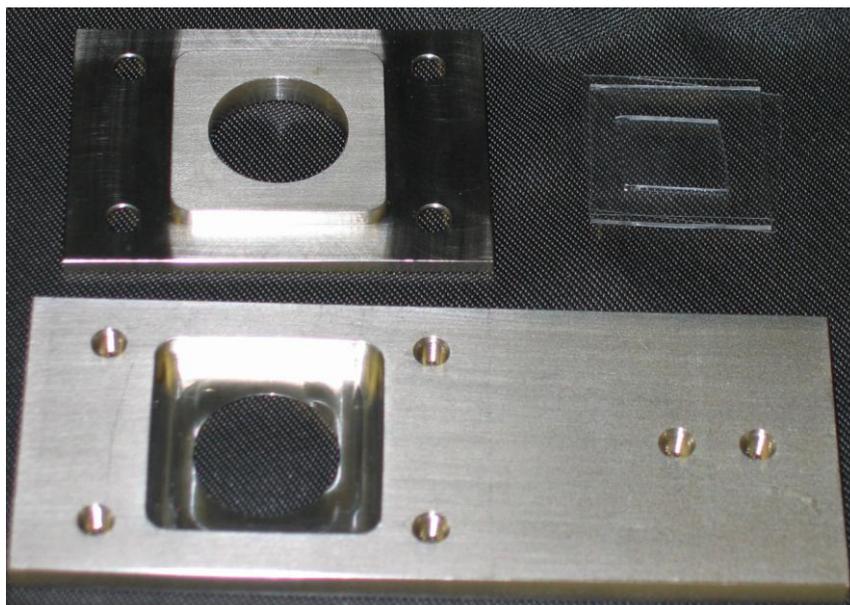


Abbildung 15: Photographie der ursprünglich als Probenkammer verwendeten PDMS-Kammern und des dafür verwendeten Probenhalters.

Die viereckige Grundstruktur der Kammern wurde mit einem Skalpell aus PDMS geschnitten und die Vorder- und Rückseite mit in Caro'scher Säure (H_2SO_4/H_2O_2 -Gemisch im Verhältnis 3:1) aktivierten Deckgläschen versiegelt. Bei der Aktivierung der Deckgläschen werden auf der Oberfläche Si-O-Bindungen aufgebrochen und es entsteht eine Hydroxylgruppen-terminierte Oberfläche. Diese Gruppen reagieren mit dem PDMS und es kommt zu einer festen Verbindung der beiden Bauteile. Da die Kammern handgeschnitten wurden, bestanden anfangs Reproduzierbarkeitsprobleme. Diese hätten durch Benutzung eines Stempelwerkzeuges oder einer Gussform umgangen werden können. Von dieser Lösung wurde aber Abstand genommen, da in Küvetten dieser Bauart, nach Präinkubation häufig tote oder immotile Trypanosomen beobachtet werden konnten. Es wird vermutet, dass dies eine Reaktion auf überschüssiges Monomer des PDMS war, das durch ungenügendes Aushärten des Polymers oder ungenügendes Spülen der Kammer mit Puffer vor der Durchführung des Experiments in der Kammer zurückgeblieben war. Aus diesen Gründen wurden Flusskanäle der Firma ibidi als Probenkammern getestet. Neben der hohen Reproduzierbarkeit der Kanalabmessungen haben diese Probenkammern den Vorteil über Luer-Konnektoren zu verfügen, die ein einfaches Befüllen der Küvette erlauben. Im Fall der PDMS-Kammern mussten hierzu Metallkanülen verwendet werden. In Anbetracht der Tatsache, dass mit pathogenen Mikroorganismen gearbeitet wurde, ist im Probenkammerwechsel somit auch ein großer Gewinn an Arbeitssicherheit zu sehen. Die Konnektoren erlauben auch das Befüllen des Kanals bzw. den Probenwechsel im eingebauten Zustand. In dieser Arbeit wurde davon kein Gebrauch gemacht, da alle Proben vor der Durchführung des Experiments 30-60 Minuten in Brutschränken unter kontrollierter Temperatur und CO_2 -Atmosphäre vorinkubiert wurden, um die Anpassung der Organismen an die Messumgebung und somit artefaktfreie Messungen zu gewährleisten.

4.3.2 Eignung des Aufbaus zur Vermessung von Trypanosomen: Ausschluss von Photo- und Chemotaxis

Die im Folgenden beschriebenen Experimente zur Photo- und Chemotaxis wurden von Niko Heddergott an der Universität Würzburg durchgeführt.

Um die Biokompatibilität der ibidi-Kanäle zu testen, wurden die einzelnen Bauteile des Kanals, ein Spritzgussteil, das die Kanaloberseite bildet, und eine Folie, die den Kanal abdichtet, in eine Petrischale mit Medium eingelegt, das mit Trypanosomen versetzt wurde und anschließend mikroskopisch untersucht. Es wurden drei Regionen verglichen, die in der sich das Spritzgussteil befand, die in der die Folie lag, und als Kontrollregion ein „freier“ Bereich der Schale.

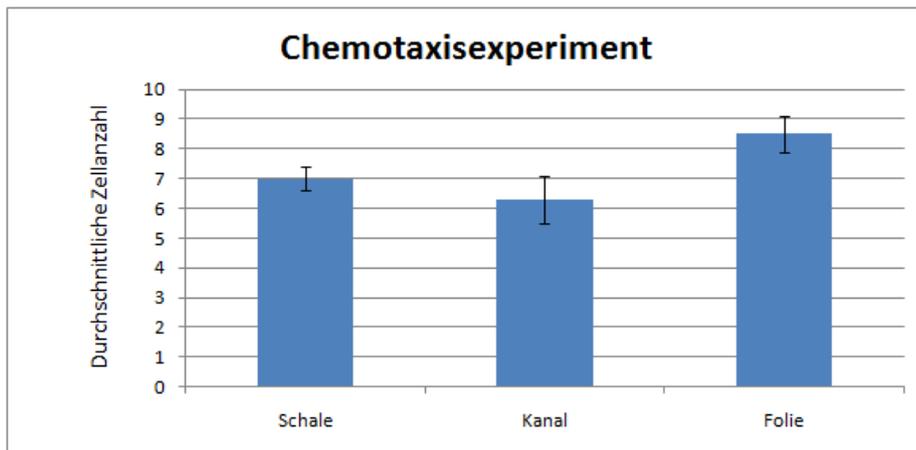


Abbildung 16: Auswertung eines Taxis-Experiments. Aufgetragen ist die Anzahl an Blutstromform-Trypanosomen in oberflächennahen Volumina gleicher Größe. Die Auszählung erfolgte nach 30-minütiger Präinkubation und wurde 20 mal wiederholt. Gezeigt sind die durchschnittlichen Zellanzahlen mit Standardabweichung [Daten zur Verfügung gestellt von N. Heddergott].

Es wurde weder positive noch negative Taxis bezüglich der Kanalteile festgestellt. Die Anzahl beobachteter Zellen war innerhalb der Fehlergrenzen in allen drei Regionen vergleichbar (vgl. Abbildung 16). Ebenso zeigten die beobachteten Zellen kein ungewöhnliches Motilitätsverhalten. Verfälschende Effekte durch Taxis während der Messung können also ausgeschlossen werden.

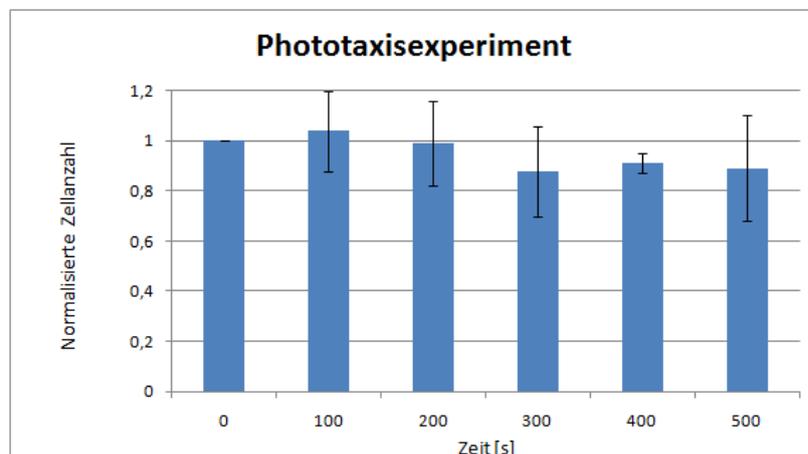


Abbildung 17: Auswertung des Phototaxis-Experiments. Gezeigt ist die Anzahl im beleuchteten Bildausschnitt befindlicher Blutstromformen-Trypanosomenzellen über einen Zeitraum von 500 Sekunden, entsprechend der allgemeinen Messdauer eines Holographieexperiments. Die Zellzahl ist auf die Startzellzahl von 47 Zellen normiert, Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen [Daten zur Verfügung gestellt von N. Heddergott].

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die Trypanosomen auch auf Phototaxis getestet. Hierzu wurden sie unter einem iMic Mikroskop (TILL Photonics, Deutschland), das im Rahmen dieser Arbeit auch für die Mikroskopieaufnahmen von Trypanosomen benutzt

wurde (vgl. Kapitel 4.3.3), mit einer 150 W Xenon-Lampe mit einem polychrom 5000 Monochromator (beides TILL Photonics, Deutschland) mit der in dem Holographieexperimenten verwendeten Wellenlänge von $\lambda=532$ nm beleuchtet. Auch in diesem Experiment ließ sich keinerlei Taxis beobachten.

Die hier beschriebenen Beobachtungen entsprechen den Erwartungen, da bis heute keine Fälle von Photo- oder Chemotaxis für Trypanosomen bekannt sind [18].

Phototaktische Effekte sind zwar auszuschließen, aber phototoxische Effekte können potentiell auftreten. Von unseren Kooperationspartnern an der Universität Würzburg wurde beobachtet, dass Langzeitbelichtungen bei hohen Lichtintensitäten bei einer Wellenlänge von 532 nm negative Effekte auf die Zellmotilität zeigen [N. Heddergott, persönliche Kommunikation]. Diese Situation ist jedoch mit der im Holographieexperiment nicht vergleichbar, da der Photonenfluss im Mikroskop aufgrund von fokussierenden Optiken wesentlich höher ist. Im Holographieexperiment ist das Gegenteil der Fall, da die Abbildung mit einem divergenten Lichtkegel stattfindet. Nichtsdestoweniger wurden die Experimentzeiten so kurz wie möglich gehalten, um solche Effekte zu minimieren.

4.3.3 Allgemeines Messprotokoll

Soweit nicht anders beschrieben wurden die holographischen Messungen in dieser Arbeit nach dem folgenden allgemeinen Protokoll durchgeführt.

Trypanosomen der jeweiligen im Experiment untersuchten Zelllinie wurden frisch aus der Zellkultur entnommen und auf eine Konzentration von typischerweise 1×10^5 Zellen/ml verdünnt. Diese Konzentration erwies sich als guter Kompromiss zwischen einer ausreichenden Zellanzahl im Beobachtungsvolumen, um eine hinreichende Statistik zu erhalten und einem klaren Streubild, in dem sich die Streumuster der einzelnen Zellen nicht zu sehr überlagern und somit den Rekonstruktionsprozess negativ beeinflussen. Die Verdünnung fand mit Pufferlösung (TDB, trypanosoma dilution buffer) oder dem zur Kultivierung verwendeten HMI-9 Medium statt. Die Medien unterscheiden sich bezüglich ihrer Zusammensetzungen (vgl. Kapitel 4.2), weisen aber ähnliche Viskositäten auf. In Mikroskopiestudien wurde keine Veränderung des Motilitätsverhaltens durch einen Wechsel des Mediums beobachtet [N. Heddergott, persönliche Kommunikation]. Das HMI-9-Medium wies jedoch einen geringeren Anteil an Schwebstoffen auf, weshalb im Rahmen dieser Arbeit beide Medien Verwendung fanden. Alle vergleichenden Messungen zwischen Blutstromformen und prozyklischen Trypanosomen wurden in TDB durchgeführt.

Die Probenlösung wurde mit Mikropipetten in die Kanäle transferiert und deren Luer-Anschlüsse mit Gummistopfen und Parafilm® abgedichtet. Die so vorbereiteten Kanäle wurden im Falle von prozyklischen Trypanosomen bei 27°C, Blutstromformen bei 37°C, und 5% CO₂ 30-60 min vorinkubiert. Die Vorinkubation dient der Adaption der Trypanosomen an die Messbedingungen, um die Experimente artefaktfrei durchführen zu

können. Bei allen vermessenen Proben wurden die Organismen vor und nach dem Experiment mittels optischer Mikroskopie auf ihre Motilität überprüft. Experimente wurden nur mit Proben durchgeführt, in denen die Parasiten unter dem Mikroskop keine Auffälligkeiten in ihrer Motilität zeigten.

Neben der Vorinkubation der Proben wurde im Falle der Messungen bei erhöhter Temperatur auch der Holograph selbst entsprechend vorbereitet. Dazu wurde der Inkubator auf 37°C gebracht und bei laufendem Laser und Kamera eine mindestens zweistündige Equilibrierungsphase vor der Messung abgewartet. Um die Einstellung des thermischen Gleichgewichts zu beschleunigen und um eine effektive Luftzirkulation zu gewährleisten und lokale Temperaturgradienten zu vermeiden, wurde auch ein kleiner USB-Ventilator in den Inkubator eingebracht.

Messungen wurden typischerweise über einen Zeitraum von 8,3 min (500 s) durchgeführt. In frühen Messungen wurde bis zu 17 Minuten gemessen, davon wurde jedoch im Laufe der Arbeit Abstand genommen. Die Messzeitlimitierung hat, unter anderem, technische Gründe, die im Wechsel der Kamera bedingt sind (vgl. Kapitel 4.4.1). Des Weiteren konnten über längere Zeiträume keine optimalen Bedingungen für die Trypanosomen gewährleistet werden, da der Holograph über keine CO₂-Zufuhr verfügte und einige Messungen in Puffer durchgeführt werden mussten, der sich nicht für die Langzeithaltung von Trypanosomen eignet (vgl. Kapitel 4.2). Nichtsdestoweniger ist der Beobachtungszeitraum ausreichend um eine gute Statistik zu gewährleisten.

Messreihen, in denen Artefakte durch Konvektion, Sedimentation oder Schwebstoffe auftraten wurden nicht zur Datenanalyse verwendet. Bei vergleichenden Messungen wurden, soweit möglich, alle Datensätze am selben oder an aufeinander folgenden Tagen gemessen, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

4.4 Datenanalyse

4.4.1 Hologrammvorbereitung und -rekonstruktion

Die beim Experiment erhaltenen Hologramme müssen, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, erst in Realrauminformation umgewandelt, also rekonstruiert werden, damit aus ihnen die Koordinaten der untersuchten Mikroschwimmer extrahiert werden können. Die Rekonstruktion der in dieser Arbeit gezeigten Daten erfolgt mit einer Matlab-Software aufbauend auf dem Algorithmus von Heydt [88, 143]. Zur Rekonstruktion müssen die Hologramme wie folgt vorbereitet werden. Je nach verwendeter Kamera liegen die Hologramme als 8 bit Bitmap-Dateien mit einer Bildgröße von 1280 x 1024 Pixeln (LuCam 160) oder als 16 bit Tiff-Dateien der selben Bildgröße (pco.1200s) vor. In beiden Fällen müssen die Bilder vor der Rekonstruktion auf 1024 x 1024 Pixel zugeschnitten werden, da der Rekonstruktionsalgorithmus, bedingt durch die Verwendung von

Fouriertransformationen, nur quadratische Bilder verarbeiten kann. In beiden Fällen müssen die Hologrammdateien über einen Zeitstempel verfügen, um im späteren Verlauf der Analyse die Schwimmggeschwindigkeiten berechnen zu können. Im Fall der LuCam-Daten wird der Zeitstempel direkt bei der Aufnahme durch das verwendete Labview-Programm an den Dateinamen angehängt. Bei diesen Daten ist der Zeitstempel zwingend nötig, da die hier verwendete USB-Kamera über keinen Kamera-internen Speicher zur Pufferung von Bildern verfügt. Die Datentransferrate zum Computer ist daher von der aktuell zur Verfügung stehenden Rechenleistung und Busauslastung abhängig und somit schwankungsanfällig. Eine ausführliche Diskussion des Problems ist in der Arbeit von Heydt gegeben [143].

Im Fall der pco-Kamera wird der Zeitstempel graustufencodiert in den ersten 14 Pixeln des Bilds gespeichert und kann mittels eines Matlab-Programms ausgelesen werden. Der für den Zeitstempel verwendete Bereich hat keinen Einfluss auf die Rekonstruktion, da er beim Zuschnitt entfernt wird. Hier kann ein sehr genaues, weitgehend schwankungsfreies Zeitintervall eingehalten werden, da die Kamera über einen internen Speicher von 2 GB zur Pufferung verfügt. Die Kamera wird im FIFO-Modus (first in first out) betrieben. Das bedeutet, dass ein Bild bei der Aufnahme zuerst im Kameraspeicher abgelegt und von dort über die Firewire-Schnittstelle der Kamera zum Rechner transferiert wird. Dieses Verfahren gewährleistet zwar eine konstante Aufnahmerate, aber nur so lange, wie ausreichend freier Kameraspeicher zur Verfügung steht. Sobald der Speicher voll ist, werden die jeweils ältesten Aufnahmen überschrieben (Ringpuffer-Modus). Die erreichbare Bildwiederholrate ist dann von der effektiven Übertragungsgeschwindigkeit der Firewire-Verbindung abhängig. Der theoretische Wert für den genutzten Firewire 400-Standard (IEEE 1394a) liegt bei 400 Mbit, also 50 MB/s. Bei einer Bildgröße von ca. 2,6 MB also 19,23 Bilder pro Sekunde. Real wird aber nur eine Rate von 3,11 Bildern pro Sekunde erreicht. Daher wurde die Aufnahmelänge auf 2500 Bilder bei 5 Bildern pro Sekunde limitiert. Dies entspricht dem längsten Zeitraum, der für die gegebene Bildwiederholrate mit konstanter Bildrate erreicht werden kann.

Die entsprechend zugeschnittenen und mit Zeitstempel versehenen Hologramme können anschließend rekonstruiert werden. Um lediglich die Trypanosomen ohne störende Hintergrundbeleuchtung zu rekonstruieren, wird von jedem Hologramm ein sog. Quellbild abgezogen. Das so erhaltene Differenzbild wird schließlich rekonstruiert (vgl. Abschnitt 3.2.2). Um die Ausleuchtung nicht zu verändern und somit Artefakte einzuführen, bietet es sich an für das Quellbild ein Hologramm aus dem Datensatz zu verwenden. Hierbei werden jedoch Artefakte der Art eingeführt, dass alle im Quellbild vorhandenen Objekte als Bildinformation ins Differenzbild eingebracht werden. Um dieses Problem zu umgehen und gleichzeitig während des Experiments auftretende Ausleuchtungsschwankungen zu kompensieren, wurden in dieser Arbeit künstlich generierte Quellbilder verwendet. Diese wurden erstellt, indem unter Verwendung eines festen Inkrements Bilder aus dem Datensatz entnommen werden. Auf den so erhaltenen Satz wurde pixelweise ein

Medianfilter angewandt, d.h. für jeden XY-Pixelkoordinatenpunkt werden die Grauwerte der Einzelbilder nach Größe sortiert in den Arbeitsspeicher geschrieben und anschließend ein Bild generiert, das sich für jeden Koordinatenpunkt aus dem Grauwert an der mittleren Position der Reihe, also z.B. der fünften Position bei neun Bildern, zusammensetzt.

Das Differenzbild aus Hologramm und der so generierten Quelle wird gemäß der von Heydt beschriebenen Prozedur rekonstruiert [88, 143]. Dabei findet ein Matlab-Programm Verwendung, das die Rekonstruktionsparameter Kamera-Lochblenden-Abstand, Detektorseitenlänge, unterste und oberste Rekonstruktionsebene, Anzahl der Rekonstruktionsebenen, die Wellenlänge und das Inkrement der zu rekonstruierenden Hologramme sowie den Speicherort der Quelle und der Hologramme aus einer Textdatei einliest.

Das Programm kann mehrere Datensätze nacheinander abarbeiten (batch-Modus) und lokal oder auf Netzwerkclustern eingesetzt werden. Die Rekonstruktionsergebnisse werden als drei Ebenenprojektionen (XY, XZ und YZ) je nach verwendeter Kamera und deren Dynamik als 8 oder 16 bit png-Dateien gespeichert. Dieser Dateityp wurde gewählt, da er kompressionsfrei arbeitet und dabei relativ kleine Datenmengen produziert. Die erhaltenen Ebenenrekonstruktionen sind wie bei Heydt beschrieben Maximalwertprojektionen [143]. Um die Bildqualität weiter zu verbessern wurden die Projektionen in dieser Arbeit zusätzlich mit einem Laplacian-of-Gaussians-(LoG)-Filter [145] nachbearbeitet. Hierbei handelt es sich um einen Kantenglättungsfilter, der Objekte mit relativ scharfen Hell-/Dunkelübergängen verstärkt und Artefakte mit graduellen Übergängen unterdrückt. Der Filter detektiert Punkte oder daraus zusammengesetzte Objekte und wird wegen der divergenten Beleuchtung und daraus in der Projektion variierenden Objektgrößen in verschiedenen Skalierungen angewandt.

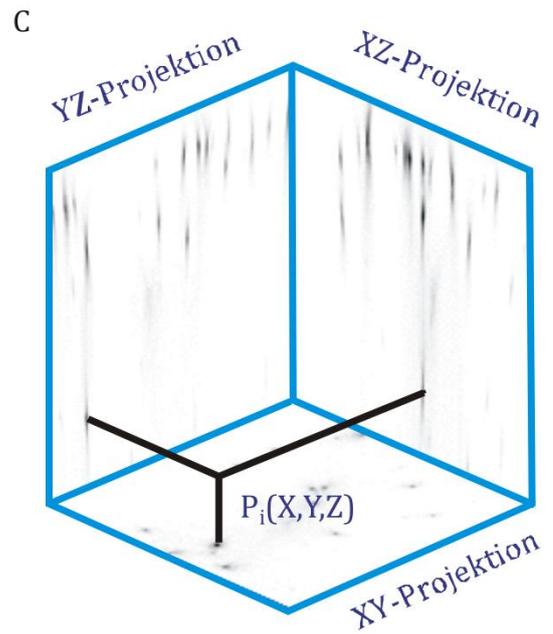
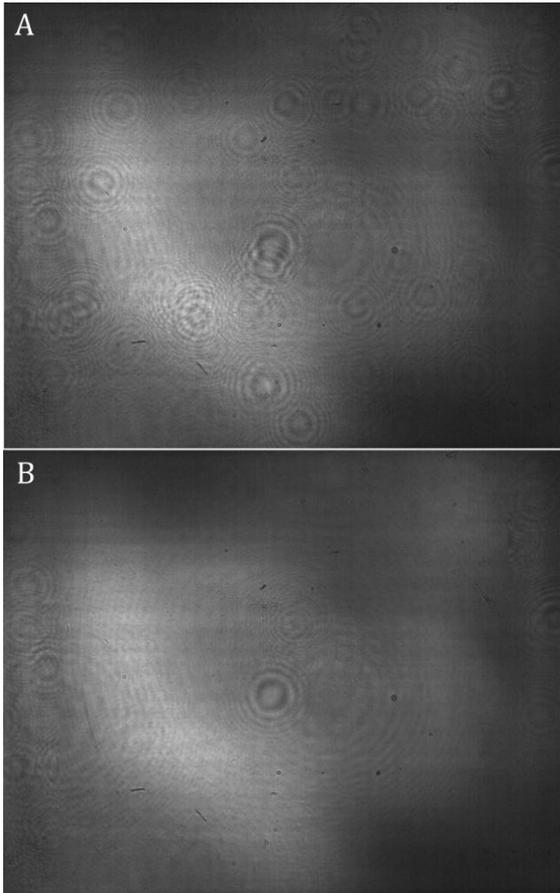


Abbildung 18: Hologramm (A), Median-gefilterte Quelle (B) und 3D-Rekonstruktion zur Extraktion der Datenpunkte (C).

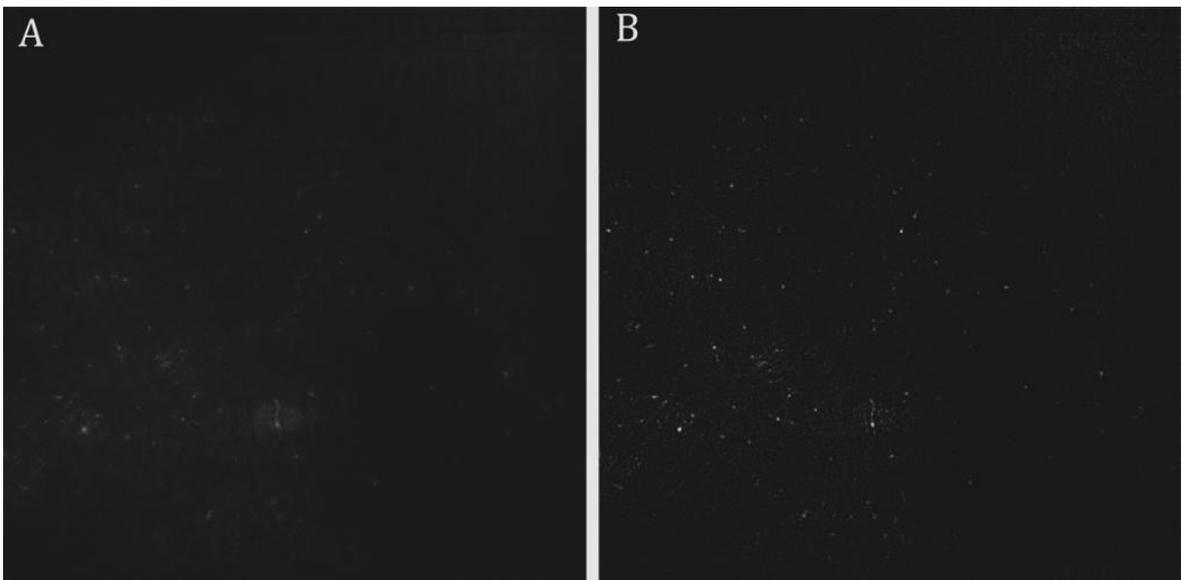


Abbildung 19: XY-Ebenenrekonstruktion vor (A) und nach der Anwendung des LoG-Filters (B).

4.4.2 Holographie in Umgebungen mit multiplen Medien [146]

Das im Folgenden beschriebene Modell wurde in unserer Gruppe von Dr. Hernán Gonzalo Sendra entwickelt.

Bei Aufnahmen in denen das Licht durch Medien mit Brechungsindizes n_i unterschiedlich von dem von Luft propagiert ändert sich die effektive Wellenlänge gemäß dem Faktor, um den sich die Brechungsindizes unterscheiden, der Dicke der jeweiligen Schicht und der Anzahl der Medien [147]. Diese Wellenlängenänderung muss bei der Rekonstruktion beachtet werden. Dies lässt sich, unter Anderem, durch die Einführung einer effektiven Wellenlänge tun. Im Fall mehrerer Medien ergibt sich für die effektive Wellenlänge der Ausdruck

$$\lambda_{eff} = \frac{\lambda}{\sum_i^n d_i n_i / L'} \quad (15)$$

mit der effektiven Wellenlänge λ_{eff} , der nominellen Wellenlänge λ , der Dicke d_i der jeweiligen Komponente im Strahlengang, den korrespondierenden Brechungsindizes n_i und dem Kamera-Detektor-Abstand L .

Neben der Wellenlänge selbst ändert sich aber auch die Form der Wellenfront (vgl. Abbildung 20).

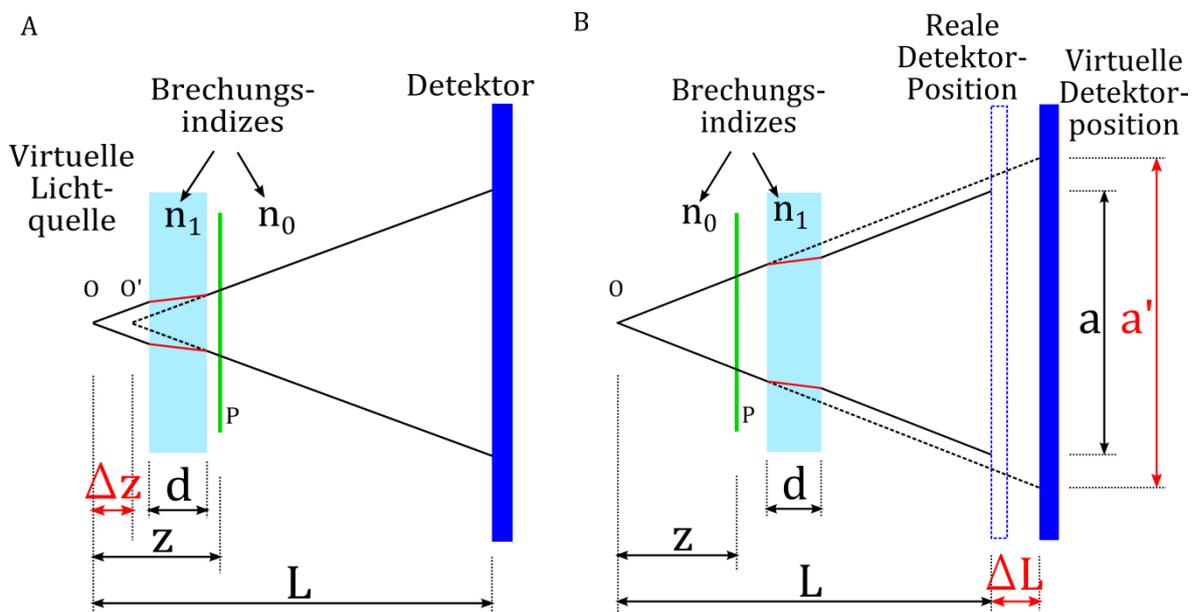


Abbildung 20: Änderung des Verlaufs der Wellenfront durch Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes. A) Grenzfall einer Lage mit Brechungsindex n_1 vor dem Objekt, B) Grenzfall einer Lage mit Brechungsindex n_1 nach dem Objekt.

Zur Herleitung der Situation für das in dieser Arbeit benutzte System sind zwei Grenzfälle zu unterscheiden. Der erste Grenzfall ist eine Lage mit einem Brechungsindex $n \neq 1$ vor dem abzubildenden Objekt (vgl. Abbildung 20 A), der zweite eine Lage hinter dem Objekt (vgl. Abbildung 20 B). Für den in Abbildung 20 A gezeigten Fall kann die Welle nach

Durchlauf durch das Medium unter Annahme der Paraxialnäherung als sphärische Welle mit auf der Strahlachse verschobenem Ursprung betrachtet werden. Der Ursprung ist dann um

$$\Delta z = d \left(1 - \frac{\tan \gamma}{\tan \alpha} \right) \approx d \left(1 - \frac{n_0}{n_1} \right) \quad (16)$$

verschoben, wobei d die Dicke der Lage mit dem Brechungsindex n_1 , α der Eintritts- und γ der Austrittswinkel des Strahls sind. Der zweite Fall ist komplizierter, da sich hier nicht nur der Lichtquelle-Detektor-Abstand, sondern auch die Ausleuchtung der Kamera und damit die effektive Detektorfläche mit der Verzerrung des Lichtkegels ändert (Abbildung 20 B). Dies ergibt sich aus der Bedingung, dass sich die Phase am Detektor zwischen korrigiertem und unkorrigiertem Fall nicht ändern darf. Es ergibt sich daraus eine Korrektur der Detektorposition ΔL zu

$$\Delta L = d \left(\frac{n_1 \cos \alpha}{n_0 \cos \gamma} - 1 \right) \approx \left(\frac{n_1}{n_0} - 1 \right) \quad (17)$$

und eine Reskalierung K von

$$K = \frac{a'}{a} = \frac{L + \Delta L}{L - d \left(1 - \frac{\tan \gamma}{\tan \alpha} \right)} \approx \frac{L + \Delta L}{L - d \left(1 - \frac{n_0}{n_1} \right)} \quad (18)$$

mit der unkorrigierten Detektorfläche a und der korrigierten Fläche a' . Auch hier ist die Paraxialnäherung angewendet worden.

Im Fall eines realen Hologramms sind beide Fälle zu kombinieren, da die Probe im Kanal von beiden Seiten mit Material mit einem Brechungsindex $n \neq 1$ umgeben ist. Bei Berücksichtigung mehrerer Lagen verschiedener Materialien ergeben sich die folgenden Korrekturterme.

$$\Delta z \approx \sum_i^n d_i \left(1 - \frac{n_0}{n_i} \right) \quad (19)$$

$$\Delta L \approx \sum_i^n d_i \left(\frac{n_0}{n_i} - 1 \right) \quad (20)$$

$$K \approx \sum_i^n \frac{L + \Delta L}{L - d_i \left(1 - \frac{n_0}{n_i} \right)} \quad (21)$$

Der Ausdruck (19) bezieht sich dabei nur auf Objekte vor der Rekonstruktionsebene, die Ausdrücke (20) und (21) auf solche hinter der Rekonstruktionsebene.

4.4.3 Datenauswertung

Die Analyse der aus der Rekonstruktion erhaltenen Projektionen erfolgt analog zur der von Heydt [143] entwickelten Vorgehensweise. Die verwendeten Programme zur Trajektorienbestimmung und zur Analyse der charakteristischen Motilitatsparameter entsprechen im Wesentlichen dem dort Gezeigten, wobei die verwendeten Parameter für

die Anwendung auf Trypanosomendatensätze angepasst wurden. Im Fall der Verwendung weiterer Analysemethoden, sind diese bei der jeweiligen Auswertung beschrieben.

4.4.3.1 Trajektorienbestimmung

Die Bestimmung der in dieser Arbeit gezeigten Trajektorien erfolgte semiautomatisch. Dem Auswertungsprogramm werden hierbei Startpunkte vorgegeben und der Algorithmus versucht anhand von gegebenen Parametern die Trajektorie zu vervollständigen. Treten Fehler auf, markiert das Programm die Punkte zur nachträglichen Korrektur. Bei drei aufeinanderfolgenden Fehlbestimmungen (z. B. durch Inkonsistenz der Z-Koordinate oder kreuzende Partikel) innerhalb einer Trajektorie bricht das Programm ab und markiert die Trajektorie zur Überprüfung durch den Benutzer. Das Programm fährt anschließend mit der Bestimmung der nächsten durch einen Startpunkt definierten Trajektorie fort. Der Prozess wiederholt sich bis die Startpunktliste abgearbeitet ist.

Im Folgenden ist die Methode der Koordinatenextraktion kurz geschildert. In einer XY-Projektion werden Startpunkte vom Benutzer markiert, anschließend sucht das Programm in den zugehörigen XZ- und YZ-Projektion entlang der jeweiligen X- bzw. Y-Koordinate nach dem Punkt maximaler Intensität. Dieser wird als Signalschwerpunkt angenommen. Die Startkoordinaten werden als korrekt akzeptiert, wenn sie eine Reihe von Kriterien erfüllen. Diese bestehen aus einem Schwellenwert für den Grauwert (typischerweise mindestens 60% der Maximalintensität), einer Ober- und Untergrenze für die Objektgröße in einer Projektion in Pixeln (Minimum 5 Pixel, Maximum 50 Pixel) sowie einer maximale Abweichung der beiden Z-Koordinaten (typischerweise 15 μm oder $\frac{3}{4}$ einer Zellgröße). Die Liste wird dann wie oben beschrieben abgearbeitet. Dabei wird die Größe des zu berücksichtigenden Fensters vorgegeben. Diese ergibt sich aus der Maximalgeschwindigkeit des Organismus und der Bildrate.

Die Automatik funktioniert besonders für sphärische Objekte gut. Im Falle sich bei der Fortbewegung verformender Objekte wie Trypanosomen ist die Objekterkennungsquote niedriger, da aufgrund der sich dynamisch ändernden Struktur der abgebildeten Organismen kein universell gültiger Filter zur Formerkennung angewandt werden kann. In einigen Fällen ist es jedoch möglich, die Trajektorienbestimmung und eine darauf basierende Klassifizierung, z.B. von Motilitätsmustern bei Mikroschwimmern komplett zu automatisieren [148-149]. Hierbei wird der schon erwähnte Laplacian-of-Gaussians-Filter zur Detektion von Objekten angewandt. Objekte, die nach Filterung ein Schwellenwertkriterium für den Grauwert erfüllen, werden in einer Datenbank gespeichert. Die Verknüpfung der Punkte über verschiedene Aufnahmen hinweg und somit die zeitliche Trajektorienbestimmung erfolgt über einen Hidden-Markov-Algorithmus [148-149].

Da das holographische Mikroskop über eine relativ kleine numerische Apertur verfügt, ist die Auflösung in der Z-Achse schlechter als in der XY-Ebene (vgl. 3.2.1). Um durch die schlechtere Tiefenauflösung keine Artefakte in die Berechnung von Schwimmparametern einzuführen wird die Z-Koordinate über eine Spanne von jeweils 11 Datenpunkten angepasst. Die Anpassung erfolgt gemäß der von Heydt entwickelten Methodik [88].

Heydt illustriert den Effekt durch eine Zeitserie von Aufnahmen einer auf einer Oberfläche adhärenen *Ulva linza*-Spore. Während die Position in der XY-Ebene relativ stabil mit einer Abweichung von ca. 500 nm bestimmt werden kann, variiert die Z-Position in der gleiche Serie um 2,5 μm . Die Anpassung der Z-Position erfolgt über ein Polynom zweiten Grades durch lokale Regression, wobei die Regressionen mittels der Methode der kleinsten Quadrate gewichtet werden (entspricht der *rls*-Routine in MatLab) [88].

4.4.3.2 Bestimmung der Schwimmggeschwindigkeit

Für die beschriebenen Datensätze, Subdatensätze daraus sowie Einzeltrajektorien und deren Segmente werden in dieser Arbeit wahrscheinlichste Geschwindigkeiten angegeben. Diese sind soweit nicht anders beschrieben aus Geschwindigkeitsverteilungshistogrammen gewonnen. Bei deren Anfertigung wurde als Geschwindigkeitsbereich 0-30 $\mu\text{m/s}$ gewählt. Dies entspricht bei einer Maximalgeschwindigkeit laut Literatur von 20 $\mu\text{m/s}$ [16-17] einem sinnvollen Wert, da der Literaturwert aus 2D-Messungen bestimmt wurde und somit aufgrund der fehlenden Tiefeninformation von einer Unterschätzung der Geschwindigkeit auszugehen ist. Die Geschwindigkeitsklassen wurden in Intervalle von 1 $\mu\text{m/s}$ eingeteilt und anschließend eine Fitfunktion auf das Histogramm angewandt. Kleinere Intervalle brachten keine Verbesserung der Qualität des fits, wohingegen größere Intervalle zu einer Verminderung seiner Qualität führten. Die Anpassungsfunktion hat im Allgemeinen die Form

$$g_1(x) = ax^2 e^{-\left(\frac{x-b}{c}\right)^2} \quad (22)$$

mit den Fit-Parametern a , b und c .

Im Verlauf der Arbeit tritt der Spezialfall von zusammengesetzten Geschwindigkeitsverteilungen mit zwei Subklassen auf. Diese Histogramme wurden durch die kombinierte Funktion

$$g_2(x) = a_1 x^2 e^{-\left(\frac{x-b_1}{c_1}\right)^2} + a_2 x^2 e^{-\left(\frac{x-b_2}{c_2}\right)^2} \quad (23)$$

mit analoger Parametrisierung angenähert.

Wenn im Folgenden von der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit die Rede ist sind die Maxima dieser Verteilungen gemeint. Die Verteilungen entsprechen der Form nach maxwell'schen Geschwindigkeitsverteilungen, wie sie für ideale Gase Gültigkeit haben [19]. Die Funktionen wurden gewählt, da sie die Form der Geschwindigkeitsverteilungen gut wiedergeben. Dies ist insofern zu erwarten, da die Trypanosomenbewegung Voraussetzungen für die Gültigkeit der Maxwellverteilung, wie die unabhängige Bewegung der Teilchen, erfüllt.

4.4.3.3 Bestimmung der Schwimmwinkel

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Arten von Schwimmwinkeln ausgewertet. Dies ist zum einen der Winkel zwischen zwei aufeinanderfolgenden Datenpunkten innerhalb einer Trajektorie, mit α_v oder als Schwimmwinkel bezeichnet, und zum anderen der Torsionswinkel $\alpha_{torsion}$ zwischen drei aufeinanderfolgenden Datenpunkten. Die Definitionen der Winkel sind in Abbildung 21 gezeigt.

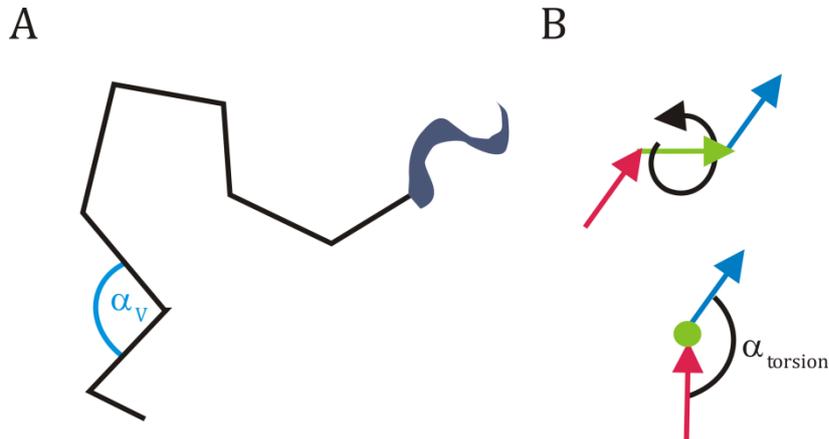


Abbildung 21: Definition des Schwimm- (A) und Torsionswinkels (B).

4.4.3.4 Ausbreitungsanalyse

Zur Analyse des Ausbreitungsverhaltens der Trypanosomen wurde die effektiv zurückgelegte Wegstrecke analysiert, dazu wurde über definierte Intervalle die Differenz von Start- und Endpunkt des Bewegungsabschnitts ausgewertet. Die jeweils benutzten Parameter sind bei der Darstellung der Ergebnisse gegeben. Eine schematische Darstellung der Vorgehensweise ist in Abbildung 22 gezeigt.

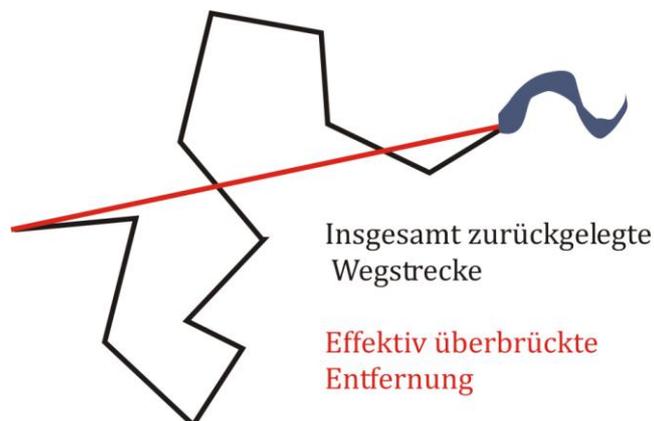


Abbildung 22: Ausbreitungsanalyse für Trypanosomenbewegung. In Schwarz ist der vom Trypanosom geschwommene Weg dargestellt, im rot die effektive Weglänge.

5 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen haben die quantitative Beschreibung des Schwimmverhaltens von *Trypanosoma brucei brucei* zum Ziel. Kenntnisse über das Motilitätsverhalten dieses Blutparasiten sind von großer Bedeutung für das Verständnis von zentralen Punkten wie Zellteilung und –migration und insbesondere zur Erklärung der Mechanismen, mittels derer der Organismus in der Lage ist die Immunantwort des infizierten Wirtes zu umgehen und sich somit effektiv in Organismus zu behaupten. Ein tiefgreifendes Verständnis der Fortbewegung ist also von zentraler Bedeutung für Modelle der Biologie und Pathogenität von Trypanosomen und für die Entwicklung von Antwortstrategien.

Ungeachtet ihrer Relevanz ist die Motilität von Trypanosomen noch immer wenig untersucht und entsprechend schlecht verstanden. Vorhandene Modelle widersprechen sich teilweise und geben kein klares Gesamtbild. Hier wird erstmalig eine quantitative Analyse der Motilität von *Trypanosoma brucei brucei* basierend auf dreidimensionalen Mikroskopiedaten mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung durchgeführt.

Die Untersuchung umfasst unterschiedliche Lebenszyklusstadien (Blutstromformen und prozyklische Insektenstadien trypanosomen) bei Raumtemperatur (22°C) und der für Blutstromformen physiologischen Temperatur von 37°C. Für die erhöhte Temperatur sind keine Prozyklendaten gezeigt, da die Zellen bei diesen Messbedingungen abstarben, was auf einen Hitzeschock zurückzuführen ist. Hierbei gilt es zu beachten, dass es sich bei den verwendeten Insektenstadien um die Fliegenmitteldarmform der Trypanosomen, also die sich vermehrende „Speicherform“ in der Fliege und nicht um die beim Stich in den Wirt übertragene metazyklische Form handelt. Die Temperaturpunkte wurden gewählt, da sie nahe dem physiologischen Optimum der untersuchten Lebenszyklusstadien (Blutstromformen bei 37°C bzw. Prozyklen bei 22°C) liegen und einen Vergleich mit klassischen Mikroskopiestudien [2, 17] erlauben.

In diesem Kapitel wird die Auswertung der oben genannten Datensätze gezeigt und das Motilitätsverhalten der Trypanosomen unter den verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen, um den Einfluss des Lebenszyklusstadiums und äußerer Parameter auf das Motilitätsverhalten zu verstehen. Die erhaltenen Ergebnisse werden anschließend mit Referenzsystemen verglichen und interpretiert.

Die bei den durchgeführten Messungen erhaltenen Trajektorien sind in Abbildung 23 für Blutstromformen bei Raumtemperatur (22°C), in Abbildung 24 für Blutstromformen bei 37°C und in Abbildung 25 für Prozyklen bei Raumtemperatur dargestellt.

Alle hier gezeigten Datensätze wurden jeweils über einen Zeitraum von 8,3 Minuten (500 s) aufgenommen. Individuelle Mikroschwimmer sind farbkodiert. Die effektiv zur Auswertung der Daten genutzte Bildwiederholungsrate entspricht 0,5 Hz. Diese Wahl wurde getroffen, da sich Werte in dieser Größenordnung bei 2D-

Mikroskopieuntersuchungen als sinnvoll herausgestellt haben. Die Trypanosomen bewegen sich so zwischen zwei ausgewerteten Aufnahmen ungefähr um eine Körperlänge vorwärts.

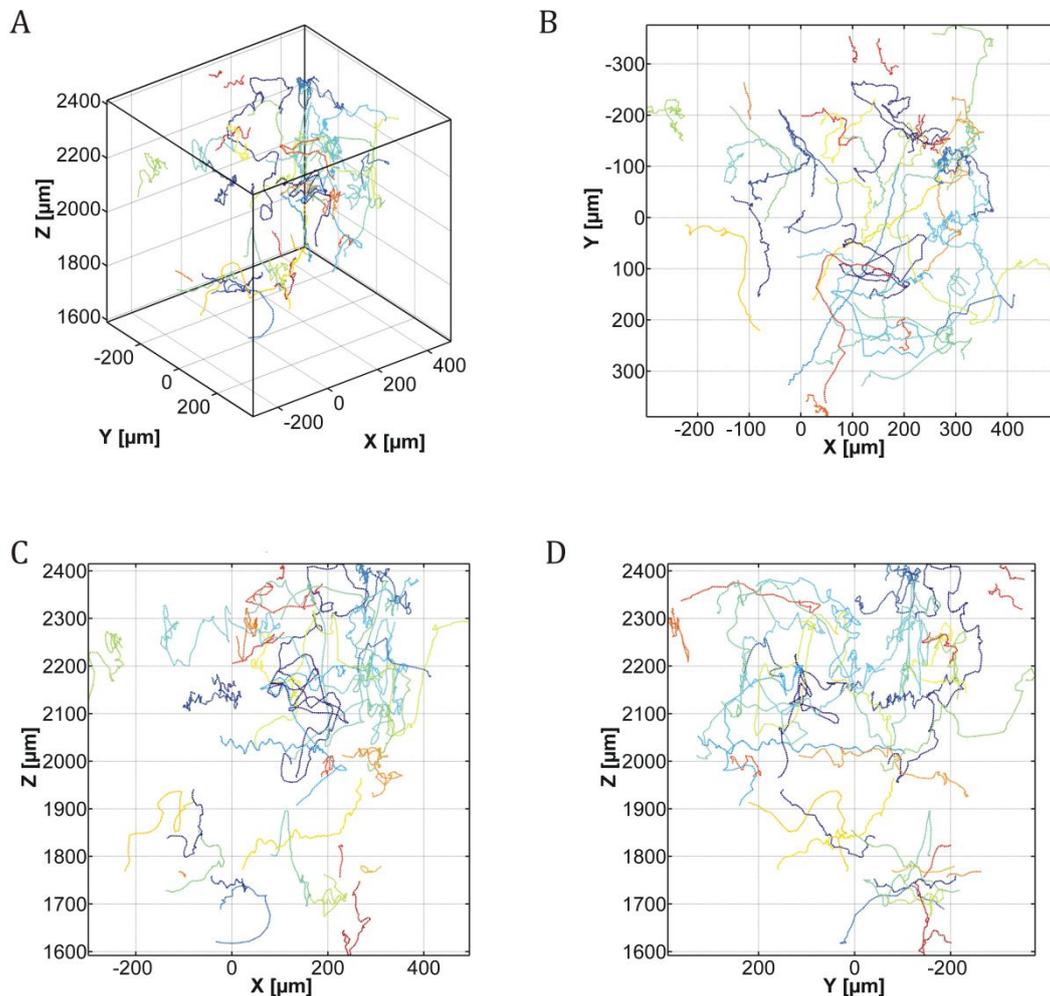
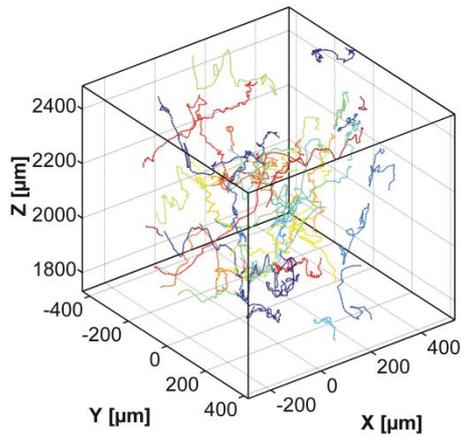
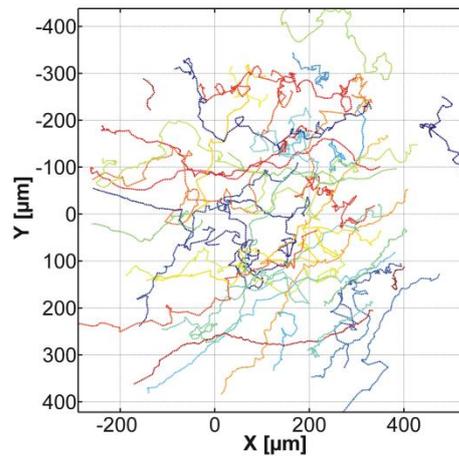


Abbildung 23: Trajektorien von Blutstromformtrypanosomen (Zelllinie MiTat 1.6) bei 22°C. Gezeigt sind eine 3D-Ansicht (A) sowie die XY- (B), XZ- (C) und YZ-Ebenenprojektionen (D). Die Farbkodierung unterscheidet einzelne Zellen.

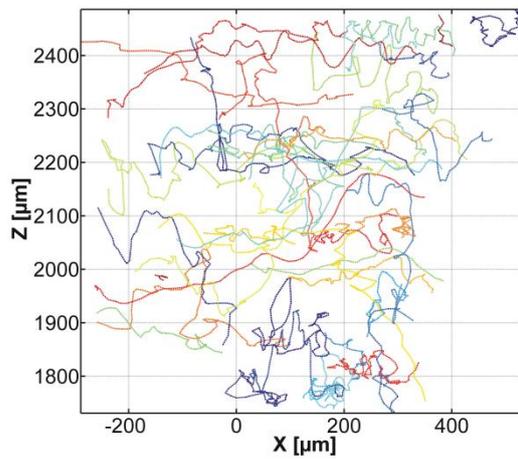
A



B



C



D

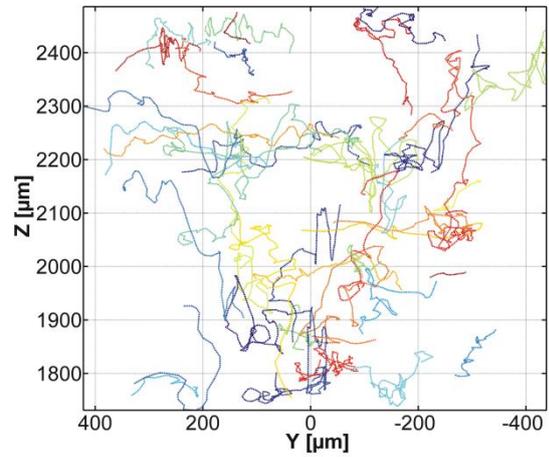


Abbildung 24: Trajektorien von Blutstromformtrypanosomen (Zelllinie MiTat 1.6) bei 37°C. Gezeigt sind eine 3D-Ansicht (A) sowie die XY- (B), XZ- (C) und YZ-Ebenenprojektionen (D). Die Farbkodierung unterscheidet einzelne Zellen.

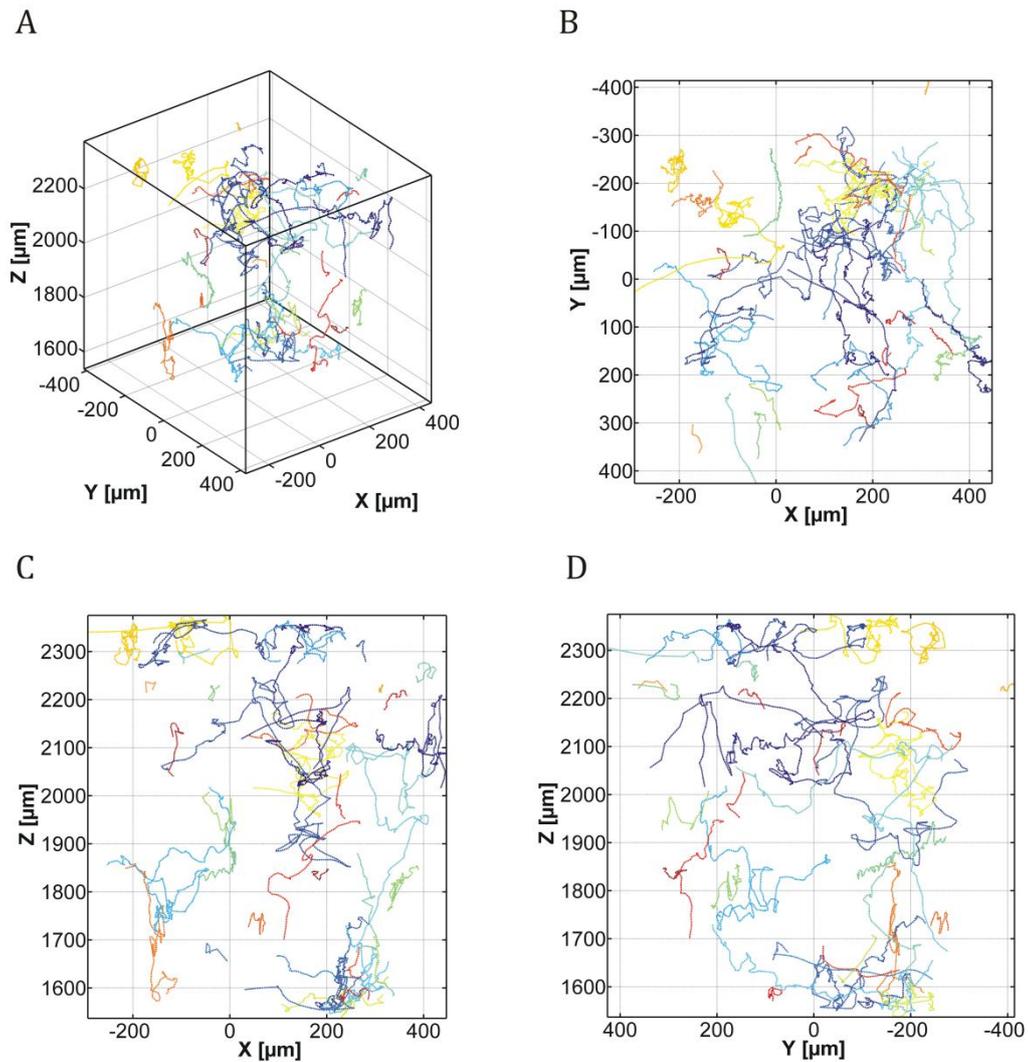


Abbildung 25: Trajektorien von prozyklischen Trypanosomen (Insektenstadium) der Zelllinie 29-13 bei 22°C. Gezeigt sind eine 3D-Ansicht (A) sowie die XY- (B), XZ- (C) und YZ-Ebenenprojektionen (D). Die Farbkodierung unterscheidet einzelne Zellen.

5.1 Geschwindigkeitsanalyse

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der Analyse der Schwimgeschwindigkeiten von Blutstromform- und Insektenstadienrypanosomen unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen.

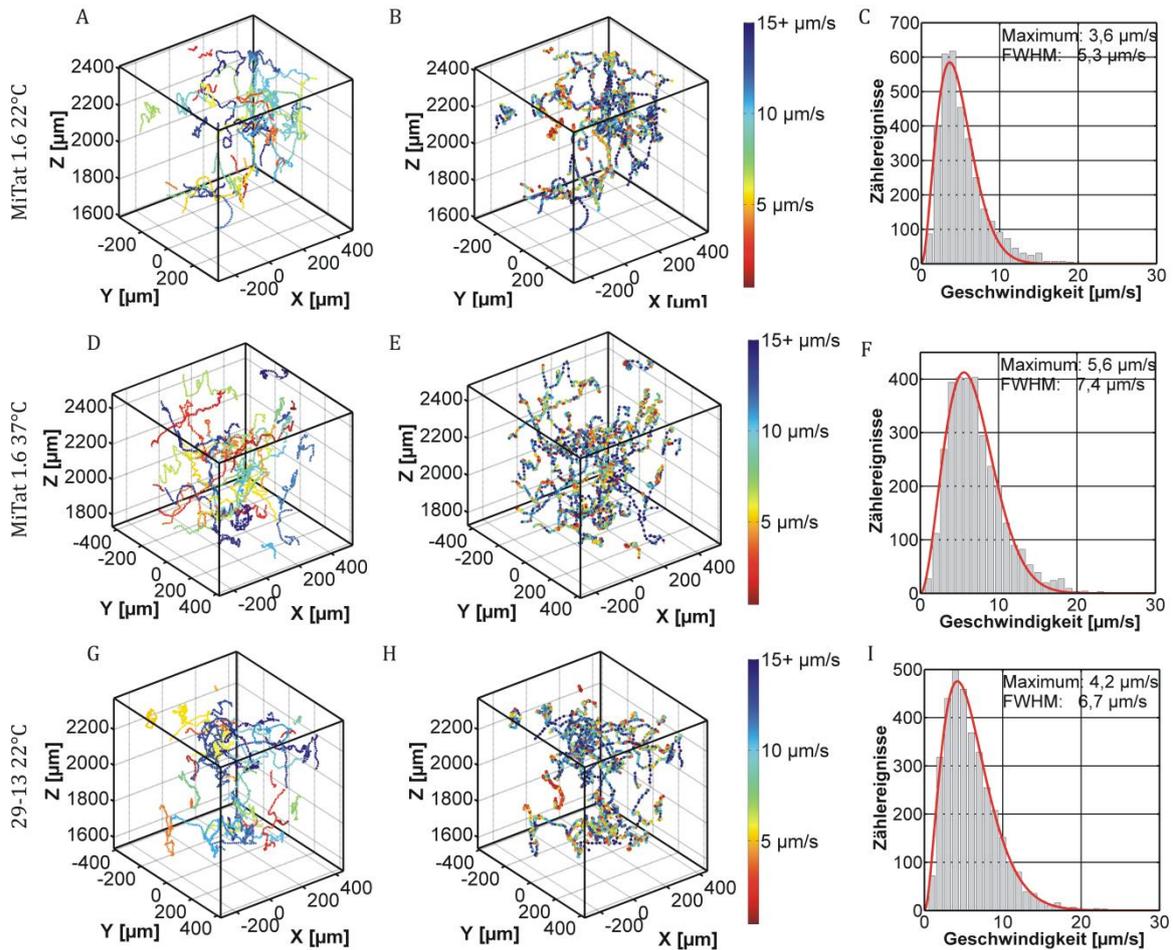


Abbildung 26: Übersicht Trajektorien und Geschwindigkeitsverteilungen für MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei Raumtemperatur (A-C), 37°C (D-F) und 29-13-Datensätze (G-I) (Prozyklen, Insektenstadium). Gezeigt sind jeweils 3D-Darstellungen der Trajektorien ohne (A, D, G) und mit farbkodierter Schwimgeschwindigkeit (B, E, H) sowie jeweils die Geschwindigkeitsverteilungen über den gesamten Datensatz (C, F, I). Die Farbkodierung in den Teilabbildungen B, E und H entspricht der gezeigten Skala, wobei Geschwindigkeiten von 15 μm/s und darüber aufgrund ihres seltenen Vorkommens in einem gemeinsamen Bin zusammengefasst sind.

In Abbildung 26 sind die in der Einleitung des Kapitels gezeigten Datensätze nochmals dargestellt, allerdings sind hier die Trajektorien zusätzlich mit einer geschwindigkeitsbasierten Farbkodierung gezeigt (Abbildung 26 B, E und H). Hierbei wurde eine graduelle Farbskala verwendet, die über rot, für kleine Geschwindigkeiten nach grün für mittlere und blau für hohe Geschwindigkeiten verläuft. Da hohe

Schwimmgeschwindigkeiten über 15 $\mu\text{m/s}$ nur sehr selten vorkommen, die Farbskala aber mit einem gleichbleibenden Inkrement zwischen der minimalen und maximalen vorkommenden Geschwindigkeit skaliert, wurden Geschwindigkeit über 15 $\mu\text{m/s}$ in einem bin zusammengefasst. Durch diese Darstellung wird eine bessere Unterscheidbarkeit der Geschwindigkeiten im stark populierte Bereich zwischen 0 $\mu\text{m/s}$ und 15 $\mu\text{m/s}$ erzielt. Die einzelnen Datensätze setzen sich typischerweise aus ca. 50 Einzeltrajektorien zusammen und umfassen ca. 3500 Datenpunkte.

Zusätzlich zur Darstellung der Trajektorien sind die Geschwindigkeitsverteilungen über jeweils alle Trajektorien des Datensatzes mit den in Kapitel 4.4.3.2 gegebenen Fitfunktionen dargestellt. Hierbei ist zu beachten, dass als charakteristische Größe jeweils das Maximum der Geschwindigkeitsverteilung angegeben ist und nicht der Mittelwert der Geschwindigkeit. Die Kenngröße ist also die wahrscheinlichste Geschwindigkeit. Ihr Wert unterscheidet sich aufgrund der Asymmetrie der Fitfunktion vom Mittelwert.

Aus den in Abbildung 26 gezeigten Geschwindigkeitsverteilungen gehen verschiedene wahrscheinlichste Geschwindigkeiten hervor. Entsprechend der Erwartung wird für die Blutstromformen bei Raumtemperatur mit 3,6 $\mu\text{m/s}$ eine geringere Geschwindigkeit als bei ihrer physiologischen Optimaltemperatur mit 5,6 $\mu\text{m/s}$ beobachtet. Für die prozyklischen Trypanosomen wird eine dazwischenliegende Geschwindigkeit von 4,2 $\mu\text{m/s}$ beobachtet.

		Wahrscheinlichste Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	Halbwertsbreite (FWHM) [$\mu\text{m/s}$]	Mittlere Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	Standard- abweichung der Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	Standardabweichung des Mittelwerts [$\mu\text{m/s}$]
MiTat	1.6	3,60	5,30	4,77	3,10	0,05
22°C						
MiTat	1.6	5,60	7,40	6,60	3,53	0,06
37°C						
29-13	22°C	4,20	6,70	5,50	3,31	0,20

Tabelle 2: Vergleich der Ensemblegeschwindigkeiten für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C sowie prozyklische Trypanosomen (29-13, Insektenstadien).

Tabelle 2 zeigt einen Vergleich der wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten, der Halbwertsbreiten der Verteilungen sowie der Geschwindigkeitsmittelwerte mit den Standardabweichungen der Verteilungen und der Mittelwerte. Aus diesen Werten gehen zwar Unterschiede im Motilitätsverhalten hervor, ihre Ursache ist jedoch nicht direkt ersichtlich. Die Trajektorien in den Übersichtsdarstellungen (Abbildung 26 A, D und G) ähneln sich über alle Datensätze hinweg stark. Sie zeigen typischerweise stochastische Schwimmuster, ohne einen auffälligen Vorzug für eine ausgewiesene Bewegungsrichtung. Der Informationsgehalt der Trajektorien lässt sich erweitern, indem die Geschwindigkeitsinformation als Farbkodierung verwendet wird (vgl. Abbildung 26 B,

E und H). Eine genaue Analyse dieser Darstellungsform zeigt, dass in allen Datensätzen drei unterschiedliche Typen von Trajektorien beobachtet werden können. Diese sind schematisch in Abbildung 27 dargestellt.

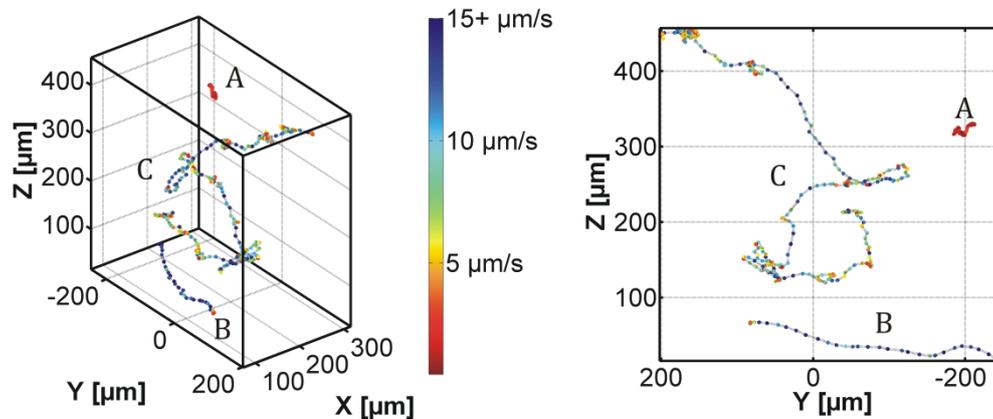


Abbildung 27: Beispiele der in allen Datensätzen beobachteten Schwimmuster. A) Taumeln, B) gerichtetes Schwimmen, C) Abwechselndes Auftreten der Schwimmuster A und B. Die Schwimmgeschwindigkeiten sind gemäß der gegebenen Skala farbkodiert. Zur besseren Übersicht sind die Trajektorien in relativen Koordinaten dargestellt.

Die unterscheidbaren Schwimmuster besitzen folgende Charakteristika: Erstens, auf der Stelle taumelnde Zellen, ohne große Nettobewegung (Abbildung 27 A), im Folgenden als Taumler bezeichnet. Dieser Typ zeigt sehr geringe Schwimmgeschwindigkeiten und häufige Richtungsänderungen. Zweitens, gerichtet, mit hoher Geschwindigkeit schwimmende Trypanosomen, im Folgenden als Schwimmer bezeichnet (Abbildung 27 B). Diese Trajektorien zeichnen sich neben hohen Schwimmgeschwindigkeiten durch eine stark ausgeprägte Linearität aus. Drittens, Mikroschwimmer, die abwechselnd langsam und schnell schwimmen (Abbildung 27 C) und dem Anschein nach abwechselnd das Verhalten der Fälle A (Taumler) und B (Schwimmer) zeigen. Der letztgenannte Fall wird am häufigsten beobachtet (ca. 80% der Trajektorien), wohingegen die Extremfälle seltener vorkommen.

Vor allem die Klasse von abwechselnd langsam und schnell schwimmenden Trypanosomen scheint sehr interessant und durch ihr häufiges Auftreten besonders relevant für das Motilitätsverhalten zu sein. Sie wurde daher näher untersucht. Schon bei der Betrachtung mit dem Auge fällt auf, dass diese Trajektorien langsame (rote Farbkodierung) und schnelle (grüne bis blaue Farbkodierung) Bereiche zeigen, der Geschwindigkeitsbereich um 5 µm/s (gelbe Farbkodierung) aber vergleichsweise selten auftritt (vgl. Abbildung 28 A, C und E). Es wechseln sich also Phasen ab, die den in Abbildung 27 gezeigten Schwimmern und Taumlern ähneln. Die Phasen weisen variable Längen auf, umfassen aber typischerweise mehr als 5 Datenpunkte. Die Beobachtung des Umschaltens zwischen Schwimmen und Taumeln wird durch die Auswertung von Geschwindigkeitsverteilungen gestützt (vgl. Abbildung 28 B, D und F). Im Gegensatz zu

den Ensemblesgeschwindigkeitsverteilungen in Abbildung 26, die jeweils über ein einzelnes klar definiertes Maximum verfügen, treten hier Verteilungen mit zwei Maxima und einem charakteristischen Minimum im Bereich von $5 \mu\text{m/s}$ auf.

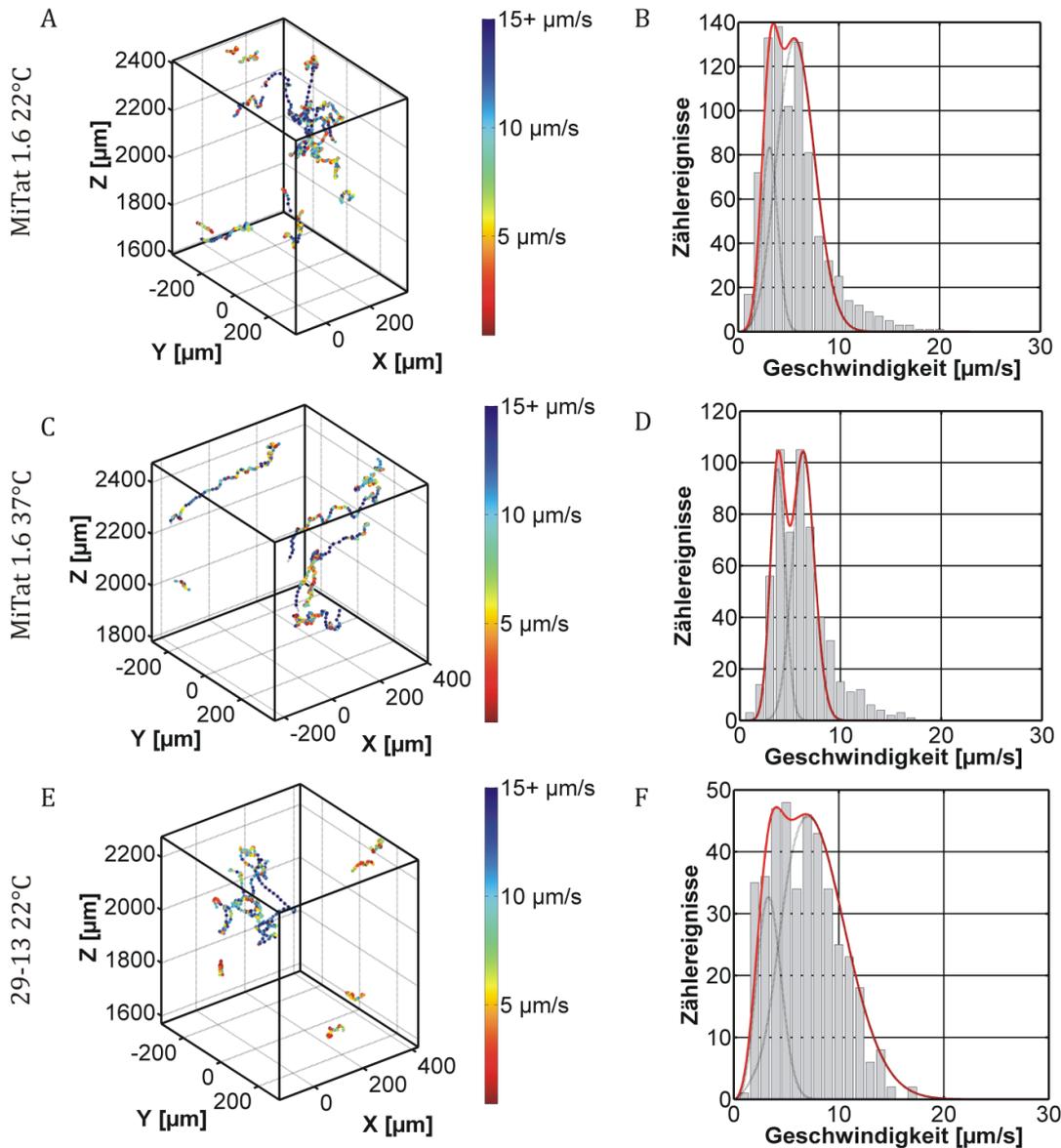


Abbildung 28: Analyse schaltender Organismen für Blutstromformtrypanosomen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, B) und 37°C (C, D) sowie prozyklische Insektenstadienrypanosomen der Zelllinie 29-13 (E, F). Gezeigt sind jeweils nach Geschwindigkeiten farb-kodierte Trajektorien (A, C, E) sowie die zugehörigen Geschwindigkeitsverteilungen (B, D, F). Die rote Linie in den Teilabbildungen B, D und F entspricht der Fitfunktion mit zwei Maxima, die in Kapitel 4.4.3.2 eingeführt wurde. Für alle Datensätze wird das lokale Minimum der Fitfunktion im Bereich von $5 \mu\text{m/s}$ beobachtet, weshalb dieser Wert für die weitere Analyse als Abgrenzung der beiden Schwimmzustände „Schwimmer“ und „Tausler“ gewählt wurde.

Basierend auf diesen Beobachtungen lässt sich folgendes Modell postulieren: Es existieren zwei Schwimmmodi, nämlich der oben beschriebene Schwimmer- sowie der

Taunlermodus. Beobachtete Segmente entsprechen weitestgehend den beobachteten Taunler- und Schwimmerzuständen. Diese beiden Modi führen zur Ausbildung der drei beschriebenen Schwimmuster (vgl. Abbildung 27). Der Geschwindigkeitsschwellenwert zur Unterscheidung des Schwimmer- und Taunlermodus liegt bei $5 \mu\text{m/s}$. Dieser Zahlenwert wird durch klassische Mikroskopiestudien von Niko Heddergott (Universität Würzburg) bestätigt [2].

Unter Benutzung des $5 \mu\text{m/s}$ -Kriteriums lassen sich binär farbkodierte Trajektoriendarstellungen anfertigen, die in schaltenden Trajektorien beide Phasen kennzeichnen. Repräsentative, schematische Darstellungen je einer so farbkodierter Schwimmer- und Taunler- sowie einer schaltenden Trajektorie sind in Abbildung 29 gezeigt.

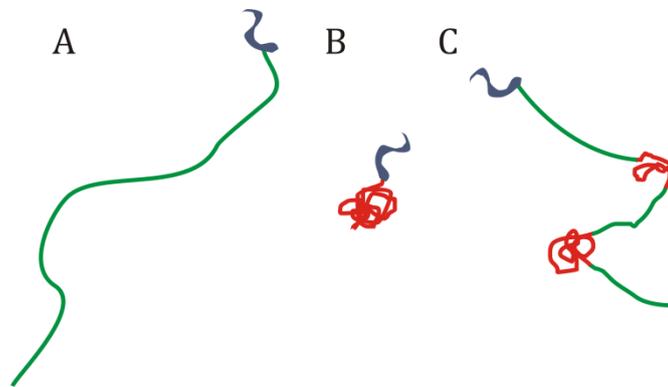


Abbildung 29: Schematische Darstellung der beobachteten Schwimmzustände A) Schwimmer, B) Taunler und C) zwischen beiden Modi umschaltendes Trypanosomen mit binärer Farbkodierung nach dem zuvor abgeleiteten $5 \mu\text{m/s}$ -Kriterium. Hierbei entsprechen grüne Abschnitte Schwimmgeschwindigkeiten von über $5 \mu\text{m/s}$ (Schwimmer) und rote Abschnitte Schwimmgeschwindigkeiten von unter $5 \mu\text{m/s}$ (Taunler).

In Abbildung 30 bis Abbildung 32 sind Trajektorien der drei Schwimmzustände mit binärer Farbkodierung für alle drei Datensätze dargestellt.

Abbildung 30 zeigt die Klasse der Schwimmer. Gezeigt ist je eine Beispieltrajektorie pro Datensatz. Die Geschwindigkeitsverteilungen sind typischerweise relativ breit (Halbwertsbreiten vom $5 \mu\text{m/s}$ bis zu über $10 \mu\text{m/s}$) und zeigen in Übereinstimmung mit den bekannten 2D-Daten wahrscheinlichste Geschwindigkeiten im Bereich um $9 \mu\text{m/s}$, also deutlich über dem Schwellenwert von $5 \mu\text{m/s}$. Änderungen der Schwimmrichtung kommen selten vor, doch wenn sie beobachtet werden, treten sie in Form langgezogener Kurven und nicht als schlagartige Richtungswechsel auf. Die Direktionalität bleibt also relativ hoch. Im Gegensatz dazu stehen die in Abbildung 31 gezeigten Taunler. Die Schwimmgeschwindigkeiten sind klein (ca. $2\text{-}4 \mu\text{m/s}$) und die Geschwindigkeitsverteilungen mit Halbwertsbreiten von ca. $2\text{-}5 \mu\text{m/s}$ sehr schmal. Im Vergleich zu den Schwimmern, sind die Trajektorien unruhiger, d.h. sie zeigen viele kleine Richtungswechsel und keine ausgeprägte Direktionalität. Der Fall, der in der Mehrzahl der

Trajektorien vorliegt, ist in Abbildung 32 gezeigt. Hier liegen die wahrscheinlichsten Schwimmgeschwindigkeiten zwischen den beiden zuvor beschriebenen Fällen. Das bedeutet Schwimmgeschwindigkeiten im Bereich von 5-7 $\mu\text{m/s}$ und Halbwertsbreiten um 7 $\mu\text{m/s}$.

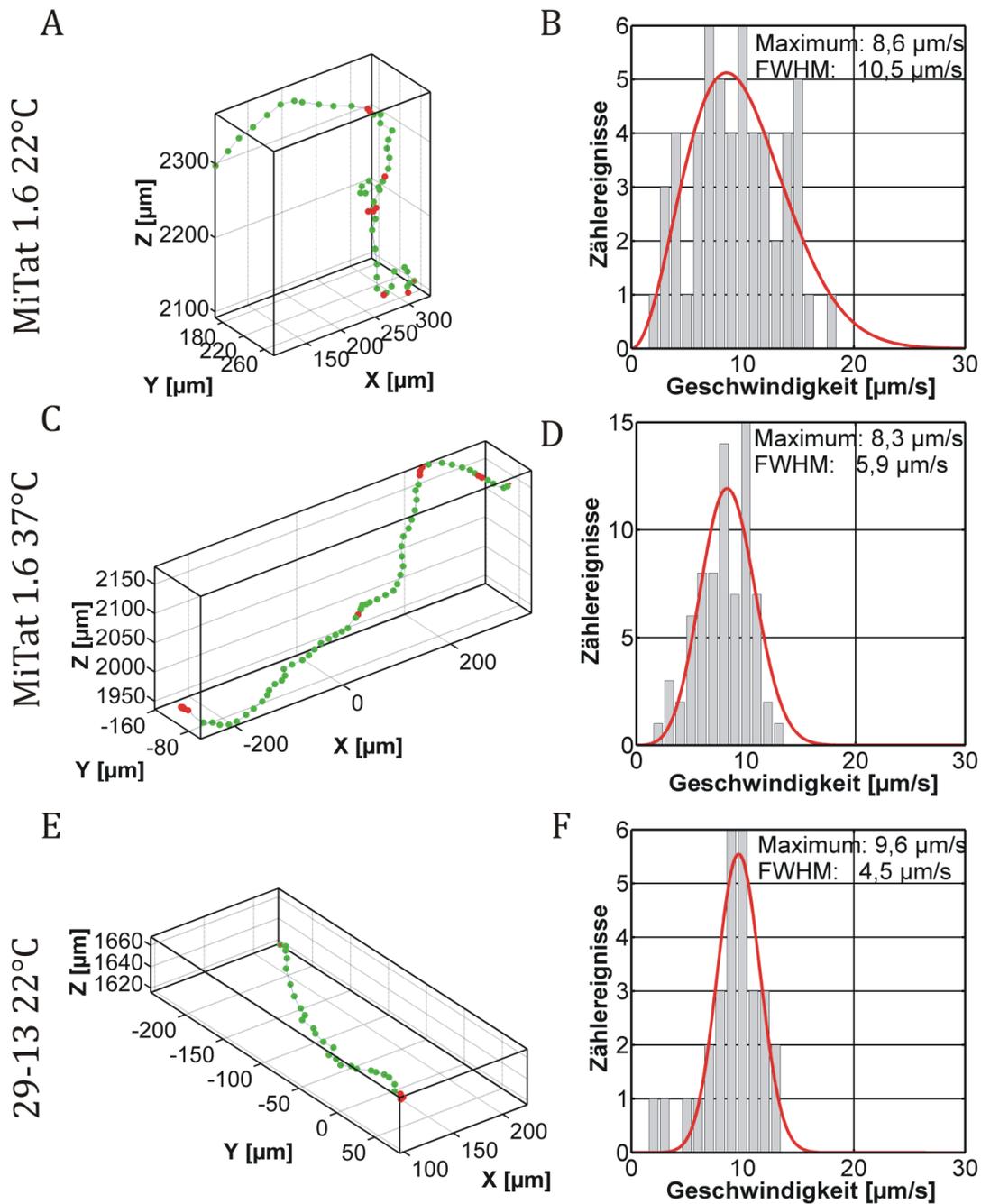


Abbildung 30: Beispiele für beobachtete Schwimmmodi – Schwimmer. Gezeigt sind geschwindigkeitskodierte Trajektorien (A, C, E), Geschwindigkeiten über 5 $\mu\text{m/s}$ sind grün, Geschwindigkeiten unter 5 $\mu\text{m/s}$ rot dargestellt. B, D, und F zeigen die zugehörigen Geschwindigkeitshistogramme. Gezeigt ist je ein Beispiel pro Parametersatz. A, B) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 22°C. C, D) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 37°C. E, F) Prozyklen, der Zelllinie 29-13 (Insektenstadium).

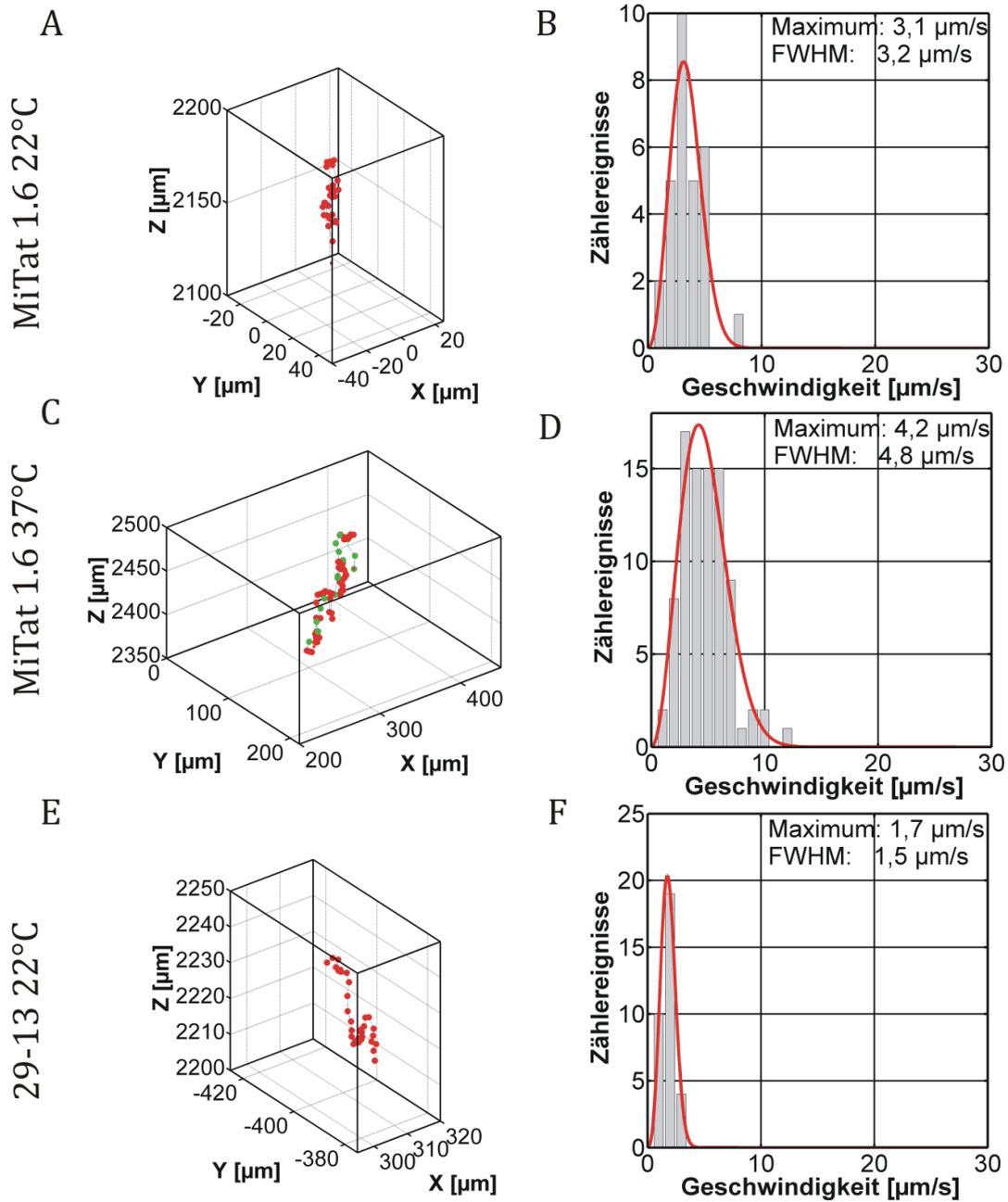


Abbildung 31: Beispiele für beobachtete Schwimmmodi – Taumler. Gezeigt sind geschwindigkeitskodierte Trajektorien (A, C, E), Geschwindigkeiten über 5 µm/s sind grün, Geschwindigkeiten unter 5 µm/s rot dargestellt. B, D, und F zeigen die zugehörigen Geschwindigkeitshistogramme. Gezeigt ist je ein Beispiel pro Parametersatz. A, B) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 22°C. C, D) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 37°C. E, F) Prozyklen, der Zelllinie 29-13 (Insektenstadium).

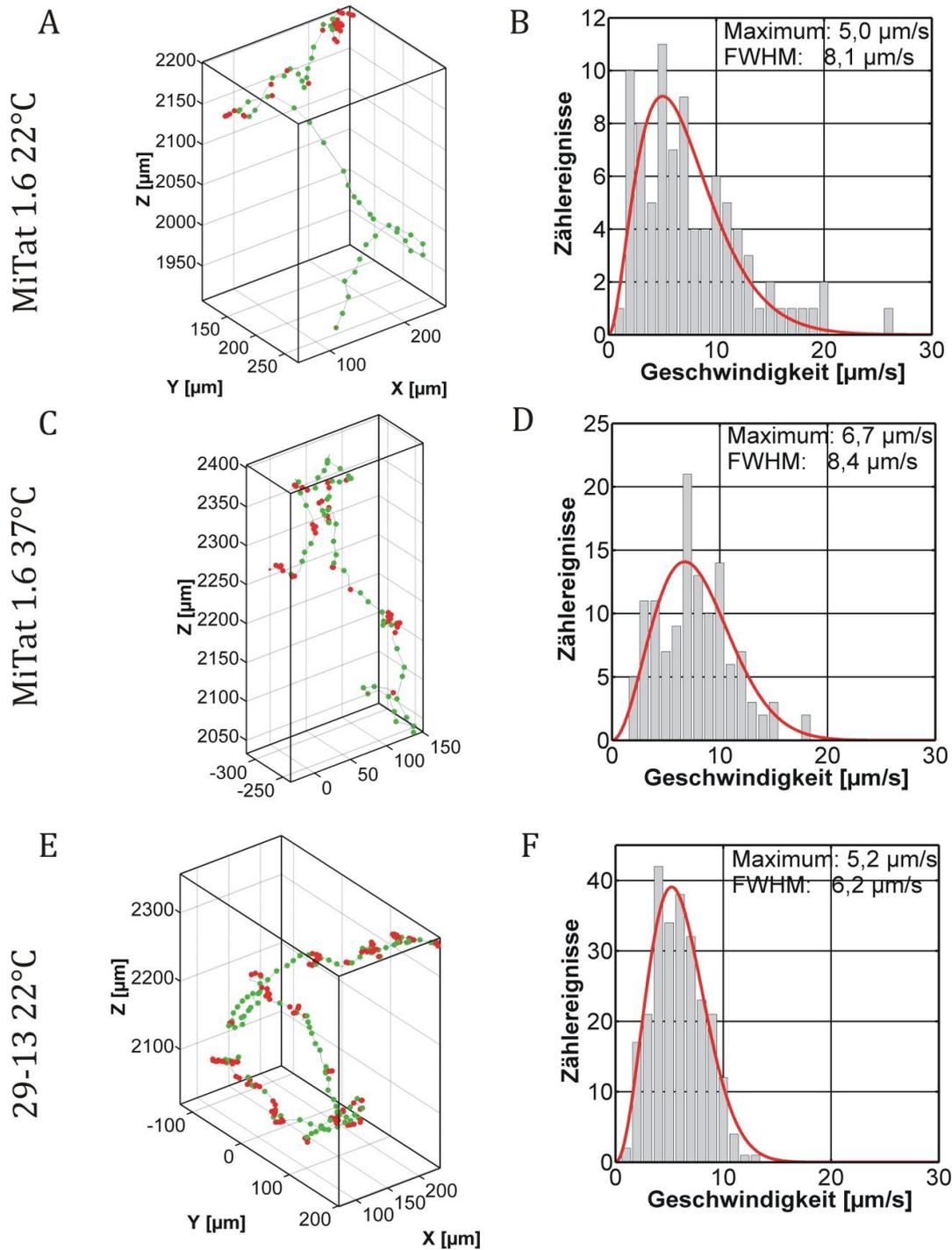


Abbildung 32: Beispiele für beobachtete Schwimmmodi – Umschaltende Trajektorien. Gezeigt sind geschwindigkeitskodierte Trajektorien (A, C, E), Geschwindigkeiten über $5 \mu\text{m/s}$ sind grün, Geschwindigkeiten unter $5 \mu\text{m/s}$ rot dargestellt. B, D, und F zeigen die zugehörigen Geschwindigkeitshistogramme. Gezeigt ist je ein Beispiel pro Parametersatz. A, B) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 22°C . C, D) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 37°C . E, F) Prozyklen, der Zelllinie 29-13 (Insektenstadium).

5.1.1 Segmentierung von schaltenden Trajektorien

Das Verhalten der umschaltenden Organismen soll im Weiteren genauer untersucht werden, es ist daher in Abbildung 33 anhand zweier Beispiele nochmals detailliert dargestellt. Gezeigt sind jeweils einzelne Trajektorien, in denen das Umschalten zwischen den beiden grundlegenden Schwimmmodi auftritt. Die Trajektorien werden mit einem Geschwindigkeits-Zeit-Diagramm („vt-Diagramm“) korreliert, in dem der Geschwindigkeitsschwellenwert von $5 \mu\text{m/s}$ als rote Linie dargestellt ist (Abbildung 33 B und D). Aus der Abbildung bestätigt sich der schon in Abbildung 32 gewonnene Eindruck, dass die, der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit nach, intermediären Trajektorien von Organismen stammen, die zwischen Schwimmen und Taumeln umschalten und keine eigene, intermediäre Spezies darstellen. Schwimm- und Taumelphasen sind durch grüne bzw. rote Doppelpfeile und entsprechende Nummerierung gekennzeichnet. Die Phasen sind im Verlauf des vt-Diagramms deutlich erkennbar.

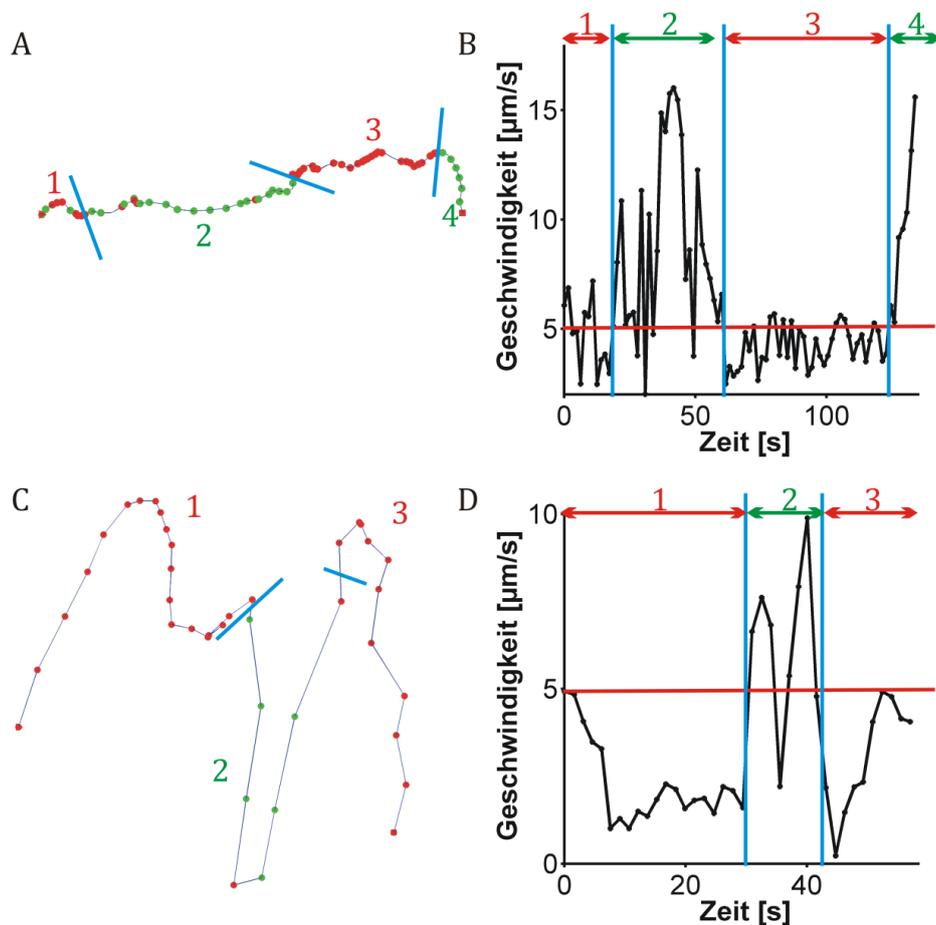


Abbildung 33: Beispiele für das Umschaltverhalten innerhalb einzelner Trajektorien. In den Teilabbildungen A und C sind Projektionen zweier Beispieltrajektorien gezeigt, wobei zugunsten der Klarheit der Darstellung auf das Koordinatensystem verzichtet wurde. Die Teilabbildungen C und D zeigen die zugehörigen Geschwindigkeit-vs.-Zeit-Diagramme (vt-Diagramme). Identische Zeitabschnitte in Trajektorien und Diagrammen sind durch die Zuordnung von Zahlen gekennzeichnet.

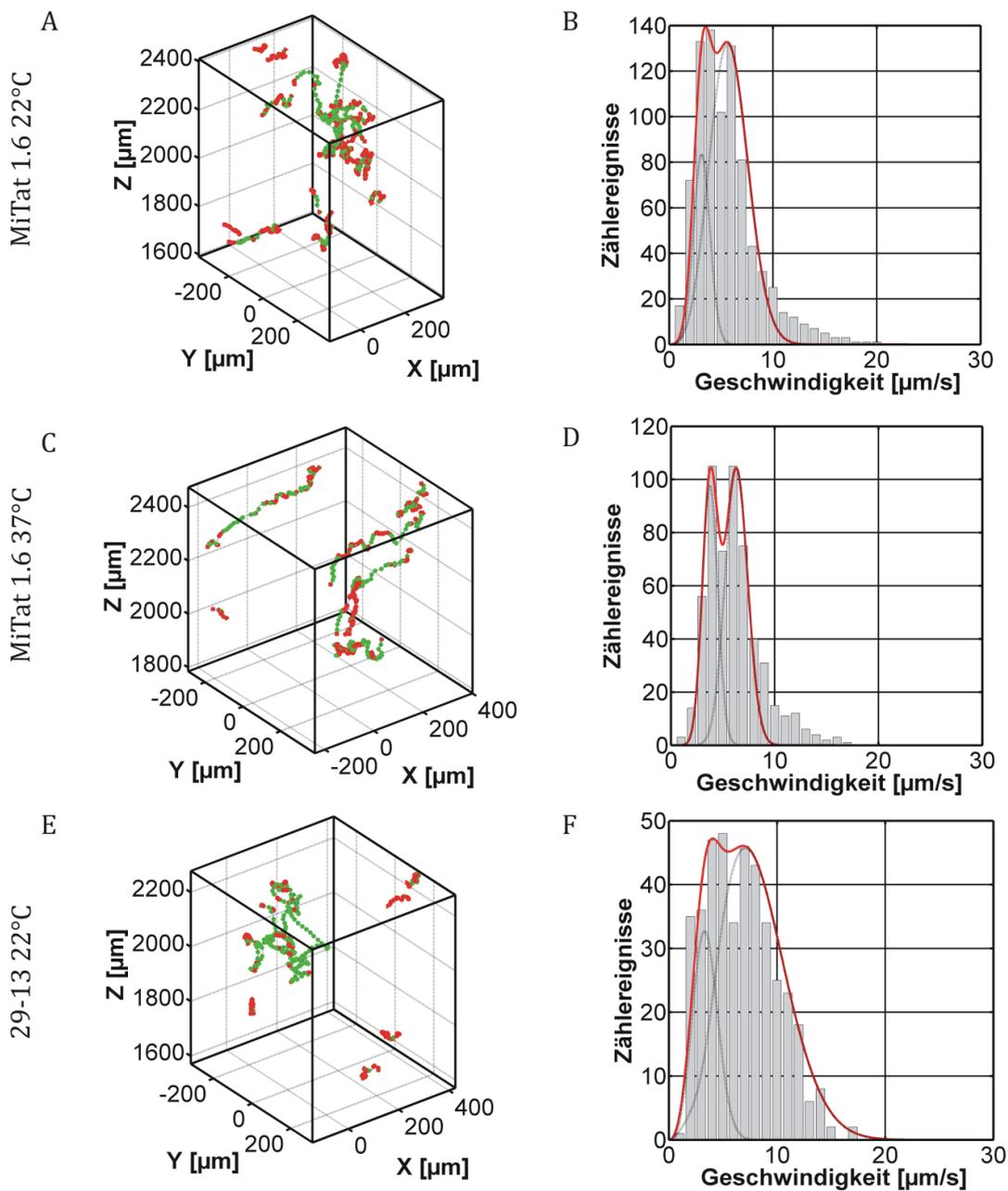


Abbildung 34: Bimodale Trajektorien und ihre Geschwindigkeitsverteilungen für Blustromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, B) und 37°C (C, D) und Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, E, F).

Abbildung 34 zeigt nochmals jeweils die Subpopulationen dieser Trajektorien in den hier betrachteten Datensätzen, diesmal allerdings mit der binären Farbkodierung. Aufgrund der charakteristischen Geschwindigkeitsverteilung mit zwei Maxima werden diese Trajektorien im Folgenden als bimodale Trajektorien bezeichnet.

Eine Segmentierung dieser Trajektorien in Schwimmer- und Taumlersegmente, die einen Vergleich mit den reinen Schwimmer- und Taumlertrajektorien erlaubt, liegt nahe. Die Segmentierung erfolgt hier manuell und auf Basis der geschwindigkeitskodierten

Trajektorien. Ihr liegt eine Reihe von Kriterien zugrunde. Als allgemeinstes Kriterium wurde eine minimale Segmentlänge von 4 Datenpunkten (ca. 6 s) festgesetzt, um den Einfluss von Ausreißern zu minimieren. Als Schwimmphasen wurden solche Segmente gewertet, die sich durch eine hohe Direktionalität bei gleichzeitig hoher Schwimmgeschwindigkeit auszeichnen ($>5 \mu\text{m/s}$). Der Klasse der Taumler wurden Segmente zugeordnet, die kleine Geschwindigkeiten ($<5 \mu\text{m/s}$) in Verbindung mit einer sehr gering ausgeprägten Direktionalität, d.h. viele Richtungsänderungen und „unruhiges“ Schwimmverhalten, zeigen. Eine schematische Darstellung des Vorgehens ist in Abbildung 35 gegeben.

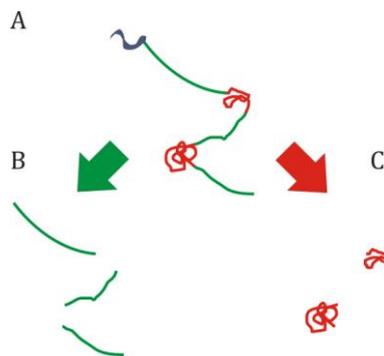


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Segmentierung: Die schaltende Trajektorie (A) wird in Schwimmer- (B) und Taumlersegmente (C) unterteilt.

Um diese Geschwindigkeitsinformationen zu interpretieren und zu validieren, ist eine Referenz notwendig. Hier wurden die jeweils schnellsten und langsamsten ca. 10% der Trajektorien jedes Datensatzes gewählt und den Extremfällen Schwimmer bzw. Taumler zugeordnet. Alle als Referenz genutzten Schwimmertrajektorien weisen wahrscheinlichste Geschwindigkeiten deutlich über $5 \mu\text{m/s}$ auf, Taumler darunter.

Eine detaillierte Darstellung der segmentierten Daten, der Referenzierung auf die Schwimmer- und Taumlertrajektorien sowie der resultierenden Geschwindigkeitsverteilungen ist in Anhang A (Kapitel 8.1) gegeben. Bei der Segmentierung ließen sich insgesamt 92,2% der Segmente eindeutig der Schwimmer- oder Taumlerklasse zuordnen. Die nicht eindeutig zuzuordnenden 7,8% der Segmente wurden bei den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Ein tabellarischer Vergleich der Segmentgeschwindigkeiten mit den Schwimmer- und Taumlertrajektorien ist in Tabelle 3 gezeigt. Aufgeführt sind die wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten, Geschwindigkeitsmittelwerte und zugehörigen Fehlerabschätzungen.

Die wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten für Taumler bewegen sich im Bereich von $(2,5-4,7) \mu\text{m/s}$, für Schwimmer liegen sie im Bereich von $(6,7-8,5) \mu\text{m/s}$. Die mittleren Geschwindigkeiten sind im Allgemeinen größer als die wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten, wobei der Effekt für die Schwimmerklasse stärker ausgeprägt ist, als für die Taumlerklasse.

Die Beobachtung höherer mittleren als wahrscheinlicher Geschwindigkeiten lässt sich durch die Asymmetrie der Geschwindigkeitsverteilung, d.h. die in den Histogrammen auftretende Schulter hin zu größeren Geschwindigkeiten, erklären. Die Tatsache, dass der Effekt für die Schwimmer stärker ausgeprägt ist als für die Taumler, erschließt sich aus einem Vergleich der Halbwertsbreiten der Geschwindigkeitsverteilungen. Die Zahlenwerte bestätigen den optischen Eindruck aus Abbildung 69 (Anhang A), dass die Verteilungen für die Schwimmerklasse breiter sind und die Asymmetrie stärker ausgeprägt ist.

	Wahrscheinlichste Geschwindigkeit [µm/s]	Halbwertsbreite (FWHM) [µm/s]	Mittlere Geschwindigkeit [µm/s]	Standard- abweichung der Geschwindigkeit [µm/s]	Standardabweichung des Mittelwerts [µm/s]
Schwimmertrajektorien MiTat 1.6 22°C	7,10	9,90	8,30	4,13	0,28
Schwimmersegmente bimodal MiTat 1.6 22°C	6,70	7,40	7,82	3,85	0,12
Taumlertrajektorien MiTat 1.6 22°C	2,70	3,20	2,79	1,67	0,07
Taumlersegmente bimodal MiTat 1.6 22°C	3,60	4,60	3,92	2,21	0,12
Schwimmertrajektorien MiTat 1.6 37°C	8,50	9,40	9,37	4,20	0,27
Schwimmersegmente bimodal MiTat 1.6 37°C	6,80	6,50	7,18	3,26	0,20
Taumlertrajektorien MiTat 1.6 37°C	4,00	5,30	4,53	2,66	0,13
Taumlersegmente bimodal MiTat 1.6 37°C	4,70	4,20	4,56	2,14	0,16
Schwimmertrajektorien 29-13 22°C	8,10	8,50	8,29	3,78	0,21
Schwimmersegmente bimodal 29-13 22°C	8,40	7,90	8,34	3,25	0,20
Taumlertrajektorien 29-13 22°C	2,50	3,60	3,51	2,51	0,11
Taumlersegmente bimodal 29-13 22°C	3,60	3,70	4,19	2,90	0,27

Tabelle 3: Vergleich der Schwimmgeschwindigkeiten der Schwimmer- und Taumlersegmente mit den Schwimmer- und Taumlertrajektorien.

Desweiteren zeigt der Vergleich von Trajektorien und Segmenten derselben Klasse innerhalb der jeweiligen Datensätze gute Übereinstimmungen, d.h. die Abweichungen der mittleren und wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten zwischen Schwimmer- und Taumlertrajektorien und -segmenten sind klein. Die gute Übereinstimmung bestätigt, dass die Parameter für die Segmentierung sinnvoll gewählt wurden.

Generell wird beobachtet, dass die Standardabweichungen des Mittelwerts klein ausfallen. Sie liegen im Bereich von (0,07-0,28) $\mu\text{m/s}$ für Werte zwischen 2,79 $\mu\text{m/s}$ und 9,37 $\mu\text{m/s}$, d.h. im Bereich von ca. (3-7)%. Auffällig ist, dass der Geschwindigkeitsunterschied zwischen den beiden Klassen für das Insektenstadium am größten ist. Die Differenzen zwischen Trajektorien bzw. Segmenten der beiden Klassen betragen für Blustromformen (MiTat 1.6) bei 22°C 4,4 $\mu\text{m/s}$ bzw. 3,1 $\mu\text{m/s}$, bei 37°C 4,5 $\mu\text{m/s}$ bzw. 2,1 $\mu\text{m/s}$. Im Vergleich dazu liegen sie bei Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadien) mit 5,6 $\mu\text{m/s}$ für Trajektorien bzw. 4,8 $\mu\text{m/s}$ für Segmente wesentlich höher.

Aus Tabelle 3 wird auch ein erster Hinweis auf die beobachtete intermediäre Ensemblegeschwindigkeit der Insektenstadien-trypanosomen ersichtlich, da sich die Geschwindigkeiten für die Schwimmerklassen sehr gut mit den Werten, die für Blutstromformen bei 37°C erhalten werden vergleichen, wohingegen die für die Taumlerklassen bestimmten Werte fast identisch mit denen für Blutstromformen bei 22°C sind.

5.1.2 Detailanalyse des Schaltverhaltens

Im folgenden Abschnitt wird das Umschaltverhalten der Trypanosomen detailliert beschrieben und der Beitrag der umschaltenden Organsimen zu den Geschwindigkeitsverteilungen der Ensembles diskutiert.

In Abbildung 36 sind die Schwimmer- und Taumlersegmente mit den zugehörigen Geschwindigkeitsverteilungen gezeigt, Abbildung 37 zeigt am Beispiel der Insektenstadien, wie sich die Geschwindigkeitsverteilung der bimodal schaltenden Trajektorien aus den beiden Subklassen zusammensetzt. Gezeigt sind die Fitfunktionen über die Schwimmer- (grün) und Taumlersegmente (rot) sowie die Summe der beiden (blau). Die Summenkurve vergleicht sich qualitativ gut mit den Geschwindigkeitsverteilungen bimodal schaltender Trajektorien. Ein Vergleich mit den in Abbildung 28 und Abbildung 34 in den Geschwindigkeitsverteilungen eingezeichneten Subklassen zeigt, dass die aus der Zerlegung der Fitfunktion erhaltenen Kurven nicht identisch mit denen sind, die aus der Segmentierung erhalten werden. Ein Grund dafür liegt, in der Tatsache, dass die Segmentierung die Festsetzung einer minimalen Segmentlänge erfordert (vgl. Kapitel 5.1.1). Dadurch kann es zu einer Verbreiterung der Subklassenverteilungen kommen. Ein weiterer Grund liegt im Fehlen der nicht eindeutig zuordenbaren Segmente (vgl. Kapitel 5.1.1). Der Vergleich zeigt jedoch auch, dass die charakteristischen Größen, die hier zur Analyse Verwendung finden, gut übereinstimmen. Im konkreten Fall sind dies die Maxima der Verteilungen und der Trend, dass der Schwimmerzustand wesentlich stärker populiert ist als der Taumlerzustand.

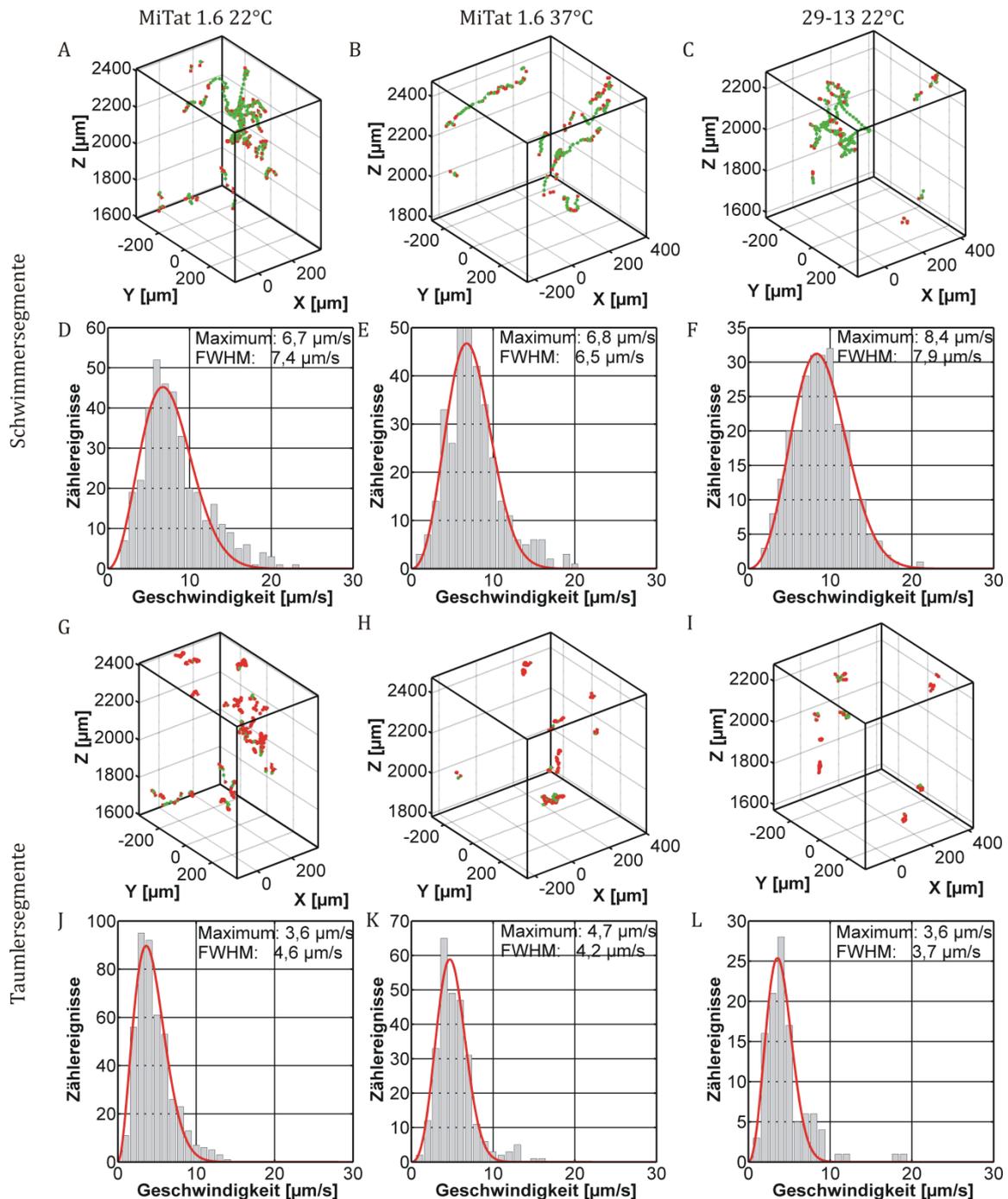


Abbildung 36: Segmentierung der bimodalen Trajektorien. A-C) 3D-Darstellung der Schwimmersegmente, D-F) Zugehörige Geschwindigkeitsverteilungen, G-I) 3D-Darstellung der Taumlersegmente, J-L) Zugehörige Geschwindigkeitsverteilungen, jeweils für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, D, G, J) und 37°C (B, E, H, K) sowie Prozyklen (Insektenstadium, Zelllinie 29-13, C, F, I, L).

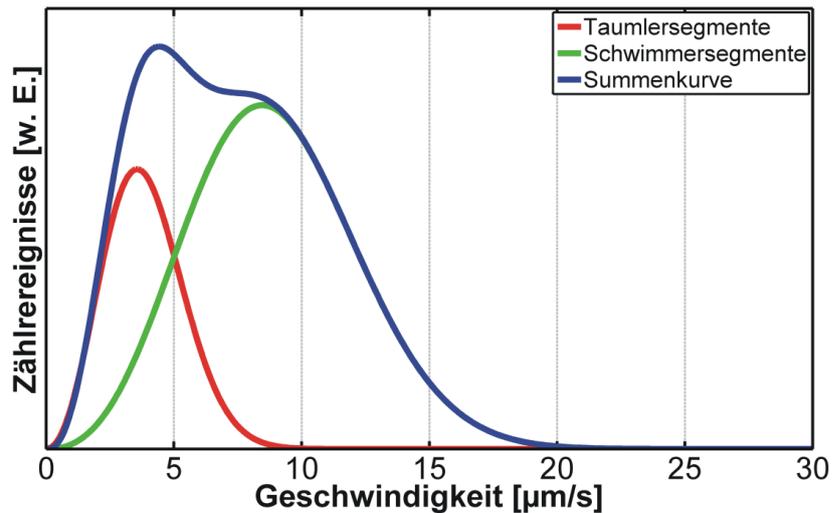


Abbildung 37: Zustandekommen der Geschwindigkeitsverteilungsaufspaltung für bimodal schaltende Trajektorien. Gezeigt sind jeweils die Fitfunktionen über die Geschwindigkeitsverteilungen der Taumler- (rot) und Schwimmersegmente (grün) sowie eine Summenkurve über diese (blau). Gezeigt sind Daten von prozyklischen Trypanosomen (Insektenstadium, Zelllinie 29-13).

Die Ausbildung von zwei Peaks in der Geschwindigkeitsverteilung ist hier deutlich zu sehen. Bei den Ensembleverteilungen kommt es jedoch nicht zur Aufspaltung der Verteilung und zur Ausbildung von zwei Maxima. Im Folgenden soll diskutiert werden, warum dies nicht der Fall ist, obwohl ein Zwei-Zustands-System vorliegt, wie die beobachteten Trajektorientypen (vgl. Abbildung 27) und die bimodal schaltenden Organismen zeigen.

5.1.3 Korrelation der Geschwindigkeitsverteilungen schaltender Organismen mit den Ensembleverteilungen

Eine genaue visuelle Betrachtung der farbkodierten Daten zeigt, dass die Mehrheit der Organismen innerhalb eines Datensatzes Schaltverhalten zeigt und das Verbleiben innerhalb eines Zustands über den kompletten Beobachtungszeitraum selten auftritt (vgl. Kapitel 5.1). Daher ist eine Ensemble-Geschwindigkeitsverteilung mit zwei Maxima zu erwarten, die aber nicht beobachtet wird. Betrachtet man nun alle schaltenden Trajektorien so treten neben den bis hier beschriebenen eindeutig bimodal schaltenden Trajektorien auch solche auf, bei denen die Aufspaltung in der Geschwindigkeitsverteilung verschwindet. Diese Trajektorien sind in Abbildung 38 gezeigt.

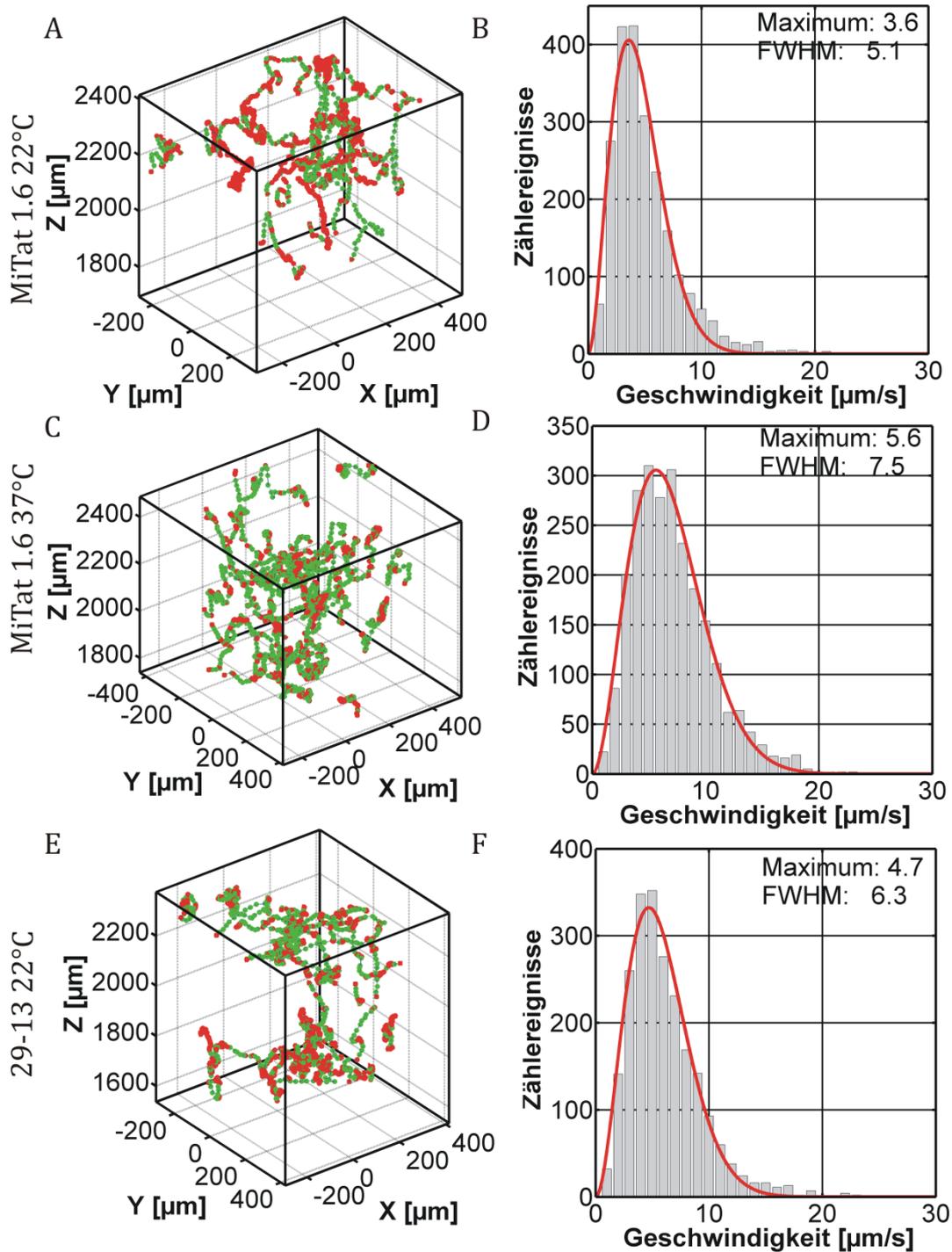


Abbildung 38: Trajektorien schaltender Organismen und ihre Geschwindigkeitsverteilungen für Blustromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, B) und 37°C (C, D) und Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, E, F).

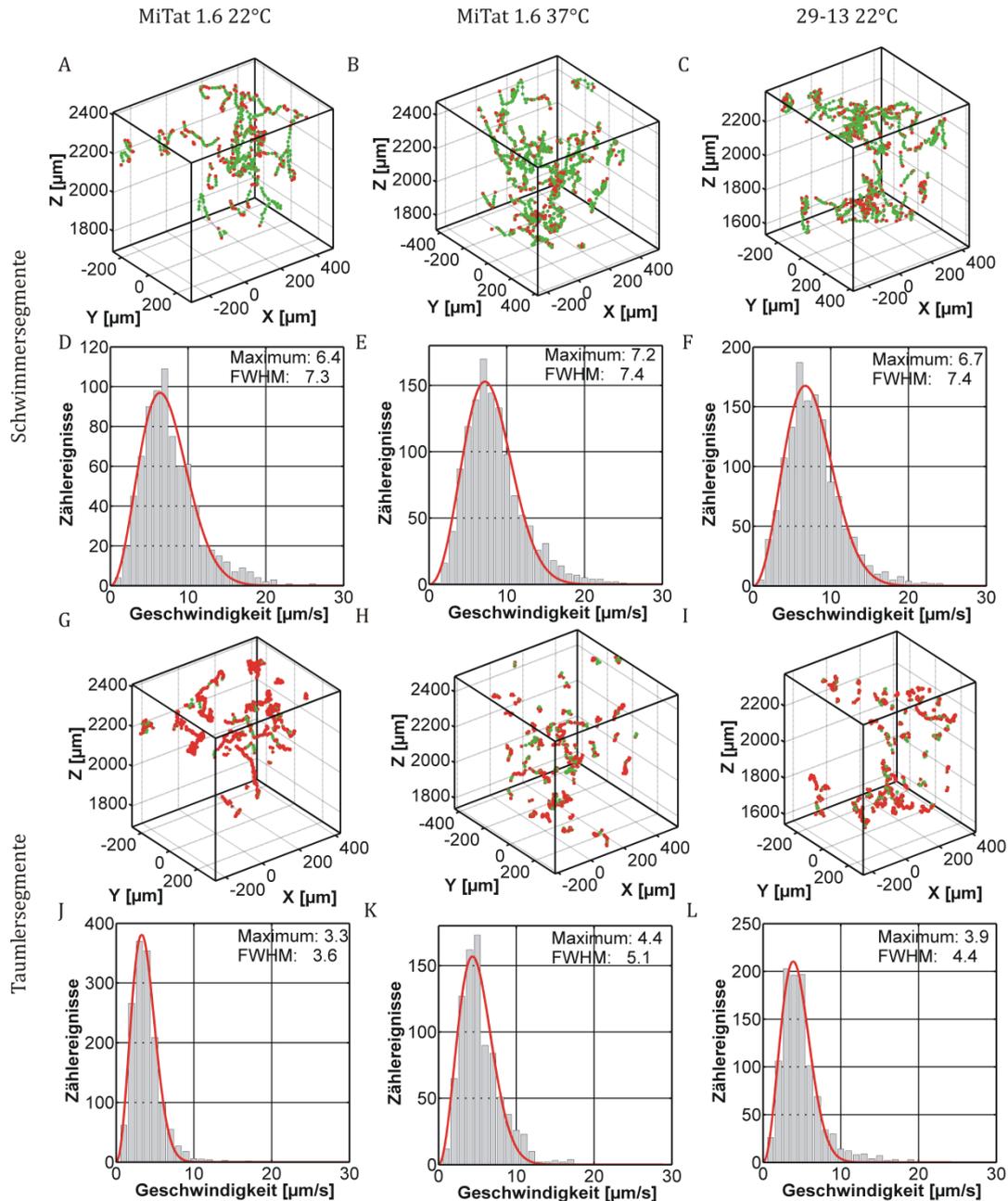


Abbildung 39: Segmentierung der Trajektorien schaltender Trypanosomen. A-C) 3D-Darstellung der Schwimmersegmente, D-F) Zugehörige Geschwindigkeitsverteilungen, G-I) 3D-Darstellung der Taalersegmente, J-L) Zugehörige Geschwindigkeitsverteilungen, jeweils für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, D, G, J) und 37°C (B, E, H, K) sowie Prozyklen (Insektenstadium, Zelllinie 29-13, C, F, I, L).

Die Trajektorien ähneln denen der zuvor beschriebenen umschaltenden Organismen und auch hier kann eine Segmentierung, vorgenommen werden, die zu den zwei beschriebenen Subklassen führt (vgl. Abbildung 39). Der entscheidende Unterschied liegt jedoch darin, dass im Gegensatz zu den bimodal schaltenden Trypanosomen, hier in den Summenhistogrammen kein lokales Minimum im Bereich von 5 $\mu\text{m/s}$ beobachtet wird. Das Zustandekommen der Kurvenform für die Geschwindigkeitsverteilung dieser

Subklasse ist in Abbildung 40A gezeigt, die Teilabbildung B zeigt zum direkten Vergleich nochmals dieselbe Auftragung für den bimodalen Fall.

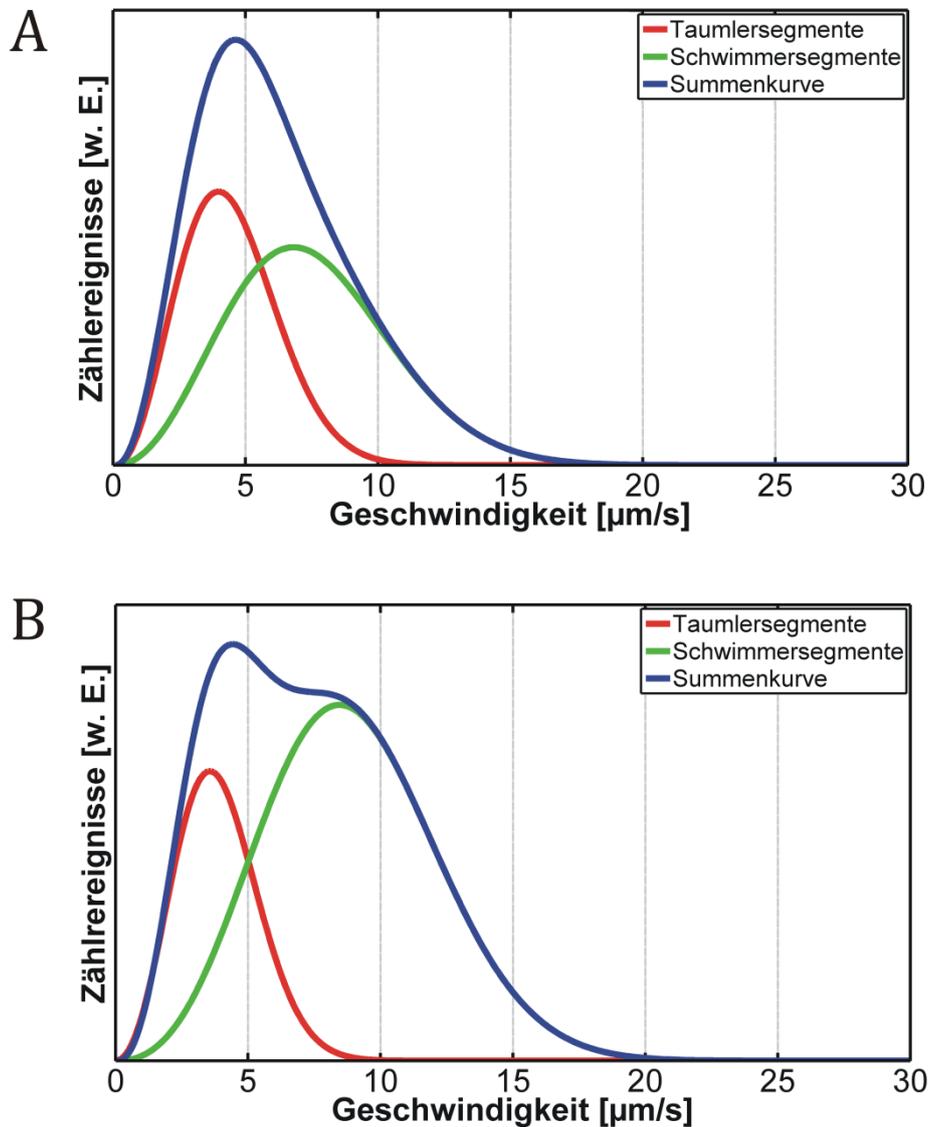


Abbildung 40: A) Zusammensetzung der Geschwindigkeitsverteilung der schaltenden Trypanosomen aus den Subklassen Schwimmer und Taumler. Gezeigt sind jeweils die Fitfunktionen über die Geschwindigkeitsverteilungen der Taumler- (rot) und Schwimmersegmente (grün) sowie deren Summe (blau). Gezeigt sind Daten von prozyklischen Trypanosomen. B) Zum Vergleich ist nochmals dieselbe Darstellung für bimodal schaltende Trypanosomen gezeigt (Abbildung 37).

	Wahrscheinlichste Geschwindigkeit [µm/s]	Halbwertsbreite (FWHM) [µm/s]	Mittlere Geschwindigkeit [µm/s]	Standard- abweichung der Geschwindigkeit [µm/s]	Standardabweichung des Mittelwerts [µm/s]
Schwimmersegmente bimodal MiTat 1.6 22°C	6,70	7,40	7,82	3,85	0,12
Schwimmersegmente Einzelmaximum MiTat 1.6 22°C	6,40	7,30	7,08	3,63	0,14
Taumersegmente bimodal MiTat 1.6 22°C	3,60	4,60	3,92	2,21	0,12
Taumersegmente Einzelmaximum MiTat 1.6 22°C	3,30	3,60	3,60	2,07	0,05
Schwimmersegmente bimodal MiTat 1.6 37°C	6,80	6,50	7,18	3,26	0,20
Schwimmersegmente Einzelmaximum MiTat 1.6 37°C	7,20	7,40	7,33	3,59	0,10
Taumersegmente bimodal MiTat 1.6 37°C	4,70	4,20	4,56	2,14	0,16
Taumersegmente Einzelmaximum MiTat 1.6 37°C	4,40	5,10	4,48	2,81	0,09
Schwimmersegmente bimodal 29-13 22°C	8,40	7,90	8,34	3,25	0,20
Schwimmersegmente Einzelmaximum 29- 13 22°C	6,70	7,40	7,94	3,76	0,11
Taumersegmente bimodal 29-13 22°C	3,60	3,70	4,19	2,90	0,27
Taumersegmente Einzelmaximum 29- 13 22°C	3,90	4,40	4,91	2,63	0,09

Tabelle 4: Vergleich der Geschwindigkeiten für schaltende und bimodal schaltende Organismen

Tabelle 4 stellt die Segmentierungsergebnisse für beide Klassen von Trajektorien mit Umschaltverhalten gegenüber. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die mittleren und wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten gut vergleichen lassen. Durch diese große Ähnlichkeit kann davon ausgegangen werden, dass auch hier, trotz des Fehlens des Minimums in der Geschwindigkeitsverteilung bei 5 µm/s, ein Umschalten zwischen den Schwimmmodi Schwimmen und Taumeln vorliegt. Das Auftreten oder Fehlen des Minimums hängt also nicht in erster Linie von der Lage des Maximums der Verteilung sondern von anderen Faktoren ab. Sowohl aus dem Vergleich von Abbildung 37 mit Abbildung 40 als auch aus Tabelle 4 wird deutlich, dass einer dieser Faktoren die Breite

der Verteilung ist, die relativ zum Wert des Maximums für die bimodal schaltenden Organismen häufig kleiner ausfällt.

Deutlicher wird der Effekt der Verteilungsbreite, wenn nicht die Geschwindigkeitsverteilungen über alle einer Klasse zugehörigen Geschwindigkeitsvektoren betrachtet werden, sondern ein segmentweiser Ansatz gewählt wird. Konkret bedeutet dies, dass jeweils die wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten für einzelne Schwimm- und Taumelsegmente bestimmt und anschließend ihre Mittelwerte und Standardabweichungen miteinander verglichen wurden. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 41 dargestellt.

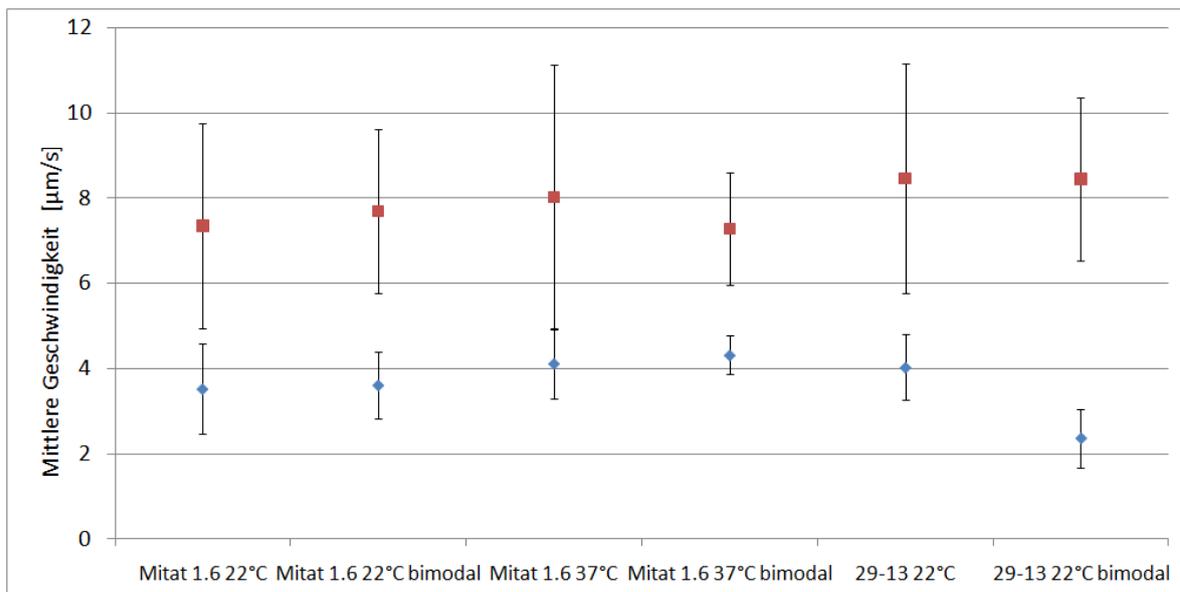


Abbildung 41: Vergleich der mittleren Segmentgeschwindigkeiten und ihrer Standardabweichungen für beide Segmentierungsklassen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die mittleren Segmentgeschwindigkeiten für die beiden Klassen schaltender Trypanosomen vergleichbar sind, jedoch ein auffälliger Unterschied bzgl. der Standardabweichungen vorhanden ist. Konkret sind diese für bimodal schaltende Segmente wesentlich kleiner. Mit der Information aus Tabelle 4 ergibt sich damit ein Bild nach dem manche Organismen in einem Datensatz sich dadurch auszeichnen, dass sie ein klareres Umschaltverhalten zeigen, d.h. dass sie eine insgesamt geringere Schwankung der Schwimmgeschwindigkeit innerhalb eines Modus zeigen, da der Geschwindigkeitsverlauf innerhalb der einzelnen Segmente konstanter ist.

Ein weiterer Aspekt ist die Anzahl an Geschwindigkeitsvektoren, die dem jeweiligen Zustand angehören, also die Anzahl Datenpunkte bzw. die Segmentlänge. Typischerweise ist die Taumlerklasse bei fehlendem Minimum in der Ensembleverteilung stärker populierte als bei bimodal schaltenden Organismen. Dies gilt besonders für die bei Raumtemperatur aufgenommenen Datensätze, wobei der Effekt für prozyklische Trypanosomen stärker ausgeprägt ist als für Blutstromformtrypanosomen (vgl. Abbildung 42).

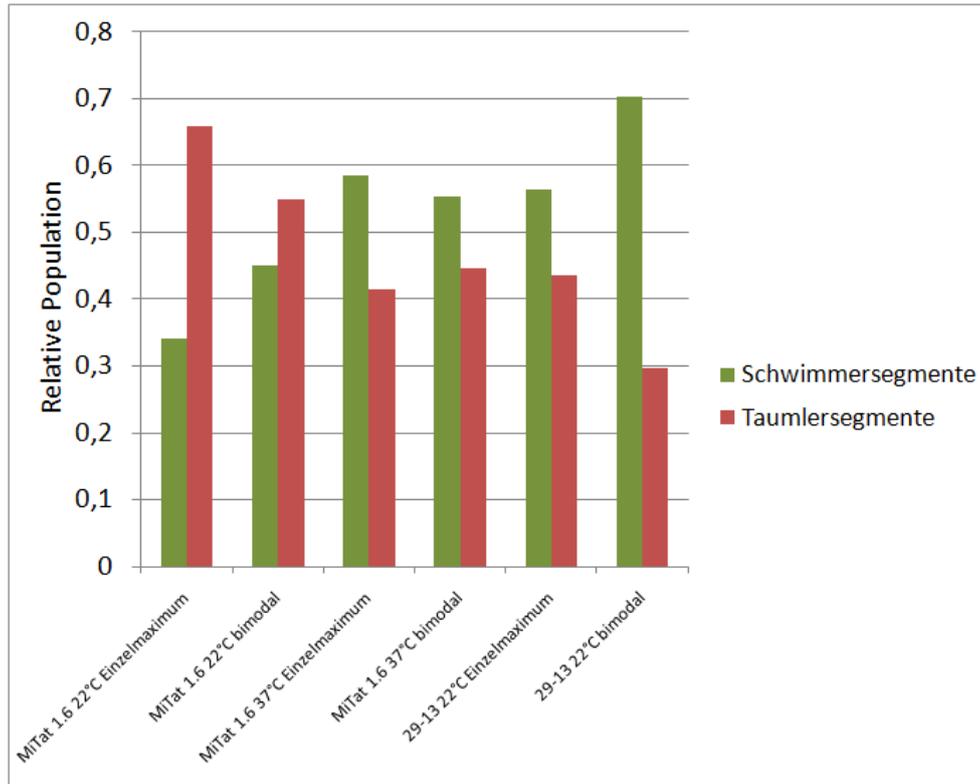


Abbildung 42: Relative Population des Schwimmer- und Taumlerzustands in den untersuchten Datensätzen.

Aus Abbildung 41 und Abbildung 42 lässt sich ableiten, dass der Faktor Verteilungsbreite bei Blutstromformentrypanosomen bei 37°C den größeren Einfluss hat, bei den Insektenstadien hingegen die stärkere Population des Schwimmermodus einen größeren Anteil hat. Für die Blutstromformentrypanosomen bei Raumtemperatur scheinen beide Einflüsse gleichsam wirksam zu sein.

Besonders aus der stärkeren Population des Schwimmerzustands in beiden Raumtemperaturdatensätzen kann geschlossen werden, dass auf Einzelorganismenbasis die Fitness des jeweiligen Trypanosoms ausschlaggebend für das Auftreten von bimodal schaltenden Trajektorien ist. Solche Organismen zeigen demnach ein präziseres Umschaltverhalten und schwimmen häufiger schnell und gerichtet als solche schaltenden Organismen, die das lokale Minimum in der Geschwindigkeitsverteilung nicht aufweisen. Zur weiteren Analyse der Trajektoriensegmente, lässt sich zusätzlich noch eine integrale Betrachtung der Segmentgeschwindigkeiten anstellen (vgl. Abbildung 43). Hierbei wurde segmentweise die addierte Geschwindigkeit aller Vektoren eines jeden Segments gegen die Segmentdauer gezeichnet. Aus der Abbildung geht deutlich hervor, dass charakteristische Steigungen für beide Schwimmmodi existieren, die auch für verschiedene Lebenszyklusstadien (Blutstrom- und Insektenstadien) und Temperaturen in vergleichbaren Bereichen liegen. Es zeigt sich aber auch, dass der Grad der Trennung

beider Zustände von der Segmentdauer abhängig ist, d.h. je länger das Segment, desto deutlicher der Geschwindigkeitsunterschied.

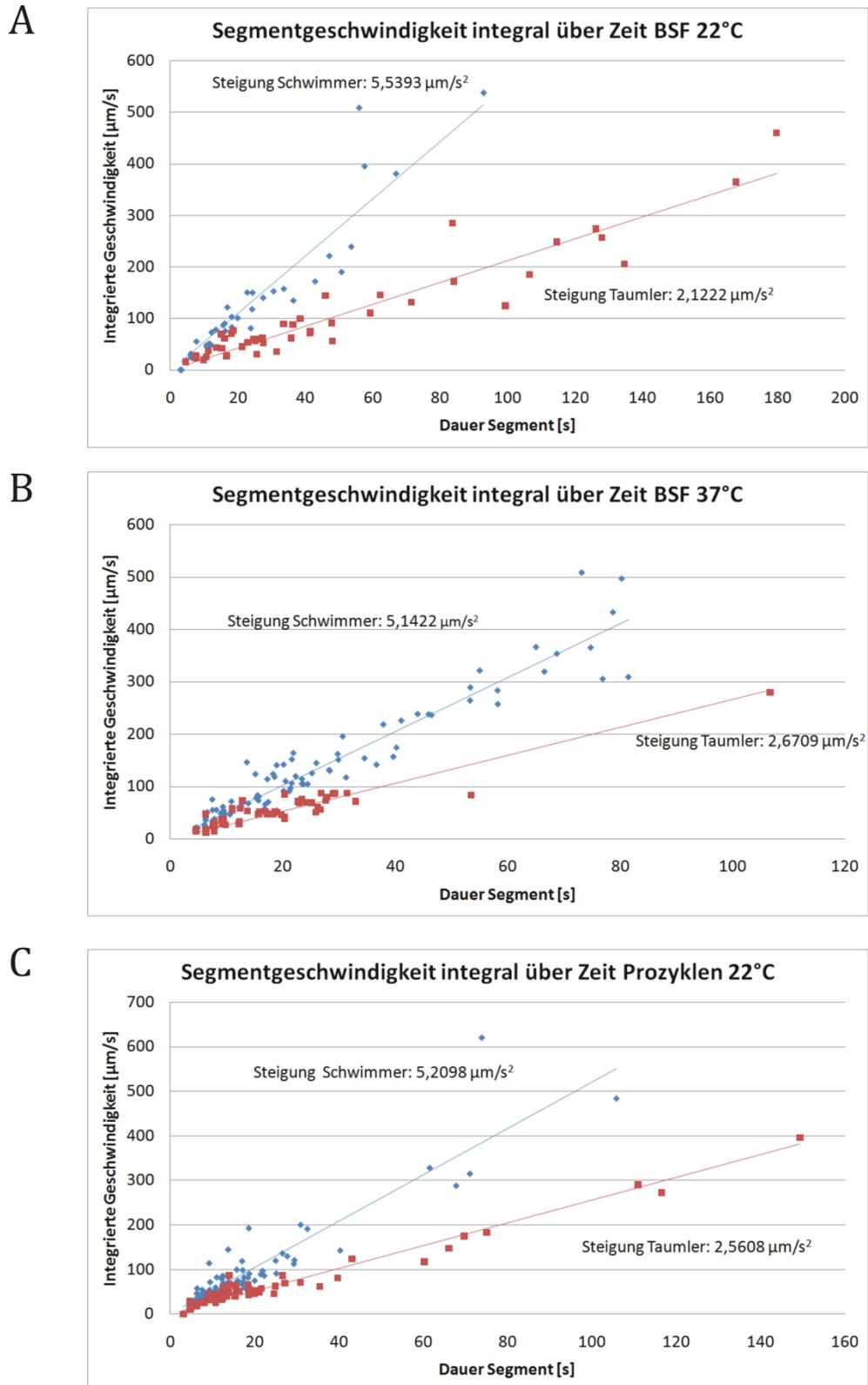


Abbildung 43: Integrale Betrachtung der Geschwindigkeit von Trajektoriensegmenten für Blutstromformen (Mitat 1.6) bei 22°C (A) und 37°C (B) sowie für Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, C). Schwimmersegmente sind blau, Taumlersegmente rot dargestellt.

5.2 Analyse des Schwimmwinkels

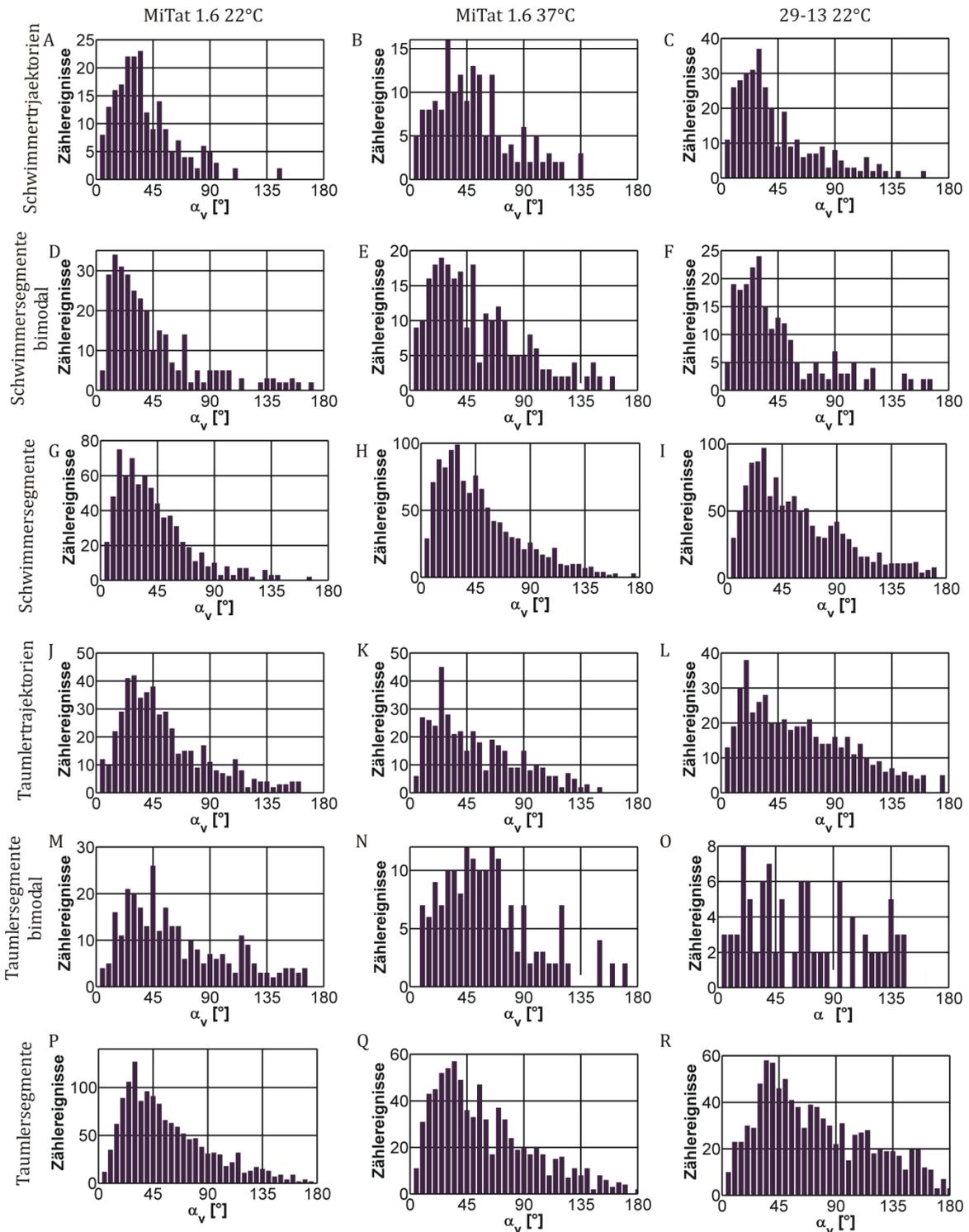


Abbildung 44: Verteilung des Schwimmwinkels. Gezeigt sind die Winkelverteilungen in bins von 5° für Schwimmertrajektorien (A-C) und -segmente (D-I) sowie für Taumlertrajektorien (J-L) und -segmente (M-R) jeweils für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, D, G, J, M, P) und 37°C (B, E, H, K, N, Q) und Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, C, F, I, L, O, R).

Neben der Schwimmgeschwindigkeit wurden zur Beschreibung der Motilität von Trypanosomen auch die Schwimmwinkel ausgewertet. Abbildung 44 und Tabelle 5 zeigen die Winkelverteilungen bzw. die daraus abgeleiteten charakteristischen Größen gemäß der schon bei der Geschwindigkeitsauswertung gezeigten Klassifizierung. Ebenfalls wurde auch hier, wie schon bei der Geschwindigkeitsanalyse eine integrale, segmentweise Analyse vorgenommen, deren Ergebnis in Abbildung 45 dargestellt ist.

	Mittlerer Schwimmwinkel [°]	Standardabweichung Schwimmwinkel [°]	Standardabweichung des Mittelwerts [°]
Schwimmertrajektorien MiTat 1.6 22°C	39,13	28,54	1,97
Schwimmersegmente bimodal MiTat 1.6 22°C	51,75	38,57	2,20
Schwimmersegmente Einzelmaximum MiTat 1.6 22°C	38,99	30,91	1,21
Taumlertrajektorien MiTat 1.6 22°C	59,28	34,55	1,55
Taumlersegmente bimodal MiTat 1.6 22°C	62,63	39,98	2,32
Taumlersegmente Einzelmaximum MiTat 1.6 22°C	54,60	34,65	0,93
Schwimmertrajektorien MiTat 1.6 37°C	43,61	32,75	2,09
Schwimmersegmente bimodal MiTat 1.6 37°C	50,57	37,15	2,30
Schwimmersegmente Einzelmaximum MiTat 1.6 37°C	46,90	38,82	1,10
Taumlertrajektorien MiTat 1.6 37°C	72,01	35,30	1,75
Taumlersegmente bimodal MiTat 1.6 37°C	61,36	38,07	2,84
Taumlersegmente Einzelmaximum MiTat 1.6 37°C	57,16	43,09	1,40
Schwimmertrajektorien 29-13 22°C	41,35	32,68	1,80
Schwimmersegmente bimodal 29-13 22°C	46,90	39,21	2,53
Schwimmersegmente Einzelmaximum 29-13 22°C	55,16	34,18	1,00
Taumlertrajektorien 29-13 22°C	60,96	41,93	1,87
Taumlersegmente bimodal 29-13 22°C	73,08	44,50	4,38
Taumlersegmente Einzelmaximum 29-13 22°C	71,77	38,95	1,38

Tabelle 5: Vergleich der Schwimmwinkel für Segmente und Trajektorien.

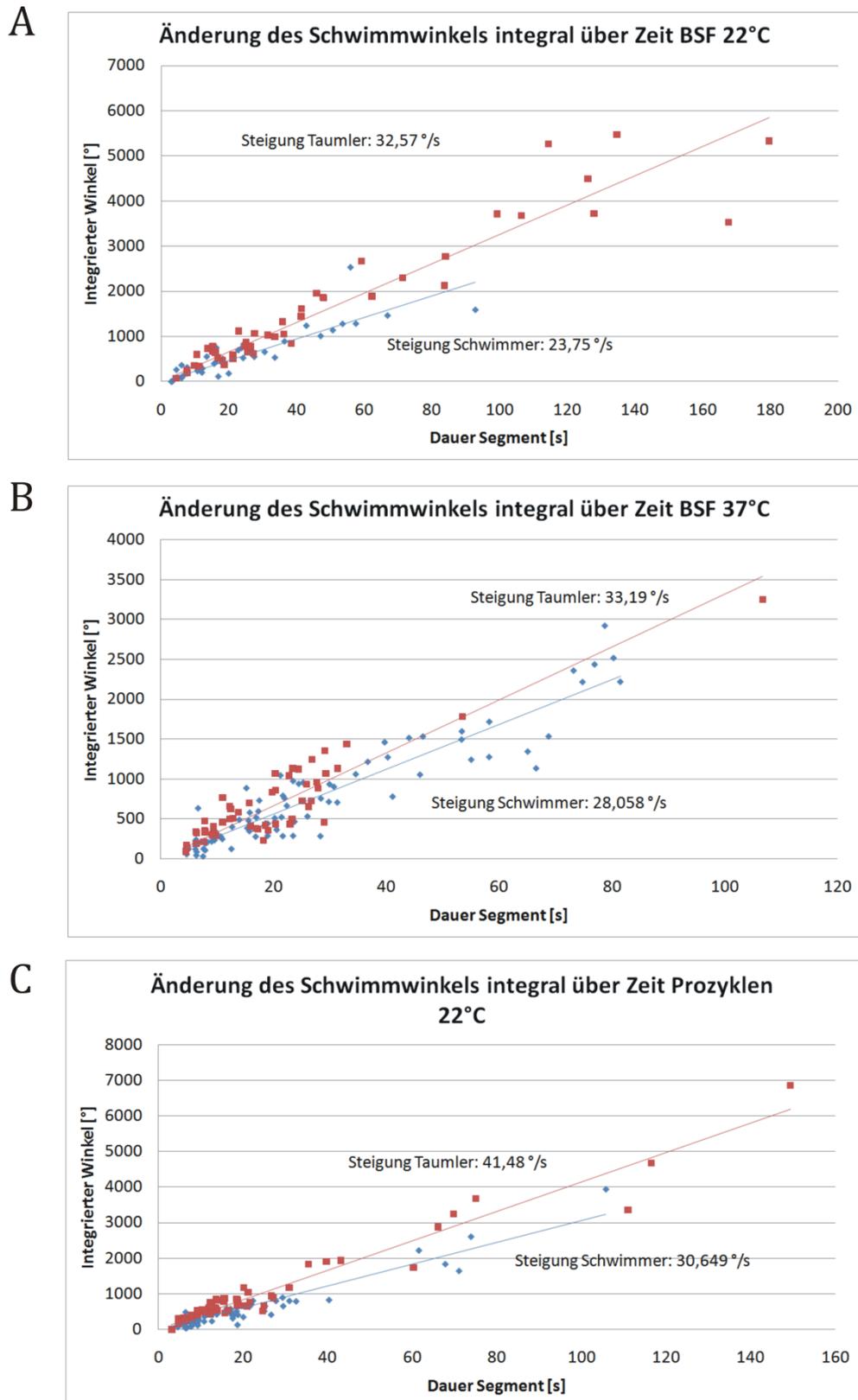


Abbildung 45: Integrale Betrachtung der Schwimmwinkel von Trajektoriensegmenten für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A) und 37°C (B) sowie für Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, C). Schwimmersegmente sind blau, Taumlersegmente rot dargestellt.

Bei den in den obenstehenden Darstellungen ausgewerteten Daten handelt es sich immer um Schwimmwinkel zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bewegungsvektoren, gemäß der Darstellung in Abbildung 21 A. Die Winkelverteilungen (Abbildung 44) sind relativ breit. Sie weisen viele Zählereignisse bei kleineren Schwimmwinkeln im Bereich von ca. $(0-60)^\circ$ auf, höhere Winkel werden selten beobachtet. In Übereinstimmung mit dem optischen Eindruck einer stärker ausgeprägten Linearität während der Schwimmphasen ist dieser Abfall in der Verteilung für Schwimmertrajektorien und -segmente stärker ausgeprägt als für Taumler, deren Schwimmverhalten schon zuvor als unruhiger beschrieben wurde. Diese Aussage wird auch durch die in Tabelle 5 zusammengestellten Mittelwerte der Schwimmwinkel gestützt, die für Schwimmer typischerweise im Bereich von $(40-50)^\circ$, für Taumler jedoch bei $(60-70)^\circ$ liegen. Aus der Differenz von nur 10° zwischen den Klassen in Verbindung mit den in Tabelle 5 gezeigten Standardabweichungen ist jedoch auch ersichtlich, dass der Schwimmwinkel ein weniger deutliches Kriterium für die Klassenunterscheidung ist als die Schwimmgeschwindigkeit. Dieser Eindruck bestätigt sich auch durch die in Abbildung 45 gezeigte integrale Betrachtung der Schwimmwinkelverteilung, die analog zu der bei der Geschwindigkeitsanalyse dargestellten Methodik durchgeführt wurde. Auch hier sind für die beiden Schwimmklassen die über die Segmentdauer integrierten Winkel gegen diese aufgetragen. Wie bei der Geschwindigkeitsanalyse lassen sich auch hier charakteristische Steigungen für beide Klassen ableiten, deren Übereinstimmung auch über verschiedene Lebenszyklusstadien und Messbedingungen hinweg sehr gut ist. Besonders für die Blutstromformen zeigt sich jedoch eine sehr große Streuung um die Anpassungsgerade. Neben dem Schwimmwinkel wurde auch der Torsionswinkel (Abbildung 21 B) als Maß für die Helizität der einzelnen Trajektorien untersucht. Hierbei konnte jedoch kein klarer Trend ausgemacht werden, sondern die Winkel schienen zufällig verteilt. Diese Beobachtung könnte auf eine der Eigenbewegung der Trypanosomen überlagerte Brown'sche Molekularbewegung zurückzuführen sein. Auf eine detaillierte Auswertung des Torsionswinkels wurde daher im Weiteren verzichtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Analyse des Schwimmwinkels, die im Kapitel 5.1 gemachten Beobachtungen und Folgerungen stützt, die Schwimmgeschwindigkeit aber das im Vergleich eindeutigere Klassifizierungskriterium ist.

5.3 Ausbreitungsanalyse

Als ein weiteres Charakteristikum des Motilitätsverhaltens von Trypanosomen wurde ihr Ausbreitungsverhalten analysiert. Dazu wird die effektive Wegstrecke, die ein Organismus über ein gegebenes Zeitintervall zurücklegt, d.h. die Differenz von Start- und Endpunkt (vgl. Abbildung 22), ermittelt und gegen die mittlere Geschwindigkeit über dieses Zeitintervall aufgetragen. Die entsprechenden Darstellungen sind in Abbildung 46 und Abbildung 47 gezeigt.

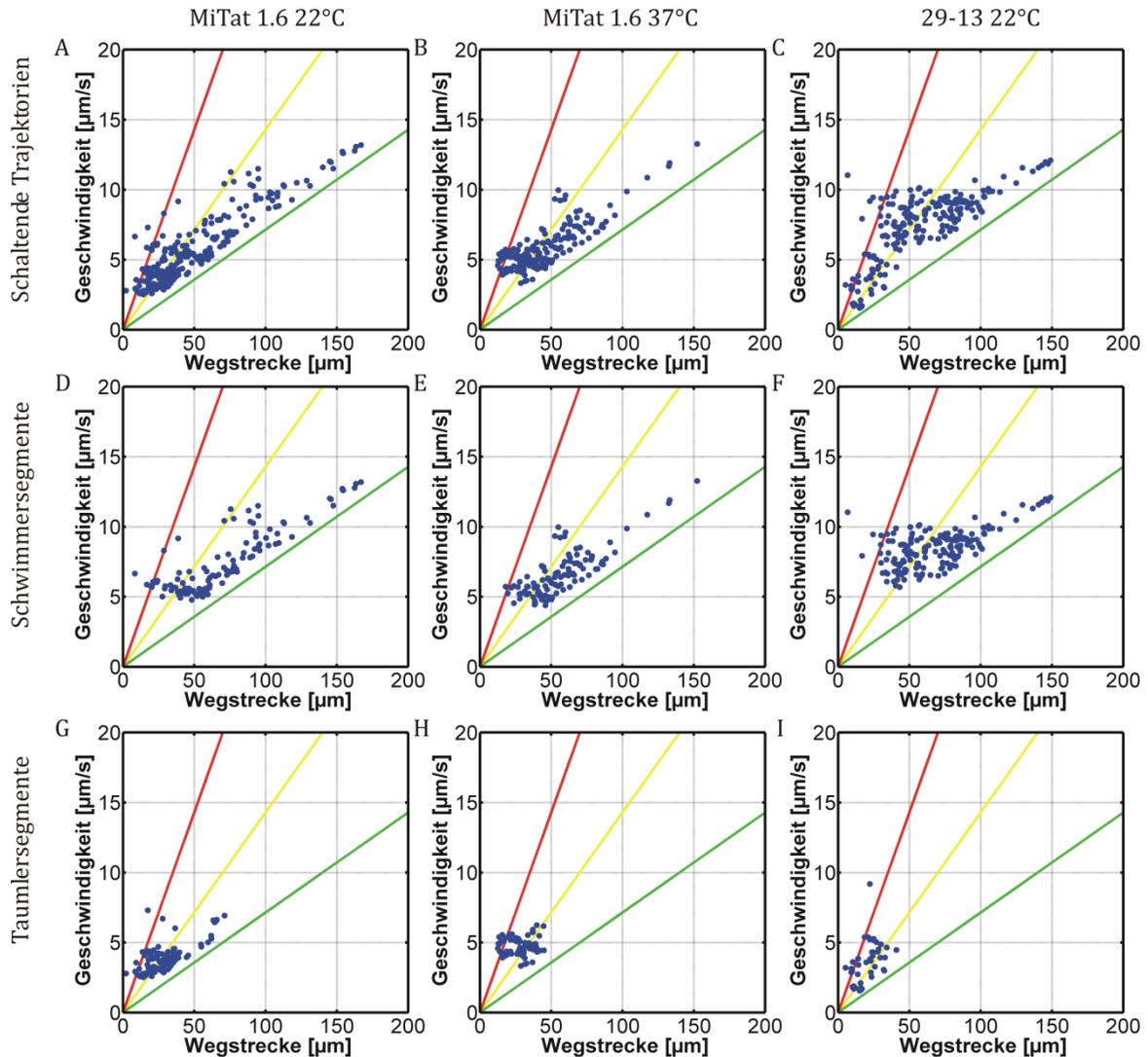


Abbildung 46: Ausbreitungsanalyse für bimodal schaltenden Trypanosomen für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, D, G) und 37°C (B, E, H) und Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, C, F, I). Gezeigt ist jeweils die effektiv zurückgelegte Wegstrecke gegen die durchschnittliche Segmentgeschwindigkeit. Jeder Datenpunkt entspricht einem Zeitintervall von 14 Sekunden. Daten für Schwimmersegmente sind in den Teilabbildungen D-F, für Taumlersegmente in G-I gezeigt. Teilabbildungen A-C zeigen jeweils die Summen. Die farbigen Linien zeigen Richtwerte für die Linearität der Ausbreitung, die grüne Linie entspricht 100%iger Linearität, gelb 50%, rot 25%.

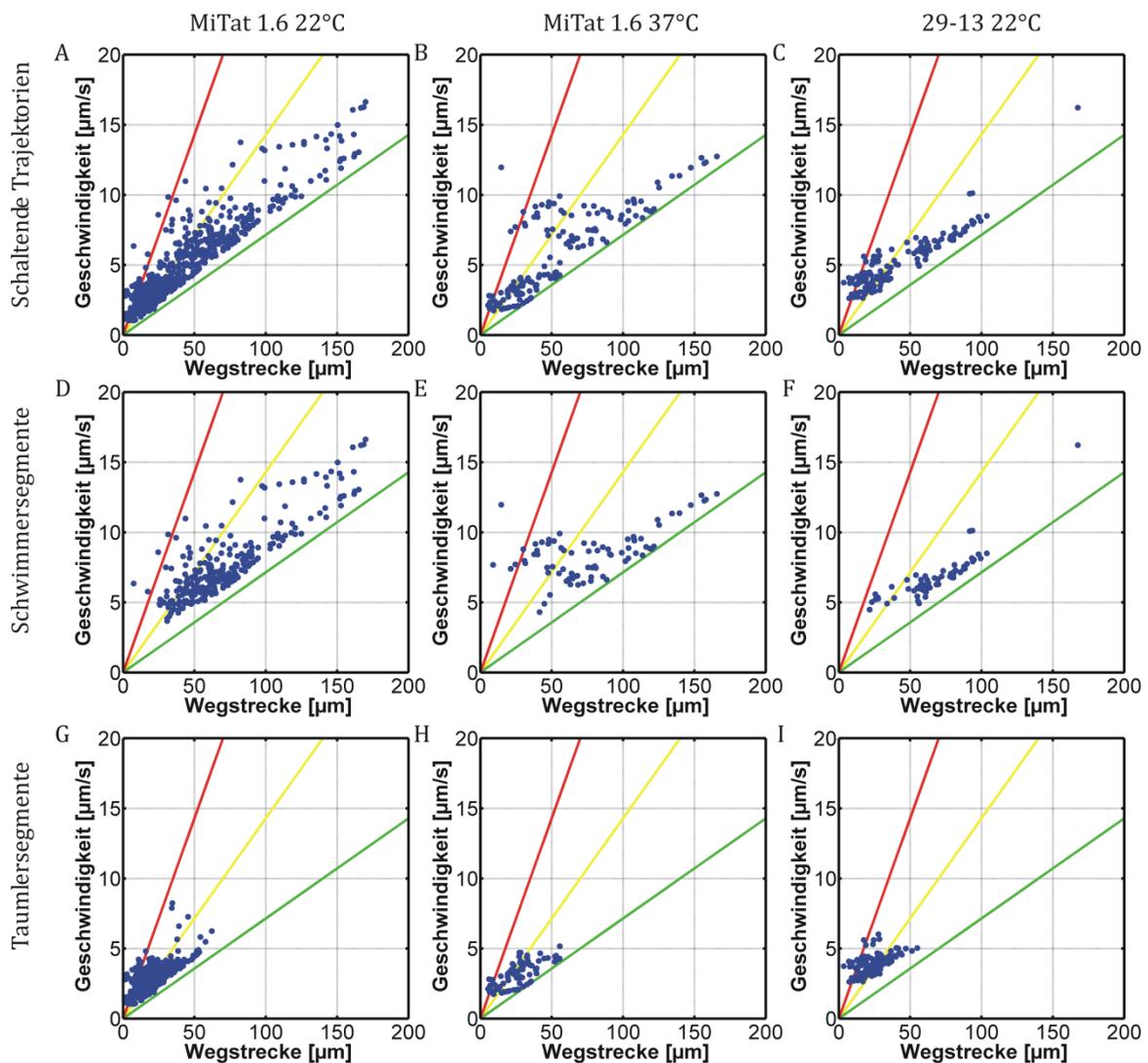


Abbildung 47: Ausbreitungsanalyse für schaltenden Trypanosomen für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, D, G) und 37°C (B, E, H) und Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, C, F, I). Gezeigt ist jeweils die effektiv zurückgelegte Wegstrecke gegen die durchschnittliche Segmentgeschwindigkeit. Jeder Datenpunkt entspricht einem Zeitintervall von 14 Sekunden. Daten für Schwimmersegmente sind in den Teilabbildungen D-F, für Taumlersegmente in G-I gezeigt. Teilabbildungen A-C zeigen jeweils die Summen. Die farbigen Linien zeigen Richtwerte für die Linearität der Ausbreitung, die grüne Linie entspricht 100%iger Linearität, gelb 50%, rot 25%.

Das Analyseergebnis ist von der gewählten Größe des Zeitintervalls abhängig. Dieses sollte in einem sinnvollen Verhältnis zur durchschnittlichen Segmentlänge gewählt werden, jedoch auch nicht zu klein sein, da die Güte der Unterscheidung der Klassen, wie in Abbildung 43 und Abbildung 45 gezeigt, mit steigender Segmentlänge besser wird. Aufgrund dieser Überlegungen und nach Evaluierung verschiedener Intervalle im Bereich von 3-30 Sekunden wurde für die hier gezeigte Analyse ein Intervall von 14 Sekunden gewählt, da es ausreichend groß für eine Unterscheidung der Zustände ist (Auftrennung im Geschwindigkeits-Weglängen-Diagramm, vgl. Abbildung 46 und Abbildung 47) und zugleich klein genug, um auch die kürzeren Segmente zu berücksichtigen.

Die Ergebnisse der Ausbreitungsanalyse sind in Abbildung 46 und Abbildung 47 gezeigt. Jeder blaue Punkt gibt für ein Segment das Wertepaar aus mittlerer Geschwindigkeit und effektiv zurückgelegter Wegstrecke an. Zur deutlicheren Einordnung der Ergebnisse sind zusätzlich drei Linien dargestellt. Die grüne Linie beschreibt hier die ideal lineare Ausbreitung, die gelbe Linie eine Linearität von 50% und die rote Linie gibt eine Linearität von 25% an. 100%ige Linearität bedeutet hierbei, dass ein Trypanosom im betrachteten 14 s-Intervall bei einer Segmentdurchschnittsgeschwindigkeit von beispielsweise 10 $\mu\text{m/s}$ eine Strecke von 140 μm , bei 50% von 70 μm und bei 25% von 35 μm zurücklegt. Wie schon zuvor sind die Segmente aus Trajektorien bimodal schaltender Organismen und solcher, die zwar Schaltverhalten zeigen, aber kein lokales Minimum in der Geschwindigkeitsverteilung, gesondert dargestellt.

Die Darstellung zeigt besonders für die Insektenstadien ein ausgeprägtes Aufspalten der beiden Zustände im Koordinatenraum. Für die Blutstromformen ist dieses Verhalten weniger stark ausgeprägt und zudem bei 37°C deutlicher als bei 22°C. Für alle Daten ist ein mehr oder weniger stark ausgeprägter Trend zu beobachten, wonach die Signalschwerpunkte für Taumler erwartungsgemäß, stärker in Richtung geringerer Linearität (viele Datenpunkte zwischen roter und gelber Linie), die für Schwimmer eher in Richtung hoher Linearität liegen (viele Datenpunkte im Bereich zwischen gelber und grüner Linie). Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Geschwindigkeits- und Winkelanalyse. Vor allem die stärker ausgeprägte Trennung der charakteristischen Schwimmparameter für beide Motilitätsklassen (Schwimmer und Taumler) bei den Insektenstadien (vgl. Tabelle 4 und Tabelle 5) findet sich im deutlichen Clustern der Datenpunkte in den Geschwindigkeits-Wegstrecken-Diagrammen wieder.

Die Ausbreitungsanalyse stellt in Prinzip eine Kombination der zuvor angestellten Geschwindigkeits- und Schwimmwinkelanalysen dar. Durch die segmentweise Untersuchung wird die bei der Winkelanalyse beobachtete starke Schwankung und große Verteilungsbreite der Werte etwas abgefangen, da längere Schwimmabschnitte untersucht werden und somit das Richtungsverhalten eindeutiger ist. Der Grund dafür liegt in der Tatsache, dass auch die Trajektorien gerichtet schwimmender Trypanosomen eine leichte Modulation um die Ausbreitungsachse zeigen. Dadurch wird die Zuordnung von Schwimmmodi nur auf Basis von Schwimmwinkeln zwischen direkt aufeinanderfolgenden Vektoren erschwert.

Insgesamt ist die Unterscheidbarkeit der Schwimmzustände mittels dieser Analysemethode qualitativ erwartungsgemäß zwischen den Ergebnissen der Winkel- und der Geschwindigkeitsanalyse anzusiedeln. Im eindeutigeren Aufspalten der Zustände für bimodal schaltende Trajektorien kann ein weiteres Indiz für das klarere Umschaltverhalten dieser Organismen gesehen werden.

5.4 Analyse der Segmentdauern

In den Kapiteln 5.1-5.3 wurden grundlegende Schwimmparameter des Blutparasiten *Trypanosoma brucei brucei* in verschiedenen Lebenszyklusstadien und bei unterschiedlichen Temperaturen beschrieben und ein Zwei-Zustands-System für die Motilität plausibilisiert. Dabei wurde gezeigt, dass datensatzübergreifende Schwimmparameter für die Motilitätsklassen, d.h. definierte Parametersätze von Schwimgeschwindigkeit, und –winkel für die auftretenden Motilitätsmodi, gültig sind. In Kapitel 5.1 wird gezeigt, dass sich die Geschwindigkeitsverteilungen über die Ensembles für Blutstromformen bei 22°C und 37°C und Insektenstadien dennoch unterscheiden. Diese Unterschiede sind zu deutlich, um sich allein aus den Fehlergrenzen der oben abgeleiteten Werte zu erklären. So ist z.B. die Ensemblegeschwindigkeitsverteilung für Blutstromformen bei 37°C im Vergleich zu der bei 22°C stärker verbreitert, als man aus dem Vergleich der Klassengeschwindigkeiten und Fehlergrenzen erwartet.



Abbildung 48: Bestimmung der Schwimm- und Taumelquote für die betrachteten Datensätze nach dem 5 µm/s-Kriterium. Oben: Quoten basierend auf wahrscheinlichsten Trajektoriengeschwindigkeiten. Unten: Quoten basierend auf den Klassen zugeordneten Datenpunkten

Es muss also noch einen weiteren Faktor geben, dessen Einfluss hier zum Tragen kommt. Dieser Faktor ist die relative Population des jeweiligen Schwimmmodus, oder anders ausgedrückt, die Schwimmerquote und Taumlerquote der Trypanosomen. Diese Quoten lassen sich im einfachsten Fall dadurch bestimmen, dass die einzelnen Trajektorien nach ihren wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten sortiert und gemäß dem 5 $\mu\text{m/s}$ -Kriterium als Schwimmer oder Taumler zugeordnet werden. Dass diese Methode zu kurz greift, da die Geschwindigkeitsverteilungen der einzelnen Trajektorien keine Berücksichtigung finden, zeigt Abbildung 48. Hier sind in der oberen Reihe für die drei untersuchten Parametersätze die Schwimm- und Taumelquoten trajektorienbasiert berechnet. Ein realistischeres Bild wird erhalten, wenn die Segmentierung mit in Betracht gezogen wird. Die untere Reihe in Abbildung 48 zeigt die Ergebnisse, wenn für die Berechnung der Schwimmquote die Summe der Datenpunkte zugrunde gelegt wird, die Schwimmertrajektorien bzw. -segmenten zugeordnet wurden und für die Taumlerquote analog verfahren wird. Die so erhaltenen Quoten korrelieren im Gegensatz zum trajektorienbasierten Ansatz gut mit den wahrscheinlichsten Ensemblesgeschwindigkeiten von 3,6 $\mu\text{m/s}$ (MiTat 1.6 22°C), 5,6 $\mu\text{m/s}$ (MiTat 1.6 37°C) und 4,2 $\mu\text{m/s}$ (29-13 22°C). D.h. der Blutstromformatensatz wird bei 22°C von den Taumlern dominiert (64%), bei 37°C überwiegen die Schwimmer (58%), bei den Prozyklen ist die Situation ausgeglichen.

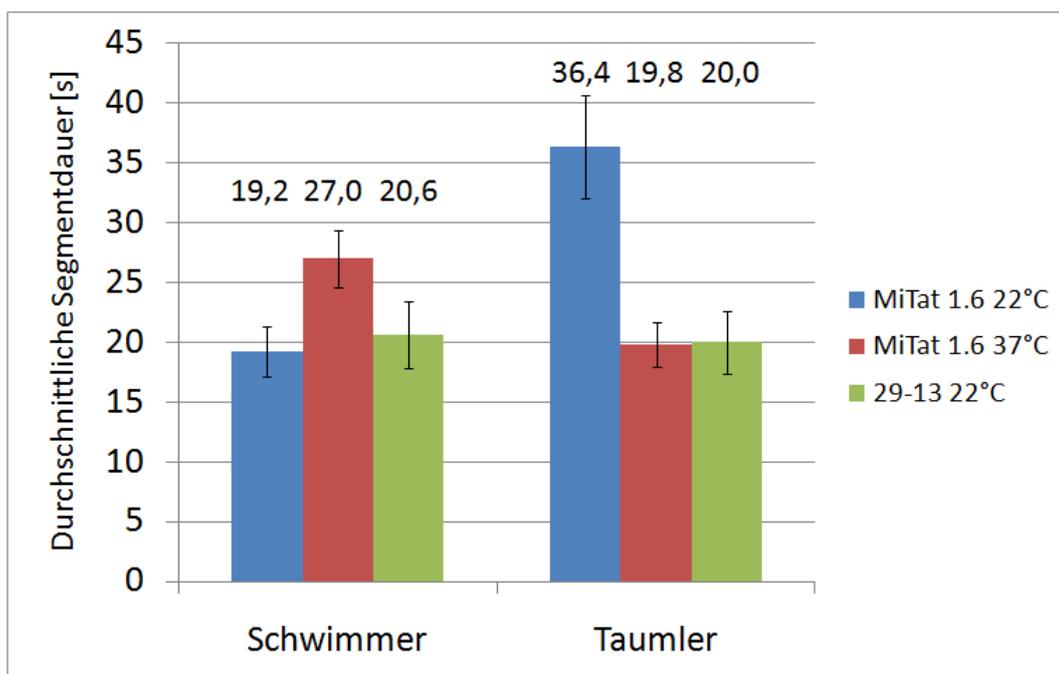


Abbildung 49: Durchschnittliche Dauer der Schwimm- und Taumelphasen für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C sowie Insektenstadien (Prozyklen, Zelllinie 29-13).

Eine Analyse der Segmentdauern von Trajektorien schaltender Organismen erlaubt zusätzlich Aussagen über das Schaltverhalten bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen. Die Ergebnisse einer solchen Betrachtung sind in Abbildung 49 dargestellt.

Die durchschnittlichen Segmentdauern sind gruppiert in Schwimmer- und Taumlersubklassen gezeigt, Blutstromformendaten (MiTat 1.6) sind blau (22°C) und rot (37°C), Insektenstadiendaten grün farbkodiert. Die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichungen der Mittelwerte der Segmentdauern an.

Folgende Werte wurden für die mittleren Segmentdauern bestimmt. Für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C wurden (36,4±4,3) s für Taumler und (19,2±2,1) s für Schwimmer erhalten, bei 37°C liegen die Werte bei (19,8±1,9) s bzw. (27,0±2,4) s. Die Werte für Insektenstadien (Zelllinie 29-13) liegen bei (20,0±2,6) s für Taumler- und (20,6±2,8) s für Schwimmersegmente.

Die Daten zeigen einige klare Trends für die mittlere Dauer der Segmente. Für die Schwimmersegmentdauern fällt direkt eine Temperaturabhängigkeit auf. Während die Segmente für beide Raumtemperaturdatensätze im Bereich von 20 s liegen (19,2 s für Blutstromformen und 20,6 s für Insektenstadien), ist die mittlere Schwimmdauer für Blutstromformen bei 37°C auf 27 s erhöht. Diese Beobachtung korreliert gut mit der für diesen Datensatz beobachteten hohen Ensemblegeschwindigkeit. Für die Taumeldauern ist das Bild anders. Hier sind die Werte für beide Lebenszyklusstadien nahe ihrer physiologischen Optimaltemperatur, MiTat 1.6 bei 37°C und 29-13 bei 22°C, vergleichbar (19,8 s und 20,0 s). Für Blutstromformen bei 22°C, also fern vom physiologischen Optimum, sind die Taumelphasen hingegen mit durchschnittlich 36,4 s deutlich verlängert. Insgesamt spiegeln die Segmentdauern gut das Ensembleverhalten wieder, wobei für den MiTat 1.6-Datensatz bei 37°C, bei dem die Schwimmphasen länger als die Taumelphasen sind, die höchste, für Insektenstadien, bei denen beide Phasen durchschnittlich gleich lang sind, eine mittlere und für Blutstromformen bei 22°C, wo die Taumelphasen dominieren, die niedrigste Geschwindigkeit gefunden wird.

Die biologischen Implikationen dieser Beobachtung werden in Kapitel 6 diskutiert.

5.5 Externe Referenzsysteme für die Schwimmzustände

In den vorhergehenden Kapiteln wurde auf Grundlage der Beobachtung von drei Schwimmmustern (Schwimmer, Taumler, schaltende Organismen) sowie eines charakteristischen Minimums in der Geschwindigkeitsverteilung bimodal schaltender Mikroschwimmer und der erfolgreichen Segmentierung von Trajektorien ein Zwei-Zustands-System für die Trypanosomenmotilität abgeleitet. Die abgeleiteten Schwimmmodi wurden innerhalb der jeweiligen Datensätze referenziert, d.h. bezogen auf die in den Messungen auftretenden Extremfälle von Organismen, die über die gesamte Messzeit hinweg überwiegend in einem der beiden Schwimmmodi verharren. Ein weiterer Ansatz zur Referenzierung besteht darin, Trypanosomen dazu zu bringen nur in einem der beiden Motilitätsmodi vorzuliegen.

Für den Zustand des Taumelns lässt sich mit gentechnischen Mitteln ein Referenzsystem herstellen. Hierbei wird die RNA-Interferenz-Technik (RNAi) verwendet, die es erlaubt

durch spezifische Degradation der entsprechenden Boten-RNA Gene sequenzspezifisch herabzuregulieren [81, 150]. Es kann also gezielt die Expression von Genen und damit die Synthese der Proteine, für die sie kodieren, unterdrückt werden. Diese Technik findet vor allem im Bereich der prozyklischen Trypanosomen (Insektenstadien) breite Anwendung [6, 33, 151]. Die Herunterregulation der Genexpression kann für die Motilität verschiedene Konsequenzen haben. Je nach adressiertem Gen kann ein unregelmäßiger Flagellenschlag ohne effektive Nettofortbewegung, eine Umkehr der Flagellenschlagrichtung, die zum Taumeln der Zelle führt, Unterdrückung der Flagellarwelle mit resultierender Paralyse des Organismus und sogar der Zelltod beobachtet werden (vgl. auch Kapitel 2.2) [6, 14]. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung der Blutstromformen gelegt, da diese die medikamentös zu adressierende und zugleich weniger gut untersuchte Form sind. Desweiteren wurde in den vorhergehenden Abschnitten gezeigt, dass die Schwimmparameter für Blutstrom- und Insektenformen sehr ähnlich sind, weshalb die Referenz für beide Stadien gültig ist. Aus diesen Gründen wurde als Referenzsystem für den Taumelzustand eine Motilitätsmutante von Blutstromformtrypanosomen verwendet. Die Wahl fiel dabei auf die Zelllinie 13-90/pZJM.DIC. Bei diesen transgenen Zellen wird die Expression der Gene, die für die intermediäre Kette der Dyneine (dynein intermediate chain, DIC) kodieren, unterbunden. Wie schon von der Gruppe um Bastin für eine transgene prozyklische Zelllinie gezeigt wurde, bei der RNAi gegen eine andere Dynein-Substruktur, die leichte Kette, angewendet wurde [6], resultiert dieses Herabregulieren in einer Unterdrückung des Vorwärtsflagellenschlages (tip-to-base) und der Ausbildung eines reinen Rückwärtsschlages (base-to-tip) [2]. Unter dem Postulat eines run-and-tumble-Motilitätsmechanismus, bei dem die Schwimmerklasse durch den Vorwärtsflagellenschlag und die Taumlerklasse durch den Rückwärtsflagellenschlag charakterisiert ist, kann die Mutante also als ein externes Referenzsystem für die Taumlerstadien herangezogen werden. Vergleichbare Schwimmparameter für diese beiden Datensätze ergäben gleichzeitig ein starkes Argument für den run-and-tumble-Mechanismus, während der bihelikale Schwimmmechanismus (vgl. Kapitel 2.2.7) das Auftreten von Taumelphasen nicht erklären kann.

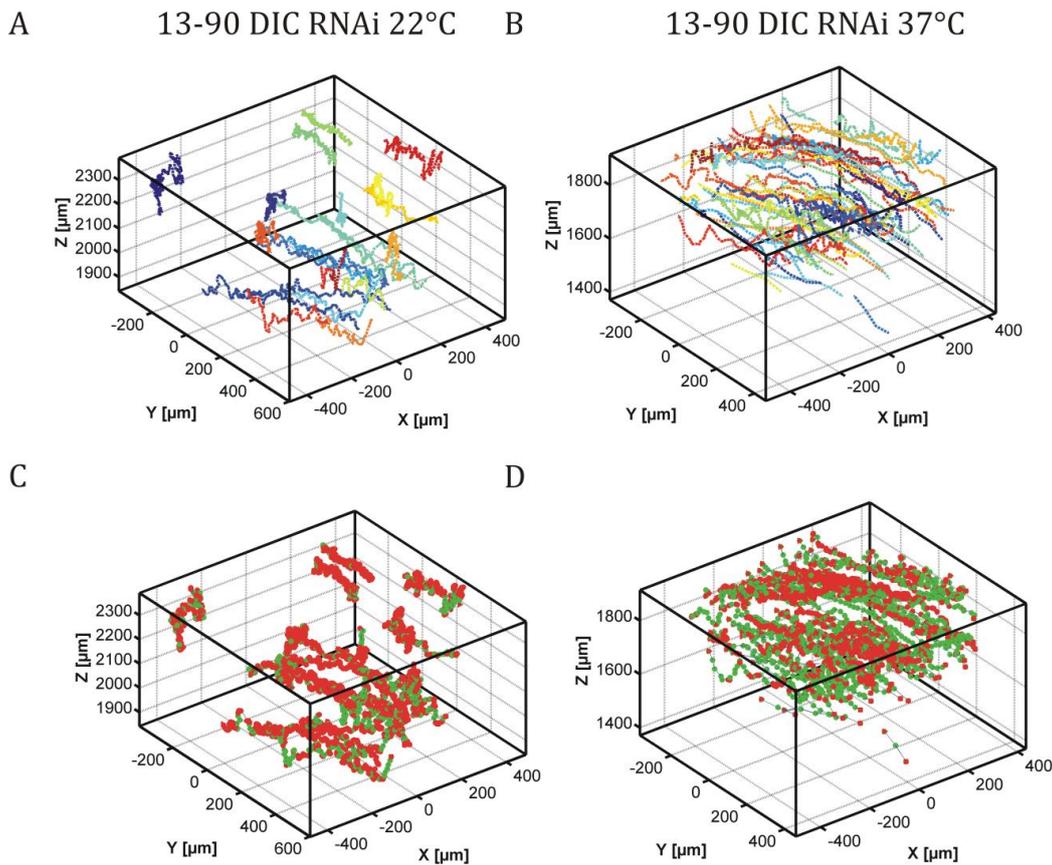


Abbildung 50: 3D-Darstellungen der Motilitätsmutanten-Datensätze (Zelllinie 13-90) bei 22°C (A, C) und 37°C (B, D). A, B) 3D-Darstellungen der analysierten Trajektorien, C, D) Trajektorien aus A und B mit geschwindigkeitsbasierter Farbkodierung, grün: Geschwindigkeiten > 5 µm/s, rot: Geschwindigkeiten < 5 µm/s.

Die Messungen an der Zelllinie 13-90/pZJM.DIC wurden in den auch für die Wildtypen verwendeten ibidi-Kanälen bei Temperaturen von 22°C und 37°C durchgeführt. Die erhaltenen Trajektorien sind in Abbildung 50 dargestellt. Im Vergleich zu den zuvor gezeigten Daten fällt direkt der unruhigere Trajektorienverlauf ins Auge, d.h. es finden häufige Änderungen des Schwimmwinkels statt. Aus der Farbkodierung in den Teilabbildungen C und D ist ebenfalls direkt die niedrige Fortbewegungsgeschwindigkeit ersichtlich.

Speziell in diesen Datensätzen sind die Datenpunkte nicht über die volle Kanalhöhe von 800 µm verteilt. Die detaillierte Analyse ergibt, dass in Rekonstruktionen entlang der Z-Achse (XZ- und YZ-Projektion) die obere und untere Grenze des Kanals lokalisiert werden können und diese einen korrekten Abstand von 800 µm aufweisen. Die Trypanosomen zeigen eine Akkumulation in Richtung der unteren Kanalgrenze (die 170 µm dicke Folie, vgl. Kapitel 4.3.2). Der Effekt kann auf das eingeschränkte Schwimmvermögen der Organismen zurückgeführt werden, das zur Sedimentation der Trypanosomen während der Vorinkubation geführt hat.

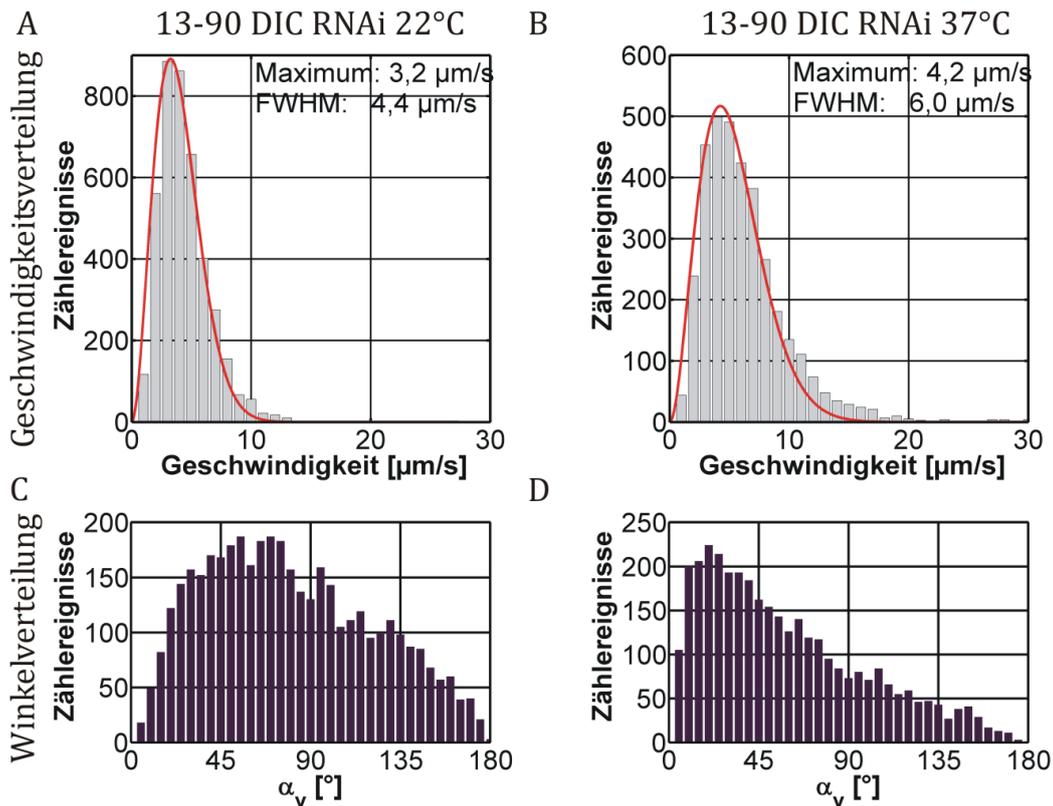


Abbildung 51: Schwimmparameter für Motilitätsmutantendatensätze (Zelllinie 13-90) bei 22°C (A, C) und 37°C (B, D). A, B) Geschwindigkeitsverteilungen, C, D) Winkelverteilungen.

Die charakteristischen Schwimmparameter und ihre Verteilungen für die Motilitätsmutante sind in Abbildung 51 gezeigt. Ein Vergleich mit den Taumlertrajektorien von Wildtyp-Blutstromformen bei identischen Messbedingungen ist in Tabelle 6 und Abbildung 52 gegeben.

Die gemessenen Schwimmparameter für das Referenzsystem (13-90/pZJM.DIC) vergleichen sich gut mit den Werten, die für die Taumlerklasse bei Wildtypzellen ermittelt wurden. Dies zeigt sich vor allem in Abbildung 52I und J, wo jeweils auf das Maximum normierte Fitkurven für die Geschwindigkeitsverteilungen der Mutantendatensätze und der zugehörigen Wildtypen-Taumlertrajektorien gezeigt sind. Die Kurvenverläufe und Lagen der Maxima zeigen eine sehr gute Übereinstimmung, die sich auch in den Werten für die wahrscheinlichste und mittlere Geschwindigkeit ($2,7 \mu\text{m/s}$ zu $3,2 \mu\text{m/s}$ und $2,80 \mu\text{m/s}$ zu $3,37 \mu\text{m/s}$ für 22°C bzw. $4,0 \mu\text{m/s}$ zu $4,2 \mu\text{m/s}$ und $4,53 \mu\text{m/s}$ zu $5,22 \mu\text{m/s}$ für 37°C) niederschlägt. Für die Schwimmwinkel wird mit $59,28^\circ$ zu $77,25^\circ$ bei 22°C und $72,01^\circ$ zu $55,97^\circ$ bei 37°C eine weniger starke Korrelation beobachtet. Allerdings sind die Fehlerbereiche für die Schwimmwinkel generell relativ groß und alle ermittelten Werte liegen in dem für die Taumlerklasse typischen Bereich.

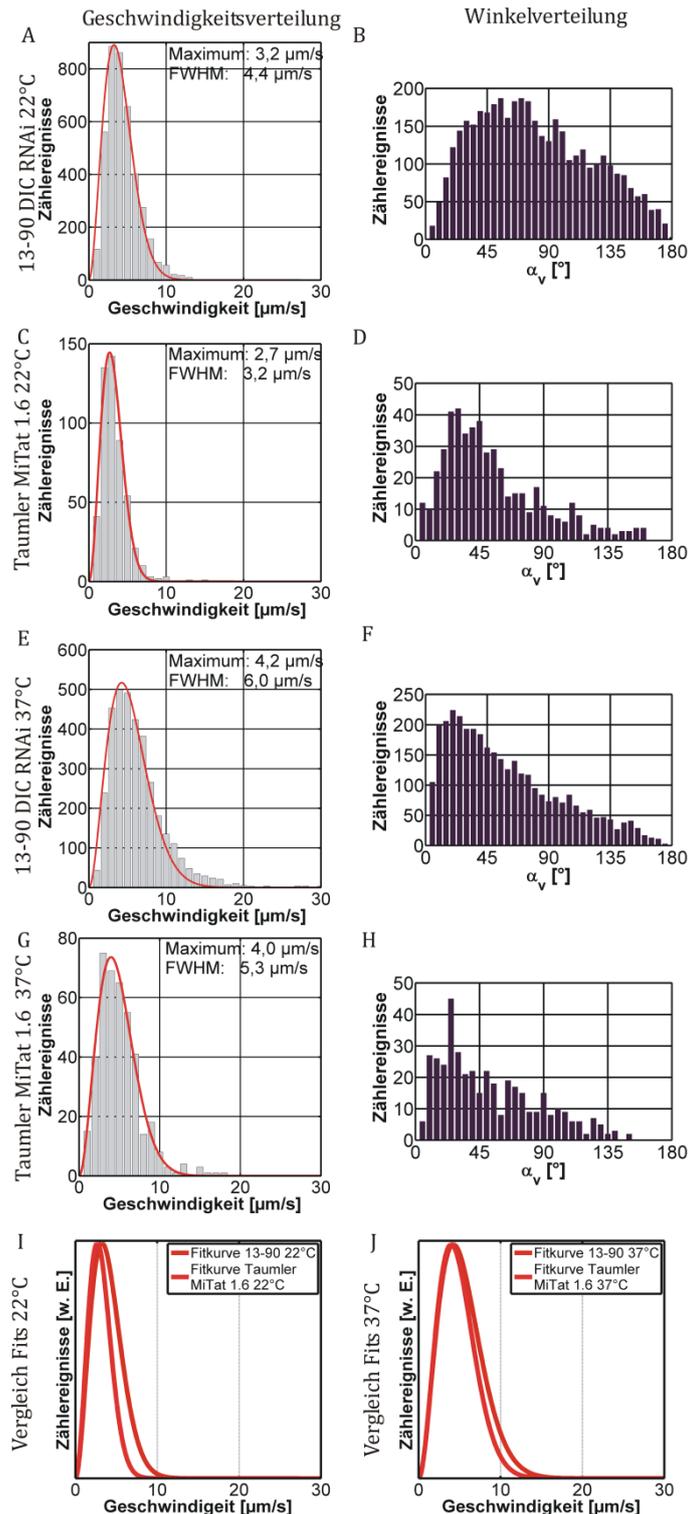


Abbildung 52: Vergleich Mutanten (13-90 DIC RNAi) mit der Taumlersubklasse für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C. A, C, E, G) Geschwindigkeitsverteilungen Mutanten (13-90 DIC RNAi, A) und Taumler Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (C) und 37°C (E, G). B, D, F, H) Winkelverteilungen Mutanten (13-90 DIC RNAi, B) und Taumlertrajektorien Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (D) und 37°C (F, H). I, J) Vergleich der Fitkurven über die Geschwindigkeitsverteilungen für Blutstromformen (MiTat 1.6) Taumler und der Ensembledaten der Motilitätsmutanten-Messreihen (13-90 DIC RNAi) bei 22°C (I) und 37°C (J), die Kurven sind zur besseren Vergleichbarkeit auf die Maxima normiert.

	MiTat 1.6 22°C Ensemble	MiTat 1.6 22°C Taumlertrajektorien	13-90 DIC RNAi 22°C	MiTat 1.6 37°C Ensemble	MiTat 1.6 37°C Taumlertrajektorien	13-90 DIC RNAi 37°C
Wahrscheinlichste Geschwindigkeit [µm/s]	3,60	2,70	3,20	5,60	4,00	4,20
Halbwertsbreite [µm/s]	5,30	3,20	4,40	7,40	5,30	6,00
Mittlere Geschwindigkeit [µm/s]	4,77	2,80	3,37	6,60	4,53	5,22
Standardabweichung der Geschwindigkeit [µm/s]	3,10	1,67	1,78	3,53	2,66	3,61
Standardabweichung des Mittelwerts [µm/s]	0,05	0,07	0,03	0,06	0,13	0,06
Mittlerer Schwimmwinkel [°]	46,49	59,28	77,25	48,85	72,01	55,97
Standardabweichung des Schwimmwinkels [°]	32,66	34,55	41,58	34,14	35,30	40,20
Standardabweichung des Mittelwerts [°]	0,56	1,55	0,65	0,60	1,75	0,68

Tabelle 6: Vergleich der charakteristischen Schwimmparameter für MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 22°C und 37°C (Ensemblewerte und Taumlertrajektorien) mit den für die Motilitätsmutantenzelllinie 13-90 bei 22°C und 37°C gemessenen Werten.

Die Übereinstimmung der Schwimmparameter hat mehrere Implikationen. Für die transgene Zelllinie ist bekannt, dass der Flagellenschlag nur in der umgekehrten Richtung, verglichen mit der gerichteten Bewegung bei Wildtypen, auftritt (also nur base-to-tip und kein tip-to-base) [2]. Die große Ähnlichkeit der aus Messungen an der Mutante bestimmten Trajektorien mit denen der Taumlerklasse des Wildtyps gibt daher einen starken Hinweis auf einen mechanistischen Zusammenhang der Laufrichtung der Flagellarwelle mit dem beobachteten Schwimmuster [6].

Für den Schwimmzustand existiert keine Möglichkeit der Referenzierung durch ein genetisches Konstrukt, da keine Mutante bekannt ist, bei der nur der Vorwärtsflagellenschlag beobachtet wird, während das Taumeln komplett unterdrückt ist. Es wurde allerdings gezeigt, dass Trypanosomen zum gerichteten Schwimmen angeregt werden können, indem man ihre Mikroumwelt modifiziert [2]. Ein Ansatz dieser Art besteht darin sog. Pillarfelder zu verwenden, d.h. regelmäßige Anordnungen von zylinderförmigen Mikrostrukturen. Hierbei wird die Situation im Blut nachgeahmt, wobei die Pillars den Einfluss von im Blut vorkommenden Hindernissen, wie Erythrozyten, darstellen. Der positive Effekte von Pillarstrukturen auf das gerichtete Schwimmen von

Trypanosomen wurde lichtmikroskopisch bestätigt, wobei bei sehr kleinen Pillarabständen Schwimmgeschwindigkeiten von bis zu $40 \mu\text{m/s}$ gefunden wurden [2]. Solche Experimente wurden auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Eine schematische Darstellung der Messung ist in Abbildung 53 gezeigt.

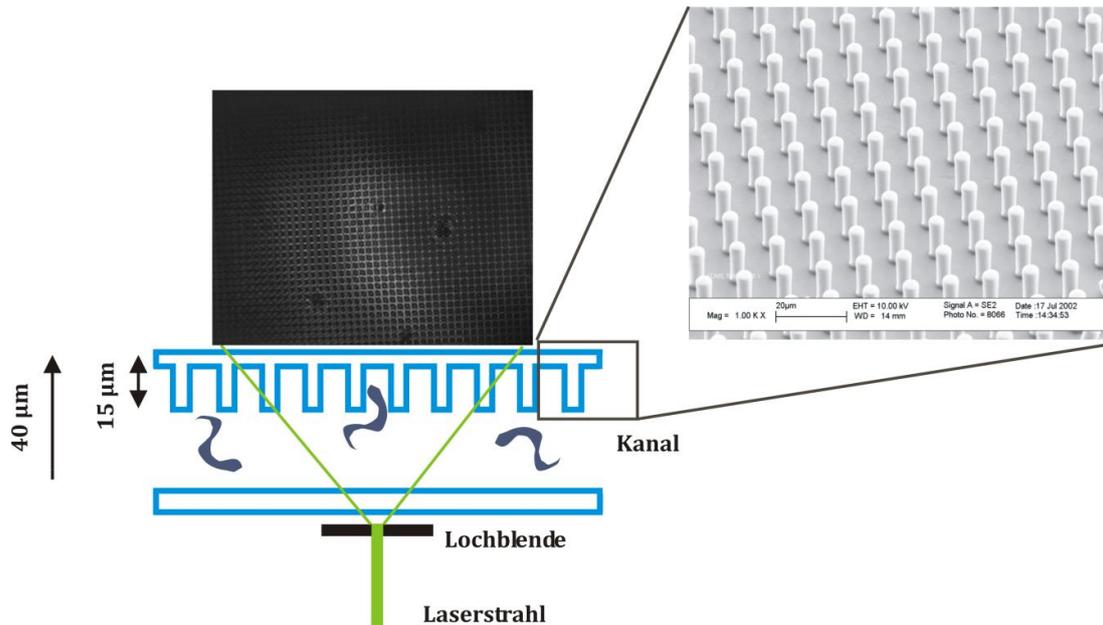


Abbildung 53: Schematische Darstellung des Aufbaus für Experimente mit mikrostrukturierten Kanälen.

Zur Verwendung kamen $40 \mu\text{m}$ hohe Mikrokanäle mit einer Grundfläche von $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$, deren obere $15 \mu\text{m}$ mit einem Feld von Säulen mit einem Durchmesser von $5 \mu\text{m}$ und einem Zentrum-zu-Zentrum-Abstand von $20 \mu\text{m}$ strukturiert sind. Die Kanäle wurden von Dr. Tamás Haraszti (Biophysikalische Chemie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Größe der Pillars ist mit denen von Erythrozyten im Blut, dem natürlichen Lebensraum der Trypanosomen, vergleichbar. Die Dichte ist allerdings geringer als die im Blut, da sowohl Messungen mit Erythrozyten in der natürlichen Konzentration von ca. 10^6 Zellen/ μl , als auch Versuche mit geringeren Pillarabständen (bis $4 \mu\text{m}$) aufgrund der hohen Objektdichte und der damit einhergehenden Verletzung des Royer-Kriteriums [92] (vgl. Kapitel 3.1) nicht rekonstruierbar waren.

Eine Photographie eines der in dieser Arbeit verwendeten Kanäle ist in Abbildung 54 gezeigt. Abbildung 53 zeigt zusätzlich eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Pillarfilds bei 1000facher Vergrößerung.

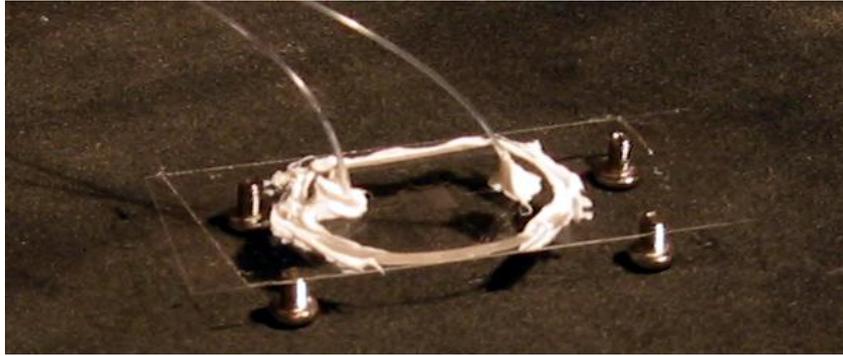


Abbildung 54: Kanalsystem für Experimente mit Pillarfeldern [Photographie zur Verfügung gestellt von T. Haraszti, Biophysikalische Chemie, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg].

Aufgrund des wesentlich geringeren Volumens der strukturierten Kanäle, bedingt durch die um den Faktor 20 geringere Höhe, im Vergleich zu den zuvor verwendeten ibidi-Kanälen, werden im gleichen Experimentzeitraum wesentlich weniger Trypanosomen abgebildet. Um trotzdem eine ausreichend gute Statistik zu erhalten, wurden für die in Abbildung 55 gezeigten Trajektorien die Daten aus vier Datensätzen kombiniert und somit eine Gesamtzahl von 25 Trajektorien erhalten.

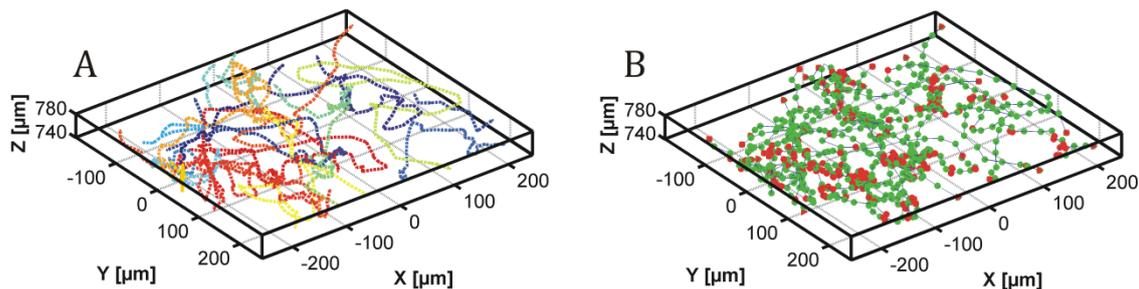


Abbildung 55: Kombinationsdatensatz aus vier Messreihen von Blustromformen (MiTat 1.6) bei 22°C in mikrostrukturierten Kanalsystemen.

Die in Abbildung 55 gezeigten Trypanosomentrajektorien stammen von Blustromformen (MiTat 1.6) bei 22°C und sind in der Teilabbildung A nach Organismen, in B nach Geschwindigkeiten, gemäß den zuvor verwendeten Konventionen, farbkodiert. Ein Vergleich mit Blustromformen bei der gleichen Temperatur in einem ibidi-Kanal zeigt, dass der Anteil mit hohen Geschwindigkeiten schwimmender Organismen (grüne Farbkodierung) wesentlich höher ist, als der in der Gesamtheit der Blustromformen im ibidi-Kanal.

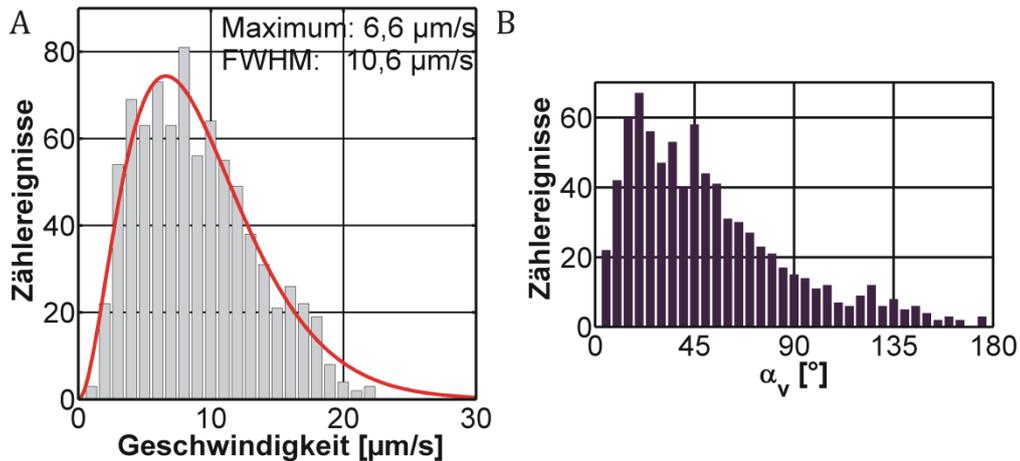
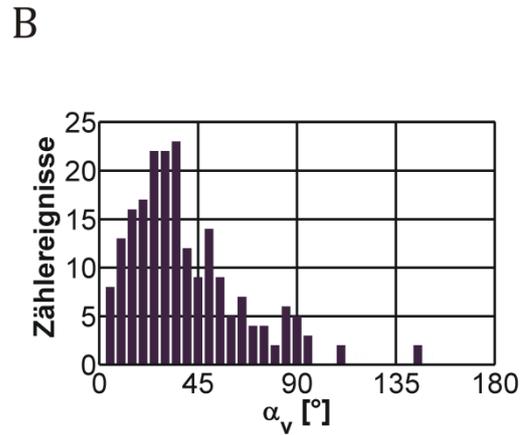
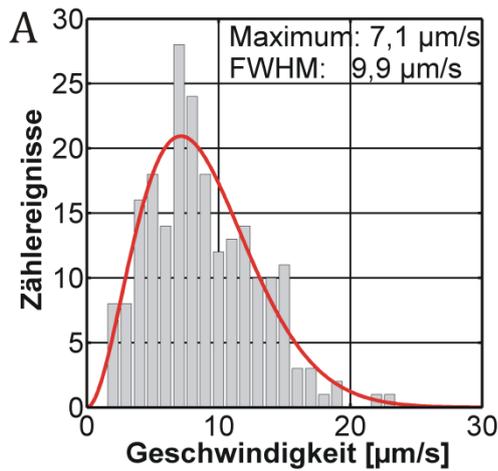


Abbildung 56: Schwimmparameter für Kombinationsdatensatz aus vier Messreihen von Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C in mikrostrukturierten Kanalsystemen. A) Geschwindigkeitsverteilung, B) Winkelverteilung.

	MiTat 1.6 22°C Ensemble	MiTat 1.6 22°C in Schwimmertrajektorien	MiTat 1.6 22°C in strukturierten Kanälen
Wahrscheinlichste Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	3,60	7,10	6,60
Halbwertsbreite [$\mu\text{m/s}$]	5,30	9,90	10,60
Mittlere Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	4,77	8,30	8,43
Standardabweichung der Geschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	3,10	4,13	4,42
Standardabweichung des Mittelwerts [$\mu\text{m/s}$]	0,05	0,28	0,15
Mittlerer Schwimmwinkel [$^\circ$]	46,49	39,13	47,36
Standardabweichung des Schwimmwinkels [$^\circ$]	32,66	28,54	36,05
Standardabweichung des Mittelwerts [$^\circ$]	0,56	1,97	1,27

Tabelle 7: Vergleich der charakteristischen Schwimmparameter für MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 22°C im ibidi-Kanal (Ensemblewerte und Schwimmertrajektorien) mit den in der mikrostrukturierten Umgebung gemessenen Werten.

Schwimmertrajektorien
MiTat 1.6 22°C



Ensemblewerte
Pillarfelder

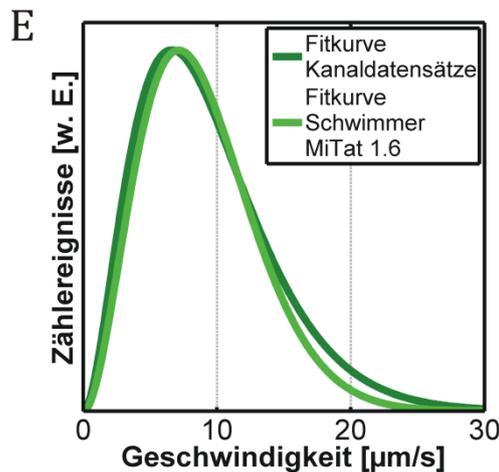
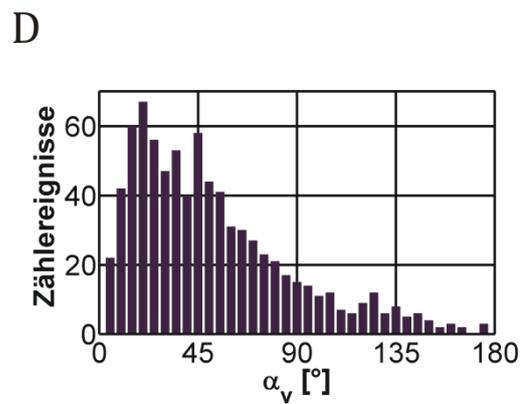
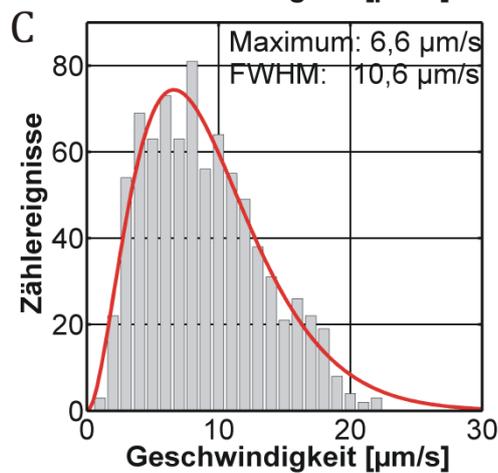


Abbildung 57: Vergleich Kanalexperiment mit Schwimmersubklasse für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C. A) Geschwindigkeitsverteilung Schwimmertrajektorien Blutstromformen (MiTat 1.6) 22°C, B) Winkelverteilung Schwimmertrajektorien Blutstromformen (MiTat 1.6) 22°C, C) Geschwindigkeitsverteilung Blutstromformen (MiTat 1.6) in Pillarkanälen (Kombinationsdatensatz) 22°C, D) Winkelverteilung Blutstromformen (MiTat 1.6) in Pillarkanälen (Kombinationsdatensatz) 22°C, E) Vergleich der Fitkurven über die Geschwindigkeitsverteilungen für Blutstromformen (MiTat 1.6) Schwimmer bei 22°C und der Ensembledaten in Pillarfeldern, die Kurven sind zur besseren Vergleichbarkeit auf die Maxima normiert.

Die erste optische Einschätzung bestätigt sich bei der Betrachtung der charakteristischen Schwimmparameter für die Parasiten in der mikrostrukturierten Umgebung. Die Werte sind zur besseren Übersicht tabellarisch dargestellt (s. Tabelle 7). Aus dem Vergleich der freien Schwimmer in unstrukturierten Kanälen mit den Trajektorien aus den Pillarfelddatensätzen ist deutlich erkennbar, dass sich die für beide Datensätze erhaltenen Werte vor allem bezüglich der Schwimmgeschwindigkeiten (wahrscheinlichste Geschwindigkeiten von $6,6 \mu\text{m/s}$ bzw. $7,1 \mu\text{m/s}$, mittlere Geschwindigkeiten von $8,43 \mu\text{m/s}$ bzw. $8,30 \mu\text{m/s}$) ausgezeichnet vergleichen. Das Ergebnis wird weiterhin durch den Vergleich der Geschwindigkeitsverteilungen in Abbildung 57 E gestützt, der eine sehr gute Überlagerung der Anpassungsfunktionen über die beiden Geschwindigkeitsverteilungen zeigt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Verteilungen auf ihre Maxima normiert. Dieses Ergebnis deckt sich mit der bei den Messungen gemachten Beobachtung, dass in den strukturierten Kanälen so gut wie keine Taumelphasen beobachtet wurden.

Bezüglich der Schwimmwinkel ist die Situation weniger eindeutig. Hier liegt der erhaltene Mittelwert von $47,36^\circ$ für MiTat in Pillarkanälen näher am Ensemblemittelwert in unstrukturierten Kanälen ($46,49^\circ$), als am Wert für Schwimmertrajektorien ($39,13^\circ$). Diese Abweichung lässt sich aus einer geometrischen Argumentation heraus erklären. Während ein gerichtet, also mit hoher Linearität, schwimmendes Trypanosom in einem freien $800 \mu\text{m}$ hohen ibidi-Kanal über lange Wegstrecken keine Hindernisse hat, trifft es in einem strukturierten Kanal, der nur $40 \mu\text{m}$ hoch ist und dessen obere $15 \mu\text{m}$ das Pillarfeld enthalten, häufig auf Hindernisse, wodurch es zu Richtungsänderungen und somit einer breiteren Verteilung der Schwimmwinkel kommt. In diesem Zusammenhang muss allerdings auch gesagt werden, dass der mittlere Schwimmwinkel für die Organismen im Pillarfeld noch in dem für Schwimmer beobachteten Bereich liegt.

Einige repräsentative Beispiele des Schwimmverhaltens von MiTat 1.6 (Blutstromformen) in den mikrostrukturierten Kanälen sind in Abbildung 58 gegeben. Hier werden Trajektorien aus einem der Pillardatensätze in Relation zum den Pillarpositionen gezeigt. Die Positionen der Pillarköpfe sowie der Kippwinkel des Feldes von $3,3^\circ$ in der XY-Ebene wurden aus Hologrammen abgeleitet. Man sieht deutlich, dass die Trajektorien bevorzugt in Pillarnähe verlaufen. Es treten Vorzugsrichtungen entlang der von den Säulen gebildeten Reihen oder quer dazu für Abschnitte linearen Schwimmens auf, die Trypanosomen fädeln sich also in die vorgegebene Struktur ein. In manchen Fällen wird nach dem Kontakt mit einem Pillar eine Richtungsänderung beobachtet. Hierin kann einer der oben beschriebenen Effekte auf den Schwimmwinkel, der vergleichsweise hoch ausfällt, gesehen werden. Der gesamte Trajektorienverlauf ist also stark von der strukturierten Seite des Kanals geprägt. Ein möglicher Grund dafür könnte ein Kontakt der Trypanosomen mit den Kanalstrukturen über ihre Flagellen sein, auch wenn sich der Zellkörper im freien Kanalbereich befindet. Solche Kontakte der Flagellen mit PDMS-Strukturen wurden auch für Kanalwände

unstrukturierter Mikrokanäle mit glatten Wänden, die ähnliche Abmessungen aufwiesen, beobachtet [2].

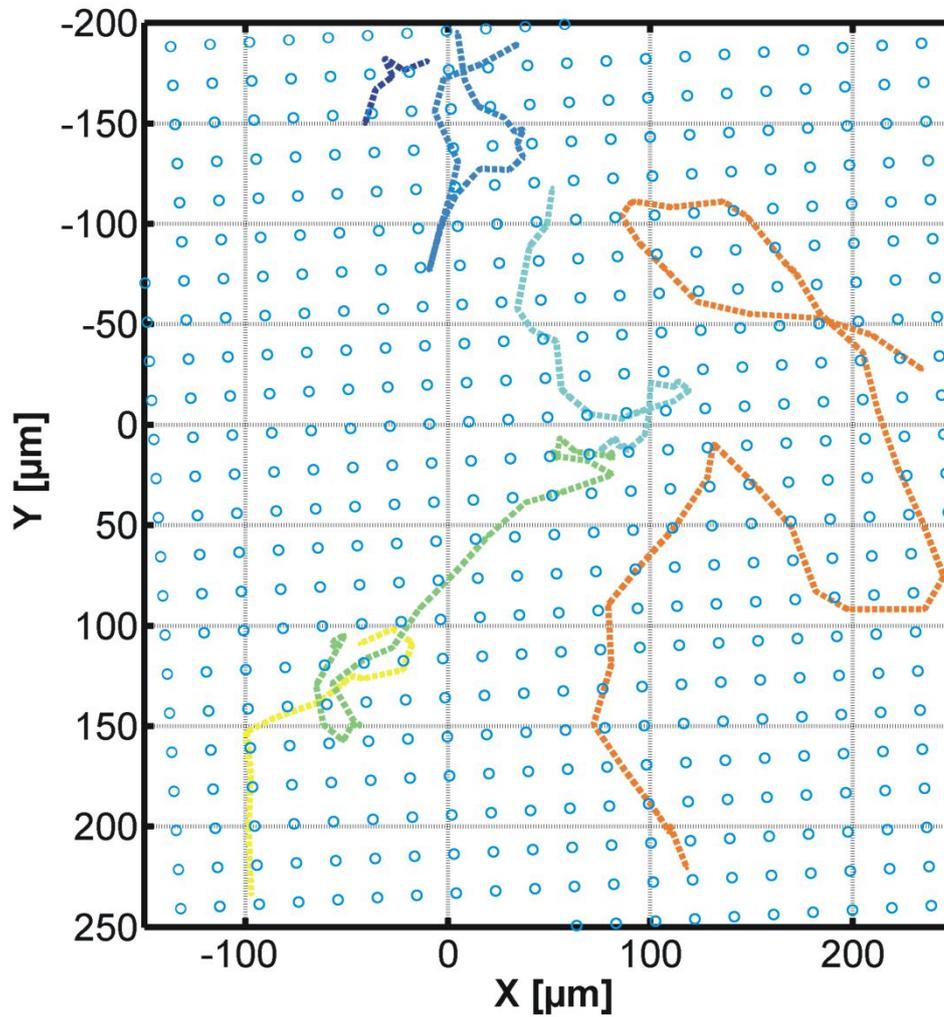


Abbildung 58: XY-Projektion der Trajektorien aus einem der MiTat 1.6-Datensätze (Blutstromformen) im strukturierten Kanal. In hellblau sind die Pillars maßstäblich dargestellt.

6 Diskussion

In diesem Kapitel werden die aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen des Schwimmverhaltens von *Trypanosoma brucei brucei* erhaltenen Ergebnisse zusammenfassend diskutiert und mit literaturbekannten Systemen und Erkenntnissen in Kontext gesetzt. Hierbei wird zuerst der Schwimmmechanismus, gefolgt von der beobachteten Temperaturabhängigkeit der Trypanosomenmotilität thematisiert. Während sich diese Diskussionsteile hauptsächlich auf die Blutstromformen beziehen, wird im letzten Abschnitt des Kapitels im Rahmen eines Vergleichs der ermittelten Motilitätsparameter von Blutstromformen- und Insektenstadien Trypanosomen auf die Adaption von Organismen des jeweiligen Lebenszyklusstadiumstyps auf ihre in der Natur vorherrschende Umgebung eingegangen.

6.1 Run-and-tumble-Zwei-Zustands-Modell der Motilität von *Trypanosoma brucei brucei*

Im vorhergehenden Kapitel wurde das Vorhandensein von zwei unterscheidbaren Schwimmmodi für Trypanosomen abgeleitet, aus deren Kombination sich die Gesamtmotilität ergibt. Es wurde dabei gezeigt, dass Organismen auftreten, die über den gesamten Beobachtungszeitraum in einem der beiden Modi (Schwimmen oder Taumeln) verbleiben. Diese bilden jedoch die Minderheit innerhalb eines Datensatzes (ca. 20%), wie man gut an farbkodierten Trajektorien sehen kann. Die Mehrzahl der beobachteten Zellen zeigt hingegen ein stochastisches Umschaltverhalten zwischen diese beiden Extremen. Diese Trajektorien lassen sich in Abschnitte, die in ihren Charakteristika den beiden beschriebenen Extremfällen, Schwimmen und Taumeln, ähneln segmentieren. Diese Beobachtung gilt für beide untersuchten Lebenszyklusstadien, also sowohl für Blutstromformen als auch für Insektenstadien. Das Schaltverhalten lässt sich besonders gut an der in dieser Arbeit beschriebenen Klasse der bimodal schaltenden Trypanosomen zeigen. Diese zeigen ein sehr wohldefiniertes Schaltverhalten, d.h. Segmente schnellen, gerichteten Schwimmens wechseln sich mit langsamen Abschnitten, ohne effektive Nettofortbewegung ab. Als Geschwindigkeitsschwellenwert zur Unterscheidung der Zustände lässt sich aus farbkodierten Darstellungen der Trypanosomentrajektorien sowie aus einem typischen Minimum der Geschwindigkeitsverteilungen ein Wert von $5 \mu\text{m/s}$ ableiten, der auch durch lichtmikroskopische Studien bestätigt wird [2]. Die Gültigkeit der Segmentierung lässt sich durch Referenzierung auf reine Schwimmer- und Taumlertrajektorien innerhalb der jeweiligen Datensätze, sowie auf Modellsysteme bestätigen. D.h. es liegen zwei grundsätzliche Schwimmmodi vor.

Als Referenzsystem für den Taumelzustand wurde eine Blutstromformtrypanosomenmotilitätsmutante gewählt, die nur zur Ausbildung eines base-

to-tip-Flagellenschlags fähig ist. Die Tatsache, dass die für diese Spezies erhaltenen Schwimmparameter gut mit denen für die Taumlersubklasse der Blutstromformwildtyptrypanosomen übereinstimmen bestätigt die Hypothese, dass Motilitätsmuster und Flagellenschlagrichtung korrelieren. Das Ergebnis wird ebenfalls durch die Studien der Gruppe um Bastin gestützt, die die Korrelation von base-to-tip-Flagellenschlag und Taumelphasen schon für Insektenstadien-trypanosomen, jedoch nicht, wie in dieser Arbeit durchgeführt, für Blutstromformen, zeigen konnten [6]. Sowohl in den hier verwendeten Blutstrom- als auch in den literaturbekannten Insektenstadienmotilitätsmutanten werden Gene, die für Bestandteile der äußeren Dyneinarme im Flagellum kodieren herunterreguliert, es werden jedoch unterschiedliche Proteinketten adressiert. Bei Blutstromformen ist dies die intermediäre, bei den Insektenstadien die leichte Kette von Dynein. In diesem Ergebnis zeigt sich auch eine weitere Bestätigung der Allgemeingültigkeit der in dieser Arbeit gemachten Klassifizierung der Trypanosomenmotilität, da die datensatzinterne Referenz, taumelnde Wildtypzellen, charakteristische Schwimmparameter zeigt, die sich gut mit den für die Mutante erhaltenen Werten decken.

Da keine Motilitätsmutante bekannt ist, die ausschließlich tip-to-base-Flagellarwellen, also nur gerichtetes Vorwärtsschwimmen zeigt, wurde für die externe Referenz des Schwimmezustands eine mit einem Pillarfeld modifizierte Probenkammer verwendet, in der Wildtypblutstromformen vermessen wurden. Die Mikrostrukturen wurden dabei in einer Größe gewählt (5 μm Durchmesser, 15 μm Höhe), die denen von roten Blutkörperchen entspricht, um physiologische Bedingungen nachzuahmen. Die Pillardichte musste jedoch geringer als die entsprechende Erythrozythenkonzentration in Blut gewählt werden, da eine zu hohe Objektdichte die Rekonstruktion der Hologramme unmöglich macht. Entsprechende Experimente wurden sowohl für hohe Pillardichten als auch unter Zugabe von Erythrozyten zur Probenlösung durchgeführt, erwiesen sich jedoch, wie erwartet, durch die Verletzung des Royer-Kriteriums [92] als nicht auswertbar. Bei den Messungen in Pillarfeldern wurde ein positiver Effekt auf das Schwimmverhalten der Trypanosomen beobachtet. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Arbeiten von Heddergott, die für mikrostrukturierte Probenkammern erhöhte Schwimmquoten und -geschwindigkeiten zeigen [2]. Diese Arbeit zeigt auch, dass der Effekt sich mit kleineren Pillarabständen noch maximiert und Schwimmgeschwindigkeiten von bis zu 40 $\mu\text{m/s}$ beobachtet werden können. Dies ist wahrscheinlich so zu verstehen, dass in den Pillarkanälen die Geometrie die Ausbildung von Taumelphasen verhindert, da gerichtet schwimmende Trypanosomen eine elongierte Zellform aufweisen und somit einen geringeren Platzbedarf zwischen den Pillars haben, als taumelnde Trypanosomen. Die stark erhöhte Geschwindigkeit bei kleinen Pillarabständen kann so gedeutet werden, dass in diesem Fall ein größerer Impulsübertrag an die Umgebung erfolgt, die Trypanosomen sich also quasi an den Hindernissen abstoßen. Im Rahmen dieser Argumentation erweist sich der hier verwendete Pillarabstand als guter Kompromiss, da wie die erhaltenen Schwimmgeschwindigkeiten zeigen, offensichtlich

Taumelphasen unterbunden, die Trypanosomen aber durch die Strukturen nicht künstlich beschleunigt worden sind.

Es wird beobachtet, dass schnell und gerichtet schwimmende Trypanosomen in Pillarfeldern Kontakt zu den Mikrostrukturen haben. Die Zellen „fädeln“ dabei sozusagen in die von der Umgebung vorgegebene Struktur ein und folgen den von den Mikrosäulen gebildeten „Kanälen im Kanal“. Dieses Verhalten wird sowohl entlang der von den Mikrosäulen gebildeten Reihen, als auch quer dazu beobachtet. Die Trajektorien der Organismen folgen der von Pillarfeld vorgegebenen Struktur. Das Resultat sind Trajektorien mit langen linearen Abschnitten, die anstelle von Taumelphasen von weiten Bögen voneinander getrennt sind, d.h. selbst bei Richtungsänderungen bleiben die Schwimgeschwindigkeiten hoch. Auch die von den Trypanosomen beschriebenen Bögen richten sich an der Strukturierung des Kanals aus und Richtungswechsel werden häufig in Pillarnähe oder mit Pillarkontakt beobachtet. Der Kontakt von Trypanosomen mit PDMS-Strukturen über ihre Flagellen wurde von Heddergott auch für die Kanalwände unstrukturierte Mikrokanäle mit vergleichbaren Abmessungen gezeigt [2]. Diese Beobachtung kann auf das natürliche Umfeld des verwendeten Trypanosomenstamms, nämlich die Blutbahn übertragen und als Vorstufe der Einwanderung des Parasiten in umliegendes Gewebe, wie es in späten Krankheitsstadien beobachtet wird, interpretiert werden. In diesem Punkt unterscheidet sich das Schwimmverhalten also deutlich vom freien Schwimmen in großen Volumina, wo Richtungswechsel im Allgemeinen von Taumelphasen eingeleitet werden.

Die Wichtigkeit der Strukturierung der Umgebung wird durch eine weitere Beobachtung unterstützt. Für Bakterien wurde gezeigt, dass die Effizienz und Geschwindigkeit ihrer Fortbewegung von der Viskosität des sie umgebenden Mediums abhängt, wobei eine Erhöhung der Viskosität beide Werte bis hin zu einem Optimum erhöht [152]. Dies scheint prinzipiell auch für Trypanosomen zu gelten, es ist jedoch entscheidend in welcher Art die Viskosität in der Mikroumgebung erhöht wird. So wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente mit Dextranen als viskositätserhöhenden Agenzien durchgeführt, die jedoch trotz der Verwendung verschiedener Dextrane (Dextran-40 und Dextran-150) und verschiedener Konzentrationen (0,1-10% Vol.) keine relevanten Unterschiede in der Motilität zeigten. Daraus kann geschlossen werden, dass nicht eine globale Erhöhung der Viskosität, sondern das lokale Vorhandensein von Hindernissen, im hier beschriebenen Fall der Pillars, den positiven Effekt auf das Schwimmverhalten in Vollblut ausmacht.

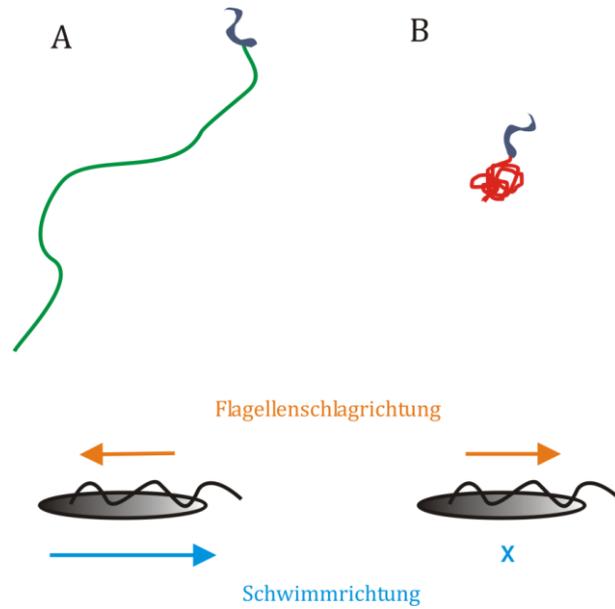


Abbildung 59: Korrelation der Schwimmmodi und der Nettofortbewegung (blau) mit der Flagellenschlagrichtung (orange). A) Schwimmermodus mit tip-to-base-Flagellenschlag und vorwärts gerichtetem Schwimmen. B) Taumlermodus ohne Nettofortbewegung mit base-to-tip-Flagellenschlag.

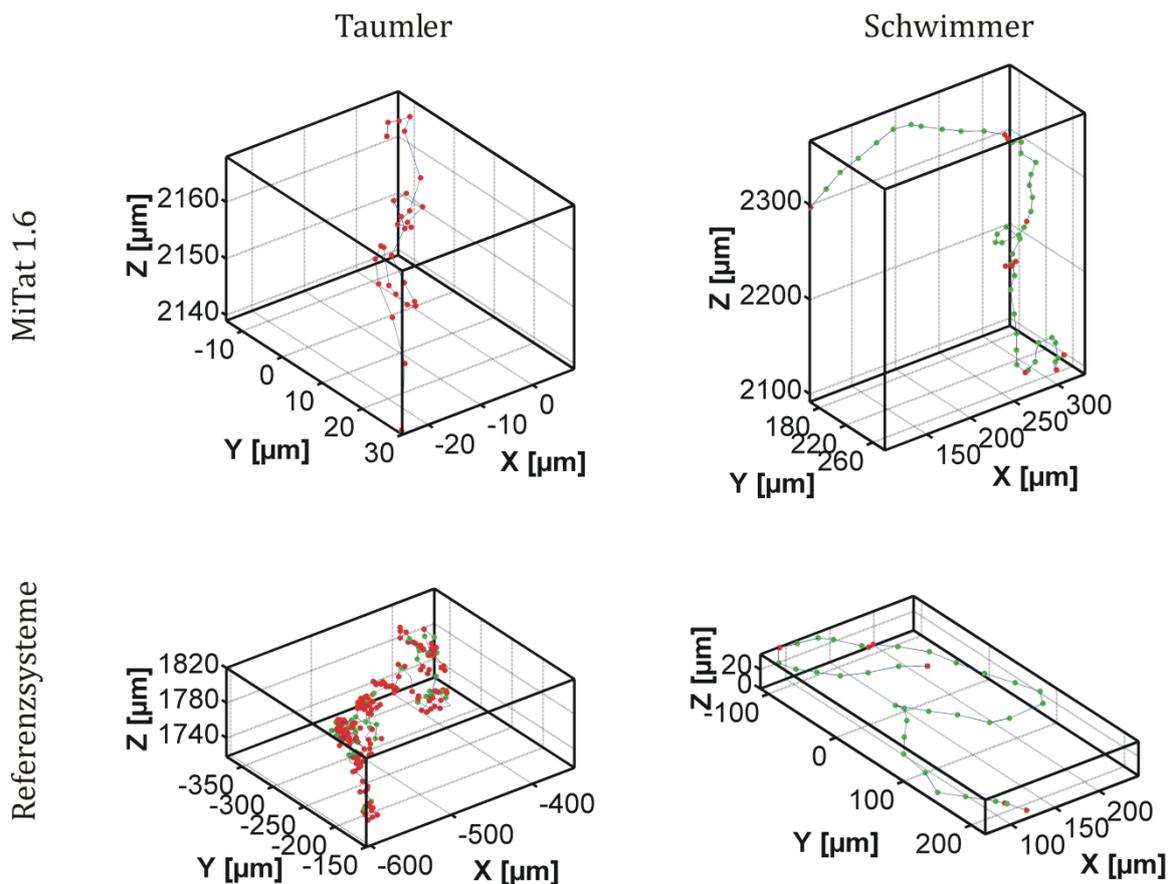


Abbildung 60: Der direkte Vergleich von Taumler- und Schwimmertrajektorien aus Wildtypendatensätzen mit den externen Referenzsystemen zeigt die sehr gute Übereinstimmung der Schwimmuster.

Auf mechanistischer Ebene werden die beiden Schwimmmodi mit dem Vorhandensein zweier Arten des Flagellenschlags korrelieren, nämlich einem Vorwärtsflagellenschlag (tip-to-base) für Schwimmer und einem Rückwärtsschlag (base-to-tip) während des Taumlerzustands (vgl. Abbildung 59). Die große Ähnlichkeit der Schwimmmuster, die in den hier durchgeführten Wildtypenmessungen und für die Referenzsysteme beobachtet werden (vgl. Abbildung 60), legt eine mechanistische Schaltanalogie nahe. D.h. nicht nur bei der Mutante sondern auch bei der Wildtypzelle findet während des Taumelns eine Umkehr der Flagellarwellenrichtung statt. Im Gegensatz zum genetisch auf einen Schwimmmodus festgelegten Referenzsystem können die Wildtypen zwischen beiden Modi hin- und herschalten, woraus sich das unterschiedliche Ensembleverhalten für Wildtypen und Referenzsysteme ergibt.

6.2 Vergleich der charakteristischen Kenngrößen für die beobachteten Schwimmmodi

Für die beiden Schwimmmodi des im vorhergehenden Abschnitt diskutierten Zwei-Zustands-Systems lassen sich für Schwimmgeschwindigkeiten und –winkel charakteristische Werte ableiten. Eine graphische Zusammenstellung ist in Abbildung 61 und Abbildung 62 gegeben.

In den gezeigten Abbildungen sind die in den jeweiligen Unterkapiteln abgeleiteten Werte für wahrscheinlichste Schwimmgeschwindigkeiten und –winkel für die Blutstromformtrypanosomen (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C sowie in Pillarfeldern, für Prozyklen (29-13) bei 22°C und für transgene Zellen, die nur zum Taumeln fähig sind (13-90) bei 22°C und 37°C zusammengestellt. Gezeigt sind die wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten und mittleren Schwimmwinkel für Schwimmer- und Taumlertrajektorien sowie Segmente und die Ensemblewerte. Aus dieser Darstellung lässt sich der lebenszyklusstadiums- und temperaturübergreifende Parameterraum für die beiden Schwimmzustände ableiten. Hierbei wurde die auch schon für die Trajektoriendarstellung angewandte Farbkodierung gewählt, rot für die Taumler-, grün für die Schwimmerklasse.

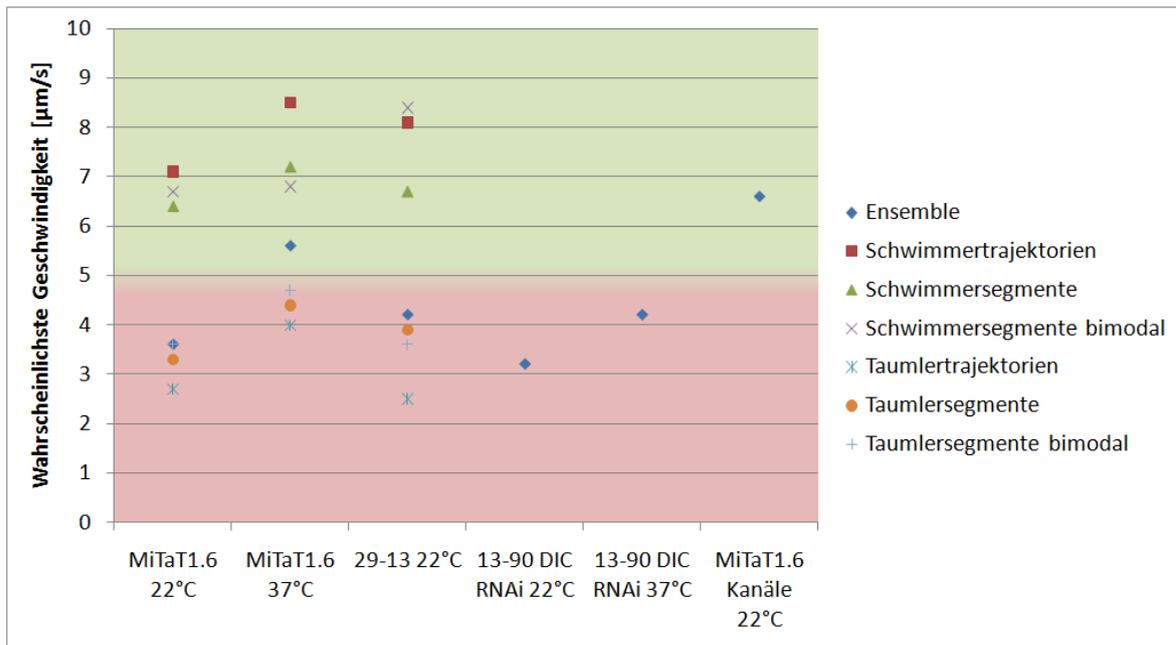


Abbildung 61: Wahrscheinlichste Geschwindigkeiten im Überblick.

Für die Schwimmgeschwindigkeiten werden über alle Datensätze hinweg für die Taumlerklassen wahrscheinlichste Geschwindigkeiten zwischen von ca. 2,5 $\mu\text{m/s}$ bis 4,5 $\mu\text{m/s}$ gefunden. Die Werte für die Schwimmerklassen liegen im Bereich von ca. 6,5 $\mu\text{m/s}$ bis 8,5 $\mu\text{m/s}$. Die Klassen sind deutlich unterscheidbar und die für die Wildtypenschwimmmodi erhaltenen Kenngrößen stimmen gut mit den für die Referenzsysteme erhaltenen Werte überein.

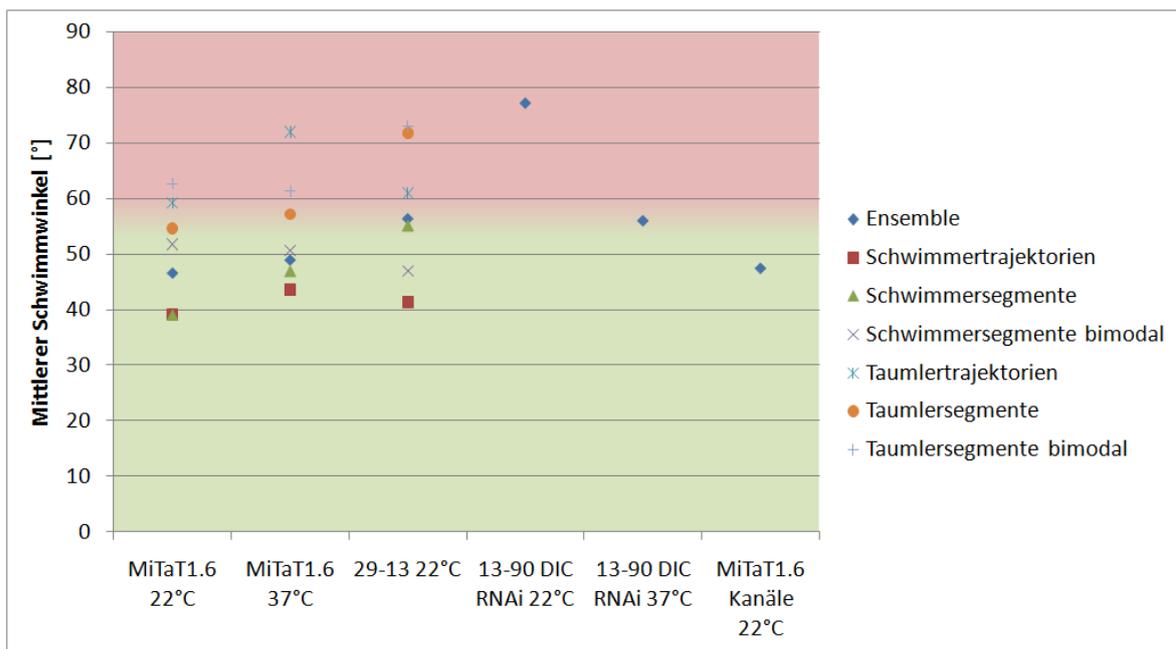


Abbildung 62: Mittlere Schwimmwinkel im Überblick.

Im Fall der Schwimmwinkel ist die Situation wie schon in Kapitel 5.2 dargestellt weniger eindeutig. Auch hier kann aber der allgemeine Trend beobachtet werden, dass die Mittelwerte für die beiden Schwimmzustände datensatzübergreifend in ähnlichen Bereichen liegen. Die weniger starke Auftrennung der Zustände ist auf die breiteren Verteilungen der Schwimmwinkel, verglichen mit den Geschwindigkeitsverteilungen, zurückzuführen. Trotzdem kann eine Abgrenzung bei ca. 55° getroffen werden. Die Schwimmmodi lassen sich also nicht nur visuell, sondern auch quantitativ durch ihre Schwimmgeschwindigkeiten und –winkel unterscheiden.

6.3 Temperaturabhängigkeit der relativen Population der Schwimmmodi von Blutstromformentrypanosomen

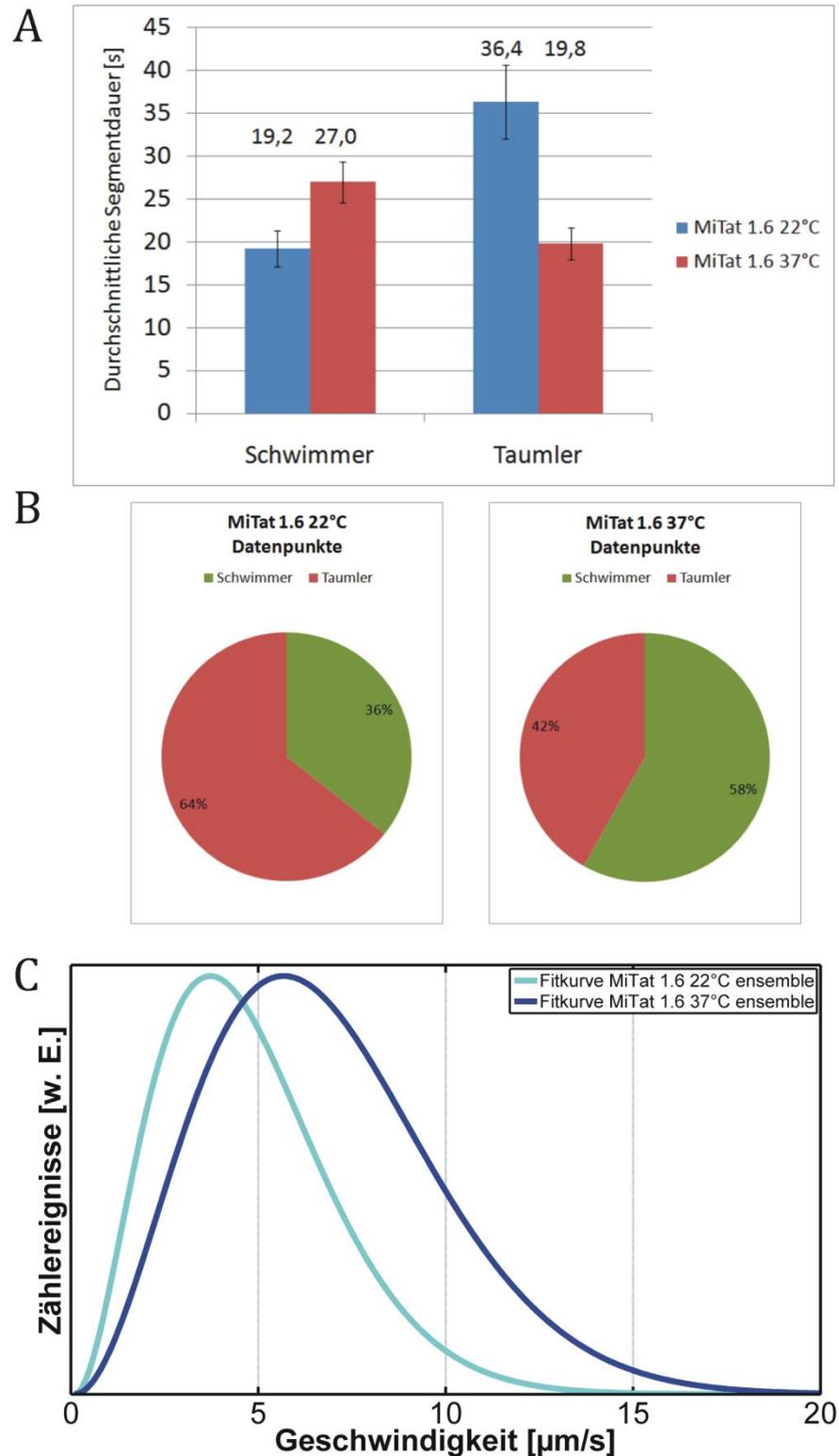


Abbildung 63: Zustandekommen der erhöhten Ensemblesgeschwindigkeiten von MiTat 1.6 bei Erhöhung der Temperatur von 22°C auf 37°C. A) Durchschnittliche Schwimm- und Taumelsegmentlänge, B) Population des Schwimmer- und Taumlerzustands für MiTat 1.6 bei 22°C und 37°C, C) Vergleich der Ensemblesgeschwindigkeitsverteilungen von MiTat 1.6 bei 22°C und 37°C.

Für Blutstromtrypanosomen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Temperaturabhängigkeit des Umschaltverhaltens zwischen Schwimm- und Taumelmodus gefunden. Es wird beobachtet, dass Schwimmphasen für Blutstromformen bei erhöhter Temperatur verlängert sind (19,2 s bei 22°C bzw. 27,0 s bei 37°C), wohingegen sich die Dauer der Taumelphasen bei Senkung der Temperatur auf 22°C im Durchschnitt fast verdoppelt (36,4 s bei 22°C vs. 19,8 s bei 37°C, vgl. Abbildung 63A). Für Blutstromformen kann also die Aussage getroffen werden, dass sich das Verhältnis von Schwimm- zu Taumeldauer mit Erhöhung der Temperatur zugunsten der Schwimmphasen verschiebt. Die Auswirkung dieses Effekts auf das Ensembleverhalten wird deutlich wenn die Schwimm- und Taumelquoten für die beiden MiTat-Datensätze verglichen werden (vgl. Abbildung 63B). Die Ensembleverteilung ist bei 22°C von Taumlern dominiert, während bei 37°C die Schwimmer überwiegen. Aus diesem Unterschied, in Kombination mit einer leichten Erhöhung der wahrscheinlichsten Schwimmgeschwindigkeiten bei 37°C verglichen mit 22°C, ergibt sich die Verschiebung der wahrscheinlichsten Ensemblegeschwindigkeit von MiTat 1.6 (Blutstromformen) um 2 $\mu\text{m/s}$, wobei die wahrscheinlichste Ensemblegeschwindigkeit für 22°C mit 3,6 $\mu\text{m/s}$ im typischen Taumler- und für 37°C mit 5,6 $\mu\text{m/s}$ im Schwimmerbereich liegt (vgl. Abbildung 63C).

Für run-and-tumble-Modelle bei Bakterien wurden ebenfalls Temperaturabhängigkeiten der Schwimmdauern beobachtet. Beispiele sind die Verlängerung der Schwimmphasen bei *E. coli* mit steigender Temperatur [153] und die temperaturbedingte Anpassung der Schwimmgeschwindigkeit für thermoacidophile Bakterien [154]. In diesen Beispielen haben die erhöhten Schwimmquoten den Sinn die Umgebung mit einer höheren Rate nach Chemokinen abzutasten (*E. coli*) um die temperaturbedingt erhöhte Diffusionsrate auszugleichen bzw., im Falle der Thermoacidophilen, die Population durch Ortsverlagerung vor dem Einfluss schädlich hoher Temperaturen zu schützen. Im Gegensatz zu Trypanosomen werden die Flagellen von Bakterien jedoch von einzelnen Rotationsmotoren angetrieben, deren Drehrichtung vom Anbinden von Signalproteinen an den selbigen abhängig ist (vgl. Kapitel 2.1). Die Regulation kann hier also durch die Kinetik der Signalproteinbindung beschrieben werden und ist damit per se temperaturabhängig, da sie auf der Ausbildung chemischer Gleichgewichte basiert [153]. Desweiteren ist im Falle von *E. coli* die Bindung der Proteine an den Motor von einer chemotaktischen Signalkaskade beeinflusst.

Im Fall der Trypanosomen ist die Lage komplizierter, da hier zur Fortbewegung die Ausbildung einer Flagellarwelle nötig ist. Diese erfordert wiederum die koordinierte Aktion von vielen Motorproteinen. Für diese Koordination, wird wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben die Existenz eines komplexen Regulationsmechanismus postuliert [54, 61, 83, 155], dessen genaue Funktionsweise jedoch noch unbekannt ist. Da die Aktion der Motorproteine ATP-getrieben ist, existiert neben der aktiven Regulation durch die Zelle weiterhin die Möglichkeit, dass die Bereitstellung von Nährstoffen für die ATP-Produktion und somit der Temperatureinfluss auf die Diffusion der Nährstoffe zur Zelle sowie die

Temperaturabhängigkeit der Verstoffwechslung der Nährstoffe einen Einfluss hat. Im Falle der Blutstromformen ist die Energiequelle für die Motoren ausschließlich Glucose [156]. In im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten bei denen der Probenlösung anstelle von Glucose 2-Desoxyglucose zugesetzt wurde, die nicht verstoffwechselt werden kann, zeigte sich, dass schon kleine Desoxyglucosekonzentrationen zur vollständigen Immotilität der Zellen führten. Diese Beobachtung deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Notwendigkeit von Glucose als Energiequelle für Blutstromformen.

In jedem Fall hat die erhöhte Schwimmquote der Blutstromtrypanosomen bei 37°C eine klare biologische Indikation. Nur bei gerichtetem Schwimmen sind Trypanosomen in der Lage gemäß dem molecular-sails-Mechanismus oberflächengebundene Antikörper aufzunehmen und somit der Immunantwort des Wirtes zu entgehen [16]. Da 37°C das physiologische Optimum für Blutstromformen darstellt erscheint es logisch, dass sie bei dieser Temperatur eine erhöhte Schwimmquote zeigen, da die Temperaturerhöhung ein Indiz für das feindliche Umfeld im Wirt ist. Ein weiteres Anzeichen dieser Optimierung und Anpassung an äußere Faktoren ist eine erhöhte Fluidität der Trypanosomenmembranen bei 37°C, wodurch der Transport von Antikörpern auf der Zelloberfläche und somit deren Endozytose erleichtert wird, was dem Parasiten ermöglicht der Immunantwort auszuweichen [157].

6.4 Die Lebenszyklusstadien von *Trypanosoma brucei brucei* sind auf die physiologischen Bedingungen optimiert

Vergleicht man beide in dieser Arbeit verwendeten Lebenszyklusstadien (Blutstromformen und prozyklische Insektenstadien), so fällt auf, dass maximale Schwimmgeschwindigkeiten bei den Wildtypenmessungen für Blutstromformen bei 37°C und Insektenstadien beobachtet werden (vgl. Abbildung 64). Ebenso werden für diese beiden Datensätze bei der Segmentdaueranalyse der schaltenden Trajektorien längere Schwimm- als Taumelphasen beobachtet, wobei der Effekt nur für die Blutstromformen signifikant ausgeprägt ist (vgl. Abbildung 65). Im Gegensatz dazu werden für Blutstromformen bei 22°C, also weit entfernt von ihrer Optimaltemperatur, reduzierte Schwimmgeschwindigkeiten (Abbildung 64) und stark verlängerte Taumelphasen (Abbildung 65) beobachtet.

Aus dieser Feststellung kann eine starke Adaption der beiden Lebenszyklusstadien an ihre physiologischen Bedingungen abgeleitet werden. Häufiges und schnelles gerichtetes Schwimmen tritt nur auf, wenn die Messbedingungen, den im jeweiligen Lebensraum vorherrschenden Bedingungen ähneln. Diese Adaption wird auch in den erhöhten Schwimmgeschwindigkeiten von MiTat 1.6 (Blutstromformen) in mit Pillars strukturierten Kanälen deutlich.

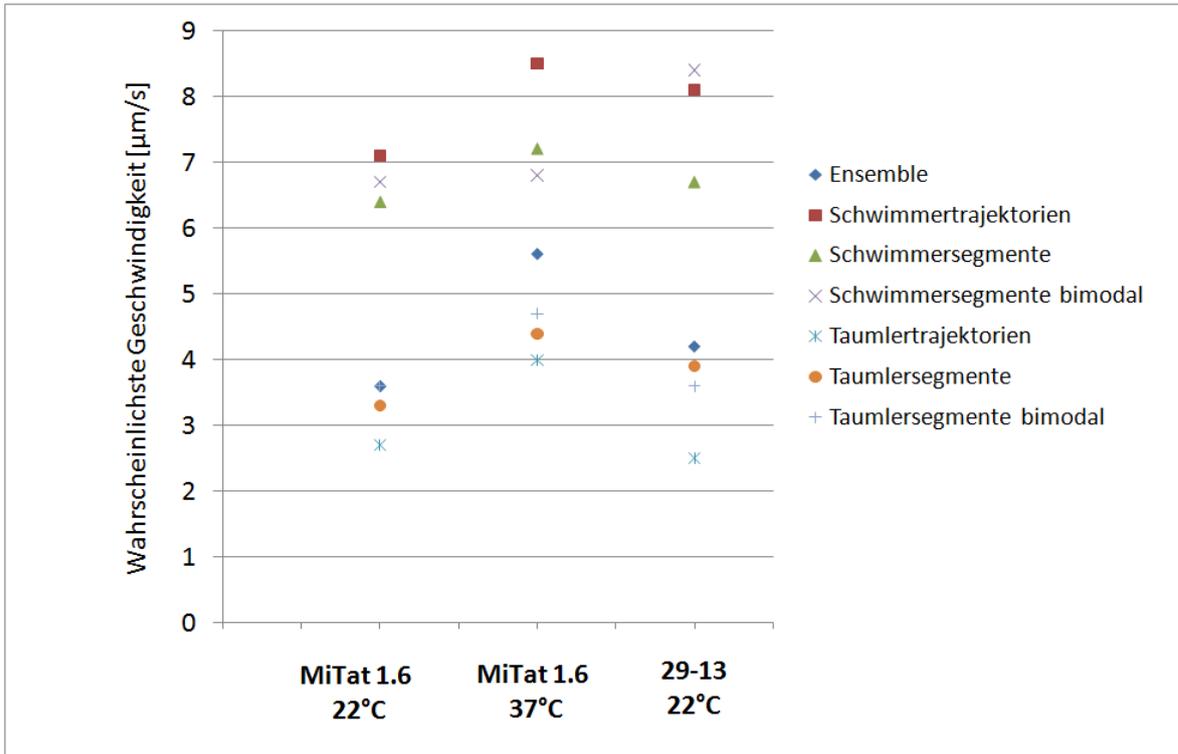


Abbildung 64: Wahrscheinlichste Trajektorien- und Segmentgeschwindigkeiten für Blutstromformentrypanosomen (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C sowie für Insektenstadientrypanosomen (29-13).

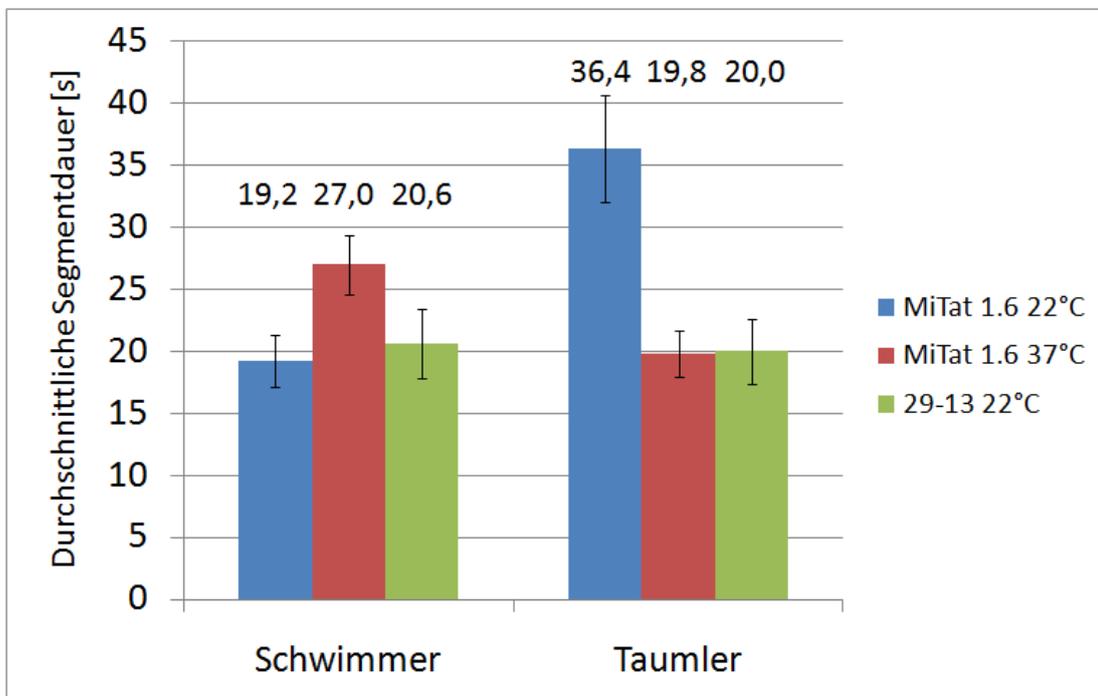


Abbildung 65: Durchschnittliche Dauer der Schwimm- und Taumelphasen für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C sowie Insektenstadien (Prozyklen, Zelllinie 29-13).

Aus biologischer Sicht lassen sich hier einige Interpretationen tätigen. Der wichtigste Punkt hierbei ist das Verhältnis von Schwimm- zu Taumelphasen. Die große Dominanz der Taumelphasen der Blutstromformtrypanosomen bei 22°C zeigt deutlich, dass die Zellen nicht auf diese Bedingungen optimiert sind. Blutstromformen kommen, wie der Name sagt, im Blutkreislauf des Wirtes vor, wo sie ständig Antikörpern ausgesetzt sind. Im Rahmen des molecular-sails-Mechanismus muss sich ein Blutstromtrypanosom aus biologischer Sicht möglichst ständig in gerichteter Vorwärtsbewegung befinden. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen recht deutlich welche Faktoren dieses Verhalten auslösen, nämlich die erhöhte Temperatur (vgl. z.B. Abbildung 26) und das Vorhandensein von Hindernissen in der Größenordnung einiger Mikrometer (vgl. Pillarfelder, z.B. Abbildung 55).

Bei den prozyklischen Trypanosomen stellt sich die Frage, warum im Gegensatz zu Blutstromformen bei 37°C, deren Ensembleverhalten von Schwimmern dominiert ist, die durchschnittliche Taumeldauer (20,0 s) auch bei Messbedingungen, die denen ihrer natürlichen Umgebung im Fliegendarm relativ nahe kommen im gleichen Bereich wie die Schwimmdauern (20,6 s) und die wahrscheinlichste Ensemblegeschwindigkeit mit 4,2 µm/s im Taumlerbereich liegt. Die Antwort ist wohl darin zu sehen, dass die Notwendigkeit des gerichteten Schwimmens in dieser Umgebung weniger stark ausgeprägt ist. Prozyklische Trypanosomen sind in der Fliege keinen Attacken durch das Immunsystem ausgesetzt, es müssen also keine Antikörper auf der Zelloberfläche transportiert werden und auch die Notwendigkeit der Fortbewegung in der Fliege zu Ausbreitungszwecken ist im Vergleich zu in das Wirtsgewebe einwandernden Blutstromformen weniger ausgeprägt.

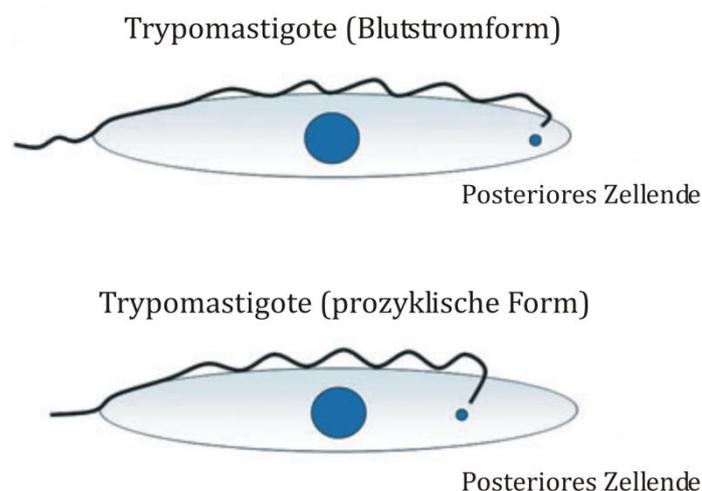


Abbildung 66: Position des Flagellenursprungs relativ zum Zellkern (blauer Kreis) zeigt für Blutstromform (oben) und prozyklisches Insektenstadium (unten) [156].

Die beobachtete Adaption im Verhalten geht mit einer morphologischen Veränderung einher. So liegen beide Zelllinien als Trypomastigoten, d.h. in einer elongierten Zellform,

vor, die Positionen der Kinetoplastiden, an denen die Flagellen entspringen unterscheiden sich aber zwischen Blutstromformen und Prozyklen (vgl. Abbildung 66).

Der Grund für diesen Unterschied im Aufbau der Zelle ist noch unverstanden [156]. Es ist jedoch möglich, dass diese unterschiedlichen Zellproportionen im Rahmen der resultierenden hydrodynamischen Eigenschaften der Zelle einen Beitrag zum schnelleren Schwimmen der Prozyklen beim niedrigen Temperaturpunkt haben.

Wahrscheinlicher ist jedoch ein energetischer Beitrag, da zwar die Flagellengrundstruktur für beide Stadien identisch ist, sich aber die Mechanismen der Energiebereitstellung unterscheiden. In beiden Fällen werden die Motoren durch ATP angetrieben, jedoch unterscheiden sich die Quellen des Energielieferanten von Blutstrom- und prozyklischen Formen. Das ATP wird in beiden Fällen in speziellen Zellorganellen, den Glykosomen generiert [158]. Da die Blutstromformen in ihrer natürlichen Umgebung ständig von ausreichend hohen Glucosekonzentrationen umgeben sind, kann hier ATP durch Glykolyse bereitgestellt werden. Im Fall der Prozyklen steht Glucose nur aus dem Blut zur Verfügung, das die Tsetse-Fliegen bei Biss eines Menschen oder Tieres aufnehmen. Dieses wird zum Großteil sofort metabolisiert und die Hauptenergiequelle zur ATP-Produktion sind Aminosäuren, wobei aber nach wie vor Glucose metabolisiert werden kann. Die ATP-Generierung an sich findet für beide Zelllinien in Glykosomen statt, aber die für beide Metabolismuswege benötigte Enzymausstattung ist unterschiedlich [158]. Hierin kann eine weitere Erklärung für die höhere Schwimmquote der Prozyklen verglichen mit Blutstromformen bei niedrigen Temperaturen gesehen werden, da die Abbauwege der Energieträger jeweils auf die Gegebenheiten für die beiden Lebenszyklusstadien, also auch unterschiedliche Temperaturen, optimiert sind.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Motilität des Blutparasiten *Trypanosoma brucei brucei*, dem Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit, mittels digitaler in-line Holographie untersucht. Diese Mikroskopiemethode erlaubt die Aufnahme vierdimensionaler Datensätze (drei Raum- und die Zeitkoordinate) mit hohen räumlichen und zeitlichen Auflösungen. Holographische Mikroskope arbeiten mit kohärenter Strahlung und nehmen Streumuster auf, in denen die komplette Rauminformation des zu untersuchenden Objekts in jedem einzelnen Bild kodiert ist. Daher ist im Gegensatz zu klassischen Mikroskopietechniken kein Rastern über die Probe nötig, das die Zeitauflösung limitiert. Auch die Notwendigkeit sich auf die Beobachtung einzelner Organismen in kleinen Sichtfeldern zu beschränken, weil z.B. die Kamera der Trajektorie folgen muss, um diese aufzunehmen entfällt, da das gesamte Sichtfeld zeitgleich mit seiner vollen räumlichen Information aufgenommen wird. Viele biologische Systeme werden aufgrund dieser Nachteile klassischer 3D-Mikroskopietechniken standardmäßig nur unter Lichtmikroskopen, und somit in 2D untersucht. Da sich Mikroschwimmer aber immer in strukturierten dreidimensionalen Umgebungen bewegen sind auch ihre Trajektorien selbst intrinsisch dreidimensional. Somit geht bei Betrachtung der 2D-Projektion in einem klassischen Mikroskop Information verloren. Desweiteren limitieren klassische Mikroskopieaufbauten durch ihre begrenzte Tiefenschärfe die Maximalhöhe der Probenkammern, weshalb Mikroschwimmer oft in Lösungen zwischen Objektträger und Deckglas untersucht werden. Aus solchen Experimenten lassen sich durch die räumliche Einschränkung keine Rückschlüsse über das freie Schwimmverhalten machen. Die Anwendung der holographischen Methode bietet daher nach unserem Wissen erstmalig die Möglichkeit der quantitativen Analyse frei schwimmender Trypanosomen in großen Volumina.

Zur Durchführung der Messungen wurde ein portables, temperaturregulierbares holographisches Mikroskop entwickelt. Das Gerät wurde auf die speziellen Anforderungen bei Messungen von Mikroschwimmern optimiert. Hierzu wurde ein temperaturstabiler Inkubator gebaut, der bis auf den als Lichtquelle verwendeten Laser und die Kamera alle Bauteile umschließt. Die Manipulation der Probe erfolgt von außen über flexible Wellen. Die verwendeten Probenkammern wurden auf Biokompatibilität und die Abwesenheit von messungsverfälschenden chemotaktischen Effekten getestet.

Zielsetzung der durchgeführten Messungen war es die Motilitätsmechanismen von *Trypanosoma brucei brucei* zu verstehen. Das Verständnis der Motilität ist von großer Bedeutung, da es neben der Zellproliferation- und -migration auch mit der Pathogenität des Parasiten zusammenhängt, da er in der Lage ist durch gerichtetes Schwimmen oberflächengebundene Antikörper „abzuwaschen“ und somit der Immunantwort

auszuweichen. Quantitative Untersuchungen des Schwimmverhaltens sind jedoch rar und es existiert kein allgemein akzeptiertes Modell für die Motilität des Parasiten.

Experimente wurden an Wildtypzellen von *Trypanosoma brucei brucei* in zwei unterschiedlichen Lebenszyklusstadien, nämlich der im Überträger, der Tsetse-Fliege, vorkommenden prozyklischen Form und den im infizierten Wirt vorkommenden Blutstromformen, bei zwei Temperaturpunkten durchgeführt. Aus Analysen der erhaltenen Daten konnte ein run-and-tumble-Zwei-Zustands-Modell für die Motilität von Trypanosomen abgeleitet werden. Das Modell ist für beide Lebenszyklusstadien gültig und konnte durch die Referenzierung auf externe Standards bestätigt werden. Für den Taumelzustand wurde eine Blutstromformenmotilitätsmutante verwendet, für die Referenzierung des Schwimmerzustands wurden Trypanosomen in komplex strukturierten Mikrokanälen untersucht, in denen das Taumeln geometrisch gehindert ist.

Für beide Schwimmmodi konnten charakteristische Kenngrößen für Schwimmgeschwindigkeiten und –winkel abgeleitet werden. Aus der Analyse der relativen Population der beiden Schwimmmodi ließen sich Aussagen über das Zustandekommen des Ensembleverhaltens innerhalb der Datensätze und die Adaption der beiden Lebenszyklusstadien an ihre physiologischen Bedingungen machen.

Zusammenfassend wurde erstmals eine quantitative dreidimensionale Motilitätsstudie an *Trypanosoma brucei brucei* durchgeführt, die ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden Motilitätsmechanismen erlaubt und somit einen wichtigen Beitrag in der Diskussion der Motilitätsmechanismen des Blutparasiten liefert. Desweiteren wurde gezeigt, dass die holographische Methode erfolgreich auch auf die Analyse anspruchsvoller Mikroorganismen anwendbar ist.

8 Anhang A

8.1 Segmentierung bimodal schaltender Trajektorien

Segmentierungsergebnisse, wie sie nach Anwendung des in dieser Arbeit abgeleiteten Schemas (Abbildung 35) auf reale Datensätze erhalten werden, sind in Abbildung 67 gezeigt. Dargestellt sind jeweils die bimodal schaltenden Trajektorien für Blutstrom- und Insektenstadien (Abbildung 67 A, D und G) mit den als Schwimmer (Abbildung 67 B, E und H) und als Taumler (Abbildung 67 C, F und I) klassifizierten Segmenten. Bei der Segmentierung ließen sich insgesamt 92,2% der Segmente eindeutig der Schwimmer- oder Taumlerklasse zuordnen. Die nicht eindeutig zuzuordnenden 7,8% der Segmente wurden bei den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Die in Abbildung 67 gezeigten Segmente stimmen optisch gut mit den in Abbildung 30 und Abbildung 31 gezeigten Schwimmer- und Taumlermotilitätsklassen überein. Zur detaillierten Untersuchung der Segmente wurde neben anderen Parametern auch die Schwimmgeschwindigkeit ausgewertet (vgl. Abbildung 69). Um diese Geschwindigkeitsinformationen zu interpretieren und zu validieren, ist eine Referenz notwendig. Hier wurden die jeweils schnellsten und langsamsten ca. 10% der Trajektorien jedes Datensatzes gewählt und den Extremfällen Schwimmer bzw. Taumler zugeordnet. Alle als Referenz genutzten Schwimmertrajektorien weisen wahrscheinlichste Geschwindigkeiten deutlich über $5 \mu\text{m/s}$ auf, Taumler darunter. Ein Vergleich der Trajektorien des jeweiligen Typs mit den entsprechenden Segmenten ist in Abbildung 68 gegeben. Die Teilabbildungen A-C zeigen die Schwimmertrajektorien, also die schnellsten jedes Datensatzes. Darunter sind in den Teilabbildungen D-F die als Schwimmer klassifizierten Segmente aus den schaltenden Trajektorien (vgl. Abbildung 67 A, D, G) für alle Datensätze gezeigt. Analog sind in den Teilabbildungen G-I die jeweils langsamsten Trajektorien der zu untersuchenden Datensätze und in den Teilabbildungen J-L die zugehörigen Segmente gezeigt. Abbildung 69 zeigt die zugehörigen Geschwindigkeitsverteilungen.

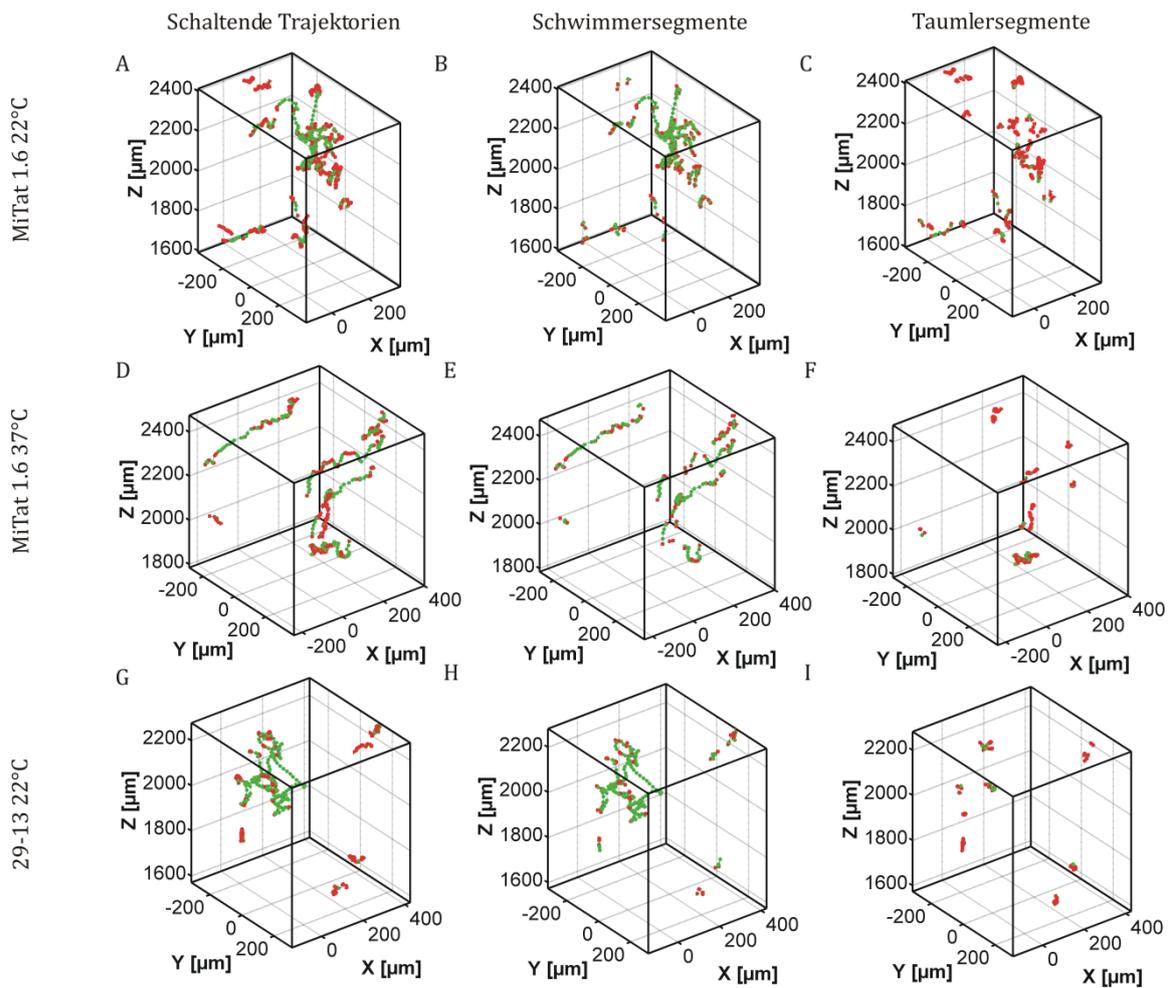


Abbildung 67: Segmentierungsergebnisse für die Blutstromformdatensätze (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C sowie für Prozyklen (29-13, Insektenstadium) bei 22°C. Gezeigt sind jeweils schaltende Trajektorien (A, D, G) sowie die daraus durch Segmentierung erhaltenen Schwimmer- (B, E, H) und Taumlersegmente (C, F, I).

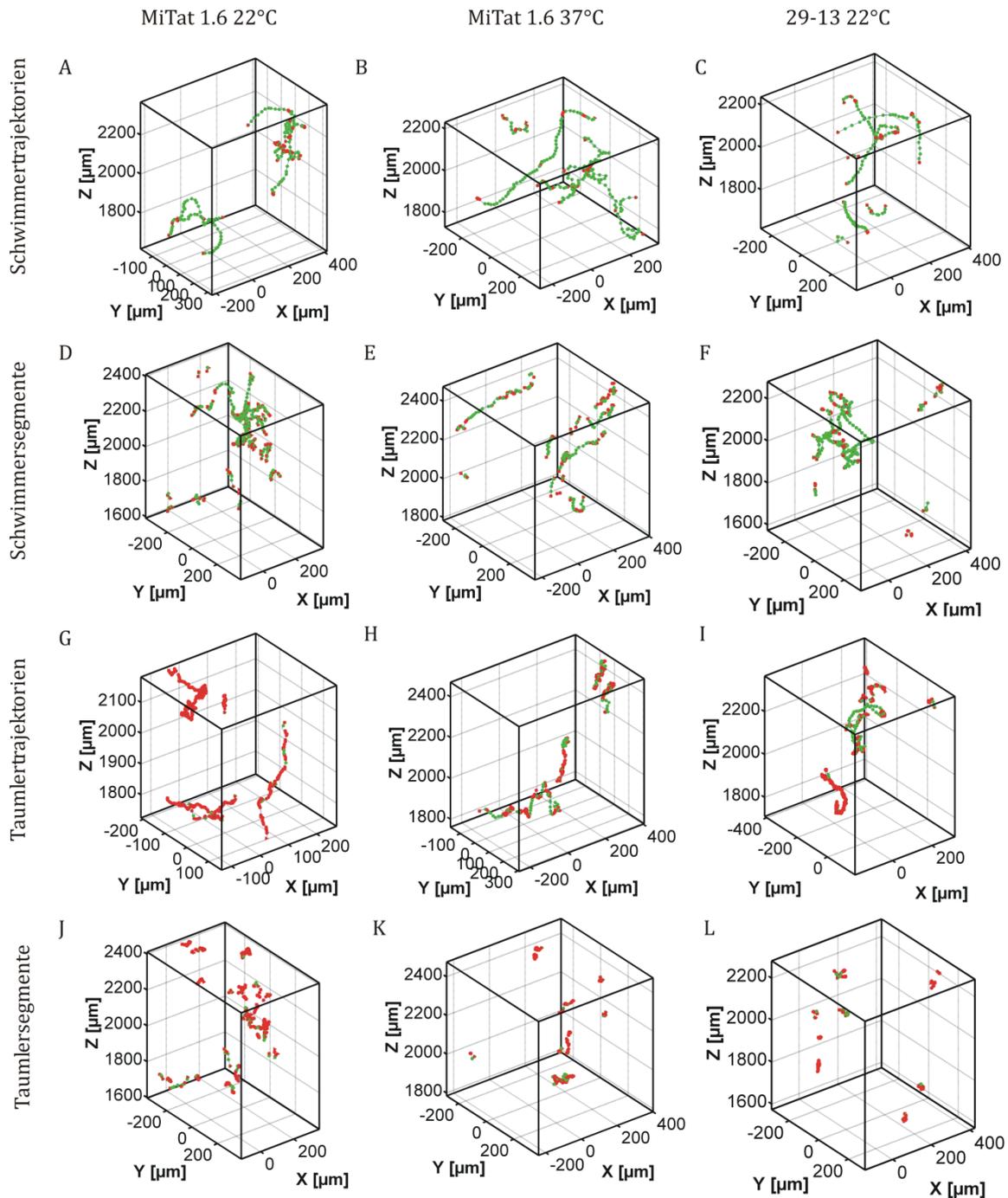


Abbildung 68: Vergleich von Schwimmer und Taumlertrajektorien und -segmenten. Gezeigt sind Schwimmertrajektorien (A–C), Schwimmersegmente (D–F), Taumlertrajektorien (G–I) und Taumlersegmente (J–L) für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, D, G, J) und 37°C (B, E, H, K) sowie Insektenstadien (Zelllinie 29-13, C, F, I, L).

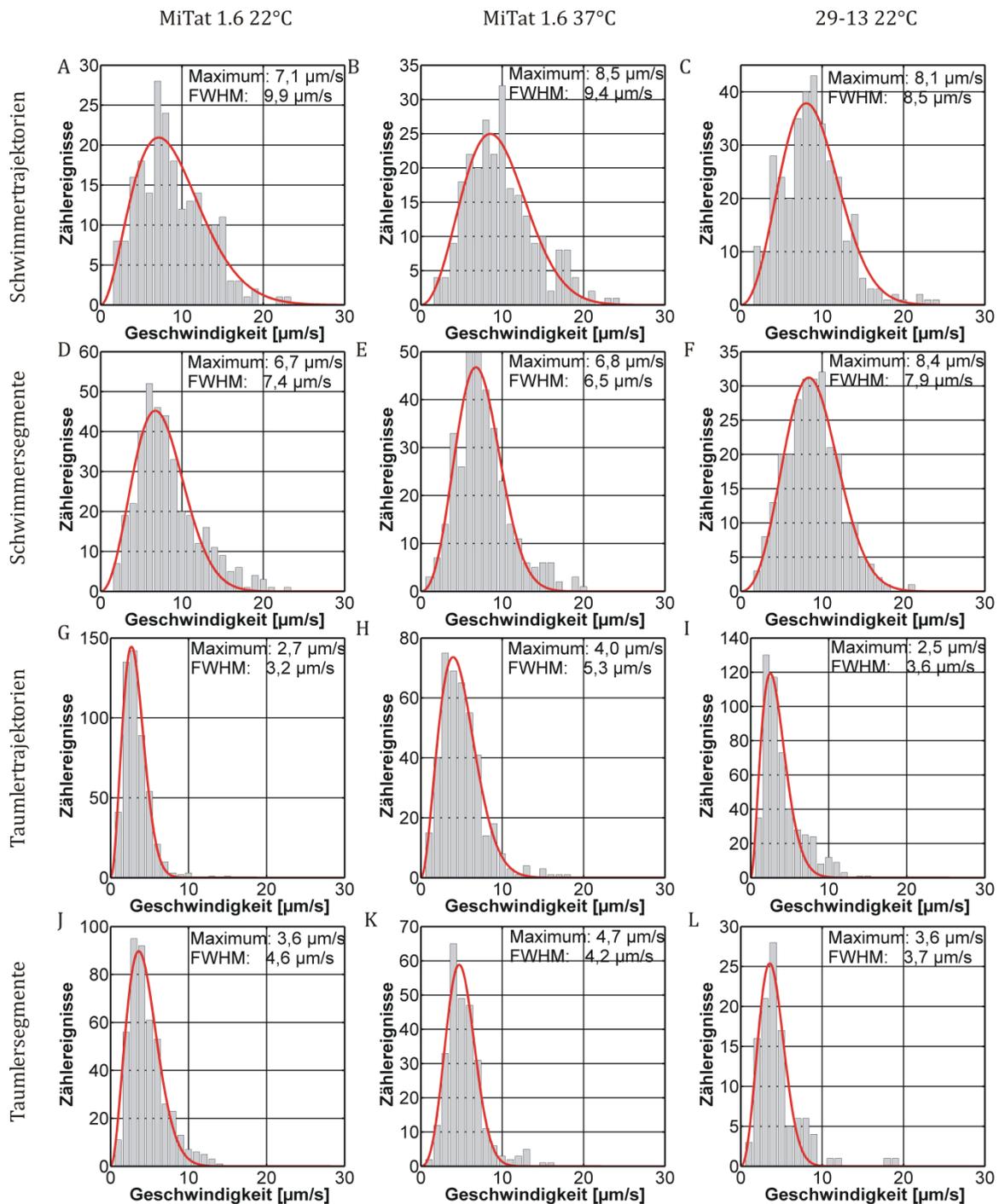


Abbildung 69: Geschwindigkeitsverteilungen der in Abbildung 67 gezeigten Trajektorien und Segmente. Gezeigt sind jeweils die Verteilungen für Schwimmertrajektorien (A-C) und -segmente (D-F) sowie für Taumlertrajektorien (G-I) und -segmente (J-L) für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, D, G, J) und 37°C (B, E, H, K) sowie Insektenstadien (Zelllinie 29-13, C, F, I, L). Geschwindigkeiten sind in Intervallen von 1 µm/s gebinnt. In rot sind die jeweils auf die Histogramme angewandten Regressionsfunktionen gezeigt (vgl. Gleichung (22)).

9 Anhang B

9.1 Eigene Publikationen

Veröffentlicht:

Weiße, S., Heydt, M., Maier, T., Schulz, S., Spatz, J. P., Grunze, M., Haraszti, T. und Rosenhahn, A., *Flow conditions in the vicinity of microstructured interfaces studied by holography and implications for the assembly of artificial actin networks*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. 10.1039/c1cp20153k.

Leal Taixe, L., Heydt, M., Weiße, S., Rosenhahn, A. und Rosenhahn, B., *Classification of swimming microorganisms motion patterns in 4D digital in-line holography data*. 32nd Annual Symposium of the German Association for Pattern Recognition (DAGM 2010), 2010. LNCS 6376: S. 283-292.

Akzeptiert:

Maleschlijski, S., Leal Taixe, L., Weiße, S., Di Fino, A., Aldred, N., Clare, A. S., Sendra, H. G., Rosenhahn, B. und Rosenhahn, A., *A stereoscopic approach for three dimensional tracking of marine biofouling microorganisms*, in *Microscopic Image Analysis with Applications in Biology, Heidelberg, 02.09.2011*. 2011.

In Vorbereitung:

Sendra, H. G., Weiße, S., Maleschlijski, S., Callow, J. A., Callow, M. E. und Rosenhahn, A., *Digital In-line Holographic Microscopy in multi-media environment*.

Weiße, S., Heddergott, N., Engstler, M., Grunze, M. und Rosenhahn A., *Quantitative studies on the motility of Trypanosoma brucei brucei by digital in-line holographic microscopy*.

9.2 Abkürzungs-und Fremdwordverzeichnis

13-90	Blutstromformentrypanosomenstamm, der zur RNAi geeignet ist.
29-13	Prozyklischer Trypanosomenstamm
Base-to-tip	engl. für "Basis zu Spitze", Flagellarwelle, die von der Flagellenspitze zum Zellkörper verläuft.
BSF	Blutstromformen, Trypanosomen-Lebenszyklusstadium im infizierten Wirt.
CCD	engl. "charge coupled device", Detektorart.
CMOS	engl. "complementary metal oxide semiconductor", Detektorart, rauschärmer als CCD.
DIC	engl. "dynein intermediate chain", intermediäre Dyneinkette, Substruktur des Motorproteins Dynein.
DRC	engl. "dynein regulatory complex", Dynein Regulations Komplex, Struktur im 9+2-Axonem, von der angenommen wird, dass sie die koordinierte Aktion der Dyneinmotorproteine reguliert.
fit	engl. für Anpassung, Anpassungsfunktion die auf einen Datensatz angewendet wird, um den Einfluss von Ausreißern zu minimieren
FWHM	engl. "full width at half maximum", Halbwertsbreite.
HPIV	engl. "holographic particle image velocimetry", PIV-Technik mit holographischer Partikeldetektion.
kink	engl. für Knick, bezeichnet den Übergang von rechtshändiger zu linkshändiger Helizität oder umgekehrt in einem Filament.
MiTat	engl. "Molteno Institute antigene type", numerische Nomenklatur für Blutstromformentrypanosomenstämme anhand ihres Oberflächenproteins (VSG).
Molecular sails Mechanismus	engl. für "Molekularsegelmechanismus", Mechanismus, der den Transport von oberflächengebundenen Antikörpern auf Trypanosomen durch Scherkräfte beschreibt.
NDRC	engl. "nexin dynein regulatory complex", postulierter DRC auf Basis des Flagellarproteins Nexin.
PCF	engl. "procytic forms", prozyklische Trypanosomen oder Prozyklen, Insektenstadium von <i>Trypanosoma brucei</i> .
PDMS	Polydimethylsiloxan, Kunststoff der in Gussverfahren in der Mikrofabrikation eingesetzt wird.
PFR	engl. "paraflagellar rod", parakristalline Struktur, die entlang des Flagellums im Zellinneren verläuft und mit zwei Mikrotubulidubletts verbunden ist.
Pillar	engl. für Säule, zylinderförmige Mikrostruktur.
Pillarfeld	Regelmäßige Anordnung von Pillars mit definiertem Abstand und relativer Ausrichtung.
PIV	engl. "particle image velocimetry", Analysetechnik in der Fluidik, bei der ein Fluss durch Autokorrelation von Mikropartikeln untersucht wird.
RNA	engl. "ribonucleic acid", Ribonukleinsäure (RNS)
RNAi	RNA-Interferenz, Methode zur Herabregulierung spezifischer Gene

Run-and-tumble	engl. für "Schwimmen/Laufen und Taumeln". Fortbewegungsart von Mikroorganismen und Bakterien, bei der sich Phasen von gerichtetem Schwimmen und auf der Stelle Taumeln abwechseln.
Tip-to-base	engl. für "Spitze zu Basis", Flagellarwelle, die vom Zellkörper zur Flagellenspitze verläuft.
VSG	engl. "variable surface glycoprotein", variables Oberflächenglykoprotein, Oberflächenproteine von Trypanosomen, an die Antikörper binden können.
WHO	engl. "World Health Organisation", Weltgesundheitsorganisation.

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer.	35
Tabelle 2: Vergleich der Ensemblegeschwindigkeiten für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C sowie prozyklische Trypanosomen (29-13, Insektenstadien).	54
Tabelle 3: Vergleich der Schwimgeschwindigkeiten der Schwimmer- und Taumlersegmente mit den Schwimmer- und Taumlertrajektorien.	64
Tabelle 4: Vergleich der Geschwindigkeiten für schaltende und bimodal schaltende Organismen.....	71
Tabelle 5: Vergleich der Schwimmwinkel für Segmente und Trajektorien.....	76
Tabelle 6: Vergleich der charakteristischen Schwimmparameter für MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 22°C und 37°C (Ensemblewerte und Taumlertrajektorien) mit den für die Motilitätsmutantenzelllinie 13-90 bei 22°C und 37°C gemessenen Werten.....	89
Tabelle 7: Vergleich der charakteristischen Schwimmparameter für MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 22°C im ibidi-Kanal (Ensemblewerte und Schwimmertrajektorien) mit den in der mikrostrukturierten Umgebung gemessenen Werten.....	92

9.4 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Lebenszyklus afrikanischer Trypanosomen, A-C) Blutstromformen (BSF, blood stream forms), D-F) Prozyklische Trypanosomen (PCF, procyclic forms). A) Teilungsaktive „slender“-BSF-Zelle, B) Intermediäre Form, C) „short stumpy“-Form, D) teilungsaktive Mitteldarm-PCF-Zelle, E) migrierende Epimastigote, F) Infektiöses metazyklisches Trypanosom [9]..... 5
- Abbildung 2: Beispiel für eine nicht-reziproke Bewegung eines Modells mit zwei Gelenken gemäß dem „scallop theorem“ nach E.M. Purcell [20]. Das Modell verfügt über zwei Gelenke, deren abwechselnde Aktion in einer nicht-reziproken Bewegung resultiert. 8
- Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli* [62]..... 9
- Abbildung 4: Projektionen einer 3D-Trajektorie einer im run-and-tumble-Modus schwimmenden Zelle von *E. coli*. Gezeigt sind Ebenenprojektionen mit einer Zeitauflösung von 12.6 Hz [23]..... 10
- Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer *Chlamydomonas reinhardtii*-Zelle [68]..... 12
- Abbildung 6: Darstellung des Umschaltverhaltens zwischen synchronem und asynchronem Flagellenschlagmuster bei *C. reinhardtii*. A) Darstellung des synchronen Flagellenschlags mit Auslenkungsdiagramm für linkes und rechtes Flagellum. B) Darstellung des asynchronen Flagellenschlags mit Auslenkungsdiagramm für linkes und rechtes Flagellum. C) Verlauf der Frequenzverschiebung Δ zwischen beiden Flagellen mit Umschaltvorgang bei ca. 50 s [28]..... 12
- Abbildung 7: A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Trypanosoms, gekennzeichnet sind das anteriore (a) und posteriore (p) Zellende sowie das an die Zellmembran angeheftete Flagellum (Pfeil). B) Darstellung eines nach dem Korkenziehermechanismus vorwärts schwimmenden Trypanosoms [18]. 14
- Abbildung 8: Schnitt durch ein Flagellum als schematische Darstellung. A) Klassisches 9+2-Axonem aus neun Mikrotubulidubletts und einem zentralen Mikrotubulipaar. Gekennzeichnet sind das zentrale Mikrotubulipaar sowie Mikrotubulidubletts, Nexin-Verbindungen und Radialspeichen sowie die Dyneinmotoren; B) Schnitt durch ein Trypanosomenflagellum, das zusätzlich zum Axonem ein paraflagellar rod (PFR) besitzt [12]. 14

Abbildung 9: „Geometric clutch“-Mechanismus nach Lindemann [78]. A) Schematische Darstellung der Ausbildung der Krümmung des Flagellums, B) Ausbildung der Krümmung auf molekularer Ebene durch selektive Aktivität der Dyneinmotoren auf einer Seite des Axonems. Gezeigt ist ein Schnitt durch das Axonem.	16
Abbildung 10: Vorwärtsbewegung eines Trypanosoms durch die Propagation von “kinks” [3]. Gezeigt ist der Zellkörper (blau) mit dem Flagellum (gelb). Der schwarze Pfeil gibt die Schwimmrichtung an, die kleinen grauen Pfeile die Propagationsrichtung der „kinks“, die Region des Flagellums mit rechtshändiger Chiralität (rote Pfeile) von solchen linkshändiger Chiralität (blaue Pfeile), trennen.....	21
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Holographie in der in-line Geometrie nach Gabor unter Verwendung von sichtbarem Licht als Strahlungsquelle.	26
Abbildung 12: A) Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Aufbaus. B) Photographie des optischen Aufbaus im Inkubator.	31
Abbildung 13: Delrinprobenhalter (unten) und überarbeitete Version des Probenhalters aus Aluminium (oben).	33
Abbildung 14: Photographie eines ibidi μ Slide I Luer Kanals, wie sie in dieser Arbeit als Probenkammern verwendet wurden.	36
Abbildung 15: Photographie der ursprünglich als Probenkammer verwendeten PDMS-Kammern und des dafür verwendeten Probenhalters.	36
Abbildung 16: Auswertung eines Taxis-Experiments. Aufgetragen ist die Anzahl an Blutstromform-Trypanosomen in oberflächennahen Volumina gleicher Größe. Die Auszählung erfolgte nach 30-minütiger Präinkubation und wurde 20 mal wiederholt. Gezeigt sind die durchschnittlichen Zellanzahlen mit Standardabweichung [Daten zur Verfügung gestellt von N. Heddergott].....	38
Abbildung 17: Auswertung des Phototaxis-Experiments. Gezeigt ist die Anzahl im beleuchteten Bildausschnitt befindlicher Blutstromformen-Trypanosomenzellen über einen Zeitraum von 500 Sekunden, entsprechend der allgemeinen Messdauer eines Holographieexperiments. Die Zellzahl ist auf die Startzellzahl von 47 Zellen normiert, Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen [Daten zur Verfügung gestellt von N. Heddergott].	38
Abbildung 18: Hologramm (A), Median-gefilterte Quelle (B) und 3D-Rekonstruktion zur Extraktion der Datenpunkte (C).....	43

Abbildung 19: XY-Ebenenrekonstruktion vor (A) und nach der Anwendung des LoG-Filters (B).....	43
Abbildung 20: Änderung des Verlaufs der Wellenfront durch Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes. A) Grenzfall einer Lage mit Brechungsindex n_1 vor dem Objekt, B) Grenzfall einer Lage mit Brechungsindex n_1 nach dem Objekt.	44
Abbildung 21: Definition des Schwimm- (A) und Torsionswinkels (B).	48
Abbildung 22: Ausbreitungsanalyse für Trypanosomenbewegung. In Schwarz ist der vom Trypanosom geschwommene Weg dargestellt, im rot die effektive Weglänge.	48
Abbildung 23: Trajektorien von Blutstromformtrypanosomen (Zelllinie MiTat 1.6) bei 22°C. Gezeigt sind eine 3D-Ansicht (A) sowie die XY- (B), XZ- (C) und YZ-Ebenenprojektionen (D). Die Farbkodierung unterscheidet einzelne Zellen.	50
Abbildung 24: Trajektorien von Blutstromformtrypanosomen (Zelllinie MiTat 1.6) bei 37°C. Gezeigt sind eine 3D-Ansicht (A) sowie die XY- (B), XZ- (C) und YZ-Ebenenprojektionen (D). Die Farbkodierung unterscheidet einzelne Zellen.	51
Abbildung 25: Trajektorien von prozyklischen Trypanosomen (Insektenstadium) der Zelllinie 29-13 bei 22°C. Gezeigt sind eine 3D-Ansicht (A) sowie die XY- (B), XZ- (C) und YZ-Ebenenprojektionen (D). Die Farbkodierung unterscheidet einzelne Zellen.	52
Abbildung 26: Übersicht Trajektorien und Geschwindigkeitsverteilungen für MiTat 1.6- (Blutstromformen) bei Raumtemperatur (A-C), 37°C (D-F) und 29-13-Datensätze (G-I) (Prozyklen, Insektenstadium). Gezeigt sind jeweils 3D-Darstellungen der Trajektorien ohne (A, D, G) und mit farbkodierter Schwimmgeschwindigkeit (B, E, H) sowie jeweils die Geschwindigkeitsverteilungen über den gesamten Datensatz (C, F, I). Die Farbkodierung in den Teilabbildungen B, E und H entspricht der gezeigten Skala, wobei Geschwindigkeiten von 15 $\mu\text{m/s}$ und darüber aufgrund ihres seltenen Vorkommens in einem gemeinsamen Bin zusammengefasst sind.....	53
Abbildung 27: Beispiele der in allen Datensätzen beobachteten Schwimmmuster. A) Taumeln, B) gerichtetes Schwimmen, C) Abwechselndes Auftreten der Schwimmmuster A und B. Die Schwimmgeschwindigkeiten sind gemäß der gegebenen Skala farbkodiert. Zur besseren Übersicht sind die Trajektorien in relativen Koordinaten dargestellt.....	55
Abbildung 28: Analyse schaltender Organismen für Blutstromformtrypanosomen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, B) und 37°C (C, D) sowie prozyklische	

Insektenstadien trypanosomen der Zelllinie 29-13 (E, F). Gezeigt sind jeweils nach Geschwindigkeiten farb-kodierte Trajektorien (A, C, E) sowie die zugehörigen Geschwindigkeitsverteilungen (B, D, F). Die rote Linie in den Teilabbildungen B, D und F entspricht der Fitfunktion mit zwei Maxima, die in Kapitel 4.4.3.2 eingeführt wurde. Für alle Datensätze wird das lokale Minimum der Fitfunktion im Bereich von $5 \mu\text{m/s}$ beobachtet, weshalb dieser Wert für die weitere Analyse als Abgrenzung der beiden Schwimmzustände „Schwimmer“ und „Taumler“ gewählt wurde. 56

Abbildung 29: Schematische Darstellung der beobachteten Schwimmzustände A) Schwimmer, B) Taumler und C) zwischen beiden Modi umschaltendes Trypanosomen mit binärer Farbkodierung nach dem zuvor abgeleiteten $5 \mu\text{m/s}$ -Kriterium. Hierbei entsprechen grüne Abschnitte Schwimmgeschwindigkeiten von über $5 \mu\text{m/s}$ (Schwimmer) und rote Abschnitte Schwimmgeschwindigkeiten von unter $5 \mu\text{m/s}$ (Taumler). 57

Abbildung 30: Beispiele für beobachtete Schwimmmodi – Schwimmer. Gezeigt sind geschwindigkeitskodierte Trajektorien (A, C, E), Geschwindigkeiten über $5 \mu\text{m/s}$ sind grün, Geschwindigkeiten unter $5 \mu\text{m/s}$ rot dargestellt. B, D, und F zeigen die zugehörigen Geschwindigkeitshistogramme. Gezeigt ist je ein Beispiel pro Parametersatz. A, B) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 22°C . C, D) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 37°C . E, F) Prozyklen, der Zelllinie 29-13 (Insektenstadium). 58

Abbildung 31: Beispiele für beobachtete Schwimmmodi – Taumler. Gezeigt sind geschwindigkeitskodierte Trajektorien (A, C, E), Geschwindigkeiten über $5 \mu\text{m/s}$ sind grün, Geschwindigkeiten unter $5 \mu\text{m/s}$ rot dargestellt. B, D, und F zeigen die zugehörigen Geschwindigkeitshistogramme. Gezeigt ist je ein Beispiel pro Parametersatz. A, B) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 22°C . C, D) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 37°C . E, F) Prozyklen, der Zelllinie 29-13 (Insektenstadium). 59

Abbildung 32: Beispiele für beobachtete Schwimmmodi – Umschaltende Trajektorien. Gezeigt sind geschwindigkeitskodierte Trajektorien (A, C, E), Geschwindigkeiten über $5 \mu\text{m/s}$ sind grün, Geschwindigkeiten unter $5 \mu\text{m/s}$ rot dargestellt. B, D, und F zeigen die zugehörigen Geschwindigkeitshistogramme. Gezeigt ist je ein Beispiel pro Parametersatz. A, B) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 22°C . C, D) MiTat 1.6 (Blutstromformen) bei 37°C . E, F) Prozyklen, der Zelllinie 29-13 (Insektenstadium). 60

Abbildung 33: Beispiele für das Umschaltverhalten innerhalb einzelner Trajektorien. In den Teilabbildungen A und C sind Projektionen zweier Beispieltrajektorien gezeigt,

wobei zugunsten der Klarheit der Darstellung auf das Koordinatensystem verzichtet wurde. Die Teilabbildungen C und D zeigen die zugehörigen Geschwindigkeit-vs.-Zeit-Diagramme (vt-Diagramme). Identische Zeitabschnitte in Trajektorien und Diagrammen sind durch die Zuordnung von Zahlen gekennzeichnet.	61
Abbildung 34: Bimodale Trajektorien und ihre Geschwindigkeitsverteilungen für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, B) und 37°C (C, D) und Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, E, F).....	62
Abbildung 35: Schematische Darstellung der Segmentierung: Die schaltende Trajektorie (A) wird in Schwimmer- (B) und Taumlersegmente (C) unterteilt.	63
Abbildung 36: Segmentierung der bimodalen Trajektorien. A-C) 3D-Darstellung der Schwimmersegmente, D-F) Zugehörige Geschwindigkeitsverteilungen, G-I) 3D-Darstellung der Taumlersegmente, J-L) Zugehörige Geschwindigkeitsverteilungen, jeweils für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, D, G, J) und 37°C (B, E, H, K) sowie Prozyklen (Insektenstadium, Zelllinie 29-13, C, F, I, L).	66
Abbildung 37: Zustandekommen der Geschwindigkeitsverteilungsaufspaltung für bimodal schaltende Trajektorien. Gezeigt sind jeweils die Fitfunktionen über die Geschwindigkeitsverteilungen der Taumler- (rot) und Schwimmersegmente (grün) sowie eine Summenkurve über diese (blau). Gezeigt sind Daten von prozyklischen Trypanosomen (Insektenstadium, Zelllinie 29-13).....	67
Abbildung 38: Trajektorien schaltender Organismen und ihre Geschwindigkeitsverteilungen für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, B) und 37°C (C, D) und Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, E, F).	68
Abbildung 39: Segmentierung der Trajektorien schaltender Trypanosomen. A-C) 3D-Darstellung der Schwimmersegmente, D-F) Zugehörige Geschwindigkeitsverteilungen, G-I) 3D-Darstellung der Taumlersegmente, J-L) Zugehörige Geschwindigkeitsverteilungen, jeweils für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, D, G, J) und 37°C (B, E, H, K) sowie Prozyklen (Insektenstadium, Zelllinie 29-13, C, F, I, L).	69
Abbildung 40: A) Zusammensetzung der Geschwindigkeitsverteilung der schaltenden Trypanosomen aus den Subklassen Schwimmer und Taumler. Gezeigt sind jeweils die Fitfunktionen über die Geschwindigkeitsverteilungen der Taumler- (rot) und Schwimmersegmente (grün) sowie deren Summe (blau). Gezeigt sind Daten von prozyklischen Trypanosomen. B) Zum Vergleich ist nochmals dieselbe Darstellung für bimodal schaltende Trypanosomen gezeigt (Abbildung 37).	70

Abbildung 41: Vergleich der mittleren Segmentgeschwindigkeiten und ihrer Standardabweichungen für beide Segmentierungsklassen.	72
Abbildung 42: Relative Population des Schwimmer- und Taumlerzustands in den untersuchten Datensätzen.	73
Abbildung 43: Integrale Betrachtung der Geschwindigkeit von Trajektoriensegmenten für Blutstromformen (Mitat 1.6) bei 22°C (A) und 37°C (B) sowie für Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, C). Schwimmersegmente sind blau, Taumlersegmente rot dargestellt.	74
Abbildung 44: Verteilung des Schwimmwinkels. Gezeigt sind die Winkelverteilungen in bins von 5° für Schwimmertrajektorien (A-C) und -segmente (D-I) sowie für Taumlertrajektorien (J-L) und -segmente (M-R) jeweils für Blutstromformen (Mitat 1.6) bei 22°C (A, D, G, J, M, P) und 37°C (B, E, H, K, N, Q) und Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, C, F, I, L, O, R).	75
Abbildung 45: Integrale Betrachtung der Schwimmwinkel von Trajektoriensegmenten für Blutstromformen (Mitat 1.6) bei 22°C (A) und 37°C (B) sowie für Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, C). Schwimmersegmente sind blau, Taumlersegmente rot dargestellt.	77
Abbildung 46: Ausbreitungsanalyse für bimodal schaltenden Trypanosomen für Blutstromformen (Mitat 1.6) bei 22°C (A, D, G) und 37°C (B, E, H) und Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, C, F, I). Gezeigt ist jeweils die effektiv zurückgelegte Wegstrecke gegen die durchschnittliche Segmentgeschwindigkeit. Jeder Datenpunkt entspricht einem Zeitintervall von 14 Sekunden. Daten für Schwimmersegmente sind in den Teilabbildungen D-F, für Taumlersegmente in G-I gezeigt. Teilabbildungen A-C zeigen jeweils die Summen. Die farbigen Linien zeigen Richtwerte für die Linearität der Ausbreitung, die grüne Linie entspricht 100%iger Linearität, gelb 50%, rot 25%.	79
Abbildung 47: Ausbreitungsanalyse für schaltenden Trypanosomen für Blutstromformen (Mitat 1.6) bei 22°C (A, D, G) und 37°C (B, E, H) und Prozyklen (Zelllinie 29-13, Insektenstadium, C, F, I). Gezeigt ist jeweils die effektiv zurückgelegte Wegstrecke gegen die durchschnittliche Segmentgeschwindigkeit. Jeder Datenpunkt entspricht einem Zeitintervall von 14 Sekunden. Daten für Schwimmersegmente sind in den Teilabbildungen D-F, für Taumlersegmente in G-I gezeigt. Teilabbildungen A-C zeigen jeweils die Summen. Die farbigen Linien zeigen Richtwerte für die Linearität der Ausbreitung, die grüne Linie entspricht 100%iger Linearität, gelb 50%, rot 25%.	80

Abbildung 48: Bestimmung der Schwimm- und Taumelquote für die betrachteten Datensätze nach dem 5 $\mu\text{m/s}$ -Kriterium. Oben: Quoten basierend auf wahrscheinlichsten Trajektoriengeschwindigkeiten. Unten: Quoten basierend auf den Klassen zugeordneten Datenpunkten.....	82
Abbildung 49: Durchschnittliche Dauer der Schwimm- und Taumelphasen für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C sowie Insektenstadien (Prozyklen, Zelllinie 29-13).	83
Abbildung 50: 3D-Darstellungen der Motilitätsmutanten-Datensätze (Zelllinie 13-90) bei 22°C (A, C) und 37°C (B, D). A, B) 3D-Darstellungen der analysierten Trajektorien, C, D) Trajektorien aus A und B mit geschwindigkeitsbasierter Farbkodierung, grün: Geschwindigkeiten > 5 $\mu\text{m/s}$, rot: Geschwindigkeiten < 5 $\mu\text{m/s}$	86
Abbildung 51: Schwimmparameter für Motilitätsmutantendatensätze (Zelllinie 13-90) bei 22°C (A, C) und 37°C (B, D). A, B) Geschwindigkeitsverteilungen, C, D) Winkelverteilungen.....	87
Abbildung 52: Vergleich Mutanten (13-90 DIC RNAi) mit der Taumlersubklasse für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C. A, C, E, G) Geschwindigkeitsverteilungen Mutanten (13-90 DIC RNAi, A) und Taumler Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (C) und 37°C (E, G). B, D, F, H) Winkelverteilungen Mutanten (13-90 DIC RNAi, B) und Taumlertrajektorien Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (D) und 37°C (F, H). I, J) Vergleich der Fitkurven über die Geschwindigkeitsverteilungen für Blutstromformen (MiTat 1.6) Taumler und der Ensembledaten der Motilitätsmutanten-Messreihen (13-90 DIC RNAi) bei 22°C (I) und 37°C (J), die Kurven sind zur besseren Vergleichbarkeit auf die Maxima normiert.	88
Abbildung 53: Schematische Darstellung des Aufbaus für Experimente mit mikrostrukturierten Kanälen.	90
Abbildung 54: Kanalsystem für Experimente mit Pillarfeldern [Photographie zur Verfügung gestellt von T. Haraszti, Biophysikalische Chemie, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg].	91
Abbildung 55: Kombinationsdatensatz aus vier Messreihen von Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C in mikrostrukturierten Kanalsystemen.	91

Abbildung 56: Schwimmparameter für Kombinationsdatensatz aus vier Messreihen von Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C in mikrostrukturierten Kanalsystemen. A) Geschwindigkeitsverteilung, B) Winkelverteilung.	92
Abbildung 57: Vergleich Kanalexperiment mit Schwimmersubklasse für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C. A) Geschwindigkeitsverteilung Schwimmertrajektorien Blutstromformen (MiTat 1.6) 22°C, B) Winkelverteilung Schwimmertrajektorien Blutstromformen (MiTat 1.6) 22°C, C) Geschwindigkeitsverteilung Blutstromformen (MiTat 1.6) in Pillarkanälen (Kombinationsdatensatz) 22°C, D) Winkelverteilung Blutstromformen (MiTat 1.6) in Pillarkanälen (Kombinationsdatensatz) 22°C, E) Vergleich der Fitkurven über die Geschwindigkeitsverteilungen für Blutstromformen (MiTat 1.6) Schwimmer bei 22°C und der Ensembledaten in Pillarfeldern, die Kurven sind zur besseren Vergleichbarkeit auf die Maxima normiert.	93
Abbildung 58: XY-Projektion der Trajektorien aus einem der MiTat 1.6-Datensätze (Blutstromformen) im strukturierten Kanal. In hellblau sind die Pillars maßstäblich dargestellt.....	95
Abbildung 59: Korrelation der Schwimmmodi und der Nettofortbewegung (blau) mit der Flagellenschlagrichtung (orange). A) Schwimmermodus mit tip-to-base-Flagellenschlag und vorwärts gerichtetem Schwimmen. B) Taumlermodus ohne Nettofortbewegung mit base-to-tip-Flagellenschlag.	100
Abbildung 60: Der direkte Vergleich von Taumler- und Schwimmertrajektorien aus Wildtypendatensätzen mit den externen Referenzsystemen zeigt die sehr gute Übereinstimmung der Schwimmuster.	100
Abbildung 61: Wahrscheinlichste Geschwindigkeiten im Überblick.	102
Abbildung 62: Mittlere Schwimmwinkel im Überblick.....	102
Abbildung 63: Zustandekommen der erhöhten Ensembledgeschwindigkeiten von MiTat 1.6 bei Erhöhung der Temperatur von 22°C auf 37°C. A) Durchschnittliche Schwimm- und Taumelsegmentlänge, B) Population des Schwimmer- und Taumlerzustands für MiTat 1.6 bei 22°C und 37°C, C) Vergleich der Ensembledgeschwindigkeitsverteilungen von MiTat 1.6 bei 22°C und 37°C.	104
Abbildung 64: Wahrscheinlichste Trajektorien- und Segmentgeschwindigkeiten für Blutstromformentrypanosomen (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C sowie für Insektenstadientrypanosomen (29-13).....	107

Abbildung 65: Durchschnittliche Dauer der Schwimm- und Taumelphasen für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C sowie Insektenstadien (Prozyklen, Zelllinie 29-13).	107
Abbildung 66: Position des Flagellenursprungs relativ zum Zellkern (blauer Kreis) gezeigt für Blutstromform (oben) und prozyklisches Insektenstadium (unten) [156].	108
Abbildung 67: Segmentierungsergebnisse für die Blutstromformdatensätze (MiTat 1.6) bei 22°C und 37°C sowie für Prozyklen (29-13, Insektenstadium) bei 22°C. Gezeigt sind jeweils schaltende Trajektorien (A, D, G) sowie die daraus durch Segmentierung erhaltenen Schwimmer- (B, E, H) und Taumlersegmente (C, F, I).	114
Abbildung 68: Vergleich von Schwimmer und Taumlertrajektorien und -segmenten. Gezeigt sind Schwimmertrajektorien (A–C), Schwimmersegmente (D-F), Taumlertrajektorien (G-I) und Taumlersegmente (J-L) für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, D, G, J) und 37°C (B, E, H, K) sowie Insektenstadien (Zelllinie 29-13, C, F, I, L).	115
Abbildung 69: Geschwindigkeitsverteilungen der in Abbildung 67 gezeigten Trajektorien und Segmente. Gezeigt sind jeweils die Verteilungen für Schwimmertrajektorien (A-C) und -segmente (D-F) sowie für Taumlertrajektorien (G-I) und -segmente (J-L) für Blutstromformen (MiTat 1.6) bei 22°C (A, D, G, J) und 37°C (B, E, H, K) sowie Insektenstadien (Zelllinie 29-13, C, F, I, L). Geschwindigkeiten sind in Intervallen von 1 µm/s gebinnt. In rot sind die jeweils auf die Histogramme angewandten Regressionsfunktionen gezeigt (vgl. Gleichung (22)).	116

9.5 Literaturverzeichnis

1. Gruby, M., *Recherches et observations sur une nouvelle espèce d'hématozoaire, Trypanosoma sanguinis*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, 1843. **17**: S. 1134-36.
2. Heddergott, N., *Zellbiologische Aspekte der Motilität von Trypanosoma brucei unter Berücksichtigung der Interaktion mit der Mikroumwelt*. 2010. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
3. Rodriguez, J.A., et al., *Propulsion of African trypanosomes is driven by bihelical waves with alternating chirality separated by kinks*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(46): S. 19322-19327. 10.1073/pnas.0907001106.
4. Ralston, K.S., et al., *The Trypanosoma brucei Flagellum: Moving Parasites in New Directions*. Annual Review of Microbiology, 2009. **63**: S. 335-362. 10.1146/annurev.micro.091208.073353.
5. Hill, K.L., *Parasites in motion: flagellum-driven cell motility in African trypanosomes*. Current Opinion in Microbiology, 2010. **13**(4): S. 459-465. 10.1016/j.mib.2010.05.015.
6. Branche, C., et al., *Conserved and specific functions of axoneme components in trypanosome motility*. Journal of Cell Science, 2006. **119**(16): S. 3443-3455. 10.1242/jcs.03078.
7. Gull, K., *Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies*. Current Opinion in Microbiology, 2003. **6**(4): S. 365-370. 10.1016/s1369-5274(03)00092-4.
8. Morocoima, A., et al., *Commercial coconut palm as an ecotope of Chagas disease vectors in north-eastern Venezuela*. Journal of Vector Borne Diseases, 2010. **47**(2): S. 76-84.
9. Brun, R., et al., *Human African trypanosomiasis*. Lancet, 2010. **375**(9709): S. 148-159. 10.1016/s0140-6736(09)60829-1.
10. Legros, D., et al., *Treatment of human African trypanosomiasis - present situation and needs for research and development*. Lancet Infectious Diseases, 2002. **2**(7): S. 437-440.
11. Alberts, B., et al., *Molekularbiologie der Zelle*. 2004: Wiley-VCH.
12. Ginger, M.L., N. Portman, und P.G. McKean, *Swimming with protists: perception, motility and flagellum assembly*. Nature Reviews Microbiology, 2008. **6**(11): S. 838-850. 10.1038/nrmicro2009.
13. Ralston, K.S. und K.L. Hill, *Trypanin, a component of the flagellar dynein regulatory complex, is essential in bloodstream form African trypanosomes*. Plos Pathogens, 2006. **2**(9): S. 873-882. e101 10.1371/journal.ppat.0020101.
14. Ralston, K.S. und K.L. Hill, *The flagellum of Trypanosoma brucei: New tricks from an old dog*. International Journal for Parasitology, 2008. **38**(8-9): S. 869-884. 10.1016/j.ijpara.2008.03.003.
15. Dean, S.D. und K.R. Matthews, *Restless gossamers: Antibody clearance by hydrodynamic flow forces generated at the surface of motile trypanosome parasites*. Cell Host & Microbe, 2007. **2**(5): S. 279-281. 10.1016/j.chom.2007.10.006.
16. Engstler, M., et al., *Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes*. Cell, 2007. **131**(3): S. 505-515. 10.1016/j.cell.2007.08.046.

-
17. Hutchings, N.R., J.E. Donelson, und K.L. Hill, *Trypanin is a cytoskeletal linker protein and is required for cell motility in African trypanosomes*. Journal of Cell Biology, 2002. **156**(5): S. 867-877. 10.1083/jcb.200201036.
 18. Hill, K.L., *Biology and mechanism of trypanosome cell motility*. Eukaryotic Cell, 2003. **2**(2): S. 200-208. 10.1128/ec.2.2.200-208.2003.
 19. Meschede, D., *Gehrtsen Physik*. 2004: Springer Verlag.
 20. Purcell, E.M., *Life at low Reynolds number*. American Journal of Physics, 1977. **45**(1): S. 3-11.
 21. Arora, S., V. Bhat, und A. Mittal, *Correlating single cell motility with population growth dynamics for flagellated bacteria*. Biotechnology and Bioengineering, 2007. **97**(6): S. 1644-1649. 10.1002/bit.21372.
 22. Berg, H.C., *The rotary motor of bacterial flagella*. Annual Review of Biochemistry, 2003. **72**: S. 19-54. 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737.
 23. Berg, H.C. und D.A. Brown, *Chemotaxis in Escherichia coli analysed by Three-dimensional tracking*. Nature, 1972. **239**: S. 500-504.
 24. Lewis, N.I., et al., *Swimming speed of three species of Alexandrium (Dinophyceae) as determined by digital in-line holography*. Phycologia, 2006. **45**(1): S. 61-70. 10.2216/04-59.1.
 25. Heydt, M., et al., *Digital in-line holography as a three-dimensional tool to study motile marine organisms during their exploration of surfaces*. Journal of Adhesion, 2007. **83**(5): S. 417-430. 10.1080/00218460701377388.
 26. Brokaw, C.J. und R. Kamiya, *Bending patterns of Chlamydomonas flagella. 4. Mutanst with defects in inner and outer dynein arms indicate differences in dynein arm function* Cell Motility and the Cytoskeleton, 1987. **8**(1): S. 68-75.
 27. Harris, E.H., *Chlamydomonas as a model organism*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001. **52**: S. 363-406.
 28. Polin, M., et al., *Chlamydomonas Swims with Two "Gears" in a Eukaryotic Version of Run-and-Tumble Locomotion*. Science, 2009. **325**(5939): S. 487-490. 10.1126/science.1172667.
 29. Fauci, L.J. und A. McDonald, *Sperm motility in the presence of boundaries*. Bulletin of Mathematical Biology, 1995. **57**(5): S. 679-699.
 30. Rothschild, *Non-random Distribution of Bull Spermatozoa in a Drop of Sperm Suspension*. Nature, 1963. **198**: S. 1221-1222.
 31. Summers, K.E. und I.R. Gibbons, *ATP induced sliding of tubules in trypsin treated flagella of sea-urchin sperm* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1971. **68**(12): S. 3092-3096.
 32. Fenchel, T., *How dinoflagellates swim*. Protist, 2001. **152**(4): S. 329-338.
 33. Baron, D.M., Z.P. Kabututu, und K.L. Hill, *Stuck in reverse: loss of LC1 in Trypanosoma brucei disrupts outer dynein arms and leads to reverse flagellar beat and backward movement*. Journal of Cell Science, 2007. **120**(9): S. 1513-1520. 10.1242/jcs.004846.
 34. Broadhead, R., et al., *Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome*. Nature, 2006. **440**(7081): S. 224-227. 10.1038/nature04541.
 35. Gadelha, C., B. Wickstead, und K. Gull, *Flagellar and ciliary beating in trypanosome motility*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2007. **64**(8): S. 629-643. 10.1002/cm.20210.
 36. Oberholzer, M., et al., *Social Motility in African Trypanosomes*. Plos Pathogens, 2010. **6**(1). e1000739 10.1371/journal.ppat.1000739.

-
37. Silflow, C.D. und P.A. Lefebvre, *Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology, 2001. **127**(4): S. 1500-1507.
 38. Vaughan, S., *Assembly of the flagellum and its role in cell morphogenesis in Trypanosoma brucei*. Current Opinion in Microbiology, 2010. **13**(4): S. 453-458. 10.1016/j.mib.2010.05.006.
 39. Berg, H.C. und L. Turner, *Chemotaxis of bacteria in glass-capillary arrays - Escherichia coli, motility, microchannel plate, and light scattering*. Biophysical Journal, 1990. **58**(4): S. 919-930.
 40. Phillips, B.R., J.A. Quinn, und H. Goldfine, *Random motility of swimming bacteria - Single cells compared to cell-populations*. Aiche Journal, 1994. **40**(2): S. 334-348.
 41. Frymier, P.D., et al., *3-Dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(13): S. 6195-6199.
 42. Frymier, P.D. und R.M. Ford, *Analysis of bacterial swimming speed approaching a solid-liquid interface*. Aiche Journal, 1997. **43**(5): S. 1341-1347.
 43. DiLuzio, W.R., et al., *Escherichia coli swim on the right-hand side*. Nature, 2005. **435**(7046): S. 1271-1274. 10.1038/nature03660.
 44. Magariyama, Y., et al., *Difference in bacterial motion between forward and backward swimming caused by the wall effect*. Biophysical Journal, 2005. **88**(5): S. 3648-3658. 10.1529/biophysj.104.054049.
 45. Lauga, E., et al., *Swimming in circles: Motion of bacteria near solid boundaries*. Biophysical Journal, 2006. **90**(2): S. 400-412. 10.1529/biophysj.105.069401.
 46. Cisneros, L., et al., *Reversal of bacterial locomotion at an obstacle*. Physical Review E, 2006. **73**. 10.1103/PhysRevE.73.030901.
 47. Hill, J., et al., *Hydrodynamic surface interactions enable Escherichia coli to seek efficient routes to swim upstream*. Physical Review Letters, 2007. **98**(6). 068101 10.1103/PhysRevLett.98.068101.
 48. Locsei, J.T., *Persistence of direction increases the drift velocity of run and tumble chemotaxis*. Journal of Mathematical Biology, 2007. **55**(1): S. 41-60. 10.1007/s00285-007-0080-z.
 49. Berke, A.P., et al., *Hydrodynamic attraction of swimming microorganisms by surfaces*. Physical Review Letters, 2008. **101**(3). 038102 10.1103/PhysRevLett.101.038102.
 50. Nicolau, D.V., Jr., J.P. Armitage, und P.K. Maini, *Directional persistence and the optimality of run-and-tumble chemotaxis*. Computational Biology and Chemistry, 2009. **33**(4): S. 269-274. 10.1016/j.compbiolchem.2009.06.003.
 51. Piperno, G. und D.J.L. Luck, *Axonemal Adenosine Triphosphatases from Flagella of Chlamydomonas reinhardtii - Purification of two dyneins*. Journal of Biological Chemistry, 1979. **254**(8): S. 3084-3090.
 52. Huang, B., Z. Ramanis, und D.J.L. Luck, *Suppressor Mutations in Chlamydomonas Reveal a Regulatory Mechanism for Flagellar Function*. Cell, 1982. **28**(1): S. 115-124.
 53. Piperno, G., K. Mead, und W. Shestak, *The inner dynein arms I2 interact with a dynein regulatory complex in Chlamydomonas flagella*. Journal of Cell Biology, 1992. **118**(6): S. 1455-1463.
 54. Gardner, L.C., et al., *Components of a "Dynein Regulatory Complex" Are Located at the Junction between the Radial Spokes and the Dynein Arms in Chlamydomonas Flagella*. Journal of Cell Biology, 1994. **127**(5): S. 1311-1325.

-
55. Mitchell, D.R., *Chlamydomonas flagella*. Journal of Phycology, 2000. **36**(2): S. 261-273.
 56. Mitchell, D.R., *Orientation of the central pair complex during flagellar bend formation in Chlamydomonas*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2003. **56**(2): S. 120-129. 10.1002/cm.10142.
 57. Rupp, G. und M.E. Porter, *A subunit of the dynein regulatory complex in Chlamydomonas is a homologue of a growth arrest-specific gene product*. Journal of Cell Biology, 2003. **162**(1): S. 47-57. 10.1083/jcb.200303019.
 58. Wargo, M.J., M.A. McPeck, und E.F. Smith, *Analysis of microtubule sliding patterns in Chlamydomonas flagellar axonemes reveals dynein activity on specific doublet microtubules*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(12): S. 2533-2544. 10.1242/jcs.01082.
 59. Wakabayashi, K. und S.M. King, *Modulation of Chlamydomonas reinhardtii flagellar motility by redox poise*. Journal of Cell Biology, 2006. **173**(5): S. 743-754.
 60. Drescher, K., K.C. Leptos, und R.E. Goldstein, *How to track protists in three dimensions*. Review of Scientific Instruments, 2009. **80**(1). 014301 10.1063/1.3053242.
 61. Heuser, T., et al., *The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella*. Journal of Cell Biology, 2009. **187**(6): S. 921-933. 10.1083/jcb.200908067.
 62. Bertin, P., et al., *The H-NS Protein Is Involved in the Biogenesis of Flagella in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1994. **176**(17): S. 5537-5540.
 63. Purcell, E.M., *The efficiency of propulsion by a rotating flagellum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(21): S. 11307-11311.
 64. Khan, S. und R.M. Macnab, *The Steady-state Counterclockwise/Clockwise Ratio of Bacterial Flagellar Motors is Regulated by Protonmotive Force*. Journal of Molecular Biology, 1980. **138**(3): S. 563-597.
 65. Duke, T.A.J., N. Le Novere, und D. Bray, *Conformational spread in a ring of proteins: A stochastic approach to allostery*. Journal of Molecular Biology, 2001. **308**(3): S. 541-553. 10.1006/jmbi.2001.4610.
 66. Sourjik, V., *Receptor clustering and signal processing in E coli chemotaxis*. Trends in Microbiology, 2004. **12**(12): S. 569-576.
 67. Bai, F., et al., *Conformational Spread as a Mechanism for Cooperativity in the Bacterial Flagellar Switch*. Science, 2010. **327**(5966): S. 685-689. 10.1126/science.1182105.
 68. Rosenbaum, J.L. und G.B. Witman, *Intraflagellar transport*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(11): S. 813-825. 10.1038/nrm952.
 69. Josef, K., J. Saranak, und K.W. Foster, *Ciliary behavior of a negatively phototactic Chlamydomonas reinhardtii*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 2005. **61**(2): S. 97-111. 10.1002/cm.20069.
 70. Ruffer, U. und W. Nultsch, *Flagellar coordination in Chlamydomonas cells held on micropipettes*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 1998. **41**(4): S. 297-307.
 71. Ruffer, U. und W. Nultsch, *Comparison of the beating of cis-flagella and trans-flagella of Chlamydomonas cells held on micropipettes*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 1987. **7**(1): S. 87-93.
 72. Okita, N., et al., *Phototactic activity in Chlamydomonas 'non-phototactic' mutants deficient in Ca²⁺-dependent control of flagellar dominance or in inner-arm dynein*. Journal of Cell Science, 2005. **118**(3): S. 529-537. 10.1242/jcs.01633.

-
73. Niedermayer, T., B. Eckhardt, und P. Lenz, *Synchronization, phase locking, and metachronal wave formation in ciliary chains*. Chaos, 2008. **18**(3). 10.1063/1.2956984.
 74. Brokaw, C.J., *Flagellar movement: A sliding filament model*. Science, 1972. **178**(4060): S. 455-462.
 75. Brokaw, C.J., *Mechanics and energetics of cilia*. American Review of Respiratory Disease, 1966. **93**(3P2): S. 32-40.
 76. Cooke, R., *The mechanism of muscle contraction*. Crc Critical Reviews in Biochemistry, 1986. **21**(1): S. 53-118.
 77. Satir, P., *Studies on cilia. 3. Furtehr studies on cilium tip and a sliding filament model of ciliary motility*. Journal of Cell Biology, 1968. **39**(1): S. 77-94.
 78. Lindemann, C.B. und K.A. Lesich, *Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible*. Journal of Cell Science, 2010. **123**(4): S. 519-528. 10.1242/jcs.051326.
 79. Sale, W.S., *The axonemal axis and Ca²⁺ induced asymmetry of active microtubule sliding in sea-urchin sperm tails*. Journal of Cell Biology, 1986. **102**(6): S. 2042-2052.
 80. Bastin, P., T. Sherwin, und K. Gull, *Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility*. Nature, 1998. **391**(6667): S. 548-548.
 81. Wirtz, E., M. Hoek, und G.A. Cross, *Regulated processive transcription of chromatin by T7 RNA polymerase in Trypanosoma brucei*. Nucleic Acids Research, 1998. **26**(20): S. 4626-4634.
 82. Baccetti, B., et al., *The dynein electrophoretic bands in axonemes naturally lacking the inner or the outer arm*. Journal of Cell Biology, 1979. **80**(2): S. 334-340.
 83. Kabututu, Z.P., et al., *CMF70 is a subunit of the dynein regulatory complex*. Journal of Cell Science, 2010. **123**(20): S. 3587-3595. 10.1242/jcs.073817.
 84. DaneshPanah, M. und B. Javidi, *Tracking biological microorganisms in sequence of 3D holographic microscopy images*. Optics Express, 2007. **15**(17): S. 10761-10766.
 85. Sheng, J., et al., *Digital holographic microscopy reveals prey-induced changes in swimming behavior of predatory dinoflagellates*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(44): S. 17512-17517. 10.1073/pnas.0704658104.
 86. Xu, W., et al., *Tracking particles in four dimensions with in-line holographic microscopy*. Optics Letters, 2003. **28**(3): S. 164-166.
 87. Sheng, J., et al., *A dinoflagellate exploits toxins to immobilize prey prior to ingestion*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(5): S. 2082-2087. 10.1073/pnas.0912254107.
 88. Heydt, M., et al., *Analysis of holographic microscopy data to quantitatively investigate three-dimensional settlement dynamics of algal zoospores in the vicinity of surfaces*. The European Physical Journal E, 2009. **30**(2): S. 141-148.
 89. Schnars, U. und W. Jüptner, *Digital Holography*. 2005: Springer Verlag.
 90. Hecht, E., *Optik*. 1994: Addison-Wesley.
 91. Hariharan, P., *Basics of holography*. 2002: Cambridge University Press.
 92. Royer, H., *Une application de la microholgraphie ultra-rapide: La métrologie des brouillards*. Nouvelle Revue Optique, 1974. **5**(2): S. 87-93.
 93. Maiman, T., et al., *Stimulated Optical Emission in Fluorescent Solids. II. Spectroscopy and Stimulated Emission in Ruby*. Physical Review, 1961. **123**(4): S. 1151-1163.

94. Michel, T., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research - Section A: accelerators, spectrometers, detectors and associated equipment*. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment, 2008. **591**(1): S. VII-VII. 10.1016/j.nima.2008.03.098.
95. Rosenhahn, A., et al., *Digital in-line soft x-ray holography with element contrast*. Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision, 2008. **25**(2): S. 416-422.
96. Rosenhahn, A., et al., *Vacuum-ultraviolet Gabor holography with synchrotron radiation*. Ultramicroscopy, 2007. **107**(12): S. 1171-1177. 10.1016/j.ultramic.2007.01.010.
97. Stöcker, H., *Taschenbuch der Physik*. 2000: Verlag Harri Deutsch.
98. Tipler, P.A., *Physik*. 2000: Spektrum Akademischer Verlag.
99. Gabor, D., *A new microscopic principle*. Nature, 1948. **161**: S. 777-778.
100. Scherzer, O., *Sphärische und chromatische Korrektur von Elektronenlinsen*. Optik, 1947. **2**: S. 114-132.
101. Möllenstedt, G., *Elektronenmikroskopische Bilder mit einem nach O. Scherzer sphärisch korrigierten Objektiv*. Optik, 1956. **13**: S. 209-215.
102. Kreuzer, H.J., *Low energy electron point source microscopy*. Micron, 1995. **26**(6): S. 503-509.
103. Fink, H.W., W. Stocker, und H. Schmid, *Holography with low-energy electrons*. Physical Review Letters, 1990. **65**(10): S. 1204-1206.
104. Fink, H.W., et al., *Electron holography of individual DNA molecules*. Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision, 1997. **14**(9): S. 2168-2172.
105. Gölzhäuser, A., et al., *Holographic imaging of macromolecules*. Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films, 1998. **16**(5): S. 3025-3028.
106. Gölzhäuser, A., et al., *Optimization of the low energy electron point source microscope: imaging of macromolecules*. Micron, 2002. **33**(3): S. 241-255.
107. Eisele, A., et al., *Nanometer resolution holography with the low energy electron point source microscope*. Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics, 2008. **222**(5-6): S. 779-787. 10.1524/zpch.2008.6008.
108. Kreuzer, H.J., et al., *Digital in-line holography with photons and electrons*. Journal of Physics-Condensed Matter, 2001. **13**(47): S. 10729-10741.
109. Garcia-Sucerquia, J., et al., *Digital in-line holographic microscopy*. Applied Optics, 2006. **45**(5): S. 836-850.
110. Schnars, U. und W. Jüptner, *Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction*. Applied Optics, 1994. **33**(2): S. 179-181.
111. Schnars, U., T.M. Kreis, und W.P.O. Jüptner, *Digital recording and numerical reconstruction of holograms: Reduction of the spatial frequency spectrum*. Optical Engineering, 1996. **35**(4): S. 977-982.
112. Leith, E.N. und J. Upatnieks, *Reconstructed wavefronts and communication theory*. Journal of the Optical Society of America, 1962. **52**: S. 1123-30.
113. Leith, E.N. und J. Upatnieks, *Wavefront reconstruction with continuous-tone objects*. Journal of the Optical Society of America, 1963. **53**: S. 1377-81.
114. Leith, E.N. und J. Upatnieks, *Wavefronts reconstruction with diffused illumination and three-dimensional objects*. Journal of the Optical Society of America, 1964. **54**: S. 1295-301.

-
115. Kreuzer, H.J., *Holographic microscope and method of hologram reconstruction*. 2002: United States Patent. p. 11.
 116. Repetto, L., E. Piano, and C. Pontiggia, *Lensless digital holographic microscope with light-emitting diode illumination*. Optics Letters, 2004. **29**(10): S. 1132-1134.
 117. Dubois, F., et al., *Digital holographic microscopy with reduced spatial coherence for three-dimensional particle flow analysis*. Applied Optics, 2006. **45**(5): S. 864-871.
 118. Garcia-Sucerquia, J., et al., *4-D imaging of fluid flow with digital in-line holographic microscopy*. Optik, 2008. **119**(9): S. 419-423. 10.1016/j.ijleo.2007.01.004.
 119. Katz, J. und J. Sheng, *Applications of Holography in Fluid Mechanics and Particle Dynamics*. Annual Review of Fluid Mechanics, 2010. **42**: S. 531-555. 10.1146/annurev-fluid-121108-145508.
 120. Ooms, T.A., R. Lindken, and J. Westerweel, *Digital holographic microscopy applied to measurement of a flow in a T-shaped micromixer*. Experiments in Fluids, 2009. **47**(6): S. 941-955. 10.1007/s00348-009-0683-9.
 121. Barnhart, D.H., R.J. Adrian, and G.C. Papen, *Phase-conjugate holographic system for high-resolution particle-image velocimetry*. Applied Optics, 1994. **33**(30): S. 7159-7170.
 122. Barnhart, D.H., N.A. Halliwell, and J.M. Coupland, *Holographic particle image velocimetry: analysis using a conjugate reconstruction geometry*. Optics and Laser Technology, 2000. **32**(7-8): S. 527-533.
 123. Hinsch, K.D., *Holographic particle image velocimetry*. Measurement Science & Technology, 2002. **13**(7): S. R61-R72.
 124. Cheong, F.C., et al., *Flow visualization and flow cytometry with holographic video microscopy*. Optics Express, 2009. **17**(15): S. 13071-13079.
 125. Barth, R., *Digital In-Line X-Ray Holographic Microscopy with Synchrotron Radiation*. 2008. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
 126. Aoki, Y., *Optical and numerical reconstruction of images from sound-wave holograms*. IEEE Transactions on Audio and Electroacoustics, 1970. **18**(3): S. 258-267.
 127. Kronrod, M.A., L.P. Yaroslavski, und N.S. Merzlyakov, *Reconstruction of a hologram with a computer*. Soviet Physics - Technical Physics, 1972. **17**: S. 333-334.
 128. Demetrakopoulos, T.H. und M. R, *Digital and Optical Reconstruction of Images from Suboptical Diffraction Patterns*. Applied Optics, 1974. **13**(3): S. 665-670.
 129. Onural, L. und M.T. Özgen, *Extraction of three-dimensional object-location information directly from in-line holograms using Wigner analysis*. Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision, 1992. **9**(2): S. 252-260.
 130. Onural, L. und P.D. Scott, *Digital decoding of in-line holograms*. Optical Engineering, 1987. **26**(11): S. 1124-1132.
 131. Jericho, S.K., et al., *In-line digital holographic microscopy for terrestrial and exobiological research*. Planetary and Space Science, 2010. **58**(4): S. 701-705. 10.1016/j.pss.2009.07.012.
 132. Kim, M.K., *Applications of Digital Holography in Biomedical Microscopy*. Journal of the Optical Society of Korea, 2010. **14**(2): S. 77-89. 10.3807/josk.2010.14.2.077.
 133. Cuhe, E., P. Marquet, und C. Depeursinge, *Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms*. Applied Optics, 1999. **38**(34): S. 6994-7001.

-
134. Politch, J., J. Shamir, und J. Ben Uri, *Improved polarization holography*. Applied Physics Letters, 1970. **16**(12): S. 496-498.
135. Colomb, T., et al., *Polarization microscopy by use of digital holography: application to optical-fiber birefringence measurements*. Applied Optics, 2005. **44**(21): S. 4461-4469.
136. Barth, R., et al., *Soft X-ray holographic microscopy of chromosomes with high aspect ratio pinholes*. Journal of Biotechnology, 2010. **149**(4): S. 238-242. 10.1016/j.jbiotec.2010.03.017.
137. Gass, J., A. Dakoff, und M.K. Kim, *Phase imaging without 2 pi ambiguity by multiwavelength digital holography*. Optics Letters, 2003. **28**(13): S. 1141-1143.
138. Svizher, A. und J. Cohen, *Holographic particle image velocimetry measurements of hairpin vortices in a subcritical air channel flow*. Physics of Fluids, 2006. **18**(1). 014105 10.1063/1.2158429.
139. Jericho, S.K., et al., *Submersible digital in-line holographic microscope*. Review of Scientific Instruments, 2006. **77**(4). 043706 10.1063/1.2193827.
140. Rappaz, B., et al., *Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy*. Optics Express, 2005. **13**(23): S. 9361-9373.
141. Weiße, S., *Neue Kontrastmechanismen in der digitalen In-line Holographie*. 2007. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
142. Schürmann, M., *Digital in-Line Holographic Microscopy with Various Wavelengths and Point Sources Applied to Static and Fluidic Specimens*. 2007. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
143. Heydt, M., *How do spores select where to settle?* 2010. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
144. Hutchings, N.R., URL: <http://www.biochem.uiowa.edu/donelson/Database%20items/SDM79.htm>. Zugriff am: [15.04.2011].
145. Lindberg, T., *Scale-space theory in computer vision*. 1994: Springer.
146. Sendra, H.G., et al., *Digital In-line Holographic Microscopy in multi-media environment*. Optics Letters, 2011. **in Vorbereitung**.
147. Garcia-Sucerquia, J., et al., *Immersion digital in-line holographic microscopy*. Optics Letters, 2006. **31**(9): S. 1211-1213.
148. Leal Taixe, L., et al., *Automatic tracking of swimming microorganisms in 4D digital in-line holography data*. IEEE Workshop on Motion and Video Computing (WMVC), Snowbird, Utah, USA., December 2009, 2009.
149. Leal Taixe, L., et al., *Classification of swimming microorganisms motion patterns in 4D digital in-line holography data*. 32nd Annual Symposium of the German Association for Pattern Recognition (DAGM 2010), 2010. **LNCS 6376**: S. 283-292.
150. Ngo, H., et al., *Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(25): S. 14687-14692.
151. Baron, D.M., et al., *Functional genomics in Trypanosoma brucei identifies evolutionarily conserved components of motile flagella*. Journal of Cell Science, 2007. **120**(3): S. 478-491. 10.1242/jcs.03352.
152. Magariyama, Y. und S. Kudo, *A mathematical explanation of an increase in bacterial swimming speed with viscosity in linear-polymer solutions*. Biophysical Journal, 2002. **83**(2): S. 733-739.

-
153. Turner, L., et al., *Temperature dependence of switching of the bacterial flagellar motor by the protein CheY(13DK106YW)*. Biophysical Journal, 1999. **77**(1): S. 597-603.
 154. Lewus, P. und R.M. Ford, *Temperature-sensitive motility of Sulfolobus acidocaldarius influences population distribution in extreme environments*. Journal of Bacteriology, 1999. **181**(13): S. 4020-4025.
 155. Ralston, K.S., et al., *Flagellar motility contributes to cytokinesis in Trypanosoma brucei and is modulated by an evolutionarily conserved dynein regulatory system*. Eukaryotic Cell, 2006. **5**(4): S. 696-711. 10.1128/ec.5.4.696-711.2006.
 156. Matthews, K.R., *The developmental cell biology of Trypanosoma brucei*. Journal of Cell Science, 2005. **118**(9): S. 283-290.
 157. ter Kuile, B.H., et al., *The electrochemical proton gradient in the bloodstream form of Trypanosoma brucei is dependent on the temperature*. Molecular and Biochemical Parasitology, 1992. **55**: S. 21-28.
 158. Parsons, M., *Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose*. Molecular Microbiology, 2004. **53**(3): S. 717-724. 10.1111/j.1365-2958.2004.04203.x.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Allen danken, die mich während der vielen Jahre meiner Zugehörigkeit zur Angewandten Physikalischen Chemie unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Michael Grunze danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit in seiner Gruppe durchführen zu können. Neben der Bereitstellung der Geräte und Räumlichkeiten möchte ich mich auf für die konstruktive Kritik bedanken, die die vorliegende Arbeit ermöglicht hat.

Prof. Dr. Joachim P. Spatz danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

PD Dr. Axel Rosenhahn gilt mein großer Dank für die geduldige Betreuung dieser Arbeit, mit vielen guten Ideen zum richtigen Zeitpunkt. Lieber Axel, ich möchte an dieser Stelle nochmal besonders dafür Danke sagen, dass du trotz eines unmenschlich befüllten Terminkalenders immer dann zur Stelle warst, wenn es wirklich brannte und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast. Ich habe von dir sehr viel gelernt und einige Dienstreisehighlights (sprechende Ampeln und der Gitarrenladen in Boston, Weinprobe in Würzburg) werden mir sicher noch lange in Erinnerung bleiben.

Prof. Dr. Markus Engstler danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung der Trypanosomen und seiner Labors in Darmstadt und Würzburg, an denen die in dieser Arbeit gezeigten Messungen durchgeführt wurden. Desweiteren möchte ich mich für die guten Diskussionen und die Unterstützung in biologischen Fragestellungen sowie für die Ausrichtung des Low-Re-Workshops in Würzburg bedanken, der ein wichtiger Bestandteil in der Entstehung dieser Arbeit war.

Prof. Dr. Cameron Tropea und der DFG danke ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 1114 und die damit verbundene Finanzierung sowie die Möglichkeit an vielen Klausur- und Seminartagen und den Veranstaltungen des GRK teilnehmen zu können.

Dr. Tamás Haraszti gilt mein großer Dank für die Bereitstellung der Pillarkanäle und den großen Einsatz bei der Entstehung der Mikrofluidikveröffentlichung. Danke für die große Geduld, die vielen guten Tipps und die Erweiterung meines Softwarehorizonts!

Karin Jordan, Benjamin Scherke, Swetlana Duchnay, Monika Medina España, Heike Kagerbauer, Astrid Biedermann, Reinhold Jehle, Peter Jeschka, Günter Meinusch und der

Werkstatt des PCI möchte ich für die Hilfe in allen administrativen und technischen Fragen danken.

Unter den vielen Kollegen in der APC mit denen ich über die Jahre arbeiten durfte möchte ich mich an erster Stelle bei Dr. Ruth Heine und Dr. Matthias Heydt bedanken. Liebe Ruth, lieber Matthias, ihr habt mir schon als Praktikant und später Hiwi und Diplomand sehr viel über Holographie, MatLab und Co. beigebracht und mir damit den Einstieg in dieses Feld ermöglicht.

Ruth, dir möchte ich vor allem für den guten Einstieg in die Gruppe und die bereitwillige Integration ins damalige „Frauenzimmer“ danken. Es war eine sehr schöne Zeit.

Matthias, danke für viele Diskussionen, praktische Tipps und vor allem das mächtige Softwarepaket, das du auf die Beine gestellt hast.

Der HORST-Crew bestehend aus Thomas, Tobias und Mike möchte ich für das gewissenhafte und ausführliche Korrekturlesen der Arbeit trotz Messzeitbelastung danken.

Hernán und Stojan waren immer zur Stelle, wenn programmiertechnische Probleme auftraten. Ein großes Dankeschön dafür!

In Würzburg möchte ich mich bei Niko Heddergott für die Kooperation, das Trypanosomenhandling und die angenehmen Messzeiten bedanken. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Andi Hartel, John Bührdel, Jamin Jung und Christopher Bartram Danke sagen.

Tamás, Simon und Timo möchte ich für die gute Zusammenarbeit bei den Pillarfeldexperimenten danken.

Meiner GRK-Crew, bestehend aus René Winter, Björn Voß, Felix „Fritten-“ Friedel, Jessica Balbo, Wasim Abuillan, Matthias Höh, Andi Hartel, Thilo Kissel, Jan Vogt, Andreas Lembach, Matthias Euler, Uwe Petzold, Andi Rudolf, Vladimir Dovgal, Alice Kress und Jörg-Karl Bösner möchte ich für die schöne Zeit, vor allem auf den alljährlichen Kleinwalsertal Touren, danken.

In Heidelberg/Karlsruhe danke ich allen aktuellen und ehemaligen Kollegen für die schöne Zeit und gute Zusammenarbeit. Das sind (in willkürlicher Reihenfolge): Mike, Svenja, Tobias, Thomas, Stella, Max, Toffi, Christina, Hernán, Maria, Pilu, Isabel, Stojan, Linlin, Tawheed, Nikolaus, Fanny, Andrea, Georg, Wodo, Florian, Matthias, Ruth, Martina, Xinyu, Sören, Jörg, Dominique, Brett, Brian, Elka und Svetlana (sowie alle die ich vergessen habe!).

Meinen Praktikanten Mike Haberberger Joachim Fix, Daniel Pflästerer und Manuel Schaffroth danke ich für die engagierte Mitarbeit. Lieber Pflästi, vor allem dir möchte ich an dieser Stelle ein ganz großes Danke für dein Riesenarbeitspensum beim Trajektorien bestimmen und die gute Laune im Büro, für die du gesorgt hast, sagen.

Auch meine Nicht-PCler-Studienkollegen sollen hier nicht unbedacht bleiben: Björn „die Eidechsenkönigin“, Micha, Achim, Christian L., Irene, Steffi, Tobi P., Knoppers, Suse, Thomas, Fabi, Christian M., Arnd, Timon, Pascal, Alex, Annemarie, Sascha, Steffen S., Anders, Steffen W., Stefan. Danke für die schöne Zeit!

Meinem Nachbarn Erik Sommer danke ich für die *E. coli*-Nachhilfe.

Meinen Freunden Jochen, Alex, Peppi, Lenny, Katharina, Maiki, Jäs, Moni, Christopher (Peppi 2), Mounti, Jensiboy, Christian, Björn, und Spuli bin ich dankbar dafür, dass sie mir gerade auch in der Zeit des Zusammenschreibens gezeigt haben, dass es auch andere Dinge als Wissenschaft gibt.

Meiner großen Familie, meiner Mutter Andrea, meinem Vater Lothar, meinem Bruder Tobias, meinem Onkel Benedikt, meiner Großmutter Ingeborg, meinen Großeltern Hannelore und Rudolf, sowie dem Richter-Klan: Anneliese, Arnold, Dani, Tobbi, Steffi, Tim, Moritz und den Eschtlern möchte ich dafür danken, dass sie mich immer unterstützt/finanziert/durchgefüttert/mir ein Dach über dem Kopf zur Verfügung gestellt haben. Ohne euch wäre das Alles nicht möglich gewesen.

Mein größter Dank gilt aber Leonie, die mich während der letzten viereinhalb Jahre mit all meinen positiven und negativen Eigenheiten begleitet hat. Ich weiß, dass es vor Allem während der Fertigstellung dieser Arbeit häufig nicht einfach für dich war, meine Launen und meine Paranoia zu ertragen, aber du warst immer für mich da und hast mich unterstützt. Ich liebe dich!

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Ich habe an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Heidelberg, den
