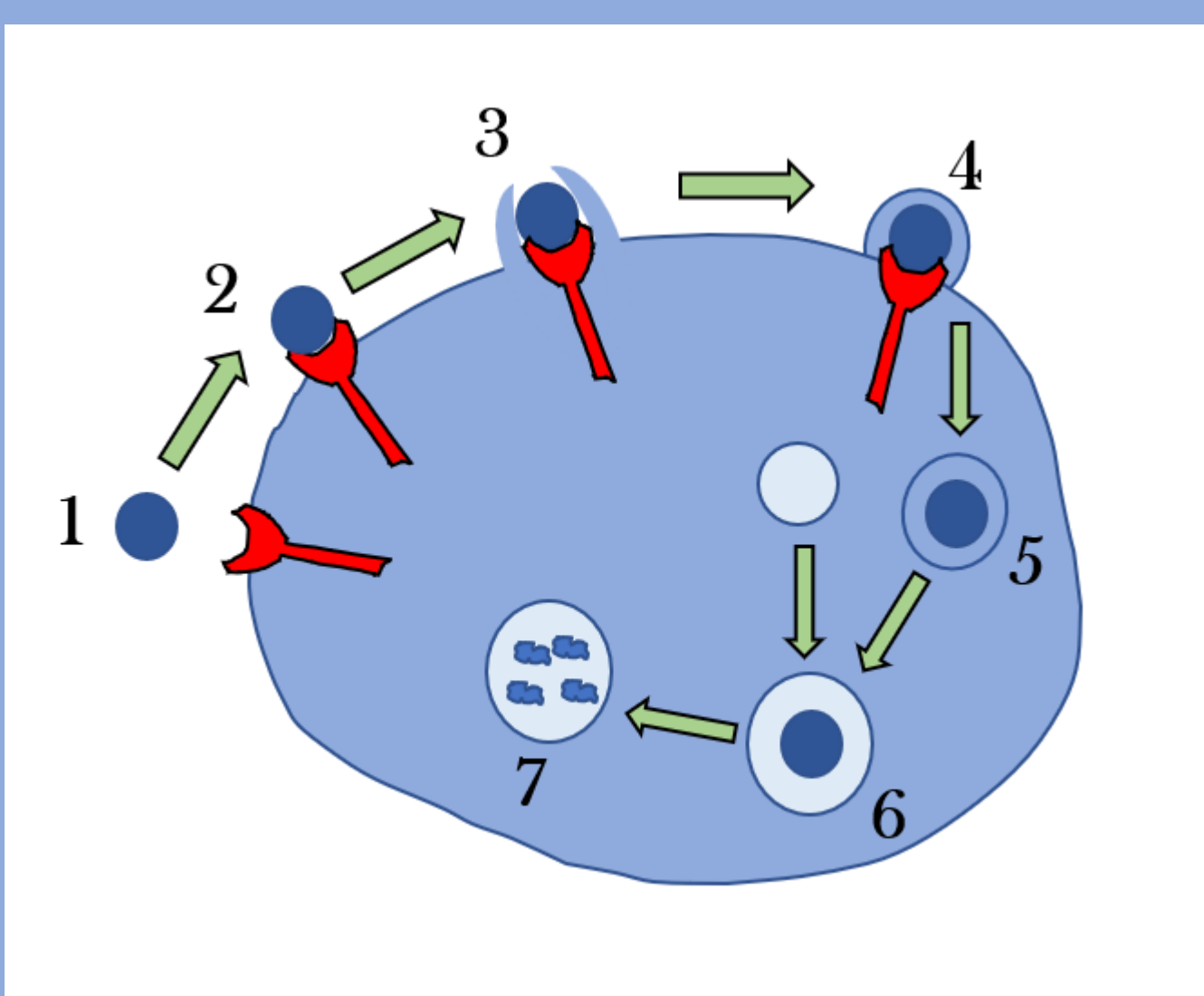


# Signalauflösung von Zellen: Ein Dualbead-Experiment

## Zwischenbericht

### Biologischer Hintergrund

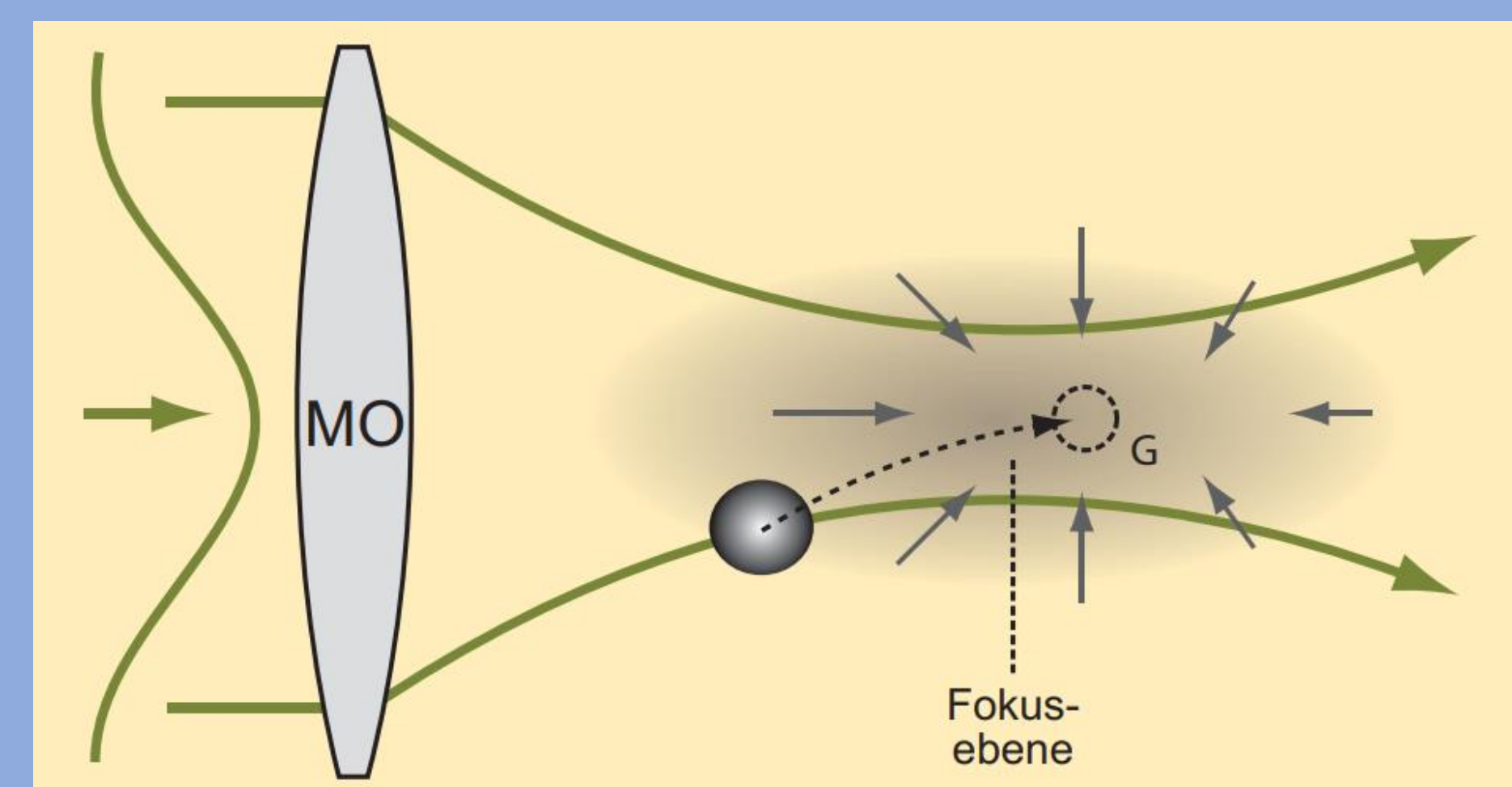
Körperfremde Moleküle werden im Körper durch *Phagocyten* eliminiert. Bei den im Experiment verwendeten *Makrophagen* binden die Fremdkörper an bestimmte Rezeptoren an der Zellmembran, im untersuchten Fall an *Fcγ-Rezeptoren*. Durch diese Bindung wird die Polymerisation von Aktin (Strukturprotein des Zellskeletts) induziert; es bildet sich eine Hülle um das Partikel, eine *phagocytische Tasse*. Nachdem es auf diese Weise in die Zelle eingeschlossen wurde, wird das Molekül mit den *Lysosomen* verschmolzen, wo dieses aufgrund des niedrigen pH-Werts zersetzt werden. Da dieser Prozess ein zentraler Bestandteil unserer Immunabwehr ist, wurden dazu bereits zahlreiche Experimente durchgeführt. Um eine komplette Beschreibung dieses Vorgangs zu erhalten, sind jedoch noch viele weitere Projekte notwendig. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Signalaufklärungsvermögen von Makrophagen, was wiederum Rückschlüsse auf die Rezeptordichte in den aktiven Bereichen zulässt.



Schema der Phagozytose:  
Ein Fremdkörper nähert sich der Zelle (1) und bindet an den entsprechenden Rezeptor (2). Dies löst die Bildung einer phagocytischen Tasse aus (3,4). Der Fremdkörper gelangt so mit seiner Tasse in die Zelle (5). Dort bildet er mit einem Lysosom einen Komplex (6), in welchem er zersetzt wird (7).

### Die optische Pinzette

Bei der *optischen Pinzette* wird fokussiertes Licht dazu verwendet, um Partikel zu fangen und zu bewegen. Trifft Licht auf Materie, findet eine Impulsübertragung in Propagationsrichtung statt, woraus die *Streuungskraft* resultiert. Bei einer inhomogenen Lichtverteilung tritt an transparenten Partikeln zusätzlich noch eine Kraft proportional zur Intensitätsänderung auf. Diese *Gradientenkraft* kann dazu verwendet werden, um Teilchen an einem Punkt festzuhalten; es ist in einer optischen Falle gefangen. Durch drehbare Spiegel kann dieses auch bewegt werden. Verwendet man einen *Spatial Light Modulator (SLM)*, ein Flüssigkristalldisplay, so können auch simultan eine Vielzahl von Fallen erzeugt und unabhängig voneinander bewegt werden.

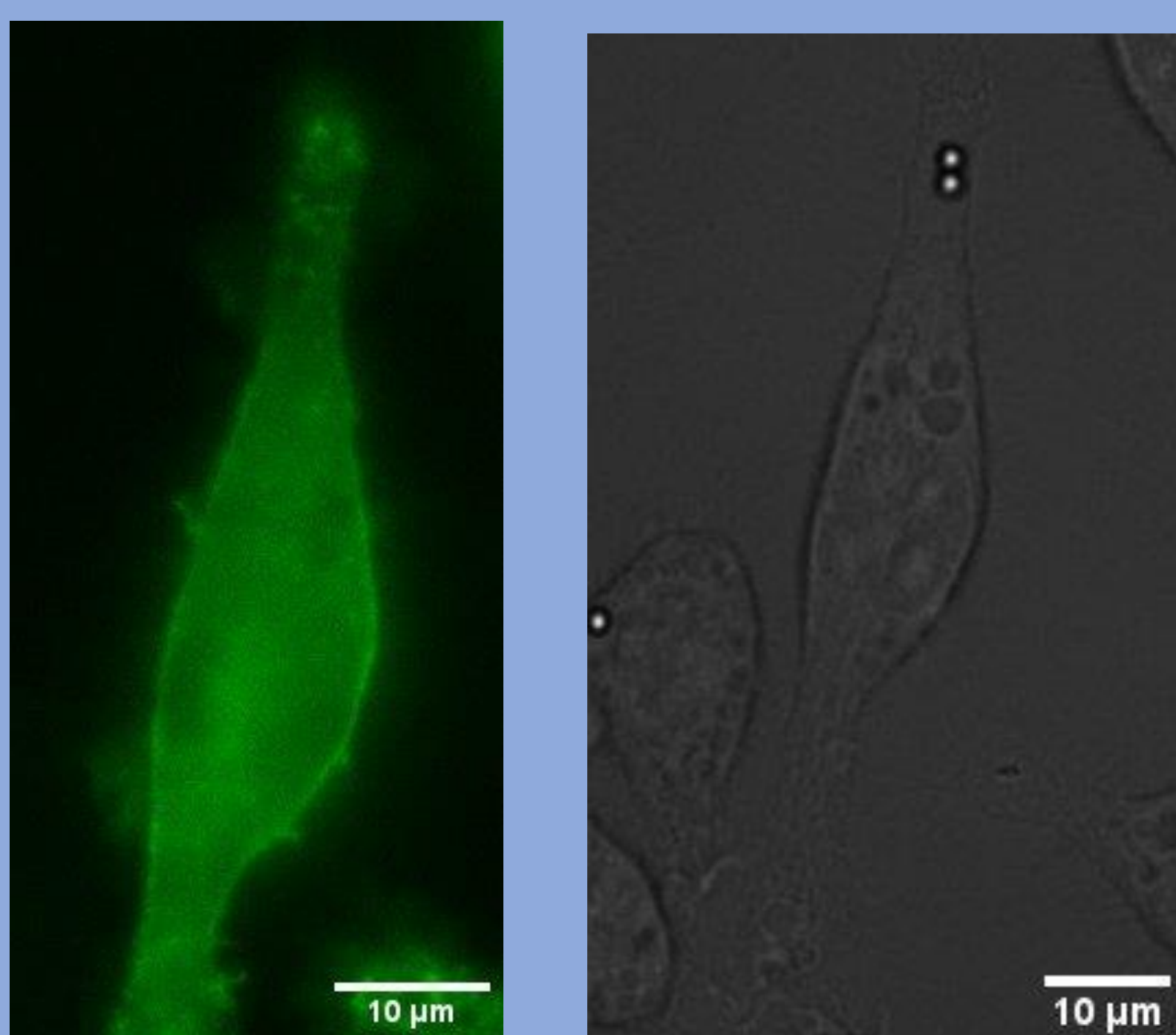


Kräfte in einem Gaußschen Strahlenbündel; durch die Gradientenkraft wird das Partikel in der Fokusebene gehalten

Bild: Alpmann et al. Die optische Pinzette. Mikrowelt im Lichtgriff. Aus: Physik unserer Zeit 1/2014

### Methodik

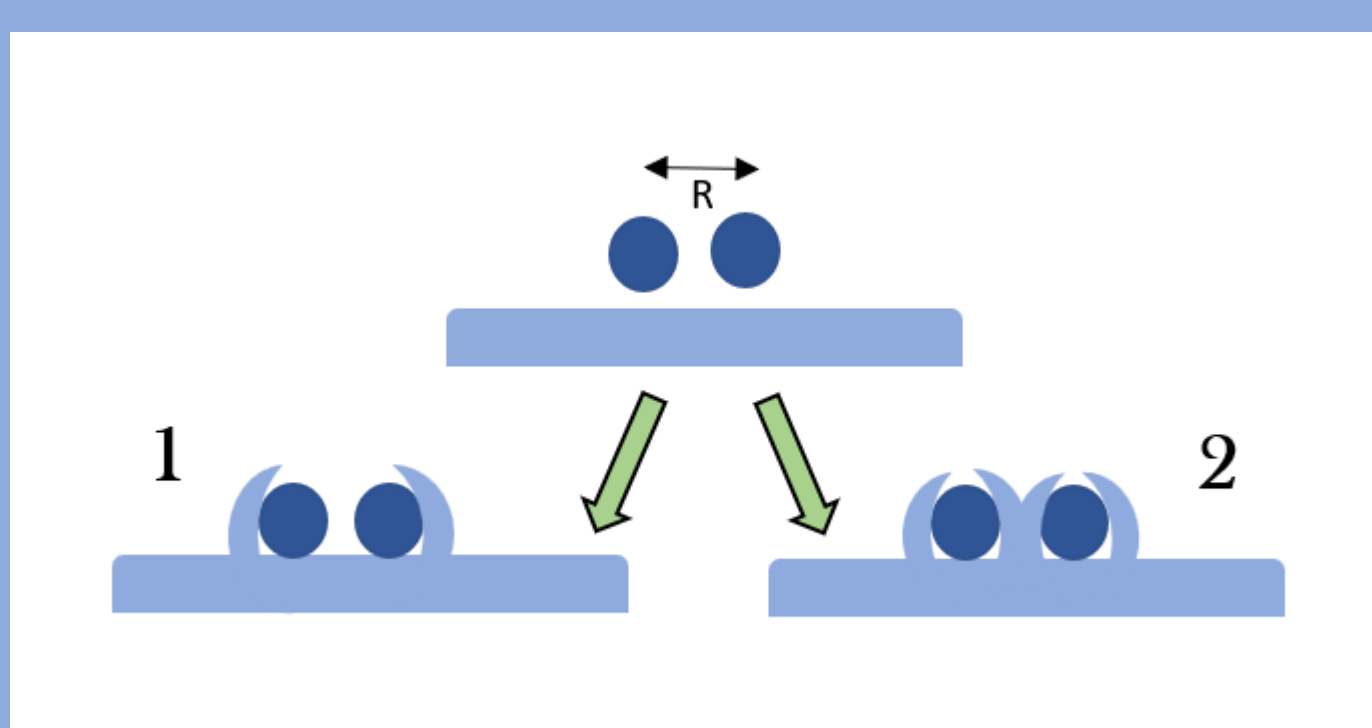
Um das Signalaufklärungsvermögen zu bestimmen, wird ein *Dualbead-Experiment* durchgeführt. Dazu werden Plastikkügelchen, die Beads, verwendet. Diese haben einen Durchmesser von  $2\mu\text{m}$  und werden mit Immunglobulin G (IgG) beschichtet, einem Substrat der *Fcγ-Rezeptoren*. Für eine Messung werden dann zwei der Beads mithilfe einer optischen Pinzette unter dem Mikroskop zusammengehalten und an eine Makrophage (J774A.1) geklebt. Das Aktinskelett dieser Zellen wurde fluoreszent gemacht, so dass diese mit Fluoreszenzmikroskopie zu beobachten sind.



Eine Makrophage sowohl im Fluoreszenzkanal (links) als auch im Hellfeld (rechts). Die beiden weißen Kreise sind die zusammengehaltenen Beads.

Werden die Beads vom Rezeptor erkannt, gibt es für die Aufnahme zwei Möglichkeiten:

1. Joint Uptake: Die Beads werden zusammen als ein Komplex wahrgenommen und gemeinsam aufgenommen
2. Single/Separate Uptake: Die Beads werden als einzelne Teilchen erkannt und ein/beide Beads werden getrennt voneinander aufgenommen

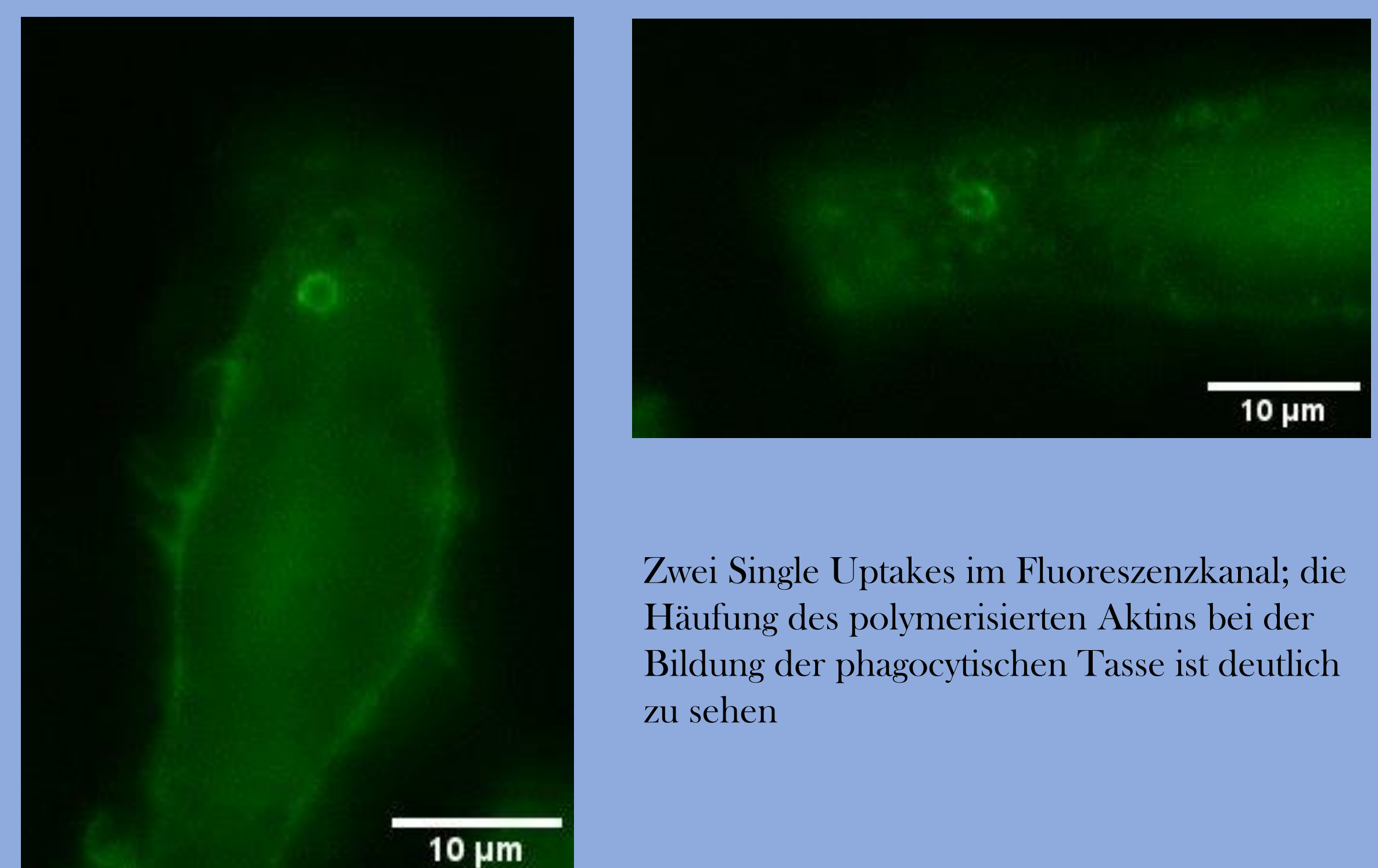


Schematische Darstellung von Joint Uptake (1) und Separate Uptake (2). Im Allgemeinen hängt das Verhalten vom Abstand der Beads  $R$  ab. Für dieses Experiment ist  $R = 0$ .

Für den Fall 1 werden also eine große phagocytische Tasse, für den Fall 2 eine einzelne/zwei separate erwartet. Da diese aus polymerisiertem Aktin bestehen, sollten diese auch im Fluoreszenzkanal zu sehen sein. Aus der Art des Uptakes kann unmittelbar auf die Rezeptordichte geschlossen werden, da IgG und die *Fcγ-Rezeptoren* im Verhältnis von 1:1 binden.

### Aktueller Stand

In bislang 82 (verwertbaren) Messungen wurden 21 Single Uptakes im Fluoreszenzkanal beobachtet, jedoch bislang keine Joint-Uptakes.



Zwei Single Uptakes im Fluoreszenzkanal; die Häufung des polymerisierten Aktins bei der Bildung der phagocytischen Tasse ist deutlich zu sehen

Probleme/mögliche Ursachen für fehlende Joint Uptakes:

- I. Falsch eingestellte Fokusebene: Das verwendete Tracking-System ist in z-Richtung für einzelne Beads optimiert, der Tracker ist also oftmals überfordert und verliert die Beads und damit den richtigen Fokus; ein Training der KI auf zwei Beads ist allerdings ungleich schwerer umzusetzen.
- II. Durch den variierenden Fokus kommt es teilweise aufgrund optischer Phänomene zu dauerhaft sichtbaren Ringen um die Beads, die leicht mit phagocytischen Tassen zu verwechseln sind. Das erschwert die automatisierte Auswertung.

### Ausblick

Da ein Trainieren der KI auf zwei Beads den Rahmen einer BA sprengt, werde ich meine vorhandenen Daten auswerten. Dazu rekonstruiere ich die unvollständigen Trackingdaten und verwende diese, um automatisiert die Intensität in einem Kreisring um die Beads im Vergleich zum Hintergrund zu messen. Um die Ringe aufgrund der optischen Relikte ausschließen zu können, werden Thresholds notwendig sein. Ich hoffe, dass durch die maschinelle Auswertung weitere Uptakes ermittelt werden, die mit bloßem Auge nicht sichtbar sind.

### Literatur

- Alpmann et al.: Die optische Pinzette. Mikrowelt im Lichtgriff. Aus: Physik unserer Zeit 1/2014  
Abröhl et al.: Taschenlehrbuch Biologie. Biochemie, Zellbiologie.  
Hardin et al.: Beckers Welt der Zelle. 8., aktualisierte Auflage.