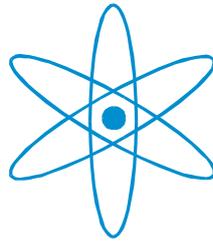


PHYSIK DEPARTMENT



Mikrorheometrie passiver und aktiver Aktinnetzwerke

Dissertation

von

Jörg Uhde



Technische Universität
München

Technische Universität München
Physik Department
Lehrstuhl für Biophysik, E22

Mikrorheometrie passiver und aktiver Aktinnetzwerke

Jörg Uhde

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der
Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Friedrich

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Rief (schriftliche Beurteilung)
1. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann, em. (mündliche Prüfung)
2. Univ.-Prof. Dr. J. O. Rädler,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 11. Mai 2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 03. Juni 2004 angenommen.

Für Sabine

Für Sabine

Für Sabine

Inhaltsverzeichnis

Theoretischer Teil	3
1 Einleitung, Materialien und Methoden	4
1.1 Einleitung	4
1.2 Materialien	7
1.2.1 Aktin und Aktinnetzwerke	7
1.2.2 Myosin & Subfragmente	9
1.2.3 Gelsolin, Phalloidin, Farbstoffe und Kugeln	14
1.2.4 Proteinpreparationen	16
1.3 Methoden	22
1.3.1 Magnetische Pinzetten	22
1.3.2 Verbesserung der Apparatur	26
1.3.3 Fluoreszenzmikroskopie	27
1.3.4 Elektronenmikroskopie	27
1.3.5 Digitalen Bildverarbeitung	29
2 Theorie	31
2.1 Polymere	31
2.1.1 Viskoelastizitätstheorie	36
2.1.2 Rheometrie	41
2.2 Osmotische Kräfte	41
2.2.1 Osmotischer Widerstand	42
2.2.2 Verschlaufte Polymernetzwerke	45
2.3 Magnetkugel im Feldgradient	45
Experimenteller Teil	47
3 Neue Methode der Krafteichung	49
3.0.1 Durchführung	49
3.0.2 Ergebnisse und Diskussion	49
4 Aktiver Transport in versteifenden Aktinnetzwerken	53
4.1 Präparation	53
4.1.1 Aktinnetzwerk mit fluoreszenzmarkierten Filamenten	53
4.1.2 Kontrollproben	54
4.1.3 Doppelfärbung von Aktin	55
4.2 Durchführung	55
4.2.1 "Low Force"-Aufbau	55
4.2.2 Fluoreszenzmikroskop	56

4.3	Ergebnisse	56
4.3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	56
4.3.2	Thermische Fluktuationen	58
4.3.3	Aktiver Transport	61
4.3.4	Torsion des Netzwerkes / Einfrieren der Filamentdynamik	67
4.3.5	Reversibilität des Sol-Gel-Übergangs	67
4.4	Diskussion	68
4.4.1	Allgemeine Diskussion	68
4.4.2	Detaillierter Mechanismus	70
4.4.3	Wahrscheinlichkeitsberechnung der Mehrfachvernetzung	72
4.4.4	Gründe für die breite Verteilungen der Parameter	73
5	Sondenkomplianzmessungen	74
5.1	Überblick über die Methode	74
5.1.1	Einleitung	74
5.1.2	Präparationen	75
5.1.3	Durchführungen	76
5.2	Relaxationsspektren aus transienten Sondenkomplianzmessungen	76
5.2.1	$G(t)$ -Spektrum-Referenzmessungen	76
5.2.2	Relaxationsspektren von Aktin	79
5.3	Direktauswertung transientser Sondenkomplianzmessungen	92
5.3.1	Einleitung	92
5.3.2	Durchführung & Auswertung	92
5.4	Komplianzkurven bei unterschiedlichen Kräften	93
5.4.1	$J(t)$ für schwache Kräfte	93
5.4.2	$J(t)$ für mittlere Kräfte	99
5.4.3	$J(t)$ für starke Kräfte / für starke Kraftgradienten	109
5.5	Kraftabhängigkeit der viskoelastischen Materialparameter	114
5.5.1	Zusammenfassung und Ergebnis	118
5.6	Einfluss der Maschenweite bzw. der Aktinkonzentration	119
5.6.1	Zusammenfassung und Ergebnis	121
5.7	Inhomogenes Langzeitverhalten der Komplianzkurven	122
5.7.1	Zusammenfassung und Ergebnis	124
6	Erzwungene Einzelfilamentauslenkungen	125
6.1	Präparation und Durchführung	125
6.2	Ergebnisse und Diskussion	127
6.3	Probleme der Methode	129
6.4	Zusammenfassung und Ergebnis	131
7	Transiente Sondenkomplianzmessungen aktiver Aktinnetzwerken	132
7.1	Präparation und Durchführung	133
7.2	Ergebnisse und Diskussion	134
7.3	Zusammenfassung und Ergebnis	136
8	Anhang	I
A	Die Methode der neue Krafteichung	II

B Methode der nicht negativen kleinsten Quadrate	VI
B.0.1 Die <i>Igor XOP</i> „MatrixNNLS“	VI
B.0.2 Kommentiertes Listing <i>MatrixNNLS.c</i>	VII
C Die ATPase-Rate von HMM	XI
Verzeichnisse	XV
Abkürzungsverzeichnis	XV
Symbolverzeichnis	XVII

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die viskoelastischen Eigenschaften passiver und aktiver (mit Motorproteinen vernetzter) Aktinnetzwerke mittels verschiedener mikro(mechanischer) Methoden. Aktin wird dabei *in vitro* aus einer präparierten Proteinlösung polymerisiert und teilweise mit dem Myosin II Fragment HMM versetzt.

Die zentrale Untersuchungsmethode der Arbeit ist die sog. Magnetische Pinzette. Bei dieser Methode werden mikroskopisch kleine Magnetkugeln in das zu untersuchende Medium eingebettet und mittels eines Magneten ausgelenkt. Der zeitliche Verlauf der Auslenkungen (\propto Komplianz $J(t)$) wird mit Hilfe der optischen Mikroskopie in Verbindung mit dynamischer Bildverarbeitung aufgenommen.

Da die Krafteichung eines solchen Aufbaus eine kritische Fehlerquelle darstellt, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit insofern deutlich verbessert, als dass eine neuartige, auf theoretischen Überlegungen basierende und physikalisch sinnvolle Normierungsfunktion entwickelt wurde.

Als weitere technische Verbesserung wurde für sehr kurze Messzeiten eine Methode zur Bestimmung des genauen zeitlichen Nullpunktes der Kriechkomplianzkurven entwickelt, wodurch der Einfluss der endlichen Aufnahme Frequenz befriedigend korrigiert werden kann.

Im ersten Teil der Arbeit wurden transiente Kriechkomplianzkurven aufgenommen. Aus diesen Kurven wurden mit Hilfe einer neuartigen Methode nach Liu [Liu, 2001a,b] verbesserte Relaxationsspektren $G(t)$ von passiven Aktinnetzwerke berechnet, die im Gegensatz zur herkömmlichen Methode nach Hopkins und Hamming [Hopkins und Hamming, 1957; Tschoegel, 1989] für einen weitaus größeren Zeitbereich verlässliche Daten liefern. Die durch Fouriertransformation berechneten Frequenzabhängigkeiten des Speichermoduls $G'(\omega)$ und des Verlustmoduls $G''(\omega)$ stimmen hervorragend mit den Spektren überein, die mittels oszillierender mikro- oder makrorheologischer Methoden gemessen werden.

Durch sorgfältige Messungen der Kriechkomplianzen von sehr kurzen bis zu sehr langen Zeiten wurden Skalengesetzte $J(t) \propto A_i t^{\alpha_i}$ im Zeitbereich von $1 \cdot 10^{-2}$ bis $1 \cdot 10^2$ Sekunden bestimmt.

Im Kurzzeitbereich wurde der bekannte Exponent $\alpha = 0.75$ des subdiffusiven Verhaltens bestätigt.

Für den mittleren Zeitbereich wurde erstmals ein Wurzelgesetz ($J(t) \propto t^{0.5}$) gefunden, welches für lange Zeiten in hydrodynamisches Fließen ($J(t) \propto t$) übergeht.

Das erstmalig beobachtete wurzelartige Verhalten $J(t) \propto t^{0.51 \pm 0.05}$ führte zu einer neuen Theorie der Mikrorheometrie [durch A. Boulbitch, Lehrstuhl E22]. Diese basiert auf der Idee, dass die Kugelbewegung einen Nichtgleichgewichtszustand der Filamente in Bewegungsrichtung erzeugt, welcher zu einer mechanischen Relaxation durch diffusive Wiederherstellung des thermodynamischen Gleichgewichts führt.

Für die Langzeitviskosität wurden quantitative Vergleiche zwischen verschiedenen Experimenten vorgenommen, welche die extreme Empfindlichkeit dieser Größe auf die Präparation demonstrieren.

Genaue Messungen der Kraftabhängigkeit bis zu sehr kleinen Kräften zeigen ein deutliches nichtlineares Verhalten. Zusätzlich tritt bei kleine Kräften plötzlich eine (bis jetzt noch nicht beschriebene) Sättigung der Kriechkomplianz auf mittleren Zeiten auf (größenordnungsmäßig einige 10 Sekunden). Aus diesem Verhalten wurde geschlossen, dass die Kraftsonden bei sehr kleinen Kräften nicht in der Lage sind, ihren Netzwerkmaschen zu entkommen, während sich die Sonden oberhalb einer Schwellkraft durch die Maschen hindurch bewegen können. Dies ist äquivalent zum Übergang von elastischem zu plastischem Verhalten normaler Festkörper. Der Unterschied zu bisher beschriebenen Kurven ist allerdings erst auf Zeitskalen erkennbar, welche bei früheren Experimenten (z.B. [Schmidt, 1999]) noch nicht zugänglich waren. Für dieses Phänomen wird ein Erklärungsansatz präsentiert.

Zusätzliche Evidenz für die Gültigkeit des neuen osmotischen Mechanismus der Relaxation lieferten Messungen der Kraftabhängigkeit der Vorfaktoren A_i der Kriechkomplianz: Der Befund $J(t) \propto F^{-0.27 \pm 0.08}$ stimmt befriedigend mit einer theoretische Abschätzung von $J(t) \propto F^{-0.2}$ überein. Ähnlich gut war die Übereinstimmung der theoretisch vorhergesagten und der gemessenen Abhängigkeit von $J(t)$ von der Aktinkonzentration. Weiterhin wurde gezeigt, dass die charakteristischen Zeiten τ_e (Entanglement-Zeit) und τ_d (Diffusions-Relaxations-Zeit) etwa invers wurzelförmig von der angelegten Kraft abhängen.

Die Abhängigkeit der Langzeitviskosität von der Aktinkonzentration (bzw. dem Verhältnis aus Maschenweite zu Kugeldurchmesser ξ/d) wurde wie folgt bestimmt: Für den Konzentrationsbereich von 3-35 μM gilt ein Potenzgesetz mit einer Potenz von 1.37 ± 0.27 (bzw. von -2.74 ± 0.34 für das Verhältnis ξ/d).

Eine sorgfältige Analyse der hydrodynamischen Bewegung der Kraftsoden ermöglichte erstmals Messungen der räumlichen Fluktuationen der Maschenweite. Insbesondere zeigte es sich, dass die Kohärenzlänge der Fluktuationen in der Größenordnung von 10 μm liegen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Methode der erzwungenen Reptation („Enforced Reptation“) wesentlich verbessert, so dass eine Anzahl von größenordnungsmäßig etwa 5 auswertbaren Kurven pro Probe im Gegensatz zu bisher etwa 5 pro Messtag, erreicht werden kann. Damit kann erstmals eine qualitative Abhängigkeit der Langzeitviskosität des Kugel/Filament-Systems von der Filamentlänge untersucht werden. Als Ergebnis ergibt sich, dass selbst die kleinsten auf dem Markt erhältlichen magnetischen Sondenpartikel (mit tolerabler Größenvarianz) das Antwortverhalten des Kugel/Sonde-Systems dominieren und zwar mindestens bis zu Filamentlängen von 20 μm .

Im dritten Teil der Arbeit wurden umfangreiche Untersuchungen an aktiven Aktin/HMM-Netzwerken bei hohem ATP-Gehalt und im Übergang zum Gel-Zustand während der ATP-Verarmung durchgeführt. Bei hohen ATP-Konzentrationen konnte im Rahmen der Genauigkeit kein messbarer Einfluss der Motoren auf die viskoelastischen Eigenschaften nachgewiesen werden. Weder die Kurvenform noch die Absolutwerte oder die Fluktuationen zeigten statistisch signifikante Abweichungen zu den mikromechanischen Messungen mit reinem Aktin.

Als neuartiges und unerwartetes Phänomen konnte jedoch während der ATP-Verarmung (in der Nähe des Sol-Gel-Übergangs) eine plötzlich einsetzende aktive Bewegung einzelner Filamente über große Entfernungen nachgewiesen werden. Einzelne Filamente werden mit Geschwindigkeiten von bis zu 2.6 $\mu\text{m/s}$ über Strecken bis etwa 40 μm transportiert. Anschließend erfolgt eine mesoskopische Torsion des Netzwerkes und ein „Einfrieren“, der Filamentdynamik.

Da einzelne HMM-Motoren nicht prozessiv sind, lässt sich aus dem Phänomen des gerichteten Transports auf ein kooperatives Zusammenwirken der Motoren schließen. Dies wird dadurch erklärt, dass der Bruchteil der gebunden Motoren aufgrund der ATP-Verarmung erhöht wird. Aufgrund der beobachteten Abhängigkeiten des Phänomens von der Aktinkonzentration, der HMM-Konzentration und der Pufferzusammensetzung wurde ein neuartiges Reißverschlussmodell vorgeschlagen.

Theoretischer Teil

Kapitel 1

Einleitung, Materialien und Methoden

1.1 Einleitung

Polymernetzwerke sind ein integraler Bestandteil aller biologischer Systeme mit einem größeren Entwicklungsgrad als dem von Viren. Aktin kommt hierbei, als dem strukturegebenden (Zellskelett) oder Bewegung ermöglichenden (Muskel, Zellbewegung) Biopolymer eine besondere Bedeutung zu ([Alberts et al., 1994; Voet und Voet, 1995]).

Das Aktinnetzwerk sorgt als Bestandteil des Zellskeletts für die nötige mechanische Stabilität der Zelle, indem es ein grobmaschiges, die ganze Zelle durchziehendes, verknüpftes Netzwerk ausbildet. Ohne dieses Netzwerk würde die Zelle, nur zusammengehalten von der weichen Zellmembran, immer eine (mehr oder weniger) kugelförmige Gestalt annehmen, die jedoch nur in Ausnahmefällen den Aufgaben einer Zelle gerecht würde. Injizierte man z.B. die Droge Lantrunculin-A in eine Zelle, blockiert dieser Stoff die Aktin-Bindungsstelle der freien Monomere. Daraufhin depolymerisiert das Aktin-Zellskelett, was zu einem Zusammenziehen und Erweichen der Zellen führt ([Yarmola et al., 2000; Feneberg, 2003]).

Andererseits ist es für eine Zelle extrem wichtig, ihre Form *gezielt* verändern zu können (zum Beispiel im Verlauf der Zellteilung oder bei der Zellbewegung). Auch hierbei spielt das Aktin eine wichtige Rolle: So polymerisiert das Aktinnetzwerk bei der Zellbewegung in Vorwärtsrichtung (im sog. Leitsaum, Abb. 1.1(a)) stärker und schiebt so die Zellmembran vorwärts. Am nachziehenden Ende depolymerisiert das Netzwerk hauptsächlich und die Zellmembran zieht sich zurück. Da die Zelle an verschiedenen Punkten der Unterlage anhaftet, bewegt sie sich so insgesamt gerichtet vorwärts. Die Richtung, in die sich eine Zelle dabei bewegt, kann z.B. durch einen chemischen Gradienten vorgegeben werden (Chemotaxis, vgl. Abb. 1.2). Die Stellen der Anhaftung sind die sog. Fokalkontakte, die durch Aktinbündel (den sog. Stressfasern) stabilisiert werden (Abb. 1.1(b)).

Verschiedene Vertreter einer speziellen Proteinfamilie sind in der Zelle für den Transport von Lasten entlang der Aktinfilamente, bzw. für die Verschiebung von Filamenten gegeneinander zuständig. Es handelt sich um die Familie der Myosin-Motorproteine (Myosine). Myosine sind in der Lage, chemische Energie in Form von ATP (Adenosin-Tri-Phosphat) in mechanische Arbeit an Aktinfilamenten umzusetzen. Dieser Vorgang spielt bei allen eben beschriebenen Prozessen eine entscheidende Rolle.

Eine Untergruppe aus der Familie der Myosine ist das Myosin II (konventionelles Muskel-Myosin). Vertreter dieser Myosin-Familie lagern sich zu Bündeln zusammen, aus denen die

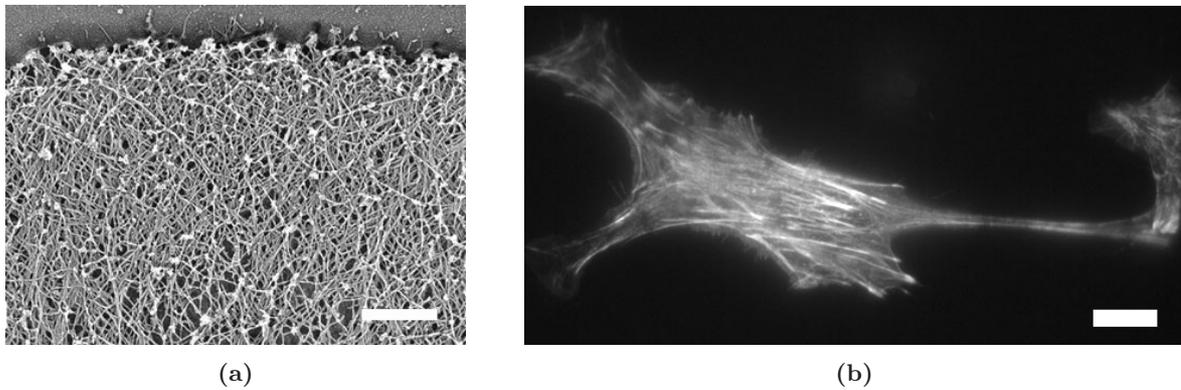


Abbildung 1.1: (a) Die Lamellopodia am Leitsaum einer Zelle bestehen aus einem dichten Netz von Aktinfilamenten. Gefrierätz-Elektronenmikroskopieaufnahme. Maßstab $5\ \mu\text{m}$. ([Svitkina et al., 1997])
 (b) Fluoreszenzaufnahme von Stressfasern eines 3T3-Mausfibroblasten. Die Stressfasern enden meist in Fokalkontakten. Das Aktin-Netzwerk der fixierten Zelle wurde mit Phalloidin-Rhodamin markiert. Maßstab $10\ \mu\text{m}$. (Eigene Aufnahme, Zeiss Axiovert200, 63x Ölimmersionsobjektiv)

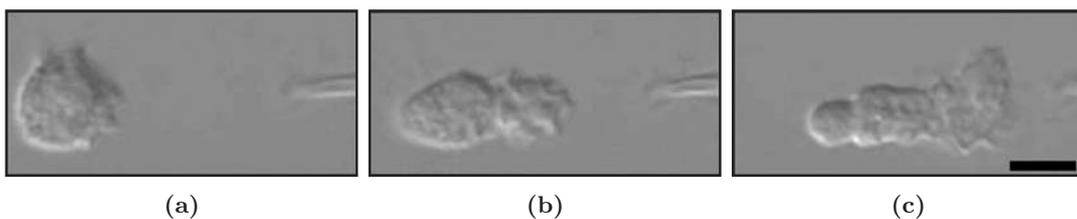


Abbildung 1.2: (a)–(c) Antwort einer *Dictyostelium* Amöbe auf einen chemotaktischen Reiz (Zugabe eines Reizstoffes über die Pipette). Die Bewegung erfolgt durch gezielte Polymerisation und Depolymerisation des Aktin-Zellskeletts und durch Aufbauen und Lösen von Fokalkontakten. Der Zeitabstand der Bilder beträgt ca. 15 s. Der Maßstab hat eine Länge von $5\ \mu\text{m}$ ([Alberts et al., 1994], Abb. 16-96, bzw. [, URL]).

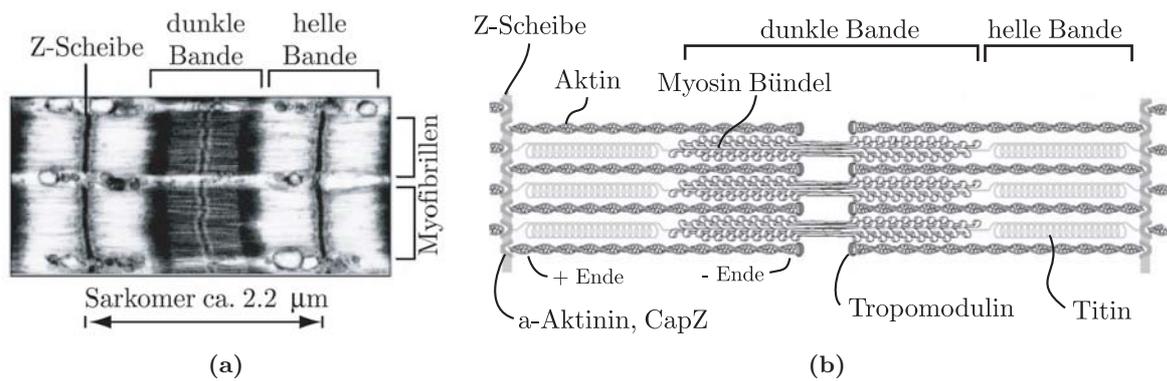


Abbildung 1.3: Myofibrillen des Skelettmuskels. (a) Längsschnitt einer Skelettmuskelzelle eines Kaninchens. Gut zu erkennen sind die hellen und dunklen Bänder und die Z-Scheibe. (b) Schematischer Aufbau einer Myofibrille. Die Plus-Enden der Aktinfilamente (dünne Filamente) sind mit einem α -Aktinin/CapZ-Komplex in der Z-Scheiben verankert. Tropomodulin stabilisiert das Aktin am Minus-Ende. Die dicken Filamente (Myosin II Bündel) werden durch Titin mittig im Sarkomer gehalten. (nach [Alberts et al., 1994], Abb. 16-69/72)

dicken Filamente des Muskel-Sarkomers¹ bestehen. Die dünnen Filamente des Sarkomers bestehen aus Aktinfilamenten. Zusätzlich sind natürlich noch eine Reihe weiterer Proteine an der Muskelfunktion beteiligt.² Siehe dazu auch Abb. 1.3.

Weitere Vertreter der Myosin Familie sind das Myosin I und das Myosin V. Beide Myosine transportieren Vesikel entlang des Aktinnetzwerkes der Zelle, vom Minus³ zum Plus-Ende³ der Filamente. Da das Monomere Myosin I nach jedem Kraftschlag⁴ vom Aktinfilament dissoziiert, ist es auf einen diffusiven Rücktransport zum Filament angewiesen. Das Myosin V hingegen ist als einziges bekanntes Myosin *prozessiv*, hat also die Fähigkeit, alleine für eine gewisse Zeit an einer Aktinfilament-Schiene entlang zu laufen. Bemerkenswert ist das Myosin VI, das als einziges bis jetzt bekanntes Myosin vom Plus- zum Minus-Ende der Aktinfilamente läuft (entgegengesetzt zur üblichen Richtung).

Um die komplexe Umgebung, in der sich Aktinnetzwerke, bzw. die Aktinnetzwerk/Motorprotein-Systeme in der Zelle befinden, zu vereinfachen, wurde in dieser Arbeit mit reinen Aktinlösungen gearbeitet. Lösungen von verschlauften, semiflexiblen Aktinnetzwerken zeigen ein komplexes viskoelastisches Verhalten, das deutlich von dem einer rein viskosen Flüssigkeit oder dem eines elastischen Festkörpers abweicht (zur Theorie vergl. Kap. 2).

Die genaue Charakterisierung der viskoelastischen Eigenschaften dieser Netzwerke mit und ohne Motorproteinen ist wegen ihrer ungeheuren biologischen Relevanz von zentraler Bedeutung. Untersuchungen mittels makroskopischer Messmethoden (klassische Rheometrie, Lichtstreuung, usw.) gibt es seit vielen Jahren, die Erkenntnis jedoch, dass die für biologische Prozesse relevanten Größenskalen mit diesen Methoden nur ungenügend (nämlich nur räumlich gemittelt) untersucht werden können und dass daher neue, mikrorheometrische Untersuchungen notwendig sind, hat sich erst in den letzten Jahren durchgesetzt.

¹Grundbaustein der Muskelfibrillen, die wiederum die Muskelfasern bilden.

²Diese Proteine verankern zum Beispiel die Aktinfilamente an der Z-Scheibe (z.B. α -Aktinin, CapZ [Lu et al., 1992], [Papa et al., 1999]), halten die Myosinbündel mittig im Sarkomer (Titin, [Trinick, 1994]) oder regulieren die Muskelkontraktion durch Freigabe der Myosin Bindungsstelle am Aktin (Troponin, Tropomyosin [Phillips et al., 1986]). Andere Proteine im Muskel regeln die Länge der Aktinfilamente, verhindern deren Depolymerisation oder verbinden die Myosin-Bündel.

³vergl. Kap. 1.2.1

⁴vergl. Kap. 1.2.2

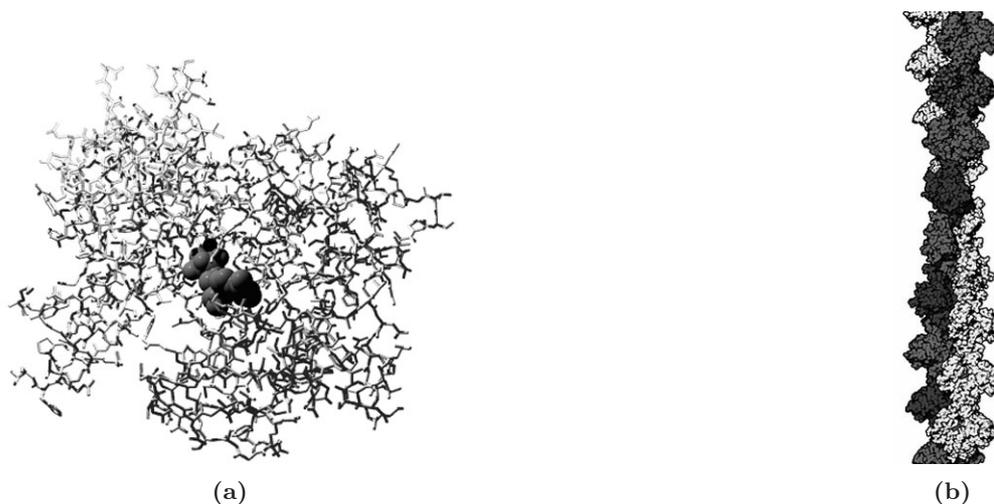


Abbildung 1.4: (a) Röntgenstruktur eines Aktinmonomers von *D. Discoideum* mit Mg-ATP (Kugeln) in der taschenartigen ATP-Bindungsstelle. ([PDB (URL), 2003; Vorobiev et al., 2003], 1NM1). (b) Aktinmonomere lagern sich zu einer Doppelhelix mit ca. 7 nm Durchmesser und einer Ganghöhe von 72 nm zusammen (Modell aus der Röntgenstruktur).

Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, mittels Magnetischen Pinzetten und mittels verschiedener mikroskopischer Methoden die viskoelastischen Eigenschaften aktiver und passiver Aktinnetzwerke auf diesen mikroskopischen Skalen zu untersuchen. Insbesondere sollten aktive Phänomene, nichtlineare- und Langzeiteffekte näher untersucht werden, da diese von besonderem Interesse sind, aber bis jetzt nicht eingehend erforscht wurden.

1.2 Materialien

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Proteine, Farbstoffe und Sondenpartikel näher charakterisiert.

1.2.1 Aktin und Aktinnetzwerke

Die viskoelastischen Eigenschaften eines Aktinnetzwerkes können mit Hilfe verschiedener physikalisch/chemischer Parameter (Aktinkonzentration, Salz-Ionenkonzentrationen, Temperatur) oder auch biologischer Parameter (Konzentration von aktinzugehörigen Proteinen ARPs¹, bzw. aktinbindenden Proteinen ABPs²) verändert werden. Da im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Aktinnetzwerke mit Hilfe der Magnetischen Pinzette (vgl. Kapitel 1.3.1) untersucht wurden, werden die wichtigsten Eigenschaften der verwendeten Proteine/Proteinnetzwerke und ABPs im Folgenden kurz erklärt:

Aktin ist ein globuläres Protein (G-Aktin), dass sich unter physiologischen Bedingungen ab einer gewissen, von der Temperatur und anderen Parametern abhängigen kritischen Konzentration c^* zu Filamenten zusammenlagert (F-Aktin). Es gibt zahlreiche Homologe des Aktins, die man in zehn Klassen einteilt. Die Aminosäuresequenzen sind dabei stark konserviert, Aktin ist also entwicklungsgeschichtlich gesehen ein sehr erfolgreiches Protein.

¹von engl.: *actin related proteins*

²von engl.: *actin Binding proteins*

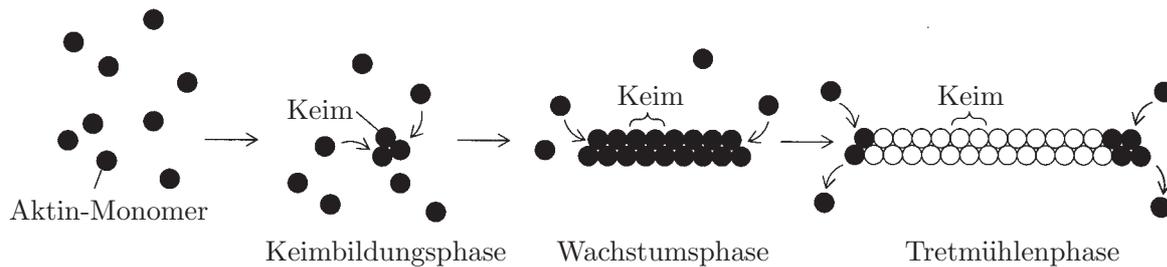


Abbildung 1.5: Verschiedene Phasen der Aktinpolymerisation: Zuerst müssen sich Polymerisationskeime aus mindestens drei Monomeren bilden, dann folgt eine Wachstumsphase. Letztendlich stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei dem unter ATP-Verbrauch Monomere am Plus-Ende angelagert werden und am Minus-Ende depolymerisieren wobei die mittlere Länge der Aktinfilamente konstant bleibt (Monomere und Polymere koexistieren in dieser Phase).

In dieser Arbeit wurde konventionelles Aktin aus Kaninchenmuskeln verwendet. Das hier verwendete G-Aktin hat ein Molekulargewicht von etwa 42 kD³, eine Größe von ca. 3x5x6 nm [Holmes et al., 1990] und besteht aus 375 Aminosäuren. Aktin polymerisiert *in vitro* zu Filamenten mit einer durchschnittlichen Länge von etwa 22 μm ([Kaufmann et al., 1992]). Einzelne Filamente können dabei durchaus Längen von über 100 μm erreichen. Die Aktinfilamente bestehen aus einer rechtshändigen Doppelhelix mit einer Ganghöhe von 72 nm ([Bullitt et al., 1988]). Durch die helikale Symmetrie besitzt ein Aktin Filament schon nach 36 nm wieder eine identische räumliche Struktur (Pseudowiederholungslänge). In Polymerisationsrichtung ist das Filament wegen des gerichteten Einbaus der Monomere polar (vergl. Abb. 1.4).

Ein Aktinfilament besitzt also zwei unterscheidbare Enden, das sog. Plus-Ende (*engl.: barbed end*) und das Minus-Ende (*engl.: pointed end*). Die Polarität der Aktinfilamente ist dabei einerseits eine notwendige Voraussetzung für die *gerichtete* Kraftübertragung durch Motorproteinen, wie sie z.B. bei der Muskelkontraktion auftritt, andererseits verändert die strukturelle Asymmetrie auch das Polymerisationsverhalten der Monomere an den beiden unterschiedlichen Enden. Das Filament polymerisiert dabei am Plus-Ende schneller als am Minus-Ende.

Das Aktinmonomer besitzt eine Bindungstasche für Magnesium- oder Kalzium-ATP. Die Bindung des ATPs verschiebt dabei die Gleichgewichtskonstante für die Polymerisations-/Depolymerisationsreaktion von Aktin stark auf die Seite der Polymerisation. Die Hydrolyse des ATPs innerhalb des Aktins erfolgt im polymerisierten Zustand, so dass die meisten Monomere in einem Filament ein gebundenes ADP (Adenosin-di-Phosphat) Molekül enthalten.

Man unterscheidet bei der Aktinpolymerisation in Anwesenheit von ATP und divalenten Ionen verschiedene Phasen, die schematisch in der Abbildung 1.5 dargestellt sind. Ein stabiler Keim für den Start der Aktinpolymerisation besteht aus mindestens drei Monomeren. Da das diffusive Zusammentreffen von drei Teilchen bei niedrigen Konzentrationen extrem unwahrscheinlich ist, findet unterhalb einer gewissen, von der Temperatur und anderen Parametern abhängigen kritischen Monomerkonzentration c^* keine Polymerisation statt. Oberhalb von c^* bilden sich in der Keimbildungsphase Polymerisationskeime aus mindestens drei Monomeren, die in der darauf folgenden Wachstumsphase sowohl am Plus-Ende (schneller) als auch

³1 Dalton[D] \equiv 1 atomare Masseneinheit = $1.66 \cdot 10^{-27}$ kg

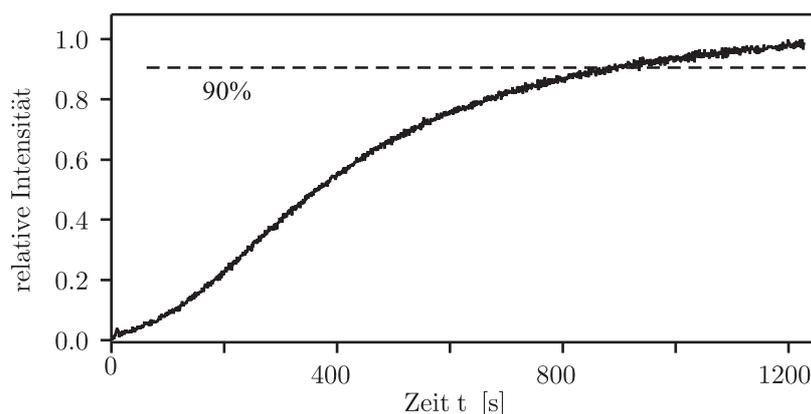


Abbildung 1.6: Zeitlicher Anstieg der Fluoreszenzemission von NBD markiertem Aktin. Anhand der Fluoreszenzintensität kann der Polymerisationsgrad relativ zur maximalen Filamentkonzentration bestimmt werden. Nach 5 Minuten liegen etwa 90% des Aktins in polymerisierter Form vor. Die Messung erfolgte in einem *Spex Fluorolog* Spektrometer, die Aktinkonzentration betrug $c_A = 8 \mu\text{M}$.

am Minus-Ende (langsamer) an Länge gewinnen. Da durch die sukzessive Anlagerung von Monomeren die G-Aktinkonzentration in der Lösung sinkt, fällt die Aktinkonzentration c_A in der Lösung nach einiger Zeit unter die Konzentration c_- , unterhalb derer am langsam wachsenden Ende noch netto Monomere angelagert werden. An diesem Ende depolymerisiert das Filament jetzt im zeitlichen Mittel. Am schnell wachsenden Ende dagegen wird die entsprechende Grenzkonzentration c_+ nicht unterschritten, da die Depolymerisierung am Minus-Ende die Konzentrationserniedrigung stoppt. Es stellt sich somit ein Gleichgewichtszustand ein ($c_- < c_A < c_+$), bei dem sich die Aktinmonomere als ATP-Aktin am Plus-Ende anlagern und als ADP-Aktin am Minus-Ende wieder abgespalten werden. Die Nettolänge der Filamente bleibt dabei in etwa konstant (Tretmühlenphase⁴, [Wegner, 1976]). Da ATP verbraucht wird handelt es sich nicht um ein thermodynamisches Gleichgewicht.

Um den zeitlichen Verlauf der Polymerisation des für diese Arbeit verwendeten Aktins zu überprüfen, wurde ein Teil des Proteins mit NBD (4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) markiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff verstärkt seine Emission, wenn die so markierten Monomere polymerisieren. Die Fluoreszenzintensität ist daher ein direktes Maß für den Anteil an polymerisiertem Aktin ([Detmers et al., 1981], vgl. Abb. 1.6). Wichtig ist hierbei, dass nach einer Zeit von etwa 15 Minuten schon ca. 90 % des Aktins in polymerisierter Form vorliegt.

1.2.2 Das Motorprotein Myosin und seine Subfragmente

Myosin ist eine ATPase, die durch eine chemomechanische Koppelung die gebundene chemische Energie des ATPs in mechanische Arbeit umwandelt. Dabei ist sowohl der Begriff Myosin, als auch der Begriff Aktin Überbegriff für die jeweilige Proteinfamilie. Zur Zeit sind etwa 17 Klassen von Myosinen bekannt. Mitglieder einer Familie zeichnen sich durch eine Homologie von über 50 % aus.

Myosin I und Myosin II, die verbreitetsten Myosine, kommen in fast allen eukaryontischen Zellen vor. Alle Myosine bestehen aus einer oder zwei sog. schweren Ketten¹ und mehreren leichten Ketten². Die schweren Ketten teilen sich auf drei strukturell und funk-

⁴ engl.: *Treadmilling*

¹ engl.: *heavy chain*

² engl.: *light chains*

tionell unterschiedliche Gruppen auf: Die globuläre Kopfdomäne beinhaltet die ATP- und Aktin-Bindungsstellen und ist für die Krafterzeugung zuständig. Die Kopfreion ist über eine α -helikale Struktur, die sog. Halsdomäne, mit der Schwanzdomäne verbunden. Die Schwanzdomäne beinhaltet funktionspezifisch unterschiedliche Bindungsdomänen, etwa für andere Schwanzdomänen (Myosin II) oder für Vesikel (Myosin I, Myosin V). Die leichten Ketten binden an die Halsdomäne, wo sie regulatorische Aufgaben wahrnehmen (vergl. Abb. 1.7(b)).

Unter Abwesenheit von ATP binden Myosine aller Familien fest an Aktinfilamente. Diesen Zustand bezeichnet man als Rigor-Bindung³. Die Rigor-Bindung ist relativ stark: Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D beträgt ungefähr $0.1 \mu\text{M}$. Nimmt man die Bindungsreaktion in erster Näherung als unabhängig von der Aktinkonzentration an, was bei größeren Aktinkonzentrationen hinreichend genau ist, so bedeutet das, dass im Schnitt nur eines von zehn Millionen Myosinen ungebunden vorliegt. In diesem Zustand stellen zweiköpfige Myosine (z.B. Typ II oder V) sehr potente Vernetzer dar.

Im Folgenden soll das in dieser Arbeit verwendete Myosin II und die ebenfalls verwendeten Subfragmente dieses Myosins näher charakterisiert werden.

Myosin II Myosin II ist eines der größten bekannten Proteine. Es handelt sich dabei um ein dimeres Molekül. Seine Molekülmasse beträgt ca. 470 kDa. Die Kopfgruppe hat eine Dimension von ca. 5.5×20 nm, die Schwanzregion hat ca. eine Länge von 160 nm [Voet und Voet, 1995]. Die beiden schweren Ketten, die jeweils eine eigene Kopfreion mit α -helikalen Hals- und Schwanzstruktur ausbilden, sind in dem dimeren Molekül verbunden. Die Verbindung zwischen diesen Untereinheiten entsteht, indem sich die α -helikalen Strukturen der Schwanzdomäne umeinander wickeln und eine sog. „coiled-coil“-Struktur ausbilden. Unter physiologischen Bedingungen lagern sich die Myosin II Moleküle zu Bündeln, ähnlich denen im Muskel, zusammen. In diesen Bündeln bilden die Schwanzdomänen das Rückgrat, während die Köpfe seitwärts herausragen (ähnlich zu Abb. 1.3(b), auf Seite 6).

HMM und S1 Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente mit einem Verdauungsprodukt des Myosin II Moleküls durchgeführt. Durch enzymatische Spaltung des Motorproteins können verschiedene Subfragmente präpariert werden. Durch die Behandlung mit Chymotrypsin kann das Myosin II Molekül in eine leichtere und eine schwere Kette gespalten werden. Die leichte Kette (LMM, von *engl.: light meromyosin*) besteht aus dem „coiled-coil“-Schwanz, über den die Myosin II Moleküle normalerweise aggregieren. Die schwere Kette (HMM, von *engl.: heavy meromyosin*) enthält die, über die Halsregion gebundenen, funktionsfähigen Köpfe [Kron und Spudich, 1986]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche mit den ca. 65 nm langen ([Bagshaw, 1993]) HMM-Subfragmenten durchgeführt, die zwar die volle Motorfunktionalität der Myosin II Moleküle besitzen, aber unter physiologischen Bedingungen nicht mehr aggregieren können.

Durch eine weitere Behandlung des HMM-Subfragments mit Papain kann die dimere Struktur des HMMs weiter aufgebrochen werden. Dabei werden die Motor-Köpfe abgetrennt. Man bezeichnet die so gewonnen Köpfe als S1-Subfragment, den übrig gebliebenen Rest als S2-Subfragment (vergl. Abb. 1.7(b)).

Das „Rotating Crossbridge“-Modell Im Folgenden soll das „Rotating Crossbridge“-Modell (RCM) vorgestellt werden, welches auf H.E. Huxley zurück geht [Huxley, 1958]. Mit

³Von *lat.: Rigor mortis*, medizinischer Begriff für die Totenstarre. Diese beruht genau auf den sich nicht mehr lösenden Myosin-Aktin Bindungen der Muskeln einige Zeit nach Eintritt des Todes. Durch enzymatische Zersetzungsprozesse weicht der Muskel im weiteren Verlauf der Verwesung wieder auf.

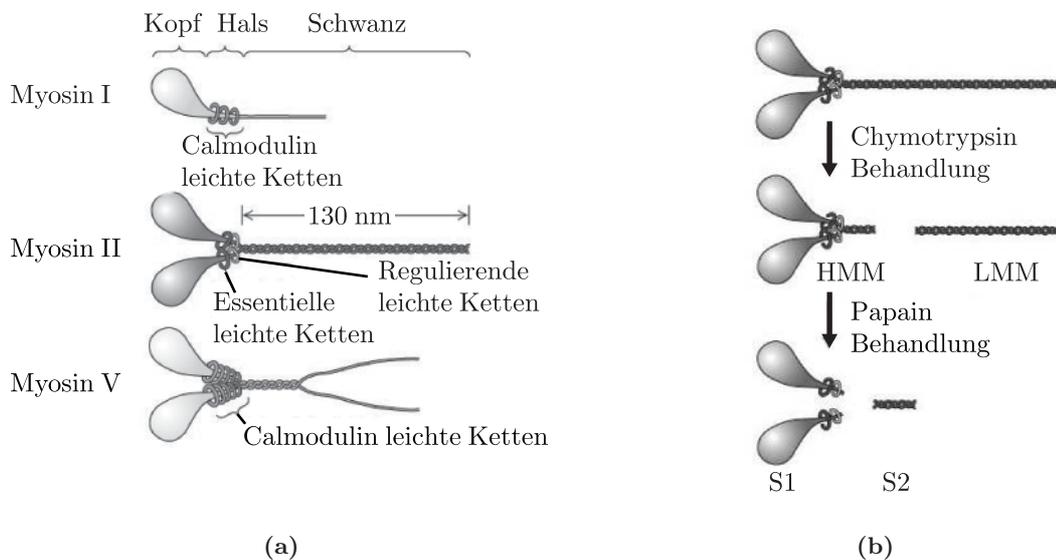


Abbildung 1.7: (a) Die drei wichtigsten Myosinmotoren bestehen aus Kopf, Hals und Schwanzdomäne. Die Kopfdomäne beinhaltet die ATP- und Aktin-Bindungsstellen, die Halsregion mit den regulierenden leichten Ketten dient zur Kraftübertragung und die Schwanzregion bindet funktionspezifisch. (b) Enzymatische Verdauung von Myosin II zu HMM, bzw. S1 Subfragmenten

Hilfe des RCM kann nicht nur die Funktion von Myosinen erklärt werden, es wurde zusätzlich erfolgreich auf Dynein (z.B. [Johnson, 1985]) und Kinesin [Howard, 1996] angewandt. Das RCM beschreibt sowohl die chemomechanische Kopplung des Kreislaufs von ATP-Hydrolyse und Konformationsänderung des Motorproteins als auch, wie durch dieses Zusammenspiel eine gerichtete Kraft auf das Aktin ausgeübt werden kann. Folgende Unterschritte können dabei unterschieden werden (vergl. auch Abb. 1.8):

- Am Beginn des Zyklus befindet sich der Myosinkopf im gebundenen Zustand am Aktinfilament.
- Nachdem eine ATP diffusiv zugeführt wurde bindet dieses an der ATP-Bindungsstelle des Myosinkopfes. Daraufhin löst sich die Aktin-Myosin-Bindung.
- Im aktiven Zentrum des Myosinkopfes wird nun die Hydrolyse des ATPs zu ADP und Phosphat katalysiert. Die im ATP gespeicherte Energie verursacht eine Konformationsänderung im Myosinkopf, nämlich eine Rotation des Kopfes um die Halsregion.⁴ Das abgespaltene Phosphat verbleibt vorerst in der Bindungstasche.
- In diesem Zustand bindet der „vorgespannte“ Kopf wieder an das Aktinfilament. Die Bindung erfolgt durch die Konformationsänderung mit einem anderen Monomer des Filaments, als dem Monomer welches bei Schritt a) gebunden war.
- Die neuerliche Myosin-Aktin-Bindung katalysiert die Abspaltung des Phosphates, was zu einem konformell instabilen Zustand führt.

⁴Von der Rotation um die Halsregion, der „Verbindungsbrücke“ (engl.: *crossbridge*) zwischen Kopf und Schwanz, hat das Modell seinen Namen.

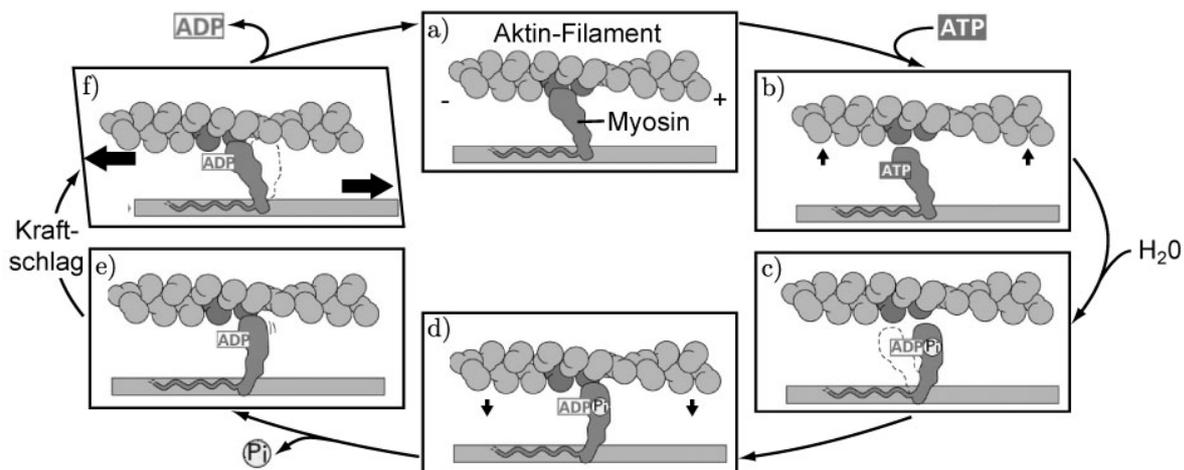


Abbildung 1.8: „Rotating Crossbridge“-Modell: Am Anfang befindet sich der Myosinkopf am Aktinfilament (a). Nach der Bindung eines ATP-Moleküls löst sich die Bindung (b). ATP wird zu ADP und Phosphat (P_i) hydrolysiert, der Myosinkopf „spannt“ sich (c). Der Myosinkopf bindet an anderer Stelle an das Aktinfilament (d). Dies katalysiert die Abspaltung des Phosphates, ein konformell instabiler Zustand folgt (e). Die Relaxation in den ursprünglichen Zustand wandelt die chemische Energie des ATPs in mechanische Arbeit um (Kraftschlag) (f).

- f) Die Relaxation in den ursprünglichen Zustand wandelt die chemische Energie des ATPs endgültig in mechanische Arbeit um (Kraftschlag). Danach dissoziiert das ADP und der chemomechanische Kreislauf kann wieder von neuem beginnen.

Die Energie für die Motorbewegung wird dem Myosin über die Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat (P_i) zur Verfügung gestellt. Dabei gibt es eine enge Verbindung von ATP-Hydrolysezyklus und Bindung bzw. Dissoziation von Aktin und Myosin. Wie oben beschrieben, katalysiert die Bindung von Myosin an das Aktin die Abspaltung des Phosphates, während die Bindung eines neuen ATPs im Myosinkopf die Dissoziation dieses Kopfes vom Aktin katalysiert. Die in den Säureanhydrid-Bindungen des ATPs gespeicherte Energie wird dem Motorprozess gemäß folgender Reaktion zur Verfügung gestellt:



Unter Bedingungen, die denen in Wirbeltierzellen ähnlich sind (freies Magnesium $[Mg^{2+}] = 1 \text{ mM}$, Gesamtionenstärke $I = 250 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7$ und 25°C)⁵ aber *ohne* Aktin gilt dabei folgende Gleichgewichtskonstante [Alberty und Goldberg, 1992], wobei die einzelnen Konzentrationen jeweils als Summe über die unterschiedlich komplexierten Produkte zu verstehen sind ($[ATP] = [MgATP^{2-}] + [MgATP^-] + [ATP^{4-}] + [ATP^{3-}] + \dots$ usw., ebenso für ADP und P_i):

$$K_{GI} = \frac{[ADP] \cdot [P_i]}{[ATP]} = 4.9 \cdot 10^5 \text{ M}$$

Dies bedeutet, dass das Gleichgewicht weit auf der Seite von ADP und Phosphat liegt. Die Zeitskala für die nicht katalysierte Hydrolyse von ATP liegt aber je nach Temperatur im Bereich von vielen Stunden bis Wochen. Diese beiden Umstände zusammengenommen machen das ATP zu einem brauchbaren Energie-Zwischenspeicher in biologischen Systemen.

Die freie Enthalpie ΔG der Hydrolysereaktion hängt von der freien Standard-Enthalpie ΔG_0 und den Konzentrationen der Edukte und Produkte ab. Die freie Standard-Enthalpie

⁵ Eckige Klammern kennzeichnen Konzentrationen)

Aktin-Myosin-Hydrolysekreislauf

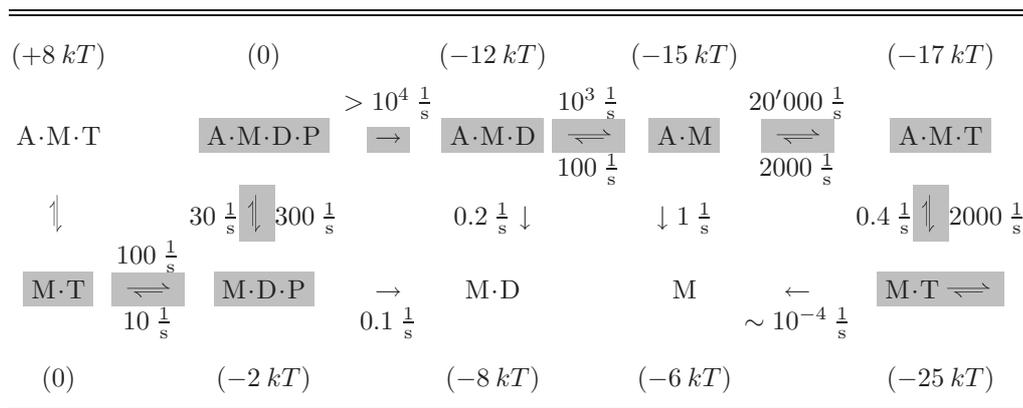


Tabelle 1.1: Aktin-Myosin Hydrolysekreislauf (glatter Skelettmuskel des Hasen). M = Myosin, T = ATP, D = ADP, P = Phosphat, A = Aktin. Der wahrscheinlichste Weg ist grau hinterlegt. Die Zahlen in Klammern sind Richtwerte für die freien Enthalpien der Zustände unter Annahme folgender Bedingungen: $[ATP] = 4 \text{ mM}$, $[P_i] = 2 \text{ mM}$, $[ADP] = 20 \mu\text{M}$. Die Aktinkonzentration ist auf 1 mM gesetzt. $[ATP] = 4 \text{ mM}$, $[P_i] = 2 \text{ mM}$, $[ADP] = 20 \text{ M}$. Referenzen siehe Text (Tabelle nach [Howard, 2001]).

beträgt etwa $\Delta G_0 = -54 \cdot 10^{-21} \text{ J}$ (ebenfalls [Alberty und Goldberg, 1992]). Daraus folgt für zelltypische ATP-, ADP- und Phosphat-Konzentrationen $[ATP]_Z = 1 \text{ mM}$, $[ADP]_Z = 1 \mu\text{M}$ und $[P_i]_Z = 1 \text{ mM}$:

$$\Delta G = \Delta G_0 - kT \ln \frac{[ATP]_Z}{[ADP]_Z \cdot [P_i]_Z} \sim -101 \cdot 10^{-21} \text{ J} \sim -25kT$$

Diese Energie kann also im chemomechanischen Kreislauf genutzt werden.

Um die typischen Zeiten der Gesamtreaktion zu erhalten ist es sinnvoll den Motorprozess in seine chemischen Subzustände zu gliedern: Aktin-Myosin mit ATP (A·M·T), Myosin mit ATP (M·T), Myosin mit ADP und Phosphat (M·D·P), Aktin-Myosin mit ADP und Phosphat (A·M·D·P), Aktin-Myosin mit ADP (A·M·D) und Aktin-Myosin (A·M). Überträgt man die experimentell bestimmten Übergangsraten für die Einzelreaktionen von Myosin II mit Aktin in ein Diagramm, erhält man eine Darstellung wie in Tabelle 1.1 ([Sleep et al., 1978; Webb et al., 1978; Cardon und Boyer, 1978; Geeves, 1991; Bagshaw, 1993; Ma und Taylor, 1994]).

Ohne Aktin hat Myosin eine geringe ATPase-Aktivität ($\sim 0.1 \text{ s}^{-1}$ pro Kopf). In Anwesenheit von Aktin steigt die ATPase-Rate auf das 200fache ($\sim 25 \text{ s}^{-1}$ pro Kopf) [Bagshaw, 1993].

Zwei weitere Größen sind von Interesse: Die Schrittweite des Motors und das sog. „duty ratio“.

Als Schrittweite δ eines Motormoleküls bezeichnet man die Entfernung, um welche sich dieses beim Kraftschlag im gebundenen Zustand weiter bewegt. Für Myosin gilt dabei ein Verhältnis von einem Schritt pro umgesetzt ATP. Schrittweiten für Myosin II wurden von verschiedenen Gruppen gemessen ([Finer et al., 1994; Mehta et al., 1997; Tyska et al., 1999]). Die Ergebnisse streuen je nach Gruppe und/oder verwendeter Methode (Optischen Pinzetten, AFM⁶, TIRF⁷) erheblich. Als wissenschaftlicher Konsens gilt zur Zeit eine Schrittweite von

⁶ engl.: *atomic force microscopy*, Rasterkraftmikroskopie

⁷ engl.: *total internal reflection fluorescence microscopy*

$\delta = 4 - 6 \text{ nm}$ [Howard, 2001]. Im weiteren wird ein mittlerer Wert von 5 nm verwendet.

Als „duty ratio“ r bezeichnet man das Verhältnis der Zeit, die der Motor an sein Substrat gebunden ist (τ_{on} , während dieser Zeit findet auch der Kraftschlag statt) zur Gesamtzeit des chemomechanischen Kreislaufs (τ_c). Die Gesamtzeit setzt sich aus τ_{on} und der Zeit zusammen, in der Aktin und Myosin nicht gebunden ist τ_{off} . Das „duty ratio“ r ergibt sich also zu

$$r = \frac{\tau_{on}}{\tau_c} = \frac{\tau_{on}}{\tau_{on} + \tau_{off}}$$

Die Zeit die ein Myosin an Aktin gebunden ist, hängt dabei von der ATP-Konzentration ab, da die Diffusionszeiten für ATP ($t_{Diff,ATP}$) größenordnungsmäßig unterhalb der Bindungszeiten einer Rigor-Bindung liegen (Diffusionskonstante von ATP: $D_{ATP} = 300 \mu\text{m}^2/\text{s}$, typische Distanzen $\Delta s \sim 0.05 \mu\text{m}$ für $c_{ATP} = 10 \mu\text{M}$):

$$t_{Diff,ATP} = \frac{1}{2D_{ATP}} \Delta s^2 = \frac{1}{600 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}} (0.05 \mu\text{m})^2 \sim 5 \mu\text{s}$$

(vergl. auch mit Tabelle 1.1, $\text{A}\cdot\text{M} \rightarrow \text{A}\cdot\text{M}\cdot\text{T}$).

Der errechnete Wert für das „duty ratio“ der glatten Kaninchenmuskulatur bei Konzentrationen, wie sie in Tabelle 1.1 angegeben sind, beträgt $r = 0.1$. Myosin II aus schnell kontrahierenden Muskeln von Wirbeltieren hat dagegen eher ein „duty ratio“ von $r = 0.01 - 0.02$ [Howard, 2001].

Ein kleines „duty ratio“ bedeutet, dass ein zweiköpfiges Motorprotein nicht prozessiv arbeiten kann, da es die meiste Zeit des chemomechanischen Zyklus weder mit dem einen noch mit dem anderen Kopf gebunden ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass zumindest ein Kopf gebunden ist, beträgt $p_{on} = r^2 \sim 0$ für $r \ll 1$. Andererseits können bei kleinem „duty ratio“ während eines Zyklus viele Motorproteine gemeinsam auf ein Filament Kraft übertragen, ohne sich gegenseitig zu behindern, wie z.B. im Muskel. Somit ermöglicht ein kleines „duty ratio“ große Geschwindigkeiten v (für Myosine aus der sog. schnellen Muskulatur bis zu $v = 6000 \text{ nm/s}$ *in vivo* [Cooke et al., 1988; Pate et al., 1994] und $v = 8000 \text{ nm/s}$ *in vitro* [Toyoshima et al., 1989]). Ein großes „duty ratio“ bedeutet, dass ein einzelnes zweiköpfiges Myosin (Köpfe (1) und (2)) prozessiv arbeiten kann: Während der Kopf (1) den Kraftschlag ausführt, bleibt der Kopf (2) noch gebunden. Mit der Spannung durch den Kraftschlag des Kopfes (1) löst sich der Kopf (2), wird nach vorne gezogen, bindet dort nach einiger Zeit und kann jetzt wieder den Kraftschlag ausführen (sog. „hand-over-hand“-Modell) [Yildiz et al., 2003]. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich beide Köpfe lösen, wird für ein hohes „duty ratio“ sehr klein: $p_{off} = (1 - r)^2 \sim 0$ für $1 - r \ll 1$.

Myosin IV hat beispielsweise *in vivo* ein hohes „duty ratio“. Ein einzelnes Myosin IV Dimer ist in der Lage, ein Vesikel über mehrere Mikrometer mit Geschwindigkeiten von $\sim 200 - 1000 \text{ nm/s}$ entlang von Aktinfilamenten zu transportieren [Sakamoto et al., 2000].

1.2.3 Gelsolin, Phalloidin, Farbstoffe und Kugeln

Gelsolin Gelsolin ist ein aktinzerschneidendes Protein das hauptsächlich für die Gel- zu Sol-Transformationen des zytoskelettalen Aktinnetzwerkes zuständig ist.¹

Es ist ein vergleichsweise großes Protein, mit beispielsweise 81 kD bzw. 84 kD beim Menschen, je nachdem ob es im Zellplasma oder im Plasma expremiert wird. Es besteht aus sechs homologen Domänen (G1–G6), die allerdings alle völlig unterschiedliche Funktionen haben.

¹Der Name Gelsolin leitet sich genau von dieser Eigenschaft ab

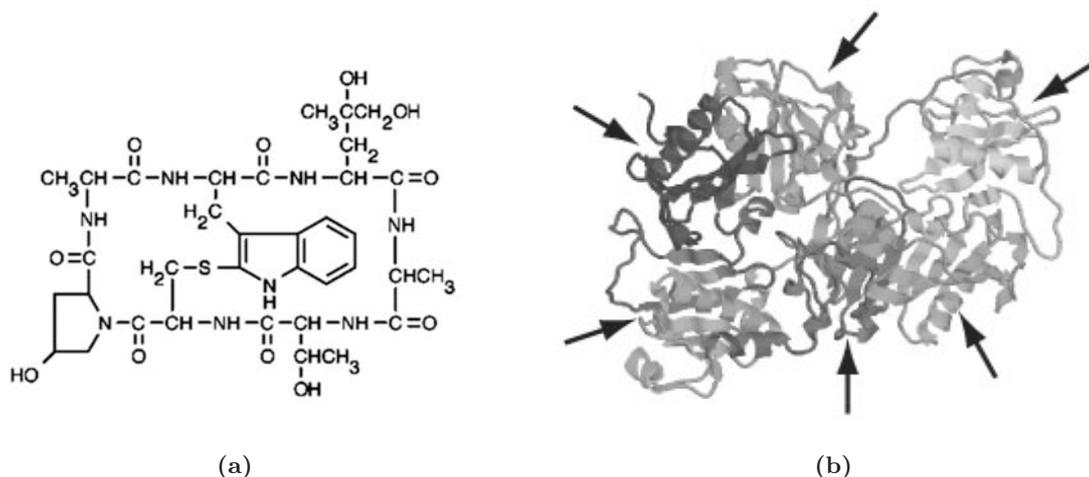


Abbildung 1.9: (a) Chemische Struktur von Phalloidin. Das Gift des Grünen Knollenblätterpilzes *amanita phalloides* stabilisiert die Aktin-Aktin-Bindung und verhindert so sehr effektiv die thermische oder enzymatische Depolymerisation von F-Aktin. (b) Gelsolinmodell, beruhend auf Röntgenstrukturanalyse. Die Pfeile kennzeichnen die ungefähre Lage der sechs homologen Domänen ([PDB (URL), 2003], ID: 1d0n)

Die filamentzerschneidende Wirkung des Gelsolins kann über die Ca^{2+} -Konzentration geregelt werden. Zusätzlich zur Schneidewirkung blockiert es das schnell wachsende Ende der Aktinfilamente mit hoher Affinität. Gelsolin hat drei Aktin-Bindungsstellen, wobei in Anwesenheit von Ca^{2+} zwei Aktinmonomere gebunden werden. Zusätzlich bindet Gelsolin über seine dritte Aktin-Bindungsstelle an F-Aktin. Gelsolin zerschneidet filamentöses Aktin sehr effektiv, wirkt aber auch als Nukleationshilfe für die Aktinpolymerisation [Yin und Stossel, 1979; Burtneck et al., 1997].

Phalloidin Die filamentzerschneidende Wirkung von Gelsolin kann durch Phalloidin unterbunden werden. Phalloidin ist das Gift des Grünen Knollenblätterpilzes *amanita phalloides* welches sich an filamentöses Aktin anlagert. Das Molekül mit einer Masse von etwa 789 Da stabilisiert dabei die Aktin-Aktin-Bindungsstelle. Da Phalloidin auch die thermische Depolymerisation von F-Aktin verhindert, wird es im Rahmen dieser Arbeit in Verbindung mit Fluoreszenzfarbstoffen zum Markieren einzelner Aktinfilamente eingesetzt.

Farbstoffe Für den Nachweis der Aktinpolymerisation (vgl. Abb. 1.6) wurde NBD verwendet. Für ein Doppelfärbe-Experiment, bei dem die Verlängerung der stabilisierten Filamente analysiert werden sollte, wurde Rhodamin (Tetramethylrhodamin, TRITC) und FITC (Fluoreszeinisothiozyanat) eingesetzt. Für alle anderen in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurde ausschließlich Rhodamin verwendet, ein Farbstoff, der sich durch eine hohe Quantenausbeute sowie eine lange Lebensdauer verbunden mit einer für biologische Systeme verträglichen Anregungswellenlänge, auszeichnet. Zusätzlich liegt das Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge, die sehr gut zu einer Spektrallinie der für die Fluoreszenzmikroskop verwendeten Quecksilberhochdrucklampen passt.

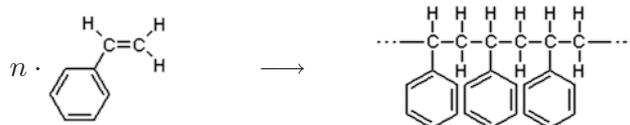
Für eine Übersicht über die verwendeten Farbstoffe, siehe Tabelle 1.2.

Kugeln Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendete Sondenpartikel (Kugeln) bestehen aus Polystyrol („PS“, „Latex“). Polystyrol ist ein flexibles, stark hydrophobes Polymer, dass

Farbstoff	Molekulargewicht	Anregung	Emission
NBD(-Aktin)	~185 D	480 nm (gelb)	530 nm (gelbgrün)
FITC	390 D	495 (gelb)	519 (gelbgrün)
TRITC	444 D	544 nm (grün)	572 nm (orangerot)

Tabelle 1.2: Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

durch radikalische Polymerisation aus Styrol hergestellt wird:



In wässriger Umgebung bilden sich aus dem Polymer kugelförmige Knäule, die chemisch stabilisiert werden [Furusawa et al., 1972; Ottewill und Shaw, 1972]. Zusätzlich können ferromagnetische Partikel eingeschlossen werden, um superparamagnetische Sondenpartikel zu erhalten. Unter Superparamagnetismus versteht man das paramagnetische Verhalten ferromagnetischer Partikel, die eine Größe von unter 50 nm aufweisen.² Zur Herstellung von magnetischen Sondenpartikeln werden z.B. Ferrit (Fe_2O_3) oder Magnetit (Fe_3O_4) Nanopartikel in die Polystyrolkugeln eingeschlossen.

Um Fluoreszenzmarkierungen zu erhalten, können Fluoreszenzfarbstoffe in die Polystyrolmatrix der Kugeln eindiffundiert werden. Diese werden dann über eine reaktive Gruppe chemisch mit der Matrix vernetzt.

Durch die chemische Aktivierung der Oberfläche oder durch kovalente Bindung von Proteinen können die Kugeln weiter funktionalisiert werden. Es können zum Beispiel mit (Strept-)Avidin funktionalisierte Kugeln sehr effizient an biotinierte Aktine gebunden werden: Biotin (Vitamin H) und das Glykoprotein (Strept-)Avidin, ein Bestandteil des Hühnereiweiß (bzw. ein Protein des Bakteriums *Streptomyces avidinii*) gehen Bindungen ein, die als die stärksten nichtkovalenten Protein-Liganden-Bindungen gelten, die bekannt sind (Dissoziationskonstanten: $K_D \sim 1 \cdot 10^{-15}$) [Wilchek und Bayer, 1990].

1.2.4 Proteinpreparationen

1.2.4.1 Aktin

Präparation Monomeres Aktin wurde aus skelettaler (glatter) Kaninchenmuskulatur nach einer Vorschrift von Spudich und Watt präpariert [Spudich und Watt, 1971]. Als weiterer Reinigungsschritt wurde eine Gel-Säulen-Chromatographie mit einer Sephacryl S-300 Säule durchgeführt [MacLean-Fletcher und Pollard, 1980]. Dieser zusätzliche Reinigungsschritt beseitigt letzte Reste von aktinbindenden Proteinen. Aktinkonzentrationen wurden photometrisch ermittelt (Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 290$ nm Wellenlänge: $\epsilon_{A,290} = 0.63 \text{ (mg cm)}^{-1}$ [Houk und Ue, 1974]). Das hochreine G-Aktin (mit typische Konzentrationen von 0.8–2.3 mg/ml) wurde sterilfiltriert und in G-Puffer (2 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan/HCl-Puffer (Tris-HCl), 0.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM DTT, 0.2 mM ATP, 0.005 vol-% NaN_3 , doppelt destilliertes Wasser (Millipore), pH 8.0) in Eppendorf-Reaktionsgefäße ab-

²Dieser Effekt kommt zustande, da sich in solch kleinen Partikeln keine Weißschen Bezirke mehr ausbilden können. Die Spins der einzelnen Atome sind aber immer noch korreliert.

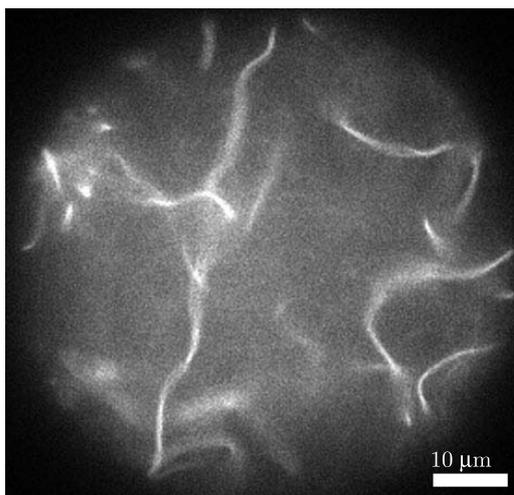


Abbildung 1.10: Qualitativ hochwertiges Aktin. Die Filamente sind über $100\ \mu\text{m}$ lang und zeigen keine sprunghafte Veränderung der Fluoreszenz entlang der Kontur. Aufgrund der thermisch angeregten Biegefluktuationen der Filamente erscheinen diese verschmiert. [Eigene Aufnahme: Axiovert 200, 100x Objektiv, Reporterfilamente in Antioxidationspuffer. Der Maßstab ist $10\ \mu\text{m}$]

gefüllt. Diese wurden maximal 10 Tage auf Eis gelagert. Angebrochene Reaktionsgefäße wurden wegen der möglichen Verunreinigung mit Bakterien am selben Tag verworfen.

Funktionstests Die Reinheit jeder einzelnen Aktinpräparation wurde direkt nach dem Gel-Säulen-Chromatographie-Reinigungsschritt mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese¹ überprüft.

Ein erster Test der Polymerisationsfähigkeit des Aktins wurde mittels Kugelfallviskosimetrie ebenfalls direkt nach der Präparation durchgeführt.

Direkt vor den einzelnen Experimenten wurde die Qualität des Aktins noch einmal im Detail überprüft. Dazu wurde eine geringe Menge Phalloidin-Rhodamin stabilisierte Filamente (vergl. Kap. 1.2.4.1) in eine Matrix aus unmarkierten Aktin einpolymerisiert. Das Verhältnis von markierten Filamenten c_{A^*} zu unmarkierten Filamenten c_A war dabei ca. $c_{A^*} : c_A \approx 1 : 1000$. Die Qualität des Aktins wurde mittels dieser Proben an einem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Lange, vereinzelte und fluktuierende Filamente mit gleichmäßiger Fluoreszenz waren dabei ein Indikator für hohe Qualität des Aktins (vergl. Abb. 1.10). Lange Filamente sprechen für gute Polymerisationseigenschaften sowie für die Abwesenheit von Schneide-² oder Kappungsproteinen³. Fluktuationen und das gleichmäßige Auftreten von vereinzelten Filamenten sprechen für die Abwesenheit von vernetzenden Proteinen⁴. Die gleichmäßige Fluoreszenz der einzelnen Filamente ist dagegen ein Indikator für die Abwesenheit von parallel-bündelnden Proteinen⁵, da z.B. eine Bündelung von zwei Aktinfilamenten in der markierten Probe zu einer sprunghaften Verdoppelung der Fluoreszenz entlang der Filamentkontur führen würde. Nur wenn das Aktin den eben beschriebenen Qualitätstest bestand, wurden die Versuche fortgesetzt.

¹ engl.: sodium dodecyl sulphate polyacrylamide-gel electrophoresis = SDS-PAGE

² engl.: severing / fragmenting proteins. Wie z.B. das *severin*.

³ engl.: capping proteins. Wie z.B. das *actin capping protein (CapZ)*.

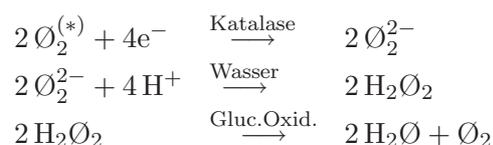
⁴ engl.: crosslinker. Wie z.B. das *filamin*.

⁵ engl.: bundling proteins. Wie z.B. das *villin*.

Polymerisation Die Polymerisation des Aktins wurde je nach Bedarf durch die Zugabe von G-Aktin zu Proben in F-Puffer (2 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0.2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM Ascorbinsäure, 0.5 mM ATP, Millipore-Wasser, pH 7.7) oder durch die Zugabe einer entsprechenden Menge von 10x konzentriertem F-Puffer zu einer Aktinlösung gestartet. In einigen Experimenten wurde aus Kompatibilitätsgründen zu Messungen mit Myosin II mit höheren KCl-Konzentrationen gearbeitet (300 mM KCl)⁶. Ebenfalls wurde in manchen Fällen zusätzlich die ATP- und MgCl₂-Konzentration erhöht. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Versuche bei Raumtemperatur.

Fluoreszenzmarkierung Um einzelne Aktinfilamente unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurde F-Aktin mit dem Farbstoff TRITC-Phalloidin markiert. Die fluoreszierenden Filamente wurden als sog. Reporterfilamente in ein unmarkiertes Netzwerk eingebettet. Zunächst wurde G-Aktin bei Raumtemperatur in F-Puffer unter Anwesenheit einer äquimolaren Menge Rhodamin-Phalloidin polymerisiert. Die Aktin- und Rhodamin-Phalloidin-Konzentration betrug 2.5 μM. Die Reporterfilamente wurden längstens drei Tage auf Eis gelagert.

Antioxidationspuffer In der Probe gelöster Sauerstoff kann durch Energietransfer vom Fluoreszenzfarbstoff in einen angeregten Zustand versetzt werden. Das vermindert die Quantenausbeute des Fluorophors. Zusätzlich befindet sich der angeregte Sauerstoff O₂^(*) im hoch reaktiven Singulett-Zustand und kann durch Oxidation sowohl den Farbstoff schädigen (ausbleichen) als auch Schäden am Proteinsystem selber verursachen. Um ein schnelles Ausbleichen der Proben zu verhindern (Fluoreszenzintensitäts-Halbwertszeit des TRITC-Phalloidin-Aktin Systems beträgt typischerweise 20 s) und um das Proteinsystem zu schützen, wurde bei Langzeitfluoreszenzaufnahmen ein so genannter Antioxidationspuffer verwendet [Ks et al., 1996]. Dazu wurde dem Puffer Glukose (D-(+)-Glukose) und die Proteine Glukoseoxidase und Katalase in geringen Mengen beigemischt. Glukoseoxidase ist ein Enzym von 160 kDa Molekulargewicht, das die Oxidation von Glukose zu Glukonsäure katalysiert. Dabei entsteht pro Sauerstoffmolekül ein Wasserstoffperoxidmolekül, das wiederum von dem Enzym Katalase (250 kDa Molekulargewicht) gespalten wird:



Netto wird pro Zyklus ein Sauerstoffmolekül aus dem System entfernt. Die Fluoreszenzintensitäts-Halbwertszeit des TRITC-Phalloidin-Aktin Systems steigt dabei auf mehrere Minuten.

1.2.4.2 Kugeln

Kugeln wurden entweder wie vom Hersteller geliefert benutzt (s. Tabelle 1.3) oder wie folgt weiter behandelt:

- a) Passivierung der Kugeln mittels BSA
- b) Funktionalisierung (Aktinbindung) mit Gelsolin

⁶Myosin II kann bei niedrigeren Ionenkonzentrationen Bündel bilden.

Name	∅ [μm]	Oberfl.	magn.(%)	fluor.	Hersteller	ProdNr. LotNr.
FluoSpheres	0.043	Avidin	nein	rot	Probes ¹	F-8770 63B1-1
FluoSpheres	2	PS	nein	rot	Probes	F-8826 6941-1
Bangs	0.76	COOH	ja (46.5%)	nein	Estaphor ²	ME03N L990126A
Bangs	0.89	COOH	ja (55.6%)	nein	Estaphor	ME03N L001017F
DynaBeads	4.5	Tosyl	ja (19.6%)	nein	Dynal ³	ME03N L990126A
DynaBeads	2.8	Avidin	ja (unbek.)	nein	Dynal	ME03N L990126A

Tabelle 1.3: Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Polystyrol-Sondenpartikel (PS=Polystyrol, COOH= karboxilierte Oberfläche, Tosyl=tosylaktivierte Oberfläche. ¹ Molekular Probes Mikropartikel, Bezug über *MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland*; ² Estapor Mikropartikel, Bezug über *Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, USA*; ³ Dynal Mikropartikel, Bezug über *Dynal Biotech GmbH, Hamburg, Deutschland*.)

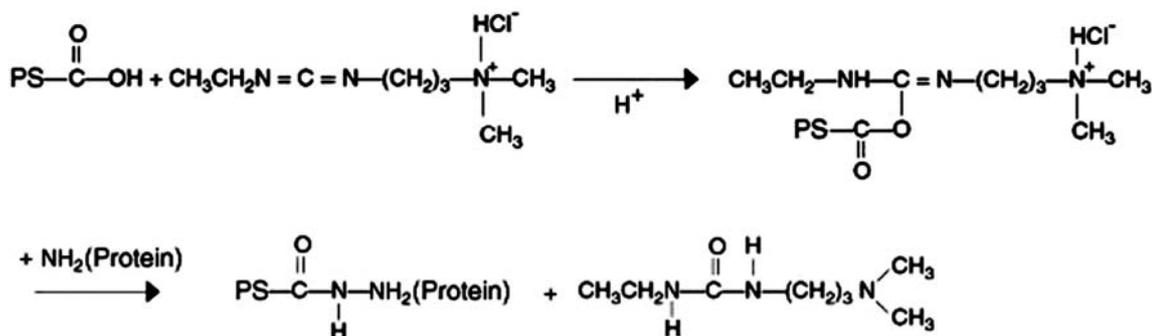
c) Funktionalisierung (Fluoreszenz) mit Rhodamin-BSA (TRITC-BSA)

Tosylaktivierte Kugeln, deren Oberfläche Aminosäuren binden können, wurden auf natürliche Weise passiviert, da sie ausschließlich in TRIS Puffer verwendet wurden, der eine Aminogruppe enthält. Zusätzlich wurden diese Kugeln für nicht oszillatorischen Messungen mit BSA passiviert (siehe unten).

Zu a): COOH-modifizierte oder tosylaktivierte Kugeln wurden mit 10 mg/ml Rinderserumalbumin (*engl.: bovine serum albumin*, BSA) versetzt und entweder für 15 min auf Eis in ein Ultraschallbad gegeben oder über Nacht bei 4° C auf einem Rotator aufbewahrt.

Zu b): Für die Oberflächenfunktionalisierung der Kugeln mittels Gelsolin wurden verschiedene Präparationsmethoden getestet. Die vom Kugelhersteller Polyscience empfohlene Methode ist die der kovalenten Bindung über *Carbodiimid*-Chemie.

Bei dieser Methode werden die COOH-Gruppen an der Kugeloberfläche mit 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) aktiviert. Carbodiimid katalysiert dabei die Ausbildung einer Aminobindung zwischen der am Polystyrol gekoppelten COOH-Gruppe und einer der Amin-Gruppen des Proteins über die Aktivierung der COOH-Gruppe zu einem hochreaktiven Zwischenzustand. Ein Reaktionspartner ist z.B. die NH₂-Gruppe des Lysines. Im Folgenden ist die Reaktion beispielhaft dargestellt (PS = Oberfläche der Polystyrolkugel):



Wie sich im Verlauf weitere Experimente zeigte, ist diese Methode für Gelsolin nicht sehr geeignet, da damit nur eine mäßige Ausbeute an funktionell intakten Gelsolinen auf der Kugeloberfläche erreicht werden konnte.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit ein eigenes Protokoll entwickelt, welches auf unspezifischer Adhäsion beruht. Die COOH-modifizierten Kugeln wurden dazu in G-Puffer suspen-

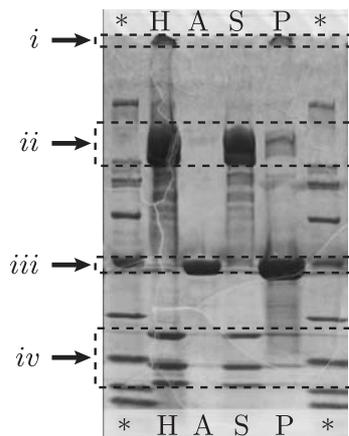


Abbildung 1.11: SDS-Polyacrylamid-Gel von aufgetautem HMM (H), frischem Aktin (A) sowie Überstand (*engl.: supernatant*, S) und Pellet (P). Die Sternchen markieren die Spalten mit dem Marker. Man beachte: Die Agglomerationsbande des HMM findet sich nur im Pellet wieder (*i*). Ein Teil der schweren Ketten des HMMs finden sich im Pellet (*ii*), es handelt sich möglicherweise um Rigorköpfe. Zusätzlich markierte Banden: Aktin-Bande (*iii*), leichte Ketten des HMMs (*iv*). Auch hier findet sich ein Teil im Pellet.

sirt und 15 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben. Die Kugelkonzentration c_K betrug ca. $c_K \sim 10 \text{ pM}$ ($\sim 6 \cdot 10^6$ Kugeln/ μl). Diese Suspension wurde mit einer äquimolaren Aktin-Gelsolin Proteinmischung versetzt, die ebenfalls 15 Minuten auf einem Rotator bei 4°C vermischt worden war. Die Kugel-Gelsolin-Aktin Probe wurde über Nacht auf einem Rotator bei 4°C gelagert. Durch die Anwesenheit des Aktins sollte das Gelsolin bei der Bindung in einer natürlichen Konformation stabilisiert werden. Die Proteinkonzentration c_P betrug ca. $c_P \approx 0.15 \mu\text{M}$. Die Kugeln wurden daraufhin mit TRITC-BSA (*Sigma*, A-2289) fluoreszenzmarkiert, gewaschen und in PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) bei 4°C für längstens 4 Wochen aufbewahrt.

Zu **c)**: Eine TRITC-BSA Markierung wurde entweder mit Gelsolin beschichteten Kugeln oder mit unbeschichteten Kugel durchgeführt. Dazu wurde die Kugellösung mit einer TRITC-BSA (*Sigma*, A-2289) Lösung versetzt. Die Endkonzentration betrug 10 mg/ml ($150 \mu\text{M}$). Die Probe wurde 1.5 Stunden bei 4°C auf einem Rotator vorsichtig gemischt. Danach wurden die Kugeln 10x gewaschen:

Ein Waschschriff besteht jeweils aus dem Absedimentieren der Kugel, je nach Kugeltypus mittels Tischzentrifuge oder magnetisch, dem Abnehmen des Überstandes und der Resuspension in PBS mit 10 mg/ml unmarkiertem BSA.

Die so präparierten Kugeln sind stabil fluoreszent, der Überstand zeigt im Mikroskop keine Restfluoreszenz mehr.

1.2.4.3 Myosin

Myosin II Myosin II wurde ebenfalls aus skelettaler Kaninchenmuskulatur nach einer Vorschrift von Margossian und Lowey gewonnen [Margossian und Lowey, 1982]. Die erhaltene Proteinkonzentration wurde mittels Absorptionsspektroskopie ermittelt (Extinktionskoeffizient $\epsilon_{M,280} = 0.53 \text{ cm}^2/\text{mg}$ bei 280 nm , ebenfalls [Margossian und Lowey, 1982]). Das Myosin wurde im letzten Präparationsschriff gegen Phosphatpuffer ($25 \text{ mM K}_2\text{HP}\text{O}_4$, 0.6 M KCl , 10 mM EDTA , 1 mM DDT bei $\text{pH} = 6.5$) umdialysiert. Um Myosin zu lagern, wurde diese Lösung im gleichen Verhältnis mit Glycerin gemischt und dann bei -20°C aufbewahrt oder

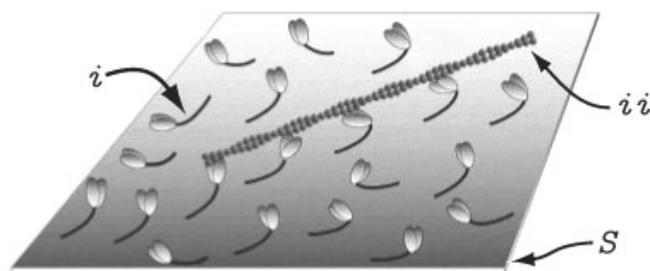


Abbildung 1.12: Nachweis der Motoraktivität des verwendeten Myosins erfolgte mittels „Motility Gliding Assay“. Aktinfilamente (*ii*) werden dabei von Myosinen (*i*), die auf einem Substrat (*S*) adhärert wurden, unter ATP-Verbrauch transportiert. Abbildung von [Univ. Vermont (URL), 2003].

es wurden ihr 30% Saccharose zugesetzt, um sie dann bei -80°C aufzubewahren.

HMM HMM wurde aus Myosin II (s.o.) durch Verdauung mit TLCK⁷ behandelten Chymotrypsin präpariert. Die Präparation nach einer Vorschrift von Kron et. al. [Kron et al., 1991] wurde dabei leicht abgewandelt: Statt die Proteinlösung nach der Chymotrypsin-Behandlung mit niedrigionischem Puffer zu verdünnen, wurde sie gegen diesen Puffer umdialysiert. Dies ergab eine wesentlich höhere HMM-Endkonzentrationen von typischerweise 8 mg/ml.

Die HMM-Konzentration wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt ($\epsilon_{H,280} = 0.64\text{ cm}^2/\text{mg}$, [Weeds und Pope, 1977]).

HMM wurde auf zwei verschiedene Methoden gelagert: Zum einen wurden kleine Tröpfchen der Proteinlösung in flüssigen Stickstoff getropft, zum anderen wurden 30% Saccharose zu der HMM-Lösung gegeben. Die Lagerung erfolgte jeweils bei -80°C .

Aufreinigung von HMM HMM wurde nach dem Auftauen teilweise weiter aufgereinigt, um eventuell denaturierte Proteine und vor allem Rigorköpfe (vergl. Kap. 1.2.1) zu entfernen. Dazu wurde HMM mit ATP und Mg^{2+} (je 20 mM) in Anwesenheit von polymerisiertem Aktin (10 μM , F-Puffer Bedingungen) nach einer Stunde Reaktionszeit bei Raumtemperatur für 2 Stunden bei 4°C bei 38000 U/min (Beckmann Ultrazentrifuge, Rotor Typ TI-50) zentrifugiert. In der Regel aggregieren denaturierte Proteine zu größeren Agglomeraten und Rigorköpfe binden fest an das filamentöse Aktin. Sowohl das Aktin mit den Rigorköpfen als auch die Proteinagglomerate sammeln sich im Pellet, während der Überstand funktionales HMM enthält, das sich wegen des anwesenden ATPs nicht permanent an das Aktin bindet. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Anhand des Gels erkennt man, dass ein Teil des HMMs im Pellet verbleibt (Rigorköpfe). Besonders wichtig ist jedoch, dass eine Bande der HMM-Probe, die agglomerierte Proteine anzeigt, sich nach der Aufreinigung nur noch im Pellet nachweisen lässt (vergl. Abb. 1.11). Die effektive Aufreinigung des HMMs ist damit nachgewiesen.

Test der Motoraktivität Die Motoraktivität des Myosins oder des HMMs wurde, wie im Detail bei Keller beschrieben ([Keller, 2003]), mittels „Motility Gliding Assay“ nach Kron und Spudich ([Kron und Spudich, 1986]) nachgewiesen.

Bei diesem Test werden Motorproteine funktionell intakt auf einer Oberfläche gebunden. Nach dem Binden von fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten kann durch Zuspülen von ATP die Motoraktivität gestartet werden, die sich durch einen aktiven Transport der Filamente

⁷N(α)-p-Tosyl-L-Lysin Chloromethyl Keton

zeigt (vergl. Abb. 1.12). Bei dem für diese Arbeit verwendeten Myosin wurden dabei Transportgeschwindigkeiten bis zu $6 \mu\text{m/s}$ beobachtet.

1.3 Methoden

Mit Hilfe von aktiven kolloidalen Sondentechniken und insbesondere mit Hilfe der Magnetischen Pinzetten (*engl.: Magnetic Tweezers*, MT) wurden in den letzten Jahren viele mikrorheologische Messungen an biologischen Systemen vorgenommen. Dabei wurden sowohl ganze Zellen ([Bausch et al., 1999; Bausch, 1999; Feneberg et al., 2001]) als auch Aktinnetzwerke ([Ziemann et al., 1994; Schmidt et al., 1996; Dichtl und Sackmann, 1999, 2002]) oder DNA ([Haber und Wirtz, 2000; Leuba et al., 2003]) untersucht.

Sowohl in der Biophysik als auch in der Biologie werden als konkurrierende mikromanipulative Methode häufig *Optische* Pinzetten benutzt. Bei einer Optischen Pinzette wird ein Sondenpartikel mit einem höheren Brechungsindex als dem des umgebenen Mediums im Fokus eines Laserstrahls gehalten, da die elektromagnetische Welle innerhalb des Mediums mit dem höheren Brechungsindex ($n \sim \sqrt{\epsilon}$) eine höhere Energiedichte ($w \sim \epsilon$) aufweist¹, bzw. die Brechung des Lichts am Kugelrand aus Gründen der Impulserhaltung eine rückstellende Kraft auf die Kugel ausübt².

Magnetischen Pinzetten weisen gegenüber Optischen Pinzetten eine Reihe von Vorteilen auf:

1. Es besteht die Möglichkeit mehrere Sondenpartikel gleichzeitig auszulenken,
2. es können Sondenpartikel ohne Abstriche durch die gesamte Probe bewegt werden,
3. die Magnetischen Pinzetten benötigen keine Optik zum Einkoppeln des Lasers und
4. es wird keine zusätzliche Laser-Energie in die Probe eingebracht.

Alle diese Vorzüge machen die Magnetischen Pinzetten für die in dieser Arbeit untersuchten Aufgabenstellungen zur Methode der Wahl. In Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich Versuche mit einem Aufbau der Magnetischen Pinzetten gemacht, der zur Erzeugung größerer Kräfte ($F_{mag} > 150 \text{ pN}$)³ für transiente Messungen benutzt wird (sog. „High-Force“-Aufbau). Der zweite Aufbau, der sog. „Low-Force“-Aufbau wird für frequenzabhängige (oszillatorische) Messungen bei kleineren Kräften ($F_{mag} < 20 \text{ pN}$)³ benutzt.

Die Kolloid- oder Filamentpositionen wurden mit Hilfe der digitalen Videomikroskopie auf den kraftgeeichten MT-Aufbauten aufgenommen und EDV-gestützt ausgewertet. Der „High-Force“-Aufbau und die weiteren, für die Messungen verwendeten Geräte und Methoden sollen im Folgenden vorgestellt werden. Der „Low-Force“-Aufbau wurde für diese Arbeit lediglich im Rahmen einer Kollaboration mit Manfred Keller verwendet ([Uhde et al., 2003]). Eine kurze Erklärung befindet sich im entsprechendem Kapitel (4.2.1), für eine detailliertere Erklärung sei auf [Keller, 2003] verwiesen.

1.3.1 Magnetische Pinzetten - High Force Aufbau

Der Aufbau der Magnetischen Pinzetten ist schematisch in Abb. 1.13 gezeigt. Er besteht aus drei Teilen:

¹Erklärung im Rayleigh Regime, für Kugeln, die kleiner als die Laserwellenlänge sind.

²Erklärung im Mie Regime, für Kugeln die größer als die Laserwellenlänge sind

³Jeweils für die $4.5 \mu\text{m}$ -Dynabeads

1. dem Mikroskop (Fluoreszenz oder Durchlicht, jeweils mit digitaler Kamera) mit Halterung für Probenkammer und Magnetspule,
2. der Elektronik zum Betrieb der Magnetischen Pinzette (Funktionsgenerator, Verstärker, Strommesser, Analog/Digital-Wandler) und
3. der Elektronik und die EDV zur Bildakquise („Frame Grabber“-Karte zum Einlesen der digitalen Videodaten, Computer mit Software „OpenBox“ und schnellem Raid-Festplattensystem).

Mikroskop und Aufbauten Die Magnetischen Pinzetten wurden auf zwei unterschiedlichen Mikroskopen verwendet. Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (vergl. auch Abschnitt 1.3.3) wurde ein inverses Mikroskop vom Typ Axiovert 200 (*Zeiss, Oberkochen*) verwendet. Als Objektiv wurden hochauflösende und lichtstarke Ölimmersionsobjektive mit großer numerischer Apertur der Firma Zeiss verwendet (Plan-Apochromat 63x/1.40Oil und Plan-Neofluar 100x/1.30Oil). Die Beleuchtung erfolgte über eine Hochdruck-Quecksilberdampfampe HBO 100 (ebenfalls *Zeiss*).

Für Rhodamin/TRITC wurde der Filtersatz Nr. 15 der Firma Zeiss benutzt (Bandfilter 546 ± 12 nm, Strahlteiler bei 580 nm, Langpass bei 590 nm [[Zeiss \(URL\), 2003](#)]). Für die Messungen mit FITC wurde der Filtersatz Nr. 09 der Firma Zeiss benutzt (Bandfilter 450 – 490 nm, Strahlteiler bei 510 nm, Langpass bei 515 nm [[Zeiss \(URL\), 2003](#)]). Die verwendete Kamera war eine Hamamatsu Orca-ER (*Hamamatsu, Herrsching*).

Für Durchlichtexperimente wurde ein inverses Mikroskop vom Typ Axiovert 10 benutzt. Das verwendete Objektiv war ein Plan-Neofluar 10x/0.3 (alles *Zeiss*). Die verwendete Kamera war eine Hamamatsu C4880-80 (*Hamamatsu, Herrsching*).

Mit den verwendeten Kameras können für Teilbilder unter günstigen Verhältnissen Bildraten von unter 10 ms realisiert werden.

Die Bilder wurden in Echtzeit von der Aufnahmesoftware „OpenBox“ auf dem Festplatten-Raid-System des Rechners gespeichert. Zur Archivierung der digitalen Videodateien (typischerweise 10-20 GByte Datenvolumen pro Messung) wurden diese mittels Wavelet-Transformation auf 10% ihres Anfangsvolumens komprimiert. Die Daten wurden dann auf Compact-Disks (CDs) oder Digital-Versatile-Disks (DVDs) archiviert. Der Verlust an Genauigkeit durch die Komprimierung liegt unterhalb der Genauigkeit der verwendeten Optik. Es findet also kein relevanter Informationsverlust statt [[Keller et al., 2001a](#)].

Auf dem speziell für diese Anwendung gefertigten Mikroskopisch befindet sich ein Rahmen, welcher sowohl die temperierbare Probenkammer als auch die Magnetspule (Kupferdraht $\varnothing = 0.7$ mm, 1600 Windungen, $\varnothing \times L = 5 \times 4.5$ cm) aufnimmt. Der Weicheisenkern der Spule ($\varnothing \times L = 1 \times 6.5$ cm) verjüngt sich zur Probenkammer hin und ragt mit seiner Spitze einige Millimeter in die Kammer hinein (vergl. Abb. 1.15(b)). Die Messkammer wird mit Silikon-Vakuumsfett („Hochvakuumsfett mittel“ *Wacker Chemie, München*) abgedichtet. Details zur Messkammer finden sich im Abschnitt 1.3.2. Die Abbildung 1.14 zeigt den montierten „High Force“-Aufbau.

Elektronik Die Elektronik besteht aus einem Funktionsgenerator (Typ DS345 *Stanford Research Systems, Sunnyvale, USA*), der die zu verstärkenden Pulsinformationen als Spannungssignal an einem 50Ω Ausgang liefert. Dieses Signal wird von einer spannungskontrollierten Stromquelle („Verstärker“, Anfertigung der Elektronikwerkstatt der TU-München, Id.-Nr. 9604) in ein definiertes, von der Last unabhängiges Stromsignal umgewandelt. Die

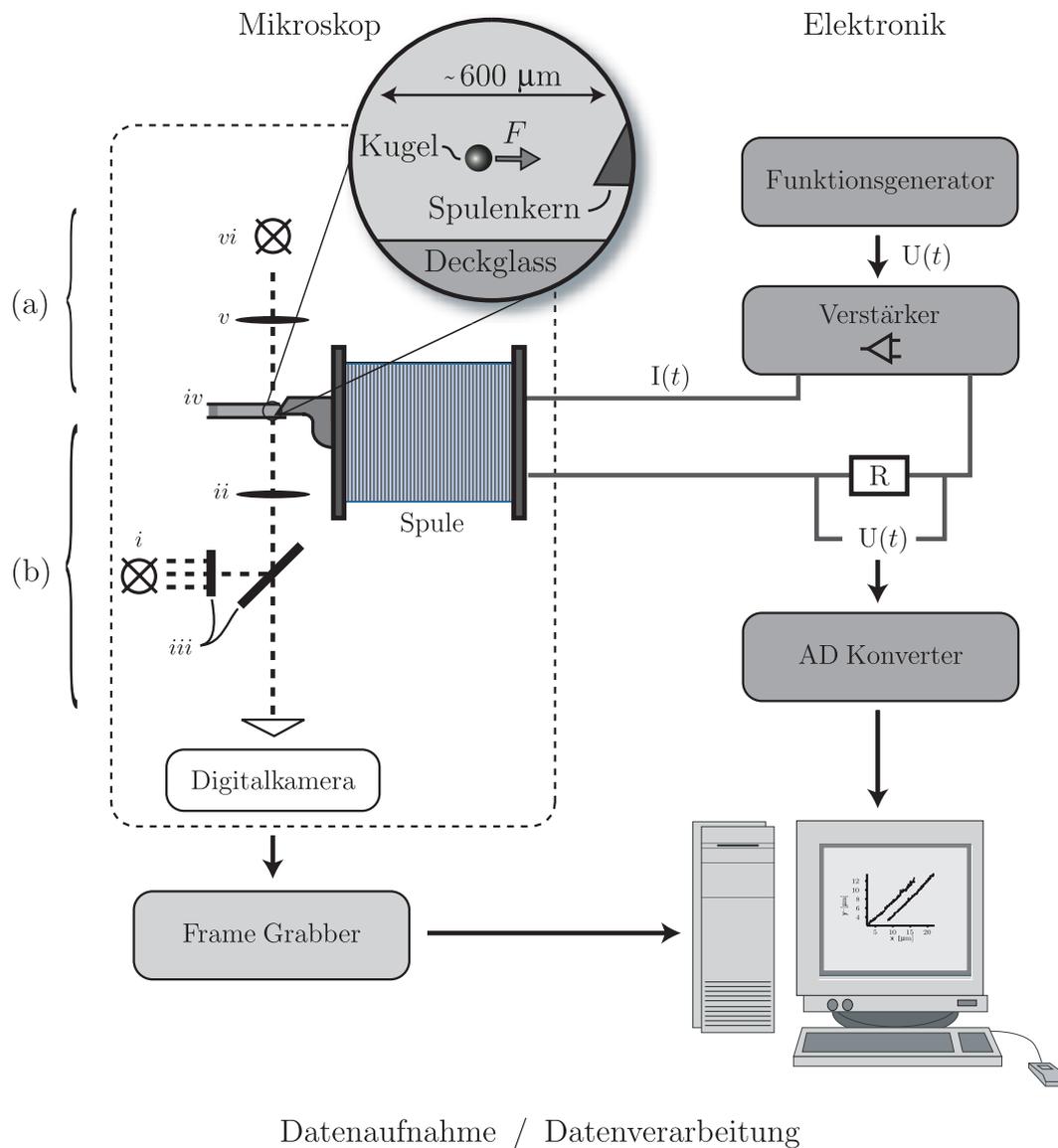


Abbildung 1.13: Übersicht über den Aufbau der Magnetischen Pinzetten („High Force“ Aufbau). Der Aufbau besteht aus dem Mikroskop, der Elektronik, der Datenaufnahme und der Datenverarbeitung. (a) Schematische Darstellung der Durchlichteinheit: Halogenlampe *vi* und Linsensystem *ii/v*. (b) Schematische Darstellung der Fluoreszenzeinheit: Quecksilberdampfampe *i*, Linsensystem *ii*, Filter und dichroitischer Spiegel *iii*. Der Ausschnitt zeigt eine schematische Darstellung des für Messungen benutzten Bereiches der Probenkammer *iv*. Weitere Erklärungen befinden sich im Text.

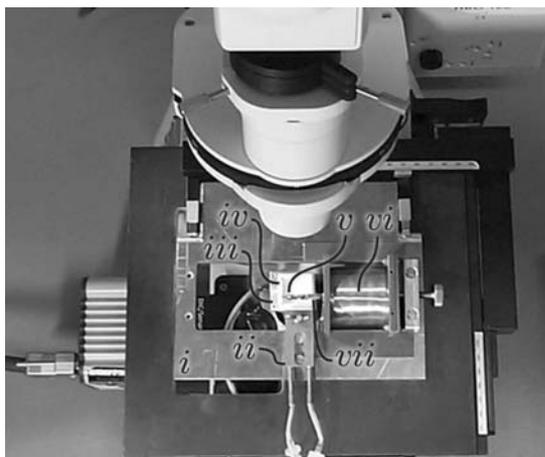


Abbildung 1.14: Montierter „High Force“-Aufbau. Der Aufbau befindet sich auf einem Axiovert 200. Die einzelnen Teile sind: Halterahmen (*i*), temperierbarer Flansch mit Zu- und Ableitung (*ii*), Alurahmen (*iii*) zur Aufnahme der inneren Kammerenelemente, Teflonrahmen (*iv*) mit Vertiefung (im Mikrokanal ist ein PT-100 montiert (*v*)), Spule (*vi*) mit Spulenkern (*vii*), der in die Aussparung des Teflonrahmens hinein ragt. Im Bild links ist die Kamera zu erkennen und im Bild oben ist der teilweise zurück geklappte Kondensator zu sehen. Die Anschlusskabel für die Spule und den PT-100 wurden vor der Aufnahme entfernt, um die Übersichtlichkeit zu verbessern.

maximale Ausgangsspannung des Verstärkers beträgt 60 V, die maximale Stromstärke beträgt 4.5 A. Der vom Verstärker gelieferte Strom erzeugt in der Magnetspule die Felder, deren Gradienten Kräfte auf die Magnetischen Sonden ausüben. Die Abhängigkeit der Kraft vom Strom wird in Kapitel 3 diskutiert.

Im Stromkreis befinden sich, seriell zur Spule, definierte Lastwiderstände zu 10 Watt mit entweder 0.5 Ω , 1 Ω oder 2 Ω (0.1% Toleranz, Typ RH-10 *Vishay Elektronik GmbH, Landshut*). Der Spannungsabfall über einen dieser Widerstände wird über eine Analog-Digital-Wandler Karte in den Messrechner eingelesen. Dieses Signal ist direkt proportional zum Spulenstrom.

Bildakquise Die von den 10 oder 12-Bit⁴ Digitalkameras gelieferten Bildsignale werden über einen zur Kamera gehörenden Controller an eine „Frame-Grabber-Karte“ weitergeleitet. Diese reicht die Bilder an den Messrechner weiter. Auf einem ausreichend schnellen Rechner ist die verwendete Software „OpenBox“ in der Lage Vollbilder in der Geschwindigkeit, mit der sie vom Controller übermittelt werden, direkt auf ein schnelles Raid-Festplattensystem zu schreiben.

Die Mikroskopiebilder wurden teilweise mit sog. *Binning* aufgenommen. Beim verwendeten Zweifach-Binning werden jeweils 2×2 Bildpunkte (Pixel) zusammen ausgelesen. Ein Zweifach-Binning-Pixel enthält dadurch die integrierte Intensität von vier normalen Pixeln, was besonders für Fluoreszenzaufnahmen bei geringer Fluoreszenzintensität hilfreich sein kann. Die Auslesegeschwindigkeit steigt beim Zweifach-Binning ca. um einen Faktor 2. Diese Vorteile müssen jedoch mit einer um den Faktor 2 reduzierten Auflösung bezahlt werden, weshalb der Einsatz des Binnings nicht immer optimal ist.

Weitere Details zu Bildakquise und eine genaue Beschreibung der Software „OpenBox“ können bei J. Schilling [[Schilling, 2003](#)] nachgelesen werden.

⁴Farbtiefe. $10\text{Bit} = 2^{10} = 1024$ Graustufen, $12\text{Bit} = 2^{12} = 40964$ Graustufen

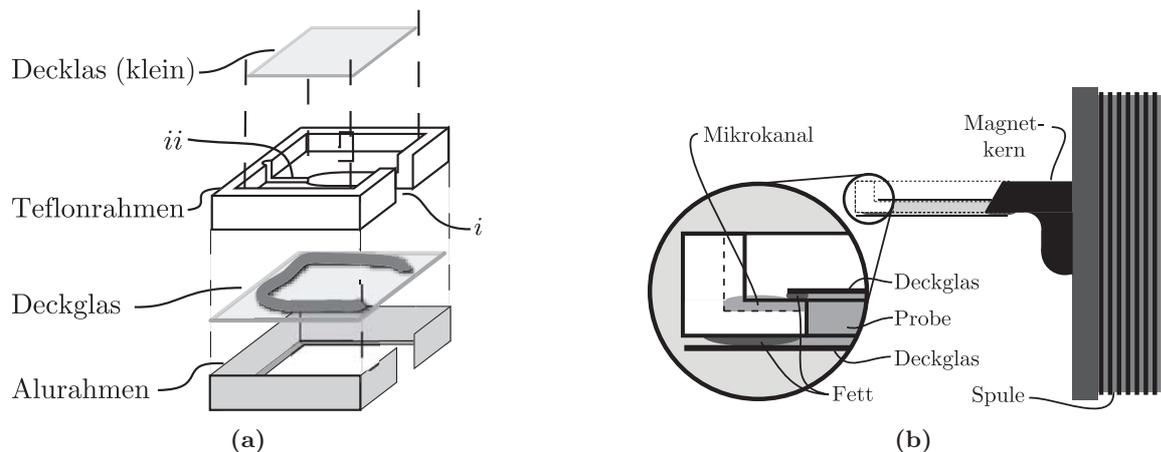


Abbildung 1.15: (a) Schematischer Aufbau der Messkammer. Der Aluminiumrahmen wird an einen temperierbaren Kupferhalter geschraubt (Halter nicht gezeigt). Im Rahmen liegt erst ein Deckglas mit einem Fettrand, dann der Teflonrahmen mit einer Aussparung (*i*) für die Probe und die Magnetkernspitze. Auf dem Teflonrahmen liegt wieder ein Deckglas. Durch den Mikrokanal (*ii*) kann einerseits ein kleiner Pt100 in die Probe eingeführt werden (ebenfalls nicht gezeigt), andererseits kann die Probe über diesen Kanal den Druck ausgleichen, der beim Verschließen der Kammer entsteht. (b) Seitenansicht der Kammer mit Magnetspule und Kern in maßstabsgetreuem Größenverhältnis mit Deckgläsern (schwarze Linien), Teflonkammer (gestrichelt) und Probe (grau). Der Ausschnitt zeigt eine Detailansicht des Mikrokanals (ohne PT-100). An der Verteilung der Probe ist die Druckausgleichsfunktion des Kanals gut zu erkennen.

1.3.2 Verbesserung der Apparatur

Der Aufbau der Messkammer, wie bei [Dichtl, 2001] beschrieben, konnte im Rahmen dieser Arbeit entscheidend verbessert werden:

- Durch Absenken der Kammerdecke konnte das Probenvolumen bei gleicher experimentell zugänglicher Fläche verkleinert werden (von ca. 1 ml auf ca. 100 μ l), was besonders bei Proben mit Myosin sehr wichtig war, da dieses Protein nur in kleinen Mengen präpariert werden kann.
- Durch Einführung eines zweiten, die Kammer nach oben abschließenden Deckglases, konnte die thermische Drift und die Verdunstung des Probeninhalts stark reduziert werden. Die Verzerrung des Durchlichtbildes aufgrund der Linsenwirkung der gekrümmten Probenoberfläche konnte damit völlig beseitigt werden.
- Durch einen neu eingeführten Mikrokanal kann einerseits ein Miniatur Pt100-Messwiderstand zur direkten Temperaturmessung in das Probenvolumen eingeführt werden, andererseits erlaubt der Kanal einen Druckausgleich und ein Entweichen der Luft beim Aufsetzen des oberen Deckglases. Die Probe kann somit Kompressions- und Scherkräftefrei verschlossen werden.

Zusätzlich wurde die Strommessung durch Verwendung von Präzisionswiderständen verbessert: Der Ausgang des Verstärkers weist bei kleinen Strömen stärkere Nullpunktsschwankungen und höheres Rauschen auf. Das Rauschen konnte um 86% und die Nullpunktsschwankungen um 91% reduziert werden (vergl. Abb. 1.16(a)).

Weiterhin wurde ein auf die Magnetspule abgestimmtes Entmagnetisierungsgerät konstruiert und benutzt, um die Spulenkerns vor jedem Experiment zu entmagnetisieren.

Damit konnte die Restmagnetisierung unter die Nachweisgrenze gesenkt werden (vergl. Abb. 1.16(b),(c)). Für Flussdichte-Messungen wurde ein Tesla-Meter der Firma *Projekt Elektronik GmbH, Berlin* vom Typ FM 210 verwendet.

1.3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Methode der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf dem Effekt, dass gewisse Moleküle (meistens solche mit ausgedehnten konjugierten π -Elektronensystemen) einen Teil des von ihnen absorbierten Lichts in Form langwelliger Strahlung wieder abgeben können.

Zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wird das Licht einer intensiven Lichtquelle, wie z.B. einer Quecksilberhöchstdrucklampe, benötigt. Das Licht der Lampe erreicht zunächst den Anregungsfilter. Dieser Filter sorgt dafür, dass nur solche Strahlung das Präparat erreichen können, deren Wellenlänge auf die Anregung des Farbstoffes abgestimmt sind. Das Anregungslicht wird mit Hilfe eines wellenlängenabhängigen (dichroitischen) Spiegels auf die Probe gelenkt.

Alle wesentlichen Übergänge, die nun in einem Farbstoffmolekül stattfinden, können vereinfacht in einem Drei-Niveau-System dargestellt werden: Vom elektronischen Grundzustand (Singulett, S_0) geht das Molekül durch die Lichteinstrahlung in den elektronisch angeregten Zustand S_1 (S_2, \dots) über. Dieser Übergang erfolgt in den Schwingungsgrundzustand oder in ein Schwingungsniveau (mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten) und ist extrem schnell (\sim Femtosekunden). Die Summe dieser Übergänge bestimmen das Absorptionsspektrum.

Schwingungsanregungen in den elektronisch angeregten Zuständen zerfallen innerhalb von Pikosekunden strahlungslos in den S_1 Grundzustand (innere Konversion). Von hier aus fällt das Molekül nach Nanosekunden in seinen S_0 -Grundzustand oder einen seiner Schwingungszustände. Diese Übergänge ergeben das zur Anregung rotverschobene Fluoreszenzspektrum (Abb. 1.17).

Das rotverschobene Fluoreszenzlicht, das vom Farbstoffmolekül ausgesendet wird, wird nun vom dichroitischen Spiegel kaum noch reflektiert und gelangt deshalb zum Emissionsfilter der jegliche Reste reflektierten Anregungslichts blockiert.

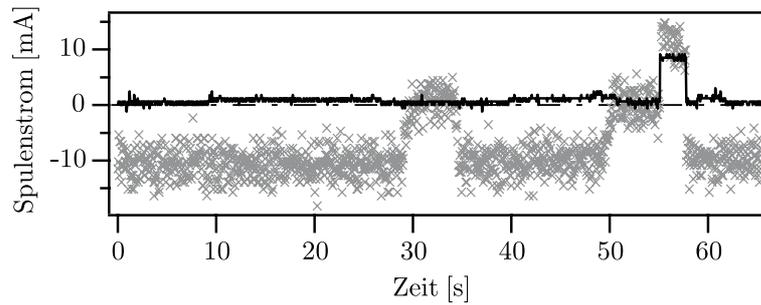
1.3.4 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Um Bündelungen und Maschenweiten der Aktinnetzwerke zu untersuchen, wurden einigen Proben mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Dabei wurde die Methode des „Negative Staining“ angewandt.

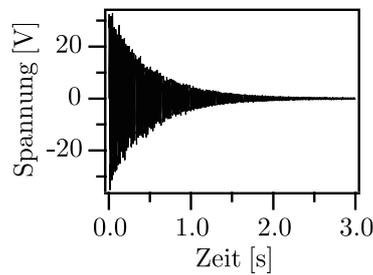
Dazu wird ein Tropfen des Aktinnetzwerkes auf ein EM-Grid (kohlebedampftes Mikrokupfernetz) aufgetropft. Der größte Teil der Probe wird anschließend mit einem Filterpapier wieder abgesaugt. Die Probe wird nun mit doppelt destilliertem Wasser gespült. Nach dieser Prozedur verbleiben nur die direkt auf der Oberfläche adsorbierten Aktinfilamente und/oder Motorproteine auf dem Grid.

Die Oberfläche wird dann für 60 Sekunden mit einer 0.8%igen Uranylacetat-Lösung inkubiert. Die auf der Probe verbleibenden Uranatome liefern nach dem Trocknen der Probe den nötigen Kontrast in der TEM-Aufnahme.

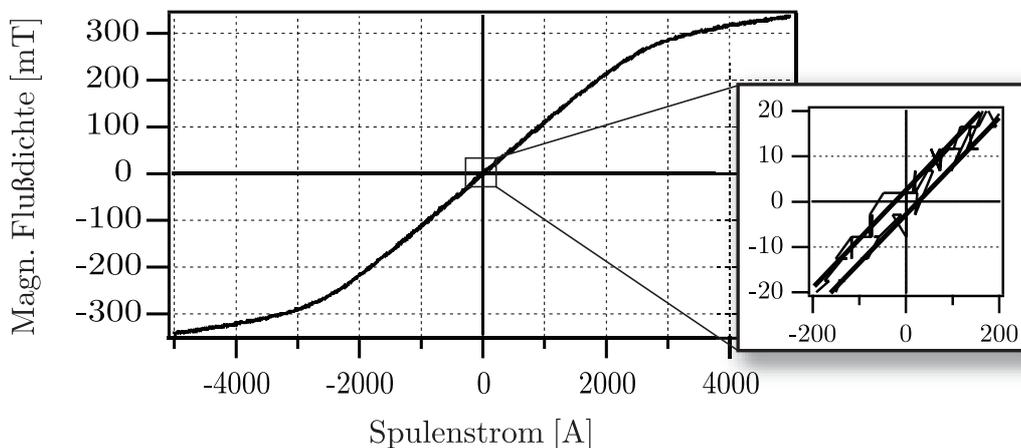
Die Untersuchungen am Elektronenmikroskop wurden in Zusammenarbeit mit unserer Mitarbeiterin Monika Rusp an einem Gerät vom Typ Phillips CM-100 durchgeführt.



(a)



(b)



(c)

Abbildung 1.16: (a) Spulenstrom gemessen über den Ausgang des Verstärkers (grau) und als Spannungsabfall über einen Präzisionswiderstand (durchgezogene Linie). Die Verbesserung beträgt 86% für das Rauschen und 91% für die Nullpunktsschwankungen. Zwischen 55 und 58 Sekunden wurde ein realer Strompuls erzeugt. (b) Spannungsverlauf beim Entmagnetisieren der Spule. Der maximale Strom sinkt von ca. 6 A auf etwa 20 mA nach drei Sekunden. Das remanente Feld der Spule ist danach mit der verwendeten Hall-Sonde nicht mehr messbar (nicht gezeigt). (c) Hysteresekurve des Weicheisenspulenkerns nach vorhergehender Magnetisierung. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung der Kurve für kleine Ströme. Die Restmagnetisierung beträgt etwa 3 mT.

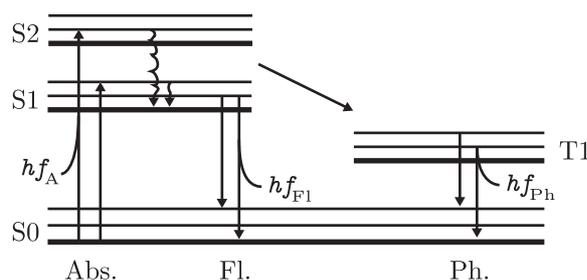


Abbildung 1.17: Vereinfachtes Termschema eines fluoreszierenden Moleküls. Vom elektronischen Grundzustand (Singulett, S_0) geht das Molekül durch die Lichteinstrahlung (hf_A) in den elektronisch angeregten Zustand S_1 (S_2, \dots) über. Ein Übergang erfolgt in den Schwingungsgrundzustand oder in ein Schwingungsniveau (Abs.). Diese Übergänge ergeben das Absorptionsspektrum. Die Schwingungsanregungen zerfallen strahlungslos in den S_1 Grundzustand (innere Konversion). Von hier aus geht das Molekül in seinen S_0 -Grundzustand oder in einen seiner Schwingungszustände (Fl.) über. Dieser Übergang kann strahlungslos (nicht gezeigt) oder unter Aussendung von Fluoreszenzlicht (hf_{Fl}) erfolgen, welches dann das zur Anregung rotverschobene Fluoreszenzspektrum ergibt. Möglich ist auch der (je nach Molekül wahrscheinliche oder unwahrscheinliche) Übergang in den metastabilen T_1 -Zustand. Der Zerfall zum Grundzustand von hier aus ist sehr langsam, man spricht dann von Phosphoreszenz (Ph.).

1.3.5 Digitalen Bildverarbeitung

Die Bilder der digitalen Kameras werden von der Software „OpenBox“ in einem unkomprimierten 16-Bit AVI-Format⁵ gespeichert und nach Beendigung der Messung mit Hilfe von Wavelet-Kompressionsalgorithmen komprimiert.

Wie bereits beschrieben, bleibt der Fehler, der bei der Positionsbestimmung der Kugel durch die Komprimierung entsteht, unter der Auflösung der verwendeten Mikroskopoptik.

Der erste Schritt der quantitativen Bildverarbeitung ist die Kugelnachverfolgung. Dazu wird je nach Qualität und Beschaffenheit des Videomaterials mit verschiedenen, in der Software integrierten Algorithmen gearbeitet, z.B. einem Gauß-Fit auf einem Paar sich kreuzender Linien oder ein zweidimensionaler Gauß-Fit oder eine Korrelationsmaximierung oder das Auffinden von Radialsymmetrien [Schilling, 2003].

Mit Hilfe der genannten Algorithmen kann die Software die Position des Kugelmittelpunkts auf Bruchteile von Pixeln genau bestimmen. Gleichzeitig mit dieser Information wird die Zeit und der aktuelle Kanal der AD-Wandlerkarte, dessen Signal proportional zum Spulenstrom ist, in einer Textdatei gespeichert.

Die Textdatei kann nun für weitere Analysen ausgelesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für alle weiteren Datenbearbeitungen oder Analysen die Software „Igor Pro“ (*Wave Metrics, Lake Oswego, OR, USA*) verwendet.

In der Regel wurde das Einlesen der Daten durch Makros automatisiert und je nach verwendeter Mikroskop/Oktiv-Kombination eine automatische Ortsskalierung durchgeführt. Die Zeitinformation wurde auf Sekunden skaliert, fehlende Zeiträume in der Messung, z.B. durch Aussetzer bei der Kugelnachverfolgung oder durch Messpausen wurden korrigiert. Danach wurden die AD-Wandlerkanäle in den tatsächlichen Spulenstrom zurückgerechnet und die Kugelpositionen automatisch auf Abstände zum Spulenkernende skaliert. Dies ist nötig da die Kraft, die auf das Sondenpartikel wirkt, von diesem Abstand und von dem im Moment der Aufnahme fließenden Strom abhängt. Je nach Typ des Experiments wurden die Daten daraufhin auf die Kraft normiert und in einzelne Pulse zerlegt (Einzelheiten zum Zusammenhang

⁵ engl.: *Audio Video Interleave Format*

zwischen Strom, Abstands und Kraft siehe Abschnitt 3).

Anschließend wurden verschiedene detaillierte Analysen mit den Daten durchgeführt, die im Einzelnen in den Experimentalkapiteln beschrieben sind.

Die Datenmenge von mehreren tausend Datenpunkten pro Kugelnachverfolgung und bis zu 100 verfolgten Kugeln pro Experimentiertag, die bei der digitalen Video-Mikroskopie anfällt, ist bei Bearbeitung von Hand nicht mehr beherrschbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb Programme in der Makrosprache der Software „Igor Pro“ entwickelt, welche diverse Aufgaben automatisieren. Insgesamt wurden weit über 4000 Zeilen Programmcode geschrieben und mehr als 20 komplexe Aufgabenstellungen implementiert, z.B. Daten einlesen, Daten skalieren, Spulenkern-Abstand-Skalierung, Kraftdaten berechnen, Pulse separieren, Pulse mittels Kraftdaten normieren, zweite Pulshälfte löschen, Durchschnitt mehrere Pulse berechnen, usw. .

Weiterhin wurde für einige Auswertungen auch eine Filamentverfolgung durchgeführt [Ziemann, 1997]. Diese Art der Auswertung ist kaum automatisiert. Filme können bis jetzt nur Bild für Bild bearbeitet werden, was diese Auswertungsmethode extrem zeitaufwendig macht.

Kapitel 2

Theorie

Aktinnetzwerke, welche Gegenstand der Untersuchung dieser Arbeit waren, zeigen sowohl elastisches als auch viskoses Verhalten. Sie gehören somit zur Klasse der viskoelastischen Materialien. Je nachdem, ob sie dauerhaft und stabil vernetzt oder unvernetzt sind, betrachtet man sie entweder als viskoelastische Festkörper (d.h. das Netzwerk verhält sich auf langen Zeitskalen elastisch) oder als viskoelastische Flüssigkeiten (d.h. das Netzwerk verhält sich auf langen Zeitskalen fluide).

Ein reines (*in vitro*) Aktinnetzwerk besteht aus verschlauften semiflexiblen Polymeren. Deshalb folgt zunächst eine kurze Übersicht über Polymere und ihre Netzwerke an sich. Im Anschluss daran werden einige Grundbegriffe der Viskoelastizitätstheorie diskutiert. Darauf folgt ein kurzer Überblick über die klassischen Methoden der rheologischen Beschreibung von Aktinnetzwerken und anschließend eine kurze kritische Diskussion derselben. Danach wird eine neue Methode der Beschreibung für rheologische Messungen an Aktinnetzwerken oder verwandten Systemen vorgestellt und in diesem Zusammenhang der Begriff des *osmotischen Widerstands* eingeführt und beschrieben.

Abschließend wird der theoretische Hintergrund der Kraftübertragung auf magnetische Sondenpartikel durch die Magnetischen Pinzetten erläutert.

2.1 Polymere und ihre Netzwerke

Für die Klassifikation von Polymeren spielen neben den physikalischen Grundeigenschaften wie Masse m , Konturlänge $0 \leq s \leq L$, Durchmesser d und der Monomeranzahl a vor allem die Persistenzlänge l_p und der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand $\langle R^2 \rangle$ mit $R = \mathbf{r}(L) - \mathbf{r}(0)$ eine Rolle.

Die Persistenzlänge ist die Konturlänge zwischen zwei Punkten s_1 und s_2 auf dem Filament, bei der die gemittelte Korrelation der (Einheits-)Tangentenvektoren $\mathbf{t}_i = \frac{\partial \mathbf{r}(s_i)}{\partial s_i}$ (zeitlich oder räumlich) von 1 auf $1/e$ abgefallen ist:

$$\langle \mathbf{t}_1, \mathbf{t}_2 \rangle = e^{-\frac{(s_2 - s_1)}{l_p}} \quad (2.1)$$

Die Persistenzlänge ist dabei ein temperaturabhängiges Maß für die Biegesteifigkeit κ des Polymers:

$$l_p = \frac{\kappa}{k_B T} \quad (2.2)$$

mit κ = Biegesteifigkeit, k_B = Boltzmann Konstante und T = Temperatur.

Der mittlere quadratische End-zu-End-Abstand $\langle R^2 \rangle$ als Maß für die mittlere räumliche Ausdehnung des Polymers lässt sich folgendermaßen aus der Persistenzlänge berechnen

[Landau und Lifschitz, 1970]:

$$\langle R^2 \rangle = 2l_p^2 \left(\frac{L}{l_p} - 1 + e^{-L/l_p} \right) \quad (2.3)$$

Anhand des Verhältnisses aus Persistenzlänge und Konturlänge bzw. aus Persistenzlänge und $\langle R^2 \rangle$ können Polymere in drei Klassen eingeteilt werden:

Steife Polymere (Steife Stäbe)	$l_p \gg L,$	$\langle R^2 \rangle = L^2$
Semiflexible Polymere	$l_p \approx L,$	$\langle R^2 \rangle \lesssim L^2$
Flexible Polymere (Polymerknäule)	$l_p \ll L,$	$\langle R^2 \rangle \ll L^2$

Beispiele für flexible Polymere sind die meisten synthetischen Polymere (wie auch das in Kapitel 1.2.3 beschriebene Polystyrol). Bei dieser Filamentklasse ist keine Orientierung der Verbindung zwischen den einzelnen Monomeren energetisch stark bevorzugt. Die Konformation flexibler Polymere ist daher fast ausschließlich von der Entropie \mathcal{S} bestimmt, welche deshalb als Zufallsknäuel vorliegen. Diese Polymere können unter Vernachlässigung der Biegesteifigkeit befriedigend als sog. Gaußsche Kette beschrieben werden ([Doi und Edwards, 1989], Kapitel 2.2).

Ein Beispiel für steife Polymere sind Mikrotubuli, die eine Persistenzlänge von einigen Millimetern besitzen ([Maier, 2001]), aber *in vivo* maximal eine Länge von einigen $10 \mu\text{m}$ (entsprechend dem Zelldurchmesser) erreichen. Die Beschreibung dieser Polymere erfolgt unter Vernachlässigung der entropischen Effekte befriedigend mit einer Theorie für elastische Stäbe ([Doi und Edwards, 1989], Kapitel 8.3).

Aktin besitzt bei Raumtemperatur eine Persistenzlänge von ca. $17 \mu\text{m}$ [Gittes et al., 1993] und *in vitro* eine durchschnittliche Konturlänge von $22 \mu\text{m}$ [Kaufmann et al., 1992]. Aktin gehört somit zur Klasse der semiflexiblen Polymere: Die Konformationsdynamik des filamentösen Aktins ist daher sowohl von der Entropie \mathcal{S} als auch von der Biegesteifigkeit κ der Filamente bestimmt. Die theoretische Beschreibung dieser Polymerklasse erfolgt explizit unter Berücksichtigung von Entropie und Biegesteifigkeit. Die Polymere werden dazu als differenzierbare, nicht dehnbare Raumkurve $\mathbf{r}(s)$ mit Konturlänge L beschrieben (Worm-Like-Chain Modell). Die statistischen Eigenschaften des Polymers werden dabei am besten durch die freie Energie \mathcal{H} dargestellt, die sich aus dem Integral über alle lokalen Krümmungen gewichtet mit der halben Biegesteifigkeit κ ergibt:

$$\mathcal{H} = \frac{\kappa}{2} \int_0^L \left(\frac{\partial^2 \mathbf{r}(s)}{\partial s^2} \right)^2 ds \quad (2.4)$$

Für die Verteilungsfunktion des End-zu-End Abstandes semiflexibler Polymere ergibt sich dabei eine interessante Konsequenz: Aufgrund der entropischen Effekte fluktuiert der tatsächliche End-zu-End Abstand R um den mittleren End-zu-End Abstand $\sqrt{\langle R^2 \rangle}$, die Verteilungsfunktion für diesen Prozess ist eine Gaußfunktion. Da sich das Polymer aufgrund der nicht vernachlässigbaren Biegesteifigkeit aber bevorzugt in einer eher gestreckten Konformation befindet, wird sich nicht nur der Mittelwert der Verteilungsfunktion wie in Gleichung (2.3) beschrieben in Richtung der Polymergesamtlänge verschieben, sondern die Verteilungsfunktion wird zusätzlich noch stark asymmetrisch ([Wilhelm und Frey, 1996]. Als Grenzfälle dieser detaillierten Beschreibung ergeben sich die Verteilungsfunktion für die Gaußsche Kette oder für den steifen Stab (vergl. Abb. 2.1).

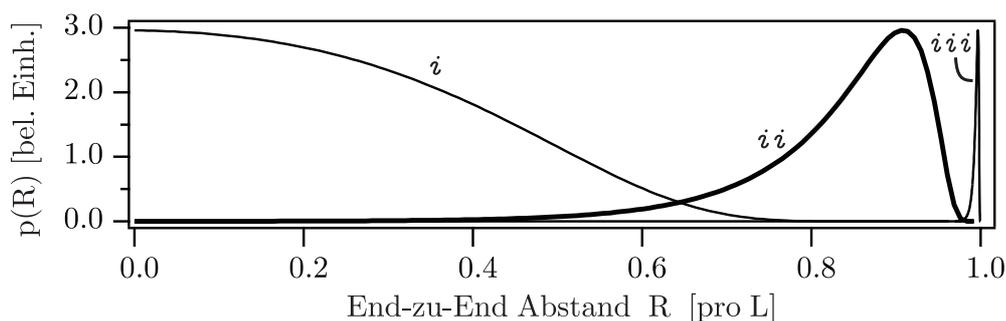


Abbildung 2.1: Asymmetrische End-zu-End Abstandsverteilungsfunktion $p(R)$ (i) im Grenzfall für sehr kleine Persistenzlängen bei flexiblen Polymeren ($l_p \approx 0.1L$, Gaußförmige Verteilungsfunktion um null), (ii) für semiflexible Polymere für $l_p \approx L$, bzw. (iii) für sehr großer Persistenzlängen bei steifen Polymeren ($l_p \approx 30L$, singuläre Verteilung bei $R \approx L$).

Polymernetzwerke Beim Lösen eines Polymers in einem guten Lösungsmittel entstehen Netzwerke, die nach ihrem Verdünnungsgrad in folgende Regimes eingeteilt werden [Doi und Edwards, 1989]:

- *Verdünnte Lösung:* Der mittlere Abstand der einzelnen Polymere ist so groß, dass sie relativ frei rotieren und fluktuieren können. Die Polymer-Polymer-Wechselwirkung ist vernachlässigbar.
- *Halbverdünnte Lösung:* Die Konzentration der Polymere ist gerade so hoch, dass Verschlaufungen der Filamente auftreten.
- *Konzentrierte Lösung:* Die einzelnen Polymere überlappen und verschlaufen sich stark: Die Lösung ist isotrop.
- *Flüssigkristalline Lösung:* Bei einem hohen Volumenbruchteil des gelösten Polymers mit endlichem Eigenvolumen ordnen sich semiflexible Filamente oder steife Stäbchen: Die Lösung wird flüssigkristallin.

Der Übergang zwischen den Regimes ist fließend und hängt wesentlich davon ab, welcher Klasse die Filamente angehören. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer Aktinkonzentration in der Größenordnung von $10 \mu\text{M}$ gearbeitet. Das entspricht einem Volumenbruchteil des Aktins von nur ca. 0.1%. Die semiflexiblen Aktinpolymere verschlaufen sich bereits bei dieser sehr niedrigen Polymerkonzentration. Dies liegt an der weitgehend gestreckten Konformation der einzelnen Filamente und bewirkt, dass das Polymernetzwerk einer halbverdünnten bis konzentrierte Lösung semiflexibler Filamente sowohl Eigenschaften einer Flüssigkeit als auch eines Festkörpers aufweist (viskoelastisches Verhalten, siehe nächstes Kapitel).

Eine zum Verdünnungsgrad äquivalente und gebräuchlichere Größe zur Beschreibung des Netzwerkes ist die sog. Maschenweite ξ . Damit wird der mittlere Abstand zwischen zwei Kreuzungspunkten im Netzwerk bezeichnet. Im Fall von F-Aktin wurde in dieser Arbeitsgruppe ([Schmidt et al., 1989]) empirisch folgender Zusammenhang zwischen ξ (in μm) und der Monomerkonzentration c_a (in mg/ml) bestimmt:

$$\xi[\mu\text{m}] = 0.34 \cdot \left(\frac{c_a}{1\text{mg/ml}} \right)^{-1/2} \quad (2.5)$$

Sind Vernetzungsproteine im Netzwerk vorhanden, gibt es eine weitere wichtige Größe: Den durchschnittlichen Vernetzer-Abstand d . Der Einfluss des Verhältnisses $\eta = \xi/d$ auf die

Struktur der Aktinlösung kann mit Hilfe der Perkolationstheorie beschrieben werden, die nach dem ersten Auftreten einer zusammengehörenden, die ganze Probe durchziehenden Gruppe von Filamenten in Abhängigkeit von η fragt. Hierzu sei z.B. auf die Arbeit von [Tempel, 1996; Tempel et al., 1996] verwiesen, der die Phasenübergänge eines Aktinnetzwerkes in Abhängigkeit von η für das Vernetzungsprotein α -Aktinin untersucht hat.

Filamente im Netzwerk Für die mikroskopische Beschreibung des Verhaltens einzelner Filamente in solchen Netzwerken hat sich in den letzten Jahren das Röhrenmodell¹ durchgesetzt. Dabei fasst man die Filamente, welche den Phasenraum des betrachteten Filaments einschränken als (unregelmäßig geformte) Röhre zusammen, in der das Filament fluktuieren und lateral diffundieren kann ([de Gennes, 1979; Doi und Edwards, 1989]). Die wichtigsten Größen dieses Modells sind in Abbildung 2.2 zusammengefasst.

Für sehr kurze Zeiten $t < \tau_e$ (τ_e ist die sog. Entanglement-Zeit, s.u.) kann das Polymer dabei als frei im Lösungsmittel beweglich angesehen werden. Für diese Zeitskalen werden die umgebenden Polymere vernachlässigt. Die Dynamik senkrecht zur Filamentachse $\mathbf{r}_\perp(s, t)$ ist dabei von besonderem Interesse, da diese das Kurzzeitverhalten der Viskosität bestimmt. Aber auch für Zeiten $t > \tau_e$ ist diese Komponente der Dynamik sehr wichtig, da sie z.B. das Antwortverhalten von Sondenpartikeln im Netzwerk bestimmt, wie im nächsten Kapitel gezeigt wird.

Da semiflexible Polymere wie Aktin normalerweise lokal schwach gekrümmt sind, kann für diesen Zeitbereich die Näherung des schwach gekrümmten Stabes benutzt werden, um die folgende Langevin-Gleichung aufzustellen ([Soda, 1973]):

$$\zeta_\perp \frac{\partial \mathbf{r}_\perp(s, t)}{\partial t} = -\kappa \frac{\partial^4 \mathbf{r}_\perp(s, t)}{\partial s^4} + \mathbf{F}_\perp^{\text{Stoch.}} \quad (2.6)$$

mit einem effektiven Reibungskoeffizienten $\zeta_\perp = 4\pi\eta/\ln(\lambda/a)$, der die Viskosität η der Flüssigkeit, den Durchmesser a des Polymers und eine hydrodynamische Abschirmlänge λ beinhaltet. Die angreifenden thermischen Kräfte sind dabei rein stochastischer Natur.

Aus Gleichung (2.6) folgt direkt die typische Abklingdauer τ_l thermisch angeregter Undulationen der Wellenlänge l :

$$\tau_l = \frac{\xi_\perp}{\kappa} l^4 \quad (2.7)$$

Weiterhin folgt die Zeitabhängigkeit der mittleren quadratischen Abweichungen (MSD)² dieser Undulationen $\langle \mathbf{r}_\perp^2 \rangle = \langle \mathbf{r}_\perp(t) - \mathbf{r}_\perp(0) \rangle$ zu:

$$\langle \mathbf{r}_\perp^2 \rangle \propto \left(\frac{k_B T}{\xi_\perp l_p^{1/3}} t \right)^{3/4} \quad (2.8)$$

Aus dieser Betrachtung folgt also ein subdiffusives Verhalten mit einem skalierenden Exponenten von 3/4 für die Kurzzeitfilamentdynamik.

Für längere Zeiten müssen die umgebenden Filamente mit in Betracht gezogen werden. Für transversale Fluktuationen wird die Beschränkung durch die Reptationsröhre durch Einführung einer harmonischen Rückstellkraft $-k \cdot \mathbf{r}(s, t)$ berücksichtigt [Odijk, 1983].

Eine neue Größe in diesem Modell ist die Verhakungs- oder Entanglement-Länge

$$L_e \approx 0.58 \xi^{4/5} l_p^{1/5} \quad (2.9)$$

¹ von lat. *reptare*, kriechen

² von engl.: *mean square displacement*

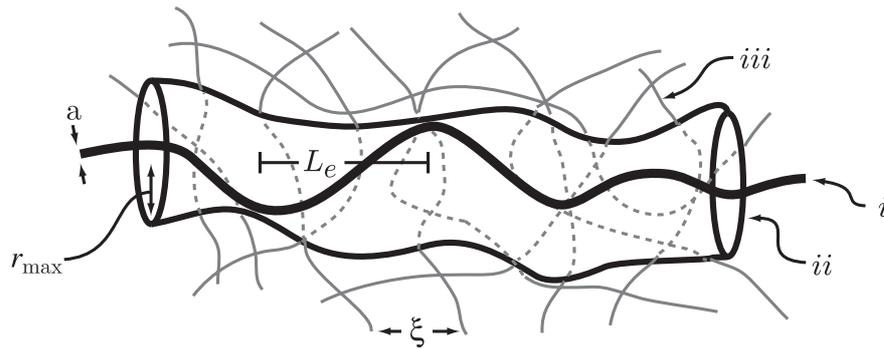


Abbildung 2.2: Reptationsmodell: Das betrachtete Filament i fluktuiert in seiner Reptationsröhre ii , die durch die umgebenden Filamente iii gebildet wird. Eingezeichnete Dimensionen: Maschenweite ξ , Filamentdurchmesser a , maximal Fluktuationsamplitude (\equiv Röhrendurchmesser) r_{\max} und Entanglement-Länge L_e .

[Hinner et al., 1998] Sie entspricht dem mittleren Abstand von zwei Berührungspunkten des Filaments mit seiner Reptationsröhre. Undulationen mit Wellenlängen größer als L_e werden stark überdämpft (vergl. auch Abb. 2.2).

Die bereits erwähnte Entanglement-Zeit τ_e kann im Rahmen dieses Modells zu folgendem Wert bestimmt werden [Isambert und Maggs, 1996]:

$$\tau_e = \frac{\zeta l_p^{1/3} r_{\max}^{8/3}}{k_B T} \quad (2.10)$$

mit $\zeta = 2\pi\eta/\ln(\lambda/a)$. Aus Gleichung 2.10 folgt direkt die starke Abhängigkeit der Entanglement-Zeit vom Durchmesser der Reptationsröhre.

Die Reptationsröhre selbst ist durch äußere Kräfte oder durch Diffusion der sich bildenden Filamenten Formänderungen unterworfen. Den diffusiven Anteil beschreibt man durch eine zusätzliche Diffusionsgleichung überdämpfter Phononen eines homogenen effektiven Mediums [Kroy, 1998]. Zusammengefasst kann man daraus das Zeitverhalten der mittleren quadratischen Verschiebung quer zur Filamentachse berechnen [Kroy, 1998]. Eine wichtige Größe ist dabei der mittlere Zeitabstand der Wechselwirkung des Polymers mit der Reptationsröhre (τ_e): Für Zeiten $t \ll \tau_e$ zeigt die mittlere quadratische Verschiebung immer ein Skalenverhalten von $\langle r_{\perp}^2 \rangle \propto t^{3/4}$. Qualitativ ist dies in Abbildung 2.3 gezeigt.

Die Bewegung des Polymers aus einem alten Segment der Röhre in ein neues Segment, die sog. Reptation, lässt sich mit existierenden Theorien [Semenov, 1986; Isambert und Maggs, 1996; Granek, 1997; Everaers et al., 1999] grundsätzlich analog zur Reptation flexibler Polymere beschreiben. Allerdings sind quantitative Ergebnisse dieser Ansätze untereinander oft nicht vergleichbar, da es Unterschiede in den Grundannahmen gibt und zudem für semiflexible Polymere nicht sinnvolle Randbedingungen benutzt werden müssen. Da die Reptationsdiffusion der Aktinfilamente für die Fragestellungen dieser Arbeit von untergeordneter Rolle waren, sei für eine detaillierte Erklärung auf die gute Zusammenstellung der verschiedenen zugrunde liegenden Mechanismen in [Dichtl, 2001] verwiesen.

Unabhängig vom zugrundegelegten Modell gilt jedoch, dass in einem verschlauften Netzwerk semiflexibler Polymere Spannungen langfristig nur über eine Umordnung des Netzwerkes relaxieren können, was wiederum aufgrund der Verschlaufungen nur über eine Selbstdiffusion der Filamente entlang ihrer Achsen möglich ist. Die Zeitkonstante dieser Relaxation ist

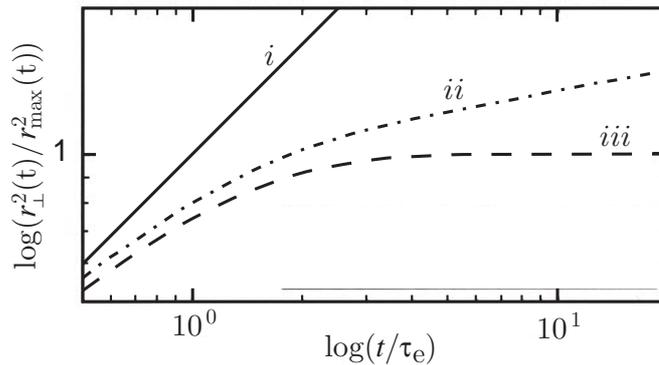


Abbildung 2.3: Qualitative Beschreibung des MSD-Verlaufs für Fluktuationen quer zur Filamentachse in doppellogarithmischer Auftragung: (i) Freies Polymer, (ii) Polymer in statischer Röhre, (iii) Polymer in veränderlicher Reptationsröhre. Die MSD-Achse ist auf die maximale Fluktuationsamplitude r_{\max}^2 normiert. Die Zeitachse ist auf den mittleren Zeitabstand der Wechselwirkung des Polymers mit der Reptationsröhre (τ_e) normiert.

also die typische Diffusionszeit eines Filaments in der Reptationsröhre über die Strecke der mittleren Konturlänge der Filamente. Diese Zeit heißt terminale Relaxationszeit (τ_{rept}). Die theoretische Vorhersage für diese terminale Relaxationszeit ist [Morse, 1998a]:

$$\tau_{\text{rept}} = l^2 / \pi^2 D_{\text{rept}} \quad (2.11)$$

mit der Reptationsdiffusionskonstante D_{rept} . Mit der Beziehung $D \propto k_B T / \eta l$ (Stokes-Einstein Gleichung) folgt daraus $\tau_{\text{rept}} \propto l^3$, wodurch die starke Abhängigkeit dieser Zeit von der Diffusionsstrecke deutlich wird.

2.1.1 Grundbegriffe der linearen Viskoelastizitätstheorie

Sind sowohl Auslenkung als auch Schergeschwindigkeit eines viskoelastischen Körpers klein und ist die zeitabhängige Relation zwischen Spannung und Scherung mit linearen Differentialgleichungen beschreibbar, so handelt es sich um lineares viskoelastisches Verhalten. Der Quotient aus Spannung und Scherung ist dann nicht von der Amplitude der Spannung abhängig, sondern von der Frequenz, bzw. der Zeit. Die Beziehungen zwischen Spannung und Scherung und deren Zeitabhängigkeit wird von der Grundgleichung der linearen Viskoelastizitätstheorie beschrieben, die im Folgenden abgeleitet wird (vgl. [Landau und Lifschitz, 1970; Ferry, 1980; Tschoegel, 1989]). Eine Erweiterung dieser klassischen Theorie auf nichtlineares Antwortverhalten wird in Kapitel 2.2 vorgestellt.

Spannungs- und Scherungstensor Der Zustand der Deformation eines viskoelastischen Körpers wird mit einem 3×3 -Tensor (u_{ij}) beschrieben (i, j sind Richtungen im kartesischen Koordinatensystem und können die Werte 1 bis 3 annehmen). Die Elemente des Tensors geben für ein infinitesimal kleines würfelförmiges Volumenelement die relativen Winkeländerungen an. Die formale Berechnung der einzelnen u_{ij} findet man z.B. bei [Tschoegel, 1989]. Für kleine Scherwinkel γ eines würfelförmigen Elements gilt dabei: $\gamma_{ij} = 2 u_{ij}$ für $i \neq j$. Die an einem Körper angreifenden Spannungen beschreibt ebenfalls ein 3×3 -Tensor, der Spannungstensor (σ_{ij}). Die Elemente dieses Tensors beschreiben die aus den verschiedenen Richtungen angreifenden Kräfte auf die Seitenflächen des würfelförmigen Volumenelements. Die Spannungskomponenten σ_{ii} senkrecht zur Seitenfläche sind die Normalenspannungen (Dehnung,

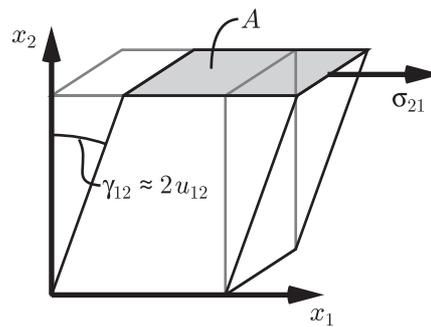


Abbildung 2.4: Scherung eines Würfels. Eingezeichnet sind die Scherspannung σ_{21} (parallel zur x_1 -Achse und zur Fläche A , die senkrecht zur x_1 -Achse liegt) und der (kleine) Scherwinkel γ_{12} .

Kompression). Die Elemente σ_{ij} mit $i \neq j$ sind Scherspannungen. Dabei zeigt die angreifende Kraft in j -Richtung und die Fläche an der sie angreift wird durch eine Flächennormale in i -Richtung definiert (vergl. Abb. 2.4).

Relaxationsmodul und Kriechkomplianz Im Folgenden werden starke Vereinfachungen des viskoelastischen Systems angenommen:

- Die angreifenden Normalenspannungen sind isotrop (z.B. der Normaldruck) und der Körper unterliegt keinen Normalenspannungsänderungen.
- Das Scherfeld hängt nur von einer Raumkoordinate ab und ist homogen, d.h. die Bedingungen für die *einfache Scherung* sind erfüllt.
- Der Betrag der Deformationsamplitude ist äußerst gering.

Man erkennt leicht, dass für mikromechanische Untersuchungen mit Sondenpartikeln keine der Bedingungen zur Gänze erfüllt ist. Trotzdem können viele Phänomene solcher Messungen befriedigend mit den Formeln beschrieben werden, die unter Annahme dieser Vereinfachungen im Folgenden hergeleitet werden. Die obigen Annahmen bedeuten dann, dass die Deformation γ und die Scherspannung σ das Superpositionsprinzip erfüllen. Damit können folgende korrespondierende eindimensionale Grundgleichungen der Viskoelastizitätstheorie angewandt werden (Boltzmann-Superpositionsintegrale):

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t G(t-t') \dot{\gamma}(t') dt' \quad (2.12)$$

und

$$\gamma(t) = \int_{-\infty}^t J(t-t') \dot{\sigma}(t') dt' \quad (2.13)$$

mit den charakteristischen Materialfunktionen $G(t)$ (Relaxationsmodul) und $J(t)$ (Kriechkomplianz). Den Gleichungen (2.12) und (2.13) liegt die Idee zugrunde, dass Spannungen oder Deformationen, die nacheinander auftreten, Veränderungen der korrespondierenden Größe im Körper erzeugen, die sich addieren. Der Relaxationsmodul und die Kriechkomplianz stellen somit eine Art viskoelastische Erinnerungsfunktion des Körpers dar.

Der Relaxationsmodul hat dabei folgende einfache Bedeutung: Nach einer instantanen Scherung des Körpers um $\gamma = \text{const}$ relaxiert die Scherspannung im Körper gemäß:

$$\sigma(t) = \gamma G(t) \quad (2.14)$$

Handelt es sich um einen rein elastischen Körper wird das Relaxationsmodul zeitunabhängig ($G(t) = \text{const}$) und Gleichung (2.14) vereinfacht sich zum Hookschen Gesetz $\sigma = \gamma G$. Für einen rein viskosen Körper gilt, dass jegliche Spannung instantan relaxiert $G(t) = \eta \delta(t)$. Damit folgt aus Gleichung (2.14) das Newtonsche Gesetz für viskose Flüssigkeiten $\sigma(t) = \eta \dot{\gamma}(t)$.

Die Kriechkomplianz dagegen beschreibt, wie sich ein viskoelastischer Körper mit der Zeit schert, nachdem er einer instantanen Spannung $\sigma = \text{const}$ unterworfen wurde:

$$\gamma(t) = \sigma J(t) \quad (2.15)$$

Sie ist ein Maß für die Zeitverzögerung mit der die Deformation nach einem Kraftpuls einsetzt.

Berechnung von $G(t)$ aus $J(t)$ Die beiden Größen $G(t)$ und $J(t)$ sind dabei nicht unabhängig, sondern bedingen sich nach folgendem Konvolutionsintegral:

$$\int_0^t G(t-t') J(t') dt' = t \quad (2.16)$$

Mit Hilfe des Konvolutionsintegrals ist es möglich, aus Kriechkomplianz-Messdaten das Relaxationsmodul zu berechnen. Eine Einschränkung ist hierbei, dass $J(t)$ theoretisch für alle Zeiten bekannt sein muss. Da experimentelle Daten immer nur ein gewisses Zeitfenster abdecken (typisch 10 ms bis einige Minuten), müssen Näherungsmethoden angewandt werden. In früheren Arbeiten [Tempel, 1996; Feneberg, 2003] wurde dabei meist eine rekursive Methode nach Hopkins und Hamming angewandt ([Hopkins und Hamming, 1957; Tschoegel, 1989]). Da reale Messdaten von statistischen Störungen überlagert sind (thermische Bewegung der Kugel, elektronisches Rauschen, Ungenauigkeiten der numerischen Algorithmen), muss erst eine analytische Funktion an $J(t)$ angepasst werden, da der fraktionale Algorithmus extrem empfindlich auf Rauschen reagiert. Zusätzlich ergeben sich starke Schwankungen für kurze Zeiten.

In dieser Arbeit wird erstmals für Viskoelastizitätsmessungen an Biopolymeren ein neuer Algorithmus etabliert, der die Bestimmung des Relaxationsmoduls in einer fehlerunanfälligen Ein-Schritt-Methode erlaubt [Liu, 2001a,b]. Im Prinzip kann die Methode mit jeder beliebigen analytischen Darstellung von $G(t)$ durchgeführt werden. Die Berechnungen im Rahmen dieser Arbeit wurden unter der Annahme durchgeführt, dass sich das Schermodul des Netzwerkes als endliche Exponentialserie annähern lässt:

$$G_n(t) = \sum_{k=0}^n a_k e^{-t/\tau_k} \quad (2.17)$$

Dies ist der Fall, wenn sich die viskoelastische Flüssigkeit mit einer endlichen Reihe von parallel geschalteten Maxwell-Elementen beschreiben lässt (generalisiertes Maxwell-Modell). Ein Maxwell-Element ist ein spezielles mechanisches Ersatzschaltbild, das aus einer Elastizität, die sich in Reihe mit einer Viskosität befindet, besteht. Das generalisierte Maxwell-Modell (das sog. Wiechert-Modell) beschreibt die Relaxation der Spannung bei einer angelegten Deformation (Abb. 2.5(a)). Das konjugierte Modell, das die verzögerte Deformation bei einer

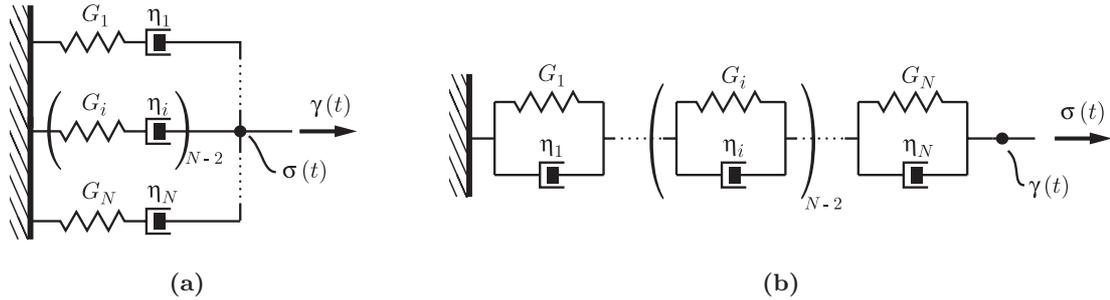


Abbildung 2.5: (a) Generalisiertes Maxwell-Modell aus N parallelen Maxwell-Elementen. Eine Maxwell-Element besteht aus einer Elastizität in Reihe mit einer Viskosität. Diese Modell beschreibt bei einer angelegten Deformation $\gamma(t)$ die Relaxation der Spannung $\sigma(t)$. (b) Generalisiertes Voigt-Modell aus N Voigt-Elementen in Serie. Ein Voigt-Element besteht aus einer Elastizität parallel zu einer Viskosität. Dieses Modell beschreibt bei einer angelegten Spannung $\sigma(t)$ die Verzögerung der Deformation $\gamma(t)$.

angelegten Spannung beschreibt, ist das generalisierte Voigt-Modell (das sog. Kelvin-Modell), das aus Voigt-Elementen in Reihe besteht. Ein Voigt-Element besteht dabei aus einer Elastizität parallel zu einer Viskosität (vergl. Abb. 2.5(b)).

Dieses einfache Ersatzschaltbildmodell ist erst ab einer gewissen Anzahl von Elementen $n \geq 3$ in der Lage, die viskoelastische Antwort eines Aktinnetzwerkes annähernd zu beschreiben. Vor allem muss mindestens ein Element derart entartet sein, dass die Elastizität dieses Elements gleich null ist, um ein viskoses Fließen für lange Zeiten zu ermöglichen. Eine Verbesserung des Ersatzschaltbildes durch Einführung eines osmotischen Elements wird in Kapitel 2.2 diskutiert.

Um aus den diskret gemessenen $J(t) = J_i(t_i)$ die Koeffizienten a_k der Gleichung (2.17) zu bestimmen, wird das Konvolutionsintegral (2.16) als Doppelsumme über die Indizes der Messzeiten und der Relaxationszeiten (i und k) genähert, wobei $G(t)$ schon durch die $G_n(t)$ aus Gleichung (2.17) ausgedrückt wird:

$$\begin{aligned} \int_0^{t_i} G_n(t_i - t'_i) J(t'_i) dt'_i &= \sum_{k=0}^n a_k \int_0^{t_i} e^{-\left(\frac{t_i - t'_i}{\tau_k}\right)} J(t'_i) dt'_i \\ &\approx \sum_{k=0}^n a_k \mathcal{I}(\tau_k, J(t_i)) \approx t_i \end{aligned} \quad (2.18)$$

$\mathcal{I}(\tau_k, J(t_i))$ stellt dabei eine trapezoidale Diskretisierung des darüber stehenden Integrals dar. Um die physikalisch sinnvollen positiven Relaxationsstärken a_k zu einem gegebenen Satz von Relaxationszeiten τ_k zu berechnen, kann man jetzt die Methode der nicht-negativen kleinsten Quadrate³ anwenden. Diese Methode findet den Vektor $\mathbf{a} = (a_0, a_1, \dots, a_n)$ derart, dass

$$E^*(\mathbf{a}) = \min_{x_k \geq 0} E^*(\mathbf{x}) \quad (2.19)$$

wobei

$$E^*(\mathbf{x}) = \sum_{i=1}^m w_i \left[\sum_{k=0}^n x_k \mathcal{I}(\tau_k, J(t_i)) - t_i \right]^2 \quad (2.20)$$

³ engl.: *nonnegative least square, NNLS*

die gewichtete Residuumsfunktion des Ausdrucks (2.18) darstellt (die w_i sind die Wichtungsfaktoren). Die meisten Elemente des Lösungsvektors sind dabei null. Eine detaillierte Beschreibung der Methode der nicht-negativen kleinsten Quadrate findet man z.B. bei [Lawson und Hanson, 1974].

Zur tatsächlichen Berechnung von $G(t)$ wurde die Minimierung nach Gl. (2.19) für diverse Sätze von Relaxationszeiten durchgeführt. Einzelne τ_k -Sätze wurden nach folgender logarithmischer Bildungsvorschrift erzeugt: $\tau_k = \tau_{\max}/a^k$. Als Qualitätsmerkmal wurde die Länge des Residuumsvektors Φ_{Res} benutzt:

$$\Phi_{\text{Res}} = \left| \sum_{k=0}^n a_k \mathcal{I}(\tau_k, J(t_i)) - t_i \right| \quad (2.21)$$

Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit als schnelles C⁺⁺-Programm, als sog. External Procedure (XOP) für die Anwendung *Igor* implementiert (vergl. Anhang B).

Umrechnung von $G(t)$ in $G(\omega)$ Um die Ergebnisse der erfolgten transienten Messungen mit denen aus oszillatorischen Messungen vergleichen zu können, muss aus der so berechneten zeitabhängigen Kriechkomplianz $G(t)$ durch Anwendung der Laplace-Transformation⁴ \mathcal{L} die komplexe Kriechkomplianz $G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$ berechnet werden:

$$G^*(\omega) = \mathcal{L}[G(t); \omega] \equiv \int_0^{\infty} G(t) e^{-i\omega t} dt \quad (2.22)$$

Hat man angenommen, dass sich die zeitabhängige Kriechkomplianz des viskoelastischen Körpers mittels einer Exponentialserie beschreiben lässt, kann das komplexe Modul durch die analytische Lösung des Integrals in Gl. (2.22) berechnet werden. Als Ergebnis erhält man die Summe der Lorentz-Linien:

$$G'(\omega) = \sum_k \frac{\omega^2 \tau_k^2}{1 + \omega^2 \tau_k^2} a_k e^{-t/\tau_k} \quad (2.23)$$

$$G''(\omega) = \sum_k \frac{\omega \tau_k}{1 + \omega^2 \tau_k^2} a_k e^{-t/\tau_k} \quad (2.24)$$

Typischerweise zeigt dabei ein Aktinnetzwerk in oszillatorischen Messungen folgende Regime:

Terminaler Bereich ($\omega < 1/\tau_D$) Es gilt: $G' \propto \omega^2$, $G'' \propto \omega$ und $G''(\omega) > G'(\omega)$ ([de Gennes, 1979; Doi und Edwards, 1989]). Bei einer Deformation haben die einzelnen Filamente genügend Zeit, durch Diffusion aus ihrer Reptationsröhre zu entkommen (Diffusionszeit dafür ist τ_D). Spannungen können auf der Zeitskala von τ_D relaxieren. Auf lange Zeiten verhält sich das Aktinnetzwerk also viskos.

Plateau-Bereich ($1/\tau_D < \omega < 1/\tau_e$) Im sog. Plateaubereich (Gummiplateau) gilt bei ausreichender Verschlaufung: $G'(\omega) > G''(\omega)$ und $G' \approx G'_N$, mit $G'_N \approx F \approx k_B T l_p^{-1/5} c_A^{7/5}$ (F Freie Energie), [Frey, 2001]. Der Verlustmodul $G''(\omega)$ nimmt ein lokales Minimum an.

⁴Eigentlich ist die Laplace-Transformation für eine komplexe Transformationsvariable und eine komplexe zu transformierende Funktion definiert. Der Gebrauch mit reeller Transformationsvariable und reeller zu transformierender Funktion ist aber ein erlaubter Spezialfall.

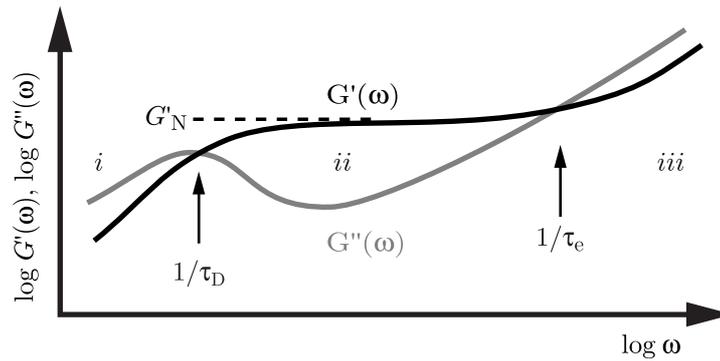


Abbildung 2.6: Theoretischer Verlauf der komplexen Relaxationsmodulen von Aktin. Gezeigt sind der Verlauf des Speichermoduls $G'(\omega)$ und des Verlustmoduls $G''(\omega)$ gegen die Anregungsfrequenz in doppelt logarithmischer Darstellung. Zu erkennen ist der terminale Bereich (*i*), das Gummiplateau (*ii*) und der Bereich interner Kettendynamik (*iii*). Weitere Erklärungen im Text.

Regime interner Kettendynamik ($\omega > 1/\tau_e$) Es gilt: $G''(\omega) > G'(\omega)$ und $G'(\omega) \propto G''(\omega) \propto \omega^{3/4}$ [Amblard et al., 1996; Gittes und MacKintosh, 1998; Morse, 1998c; Frey, 2001]. Die Dynamik der Einzelfilamente dominiert das Verhalten.

Vergleiche dazu auch Abbildung 2.6.

2.1.2 Transiente rheometrische Methoden

Sind die Voraussetzungen für die einfache Scherung gegeben, kann die komplizierte Scherdeformation, welche die Kugel im viskoelastischen Körper hervorruft, unter Berücksichtigung dieser geometrischen Faktoren als einfache Scherung behandelt werden. Es kann gezeigt werden, dass dann folgende Ersetzungen zulässig sind:

$$\begin{aligned} \gamma(t) &\rightarrow g x(t) \\ \dot{\gamma}(t) &\rightarrow g \dot{x}(t) \\ \sigma &\rightarrow F_{\text{Mag}}(t) \end{aligned} \quad (2.25)$$

Ausgangspunkt für die Bestimmung des geometrischen Faktors g ist dabei die in einem isotropen viskoelastischen Körper eingebettete Kugel. Deren auf eine Dimension reduzierte Bewegungsgleichung lautet in einem Medium der Viskosität η und der Elastizität μ unter Vernachlässigung der Trägheit:

$$g_V \eta \dot{x} + g_E \mu x = F_{\text{Mag}}(t) \quad (2.26)$$

dabei sind g_V und g_E nach Viskosität und Elastizität getrennte Vorfaktoren. Diese können zu

$$g_V \approx g_E \approx 6\pi R \quad (2.27)$$

bestimmt werden ([Ziemann, 1997]). R ist dabei der Kugelradius.

Kann die oben angegebene Näherung nicht gemacht werden, müssen detailliertere Modelle betrachtet werden (siehe nächstes Kapitel).

2.2 Osmotische Kräfte in Filament-Lösungen

Im Gegensatz zu oszillatorischen Messungen oder zu transienten Messungen mit kleinen Deformationsamplituden zeigen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten kraftbasierten

Messungen, bei denen die magnetischen Sonden über den vielfachen Kugeldurchmesser ausgelenkt werden ein Zeitverhalten der Kriechkomplianz, dass sich nicht befriedigend mit den im letzten Kapitel beschriebenen, vereinfachten Modellen darstellen lässt.

Ein neuer theoretischer Ansatz ([Uhde et al., 2003; Ter-Organessian und Boulbitch, 2004]), der auf osmotischen Kräften beruht, kann das beobachtete Zeitverhalten befriedigend erklären. Der theoretische Ansatz soll im Folgenden kurz dargestellt werden. Dazu wird im ersten Teil der allgemeine theoretische Hintergrund des osmotischen Widerstands erläutert und im zweiten Teil wird das Modell detaillierter auf verschlaufte Netzwerke semiflexibler Polymere bezogen.

2.2.1 Prinzip des osmotischen Widerstands

Dieses Kapitel soll die grundlegende Idee des osmotischen Widerstandes eines im Netzwerk bewegten Mikropartikels erklären. Ausgangspunkt ist ein mit der externen Kraft F_{ex} bewegtes Teilchen beliebiger Form, dass in einem verschlaufenen Polymernetzwerk der durchschnittlichen Maschenweite ξ bewegt wird. Die typische Dimension R des Teilchens beträgt dabei einige Maschenweiten ($R \approx \mathcal{O}(10\xi)$).

Zur Vereinfachung der Beschreibung wird das (thermisch fluktuierende) Netzwerk auf seine Knotenpunkte reduziert, da es diese sind, die die freie Bewegung des Mikropartikels behindern. Diese Knotenpunkte werden im Folgenden als Teilchen betrachtet, die mit der typischen transversalen Diffusionskonstante D_{\perp} des Polymers diffundieren können aber fast unabhängig von hydrodynamischen Flüssen um das bewegte Teilchen herum sind. Letztere Eigenschaft ergibt sich aus einer Abschätzung der Eindringtiefe l des hydrodynamischen Feldes in ein Polymernetzwerk (Herleitung siehe [Grosberg und Khokhlov, 1994], Kap. 32.3):

$$l = \sqrt{\eta/\Gamma c} = \sqrt{2\xi^2/6\pi} \approx \mathcal{O}(\xi) \quad (2.28)$$

mit der Viskosität η , dem Reibungskoeffizienten Γ in der Größenordnung von $\gamma \approx 4\pi\eta\xi$ und der Polymerkonzentration c von $c \approx 1/\xi^3$.

Die Eindringtiefe des hydrodynamischen Feldes liegt also größenordnungsmäßig bei einer Maschenweite und ist deshalb für den Filamenttransport zu vernachlässigen. Zusätzlich kann unter Zuhilfenahme des Rouse-Zimm-Modells eine genauere Abschätzung des Einflusses der Hydrodynamik durchgeführt werden, die dieses Ergebnis bestätigt ([Doi und Edwards, 1989] Kap. 4, [Grosberg und Khokhlov, 1994], Kap 31./32.). Das Rouse-Zimm-Modell beschreibt eigentlich *flexible* Polymere unter Berücksichtigung der Hydrodynamik, kann hier aber angewandt werden, da wegen des Aufkonzentrierens der Polymere vor der Kugel ein Zustand erzeugt wird, der dem in einem Knäuel aus flexiblen Polymeren analog ist.

Weiterhin wird das bewegte Teilchen ohne Beschränkung der Allgemeinheit als sphärisch angenommen.

Kurzzeitverhalten Unter den eben beschriebenen Voraussetzungen ergibt sich ein Bild wie in Abbildung 2.7(a): Ein sphärisches Teilchen des Durchmessers R ist in einem Netzwerk mit dem mittleren Knotenpunkt-Abstand ξ (Maschenweite) eingebettet. Die Netzwerk-knotenpunkte können mit der transversalen Diffusionskonstante D_{\perp} des Polymers diffundieren. Die Konzentration der Knotenpunkte beträgt c_0 . Wird die Kugel nun durch eine Kraft F um die Strecke $x(t)$ ausgelenkt, häuft sie N Knotenpunkte vor sich auf, wobei N rein geometrisch zu

$$N \sim A_{\text{Kugel}} \Delta x c_0 \sim \pi R^2 x(t) c_0 \quad (2.29)$$

genähert werden kann. Diese Knotenpunkte diffundieren nun in Bewegungsrichtung und seitwärts dazu aus dem angehäuften Bereich heraus.

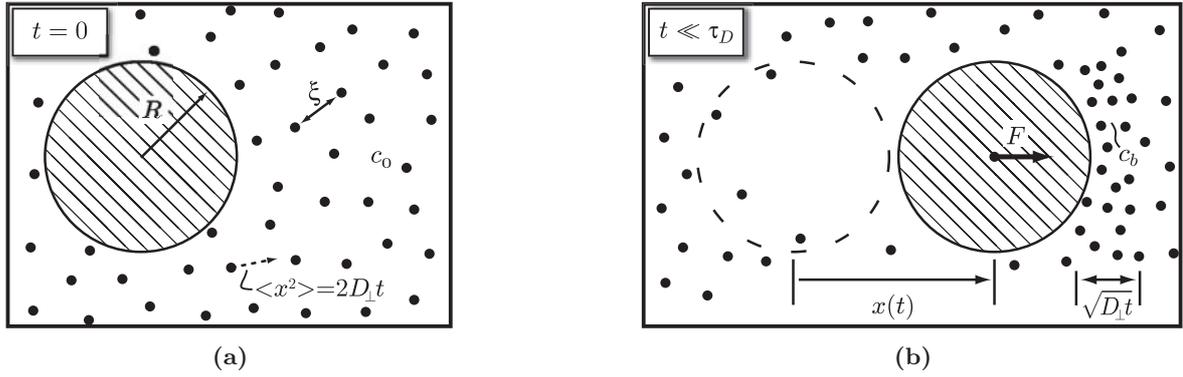


Abbildung 2.7: Osmotischer Widerstand einer bewegten Kugel in einem Polymernetzwerk. Das Netzwerk ist auf seine Knotenpunkte reduziert dargestellt. (a) Die Kugel mit dem Durchmesser R liegt in einem Netzwerk mit dem mittleren Abstand ξ (Maschenweite). Die Netzwerkknöttenpunkte können mit der transversalen Diffusionskonstante D_{\perp} des Polymers diffundieren. Die Konzentration der Knöttenpunkte beträgt c_0 . (b) Für Zeiten $t \ll \tau_D$ gilt: Wird die Kugel durch die Kraft F um eine Strecke $x(t)$ ausgelenkt, häuft sie Polymere mit der Schichtdicke $\sqrt{D_{\perp}t}$ und der Konzentration c_B vor sich auf. Der Konzentrationsunterschied zwischen c_0 und c_B erzeugt eine osmotische Widerstandskraft auf die Kugel, die zu einer wurzelförmigen Komplianz $J(t) \propto \sqrt{t}$ führt.

Ist die betrachtete Zeit t viel kleiner als die typische Diffusionszeit τ_D , die ein Knöttenpunkt benötigt, um aus dem Bewegungspfad der Kugel zu entkommen

$$\begin{aligned} t &\ll \tau_D \\ \text{mit } \tau_D &= R^2/D_{\perp} \end{aligned} \quad (2.30)$$

kann die Seitwärtsdiffusion vernachlässigt werden. Unter dieser Voraussetzung können sich die aufgehäuften Knöttenpunkte über eine Strecke $\sim \sqrt{D_{\perp}t}$ verteilen. Das Volumen V dieser Schicht beträgt $V \sim \pi R^2 \sqrt{D_{\perp}t}$. Die neue Konzentration in diesem Volumen ist

$$c_b \sim N/V \sim c_0 \sqrt{D_{\perp}t} x(t) \quad (2.31)$$

Wie in Abbildung 2.7(b) schematisch gezeigt, bleibt auf diesen kurzen Zeiten die Rückseite der Kugel frei von Polymeren, da diese zu wenig Zeit haben, um in den Pfad hinein zu diffundieren. Daraus ergibt sich auf die Vorderseite der Kugel ein osmotischer Druck $p_{\text{osm}} = c_b k_B T$ (k_B Boltzmannkonstante, T Temperatur), der zu einer osmotischen Kraft F_{osm} in der Größenordnung $F_{\text{osm}} \sim \pi R^2 p_{\text{osm}} \sim c_b k_B T \pi R^2$ auf die Kugel führt. Unter Ausnutzung von Gleichung (2.30) ergibt das

$$F_{\text{osm}} = g c_0 k_B T R x(t) \sqrt{\tau_D/t} \quad (2.32)$$

wobei g der geometrischer Faktor für den Bereich ist, in dem sich noch kein Gleichgewicht eingestellt hat. Diese Kraft stellt einen Widerstand gegenüber der Kugelbewegung dar, der von einem osmotischen Druck verursacht wird. Die auf die Kraft normierte Auslenkung $J_{t \ll \tau_D}(t) = x(t)/F(t)$ für kurze Zeiten ist dabei proportional zur Wurzel aus der Zeit:

$$\begin{aligned} J_{t \ll \tau_D}(t) &= \frac{1}{gC} \sqrt{t} \\ \text{mit } C &= c_0 k_B T R \sqrt{\tau_D} \end{aligned} \quad (2.33)$$

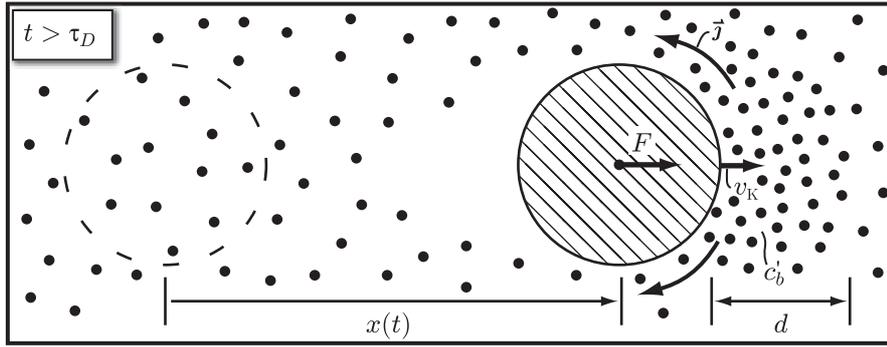


Abbildung 2.8: Osmotischer Widerstand einer bewegten Kugel für Zeiten $t > \tau_D$:

Langzeitverhalten Ist die betrachtete Zeit t größer als τ_D stellt sich ein Gleichgewicht ein, in dem sich die Kugel mit konstanter Geschwindigkeit $v_K = \dot{x}(t)$ bewegt. Während eines Zeitintervalls Δt schiebt die Kugel

$$N_+ \sim \pi R^2 \dot{x}(t) \Delta t c_0 \quad (2.34)$$

Filamentknotenpunkte zusammen. Im Gleichgewicht stellt sich dabei eine Dicke d des aufkonzentrierten Bereichs ein, die in der Größenordnung von R liegt. Der Betrag des Stromes $j = |\mathbf{j}|$ der entkommenden Knotenpunkte ist $j = -D_\perp \nabla c$. Da $c_B \gg c_0$ ist, wird der Gradient der Konzentration zu $\nabla c \sim -c'_b$ und der Betrag des Stromes zu

$$j \sim \frac{D_\perp c'_b}{R} \quad (2.35)$$

Die Anzahl der pro Zeitintervall Δt entkommenden Knotenpunkte N_- ist dann $N_- \sim 2\pi R d j \Delta t$. Mit $d \sim R$ und Gl. (2.35) wird daraus

$$N_- \sim 2\pi R D_\perp c'_b \Delta t \quad (2.36)$$

Im Gleichgewicht gilt $N_- = N_+$. Daraus folgt c'_b zu

$$c'_b \sim \frac{c_0 \dot{x}(t) \tau_D}{2D} \quad (2.37)$$

Die Rückseite der Kugel wird wieder als (fast) frei von Polymeren angenommen, zumindest gilt $c_0 \ll c'_b$. Es ergibt sich wieder auf die Vorderseite der Kugel ein osmotischer Druck $p_{\text{osm}} = c'_b k_B T$, der zu einer osmotischen Kraft F'_{osm} in der Größenordnung

$$F'_{\text{osm}} = g' c_0 k_B T R \tau_D \frac{\dot{x}(t)}{t} \quad (2.38)$$

führt, wobei g' der geometrische Faktor des Gleichgewichts-Zustandes ist. Die auf die Kraft normierte Auslenkung $J_{t>\tau_D}(t) = x(t)/F(t)$ für lange Zeiten ist dabei proportional zur Zeit:

$$J_{t>\tau_D}(t) = \frac{1}{g' C'} t \quad (2.39)$$

mit $C' = c_0 k_B T \tau_D$

In Abbildung 2.8 ist der Gleichgewichtszustand noch einmal schematisch dargestellt.

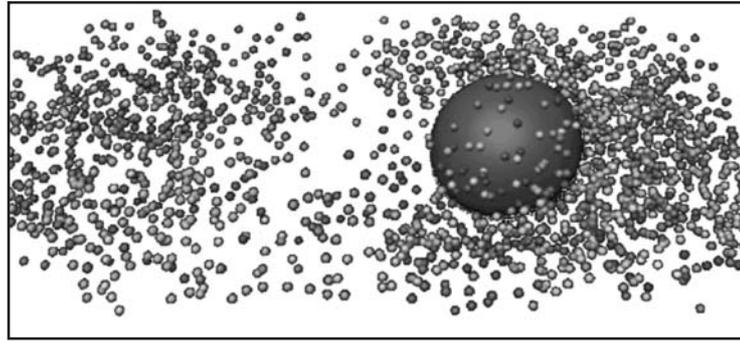


Abbildung 2.9: Simulation der Bewegung einer Kugel in einem verschlauften Polymernetzwerk. Von den Filamenten ist nur eine repräsentative Auswahl an Monomeren gezeigt. Gut zu erkennen ist der aufgehäufte Bereich vor und der verarmte Bereich hinter der Kugel. [Mit freundlicher Genehmigung von N. Ter-Orgnessian].

2.2.2 Osmotische Kräfte in verschlauften Polymernetzwerken

Die geometrischen Faktoren g und g' aus dem letzten Kapitel wurden numerisch für Netzwerke aus verschlauften Polymeren berechnet [Ter-Orgnessian und Boulbitch, 2004]. Es ergaben sich Werte von ca. $g \approx 2.8$ und $g' \approx 2$. Ein aus den Daten dieser Berechnung generiertes Bild ist in Abbildung 2.9 gezeigt.

Eine weitere Abschätzung liefert die erwartete Größenordnung für τ_D : Mit einer transversalen Diffusionskonstante von größenordnungsmäßig $k_B T / \xi_\perp l_p^{1/3}$ (vergl. Gl. (2.8)) und einem Kugelradius von typischerweise $0.5 - 2 \mu\text{m}$ ergibt sich τ_D in der Größenordnung $\mathcal{O}(10\text{s})$.

2.3 Die Magnetkugel im magnetischen Feldgradienten

Abschließend soll kurz die Kraftübertragung mittels magnetischer Sondenpartikel und die Abhängigkeit der Kraft vom angelegten Spulenstrom diskutiert werden.

Die Erzeugung einer Kraft auf einen magnetischen Dipol (mit Dipolmoment \mathbf{m}) in einem inhomogenen Magnetfeld \mathbf{B} beruht auf der Minimierung der potentiellen Energie U .

Es wird im Folgenden von einem paramagnetischen Partikel ausgegangen, bei dem das äußere Feld \mathbf{B} folgendes Dipolmoment induziert:

$$\mathbf{m} = (\mathbf{B}_m - \mathbf{B}) = \chi \mathbf{B} \quad (2.40)$$

Dabei ist χ die magnetische Suszeptibilität (eine Materialkonstante), \mathbf{B}_m und \mathbf{B} bezeichnen das magnetischen Feld mit und ohne Sondenpartikel.

Ein magnetischer Dipol besitzt in einem Feld die potentielle Energie

$$U = \mathbf{m} \cdot \mathbf{B} \quad (2.41)$$

Die Kraft, die auf den Dipol im magnetischen Feld wirkt, lautet dann

$$\mathbf{F} = -\nabla(\mathbf{m} \cdot \mathbf{B}) \quad (2.42)$$

Diese Beziehung ist allgemein gültig, unabhängig davon, ob das Magnetfeld homogen oder inhomogen ist. In einem räumlich und zeitlich konstanten Magnetfeld ist das induzierte Dipolmoment ebenfalls konstant. Der Nablaoperator wirkt also auf eine Konstante und ergibt null: Im homogenen Magnetfeld wirkt keine Kraft auf einen paramagnetischen Partikel.

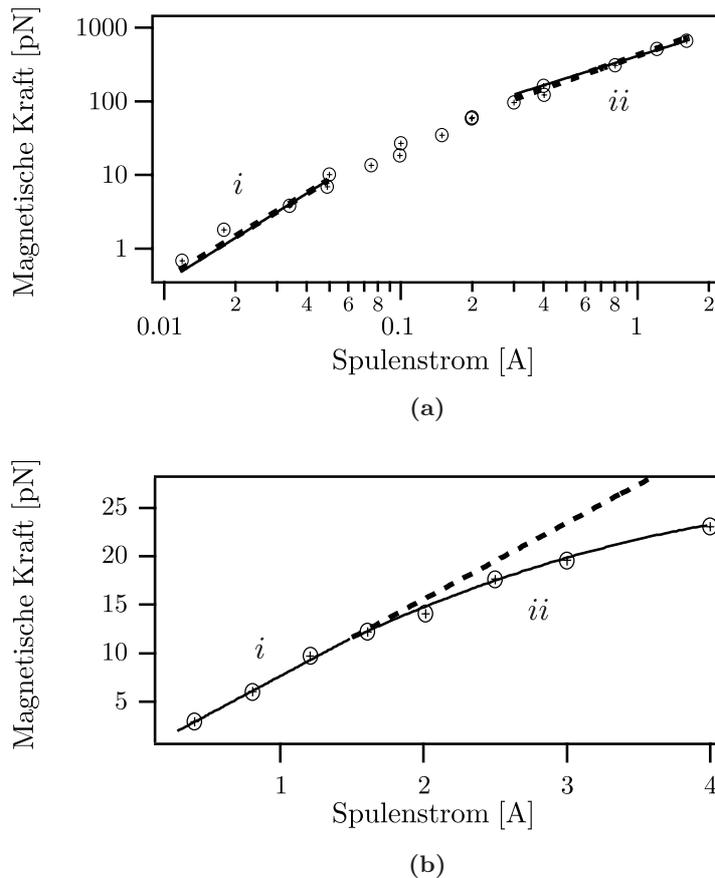


Abbildung 2.10: Strom-Kraft Abhängigkeiten. (a) Abhängigkeit der magnetischen Kraft auf paramagnetische Sondenpartikel vom Spulenstrom in doppelt logarithmischer Auftragung. Unterhalb der Sättigungsmagnetisierung besteht eine quadratische Abhängigkeit (*i*). Oberhalb der Sättigungsmagnetisierung besteht eine lineare Abhängigkeit (*ii*). Gezeigt sind die theoretischen Voraussagen (durchgezogene Linien, Steigung $m = 2$ und $m = 1$), Messdaten der $4.5 \mu\text{m}$ Dynalkugeln bei $200 \mu\text{m}$ Abstand zum Spulenkern (Symbole) und der beste Fit der Messdaten (gestrichelte Linien). In der Mitte liegt der Übergangsbereich zwischen diesen beiden Regimen. (b) Sättigung des Weicheisenkerns. Bis ca. 1.5 T steigt die Kraft linear mit dem Spulenstrom (*i*). Bei stärkeren Strömen sättigt der Kern zunehmend und die Strom-Kraft-Kurve verliert ihre Linearität (*ii*). Gezeigt sind Messdaten der $2.8 \mu\text{m}$ Dynalkugeln bei $600 \mu\text{m}$ Abstand zum Spulenkern (Symbole) und der beste Fit der Messdaten (linearer Fit, bzw. kubischer Fit).

Wegen Gleichung 2.40 ist \mathbf{m} parallel zu \mathbf{B} , deshalb gilt: $\mathbf{m} \cdot \mathbf{B} = m \cdot B$. Der Nablaoperator wirkt also auf ein Skalar, die Kraft ist deshalb unabhängig von der Richtung des magnetischen Feldes, sie hängt nur vom *Feldgradienten* ab.

Im Fall des „High Force“- und des „Low Force“-Aufbaus der Magnetischen Pinzetten verlaufen Kraft und Feldlinien parallel. Beispiele, in denen die erzeugte Kraft gerade senkrecht auf den Feldlinien steht, sind jedoch auch bekannt (z.B. [Gönnenwein, 2003]).

Die Kombination der Gleichungen 2.40 und 2.41 ergibt eine quadratische Abhängigkeit der Kraft von der magnetischen Feldstärke. Wird das magnetische Feld durch eine stromdurchflossene Spule (mit Spulenstrom $I_{\text{Sp.}}$) erzeugt, hängt die Kraft quadratisch vom fließenden Strom ab, da Strom und Feld proportional sind:

$$F = -\nabla(\chi B^2) \propto I_{\text{Sp.}}^2. \quad (2.43)$$

Diese quadratische Abhängigkeit wird für kleine Ströme beobachtet (vergl. Kap. 3).

Die verwendeten (super-)paramagnetischen Kugeln erreichen jedoch schon bei relativ geringen Spulenströmen ($\sim 100\text{--}250\text{ mA}$) ihre Sättigungsmagnetisierung m_{\max} ([Feneberg, 2003]). Die Kraft auf die Kugeln hängt dann nur noch linear vom angelegten Feld und somit vom Spulenstrom ab:

$$F = -\nabla(m_{\max} \cdot B) \propto I_{\text{Sp}}. \quad (2.44)$$

Diese beiden Abhängigkeiten sind in Abbildung 2.10(a) noch einmal im Vergleich mit realen Daten dargestellt.

Für größere Spulenströme kann die Feldstärke im Weicheisenkern die Sättigungsmagnetisierung (ca. $1.5 - 2\text{ T}$) erreichen. Diese Sättigung macht sich bei dem verwendeten Weicheisenkern ab einer Stromstärke von ca. 1.5 A bemerkbar. Ab diesem Wert steigt die Kraft zwar immer noch mit der Stromstärke, aber deutlich langsamer als im linearen Bereich (vergl. Abb. 2.10(b)).

Experimenteller Teil

Kapitel 3

Neue Methode der Krafteichung

3.0.1 Durchführung

Da die Kraft auf die magnetischen Sondenpartikel bei den Magnetischen Pinzetten stark vom Abstand zum Spulenkern abhängt, ist eine Krafteichung selbst für qualitative Experimente unerlässlich.

Die Krafteichung der Magnetischen Pinzetten für eine spezielle Kugelsorte wird für jede neue Spule bzw. Spulenkerngeometrie folgendermaßen durchgeführt [[Ziemann, 1997](#)]:

1. Die Kugeln mit dem Radius R werden in einer rein viskosen Lösung, z.B. einem Glycerin/Wasser-Gemisch der Viskosität η suspensiert. Zusätzlich wird ein schweres Salz, z.B. Cäsiumchlorid, zur Lösung hinzugegeben, um die Dichte der Lösung zu erhöhen. So erreicht man annähernd eine Anpassung der Dichte von Kugeln und Lösung. Die Kugeln sinken jetzt unter dem Einfluss der Gravitation kaum noch ab.
2. Die viskose Kugellösung wird in den temperierten Probenhalter gefüllt. Dann werden die Trajektorien von einigen Kugeln unter dem Einfluss verschieden starker Spulenströme (entsprechend verschieden starker Magnetkräfte) aufgenommen. Ist die Spulenkernkante mit einer Schicht aus Kugeln belegt, muss die Kalibrationsprobe ersetzt werden.
3. Die Viskosität der Kalibrationsflüssigkeit wird mit Hilfe von Kugelfallviskosimetrie im Vergleich zu Wasser bestimmt.
4. Die Kugelpositionen werden durch digitale Partikelverfolgung bestimmt. Die Geschwindigkeit v zu jeder Kugelposition x wird durch Anpassen einer analytischen Funktion an die Daten und anschließendem Differenzieren dieser Funktion bestimmt. Dann wird mit Hilfe des Stoke'schen Gesetzes ($F = 6\pi\eta Rv$) die tatsächliche Kraft $F(x)$ bestimmt, die zu einer fixen Entfernung x zum Magnetkernende bei einer bestimmten Spulenstromstärke gehört.

3.0.2 Ergebnisse und Diskussion

Die größte Ungenauigkeit bei dieser Art der Kalibrierung ist die unterschiedliche Größe der Kugeln und ihr unterschiedlicher Gehalt an magnetischem Material. Für die $4.5\mu\text{m}$ Kugeln, welche die am genauesten charakterisierten Kugeln sind, die in dieser Arbeit verwendet wurden, liefert der Hersteller eine Ungenauigkeit des Kugelradius $u_{\text{rel}}(R) = \Delta R/R = 3\%$. Die Ungenauigkeit des Eisengehalts $u_{\text{rel}}(m)$ dieser Kugeln wurde mittels Elektronen-Verlustspektroskopie (EELS) zu $u_{\text{rel}}(m) = \Delta m/m = 10 \text{ Gew}\%$ bestimmt [[Door et al., 1991](#)].

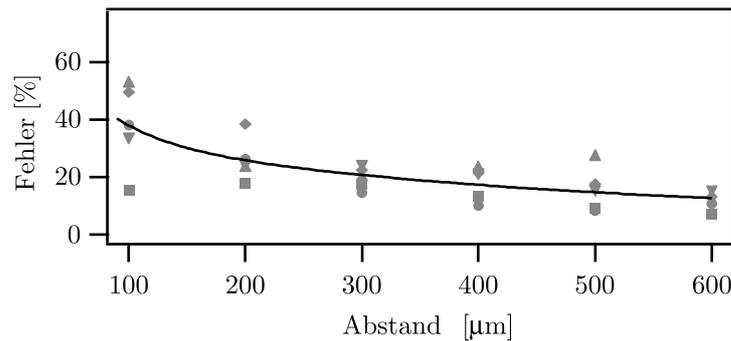


Abbildung 3.1: Abstandsabhängigkeit des prozentualen Fehlers der Kräfteichung. Die grauen Symbole sind Ungenauigkeiten bei verschiedenen Stromstärken. Die durchgezogene Linie ist der mittlere prozentuale Fehler bei diesem Abstand (mit angepasster doppel-exponentieller Funktion).

Die absolute Unsicherheit der Kräfteichung $u_{\text{rel}}(F)$ ergibt sich mittels Gaußscher Fehlerfortpflanzung aus den beiden oben genannten Ungenauigkeiten, wobei der Radius in der dritten Potenz eingeht. Das liegt daran, dass der Gehalt des magnetischen Materials vom Volumen der Kugeln abhängt:

$$u_{\text{rel}}(F) = \sqrt{3^2 \left(\frac{\Delta R}{R}\right)^2 + \left(\frac{\Delta m}{m}\right)^2} \quad (3.1)$$

Für die oben angegebenen Kugel beträgt diese Unsicherheit etwa 15-20 %.

Eigene Messungen ergaben, dass die Ungenauigkeit der Kraftmessung zusätzlich stark von der Entfernung zum Magnetspulen Kern abhängt. Das ist nachvollziehbar, da das Magnetfeld im Nahbereich der Kernspitze aufgrund feinsten Unebenheiten stark inhomogen wird. Für Entfernungen zur Magnetkernspitze, die größer als etwa $500 \mu\text{m}$ sind, liegt die gemessene Ungenauigkeit für die $4.5 \mu\text{m}$ Kugeln trotzdem unter 15 %. Diese Kugeln streuen also in Größe und Magnetitgehalt weniger, als vom Hersteller angegeben. Für Entfernungen größer als etwa $300 \mu\text{m}$ bleibt die Ungenauigkeit unter den erwarteten 20 %, während sie für kürzere Entfernungen aufgrund des oben beschriebenen Einflusses der Feldinhomogenität sogar darüber steigen kann (vergl. hierzu Abb. 3.1). Für kleinere Kugeln gilt Analoges, allerdings kann der absolute Fehler noch größer werden.

Bei der Berechnung der Eichfunktion wurden bisher jeweils alle Kraft-Abstands kurven einer Stromstärke überlagert und daran eine geeignete Funktion (i.a. einem doppel-exponentiellen Abfall) angepasst. Für jede gemessene Stromstärke existiert danach eine analytische Funktion, die allerdings jeweils mit dem oben beschriebenen Fehler behaftet ist. Nicht gemessene Stromzwischenwerte wurden bisher einfach durch eine lineare Interpolation zwischen diesen Kurven berechnet. Daten aus erneuten Eichmessungen konnten nur unbefriedigend mit alten Messungen kombiniert werden.

Wie an Abbildung 3.1 zu erkennen ist, kann der Fehler für eine einzelne Stromstärke, je nachdem wie viele Kugeln beobachtet und ausgewertet werden konnten, besser oder schlechter ausfallen. Dies führt dazu, dass bei der Verwendung der herkömmlichen Eichmethode die Interpolation der nicht gemessenen Stromzwischenwerte stark fehlerbehaftet war. Die so erhaltenen Abhängigkeiten waren insbesondere nicht glatt¹ (vergl. Abb. 3.2). Dies ist phy-

¹im Sinne einer numerischen Definition von stetiger Differenzierbarkeit an der Stelle x_0 für eine Abschnittsweise definierte Funktion der Art $F(x) = f(x), x \in [\dots, x_0] \wedge \tilde{f}(x), x \in [x_0, \dots]: f'(x_0) - \tilde{f}'(x \searrow x_0) < \varepsilon, \varepsilon \ll f'(x_0)$

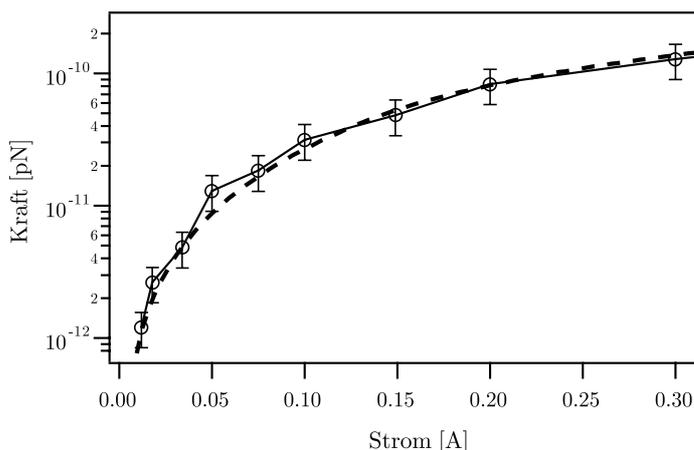


Abbildung 3.2: Vergleich der Interpolation der Eichkurven nach der herkömmlichen Methode (durchgezogene Linie) und der neuen Methode (gestrichelte Linie). Die Symbole kennzeichnen die Messdaten.

sikalisch nicht sinnvoll und erschwert die Interpretation der mit dieser Methode gemessenen Daten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Eichmethode entwickelt, die auf einem Zweidimensionalen Fit der Daten unter gewissen Nebenbedingungen beruht. Diese Methode liefert erstens einen stetigen und glatten Kraft-Strom-Abstandsabhängigkeit und zweitens wird durch den Fit eine Reduzierung des Gesamtfehlers gegenüber der Interpolation erreicht.

Dabei geht folgende Theorie über den Verlauf der Kraft-Strom-Abhängigkeit explizit in den Ansatz der anzupassenden Funktion ein:

- Für kleine Ströme steigt die Kraft quadratisch mit dem Strom,
- für mittlere Ströme steigt die Kraft linear mit dem Strom und
- für große Ströme steigt die Kraft weniger als linear mit dem Strom.

Zum theoretischen Hintergrund dieser Abhängigkeiten siehe Kap. 2.3.

Die benutzten Funktionen der Anpassung werden abschnittsweise für den Strom definiert, um die obigen Anforderungen zu erfüllen. Um zu erreichen, dass die gesamte dreidimensionale Funktion stetig ist, wurde die Identität der Funktionen an den Abschnittsgrenzen erzwungen. Damit die Funktion in gewissen Bereichen glatt ist, wurde zusätzlich die Identität der ersten Ableitung an den Abschnittsgrenzen für diese Bereiche erzwungen. Die genauen Positionen der Abschnittsgrenzen wurden in einem eigens programmierten Verfahren ermittelt. Dazu wurde die (eben beschriebene, zusammengesetzte Funktion) an die gesamte Datenmenge mit einer fixen Abschnittsgrenze angepasst und die Summe der Abstandsquadrate $\chi^2 = \sum (\mathbf{x}_{i,\text{Fit}} - \mathbf{x}_i)^2$ berechnet. Durch Verschieben der Abschnittsgrenze, erneutem Anpassen und Berechnen von χ^2 erhält man eine Abhängigkeit von χ^2 von der Position der Abschnittsgrenze. Diese Funktion hat ein globales Minimum bei der besten Abschnittsgrenzenposition, die so bestimmt werden kann. Für den in dieser Arbeit benutzten Aufbau und für die $4.5\mu\text{m}$ Kugeln wurde der Übergang zwischen dem quadratischen und dem linearem Regimes beispielsweise zu 130 mA bestimmt.

Details zu dieser Methode, wie z.B. die genauen angepassten Funktionen, können im Anhang gefunden werden. In Abbildung 3.3 ist beispielhaft eine Überlagerung der gemessenen

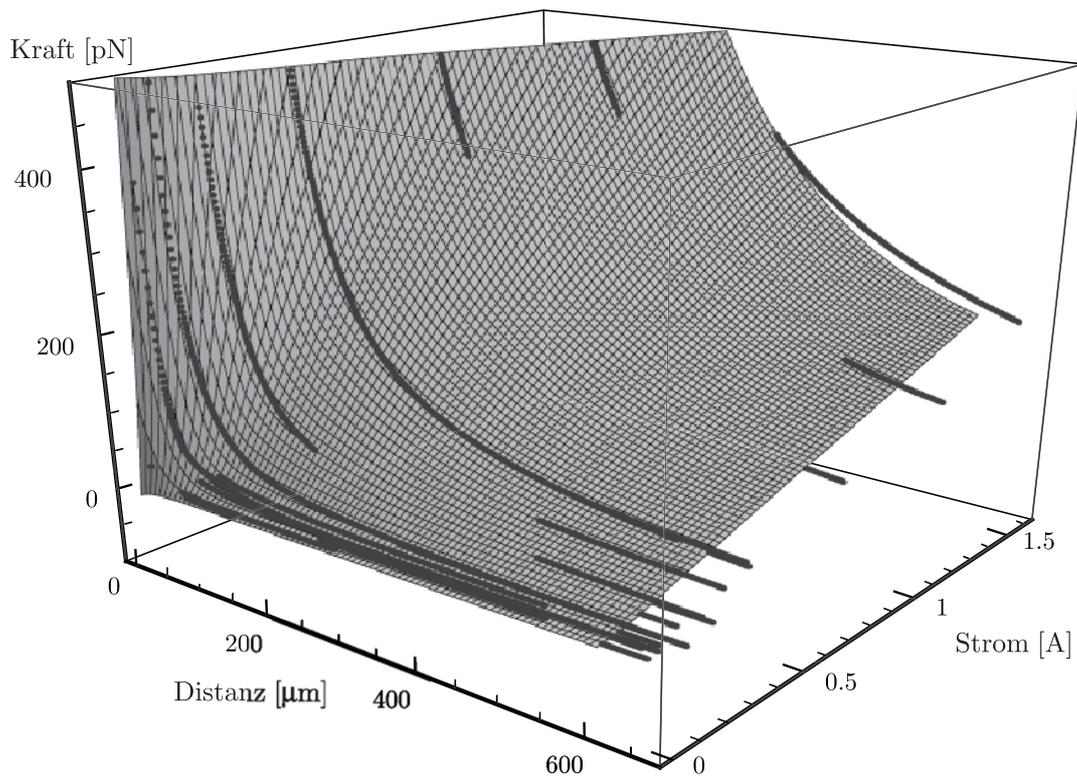


Abbildung 3.3: Vergleich der Messdaten (schwarze Symbole) mit der angepassten neuartigen dreidimensionalen Funktion (graue Fläche) für die $4.5 \mu\text{m}$ Kugeln. Die analytische Funktion repräsentiert die Daten im gemessenen Bereich sehr gut, sie ist zudem sowohl in x als auch in I -Richtung stetig und monoton steigend. Die erste Ableitung ist ebenfalls stetig und monoton steigend. Damit beschreibt die Funktion die physikalische Realität sehr gut.

Eichdaten für die $4.5 \mu\text{m}$ Kugeln mit der angepassten analytischen Funktion gezeigt. Gut zu erkennen ist, dass die zweidimensionale Anpassung die Fehler der Einzelmessungen ausgleicht, da alle Daten mit in die Anpassung eingehen und die Funktion so gewählt wurde, dass auch die erste Ableitungen stetig und monoton steigend sind. Damit wird eine Welligkeit der Interpolation, wie sie bei der herkömmlichen Methode auftritt, verhindert. Der Fehler für eine Kraft sinkt vom maximalen Fehler der Einzelmessungen (vergl. Abb. 3.1) bei der herkömmlichen Methode auf ein wesentlich geringeres Maß ab.

Der Graph zeigt zusätzlich den Kraftbereich, der sich mit dem verwendeten Aufbau für die $4.5 \mu\text{m}$ Kugeln realisieren lässt. Auch für Abstände, die z.B. größer als $300 \mu\text{m}$ sind, lassen sich mit diesen Kugeln noch Kräfte im Bereich von einigen hundert Piconewton realisieren.

Kapitel 4

Aktiver Filamenttransport in versteifenden Aktin–HMM–Netzwerken

Das folgende Kapitel stellt eine detaillierte Version von [Uhde et al., 2003] dar. Zusätzlich werden weitere, unveröffentlichte Ergebnisse vorgestellt.

Wie bereits erwähnt (Kap. 1.2.2, S. 10) liegt das Myosin II Subfragment HMM in dimerer Form vor und ist aufgrund der fehlenden Schwanz-Domäne nicht in der Lage, sich wie z.B. komplettes Myosin II zu Bündeln zusammen zu lagern. In einem verschlauften Aktinnetzwerk mit HMM-Motoren sollte deshalb aufgrund des kleinen „duty ratio“ des Myosin II HMMs kein gerichteter Transport von Aktinfilamenten möglich sein, da die Wahrscheinlichkeit, dass ein HMM-Molekül im Moment des Kraftschlages gerade zwei Aktinstränge verbindet, mit dem Quadrat des „duty ratio“ abnimmt. Das Motorprotein HMM kann aber aufgrund seiner viel kleineren Masse nur gerichtete Kräfte auf Aktinfilamente ausüben, wenn es zwei dieser Filamente verbindet und sie mit Hilfe des Kraftschlages relativ zueinander verschiebt.

Wenn in einem Aktin/HMM-Netzwerk die ATP-Konzentration aufgrund der ATPase-Funktion des Motors stark abnimmt, wird das Ablösen des Motors vom Filament verzögert. Dieses Phänomen verändert das „duty ratio“. Letztlich geht der Motor nach Verbrauch sämtlichen ATPs in den Rigor Zustand über und vernetzt das Aktinnetzwerk permanent. Es erfolgt also ein durch ATP-Verbrauch induzierter Sol-Gel-Übergang.

Im Folgenden werden das Verhalten von Einzelfilamenten und die Netzwerkeigenschaften eines solchen, ATP-verarmenden Aktin/HMM-Netzwerkes vorgestellt. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf dem neu entdeckten Phänomen des gerichteten Filamenttransportes in der zeitlichen Nähe des Sol-Gel-Übergangs. Dieses Phänomen wird mit einem neuen, nicht-trivialen mikroskopischen Modell, dem Reißverschluss-Modell erklärt.

4.1 Probenpräparation

4.1.1 Aktinnetzwerk mit fluoreszenzmarkierten Filamenten

Für die Experimente wurde F-Aktin und HMM, wie in Kap. 1.2.4.1 bzw. 1.2.4.3 beschrieben, präpariert. Das F-Aktin wurde mit einer Konzentration von $c'_A = 5 \mu\text{M}$ präpariert und mit einer äquimolaren Menge TRITC-Phalloidin fluoreszenzmarkiert. Diese sog. Reporterfilamente wurden in geringer Konzentration in ein unmarkiertes Aktinnetzwerk in Anwesenheit von HMM einpolymerisiert. Die Aktinendkonzentration betrug $c_A = 0.4 \text{ mg/mL}$ oder

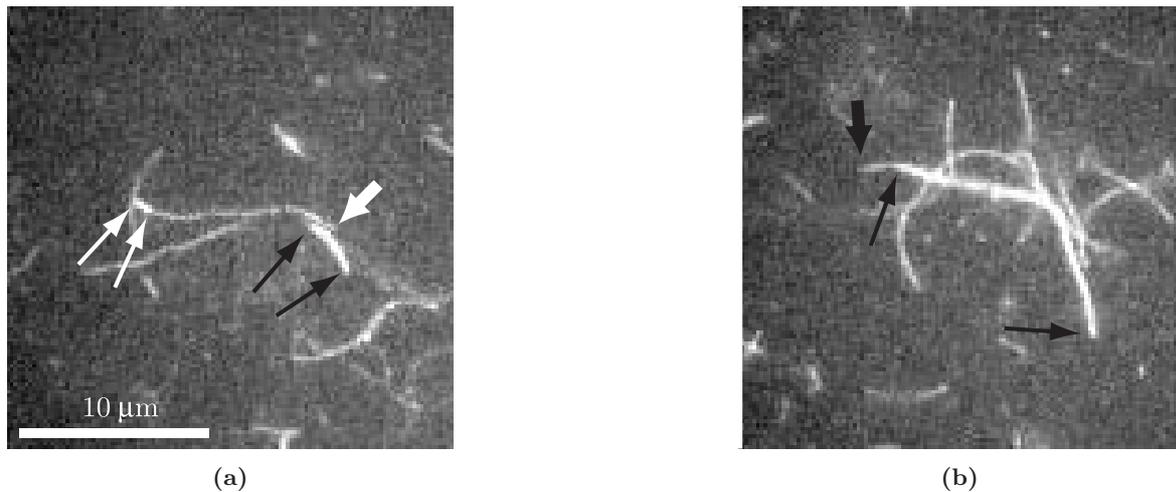


Abbildung 4.1: Kontrollexperiment zum Wachstum der Reporterfilamente. (a) und (b) zeigen zwei unterschiedliche, repräsentative Überlagerung von Fluoreszenzaufnahmen von Aktinfilamenten, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Stark fluoreszierende Reporterfilamente (Enden mit schwarzen bzw. weißen *dünnen* Pfeilen markiert) mit anschließend polymerisierten, weniger stark fluoreszierenden Abschnitten (Verlängerung durch *dicke* Pfeile markiert). Während die meisten Filamente keine oder nur geringfügige absolute Verlängerung aufwiesen, (schwarze Pfeile in (a) und (b)), zeigten einige Filamente eine beträchtliche Verlängerung (weiße Pfeile in (a)).

$c_A=0.8$ mg/mL (9.5 μM bzw. 19 μM), entsprechend einer Maschenweite von $\xi \sim 0.54$ μm bzw. 0.38 μm (nach Gl.(2.5)). Das Verhältnis von fluoreszenzmarkiertem zu unmarkiertem Aktin betrug $1:300$ – $1:1000$. Das Verhältnis von Aktin zu HMM betrug $r_{AH} = 8, 12, 25, 50$ und 175 entsprechend HMM-Konzentrationen zwischen 2.5 μM und 55 nM. Die ATP-Konzentration wurde auf verschiedene Startwerte von 150 μM bis 1 mM eingestellt.

Diese Probe wurde unter Antioxidationspufferbedingungen präpariert (Kap. 1.2.4.1) und direkt nach Polymerisationsbeginn geteilt. Ein Teil wurde zusätzlich mit 4.5 μm Latex-Kugeln (s. Tabelle 1.2.4.2) vermischt. Mit diesem Teil der Probe wurde im „Low Force“-Aufbau der Sol-Gel-Übergang der Probe vermessen. Mit dem anderen Teil der Probe wurde zeitgleich im Fluoreszenzmikroskop die Einzelfilamentdynamik untersucht. Die Messungen begannen frühestens 5 min nach Polymerisationsbeginn.

Um den Einfluss der ATPase-Rate von HMM auf den aktiven Transport der Aktinfilamente zu ermitteln, wurden die Experimente zusätzlich in einem zweiten Puffer, dem sog. Assay-Puffer (2 mM Imidazol, 25 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 0.2 mM Ascorbinsäure, 0.5 mM ATP, Millipore-Wasser, pH 7.7) durchgeführt. Die ATPase-Rate von HMM ist im Assay-Puffer um den Faktor 15 größer als im Standard-F-Puffer.

4.1.2 Kontrollproben

Kontrollproben wurden wie oben beschrieben hergestellt, jedoch wurde kein HMM zugegeben. Die ATP-Konzentration wurde in diesem Fall nur durch den Tretmühlenprozess des Aktins verringert. Die Veränderung der ATP-Konzentration durch diesen Prozess ist aber bei den verwendeten ATP-Startkonzentrationen und den gewählten Beobachtungszeiträumen vernachlässigbar. Die Proben wurden im Fluoreszenzmikroskop als Kontrollproben eingesetzt, um die gerichtete Bewegung eindeutig von thermischen Fluktuationen unterscheiden zu können.

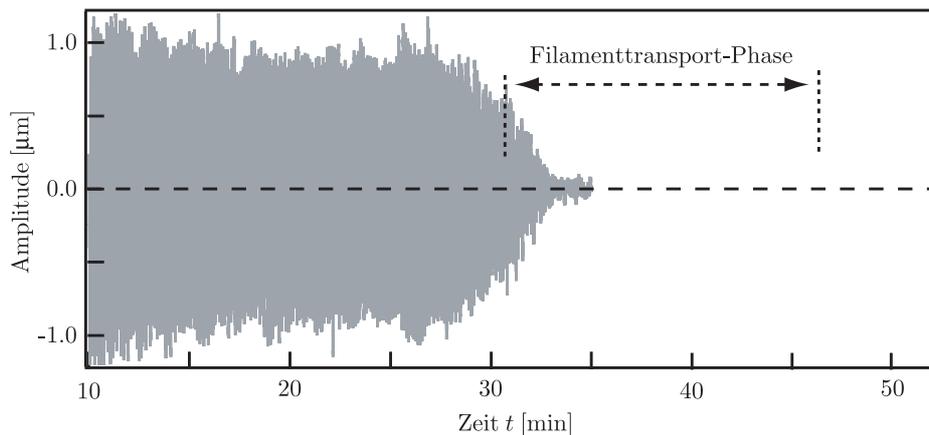


Abbildung 4.2: Amplitude der Auslenkung einer Magnetkugel bei periodischer Anregung im sich versteifenden Aktin/HMM-Netzwerk, aufgenommen mit dem sog. „Low Force“-Aufbau. Eingezeichnet ist der zeitliche Bereich, in dem das Phänomen des gerichteten Filamenttransports auftrat. Die Aktinkonzentration betrug $c_A = 19$ mM, die Kraftamplitude 2.55 pN, die Frequenz $f = 150$ mHz und das molare Verhältnis Aktin-zu-HMM $r_{AH} = 44$.

4.1.3 Doppelfärbung von Aktin

Um eine Aussage über die tatsächliche Länge der Reporterfilamente nach der zweiten Polymerisation machen zu können, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, bei dem der Zuwachs der Filamente durch eine Doppelfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht wurde. Dazu wurde eine messfertig zubereitete Probe (mit eingebetteten, rot fluoreszierenden TRITC-Phalloidin stabilisierten Reporterfilamenten) nach der Auspolymerisation der umgebenden Aktinmatrix zusätzlich mittels eines gelb fluoreszierenden FITC-markierten Phalloidins stabilisiert. Reporterfilamente, die während der zweiten Polymerisationszeit weiter wachsen, sind nach der FITC-Phalloidin Markierung doppelt gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop kann nun zwischen der ursprünglichen Kontur (rot) und der Gesamtkontur (rot + gelb) unterschieden werden. Die so erhaltenen Filamente werden wiederum in ein unmarkiertes Netzwerk einpolymerisiert, um die Konzentration an fluoreszenzgefärbten Filamenten insgesamt zu verkleinern und die Filament-Fluktuationen zu dämpfen. Aufnahmen von Filamenten, die auf dem Deckglas adhäriert waren, wurden im Computer mit unterschiedlichen Intensitäten überlagert, um quantitative Aussagen treffen zu können.

Als Ergebnis ergibt sich aus diesem Kontrollexperiment, dass über 80 % der Filamente keine oder nur eine geringe Verlängerung (unter $2 \mu\text{m}$) aufweisen, einzelne Filamente jedoch teilweise beträchtliche Verlängerungen zeigen ($15 \mu\text{m}$ oder mehr). Siehe dazu Abb. 4.1, in welcher auf der Oberfläche adsorbierte Filamente gezeigt sind.

4.2 Durchführung

4.2.1 „Low Force“-Aufbau

Die im Netzwerk eingebetteten Kugeln wurden mit Hilfe der Magnetspulen oszillierend angeregt. Die Kugelbewegung konnte mit Hilfe der Mikroskop-Optik aufgenommen und in Echtzeit nachverfolgt werden. Als Ergebnis erhält man die zeitabhängige Amplitude der Kugel (vergl. Abb. 4.2).

Mit Hilfe dieser Methode lässt sich der Zeitpunkt des Sol-Gel-Übergangs als Versteifung

des Netzwerks auf einer mikroskopischen Skala (nämlich der Skala der Kugelgröße) bestimmen. Zusätzlich erhält man einen indirekten Hinweis auf die ATP-Konzentration in der Probe. Für eine detailliertere Beschreibung dieses Versuchsteils siehe [Keller, 2003].

Die Zeitskala sowohl hier als auch im Folgenden ist die Zeit nach Polymerisationsbeginn, die sog. *Referenzzeit*.

4.2.2 Fluoreszenzmikroskop

Mit Hilfe der Methode der Fluoreszenzmikroskopie könnte ein Probenausschnitt über den Zeitraum von einigen Minuten aufgenommen werden bevor der beobachtete Bereich so stark ausgebleicht war, dass ein Wechsel zu einem anderen, noch nicht exponierten Ort erforderlich wurde. Die in Form von digitalen Filmen gespeicherten Aufnahmen der Reporterfilamente wurde anschließend im schnellen Vorlauf ausgewertet, da man bei Beobachtung in Realzeit den gerichteten Transport der Filamente optisch kaum von thermischen Fluktuationen trennen kann. Für alle Ereignisse von gerichtetem Transport wurde die Zeit nach Polymerisationsbeginn (*Referenzzeit*), die Laufzeit, die in dieser Zeit zurückgelegte Strecke sowie die sichtbare Länge extrahiert. Die dazugehörigen Fehler wurden jeweils grob abgeschätzt und mit den Messdaten in einer Datenbank gespeichert.

Da nicht von allen aktiv transportierten Filamenten der gesamte Transport beobachtet werden konnte (z.B. weil sich das Filament aus der Fokalebene bewegt hat oder weil die Probe zu stark ausgebleicht war), können die aus den oben beschriebenen Daten ermittelten mittleren Geschwindigkeiten von den tatsächlichen mittleren Geschwindigkeiten leicht abweichen.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den ersten Minuten nach dem Beginn der Experimente, zu einem Zeitpunkt in dem das Filamentnetzwerk noch nicht ausreichend ausgebildet ist, zeigten die Reporterfilamente ein ausgeprägtes diffusives Verhalten, d.h. Fluktuationen in alle Richtungen u.a. auch quer zur Filamentachse. Dies entspricht dem Verhalten freier Filamente in wässrigen Lösungen oder in stark verdünnten, unverschluften Polymerlösungen.

Nachdem die Polymerisation weit genug fortgeschritten ist, um ein Netzwerk im Sinne des Reptationsröhren-Modells (vergl. Kap. 2.1) bilden zu können, zeigten sich an den Bewegungen der Reporterfilamente zunehmend die Einschränkungen durch das Netzwerk. Die Filamente vollführen nur noch thermisch getriebene Reptationsbewegungen (Diffusion entlang der Reptationsröhre), die durch die Motoraktivität des HMM vergrößert sein könnten [Liverpool et al., 2001; Le Goff et al., 2002]. Im Gegensatz zu einem Aktinnetzwerk, das quasi-prozessive Motorkonstrukte wie Myosin-II-Minifilamente [Humphrey et al., 2002] enthält, wird hier über längeren Zeitraum keine *gerichtete* Bewegung von F-Aktin beobachtet. Soweit entspricht das beobachtete Verhalten der Filamente den Erwartungen.

In der zeitlichen Nähe des mit dem „Low Force“-Aufbau bestimmten Sol-Gel-Übergangs, dessen Zeitpunkt von der anfänglichen ATP-Konzentration, der Aktin- und HMM-Konzentration sowie dem verwendeten Puffer abhängt, kommt es zu einem unerwarteten Auftreten von aktivem, gerichtetem Transport von Reporterfilamenten (vergl. Abb. 4.3). Im Maximalfall bewegen sich bis zu 40 % der sichtbaren Filamente (vergl. Abb. 4.4). Da die Reporterfilamente nicht besonders ausgezeichnet sind, dürften sich in diesem Zustand etwa 40 % aller im Netzwerk vorhandenen Filamente bewegen.

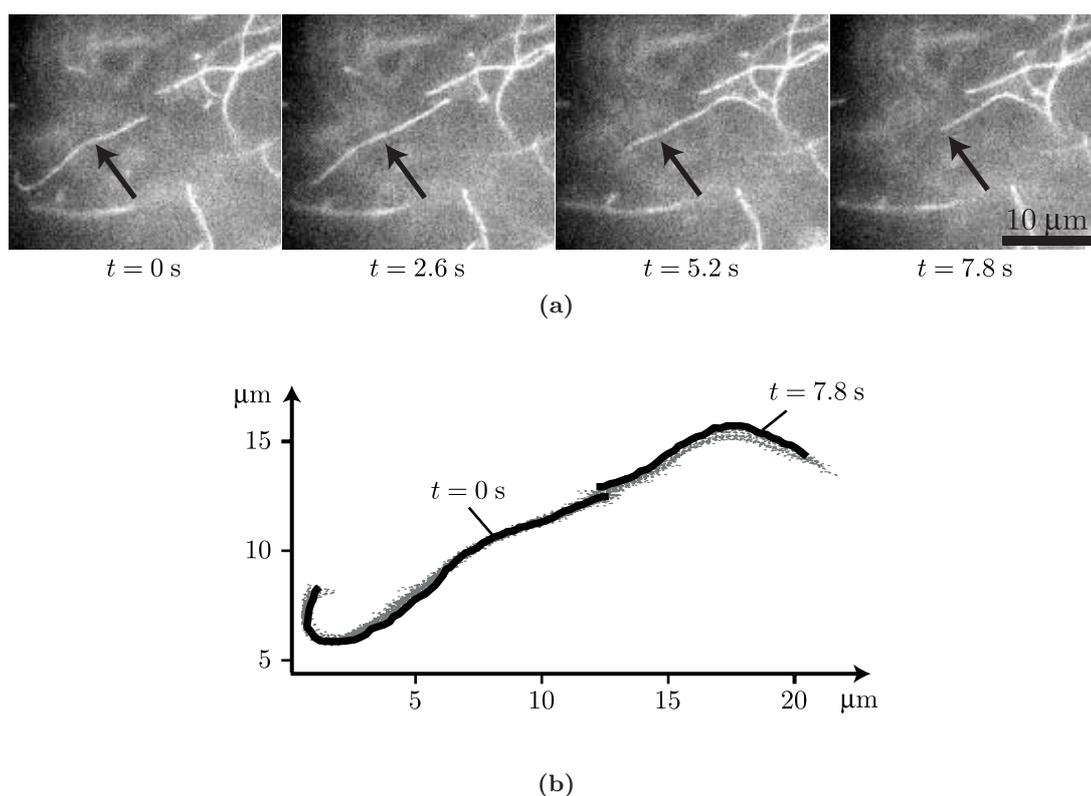


Abbildung 4.3: Trajektorie eines im ATP verarmten Aktin/HMM-Netzwerk *aktiv* transportierten Aktinfilaments. Die Aktinkonzentration betrug $c_A \approx 10 \mu\text{M}$, das molare Verhältnis Aktin-zu-HMM betrug $r_{AC} \approx 10$. (a) Sequenz von digitalen Fluoreszenzmikroskopie Bildern im Abstand von je 2.6 s aufgenommen. Das transportierte Filament ist im ersten Bild durch einen Pfeil markiert. Die scheinbare Verkürzung des Filaments beruht auf der Tatsache, dass sich das Filament aus der Fokalebene bewegt. (b) Überlagerte Darstellung der digitalisierten Konturen des Filaments während der Transportphase (driftbereinigt). Die Start und Endkontur sind markiert. Das $16.5 \mu\text{m}$ lange Filament wird in wenigen Sekunden um über $15 \mu\text{m}$ transportiert.

Anschließend an diese Phase endet jegliche Drift, welche in der Probenkammer vorhanden ist („Einfrieren“ der kollektiven Filamentbewegung). Die Trajektorien der fluoreszenzmarkierten Filamente zeigen in dieser Phase deutliche Divergenz und Rotation, das Netzwerk unterliegt also zu diesem Zeitpunkt stark anisotropen inneren Kräften (*Torsionsphase*, vergl. Abb. 4.5).

Nach einigen weiteren Minuten frieren auch die individuellen Fluktuationen der Filamente komplett ein. Die Filamente erscheinen im Rahmen der Auflösung des verwendeten Fluoreszenzmikroskops als unbeweglich. Sie zeigen in diesem Stadium scharfe Knicke (vergl. Abb. 4.6).

Durch Zugabe von ATP kann der Sol-Gel-Übergang rückgängig gemacht werden, auch kann nach einer erneuten ATP Zugabe wieder gerichteter Transport bzw. nach einiger Zeit ein erneutes Einfrieren der kollektiven Bewegung bzw. der individuellen Bewegung der Filamente beobachtet werden.

Das wichtigste Ergebnis ist das Auftreten eines gerichteten Filamenttransportes durch das eigentlich als „nicht prozessiv“ bekannte HMM. Untersucht man die Einzelfilamentdynamik genauer, indem man für jedes Bild eines Filaments die gesamte Filamentposition nachverfolgt und dann die Bewegung auf die gemittelte Kurve aller Filamentpositionen (*Masterkurve*) pro-

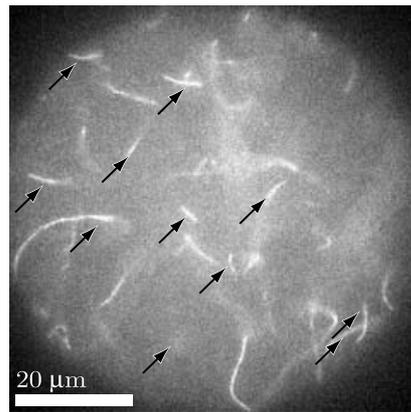


Abbildung 4.4: Typische Aufnahme eines Netzwerkes zu dem Zeitpunkt, an dem maximal viele Filamente transportiert werden. Die transportierten Filamente sind mit Pfeilen markiert (ca. 40 % aller Filamente in und in der Nähe der Fokalebene). Die Aktinkonzentration betrug $c_A \approx 20 \mu\text{M}$, das molare Verhältnis Aktin-zu-HMM betrug $r_{AC} \approx 45$.

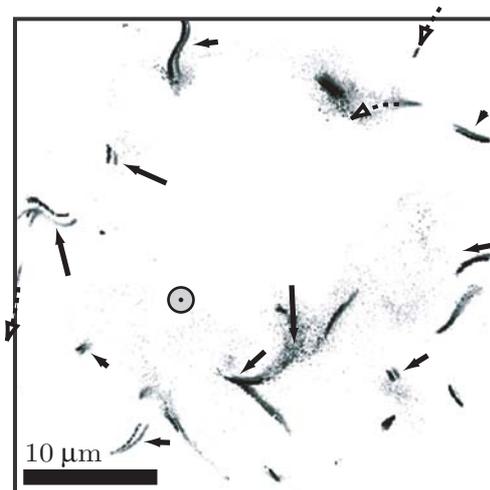


Abbildung 4.5: Interne torsionsartige Deformation des Netzwerkes in der Nähe des Sol-Gel-Übergangs. Zwei überlagerte Bilder mit einem zeitlichen Abstand von 30 Sekunden. Gezeigt sind die Positionen einiger Filamente zu Beginn der Torsionsphase (graue Konturen) und am Ende (schwarze Konturen). Die schwarzen Pfeile zeigen Richtung und fünffache Länge der Verschiebung. Gestrichelte Pfeile zeigen die Bewegungsrichtung von aktiv transportierten Reporterfilamenten. Das kreisförmige Symbol markiert den Ort minimaler Verschiebung. Zu Beachten sind besonders die unterschiedlichen Längen und Richtungen der schwarzen Pfeile.

jeziert, erkennt man, dass ein transportiertes Filament zunächst typische thermische Fluktuationen ausführt, beschleunigt, sich einige Zeit mit annähernd konstanter Geschwindigkeit bewegt und schließlich nach einer Bremsphase wieder thermisch fluktuiert (vergl. Abb. 4.8).

4.3.2 Detaillierte Darstellung der Ergebnisse - Thermische Fluktuationen

Um zu überprüfen, ob sich die anfänglichen Fluktuationen tatsächlich mit thermisch getriebenen Bewegungen vergleichen lassen, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, in welchem Proben präpariert wurden, die mit den oben beschriebenen Proben bis auf fehlendes HMM

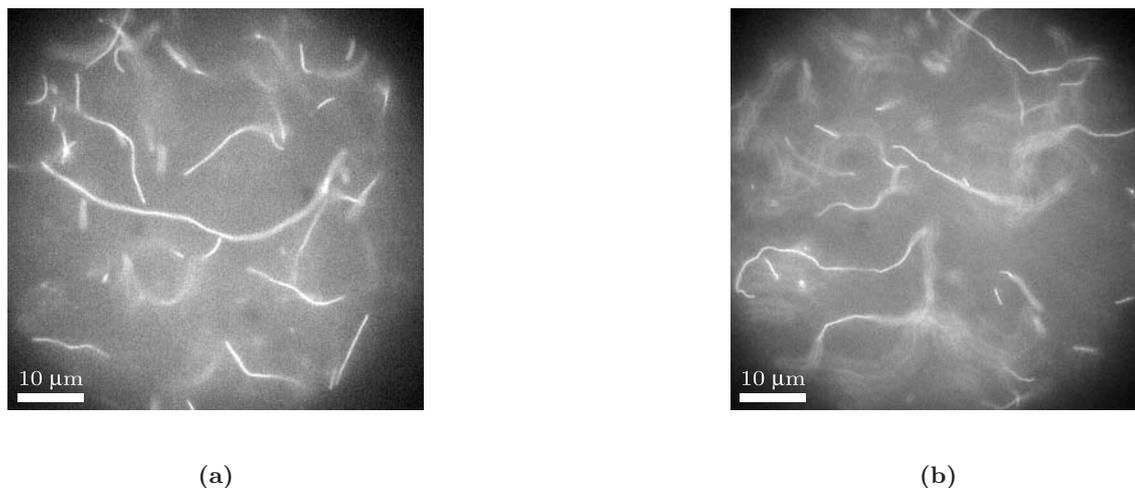


Abbildung 4.6: Einfrieren der Einzelfilamentfluktuationen. Die Aktinkonzentration betrug $c_A \approx 10 \mu\text{M}$, das molare Verhältnis Aktin-zu-HMM betrug $r_{AC} \approx 30$. (a) Mittelung aus 10 Einzelbildern im aktiven Zustand. Die Reporterfilamente erscheinen aufgrund ihrer Fluktuationen weich verschmiert. Fluktuationen senkrecht zur Fokalebene verwischen die Beugungsbilder (strukturlose Halos). (b) Mittelung aus 10 Einzelbildern im fest vernetzten Zustand. Unscharfe Filamentbereiche ergeben sich ausschließlich durch Teile der Filamente, die nicht in der Fokalebene liegen. Durch die fehlenden Fluktuationen werden die Beugungsbilder der Filamente scharf abgebildet (strukturierte Halos), erstaunlicherweise zeigen die Filamente scharfe Knicke.

identisch sind. Die thermisch getriebenen Filamente zeigten je nach Länge unterschiedlich starke Fluktuationen der Filamentenden: Kurze Filamente ($l < l_p$) fluktuierten stärker entlang ihrer Reptationsröhre, längere ($l > l_p$) weniger stark. Dieses Verhalten ist von einem semiflexiblen, in ein Netzwerk eingebetteten Polymer zu erwarten, da die thermische Energie bei kurzen Filamenten kaum transversale Moden mit größerer Amplitude anregen kann und die Anregung des translatorischen Freiheitsgrades parallel zur Filamentachse fast vollständig in eine diffusive Bewegung umgesetzt werden kann. Bei langen Filamenten wird im Gegensatz dazu ein großer Anteil der thermischen Energie transversale Moden anregen. Die Anregung des parallelen translatorischen Freiheitsgrades wird aber kaum zu einer Gesamtbewegung führen, da das Filament aufgrund seiner vielen Verschlaufungspunkte einer viel stärkeren Dissipation unterliegt. Erwartet wird auch das Ergebnis, dass sich zwei Punkte (hier die Enden) eines Filaments mit einer Länge $l < l_p$ korreliert verhalten, während zwei Punkte mit einem Abstand größer als l_p wie erwartet unkorreliertes Verhalten zeigen. (Vergleiche dazu auch die Definition der Persistenzlänge (Gl. 2.1) für *freie* Filamente.)

Projiziert man wieder die Positionen der Filamentenden zum Zeitpunkt t_i auf die gemittelte (und an den Enden extrapolierte) Kontur, erhält man Positionen s_i entlang der Reptationsröhre. Trägt man die Geschwindigkeiten $v_i = \Delta s_i / \Delta t_i$ ($\Delta s_i = s_{i+1} - s_i$, $\Delta t = t_{i+1} - t_i$) der Filamentenden als Histogramm auf, ergeben sich bei thermisch getriebenen Filamenten Gaußförmige Verteilungen um null. Die Breite der Verteilung hängt dabei hauptsächlich vom Grad der Verschlaufung ab. Für aktiv transportierte Filamente im passiven Zustand, also in der Zeit vor oder nach dem erkennbaren aktiven Transport, hat die Verteilung der Geschwindigkeiten eine identische Form wie die Verteilung der thermisch getriebenen Filamente. Für die aktive Phase (Transport) ist eine deutliche, signifikante Verschiebung der Verteilungsfunktion zu erkennen. Die Asymmetrie dieser Verteilungsfunktion kann dabei durch die Überlagerung zweier Gaußkurven erklärt werden. Eine Gaußkurve um null repräsentiert

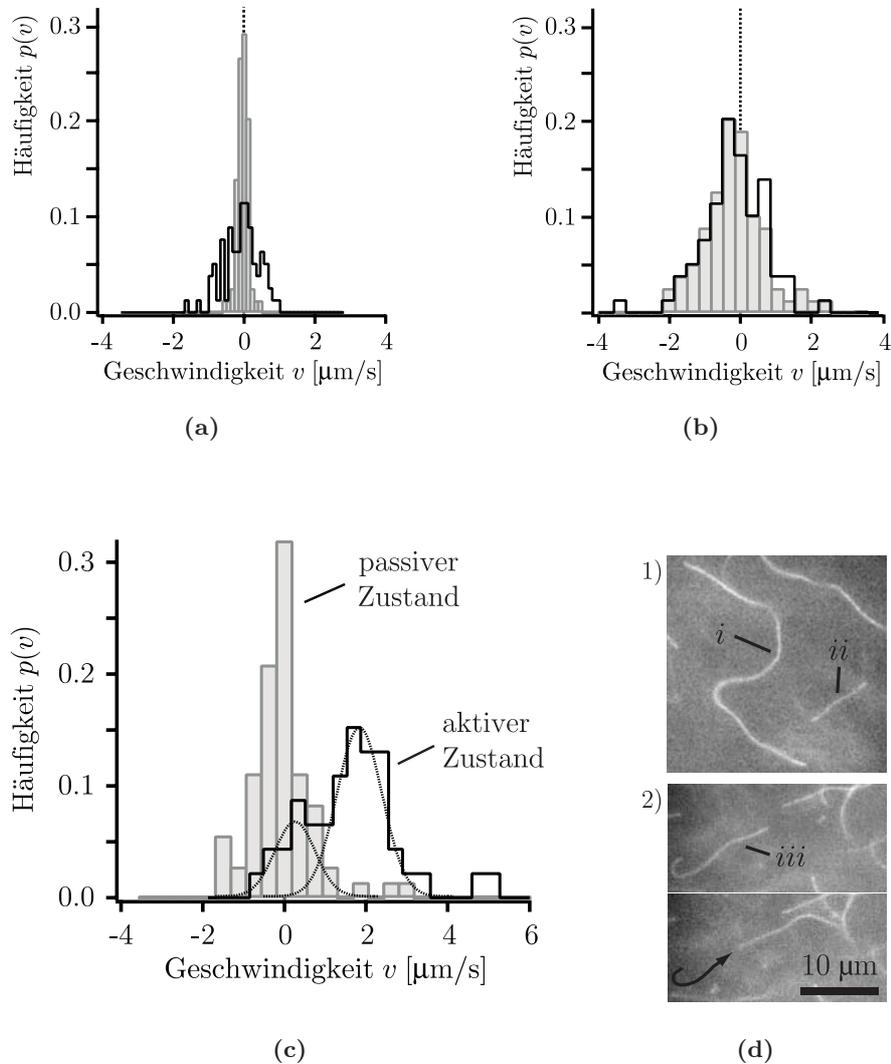


Abbildung 4.7: Histogramme der Geschwindigkeiten v_i der Filamentenden: In den oberen Histogrammen sind die Geschwindigkeiten der Filamentenden für ein langes Filament (a) und ein kurzes Filament (b) gezeigt. Man beachte den starken Einfluss der lokalen Umgebung, sichtbar an den unterschiedlichen Fluktuationsamplituden der Filamentenden für das lange Filament. (c) Für das aktive Filament lässt sich die Phase der rein thermischen Bewegung (grau hinterlegte Balken) von der Phase der aktiven Bewegung (schwarz umrandete Balken) deutlich unterscheiden. In der aktiven Phase erkennt man zwei Anteile in der Verteilungsfunktion: Eine Gaußkurve um null und eine um einen positiven Wert von etwa $2 \mu\text{m/s}$ (gestrichelte Linien = angepasste Gaußkurve). (d) 1) Thermisch getriebene Filamente, i entspricht (a), ii entspricht (b). 2) Aktiv transportiertes Filament vorher / nachher (iii), der Pfeil zeigt die Transportstrecke.

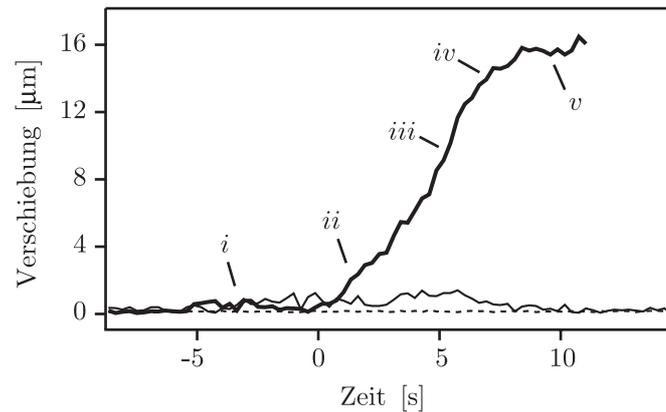


Abbildung 4.8: Verschiebung eines Filamentendes entlang der gemittelten Kontur (Reptationsröhre), aufgetragen gegen die Zeit (*dicke Linie*). Zum Vergleich sind die Verschiebungen eines kurzen (*dünne Linie*) und eines langen (*gestrichelte Linie*) thermisch getriebenen Filaments dargestellt. Das aktiv transportierte Filament zeigt eine Phase rein thermischer Fluktuationen (*i*), eine Beschleunigungsphase (*ii*), eine Phase konstanter Bewegung (*iii*), eine Bremsphase (*iv*) und wieder thermische Fluktuationen (*v*).

weiterhin thermische Fluktuationen, die zweite Kurve repräsentiert den aktiven Transport.

Die Breite der Verteilungsfunktion für ein $16\ \mu\text{m}$ langes aktives Filament in passiver Phase ist dabei größenordnungsmäßig identisch mit den Verteilungsfunktionsbreiten kürzerer (gezeigt für $9\ \mu\text{m}$) und längerer (gezeigt für $45\ \mu\text{m}$), thermisch angeregter Filamente. Die Verschlaufung hat einen deutlich größeren Einfluss auf die Geschwindigkeitsverteilung als die Filamentlänge. Repräsentative Beispiele dieses Verhaltens sind in Abbildung 4.7 wiedergegeben.

4.3.3 Detaillierte Darstellung der Ergebnisse - Aktiver Transport

In der zeitlichen Nähe zum Sol-Gel-Übergang tritt, wie bereits beschrieben, ein plötzlicher, aktiver Transport von Filamenten im dreidimensionalen Netzwerk auf. Für diese Arbeit wurden 132 einzelne Ereignisse ausgewertet. Reporterfilamente wurden dabei mit Geschwindigkeiten von über $2.6\ \mu\text{m/s}$ über Strecken von bis zu $37\ \mu\text{m}$ (Pfadlänge) transportiert. Einzelne Filamente bewegten sich kontinuierlich während eines Zeitraums von bis zu 100 s. In vielen Fällen wurden die Filamente ungefähr eine Distanz entsprechend ihrer eigenen Länge transportiert, bevor die Bewegung endete. In einigen Bereichen der Probe bewegten sich bis zu 40% aller Filamente, die sich im Fokus befanden (s.o.), in anderen bewegten sich nur ein kleiner Prozentsatz des F-Aktins.

Der beschriebene Transport von Aktinfilamenten wurde bei verschiedenen Pufferbedingungen, Aktin- und HMM-Konzentrationen und unterschiedlichen molaren Verhältnissen Aktin-zu-HMM beobachtet. Auch der Einfluss der Alterung der aufgetauten HMM-Stammlösungen wurde ermittelt. Aufgrund des Alterungseffekts von HMM werden im Folgenden nur Experimente verglichen, die mit derselben Aktinpräparation und einer vergleichbaren (frisch aufgetauten oder einen Tag auf Eis gelagerten) HMM-Stammlösung durchgeführt wurden.

Die Messwerte (Transportstrecke, -zeit, -geschwindigkeit und Filamentlänge) dieser Versuche sind nicht offensichtlich korreliert (ein Beispiel ist in Abb. 4.9 gezeigt). In der Diskussion (Kap. 4.4) wird eine Erklärung für dieses Phänomen geliefert, deshalb werden im Folgenden

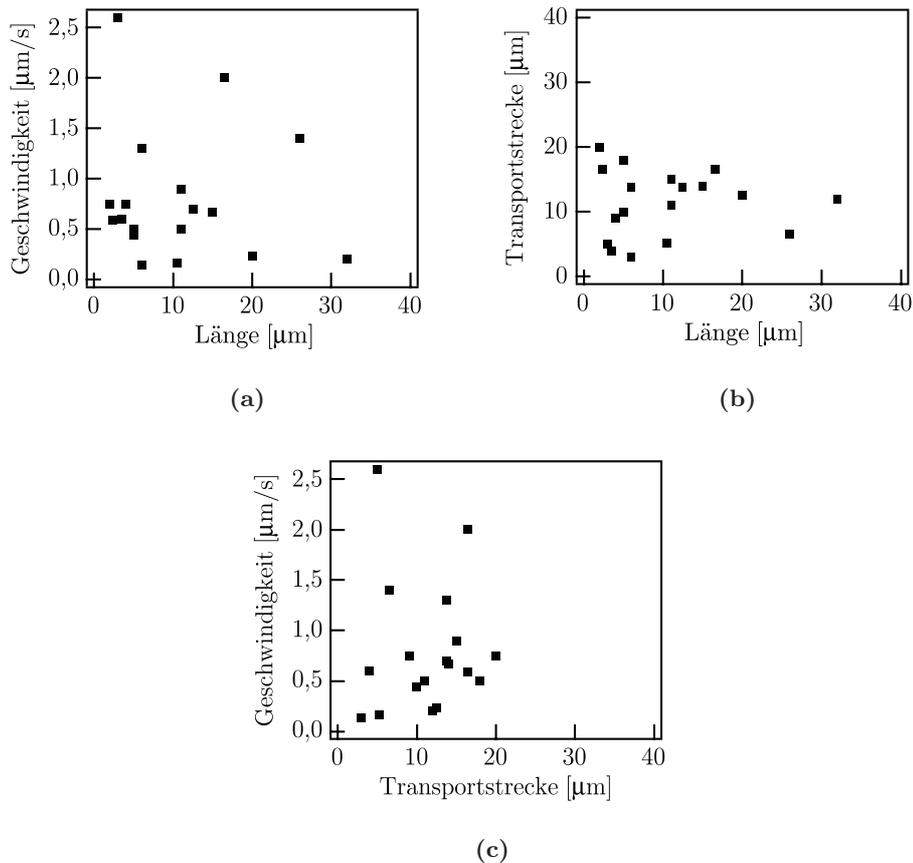


Abbildung 4.9: Relationen der verschiedenen Transportparameter einer Probe mit einer Aktinkonzentration von $9.5 \mu\text{M}$ und einem molaren Verhältnis Aktin-zu-HMM von $r_{\text{AH}} = 11 \mu\text{M}$. (a) Geschwindigkeit gegen die sichtbare Filamentlänge, (b) transportierte Strecke gegen die sichtbare Filamentlänge und (c) Geschwindigkeit gegen die transportierte Distanz. Es gibt keine eindeutige Abhängigkeit der verschiedenen beobachteten Parameter. Zu beachten ist jedoch, dass alle drei Parameter nicht exakt bestimmt werden können, da die Filamente länger sein könnten, als sie erscheinen und die transportierte Strecke (aufgrund technischer Beschränkungen) ebenfalls länger sein könnte als gemessen.

lediglich die Mittelwerte der Messwerte vorgestellt.

Einfluss der Aktinkonzentration Der Transport von Aktinfilamenten innerhalb eines Aktinnetzwerks basiert auf der Wechselwirkung von zwei oder mehr Aktinfilamenten mit dem molekularen Motor HMM. Deshalb ist der Einfluss der Aktinkonzentration auf die Transporteigenschaften für das Verständnis des Transportprozesses von Interesse.

In Abb. 4.10 werden die Messwerte zweier Aktin-HMM-Lösungen in Assay-Puffer miteinander verglichen: Eine hatte eine Aktinkonzentration von $9.5 \mu\text{M}$ (Abbn. 4.10a–c), die andere enthielt die doppelte Menge, also $19 \mu\text{M}$ (Abbn. 4.10d–e). In beiden Fällen war die HMM-Konzentration $0.38 \mu\text{M}$, entsprechend einem molaren Verhältnis Aktin-zu-HMM von $r_{\text{AH}} = 27$ bzw. $r_{\text{AH}} = 53$. Die gefüllten Symbole in a–c bezeichnen Messergebnisse vor dem ersten vollständigen ATP-Verbrauch, die offenen Symbole beziehen sich auf Messungen nach einer zusätzlichen ATP Zugabe, also nach der Wiederherstellung der ATPase-Aktivität der HMM-Moleküle. Die Verdoppelung der Aktinkonzentration hat folgenden Effekt:

1. die mittlere Transportgeschwindigkeit reduziert sich von $0.68 \mu\text{m/s}$ auf $0.42 \mu\text{m/s}$ (entsprechend einem Faktor 1.6),
2. die mittlere transportierte Strecke reduziert sich von $9.6 \mu\text{m}$ auf $3.3 \mu\text{m}$ (Faktor 2.9) und
3. die mittlere Transportzeit sinkt von 18.6 s auf 11.4 s (Faktor 1.6).

Die mittleren sichtbaren Filamentlängen beider Fälle sind vergleichbar ($6.1 \mu\text{m}$ im Falle von $9.5 \mu\text{M}$ Aktinkonzentration und $7.7 \mu\text{m}$ im Falle von $19 \mu\text{M}$).

Einfluss der HMM-Konzentration Die Transporteigenschaften der Reporterfilamente hängen zusätzlich von der HMM-Konzentration ab. In Abb. 4.11 werden zwei Aktin-HMM-Lösungen mit der gleichen Aktinkonzentration $c_A = 9.5 \mu\text{M}$ verglichen. In Abb. 4.11a–c wurde ein molares Verhältnis Aktin-zu-HMM von $r_{\text{AH}} = 9$ verwendet, in Abb. 4.11d–e betrug die HMM-Konzentration nur ein Drittel, also $r_{\text{AH}} = 27$. Die durchschnittliche sichtbare Länge der Reporterfilamente war vergleichbar ($8.4 \mu\text{m}$ bzw. $9.2 \mu\text{m}$). Die Verminderung der HMM-Konzentration um einen Faktor drei führt zu einer Reduktion der mittleren Transportgeschwindigkeit von $0.5 \mu\text{m/s}$ auf $0.31 \mu\text{m/s}$ (Faktor 1.6) und einem Anstieg sowohl der Transportstrecke von $7.1 \mu\text{m}$ auf $9.2 \mu\text{m}$ (Faktor 1.3) als auch der Transportzeit von 16.2 s auf 30.8 s (Faktor 1.9).

Einfluss der Alterung des HMM Obwohl die HMM-Stammlösung das Antioxidationsmittel DTT enthielt, leidet die Qualität des HMM während der Lagerung auf Eis. Die Verringerung der ATPase-Rate des Motorproteins und der Verlust der Fähigkeit, den Power Stroke zu vollführen, kann durch die Bildung von sog. Rigor-Köpfen erklärt werden. Dies sind denaturierte HMM-Köpfchen, die nur noch irreversibel an Aktinfilamente binden können (vergl. Kap. 1.2.1).

Um die Auswirkungen des Alterungsvorganges der Motorproteine zu ermitteln, wurden zwei ansonsten identische Proben in F-Puffer angesetzt, deren einziger Unterschied das Alter des HMM war. Einmal wurde frisch aufgetautes Protein verwendet, das andere Mal wurde dieselbe HMM-Stammlösung verwendet, nachdem sie zuvor 24 h auf Eis gelagert wurde. In beiden Fällen war die sichtbare Filamentlänge $10 \mu\text{m}$, das molare Verhältnis Aktin-zu-HMM $r_{\text{AH}} = 13$ und die Aktinkonzentration $9.5 \mu\text{M}$.

Der Einfluss der Alterung des Motorproteins HMM ist in Abb. 4.12 gezeigt. Dort werden Transportgeschwindigkeit, -strecke und -zeit miteinander verglichen. Abbn. 4.12a–c zeigen die Ergebnisse der Experimente mit frisch aufgetautem HMM, Abbn. 4.12d–e zeigen Ergebnisse von Messungen mit HMM, welches vor dem Experiment 24 Stunden auf Eis gelagert wurde. Die Alterung äußert sich in einer Reduktion der mittleren Transportgeschwindigkeit um einen Faktor 2.6 und der Transportstrecke um einen Faktor 1.7. Interessanterweise erhöhte sich die Transportzeit um einen Faktor 2.2.

In beiden Proben wurde nach dem ersten Sol-Gel-Übergang der Aktin-HMM-Lösung und dem anschließenden vollständigen ATP-Verbrauch erneut ATP zugegeben (vgl. Kap. 4.3.5). In Abb. 4.12 beziehen sich die gefüllten Symbole auf Messungen vor der ATP Zugabe und die offenen Symbole auf diejenigen danach.

Einfluss der Pufferzusammensetzung Wie im Abschnitt 4.1.1 erwähnt, hängt die ATPase-Aktivität des HMM von der Zusammensetzung des Puffers ab. In Assay-Puffer ist sie um einen Faktor 15 höher als in F-Puffer [Keller, 2003]. Aus diesem Grund wurde der Einfluss dieser zwei Puffer auf die Transporteigenschaften der Aktinfilamente untersucht. Zwei

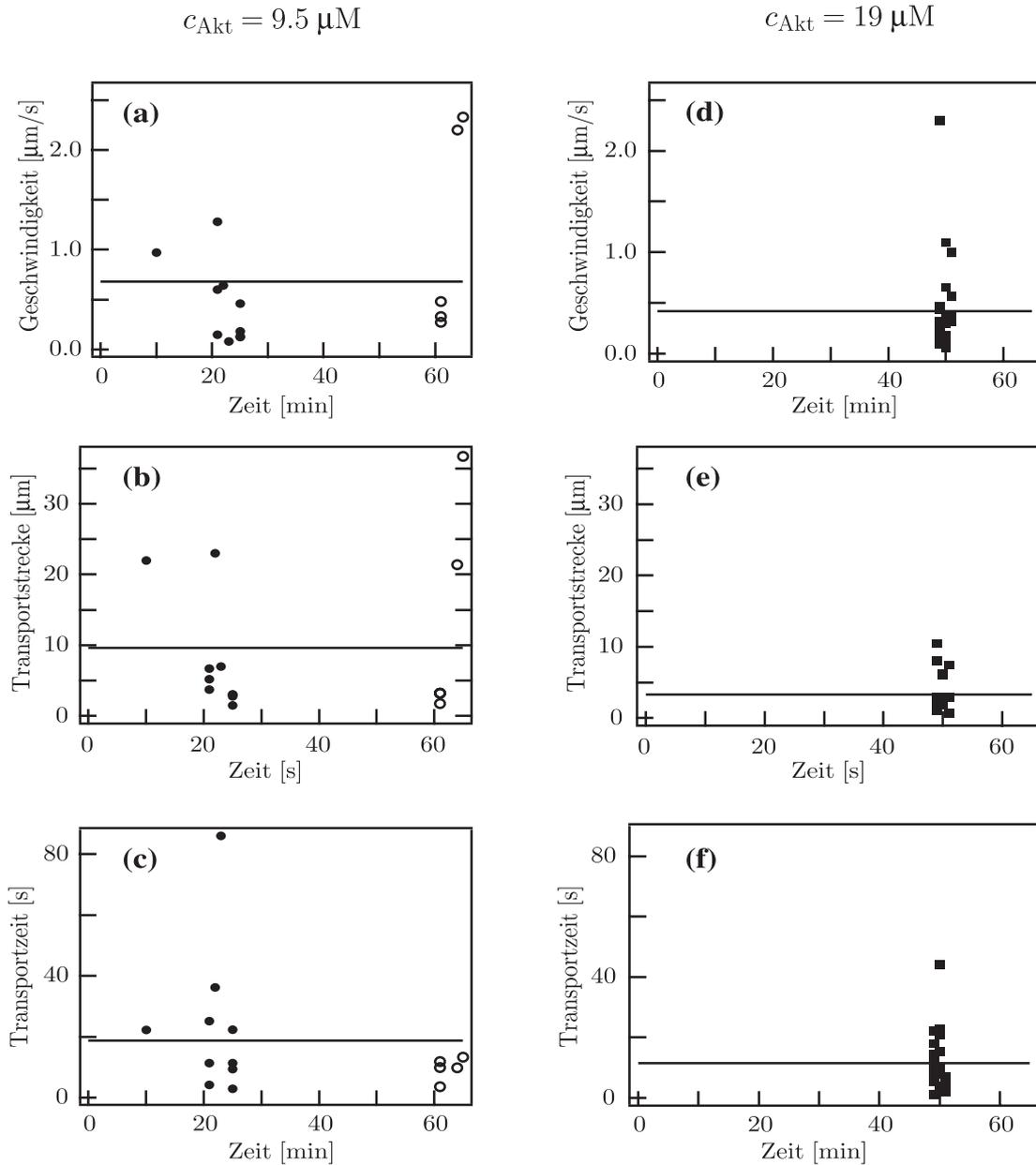


Abbildung 4.10: Einfluss der Aktinkonzentration auf die Transporteigenschaften. Die Aktinkonzentration c_A betrug $9.5 \mu\text{M}$ (a–c), bzw. $19 \mu\text{M}$ (d–f). Gefüllte Symbole beziehen sich auf Messungen des ersten Sol-Gel-Übergangs, offene Symbole auf einen zweiten Übergang nach Reaktivierung der HMM-Aktivität durch erneute ATP-Zugabe. Horizontale Linien kennzeichnen Mittelwerte. Die Verdopplung von c_A führt zu einer Reduktion der mittleren Geschwindigkeit um einen Faktor 1.6, der mittleren transportierten Strecke um einen Faktor von 2.9 und der mittleren Transportzeit um einen Faktor 1.6. Die mittleren sichtbaren Filamentlängen sind jeweils vergleichbar ($6.1 \mu\text{m}$ für $c_A = 9.5 \mu\text{M}$ und $7.7 \mu\text{m}$ für $c_A = 19 \mu\text{M}$). Die HMM-Konzentration betrug $0.38 \mu\text{M}$, entsprechend $r_{\text{AH}} = 27$ bzw. 53.

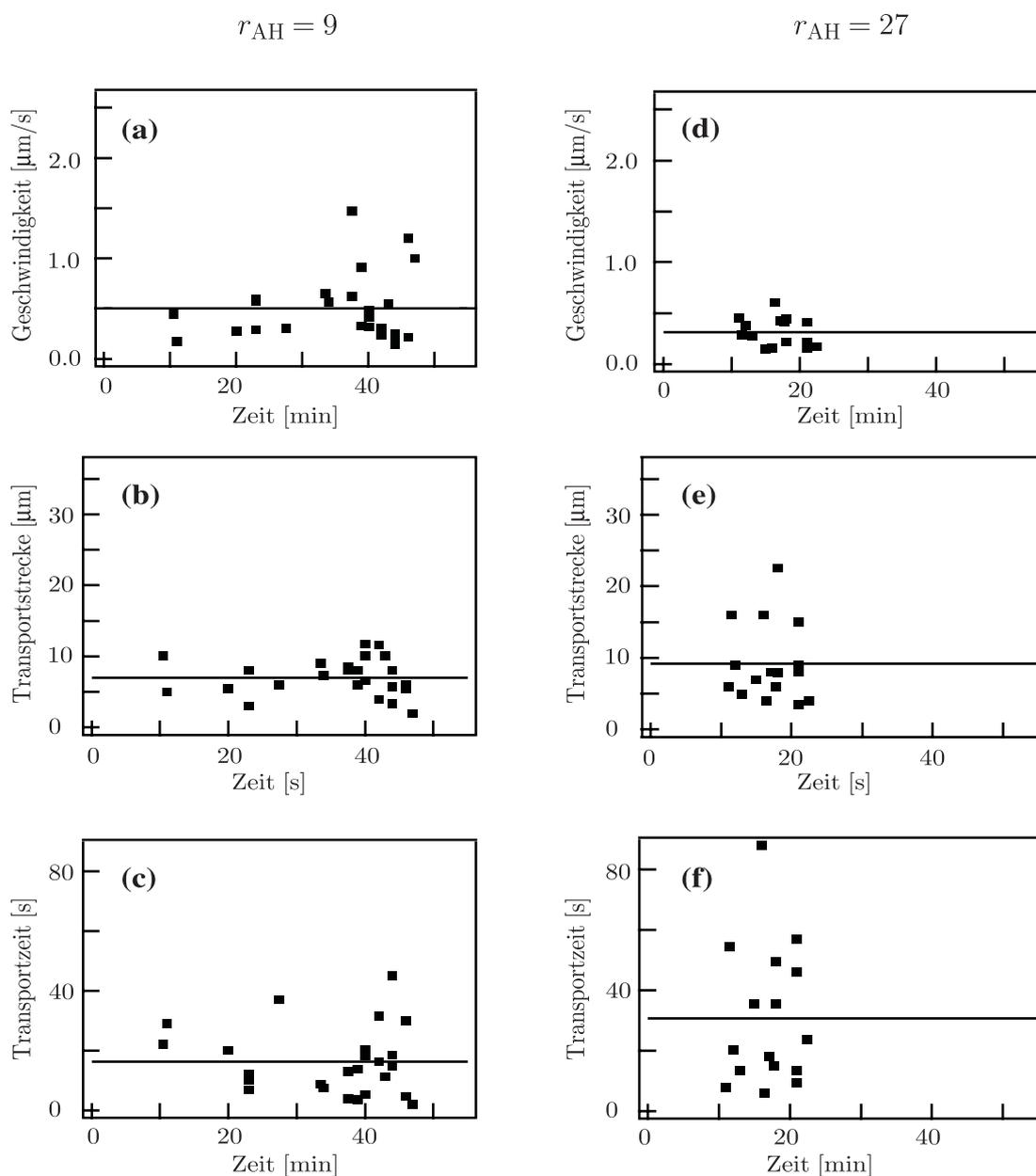


Abbildung 4.11: Einfluss der HMM-Konzentration auf die Transporteigenschaften. Vergleich von Experimenten in F-Puffer mit einem molaren Aktin-zu-HMM Verhältnis von $r_{AH} = 9$ (a–c) und $r_{AH} = 27$ (d–e). Horizontale Linien kennzeichnen Mittelwerte. Die Verringerung der HMM-Konzentration um einen Faktor drei bewirkt eine Reduktion der mittleren Transportgeschwindigkeit um einen Faktor 1.6. Die mittlere Transportstrecke erhöhte sich um einen Faktor 1.3, die mittlere Transportzeit verlängerte sich um einen Faktor 1.9. In beiden Fällen war die sichtbare Filamentlänge vergleichbar ($8.4 \mu\text{m}$ und $9.2 \mu\text{m}$ im Falle von r_{AH} bzw. r_{AH}). Die Aktinkonzentration betrug $9.5 \mu\text{M}$.

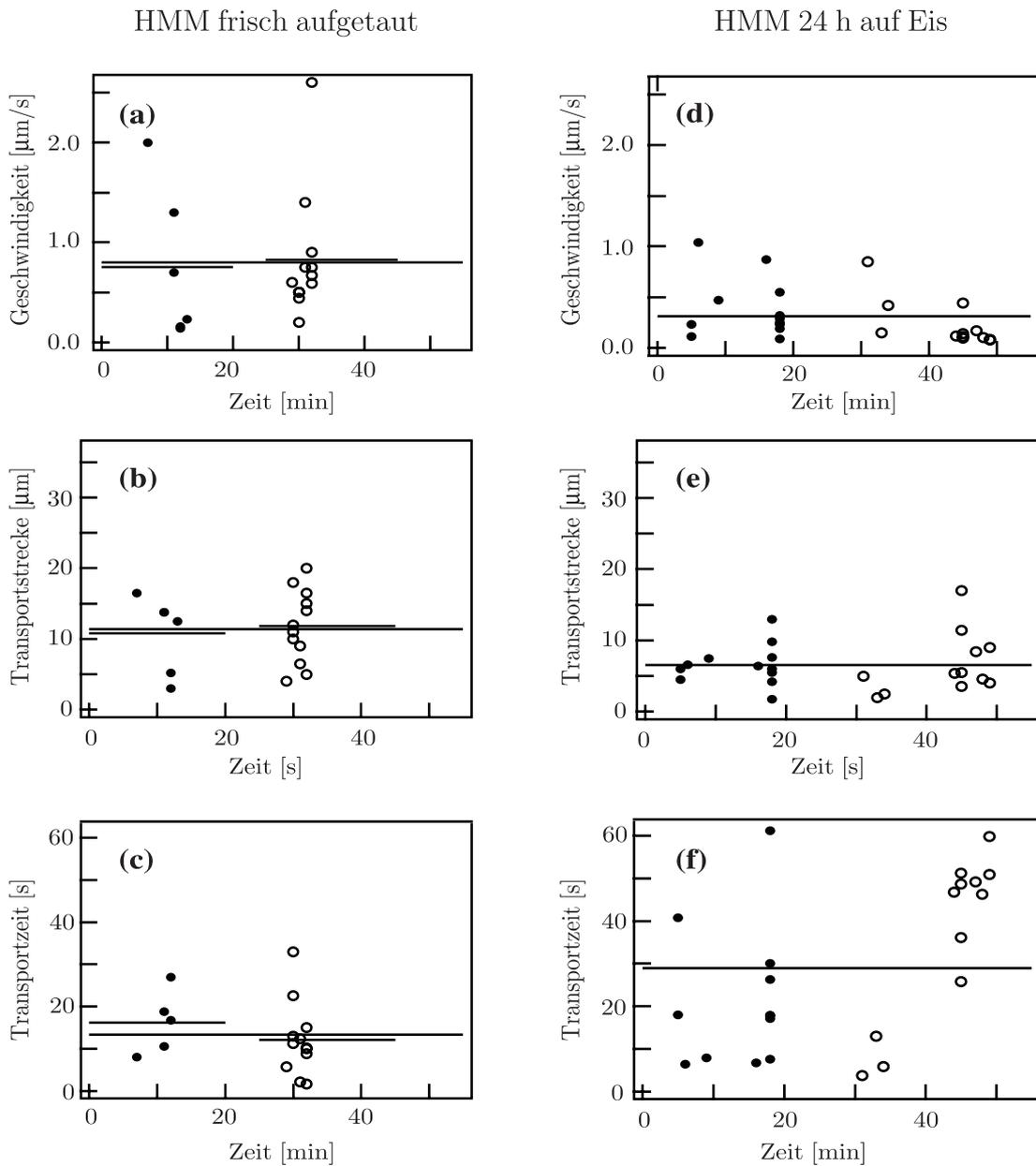


Abbildung 4.12: Einfluss der Alterung des HMM auf die Transporteigenschaften. Vergleich von Experimenten mit frisch aufgetautem HMM (a-c) und solchen mit HMM, das 24 h Eis gelagert wurde (d-e). Gefüllte Symbole in (a-c) beziehen sich auf Messungen des ersten Sol-Gel-Übergangs, offene Symbole auf einen zweiten Übergang nach Reaktivierung der HMM-Aktivität durch erneute ATP Zugabe. Horizontale Linien kennzeichnen Mittelwerte. Die Alterung des HMMs führt zu einer Reduktion der mittleren Transportgeschwindigkeit um einen Faktor 2.6, bzw. der Transportstrecke um einen Faktor 1.7. Die Transportzeit erhöht sich um einen Faktor 2.2. In beiden Fällen war die mittlere Filamentlänge $10 \mu\text{m}$, das molare Verhältnis Aktin-zu-HMM war $r_{\text{AH}} = 13$ und die Aktinkonzentration $9.5 \mu\text{M}$.

Proben mit einer Aktinkonzentration von $9.5 \mu\text{M}$ und einem molaren Verhältnis Aktin-zu-HMM von $r_{\text{AH}} = 27$ wurden angesetzt, einmal mit F-Puffer und einmal mit Assay-Puffer. Die Daten (nicht gezeigt) können nur qualitativ, nicht quantitativ, verglichen werden, da die beiden Messungen an zwei verschiedenen Tagen mit verschieden gealtertem HMM durchgeführt wurden. Die Probe, die mit F-Puffer präpariert wurde, enthielt frisch aufgetautes HMM, diejenige die in Assay-Puffer präpariert wurde, enthielt HMM, welches bereits einen Tag auf Eis gelagert worden war.

Obwohl das HMM der letztgenannten Probe (Assay-Puffer, gealtertes HMM) gealtert war und damit ein Teil der Moleküle denaturiert waren (vgl. vorhergegangener Abschnitt), ist die Transportgeschwindigkeit gegenüber der erstgenannten Probe (F-Puffer, frisches HMM) erhöht. Dies bedeutet, dass der Puffer und damit auch die ATPase-Aktivität des HMM einen starken Einfluss auf die Transporteigenschaften hat.

4.3.4 Detaillierte Darstellung der Ergebnisse - Torsionsartige Deformation des Netzwerkes und Einfrieren der Filamentdynamik

Während sich das Netzwerk in der Gel-Phase befindet, unterliegt es global wirkenden Prozessen wie der ungleichmäßigen Erwärmung der Probenkammer oder der Verdunstung von Probenflüssigkeit am Druckausgleichskanal der Probenhalterung. Diese Prozesse führen zu einer globalen Drift der Probe in der Größenordnung von $0.1 - 0.15 \mu\text{m/s}$.

Jeweils wenige Minuten nach dem letzten beobachteten aktiven Transport kommen die globalen Driftprozesse in der Probe zum Erliegen. In einem Zeitraum von typischerweise einer Minute beobachtet man dann im Netzwerk deutliche lokale Deformationen und Rotationen. Das Netzwerk unterliegt also zu diesem Zeitpunkt starken anisotropen inneren Kräften (*Torsionsphase*, vgl. Abb. 4.5). Maximale beobachtete Torsionsgeschwindigkeiten waren dabei $0.04 - 0.06 \mu\text{m/s}$ pro Filament in entgegengesetzte Richtungen bei einem Abstand von etwa $36 \mu\text{m}$.

Nach dem Ende dieser Torsionsphase wird das Fluoreszenzbild des Aktinnetzwerkes völlig statisch. Bis auf elektronisches Rauschen und Bleichprozesse liefert die CCD Kamera über Zeiten von Millisekunden bis zu einigen 10 Sekunden identische Bilder. In dieser Phase können die Fluoreszenzbilder gut gemittelt werden. Die einzelnen Filamente zeigen in dieser Phase scharfe Knicke.

4.3.5 Detaillierte Darstellung der Ergebnisse - Reversibilität des Sol-Gel-Übergangs

Die Phase, innerhalb derer die Aktinfilamente aktiv transportiert werden, endete jeweils, wie oben beschrieben, nach einiger Zeit mit der Torsionsphase. Danach ist das Netzwerk nicht nur makroskopisch fest (Gel-Zustand), sondern zeigt auch mikroskopisch keine Fluidität mehr. Durch eine erneute Zufuhr von ATP kann nicht nur (wie bereits bekannt) der Sol zu Gel Übergang rückgängig gemacht werden, sondern es tritt auch erneut eine Phase des aktiven Filamenttransports auf. Um dies zu zeigen, wurde an den Rand des Aktin-HMM-Gels in der teilweise geöffneten Probenkammer z.B. $10 \mu\text{L}$ einer 0.1 M ATP-Lösung gegeben. Nachdem das ATP durch die Probe bis in die unter dem Mikroskop betrachtete Region diffundiert war, konnten wieder aktiv transportierte Filamente beobachtet werden. Mikroskopisch war die erneuerte Fluidität der Probe an der wieder einsetzenden globalen Drift bzw. an den Fluktuationen einzelner Filamente zu erkennen. Der osmotische Schock der konzentrierten ATP-Lösung zerriss zwar manchmal Reporterfilamente und damit wahrscheinlich auch unmarkierte Filamente (nicht gezeigt), trotzdem entsprachen die Transporteigenschaften im Mittel denjenigen der ersten Transportphase (s. Abbn. 4.10 und 4.12, gefüllte bzw. offene

Kreise). Der Übergang des Aktin-HMM-Systems von einer Phase mit sich bewegenden Filamenten zu einer Phase mit fixierten Filamenten ist also reversibel.

4.4 Diskussion

4.4.1 Allgemeine Diskussion der Ergebnisse

Im Rotating Cross-bridge Modell (vgl. Kap. 1.2.2) für Myosin wird beschrieben, wie dieses Enzym mit dem Kopf an F-Aktin bindet und während der Bindung eine Konformationsänderung (Power Stroke) vollführt. Nach der Trennung vom Filament geht das Myosin wieder in seine ursprüngliche Konformation zurück. Dieser zyklische Prozess transformiert chemische Energie in Form von ATP in mechanische Arbeit. Der Quotient der durchschnittlichen Zeit im gebundenen Zustand zur gesamten Zykluszeit wird „duty ratio“ genannt (s. Kap. 1.2.2). Ein „duty ratio“ $r > 0.5$ ist Voraussetzung dafür, dass ein zweiköpfiges Molekül prozessiv ist (s. Kap. 1.1).

Unter physiologischen Bedingungen und bei hoher ATP-Konzentration hat Myosin II einen niedrigen „duty ratio“ von $r_{\text{MII}} = 0.01 - 0.02$ [Howard, 1997] und kann deswegen nur dann Aktinfilamente kontinuierlich bewegen, wenn mehrere molekulare Motoren beteiligt sind, wie z.B. im dicken Filament des Sarkomers. Im zweidimensionalen Motility Gliding Assay [Kron und Spudich, 1986], bei dem Myosin II, sein doppelköpfiges Fragment HMM oder das einzelköpfige Fragment S1 auf eine Oberfläche adsorbiert sind, können ebenfalls Aktinfilamente über längere Strecken transportiert werden, falls die Proteinkonzentration eine gewisse Grenze überschreitet. Das Filament wäre sonst nicht ohne Unterbrechung durch einen Motor an die Oberfläche gebunden und würde sich diffusiv entfernen [Uyeda et al., 1990]. Da Myosin II und seine Fragmente nicht als einzelnes Molekül ein Aktinfilament transportieren können, werden sie *nicht-prozessiv* genannt.

Humphrey et al. berichteten, dass auch bipolare Bündel von 2–16 Myosin-II-Molekülen, sog. Minifilamente, ebenfalls Aktinfilamente aktiv und gerichtet in einem dreidimensionalen Netzwerk transportieren können [Humphrey et al., 2002]. Die mittlere Geschwindigkeit betrug dabei $1.3 \mu\text{m/s}$. Diese Ensembles von molekularen Motoren könnten *quasi-prozessiv* genannt werden. Auch Takiguchi [Takiguchi, 1991] beobachtete bei Anwesenheit von HMM und ATP die Kontraktion von unpolaren Aktinbündeln, die in einem Puffer hergestellt wurden, der (chemisch inerte) Methylzellulose enthielt. Die dabei erreichte maximale Geschwindigkeit betrug $1.6 \mu\text{m/s}$. Takiguchi erklärt die Kontraktion ebenfalls durch Kräfte durch HMM auf antiparallele Aktinfilamente. Er beachtet dabei aber nicht, dass der „duty ratio“ r von HMM bei der von ihm verwendeten ATP-Konzentration mit $r = 0.01 - 0.02$ sehr niedrig ist. Dadurch ist es extrem unwahrscheinlich, dass ein HMM-Molekül gleichzeitig an zwei Aktinfilamente gebunden ist. Dies ist jedoch eine Voraussetzung für die Krafterzeugung.

Im Gegensatz zum intakten Myosin II fehlt seinem Fragment HMM die für die Bündelbildung verantwortliche LMM-Domäne (vgl. Abb. 1.7). Mittels Gel-Chromatographie (silver stain), bei der eine große Menge an Protein eingesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass Myosin II sowohl in der Aktin- als auch in der HMM-Präparation unterhalb der Nachweisgrenze lag (Daten nicht gezeigt). Dies war nötig, da zu Beginn der Proteinpräparationen noch große Mengen von natürlichem Myosin II in der Lösung enthalten sind bzw. HMM direkt aus Myosin II präpariert wird (s. Kap. 1.2.4.3).

Kräfte auf Filamente durch HMM In einem dreidimensionalen Aktinnetzwerk können (doppelköpfige) HMM-Moleküle an zwei verschiedene Filamente binden. Kraft auf die Filamente kann dabei nur ausgeübt werden, wenn der Motor gleichzeitig an zwei verschiedene

Filamente gebunden ist, während einer der Köpfe den Power Stroke vollführt. Ist nur einer der Köpfe an ein Aktinfilament gebunden, führt der Power Stroke aufgrund der stark unterschiedlichen Massen und Reibungskoeffizienten der beiden Bindungspartner lediglich zu einer Verschiebung des Motors um eine Schrittweite und nicht zu einer Verschiebung des Aktinfilaments. Dies steht nicht im Widerspruch zum Motility Gliding Assay mit dem Fragment S1: Die Motorköpfe sind dort auf eine Oberfläche adhärirt, somit werden auch Kräfte auf die Aktinfilamente ausgeübt und diese auch transportiert. Unter physiologischen Bedingungen und hoher ATP-Konzentration ist die Wahrscheinlichkeit, dass beide Köpfe gleichzeitig an zwei verschiedene Filamente gebunden sind (p_{both}) für Myosin II und HMM sehr klein: $p_{\text{both}} \approx r^2 \lesssim 0.02^2$. Deswegen ist verständlich, dass unter diesen Bedingungen kein gerichteter Langzeittransport von Aktinfilamenten beobachtet wurde.

Niedrige ATPase-Rate als Voraussetzung für Transport Im Folgenden wird gezeigt, dass *einzelne* doppelköpfige HMM-Motoren, die unter ATP-reichen Bedingungen nicht-prozessiv sind, durch Verminderung der ATP-Konzentration und damit der ATPase-Rate, Kräfte auf Aktinfilamente in dreidimensionalen Netzwerken ausüben können. ATP wird benötigt, um einen HMM-Kopf von einem Aktinfilament zu lösen. Aufgrund einer anfänglich relativ hohen ATP-Konzentration ist zunächst die Bindung des molekularen Motors an ein Aktinfilament geschwindigkeitsbegrenzend für seinen ATPase-Zyklus. Im Lauf der Zeit sinkt die ATP-Konzentration aufgrund der ATPase-Aktivität des Motors immer weiter, bis schließlich die Bindung dieses Nukleotids der ratenbegrenzende Schritt in seinem ATPase-Zyklus wird. Dies führt zu einer Verlängerung der Zeit, die der HMM-Kopf im gebundenen Zustand am Aktinfilament verbleibt, was gleichbedeutend mit einem Anstieg des „duty ratio“ ist. Unter diesen Bedingungen wird es zunehmend wahrscheinlicher, dass beide Köpfe eines Moleküls gleichzeitig an F-Aktin gebunden sind. Dies führt zu zwei gegenläufigen Effekten: Einerseits nimmt das „duty ratio“ der Motoren zu. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass HMM-Moleküle als *aktive Vernetzer* Kräfte auf die Aktinfilamente ausüben können und somit einen gerichteten Transport des F-Aktin bewirken. Andererseits fungiert im Mittel ein (steigender) Anteil des HMM als *passiver Vernetzer* im Aktinnetzwerk, wie mittels Messungen mit Magnetischen Pinzetten gezeigt werden kann. Solange ATP verfügbar ist, sind die Vernetzungen durch HMM nur vorübergehend, während sie nach vollkommenem ATP-Verbrauch dauerhaft werden (sog. Rigorzustand).

Dabei sinkt zu Beginn die anfangs hohe ATP-Konzentration linear, da die ATP-Bindung an den Aktin-HMM-Komplex nicht der ratenbegrenzende Schritt im ATPase-Zyklus ist. Später nähert sie sich nach der Michaelis-Menten-Kinetik exponentiell dem Wert null (vgl. Kap. C im Anhang), so dass die letzte Phase des ATP-Verbrauchs genügend langsam verläuft, um den Filamenttransport während eines längeren Zeitraums beobachten zu können.

Antiparallele Filamente als Voraussetzung für Filamenttransport Die S1-S2-Verbindung, der „Hals“ eines Myosins bzw. eines HMM-Moleküls, ist sehr flexibel [Bagnall, 1993]. Damit ist die Orientierung der beiden Köpfe des HMM-Moleküls zueinander weitgehend beliebig. Dadurch erscheint es wahrscheinlich, dass ein HMM-Molekül sowohl an parallele als auch an antiparallele Aktinfilamente binden kann. Trotzdem kann ein einzelnes, zwei Aktinfilamente vernetzendes HMM-Molekül nicht zu einer kontinuierlichen Bewegung der Filamente führen, da die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass sich die beiden Filamente aufgrund thermischer Fluktuationen räumlich voneinander entfernen, sobald sich einer der beiden HMM-Köpfe von seinem Filament trennt. Selbst in einem verschlauften Aktinnetzwerk sind die Abstände der Filamente im zeitlichen Mittel wesentlich größer als der Abstand, der für einen kontinuierlichen Transport durch HMM benötigt wird. Für Aktinfilamente, die kei-

ne zumindest abschnittsweise parallele Orientierung haben, sind wegen des kurzen Abstands zwischen den zwei HMM-Köpfen eines Moleküls nur einzelne bis maximal einige wenige Vernetzungen durch HMM möglich. F-Aktin ist polar mit einem Plus- und einem Minus-Ende. Deswegen können zwei antiparallele Filamente, die einen Überlappungsbereich haben, von vielen HMM-Molekülen vernetzt, d.h. in dieser Anordnung gehalten werden und gleichzeitig Kräfte auf sie ausüben [Nakazawa und Sekimoto, 1996; Kruse und Jlicher, 2000] (s. Abb. 4.13). Unter diesen Bedingungen und bei niedriger ATP-Konzentration ist ein gerichteter, längerfristiger Transport von Aktinfilamenten im dreidimensionalen Netzwerk möglich. Zu beachten ist, dass bei parallelen Aktinfilamenten die Kräfte abwechselnd in beide Richtungen wirken und somit kein gerichteter Transport zustande kommen kann.

Experimentell wurde nie beobachtet, wie sich zwei fluoreszenzmarkierte Filamente direkt aneinander entlang bewegen. Zum einen ist die Wahrscheinlichkeit für das Ereignis, dass sich zwei sichtbare Aktinfilamente berühren, äußerst gering, da höchstens jedes dreihundertste Filament fluoreszenzmarkiert ist, zum anderen könnte aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens des Mikroskops keine Aussage darüber getroffen werden, wie nah sich zwei Filamente tatsächlich sind sobald diese einen Abstand von weniger als ca. $0.5 \cdot 0.5 \mu\text{m}$ (Rayleigh-Kriterium) voneinander haben. Deshalb ist mit diesem Aufbau prinzipiell keine Aussage darüber möglich, ob die erforderliche Nähe der Filamente zueinander von 10–20 nm vorliegt oder nicht.

4.4.2 Detaillierter Mechanismus

Von uns [Uhde, Keller, Parmeggiani, Frey, Sackmann] wird ein detailliertes Modell vorgeschlagen, welches die beobachteten Daten plausibel erklärt:

Nachdem Kopf 1 eines HMM-Moleküls an Aktinfilament 1 gebunden hat, vollführt er sofort (innerhalb von 1 ms [Howard, 1997]) den Power Stroke *ohne* auf Filament 1 oder 2 eine Kraft auszuüben. Falls Kopf 2 nun an Filament 2 bindet, während sich Kopf 1 noch nicht wieder von Filament 1 gelöst hat, so wird sofort eine Kraft auf die beiden Filamente ausgeübt („aktive Vernetzung“). Existieren zwischen den beiden Filamenten keine weiteren Querverbindungen, so vollführt der Motorkopf den Power Stroke und schiebt dabei die beiden Filamente in entgegengesetzte Richtungen (s.u.). Die weiteren HMM-Moleküle zwischen den beiden Filamenten, die ihren Power Stroke bereits ausgeführt, sich aber noch nicht von den Filamenten gelöst haben, gestatten nur eine Verschiebung der Filamente, bis die Schubkraft der aktiven Vernetzung der elastischen Widerstandskraft der passiven Querverbindungen entspricht. Sobald ein passiver Vernetzer (HMM im Rigorzustand) ATP bindet und sich daraufhin von einem der beiden Filamente löst, führt diese Verringerung der elastischen Widerstandskraft zu einer weiteren Verschiebung der Filamente durch den aktiven Vernetzer. Das HMM-Molekül, das kurz zuvor einen seiner Köpfe gelöst hatte, stellt dabei im Verlauf des ATPase-Zyklus seine ursprüngliche Konformation wieder her und kann wieder an eine anderen Position des Aktinfilaments binden und somit erneut als aktiver Vernetzer eine Kraft auf die Filamente ausüben.

Ende der Bewegung Bei sehr niedrigen ATP-Konzentrationen wird τ_{on} immer größer, so dass sich ein Großteil der Vernetzer im Rigorzustand befinden, d.h. die meisten HMM-Moleküle sind dauerhaft an ein oder zwei Aktinfilamente gebunden. Deswegen wird der Widerstand gegen aktive Vernetzer zunehmend höher, so dass schließlich kein Transport mehr zustande kommen kann. Ein Transport von F-Aktin kann also nur stattfinden, solange der Quotient aus aktiven und passiven Vernetzern oberhalb eines gewissen Schwellenwerts liegt.

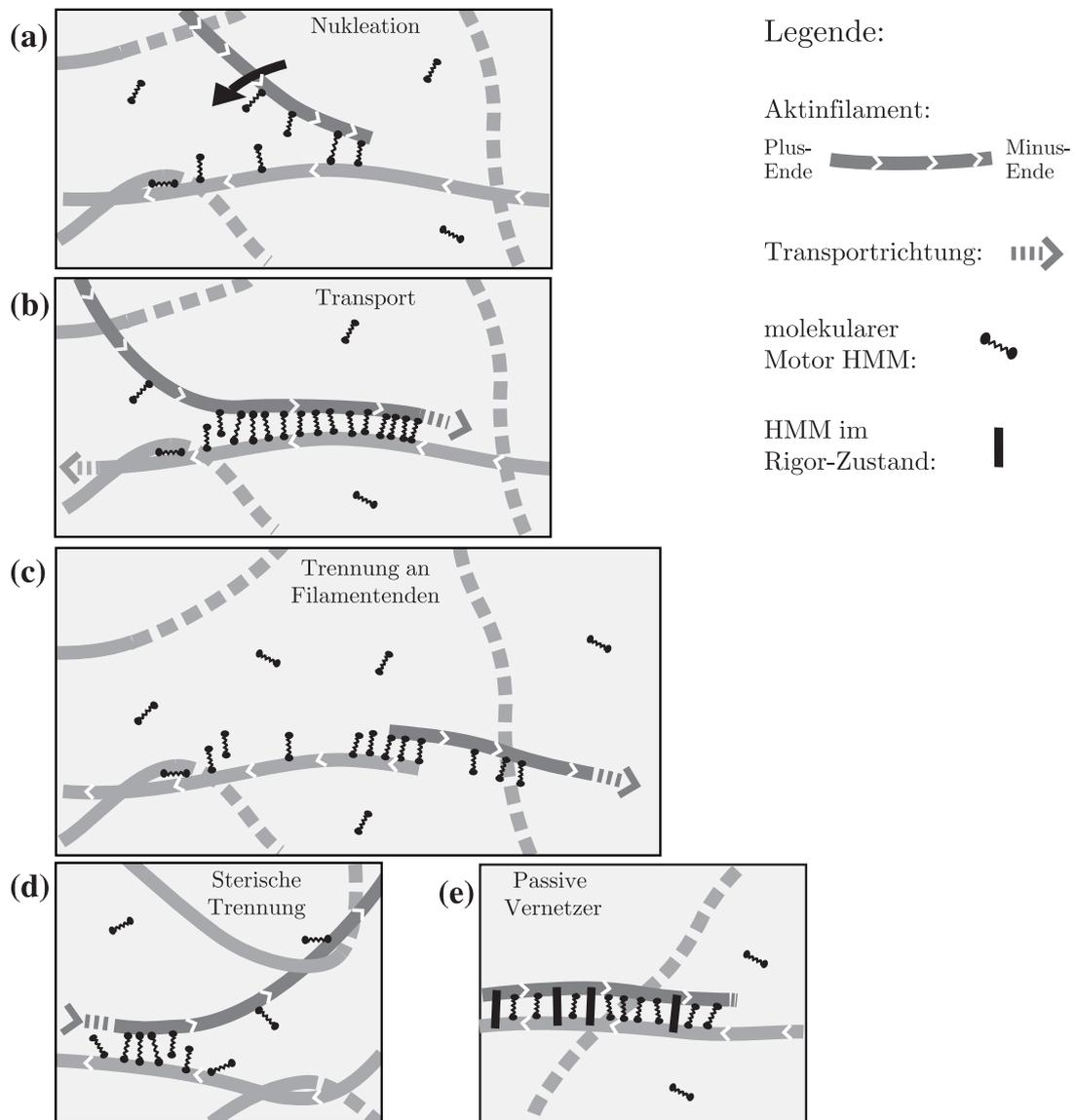


Abbildung 4.13: Illustration des vorgeschlagenen Reißverschluss-Mechanismus, der eine (abschnittsweise) parallele Ausrichtung der Aktinfilamente im ansonsten isotropen Netzwerk bewirkt. (a) Durch thermische Bewegung orientiert sich das Minus-Ende eines Filaments über einen kurzen Abschnitt sehr nah und antiparallel zu einem weiteren Filament (Nukleation). HMM-Moleküle mit erhöhtem „duty ratio“ binden in diesem Abschnitt gleichzeitig an beide Filamente und verhindern einerseits eine diffusive Trennung des F-Aktin, andererseits üben die molekularen Motoren durch den Power Stroke axiale Kräfte auf sie aus. (b) Mindestens eines der beiden Filamente wird durch die Motoren an dem anderen entlang transportiert. Der Überlappung wird größer. Der Transportprozess endet, falls (c) die Hinter-Enden einander passieren, (d) das Vorder-Ende (und damit zu einem späteren Zeitpunkt auch das Hinter-Ende) sich aufgrund sterischer Hindernisse vom anderen Filament entfernt oder (e) zu viele HMM-Moleküle im Rigorzustand sind und so als passive Vernetzer wirken. Ein zu niedriger ATP-Gehalt mit einem daraus resultierenden zu hohen „duty ratio“ kann letzteres bewirken.

Ein- und Ausfädelmechanismus In einem verschlauften Aktinnetzwerk ist es zunächst unwahrscheinlich, dass Filamente antiparallel sind und sich zugleich einander sehr nahe befinden. Im Folgenden wird ein Mechanismus beschrieben, der erklären könnte, wie sich diese Konformation entwickeln kann: Die Position eines Aktinfilaments in der Matrix der umgebenden Filamente ist durch die Verschlaufungen mit diesen auf seine Reptationsröhre beschränkt und damit weitgehend definiert (s. Kap. 2.1). Deswegen können sich i.a. zwei antiparallele Filamente nicht seitlich (transversal) aneinander anlagern. Ein möglicher (longitudinaler) Mechanismus besteht darin, diese parallele Anlagerung am Vorder-Ende (Minus-Ende) eines Filaments zu beginnen, da diese Region sterisch am wenigsten durch Verschlaufungen behindert wird und sich deshalb im umgebenden Volumen relativ frei bewegen kann (s. Abb. 4.13). Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass das Vorder-Ende durch seine thermischen Fluktuationen zufällig antiparallel auf ein anderes Aktinfilament trifft. Dies kann irgendwo entlang dessen Kontur sein. Entstehen nun einige Vernetzungen zwischen diesen beiden Filamenten, so werden die Fluktuationen dieser zwei Filamente relativ zueinander in diesem Bereich stark unterdrückt. Da F-Aktin semiflexibel ist, können bereits wenige Vernetzer mit einem durchschnittlichen Abstand kleiner als die Maschenweite, die zwei Filamente in eine definierte, lokal antiparallele Orientierung bringen. Dies entspricht einem Nukleationsprozess, da nun wie bei einem Reißverschluss schnell eine HMM-Verbindung nach der anderen gebildet werden kann. Dadurch bekommen die zwei Filamente eine überlappende Region, innerhalb der sie antiparallel und nahe beieinander sind. Nun kann der oben beschriebene Transportmechanismus stattfinden, wodurch sich die Kontaktzone der beiden Filamente durch das Vorwärtslaufen des Vorder-Endes des ersten Filaments ständig vergrößert. Der Verlängerungsprozess ist jedoch langsam verglichen mit dem anfänglichen Reißverschlussverfahren. Dies kann das plötzliche Einsetzen des Transportvorganges mit einer wenig ausgeprägten Beschleunigungsphase erklären, so wie er im Experiment beobachtet wurde.

Wenn zwei Filamente zwischen zwei Verschlaufungspunkten in Kontakt sind (jedoch nicht am Vorder-Ende eines der beiden) und sie zusätzlich antiparallel orientiert sind, so kann dies nicht zu dem beschriebenen Reißverschlussverfahren führen, da die Kontaktzone nicht länger werden kann als der Abstand der Verschlaufungspunkte. Dennoch könnte dies zu einem Filamenttransport führen, falls der Überlappungsbereich lang genug ist.

Sobald das Hinter-Ende des einen Filaments dasjenige des anderen erreicht hat, endet der Transportvorgang. Das gleiche gilt, wenn das Vorder-Ende desjenigen Filaments, das seine Bewegung mit diesem Vorder-Ende begonnen hatte, auf ein Hindernis (z.B. ein anderes Filament) stößt und deswegen oder aus anderer Ursache seine Aktinschiene verlässt. Dann setzt das umgekehrte Reißverschluss(öffnungs)verfahren ein.

4.4.3 Berechnung der Wahrscheinlichkeit für Mehrfachvernetzung

Bei hoher ATP- (und Aktin-)Konzentration beträgt die Gesamtzykluszeit $\tau_Z = 1/20 \text{ s} = 50 \text{ ms}$ [Toyoshima et al., 1989; Howard, 1997]. Unterhalb einer gewissen ATP-Konzentration wird die Verweildauer eines HMM-Kopfes im gebundenen Zustand (τ_{on}) und damit die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere HMM-Moleküle gleichzeitig zwischen zwei antiparallelen Aktinfilamenten gebunden sind, lang genug, um die beiden Filamente in dieser Formation zu halten. Zu jeder gegebenen Zeit $t \gg \tau_Z$ (τ_Z ist die von der ATP-Konzentration abhängige Zykluszeit) müssen mindestens zwei Vernetzungen existieren, um die zwei Filamente daran zu hindern, (um einen einzigen Vernetzungspunkt) zu rotieren oder sich gar (ohne Vernetzungspunkt) diffusiv voneinander zu entfernen.

Befinden sich z.B. N HMM-Moleküle zwischen zwei antiparallelen Aktinfilamenten, so ist die Wahrscheinlichkeit P_n dafür, dass davon mindestens n vorübergehende Vernetzungen

existieren:

$$P_n = 1 - \frac{1}{\tau_Z^{2N}} \sum_{i=0}^{n-1} \binom{N}{i} \left((\tau_Z - \tau_{\text{on}})^2 \right)^{N-i} \cdot (\tau_{\text{on}}^2)^i. \quad (4.1)$$

Da die Zeit τ_{on} in der das HMM an das Aktin gebunden ist (und damit auch $\tau_Z = \tau_{\text{on}} + \tau_{\text{off}}$) mit abnehmender ATP-Konzentration zunimmt, steigt die Wahrscheinlichkeit P_n im Laufe der Zeit mit dem ATP-Verbrauch an. Bei hoher ATP- und Aktinkonzentration ist $\tau_Z = 1/20 \text{ s} = 50 \text{ ms}$ [Toyoshima et al., 1989; Howard, 1997].

4.4.4 Gründe für die breite Verteilungen der Parameter

Die breite Verteilung der Transportparameter kann unterschiedliche Ursachen haben. Die Gesamtzahl n_{PS} an Power Strokes pro Sekunde, die zum Transport eines Filaments beitragen, ist ungefähr:

$$n_{\text{PS}} = f \cdot \frac{2.5 \text{ } \mu\text{m/s}}{5 \text{ nm}} = f \cdot 500 \text{ s}^{-1}.$$

Der Faktor f hängt vom Verhältnis der Reibungskoeffizienten der beiden Filamente ab. Dabei gilt $0 < f \leq 1$. Wenn das unsichtbare antiparallele F-Aktin fest an die umgebende Aktinmatrix gebunden ist (z.B. durch passive Vernetzer), so wird das sichtbare Filament durch jeden beitragenden Power Stroke um eine volle Schrittweite transportiert ($f = 1$). Wenn beide Filamente den gleichen Reibungskoeffizienten haben und sich deshalb beide gleich schnell bewegen, so führt jeder beitragende Power Stroke zu einer Verschiebung der einzelnen Filamente, die die halbe Schrittweite beträgt ($f = 0.5$). Wenn der Reibungskoeffizient des beobachteten Filaments größer ist als der des unsichtbaren, so nimmt f weiter ab. Nicht nur der Faktor f führt zu einer breiten Verteilung der gemessenen Geschwindigkeiten bei identischer Kontaktzonengeometrie, auch die Anzahl der molekularen Motoren, die die antiparallelen Filamentabschnitte verbinden, hängt von der Länge der Kontaktzone zwischen den zwei Filamenten ab. Diese ist unbekannt und kann länger oder kürzer als die sichtbare Filamentlänge sein. Zudem ist die tatsächliche Anzahl an molekularen Motoren, die zum Transport beitragen, statistischer Natur. Schließlich können Spuren an denaturiertem, also ATPase inaktiven HMM-Molekülen vorhanden sein, die den Transportprozess verlangsamen oder ganz unterbinden können.

Kapitel 5

Sondenkomplianzmessungen an aktiven und passiven Aktinnetzwerken

5.1 Überblick über die Methode

5.1.1 Einleitung

Mikrorheologische Untersuchungen an Aktinnetzwerken (z.B. [Schmidt et al., 1989; Ziemann et al., 1994; Amblard et al., 1996; Schnurr et al., 1997; Hinner et al., 1998; Dichtl und Sackmann, 1999; Gisler und Weitz, 1999; Schmidt et al., 2000; Mason et al., 2000]), als auch solche an Zellen (z.B. [Feneberg et al., 2001]) haben gezeigt, dass:

1. die gewohnte Beschreibung dieser Netzwerke mittels mechanischer Ersatzschaltbilder (insbesondere über eine Kombination von Zener-elementen ([Schmidt, 1999]) teilweise unbefriedigend ist.
2. die transienten mikrorheologischen Messmethoden teilweise (signifikant) abweichende Ergebnisse zu anderen passiven oder aktiven mikrorheologischen sowie zu makrorheologischen Messungen liefern.
3. die bis jetzt benutzten mikrorheologischen Methoden für zuverlässige und aussagekräftige Langzeitmessungen nicht optimal sind.

Im Folgenden werden transiente Messungen an aktiven und passiven Aktinnetzwerken (bzw. zu Vergleichszwecken auch an Zellen) vorgestellt, welche erstmals die Gültigkeit und Zuverlässigkeit der transienten Methode für Aktinnetzwerke auf einer Zeitskala von ca. 0.02 bis 100 Sekunden (oder länger) demonstrieren.

Im ersten Teil des Kapitels wird dazu im Rahmen der herkömmlichen theoretischen Modelle [Doi und Edwards, 1989] eine Umrechnung der Kriechkomplianzkurven in komplexe Relaxationsspektren durchgeführt. Dazu wird die neue, verbesserte Umrechnungsmethode erst charakterisiert und dann benutzt um die rheologischen Parameter eines 10 μM Aktinnetzwerkes zu bestimmen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse werden ausführlich mit den Ergebnissen anderer Methoden und theoretischen Vorhersagen [Isambert und Maggs, 1996; Morse, 1998a,b,c, 2001] verglichen. Außerdem werden Gründe für Abweichungen diskutiert, falls diese vorhanden sind.

Weiterhin wird die in Kap. 2.2 vorgestellte Theorie über die mechanischen Eigenschaften viskoelastischer Körper aufgrund der Diffusion von Netzwerkknötchen benutzt, um

Komplianzmessungen direkt, ohne den Umweg einer Umrechnung in Relaxationsmodule, zu interpretieren. Diese neue Theorie ist in der Lage einige scheinbare Widersprüche der im ersten Teil vorgestellten Messungen zu erklären. Dazu gehört beispielsweise die ungewöhnliche Längenskala der Filamentdiffusion, welche die Relaxation der Netzwerkspannungen auf langen Zeitskalen verursacht.

Insbesondere ein Zeitbereich in welchem die auf die Kraft normierte Auslenkung proportional zur Wurzel aus der Zeit anwächst wird detailliert untersucht, da dieser Bereich den größten Widerspruch zu herkömmlichen theoretischen Beschreibungen von Netzwerken semiflexibler Polymere darstellt. Die wurzelförmige Abhängigkeit von t wird aber mit Hilfe der Diffusionstheorie hervorragend erklärt (vergl. Gl. 2.33).

Zusätzlich werden erstmals transiente mikrorheologische Messungen mit Kräften vorgestellt (bis über 100 pN), die weit oberhalb derer liegen, mit denen Aktinnetzwerke bisher untersucht wurden (typischerweise bis etwa 10 pN). Explizit wird dabei die bisher theoretisch nicht erklärbare Kraftabhängigkeit der Komplianz- und Relaxationskurven untersucht. Bedenkt man, dass *Lysteria*-Bakterien Kräfte bis etwa 200 pN erzeugen können [McGrath et al., 2003], wird die Relevanz der Messungen bei höheren Kräften deutlich.

Erstmals werden auch Deformationen auf Zeitskalen (bis 100 s) untersucht, die ca. eine Größenordnung über den bisher Untersuchten liegen (bisher typischerweise 10 s). Die auf die Kraft normierten Zeit-Auslenkungskurven (Komplianzkurven) zeigen dabei als neuartiges Verhalten eine periodische Veränderung der gemessenen Komplianzwerte. Diese Veränderungen wurden in früheren Experimenten wegen der deutlich kürzeren Messzeiten nicht erfasst, oder lediglich als statistische Abweichung vom benutzten Modell erklärt.

5.1.2 Probenpräparationen - Aktive und passive Aktinnetzwerke mit superparamagnetischen Sondenpartikeln

Für die Experimente wurde F-Aktin und HMM präpariert, wie in Kap. 1.2.4.1 bzw. 1.2.4.3 beschrieben. Das F-Aktin wurde in Endkonzentrationen von $c'_A = 2.5\text{-}30 \mu\text{M}$ benutzt. Zu Beginn der Polymerisation wurden die Proben 1:1000 mit einer Kugel/BSA-Lösung versetzt ($4.5 \mu\text{m}$, bzw. $2.8 \mu\text{m}$ Dynal-Kugeln, vergleiche Tab. 1.3). Diese Lösung besteht aus der 1:10 in 10 mg/ml BSA-Lösung verdünnten Kugellösung des Herstellers. Entweder wurden passive Netzwerke (reine Aktinnetzwerke) oder aktive Aktin/HMM-Netzwerke untersucht. Das Verhältnis von Aktin zu HMM betrug dann $r_{AH} = 10, 50$ oder 100 . Die ATP- und Mg^{2+} Konzentrationen wurden für die Messungen der passiven Netzwerke durch den F-Puffer bestimmt (2 mM MgCl_2 und 0.5 mM ATP), für die Messungen an aktiven Netzwerken wurden diese Konzentrationen auf je 10 mM erhöht, um dem ATP-Verbrauch durch die Motoren ausgleichen zu können. Zusätzlich wurden Messungen bei einer erhöhten Ionenstärke (300 mM KCl) durchgeführt, um die Ergebnisse mit solchen vergleichen zu können bei denen Myosin II als aktiver Vernetzer benutzt wurde. Myosin II bildet ab dieser Ionenstärke keine Bündel mehr. Dadurch kann der Einfluss einzelner Myosin II Dimere auf ein Aktinnetzwerk untersucht werden. Alle Experimente wurden mit frisch präpariertem Aktin durchgeführt, das längstens 7 Tage auf Eis gelagert wurde.

Nach Polymerisationsbeginn wurden die Proben ca. 2 Minuten lang äußerst vorsichtig alle fünf bis zehn Sekunden umgedreht. Damit wird ein Absinken der Kugeln, welches sonst erfolgen würde, verhindert, da sich in dieser Zeit noch kein genügend feines Netzwerk ausgebildet hat. Nach etwa 10 Minuten wurden die Proben ebenfalls sehr vorsichtig mit abgeschnittenen Pipettenspitzen in die vorbereitete Probenkammer gefüllt, die etwa 100 μL Probenvolumen fasst. Die Probe wurde sofort mit einem Deckglas abgedeckt und konnte dann etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur relaxieren. Die Messungen wurden alle ca. 40 Minuten nach

Polymerisationsbeginn gestartet, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

5.1.3 Durchführungen - Transiente Sondenkomplianzmessungen

Die Messungen wurden in der geschlossenen Probenkammer durchgeführt. Zur Aufnahme wurde ein inverses Mikroskop (*Zeiss*, Axiovert 10) mit einem 10fach Objektiv verwendet. Die niedrige Vergrößerung liefert im Gegenzug ein großes Bildfeld von über 600 μm Breite. Da die Sondenpartikel einen gewissen Abstand voneinander aufweisen müssen, um sich gegenseitig nicht zu beeinflussen¹ und da sie zusätzlich über Strecken ausgelenkt werden sollen, die wesentlich größer als ihr eigener Durchmesser sind, ist ein derart großes Bildfeld unerlässlich.

Die 12 Bit Bilder der Kamera wurden durch „OpenBox“ mit unterschiedlichen Bildraten gespeichert. Die Kugelpositionen wurden anschließend mit Hilfe des zweidimensionalen Gaußfit-Algorithmus bestimmt. Die lückenhaften Rohdaten (durch Aufnahmepausen) werden in Igor importiert, zeitlich um die Dauer der Aufnahmepausen korrigiert, orts- und zeitskaliert, in Pulse zerteilt und auf die angelegte Kraft normiert.

5.2 Relaxationsspektren aus transienten Sondenkomplianzmessungen

In diesem Kapitel sollen Ergebnisse aus transienten Sondenkomplianzmessungen an passiven Aktinnetzwerken vorgestellt werden.

Zuerst wird die Überprüfung einer neuartigen, verbesserte Methode zur Umrechnung von Kriechkomplianzen in (komplexe) Relaxationsmodule vorgestellt. Danach werden Relaxationsspektren, wie sie sich mittels dieser Umrechnung ergeben, mit Spektren aus anderen Arbeiten und theoretischen Vorhersagen verglichen.

5.2.1 $G(t)$ -Spektrum-Referenzmessungen

Der Vergleich von transienten Messungen an viskoelastischen Biopolymernetzwerken mit direkten Messungen der (frequenzabhängigen) viskoelastischen Spektren (z.B. mittels der oszillierenden Magnetischen Pinzetten oder mittels Makrorheometer) ist nur dann möglich, wenn es gelingt, die zeitabhängige Kriechkomplianz $J(t)$ in die entsprechende Größe des frequenzabhängigen komplexen Relaxationsmoduls $G(\omega)$ umzurechnen. Im Rahmen dieser Arbeit ist eine verbesserte fehlerunanfälligen Ein-Schritt Methode für die Umrechnung implementiert worden (vergl. Kap. 2.1.1), die auf einer direkten Minimierung des Konvolutionsintegrals unter der Nebenbedingung von nicht-negativen Lösungen beruht (zu Details der Minimierung vergl. Anhang B).

Da die Methode für die Annahme entwickelt wurde, dass sich der Schermodul des Netzwerkes als endliche Exponentialserie mit wenigen Summanden annähern lässt, können (wie bei den älteren Methoden auch) nur Messungen ausgewertet werden, bei denen die Gesamtauslenkung der Sondenpartikel nicht zu groß wird und die Auslenkungsgeschwindigkeit ebenfalls unterhalb einer gewissen Schwelle bleibt.

Bei Messungen an Aktinnetzwerken beträgt die maximal zugängliche Zeit, je nach Inhomogenität des Netzwerkes und der Auslenkungsdistanz/Sondengeschwindigkeit etwa 10-100 Sekunden.

¹Da das magnetische Material im Inneren der superparamagnetischen Sondenpartikel in einem äußeren Feld eine lokale Veränderung des Feldgradient verursacht, ziehen sich die Sondenpartikel gegenseitig an. Obwohl dieser Effekt sehr schwach ist, führt er bei zu hohen Kugeldichten zu einer kettenförmigen Ausrichtung der Kugeln.

Bei längeren Messungen werden die Abweichungen von der obigen Annahme so signifikant, dass die Methode unbrauchbar wird. Da in älteren Arbeiten wie von z.B von Schmidt, Feneberg oder Keller ([Schmidt, 1999; Keller et al., 2003; Feneberg, 2003]) die Messzeiten ebenfalls in dieser Größenordnung liegen, ist trotzdem eine gute Vergleichbarkeit gewährleistet.

5.2.1.1 Vergleich mit der Methode nach Hopkins und Hamming

In diesem Abschnitt soll die neue Methode anhand gleicher Ausgangsdaten direkt mit der hergebrachten iterativen Methode nach Hopkins und Hamming verglichen werden. Es soll gezeigt werden, dass die neue Methode für die Mitte des betrachteten Frequenzbereichs fast identische Ergebnisse liefert, dass aber die Genauigkeit an den Rändern der untersuchten Frequenzintervalle deutlich höher ist.

Um eine optimale Überprüfung der Methode zu gewährleisten müssen verschiedene Anforderungen an die Testdaten gestellt werden:

1. Die Datensätze sollten möglichst lang sein, dabei jedoch noch keine Abweichung vom dem Modellbild aufweisen, dass sich das Relaxationsmodul der Probe als Summe über einige wenige Exponentialterme beschreiben lässt.
2. Die Testdaten sollten unter Bedingungen aufgenommen werden, die größtmögliche Ähnlichkeit zu denen haben, die für die späteren Messungen an Aktinnetzwerken verwendet werden.
3. Die mit beiden Methoden berechneten Relaxationsmodulen sollten sich anhand von Messungen mit anderen Methoden grob überprüfen lassen.

Aus diesem Gründen wurden zum Vergleich der neuen Methode mit der Methode nach Hopkins und Hamming Kriechkomplianzdaten von auf Zellen adhärenierten Kugeln [Feneberg, 2003] verwendet. Diese Daten befriedigen die oben gestellten Anforderungen in jeglicher Hinsicht, zudem lagen sowohl die Rohdaten, als auch die nach der Methode von Hopkins und Hamming ausgerechneten Relaxationsmodule in elektronischer Form vor.

5.2.1.2 Ergebnisse

Der direkte Vergleich wurde für verschiedene Pulse berechnet und ist beispielhaft in Abbildung 5.1 zu sehen. Für lange und mittlere Zeiten ist die Übereinstimmung der Daten sehr gut, für kurze Zeiten wird die iterative Methode jedoch sehr ungenau, während die neue Methode auch hier ein numerisch stabiles und physikalisch sinnvolles Resultat liefert. Nur in seltenen Ausnahmefällen liefert die Methode nach Hopkins und Hamming ähnlich gute Ergebnisse wie die neue Methode nach Liu (vergl. Abb. 5.1).

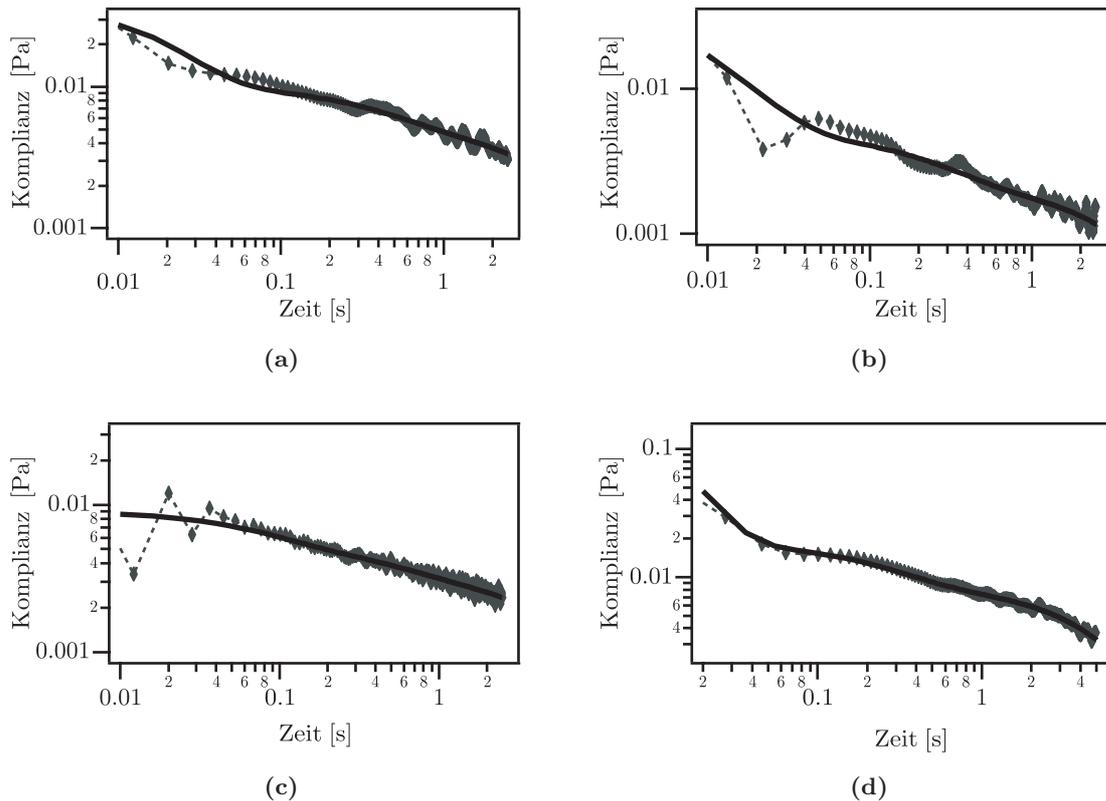


Abbildung 5.1: Vergleich von zwei Methoden zur Berechnung des Relaxationsmoduls aus der Kriechkomplianz. Symbole: Iterative Methode nach Hopkins und Hamming. Durchgezogene Linie: Neue Ein-Schritt Methode nach Liu. Meistens liefert die neue Methode über den ganzen Messbereich eine deutlich bessere Umrechnung. Insbesondere entfällt das physikalisch nicht sinnvolle, stufenweise An- und Abschwollen der Relaxationsmodulen. Bei besseren Ausgangsdatensätzen (wenig Rauschen) liefern die Methoden weitgehend identische Ergebnisse, die Methode nach Liu berechnet dann Kurven, die in etwa der geglätteten Relaxationsmodulkurven nach Hopkins und Hamming entsprechen. Meistens bleibt trotzdem eine deutliche Verbesserung für kurze Zeiten (c). Nur in seltensten Fällen (bei sehr wenig verrauschten Ausgangsdaten) liefert die Methode nach Hopkins und Hamming ähnlich gute Resultate, wie die Methode nach Liu (d).

5.2.2 Relaxationsspektren halbverdünnter Aktinlösungen

5.2.2.1 Durchführung

Zur Berechnung der komplexen Relaxationsspektren mit der neuen Methode wurde eine $10\mu\text{M}$ Aktinlösung hergestellt. In die Lösung wurden Kugeln mit einem Durchmesser von $4.5\mu\text{m}$ eingebettet. Verschiedene rechteckförmige Strompulse, die Kräfte von 1 pN bis zu 120 pN auf die Kugel erzeugten, wurden an die Magnetspule angelegt, um die Kugeln gegen den Widerstand des Netzwerks auszulenken. Gemessen wurden die Auslenkungen x der Sondenpartikel in Abhängigkeit von der Zeit t , ihrem Abstand zum Spulenkernende x_0 und der angelegten Spulenstromstärke I für verschiedene Pulslängen:

$$x \equiv (x - x_0)(I, t)$$

Eine Kugel im Bildbereich wurde als Relaxationsmarker schon während der Experimente in Echtzeit nachverfolgt. Ein neuer Puls wurde nicht gestartet, bevor das Netzwerk nicht mindestens die zehnfache Dauer des letzten Pulses Zeit hatte, zu relaxieren. Hatte der Relaxationsmarker zu diesem Zeitpunkt noch eine Bewegungskomponente in x -Richtung, wurde der nächste Puls weiter hinausgezögert, bis die x -Position des Relaxationsmarkers über mindestens 20 Sekunden stabil blieb.

Die Kraft F für alle Orte x bei einer Spulenstromstärke I ist durch Eichmessungen bekannt (vergl. Kap. 3). Die gemessenen Kurven $x_I(t)$ wurden durch die am Ort x wirkende Kraft $F(x)$ geteilt. Das Ergebnis dieser Berechnung ist die mit einem geometrischen Faktor g versehene zeitabhängige Kriechkomplianz $gJ(t)$ in Einheiten [Länge/Kraft].

Als einfachster Ansatz für die Berechnung von g und um die Vergleichbarkeit mit früheren Arbeiten (z.B. [Tempel, 1996; Schmidt, 1999]) zu gewährleisten, werden die erhaltenen Werte der nicht normierten Kriechkomplianz mit den Faktor $g^{-1} = 1/6\pi R_{\text{Kugel}}$ (Gl. 2.27) multipliziert ([Ziemann, 1997]).

Als Ergebnis erhält man, bis auf kleine Korrekturen, die zeitabhängige Kriechkomplianz $J(t)$. Die kleinen Korrekturen rühren daher, dass der geometrische Faktor g in einem semiflexiblen Netzwerk möglicherweise zeit- bzw. frequenzabhängig wird und damit vom reinen Stokes-Faktor abweicht.

Eine typische Kriechantwortkurve, welche auf die eben beschriebene Art gemessen wurde, ist in Abbildung 5.2(a) zu sehen. Diese Kurven können mit der im letzten Paragraphen vorgestellten Methode in zeitabhängige Relaxationsmodule umgerechnet werden. Das Ergebnis einer solchen Umrechnung ist in Abbildung 5.2(b) zu sehen.

Neben der generellen Qualität der Messkurve sind vor allem die Aufnahmefrequenz und die Pulslänge entscheidende Kriterien für die Genauigkeit der Umrechnung. Verwendet man volle Datensätze, kann die Methode bei einem ähnlichen Qualitätsfaktor Φ_{Res} (vergl. Gl. 2.21) im Kurzzeitbereich stärker streuende $G(t)$ -Kurven liefern (vergl. Abb. 5.4(a)). Allerdings machen solche Pulslängen Aussagen über viskoelastische Eigenschaften des Netzwerkes bei niedrigen Frequenzen überhaupt erst möglich. Wird die Länge des Ausgangsdatsatz auf eine kürzere Zeit reduziert (typischerweise 10-15 s), liegen die erhaltenen Kurven für kleine Φ_{Res} dicht bei der Kurve für minimales Φ_{Res} , was auf eine auch für kurze Zeiten stabile Lösung hinweist (vergl. Abb. 5.4(b)). Dabei gehen allerdings die Langzeitinformationen verloren. Dieser Vorgang spielt bei allen eben beschriebenen Prozessen eine entscheidende Rolle.

Da Messungen im Langzeitbereich gerade die Stärke der transienten Methoden ist², wurden die aufgenommenen Pulse nur gekürzt, wenn Netzwerkinhomogenitäten die Komplianzkurven derart verändert hatten, dass die Auswertung mittels des benutzten Modells ($G(t)$

²Im Kurzzeitbereich sind oszillatorische Messungen vorzuziehen, da diese jeden Kurzzeitmesspunkt als Mittelwert über eine große Anzahl von Zyklen messen können.

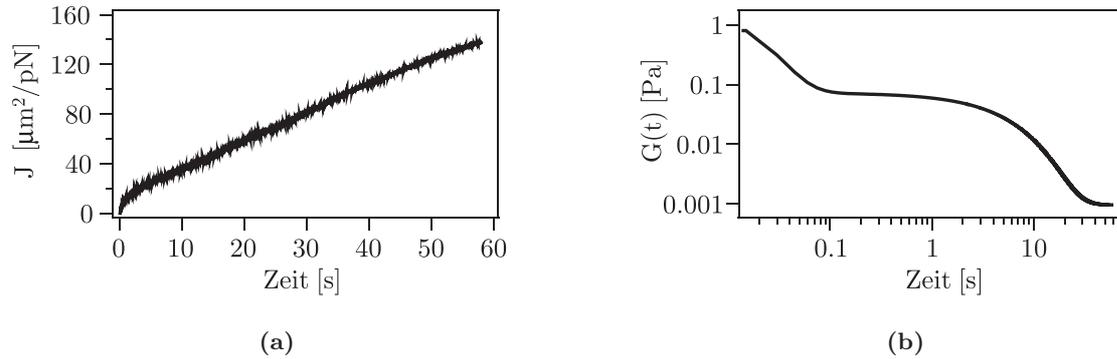


Abbildung 5.2: (a) Kriechantwort-(Kriechkomplianz)kurve einer $4.5\mu\text{m}$ Magnetkugel in einem $10\mu\text{M}$ Aktinnetzwerk. Die angreifende Kraft betrug im Mittel 15 pN während eines Pulses von 58 Sekunden Dauer. Die Kugel wurde in dieser Zeit um $54\mu\text{m}$ durch das Netzwerk bewegt. (b) Zeitabhängiger Relaxationsmodul eines $10\mu\text{M}$ Aktinnetzwerks. (Berechnet aus der in (a) gezeigten Komplianzkurve mittels der neuartige Methode nach Liu.)

als Summen von Exponentialfunktionen) nicht mehr möglich gewesen wäre. Die reduzierte Genauigkeit für hohe Frequenzen wurde dabei bewusst in Kauf genommen.

Aus den so berechneten zeitabhängigen Relaxationskurven konnten mittels der Gleichungen 2.23 und 2.24 die Komponenten G' (Speichermodul) und G'' (Verlustmodul) des komplexen Relaxationsmoduls $G^*(f) = G'(f) + iG''(f)$ berechnet werden (Abb. 5.5).

Aufgrund der begrenzten Messintervalllänge T_{Puls} , bzw. wegen der endlichen Datenaufnahmerate Δt_i , sind die so berechneten Kurven zu den Rändern hin zunehmend ungenau. Da je nach Güte der Messkurven bis über 10 Messpunkte nötig sind um die kleinste Relaxationszeit zu bestimmen, werden die berechneten Kurven für hohe Frequenzen nur bis etwa zu einem Zehntel der theoretisch berechenbaren Maximalfrequenz betrachtet. Weisen die zeitabhängigen Relaxationskurven bereits stärkere Variationen im Kurzzeitbereich auf, wird der betrachtete Bereich eventuell weiter eingeschränkt. Ein Kriterium ist dabei der Übergang des Bereiches, in dem beide Komponenten des komplexen Moduls einem gleichartigen Potenzgesetz $G' \propto G'' \propto t^\alpha$ mit einer positiven Potenz $0.5 < \alpha < 1$ folgen, zu dem physikalisch nicht sinnvolle Bereich, in dem beide Modulen einbrechen (vergl. Einsatz in Abb. 5.5). Dieser Übergang (ab dem die umgerechneten Kurven nicht mehr betrachtet werden) liegt bei den hier vorgestellten Messungen größenordnungsmäßig bei Frequenzen um 10 Hz . Die theoretisch erreichbare maximale Frequenz f_{max} ergibt sich aus dem reziproken Wert der Datenaufnahmerate $f_{\text{max}} = 1/\Delta t_1$ zu ungefähr $f_{\text{max}} \approx 70\text{ Hz}$ für die in den betrachteten Experimenten benutzte Aufnahmerate von ca. 14 ms . Daraus ergibt sich, dass ca. die letzten 10% der umgerechneten Kurven nicht betrachtet werden sollten.

Die minimale Frequenz f_{min} ergibt sich aus dem Reziproken der Pulslänge $f_{\text{min}} = 1/T_{\text{Puls}}$ zu Werten in der Größenordnung von $0.1\text{--}0.01\text{ Hz}$. Für lange Zeiten werden im Konvolutionsintegral sehr viele Messpunkte ausgewertet, weshalb die Lösung dort weniger fehlerbehaftet ist. Eine größere Rolle für Ungenauigkeiten spielen in diesem Bereich Abweichungen vom zugrundegelegten Modell. Die Wichtungsfaktoren w_i werden nach folgender Formel berechnet:

$$w_i = 1/t_i^{k_w}$$

Sie sorgen für eine stärkere Wichtung der wenigen Messpunkte am Anfang der $J(t)$ -Kurve, die den sprunghaften Anstieg der Kriechkomplianz für kurze Zeiten beschreiben. Das ist nötig

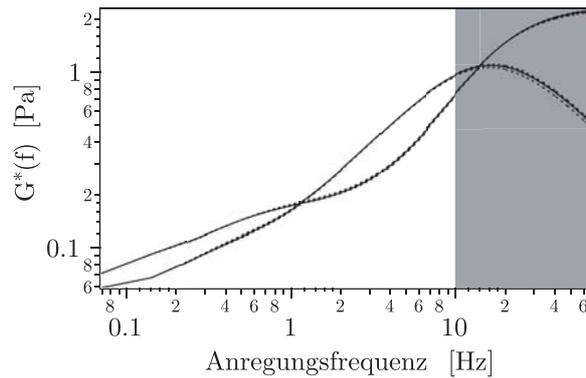


Abbildung 5.3: Einfluss des Wichtungsfaktors auf den berechneten Relaxationsmodul. Optimale Wichtung ($k_w = 0.15$, durchgezogene Linie) und Variationen der Wichtung ($k_w = 0.1$ und $k_w = 0.20$, gestrichelte Linien). Im optimalen Bereich der Wichtung hat diese nur noch einen schwachen Einfluss. Grundsätzlich ist der Einfluss der Wichtung nur im Hochfrequenzbereich signifikant. Die graue Schattierung zeigt den physikalisch nicht sinnvollen und daher normalerweise ausgeblendeten Bereich der Umrechnung. ($10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5 \mu\text{m}$ Kugel, $F = 30 \text{ pN}$. Da der Puls nur eine Dauer von etwa 15 Sekunden hatte, kann weder das Plateau noch die terminale Relaxation bestimmt werden. Siehe dazu Kap. 5.2.2.2)

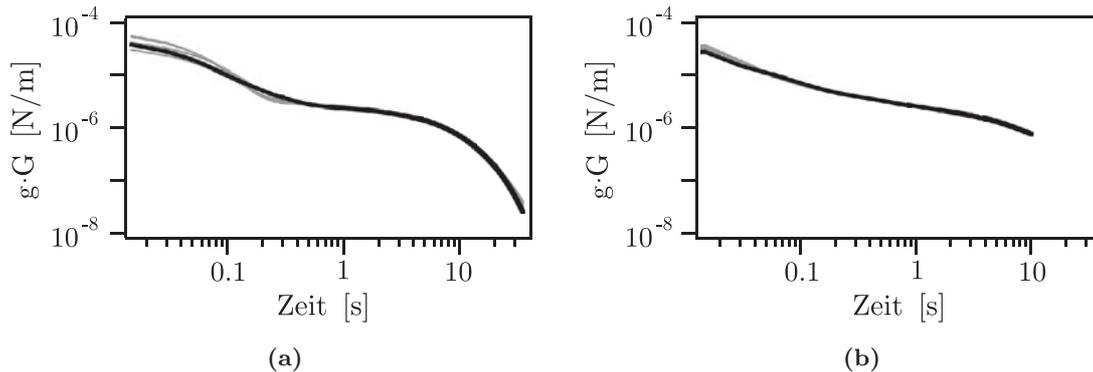


Abbildung 5.4: Einfluss der Pulslänge auf die Berechnung des zeitabhängigen Relaxationsmoduls $G(t)$. Gezeigt ist die Umrechnung für den identischen Puls bei voller Pulslänge von 35 Sekunden ((a)) und für den auf 10 Sekunden gekürzten Datensatz ((b)). Bei dem kürzeren Puls nimmt die Genauigkeit der Umrechnung für Zeiten $t < 1$ Sekunde zu, während man andererseits sämtliche Langzeitinformationen verliert. Schwarze Linie: Umrechnung mit minimalem Qualitätsfaktor. Graue Linien: Die 20 darauf folgenden Umrechnungen mit abnehmender Qualität. ($10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5 \mu\text{m}$ Kugel, $F = 17.4 \text{ pN}$. Vergleiche dazu auch Abb. 5.8.)

da die Mehrheit der Datenpunkte für lange Zeiten kaum noch neue Informationen beinhaltet, rein von der Anzahl jedoch stark in die Minimierung eingehen. Die Wichtungskonstante k_w lag dabei im Bereich von 0 bis 0.25 und wird derart variiert, dass Φ_{Res} minimiert wird (vergl. Gl. 2.21). Innerhalb des Bereiches, in dem Φ_{Res} minimal ist, weisen die berechneten komplexen Relaxationsmodule kaum noch eine Abhängigkeit von k_w auf (vergl. Abb. 5.3).

Wünschenswert wäre in diesem Zusammenhang ein logarithmisch skalierendes Aufnahmeintervall, um diese nachträgliche Wichtung umgehen und um Speicherplatz sparen zu können. Diese Form der Datenaufnahme lässt sich jedoch mit der verwendeten Software (noch) nicht realisieren.

5.2.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Die auf diese Weise berechneten komplexen Relaxationsmodule zeigen ein in sich konsistentes Bild. Kurven wie z.B. die in Abb. 5.5 entsprechen in allen prinzipiellen Eigenschaften den theoretisch vorhergesagten Kurven des komplexen Relaxationsmoduls für Aktin.

Aus den Kurven können verschiedene, das Netzwerk charakterisierende Parameter ausgelesen werden. In diesem Abschnitt werden folgende Parameter näher charakterisiert:

- Die Steigung α der doppelt logarithmisch aufgetragenen Kurven von G' und G'' für hohe Frequenzen f_{hoch} . Theoretische Vorhersagen ([Amblard et al., 1996; Gittes und MacKintosh, 1998; Morse, 1998c; Frey, 2001]) und aktive sowie passive mikrorheologische Messungen an Aktinnetzwerken (z.B. [Amblard et al., 1996; Dichtl und Sackmann, 1999]) sagen für diesen Bereich einen skalierenden Exponenten $G' \propto G'' \propto f_{\text{hoch}}^\alpha$ von $\alpha = 3/4$ voraus.
- Die Frequenz f_e , bei welcher der Verlustmodul erstmals unter den Speichermodul sinkt und somit das sog. Gummiplateau beginnt. Dieser Wert entspricht einer Zeit $\tau_e = f_e^{-1}$, bei welcher Netzwerkeigenschaften für die Sondenantwort wichtiger werden als die entropischen Kräfte der Einzelfilamente. In der passiven Mikrorheologie ist das die Entanglement-Zeit. Wie gezeigt werden wird, muss in der aktiven, transienten Mikrorheologie eine modifizierte Definition dieser Zeit benutzt werden.
- Die Frequenz f_d , bei der der Speichermodul langfristig unter den Verlustmodul sinkt und somit die terminale Phase des viskosen Fließens einsetzt (\approx Ende des Gummiplateaus). Dieser Wert entspricht einer Diffusionszeit $\tau_d = f_d^{-1}$. Für die passive Mikrorheologie sagt die Theorie die Reptationsdiffusionszeit (Diffusion in der Reptationsröhre über die Entfernung der mittleren Filamentlänge) voraus. Alle neueren Messungen weisen jedoch auf eine andere relevante Diffusionskonstante für diesen Prozess hin. Für die aktive, transiente Mikrorheologie kann gezeigt werden, dass die Zeit τ_d die Zeit ist, die ein Filamente benötigt um mit seiner transversalen Diffusionskonstante über die Distanz des Kugelradius zu diffundieren.
- Die Position des Verlustmoduls G'' , an dem er seinen lokales Minimum annimmt.
- Der Wert des Speichermoduls G' an der Stelle, an der der Verlustmodul G'' sein lokales Minimum aufweist. Dieser Wert ist der Plateaumodul.

Aktinnetzwerke sind naturgemäß inhomogen und die transiente Mikrorheometrie arbeitet stichprobenartig. Aus diesen Gründen streuen sowohl die gemessenen Absolutwerte für G' und G'' , als auch die Steigungen und die Überkreuzungspunkte der Steigungen (Steigungen sind 0.75, 0.5 und 1). Diese Überkreuzungspunkte stellen im klassischen Ersatzschaltbild-Modell die Entanglement-Zeit (τ_e) und die charakteristische Zeit der Reptationsdiffusion (τ_d) dar. In den folgenden Paragraphen werden aufgrund dieser Streuungen nur Mittelwerte (mit Fehlerintervall) diskutiert. Da sich für die meisten Werte eine gewisse Kraftabhängigkeit zeigt, wurden die Mittelwerte aus Messungen gebildet, die alle in einem Kraftintervall von etwa 5-20 pN Kraft auf die Mikrosonde, gemessen wurden. In diesem möglichst niedrigen Kraftbereich werden einerseits die Kurven nicht mehr so stark von (thermische getriebenen) passiven Bewegungen überlagert, so dass eine Auswertung mit den hier beschriebenen Methoden unmöglich wird, andererseits ist hier die Kraftabhängigkeit der Werte im Verhältnis zur Streuung der Werte durch Netzwerkinhomogenitäten noch zu vernachlässigen. Auf die Kraftabhängigkeit selbst wird im letzten Paragraphen diese Kapitels näher eingegangen.

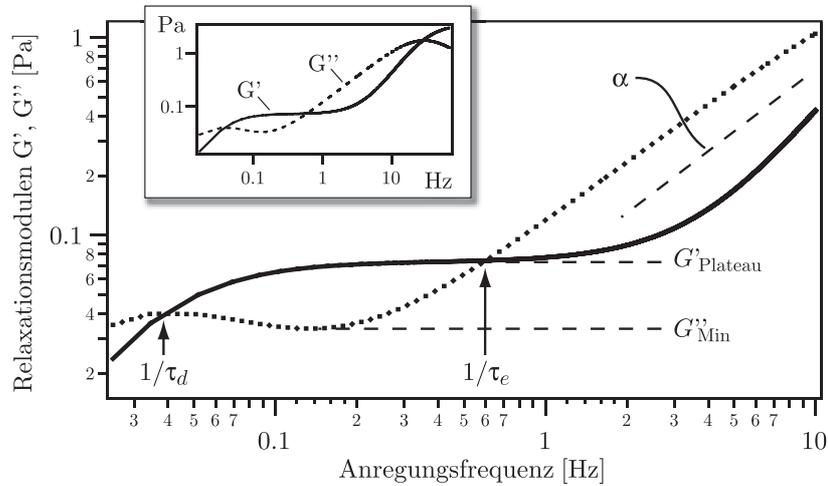


Abbildung 5.5: Mittels transienter Mikrorheologie gemessenes komplexes Relaxationsspektrum einer $4.5 \mu\text{m}$ Kugel in einem $10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk. Berechnet aus dem in Abb. 5.2 gezeigten Daten. Ein-gezeichnet sind die Entanglement-Zeit τ_e , eine charakteristische Zeit für die Diffusion der Filamente τ_d , das Gummiplateau G'_{Plateau} , G''_{Min} und die Steigung α für G' bzw. G'' für hohe Frequenzen. Der Einsatz zeigt den ungekürzten Datensatz mit seinem physikalisch nicht sinnvollen Kurvenverlauf für sehr hohe Frequenzen (Abknicken der Kurven nach unten).

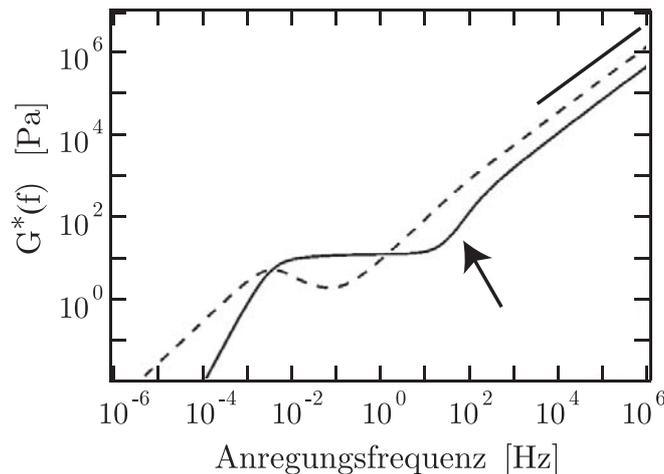


Abbildung 5.6: Theoretisch berechnetes komplexes Relaxationsspektrum von Aktin (G' durchgezogene Linie, G'' gestrichelte Linie). Die kurze Linie hat eine Steigung von $3/4$, der Pfeil zeigt den Teil des Übergangsbereichs, in dem die Steigungen größer als $3/4$ sind. Gut zu erkennen ist auch, dass G' steiler verläuft als G'' . [nach [Morse, 1998c](#)], Fig. 2].

Skalengesetz des Kurzzeitverhaltens Verschiedene Theorien sowie passive und aktive (oszillatorische) mikrorheologische Experimente haben ein Skalengesetz $G(t) \propto t^{3/4}$ für die Frequenzabhängigkeit des Relaxationsmoduls bei hohen Frequenzen vorhergesagt, bzw. gemessen (z.B. [Morse, 1998c] Theorie, [Dichtl und Sackmann, 1999] passive Mikrorheologie mit kolloidal markierten Filamenten, [Amblard et al., 1996; Keller et al., 2001b] Magnetische Pinzetten, [Schnurr et al., 1997] passive Einzelkugel Mikrorheologie, [Mason et al., 2000] Lichtstreuung, usw.). Wie im nächsten Kapitel (Kap. 5.4) gezeigt wird, ist die daraus folgende $t^{3/4}$ Abhängigkeit der Kriechkomplianzdaten³ auch bei transienten Messungen zumindest für kleine und mittlere Kräfte gut messbar. Es stellt sich nun die Frage, ob diese Netzwerkeigenschaft auch nach der Transformation in den komplexen Relaxationsmodul G^* noch reproduzierbar ist. Es wurde zu diesem Zweck die gemittelte Steigung α_{Fit} von G' und G'' von verschiedenen komplexen Relaxationsspektren bestimmt. Dazu wurden in doppelt logarithmischer Auftragung jeweils im sichtbar linearen Bereich (je nach Kurve zwischen 1-15 Hz), je eine lineare Funktion an G' und G'' angepasst und der Mittelwert der Steigungen für jedes Spektrum berechnet. Diese Steigungen wurden für alle Spektren gemittelt. Der resultierende Exponent lag bei

$$\alpha_{Fit} = 0.84 \pm 0.09 \quad (5.1)$$

was mit der Theorie in Einklang steht. Allerdings gab es einige Ausreißer mit Steigungen deutlich größer als 1 (maximal $\alpha_{Fit} = 1.45$), die nicht in die Mittelwertbildung einbezogen wurden. Bei allen Kurven war zusätzlich die Steigung von G' systematisch größer als die von G'' .

Die systematische Abweichung zu einem größeren skalierenden Exponenten als dem theoretisch vorhergesagten und auch die unterschiedlichen Steigungen für G' und G'' können im Rahmen der benutzten Modelle folgendermaßen erklärt werden: Da die umgerechneten Kurven für ganz hohe Frequenzen unbrauchbar werden, kann nur die Steigung nur im Übergangsbereich zum $t^{3/4}$ -Bereich gemessen werden. Wie ein Vergleich mit der theoretisch vorhergesagten Kurve ergibt, ist dieser Übergangsbereich genau dadurch gekennzeichnet, dass G' und G'' steiler als $t^{3/4}$ verläuft und dass insbesondere G' steiler als G'' ist. Vergleiche hierzu insbesondere die aus [Morse, 1998c] entnommene Theoriekurve. Die Parameter der Theorie wurden für diese Kurve derart angepasst, dass sie die prinzipiellen Eigenschaften (Persistenzlänge, Maschenweite, usw.) eines halbverdünnten Aktinnetzwerkes reproduzieren (vergl. Abb. 5.6). Die Verschiebung von α zu höheren Werten sollte somit eine universell Eigenschaft in diesem Bereich sein und deshalb auch bei z.B. oszillatorischen Messungen zu finden sein. Tatsächlich findet sich in [Keller et al., 2001b] ein Wert für den skalierenden Exponenten, der sehr dicht bei dem in diesen Experimenten erhaltenen Wert liegt: $\alpha_{Keller} = 0.83 \pm 0.08$ für den Bereich von 15-40 Hz.

Die vereinzelt auftretenden Werte $\alpha > 1$ sind durch Konversionsfehler im Hochfrequenzbereich bei längeren Datensätzen zu erklären (vergl. Abb. 5.4), da solche Steigungen in den Komplianzdaten nicht gefunden werden.

Übergang von Einzelfilamentdynamik zu kollektivem Einfluss Die theoretische Vorhersage der Übergangszeit (bzw. Übergangsfrequenz) des Bereiches, in dem die Einzelfilamentdynamik die Sondenantwort bestimmt zu dem Bereich, in dem kollektive Netzwerkei-

³Dieser Zusammenhang ist nicht sofort einsichtig, kann jedoch mittels einer längeren Rechnung gezeigt werden [Alexei Boulbitch, private Kommunikation]. Die $t^{3/4}$ -Abhängigkeit der Kriechkomplianz lässt sich allerdings einfach aus der (experimentell bestätigten) $t^{3/4}$ -Abhängigkeit der mittleren quadratischen Abweichung $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ von Sondenpartikeln im Aktinnetzwerk herleiten, indem man die generalisierte Gleichung von Stokes-Einstein in Laplacefrequenzen s schreibt $\tilde{G}(s) \propto k_B T / (s \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle)$ und dann die Beziehung $\tilde{J} = 1 / (s \tilde{G})$ ausnutzt. Nach Umrechnung auf Zeiten folgt direkt: $J(t) \propto \langle \Delta r^2(t) \rangle \propto t^{3/4}$ [Mason et al., 2000].

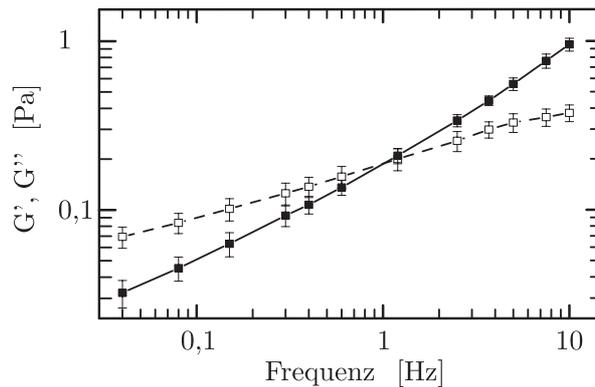


Abbildung 5.7: Mittels oszillierender Magnetischer Pinzetten gemessenes komplexes Relaxationsspektrum einer $9.5 \mu\text{M}$ Aktinlösung (G' gefüllte Symbole, G'' offene Symbole, die Linien dienen zur Orientierung). Mikrosonden waren die in dieser Arbeit verwendeten $4.5 \mu\text{m}$ durchmessenden magnetischen Sondenpartikel der Firma Dynal. Die Kraftamplitude betrug ca. 6 pN , die maximale Auslenkung ca. $1.5 \mu\text{m}$. Man beachte, dass die Entanglement-Zeit gut mit der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Zeit übereinstimmt. Das Gummiplateau deutet sich am linken Rand der G' -Kurve mit Werten zwischen etwa $0.05\text{-}0.07 \text{ Pa}$ an. [Mit freundlicher Genehmigung von Bernd Wagner]

genschaften (insbesondere die Verschlaufung), wichtig werden, kann mit Gleichung 2.10 (Seite 35) bestimmt werden. Setzt man die in diesem Experiment relevanten Größen ein, kommt man zu einem Wert von

$$\tau_e^{\text{Th.}} \approx 2\text{s} \quad \Rightarrow \quad f_e^{\text{Th.}} \approx 0.5\text{Hz}$$

mit der Persistenzlänge von Aktin $l_p = 17 \mu\text{m}$, dem Reptationsröhrenradius $d \approx \xi = 0.54 \mu\text{m}$ (nach Gl. 2.5 für ein $10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk) und dem Filamentdurchmesser von $a \approx 10 \text{ nm}$.

Der Mittelwert der aus den Daten bestimmten Übergangsfrequenz für Kurven mittlere Kraft beträgt:

$$f_e = 0.5 \pm 0.3\text{Hz}$$

und stimmt damit hervorragend mit den theoretischen Vorhersagen überein.

Bei Messungen mit oszillierenden Mikrosonden werden gleiche Übergangzeiten gefunden [Rainer Tharmann, Bernd Wagner, private Kommunikation]. In Abbildung 5.7 ist zum Vergleich das aus sechs Einzelkurven gemittelte Relaxationsspektrum einer $9.5 \mu\text{M}$ Aktinlösung abgebildet, wie es mit oszillierenden Magnetischen Pinzetten gemessen wird.

Auch bei kollektiven mikrorheologischen Methoden wie z.B. bei der „Diffusing Wave Spectroscopy“⁴ (DWS) werden ähnliche Übergangzeiten gefunden [Gisler und Weitz, 1999].

Bei makrorheometrischen Untersuchungen weicht die gemessene Entanglement-Zeit bekanntermaßen zu größeren Werten hin ab. Selbst neuere makroskopische Messungen zeigen immer noch eine Abweichung um den Faktor 3-5 ($\tau_e^{\text{Makro}} \approx 10 \text{ s}$) [Schmidt et al., 2000]. Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass die verwendeten Sondenpartikel mit einem Durchmesser $D = 4.5 \mu\text{m}$ zwar größer als die Netzwerkmaschenweite von $\xi \approx 0.5 \mu\text{m}$, aber kleiner als die Persistenzlänge von $l_p \approx 17 \mu\text{m}$ sind. Aufgrund theoretischer Überlegungen [Maggs, 1998] kann gezeigt werden, dass die Größe des Sondenpartikels größer als eine zweite die Netzwerkeigenschaften bestimmende Länge $\xi < l_c \propto \sqrt{l_p}$ sein muss, um identische Ergebnisse mit makrorheometrischen Messungen zu erhalten. Dieses Ergebnis ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass die Größe und Form des Sondenpartikels auf dieser Längenskala genauer

⁴ Bei dieser Methode wird mittels Lichtstreuung die Intensitäts-Autokorrelationsfunktion einer Vielzahl von in die Probe eingebrachten Mikrosonden gemessen.

in die Interpretation von mikrorheologischen Messdaten mit einbezogen werden muss, wie es z.B. bei der im nächsten Kapitel vorgestellte Methode der Fall ist.

Zum Vergleich der aufgezählten Entanglement-Zeiten sei auf die Tabelle 5.1 verwiesen.

Vergleich der Entanglement-Zeiten

Quelle	τ_e
Theorie	≈ 2 s
Eigene Messung (transiente Sondenkomplianzmessung)	2 ± 1.2 s
Oszillierende Sondenkomplianzmessungen	1.9 ± 1.4 s
DWS	≈ 0.5 s
Makrorheometrische Messungen	≈ 10 s

Tabelle 5.1: Entanglement-Zeiten für Aktinnetzwerke im Konzentrationsbereich um $10\mu\text{M}$. Referenzen siehe Text.

Übergang vom Gummiplateau in das terminale Fließen In einem verschlauten Netzwerk semiflexibler Polymere wird die Frequenz, bei welcher der Speichermodul endgültig unter den Verlustmodul sinkt ($\hat{=}$ Einsetzen des terminalen Fließens) durch die Zeitdauer bestimmt, in der Spannungen über eine Umordnung des Netzwerkes relaxieren können.

Die klassische theoretische Erklärung für diese Zeitskala ergibt sich aus der Zeit, die ein Filament benötigt, um über die Entfernung der mittleren Filamentlänge \bar{L} entlang seiner eigenen Reptationsröhre zu diffundieren (Reptationsdiffusionszeit τ_{rept}). Benutzt man Gleichung 2.11 zur Berechnung der Größenordnung dieser Zeit mit gemessenen Werten für die Reptationsdiffusionskonstante von etwa $D_{\text{rept}} \approx 1 \cdot 10^{-16} \text{ m}^2/\text{s}$ [Dichtl und Sackmann, 1999] und typischen mittleren Konturlängen von $\approx 22 \mu\text{m}$ [Kaufmann et al., 1992], erhält man Werte von τ_{rept} im Bereich von über 100 Stunden.

Diese Zeit mag nun die Reptationsdiffusion korrekt charakterisieren, sie ist jedoch sicherlich nicht identisch mit jener Zeit, auf der Netzwerkspannungen tatsächlich relaxieren. So liegt die aus der täglichen Erfahrung des Experimentators mit Aktinnetzwerken heraus geschätzte Relaxationszeit $\tau_r^{\text{fließ}}$ (definiert als die Zeit auf der das Netzwerk fließt), bei etwa 10-100 Minuten. Diese Zeitskala stimmt hinreichend gut mit makrorheometrischen Messungen der terminalen Relaxationszeit von z.B. [Hinner et al., 1998] ($\tau_r^{\text{Makro}} \approx 30\text{-}70$ Minuten für ein ca. $25 \mu\text{M}$ Netzwerk und einer mittleren Filamentlänge von $\approx 20 \mu\text{m}$) überein. Auch die Extrapolation der gemessenen terminalen Relaxationszeiten mittels oszillierender Mikrorheometrie [Schmidt et al., 2000], bei der terminale Relaxationszeiten für mittlere Filamentlängen von $1.5 \mu\text{m}$, $2.5 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$ und $10 \mu\text{m}$ auf die mittlere Filamentlänge von $22 \mu\text{m}$ hochgerechnet werden, ergibt eine Zeit, die in dieser Größenordnung liegt ($\tau_r^{\text{Mikro}} \approx 45 \pm 20$ Minuten).⁵

Nimmt man daraus folgend als mittlere Relaxationszeit einen Wert von 50 Minuten ($\hat{=}$ 3000s), folgt nach Gleichung 2.11 eine relaxierende Diffusionskonstante D_r für die Relaxation von $D_r = 1.5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$. Ein solcher Wert entspricht den Diffusionskonstanten, die auf

⁵Für die Extrapolation wurden die Relaxationsfrequenzen f_r für die durchschnittlichen Filamentlängen von $l = 1.5 \mu\text{m}$, $l = 2.5 \mu\text{m}$, $l = 5 \mu\text{m}$ und ein geschätzter f_r Wert von 0.002s für $l = 10 \mu\text{m}$ aus der Abbildung Fig. 3 ausgelesen. An die zugehörigen Relaxationszeiten als Funktion der Länge wurde eine quadratische Funktion angepasst (vergl. Gl. 2.11), um den Wert für $22 \mu\text{m}$ zu erhalten. Minimal bzw. maximal verträgliche Kurven definieren den Fehler.

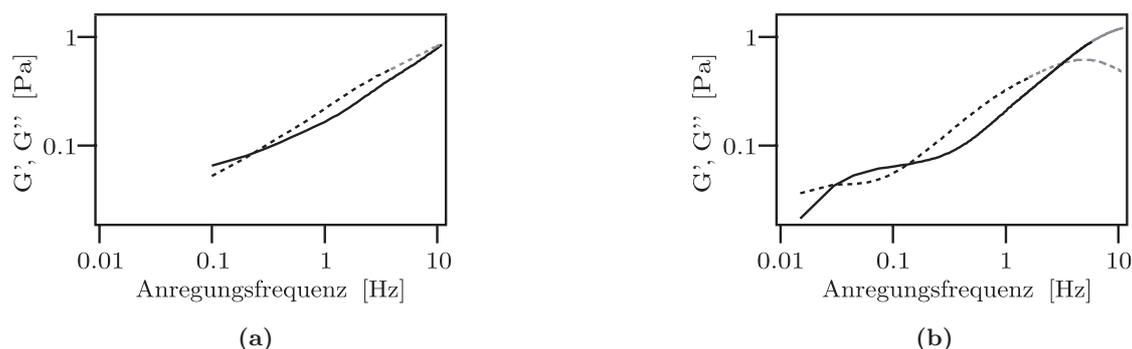


Abbildung 5.8: Unterschied des komplexen Relaxationsmoduls G^* für einen gekürzten Puls (10s, (a)) und den vollständigen Puls (35 s, (b)). Die durchgezogenen Linien kennzeichnen G' , die gestrichelten Linien G'' . ($10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5 \mu\text{m}$ Kugel, $F = 17.4 \text{ pN}$. Vergleiche dazu auch Abb. 5.4.).

kürzeren Zeitskalen (typischerweise bis 20 s) mittels Autokorrelationsanalysen von kolloidal markierten Aktinfilamenten gemessen wurden. Die Werte schwanken bei einem $12 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk je nach verwendetem Kolloid (Gold bzw. Latex) sowie je nach analysierter Bewegungsrichtung (in Filamentachse bzw. senkrecht zur Filamentachse) zwischen $1.5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ und $5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ [Dichtl, 1997]. Eine direkte Berechnung von D_r aus den in [Schmidt et al., 2000] präsentierten Daten mittels Gleichung 2.11 ergibt ebenfalls eine Diffusionskonstante für die Netzwerkrelaxation von $D_r \approx 4 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass andere Mechanismen bei der Spannungsrelaxation des Netzwerks eine Rolle spielen, als die reine Reptationsdiffusion über die komplette Konturlänge. Für die Interpretation transientser mikrorheologischer Experimente ist die Verwendung der senkrechten Kurzzeit-Diffusionskonstante D_{\perp} bereits erklärt (vergl. Gl. 2.30 in Kapitel 2.2), für die makroskopische Relaxation von Spannungen im Netzwerk steht diese Erklärung jedoch noch aus.

Exkurs:

Eine möglicher Denkansatz wäre, dass es zur Spannungsrelaxation ausreicht, wenn auf einer gewissen Zeitskala genügend Filamente (A) ca. eine Maschenweite weit diffundieren, um einem gewissen Prozentsatz anderer Filamente (B) die Relaxation quer zur Achse dieser Filamente zu erlauben. Ein anderer Teil Filamente (A') ist kurz darauf eine Maschenweite weit diffundiert und erlaubt den Filamenten (B') die Relaxation. Da dies im kollektiven Netzwerk ein kontinuierliches Phänomen ist, reicht also möglicherweise die Diffusion über die Dimension einer Maschenweite (die durch die Kurzzeitdiffusionskonstante in der Größenordnung $\mathcal{O}(1 \cdot 10^{-13}) \text{ m}^2/\text{s}$ bestimmt ist), um Netzwerkspannungen global zu relaxieren. Ob die Effektivität dieses Prozesses wirklich ausreicht, sollte (z.B. mittels Simulationen) überprüft werden.

Die Mittelung der Relaxationsfrequenzen aus den komplexen Relaxationsspektren ergibt für ein $10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk und Sondenkugeln mit einem Durchmesser von $4.5 \mu\text{m}$:

$$f_r = 0.05 \pm 0.02 \text{ Hz}$$

Daraus ergibt sich für die Mikrosonde eine mittlere Relaxationszeit von $\tau_r = 20 \text{ s}$. Berechnet man mit diesem Wert und der relevanten Diffusionskonstante von $D_{\perp} 3 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ die korrespondierende Längenskala ($l = \sqrt{\pi^2 D \tau}$), dann erhält man einen Wert von $l = 2.4 \mu\text{m}$. Dieser

Wert entspricht größenordnungsmäßig dem Radius R des Sondenpartikels ($R = 2.25 \mu\text{m}$), wie es im Bild der neuen Theorie zu erwarten ist. In der klassischen Interpretation würde das eben beschriebene Ergebnis bedeuten, dass die mittlere Filamentlänge in der Probe nur noch etwa $2.5 \mu\text{m}$ beträgt, was nicht der Fall ist.

Die Diskrepanz der berechneten relevanten und der theoretisch erwarteten Längenskala ist ein eindrucksvoller Beweis dafür, dass eine Interpretation von Langzeitmessungen mittels Sondenpartikeln nicht komplett mit Hilfe der klassischen Ersatzschaltbildtheorie (mit Ersatzschaltbildern aus Elastizitäten und Viskositäten) möglich ist. Wenn man die makroskopischen Netzwerkeigenschaften aus Sondenkomplianzmessungen korrekt ableiten möchte, muss ein weiteres Element, nämlich die Diffusion der Polymere über die Dimension des Kugelradius, mit einbezogen werden. Hierzu sei noch einmal auf die Kapitel 2.2 und 5.4 verwiesen.

Bei kürzeren Messzeiten ($T \lesssim 30 \text{ s}$) war keine terminale Relaxationszeit messbar. Kurven aus so kurzen Messzeiten weisen auch kein ausgeprägtes Gummiplateau mehr auf. Aus diesen Messungen kann lediglich ein Wert für τ_e und die Steigung α (vergl. Abb. 5.8) extrahiert werden.

Absolutwert und Lage des Gummiplateaus Als Gummiplateau bezeichnet man den weitgehend frequenzunabhängigen Bereich konstanten Speichermoduls, in dem der Verlustmodul ein lokales Minimum aufweist und sich das Aktinnetzwerk deshalb wie ein elastischer Festkörper verhält. Zeitlich liegt dieser Bereich zwischen τ_e und τ_r . Basierend auf dem Reptationsröhrenmodell kann folgende Beziehung für den Absolutwert des (konstanten) Plateaumoduls G_0 hergeleitet werden [Hinner et al., 1998]:

$$G_0^{\text{Th.}} = \frac{9 k_B T}{5 l_e \xi^2} \quad (5.2)$$

mit Gleichung 2.9 für l_e , folgt daraus $G_0 \approx 3 k_B T / l_p^{1/5} \xi^{14/5}$. Setzt man die entsprechenden Werte für ein $10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk ein, folgt ein Wert von

$$G_0^{\text{Th.}} \approx 0.04 \text{ Pa}$$

Um aus den im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Relaxationsspektren das Plateaumodul zu extrahieren, wurde bei deutlich ausgeprägtem plateauartigem Verhalten immer der Wert von G' benutzt, bei dem G'' lokal minimal war. War das Plateau aufgrund zu kurzer Messzeiten nicht vollständig erfasst, wurde der niedrigste noch gemessene G' -Wert benutzt, falls der Beginn des Plateaus in den Daten deutlich erkennbar war, andernfalls wurde die Messung nicht zur Auswertung von G_0 herangezogen. Der Mittelwert des gemessenen Plateaumoduls beträgt

$$G_0 = 0.07 \pm 0.04 \text{ Pa}$$

Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit der theoretischen Vorhersage, er wird allerdings im nächsten Paragraphen über die Kraftabhängigkeit der Messungen noch leicht präzisiert. Da sich die Größenordnung des G_0 -Wertes dabei aber nicht mehr ändert, soll schon hier die Einordnung dieses Wertes in das Spektrum der Ergebnisse anderer Messungen erfolgen: Für aktuelle oszillatorische mikrorheologische Untersuchungen ergibt sich ein vergleichbarer Wert ($G_0 \approx 0.03 \text{ Pa}$ [Ziemann et al., 1994], $G_0 \approx 0.05 \text{ Pa}$ [Schmidt et al., 2000], bzw. vergl. Abb. 5.7). Auch makrorheometrische Messungen liefern Plateaumodule in diesem Bereich ($G_0 \approx 0.03 \text{ Pa}$ [Hinner et al., 1998]) oder etwas höher ($G_0 \approx 0.08 \text{ Pa}$ [Schmidt et al., 2000]). Dagegen misst [Mason et al., 2000] mittels DWS etwas höhere Werte von $G_0 \approx 0.2 \text{ Pa}$.⁶

⁶Die in diesen Veröffentlichungen angegebenen Plateaumodule wurden für Aktinkonzentrationen zwischen 7

Vergleich der Plateaumodule	
Quelle	G_0
Theorie	≈ 0.04 Pa
Eigene Messung (transiente Sondenkomplianzmessung)	0.07 ± 0.04 Pa
... um den Krafteinfluss korrigierter Wert	0.03 ± 0.01 Pa
Oszillierende Sondenkomplianzmessungen	0.03-0.05 Pa
Makrorheometrische Messungen	0.03-0.08 Pa
DWS	≈ 0.2 Pa

Tabelle 5.2: Mittels verschiedener Methoden gemessene Plateaumodule für Aktinnetzwerk. Alle Werte sind auf eine Konzentration von $10\mu\text{M}$ umgerechnet. Referenzen siehe Text.

Diese Unterschiede können nicht so leicht erklärt werden und liegen möglicherweise einzig an der extremen Empfindlichkeit des Plateaumoduls gegenüber Verunreinigungen des Aktins (z.B. durch Präparation, Alterung oder Lagerung). So ist denkbar, dass unterschiedliche Gruppen nicht aufgrund der verwendeten Methoden (leicht) verschiedene G_0 -Werte messen, sondern weil z.B. das Aktin bei leicht unterschiedlichen Bedingungen gelagert wird. Es wären weitere Versuche von möglichst verschiedenen Methoden an derselben Aktincharge nötig, um diese Frage abschließend zu beantworten.

Zum Vergleich der aufgezählten Plateaumodule sei auf die Tabelle 5.2 verwiesen, in welcher auch der um den Krafteinfluss korrigierte Wert für G_0 zu finden ist.

Kraftabhängigkeit des Gummiplateaus Ein völlig neuartiges Ergebnis ist die Abhängigkeit des mittels Mikrosonden gemessenen Gummiplateaus von der extern angelegten Kraft F^{ext} . Zur Zeit gibt es dazu noch keine theoretischen Vorhersagen, da sich alle bisher entwickelten Theorien entweder direkt auf die passive Mikrorheologie beziehen oder explizit lineare Theorien sind. Da jedoch innerhalb der hier vorgestellten Messungen die Bedingung der kleinen Amplituden (vergl. Kap. 2.1.1) völlig missachtet werden (typische Kugelauslenkungen liegen bei etwa dem 10fachen des Sondendurchmessers), ist es nicht verwunderlich, dass nichtlineare Effekte auftreten. Im nächsten Kapitel wird allerdings eine Erklärung für die Kraftabhängigkeit des Plateaus im Rahmen der neuen osmotischen Theorie geliefert, die mittels einfacher Abschätzungen einen skalierenden Exponenten β von $\beta \approx 0.6$ vorhersagt.

Führt man eine lineare Regression durch um die Stärke der Abhängigkeit und den Plateaumodul für $F^{\text{ext}} \rightarrow 0$ (also für den passiven, rein thermisch getriebenen Fall) abzuschätzen, erhält man folgende Ergebnisse:

Die Abhängigkeit des Plateaumoduls von der Kraft, mit der die Mikrosonde ausgelenkt wird, ergibt sich zu

$$\Delta G_0(F^{\text{ext}})/\Delta F^{\text{ext}} = 2 \pm 0.5 \text{ mPa/pN}$$

Daraus lässt sich ableiten, dass schon bei moderaten Kraftamplituden von z.B. 50 pN eine relative Verfälschung des Messwertes $u^{\text{rel}}(G_0)$ von ca. $u^{\text{rel}} \approx 30\%$ erfolgt. Die Kraftabhängigkeit sollte deshalb, außer bei Messungen mit sehr kleinen Kraftamplituden ($F^{\text{ext}} < 15 \text{ pN} \Rightarrow u^{\text{rel}} \lesssim 10\%$) explizit berücksichtigt werden.

und $30\mu\text{M}$ gemessen. Um die Werte vergleichen zu können, wurden alle Module mittels der Beziehung $G_0 \propto c_A^{7/5}$ (Gl. 2.5 für die Maschenweite in Gl. 5.2 eingesetzt) auf eine Konzentration von $10\mu\text{M}$ ($\hat{=} 0.42\text{mg/ml}$) heruntergerechnet.

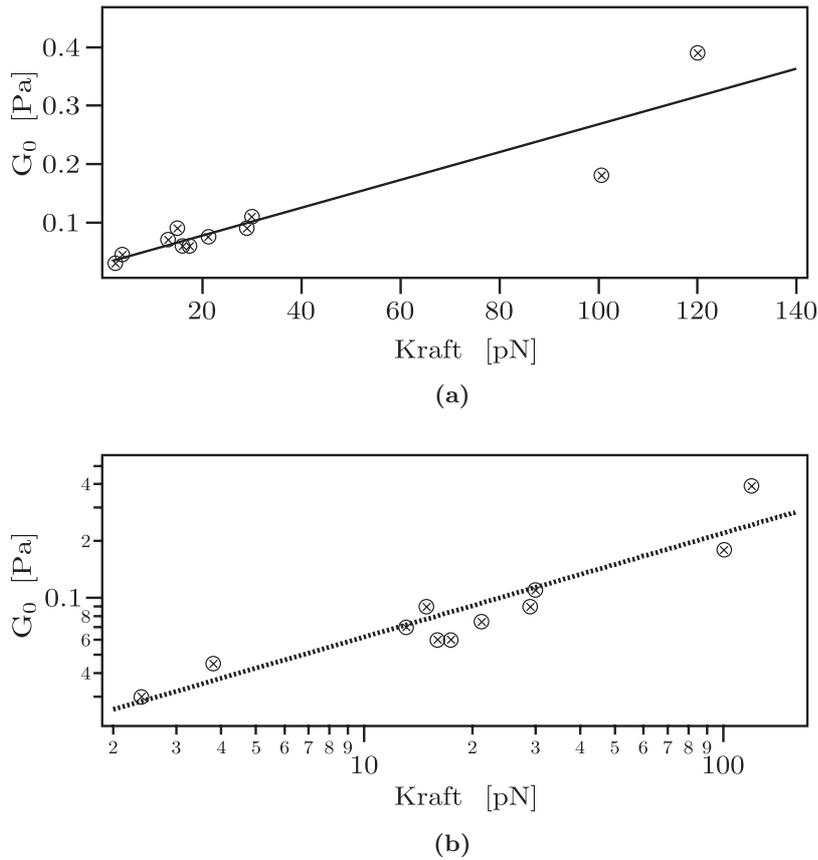


Abbildung 5.9: Abhängigkeit des Gummiplateaus einer $10 \mu\text{M}$ Aktinlösung von der Kraft auf die Sondenkugel bei einer Messung mit aktiver transientser Mikrorheologie ($4.5 \mu\text{m}$ Kugeln). (a) Lineare Darstellung der Kraftabhängigkeit mit angepasster Gerade (schwarze Linie). Die Steigung beträgt ca. 2 mPa/pN , eine Interpolation für $F \rightarrow 0$ liefert ein Kräfteinflussbereinigtes Plateaumodul von ca. $G_0^{\text{korrt}} = 0.03 \text{ Pa}$. (b) Doppelt logarithmische Auftragung der Kraftabhängigkeit. Die gestrichelte Linie ist die beste angepasste Gerade. Die Steigung und damit der Exponent für ein Potenzgesetz liegt bei etwa $\alpha = 0.56$.

Für fehlende externe Kräfte (thermische Bewegung) kann der Plateaumodul auf $F^{\text{ext}} = 0$ extrapolierte werden. Der um den Krafteinfluss linear korrigierte Wert für G_0 ergibt sich dabei zu

$$G_0^{\text{kor}} = 0.03 \pm 0.01 \text{ Pa}$$

Dieser korrigierte Wert liegt nun in hervorragender Übereinstimmung mit oszillatorischen mikrorheologischen Messungen und den „weichsten“ Ergebnissen der anderen Methoden bzw. Gruppen. Die lineare Regression der Daten ist in Abbildung 5.9(a) dargestellt.

Um die Kraftabhängigkeit des Gummiplateaus auf ein skalierendes Verhalten der Art $G_0(F) \propto F^\beta$ zu untersuchen, wurde an die Daten in doppelt logarithmischer Darstellung eine lineare Funktion angepasst. Das Ergebnis ist ein skalierender Exponent von

$$\beta = 0.56 \pm 0.14$$

für den Bereich von 2.4-120 pN. Wie sich im nächsten Kapitel zeigen wird, gibt es eine plausible Erklärung für einen skalierenden Exponenten von dieser Größenordnung. Es ist außerdem Anzumerken, dass das Skalenverhalten nur bis etwa $F^{\text{ext}} \approx 1 \text{ pN}$ gültig ist, da unterhalb dieses Wertes das thermische Rauschen der Sondenpartikel gegenüber den erzwungenen Auslenkungen groß wird. In diesem Bereich muss also für G_0 der konstante Wert passiver rheologischer Messungen benutzt werden.

5.2.2.3 Zusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Umrechnung von Kriechkomplianzdaten auf den komplexen Relaxationsmodul mittels der neuen, fehlerunanfälligen Methode nach Liu genauere Ergebnisse liefert, als die hergebrachte Methode nach Hopkins und Hamming.

Anhand der Spektren einer halbverdünnten Aktinlösung, die mittels dieser Methode berechnet wurden, konnte gezeigt werden, dass transiente mikrorheologische Messungen an Aktinnetzwerken gleichwertig zu Messungen durch andere Methoden sind. Die berechneten Spektren entsprachen in ihrer Form den theoretischen Vorhersagen und die Netzwerkeigenschaften eines $10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerkes konnten in mehreren Bereichen reproduziert und im Rahmen der benutzten linearen Theorie mehr oder weniger befriedigend erklärt werden.

Gute Übereinstimmung ergab sich für die $f^{3/4}$ -Abhängigkeit für hohe Frequenzen. Der gemessene Exponent von $\alpha = 0.84 \pm 0.09$ liegt gegenüber theoretischen Vorhersagen etwas zu hoch, dieses Ergebnis wird jedoch auch von anderen Gruppen reproduziert und ist konsistent mit einem in der Theorie vorhergesagten Übergangsbereich. Die Übereinstimmung der gemessenen Entanglement-Zeit $\tau_e \approx 2 \text{ s}$ mit Theorie und Messungen anderer Gruppen ist bestens. Eine deutliche Abweichung von theoretischen Vorhersagen ergibt sich hauptsächlich für lange Zeiten und zwar derart, dass die terminale Relaxation τ_r schon bei kleineren Zeiten ($\tau_r = \mathcal{O}(20 \text{ s})$) gemessen wird, als es nach klassischen Theorien zu vermuten wäre. Diese Abweichung zeigt, dass die hergebrachte Methode zur Beschreibung von verschlauften Netzwerken semiflexibler Polymere, nämlich die Beschreibung mittels mechanischer Ersatzschaltbilder aus Elastizitäten und Viskositäten, für diese Art der Experimente erweitert werden sollte. Die Abweichung ist im Rahmen der neuen Theorie leicht zu erklären, wenn man davon ausgeht, dass die Filamente lediglich mit ihrer transversalen Diffusionskonstante aus dem Pfad der Kugel diffundieren müssen, damit sich ein Fließgleichgewicht einstellt. Auch die gefundene Kraftabhängigkeit des gemessenen Gummiplateaus von $G_0 \propto F^{0.56 \pm 0.14}$ kann mit der neuen Theorie erklärt werden (Siehe nächstes Kapitel). Sie sollte bei Auswertungen von experimentellen Daten ab etwa 15 pN Kraftamplitude explizit berücksichtigt werden.

5.3 Direktauswertung transienter Sondenkomplianzmessungen halbverdünnter Aktinnetzwerken

5.3.1 Einleitung

Die Umrechnung aktiver, transienter Sondenkomplianzmessungen halbverdünnter Aktinnetzwerke in komplexe Relaxationsmodule hat mehrere Nachteile:

1. Innerhalb der herkömmlichen Methode werden mechanische Ersatzschaltbilder, welche ausschließlich aus Elastizitäten und Viskositäten bestehen, zur Interpretation und Umrechnung der Kurven benutzt. Wie in diesem Kapitel gezeigt werden wird, können aber einige Eigenschaften der gemessenen Kriechkomplianzkurven nur schlecht in Rahmen dieser Modellvorstellung abgebildet werden.
2. Alle Theorien, die bisher zur Interpretation solcher Messungen entwickelt wurden, sind explizit linear in der Kraft und somit *A priori* nicht geeignet, die dieser Arbeit zugrunde liegende Messung, welche eine deutliche nicht-lineare Kraftabhängigkeit zeigen, zu beschreiben.
3. Jegliche Art von Umrechnung, wie sie innerhalb des letzten Kapitels vorgestellt wurde, ist mit Fehlern und Informationsverlusten behaftet, da bei den verwendeten Methoden eine Integration über unendliche Zeiten durch eine Summe über endliche Zeiten ersetzt wird (vergl. Gl. 2.18).

Dazu einige Anmerkungen: Der erste Punkt könnte umgangen werden, indem man im zu minimierenden Konvolutionsintegral (Gl. 2.16) einen verbesserten Ansatz für $G(t)$ einsetzt. Allerdings ist nicht klar, wie sich die Kraftabhängigkeit, die sich bei den gemessenen Kriechkomplianzkurven zeigt (siehe zweiter Punkt der Aufzählung), in dieser Umrechnung zu berücksichtigen ist. Letztendlich bleibt aber immer der dritte Punkt, der Informationsverlust bzw. die Zunahme der Fehler durch die Umrechnung. Diese Einflüsse kann man grundsätzlich nicht verhindern sondern nur minimieren.

Als bessere Vorgehensweise empfiehlt sich somit, zuerst Theorien zu entwickeln durch welche aktive, transiente Messungen direkt interpretiert werden können. Wenn anhand dieser Theorien die Eigenschaften der Messungen befriedigend erklärt werden können, so kann daraufhin in einem späteren Stadium versucht werden, Aussagen über das Relaxationsverhalten der Aktinlösungen auf der Basis dieser Modelle zu erlangen.

Im Folgenden werden deshalb direkte Komplianzauswertungen von halbverdünnten Aktinnetzwerken vorgestellt. Speziell wird die nicht-triviale Wurzelabhängigkeit von der Zeit sowie verschiedene Antwortkurvenformen für verschiedenen Messkräfte untersucht. Dabei werden Korrekturen für kurze Messzeiten und starke Kraftschwankungen entwickelt. Danach folgt eine systematische Untersuchung der Abhängigkeiten verschiedener viskoelastischer Materialparameter von der angelegten Kraft bzw. von der verwendeten Maschenweite des umgebenden Netzwerkes. Abschließend erfolgt eine Diskussion der Langzeitschwankungen der Kriechkomplianz.

5.3.2 Durchführung & Auswertung

Die Messungen wurden wie in Kapitel 5.1.3 beschrieben durchgeführt. Die auf die an jedem Ort wirkende Kraft normierten Sondenpositionen werden jedoch nicht mit dem geometrischen Faktor von $g = 6\pi R_{\text{Kugel}}$ multipliziert, da dieser für die Untersuchungen der Zeit- und Kraftabhängigkeiten unerheblich ist. Zusätzlich erleichtert die Angabe der kraftnormierten

Auslenkung ohne die Normierung mittels g die Interpretation der Daten, da die Kurven bei bekannter Kraft sehr leicht in die totale Kugelauslenkung umzurechnen sind. Diese Größe ist sicherlich von größerem Interesse als die Angabe von J in korrekten Einheiten. Die kraftnormierte Auslenkung wird deshalb ab jetzt mit der Kriechkomplianz gleichgesetzt:

$$J \equiv x(t)/F(x) [m/N]$$

Sobald die Kriechkomplianz mittels des Faktors g auf die korrekte Einheit [Fläche/Kraft] umgerechnet wird, um einen Vergleich der Absolutwerte mit anderen Methoden zu ermöglichen, wird an der entsprechenden Stelle darauf hingewiesen.

5.4 Komplianzkurven halbverdünnter Aktinlösungen bei unterschiedlichen Kräften

In diesem Kapitel werden typische Komplianzkurven für unterschiedliche Kräfte vorgestellt. Im Folgenden soll dabei zwischen *schwachen*, *mittleren* und *hohen* Kräften unterschieden werden. Dabei sind diese drei Bereiche nicht über absolute Kräfte, sondern über die Art der resultierenden Komplianzkurven definiert. Die Absolutwerte können dabei, je nach Netzwerkdicke, Kugelgröße oder lokalen Inhomogenitäten schwanken:

- Dominiert in den resultierenden Komplianzkurven der Einfluss der thermischen Anregung das Antwortverhalten der Sondenkugeln, so wird die angelegte Kraft als *schwach* definiert. Bei einem $10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk und $4.5 \mu\text{m}$ Kugeldurchmesser liegt dieser Bereich größenordnungsmäßig bei $F \lesssim 2 \text{ pN}$.
- Zeigen sich bei steigender Kraft in den resultierenden Komplianzkurven mindestens drei deutlich getrennte Bereiche, in denen Potenzgesetze das Antwortverhalten der Sondenpartikel beschreiben, so gilt die angelegte Kraft als *mittel*. Bei einem $10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk und $4.5 \mu\text{m}$ Kugeldurchmesser liegt dieser Bereich größenordnungsmäßig bei $F \gtrsim 2 \text{ pN}$.
- Zeigt sich in den Kurven bei weiter steigender Kraft zunehmend ein nichtlinearer Einfluss der Kraft, so gilt die angelegte Kraft als *hoch*. Der Übergang in diesen Bereich ist fließend. Bei einem $10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk und $4.5 \mu\text{m}$ Kugeldurchmesser liegt er bei $40\text{-}80 \text{ pN}$.

5.4.1 $J(t)$ für schwache Kräfte

In diesem Kapitel wird eine sinnvolle untere Grenze für die benutzten Kräfte bei aktiven Messungen und eine speziell bei schwachen Kräften auftretende Kurvenform der Kriechkomplianz diskutiert.

5.4.1.1 Ergebnisse und Diskussion

Ein Problem der Auswertung von aktiven Sondenkomplianzmessungen bei schwachen Kräften liegt darin, dass das Rauschen der Kurven in der Größenordnung der Gesamtauslenkung der Sondenkugeln während eines Kraftpulses liegt. Dieses Rauschen hat zwei Ursachen:

1. Thermisches Rauschen, d.h. eine tatsächliche Fluktuation des Sondenpartikels aufgrund von thermische verursachten Stößen zwischen Sondenpartikel, Lösungsmittel und Polymeren (Brownsche Bewegung des Sondenpartikels im Potenzial des umgebenden Netzwerkes).

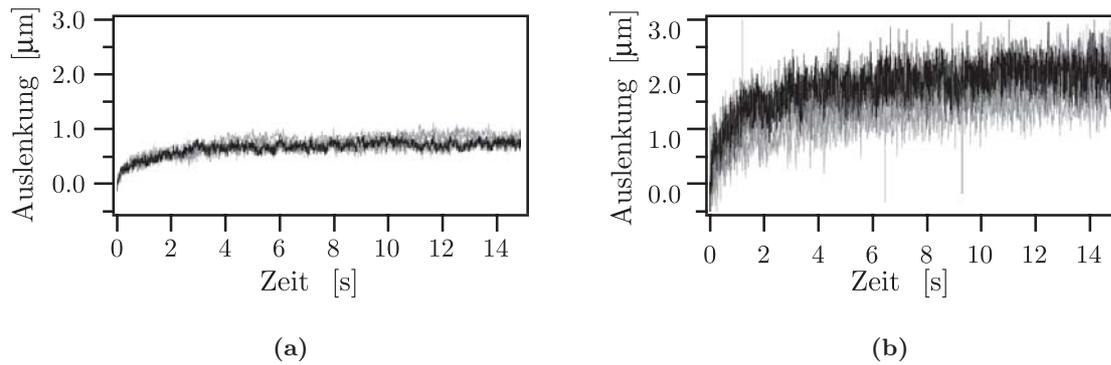


Abbildung 5.10: Positionen von $4.5\mu\text{m}$ Sondenpartikeln in einem $10\mu\text{M}$ Aktinnetzwerk mit Rauschen in der Größenordnung der Gesamtauslenkung. Das durch Brownsche Bewegung verursachte Rauschen (a) kann durch schlechte Bildqualität bei der Kugelnachverfolgung noch verstärkt werden (b). Gezeigt sind jeweils vier Auslenkungen, die von Magnetkraftpulsen der Stärke $F^{\text{ext}} = 1.1\text{ pN}$ (a), bzw. $F^{\text{ext}} = 1.9\text{ pN}$ (b) erzeugt wurden. Ein Puls ist jeweils zur Verdeutlichung schwarz hervorgehoben.

2. Digitales Rauschen, welches bei schlechtem Bildmaterial⁷ durch das Unvermögen des Kugelnachverfolgungsalgorithmus, den Mittelpunkt des Sondenpartikels exakt zu lokalisieren, verursacht wird.

Da die maximale Auflösung des Nachverfolgungsalgorithmus für diesen Typ von Kugeln bei einigen 10 nm liegt [Schilling, 2003], kann man bei gutem Bildmaterial davon ausgehen, dass das resultierende Rauschen rein thermischer Natur ist (vergl. Abb. 5.10(a)).

Größere Rauschamplituden (vergl. Abb. 5.10(b)) sind auf die Bildverarbeitung zurückzuführen und haben keine physikalische Relevanz. Leider ist es nicht immer möglich, optimale Bilder zu erhalten, da der Vorteil der benutzten Methode ja gerade darin besteht, mehrere Sondenkugeln gleichzeitig zu verfolgen. Da die Kugeln aber statistisch in der Probe verteilt sind, kann im Prinzip immer nur eine Kugel exakt scharf eingestellt werden. In der Praxis sind die Kugeln aufgrund ihrer Größe jedoch auch einige Mikrometer ober- und unterhalb der Fokalebene sichtbar, wenn auch zunehmend verschwommen.

Ein großer Nachteil bei Messungen mit kleinen Kräften ist, dass für kurze Zeiten (außer mit passiver Rauschanalyse) überhaupt keine Abhängigkeiten der Auslenkung von der Zeit untersucht werden können. Der Vorteil aktiver Messungen geht also völlig verloren. In einer einfachen logarithmischen Auftragung wie in Abbildung 5.11 erkennt man, dass selbst für eine Kraft von knapp 2 pN das Rauschen bis etwa 0.1 Sekunde jegliche Abhängigkeit überlagert. Eine sinnvolle Kraft für aktive Sondenkomplianzmessungen sollte also so gewählt werden, dass bereits nach einigen wenigen Messpunkten die durch die Kraft verursachte Auslenkung größer als das Rauschen wird.

Eine Rauschanalyse der in Abb. 5.10(a) gezeigten Kurve in einem Bereich, der vor dem Beginn des Kraftpulses liegt (Bereich nicht gezeigt), liefert einen Wert für die Wurzel der mittleren quadratischen Auslenkung (RMS) von $\sqrt{\langle x^2 \rangle} = 0.07\mu\text{m}$ (bzw. $\text{MSD} \langle x^2 \rangle = 5 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$). Aus diesem passiv gemessenen Wert kann man leicht die Federkonstante κ_{th} des Potentials bestimmen, welches die Kugel an ihrem Platz zu halten versucht: Die Wahrscheinlichkeitsverteilung $\Psi(x)$ für den Aufenthaltsort des Teilchens ist proportional zum Quotienten aus

⁷Schlechteres Bildmaterial entsteht z.B., wenn die nachverfolgte Sondenkugel nicht vollständig im Fokus der Mikroskopoptik liegt.

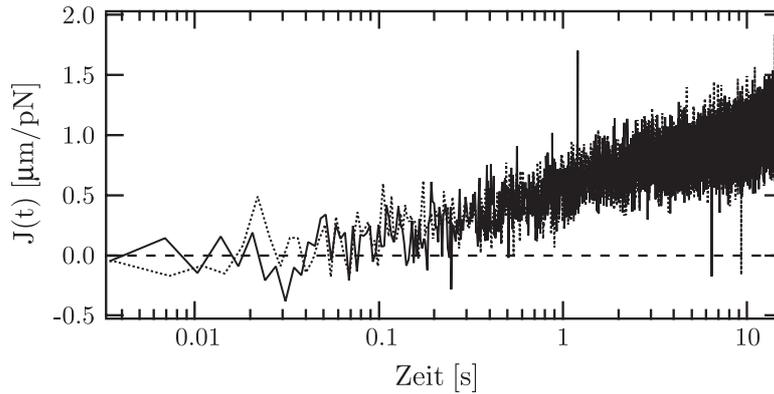


Abbildung 5.11: Komplianz einer verrauschten Kurve, aufgetragen gegen den Logarithmus der Zeit. Gut zu erkennen ist, dass bis etwa 0.1 Sekunde keine Zeitabhängigkeit der Komplianz bestimmt werden kann, da das Rauschen diese Information komplett überlagert.

potentieller und thermischer Energie:

$$\Psi \propto e^{-E_{\text{Pot}}/k_B T} = e^{-\kappa_{\text{th}} x^2 / 2k_B T} \quad (5.3)$$

Da die mittlere quadratische Auslenkung der Standardabweichung entspricht, folgt:

$$\langle x^2 \rangle = 2k_B T / 2\kappa_{\text{th}} \quad \Rightarrow \quad \kappa_{\text{th}} = 2k_B T / \langle x^2 \rangle \quad (5.4)$$

Setzt man die entsprechenden Werte ein, folgt daraus die (statische) Federkonstante von $\kappa_{\text{th}} \approx 1.5 \cdot 10^{-6} \text{ N/m}$ ($\kappa_{\text{th}} = 1.5 \text{ pN}/\mu\text{m}$). Dieser Wert liegt etwa zwei Größenordnungen über der Federkonstante $\kappa_{\perp, \text{Akt}}$, die ein einzelnes Aktinfilament in einem vergleichbaren Netzwerk in seiner Reptationsröhre spürt: $\kappa_{\perp, \text{Akt}} \approx 5 \cdot 10^{-8} \text{ N/m}$ [Dichtl und Sackmann, 1999]. Daraus lässt sich schließen, dass Sondenkugeln dieser Größe vom umgebenden Netzwerk stark in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt werden und insbesondere, dass eine von außen angelegte Kraft dieses Potential überwinden muss, um die Kugel aus ihrem Filamentkäfig heraus zu bewegen. Ist die Kraft dafür zu schwach, sollte sich das Antwortverhalten gegenüber stärkeren Kräften verändern: Auf den Zeitskalen, auf denen das Netzwerk für die aktiven Experimente sonst zunehmend viskos erscheint, sollte das Antwortverhalten bei kleinen Kräften elastisch bleiben. Tatsächlich sättigen die meisten Komplianzkurven für sehr kleine Kräfte auf den beobachteten Zeitskalen. Nach Abschalten der Kraft relaxieren die Sonden im Rahmen der Messgenauigkeit vollständig (vergl. Abb. 5.12).

Für derart sättigende Kurven kann die Langzeitfederkonstante direkt aus der inversen Sättigungskomplianz abgelesen werden (vergl. Abbn. 5.13). Aus Komplianzen in der Größenordnung $J \approx 0.75 \mu\text{m}/\text{pN} - 1 \mu\text{m}/\text{pN}$ folgt die Federkonstante $\kappa_F = \mathcal{O}(1 \text{ pN}/\mu\text{m})$. Passive und aktive Messungen passen also gut zusammen.

Insbesondere zeigt sich aus dieser Übereinstimmung, dass das Rauschen in der eben beschriebenen Größenordnung wirklich thermischer Natur ist. Es ist also nicht möglich, durch höhere Auflösungen der Optik oder durch andere Maßnahmen diesen Rauschanteil zu verringern. Damit wird gleichzeitig gezeigt, dass die relativ kleine Vergrößerung, die für diese Experimente gewählt wurde, absolut ausreichend ist.

Weitere Messungen haben gezeigt, dass schon geringfügig höhere Kräfte ($\approx 2.5 \text{ pN}$) ausreichen, damit die gemessenen Komplianzkurven die theoretisch erwartete Form annehmen. Der Unterschied zwischen den sättigenden und den theoretisch erwarteten Kurven kann einfach quantifiziert werden: Benutzt man als Näherung für die kraftnormierte Sondenantwort

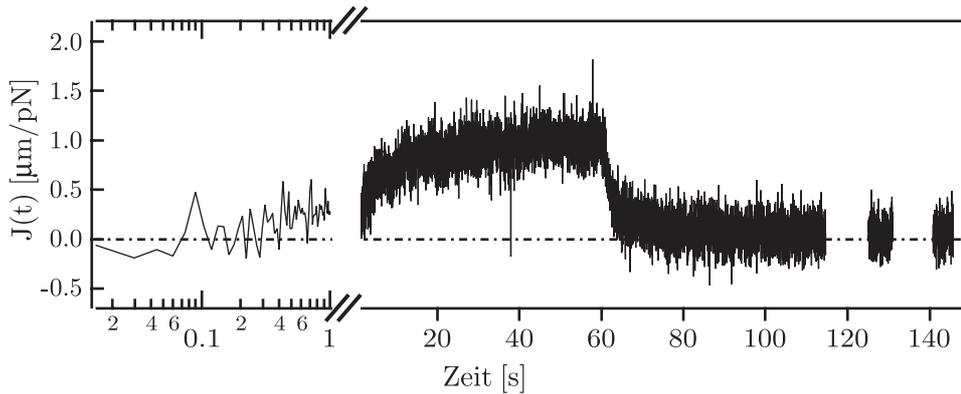


Abbildung 5.12: Totale Relaxation der Sondenauslenkung bei kleinen Kräften. Gezeigt ist die Komplianz $J(t)$, aufgetragen gegen den Logarithmus der Zeit (bis 1 s) und gegen die Zeit (ab 1 s). Die erzwungene Auslenkung relaxiert im Rahmen der Messungenauigkeit (thermisches + digitales Rauschen) vollständig. Die Lücken oberhalb von 100 Sekunden kennzeichnen Messpausen und haben keine weitere Bedeutung. ($10\ \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5\ \mu\text{m}$ Sondenkugeln, Kraftpuls: $1.88\ \text{pN}$ für 60 s, Gesamtauslenkung $\approx 1.85\ \mu\text{m}$.)

$J(t)$ (im klassischen viskoelastischen Bild) eine Reihenschaltung von Voigt-Elementen (vergl. Abb. 2.5 in Kap. 2.1.1), so kann bei sättigenden Kurven die Sondenantwort mit nur zwei Elementen beschrieben werden. Speziell ist die größere Relaxationszeit deutlich kleiner als die Pulslänge. Eine exponentielle Sättigung wird also schon auf den beobachteten Zeitskalen erreicht.

Um dies zu zeigen, wurde an die Daten folgende Funktion angepasst (Antwortverhalten eines Multi-Voigt-Modells, vergl. Abb. 5.14(a)):

$$J^{\text{th}}(t) = \sum_n \kappa_n^{-1} (1 - e^{-t/\tau_n}) \quad \text{mit } \tau_n = \eta_n / \kappa_n \quad (5.5)$$

Dabei sind sowohl die τ_n als auch die κ_n freie Parameter der Anpassung. Um die Güte der Anpassung zu beurteilen, wird die mittlere quadrierte Summe aller Differenzen zwischen Anpassung und Originaldaten (normiert auf die Standardabweichung σ) betrachtet:

$$\langle \chi^2 \rangle \equiv \frac{1}{N} \sum_i \left(\frac{J(t_i) - J^{\text{fit}}(t_i)}{\sigma} \right)^2 \quad (5.6)$$

Als Standardabweichung wird dabei die RMS des Rauschens in einem kräftefreien Bereich verwendet.

Bei normalverteiltem Fehler und perfekter Anpassung folgt: $\langle \chi^2 \rangle = 1$. Bei realen Messungen und guter Anpassung ergeben sich Werte in der Größenordnung von 1 (real gemessene Werte für sichtbar gute Anpassungen lagen je nach Güte der Ausgangskurven zwischen $0.9 < \langle \chi^2 \rangle < 1.1$). Aussagekräftiger als der Absolutwert von $\langle \chi^2 \rangle$, der stark von der Gleichförmigkeit des Rauschens und somit von der Qualität der Messung abhängt, ist seine Zu- oder Abnahme bei Änderung der Anzahl der Voigt-Elemente im Multi-Voigt-Modell ($\hat{=}$ Anzahl der Summanden in der Anpassung, vergl. Gl. 5.5).

Die Anpassung eines Modells $J^{\text{fit}}(t)$ mit drei Elementen ($\tau_1 = \mathcal{O}(0.3\text{s})$, $\tau_2 = \mathcal{O}(5\text{s})$, bei τ_3 war der Fehler größer als der Wert) ergibt bei sättigenden Komplianzkurven keine grundlegende Verbesserung von χ^2 gegenüber der Anpassung eines Modells mit zwei Relaxationszeiten ($\tau_1 = \mathcal{O}(0.3\text{s})$, $\tau_2 = \mathcal{O}(6\text{s})$). Der relative Unterschied liegt ca. bei 1 % und ist damit in

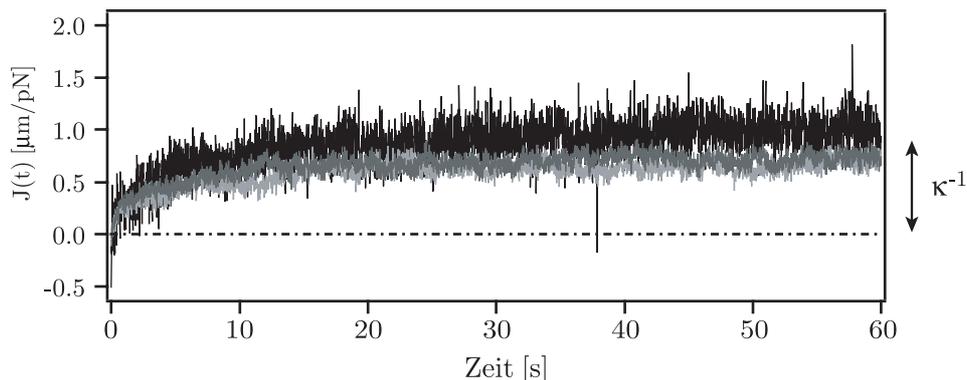


Abbildung 5.13: Sättigung der Komplianzkurven bei Kugelauslenkungen mit kleinen Kräften für einen Puls der Länge 60s. Gezeigt sind drei Komplianzkurven für zwei unterschiedliche Kräfte (1.88pN schwarze Kurve, 1.12 pN graue Kurven). Die totale Auslenkung entspricht dem Inversen Wert einer (statischen) Federkonstante κ ($10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5 \mu\text{m}$ Sondenkugeln).

einer nicht signifikanten Größenordnung⁸. Insbesondere ist $\tau_2 \ll t_{\text{Puls}}$, die (exponentielle) Sättigung der Kurve ist damit auf Zeiten bis 60 Sekunden quantifiziert.

Bei den Kurven mit etwas größeren Kräften, die ein gewohntes Verhalten der Kriechkomplianz zeigten, war die Anpassung von zwei Voigt-Elementen nicht ausreichend. Die Reduzierung der (qualitativ guten) Anpassung von drei Elementen ($\tau_1 = \mathcal{O}(0.5 \text{ s})$, $\tau_2 = \mathcal{O}(6 \text{ s})$, $\tau_3 = \mathcal{O}(60 \text{ s})$) auf zwei Elemente, führte zu einer Verschlechterung von $\langle \chi^2 \rangle$ von über 30 %. Insbesondere lag die größte Relaxationszeit der Anpassung in der Größenordnung der Pulsdauer. Diese Pulse zeigen auf der beobachteten Zeitskala noch einen deutlichen Anstieg der Komplianz.

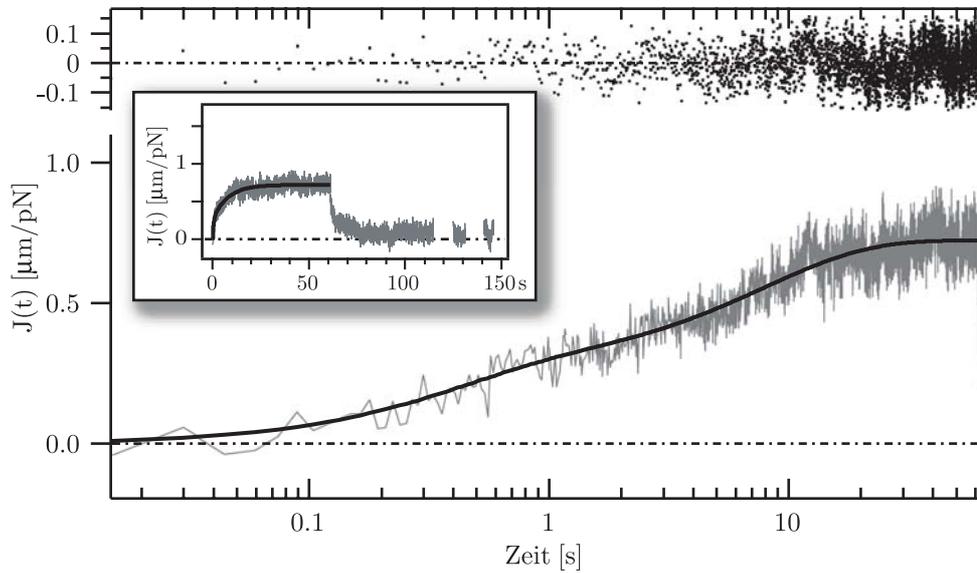
Als Anmerkung ist noch hinzuzufügen, dass auch ein Multi-Voigt-Modell aus endlich vielen Elementen prinzipiell nicht in der Lage ist, das Antwortverhalten einer viskoelastischen Flüssigkeit auf langen Zeitskalen zu beschreiben, ohne dass ein rein viskoses Element in Reihe geschaltet wird. Da die hier betrachteten Pulse bei schwachen Kräften jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit alle vollständig relaxierten (vergl. Abb. 5.12), wurde in den angepassten Funktionen auf einen Summanden $\sim \eta_n^{-1}t$ verzichtet. Berechnet man nach der Formel $\eta_n = \tau_n \kappa_n$ die Viskositäten für die größte Relaxationszeit τ_3 aus einer Anpassung eines 3-Elemente-Modells mit festgehaltener Relaxationszeit $\tau_3 = 60 \text{ s}$, ergibt sich folgendes Ergebnis:

$$\begin{aligned} \eta_{60\text{s}} &= 11.5 \text{ Pa}\cdot\text{s} && \text{(für sättigende Kurven)} \\ \eta_{60\text{s}} &= 2 \text{ Pa}\cdot\text{s} && \text{(für normale Kurven)} \end{aligned}$$

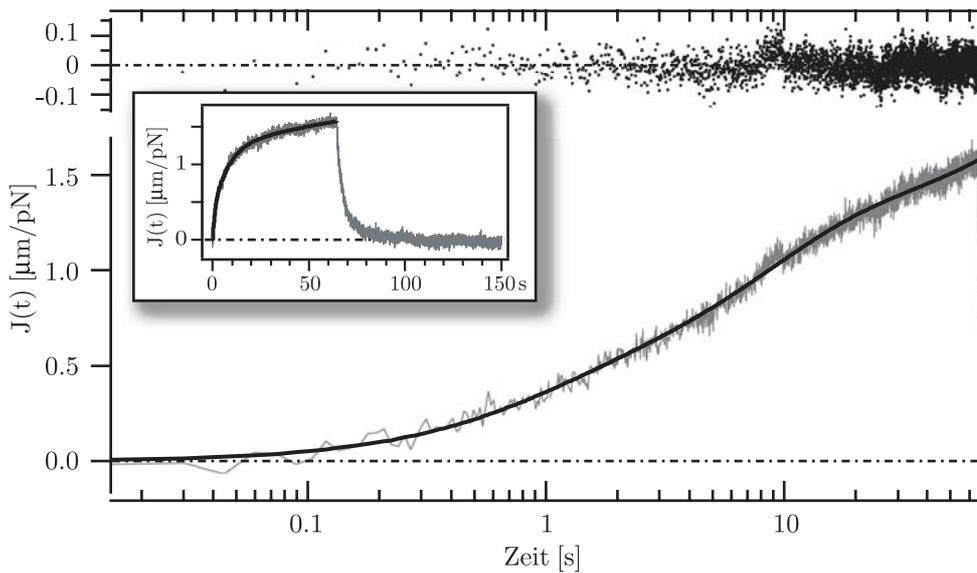
Man beachte hierbei, dass der Kraftunterschied zwischen diesen Kurven in der Größenordnung von 1 pN liegt und sich nach herkömmlichen Theorien identische Kurvenverläufe (statistische Abweichungen nicht eingerechnet) ergeben sollten.

Auch die Absolutwerte der Kriechkomplianz weisen deutliche Unterschiede auf, wie in Abbildung 5.10 deutlich zu erkennen ist.

⁸Verbesserungen von $\langle \chi^2 \rangle$ in dieser Größenordnung können prinzipiell durch die Hinzunahme einer beliebigen Funktion erreicht werden.



(a)



(b)

Abbildung 5.14: Anpassung von Multi-Voigt-Modellen (schwarze Linien) an eine sättigende Kriechkomplianzkurve (a) und eine normale Kriechkomplianzkurve (b), aufgetragen gegen den Logarithmus der Zeit. Die sättigende Kurve wurde mit zwei Elementen modelliert ($\tau_n = 0.4$ s, 8 s), die normale Kurve lässt sich erst mit drei Elementen ($\tau_n = 0.5$ s, 6 s, 60 s) befriedigend beschreiben. Schwarze Punkte sind das Residuum der Anpassung. Die Einsätze zeigen die Kurven in linearer Auftragung. (10 μ M Aktinnetzwerk, 4.5 μ m Sondenkugeln, Kräfte/Gesamtauslenkung: 1.1 pN/0.7 μ m bei (a) und 2.5 pN/3.5 μ m bei (b))

5.4.1.2 Zusammenfassung und Ergebnis

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unterhalb einer gewissen Kraftschwelle eine Kriechkomplianzkurvenform auftritt, die eindeutig Sättigung zeigt. Die neuartige Kurvenform ist eine Sättigung der Kriechkomplianz auf kurzen Zeiten (größenordnungsmäßig einige 10 Sekunden). Der Unterschied zu bisher beschriebenen Kurven ist allerdings erst auf Zeitskalen erkennbar, die frühere Experimente (z.B. [Schmidt, 1999]) nicht mehr untersucht haben. Die Ursache für dieses geänderte Antwortverhalten auf längeren Zeiten ist bis jetzt noch nicht geklärt. Möglicherweise spielt der Umstand eine Rolle, dass die Gesamtauslenkung der Kugeln bei sättigenden Kurven nicht viel größer als 1-2 Maschenweiten ist. Eine logische Schlussfolgerung daraus wäre, dass es sich um ein Phänomen handelt, welches mit dem Entkommen der Kugel aus seinem ursprünglichen Filamentkäfig zu tun hat. Darauf weisen auch die identischen Federkonstanten für das Potential hin, welches die Bewegung der Kugel einschränkt, die einerseits aus der Auslenkung bis in die Sättigung und andererseits aus der Rauschanalyse der Kugel (ohne externe Kräfte) extrahiert werden kann.

Bei geringfügig erhöhten Kräften zeigt sich ein Antwortverhalten, wie es bisher beschrieben worden ist (z.B. [Ziemann, 1997; Schmidt, 1999]).

Der Kraftbereich, in dem das Phänomen der sättigenden Kurven auftritt ist ansonsten für aktive Sondenkomplianzmessungen nicht sehr geeignet, da das thermische Rauschen eine Analyse der Zeitabhängigkeit der Kriechkomplianz auf kurzen Zeiten unmöglich macht und auf mittleren bis langen Zeiten erschwert.

5.4.2 $J(t)$ für mittlere Kräfte

Der folgende Abschnitt basiert auf einer Übersetzungen von [Uhde et al., 2003] und enthält weitere, unveröffentlichte Ergebnisse.

5.4.2.1 Ergebnisse und Diskussion

Der Kraftbereich der mittleren Kräfte zeichnet sich dadurch aus, dass die erzwungene Auslenkung der Sonden schon nach wenigen Millisekunden größer als die Amplitude des thermische Rauschens ist. In diesem Kraftbereich können die Komplianzkurven in drei Bereiche aufgeteilt werden, in denen sie Potenzgesetzen der Art

$$J(t) = A_n t^{\alpha_n} \tag{5.7}$$

gehörchen. Dabei sind die A_n Vorfaktoren und $n = 1, 2, 3$ bezeichnet jeweils eines der drei Regime:

1. Auf kurzen Zeiten ($0 < t < \tau_1$) wird das schon bekannte ([Amblard et al., 1996; Gittes und MacKintosh, 1998; Morse, 1998c; Frey, 2001]) subdiffusive Verhalten beobachtet, welches sich durch einen skalierenden Exponenten von $\alpha_1 \approx 3/4$ auszeichnet.⁹ Diese Abhängigkeit ist eng mit der Einzelfilamentdynamik der Aktinpolymere verknüpft: Die freie Diffusion bzw. Auslenkung der Kugel wird durch die Undulationen der Einzelfilamente behindert (Regime interner Kettendynamik, vergl. auch Kap. 2.1).
2. Erstmals wurde im zeitlichen Bereich ($\tau_1 < t < \tau_2$) ein Potenzgesetz (Gl. 5.7) mit einem skalierenden Exponenten $\alpha_2 \approx 1/2$ gemessen. Dieses Verhalten ist bis jetzt noch

⁹Vergleiche mit der Fußnote auf Seite 84 zur Herleitung von $J(t) \sim t^{3/4}$ aus der Zeitabhängigkeit der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle \Delta r^2(t) \rangle$.

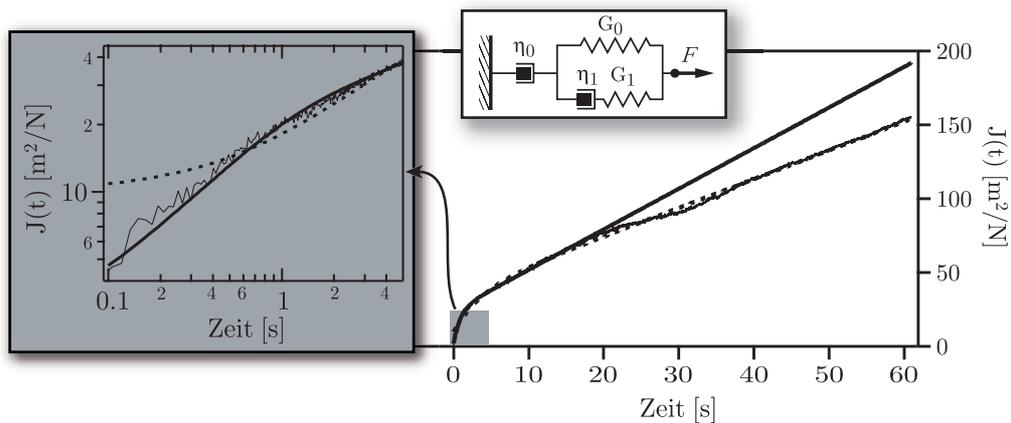


Abbildung 5.15: Gezeigt ist die Anpassung eines erweiterten Zener-Modells (Einsatz), das bisher zur Beschreibung von Kriechkomplianzpulsen von Aktin verwendet wurde [Schmidt, 1999], mit einer Langzeit-Kriechkomplianzmessung (durchgezogene dünne Linie). Ohne Wichtung liefert die Anpassung für lange Zeiten befriedigende Ergebnisse, jedoch wird das Kurzzeitverhalten sehr schlecht reproduziert (gestrichelte dicke Linie). Eine Wichtung proportional zu $1/t^w$ mit $0 < w < 1$ erlaubt die Anpassung für kurze Zeiten zu verbessern. Die angepassten Kurven zeigen aber immer noch systematische Abweichungen im Kurzzeitbereich, während jetzt das Langzeitverhalten sehr schlecht reproduziert wird (durchgezogene dicke Linie). Das erweiterte Zener-Modell ist somit nicht in der Lage, Pulse die wesentlich länger als 10 Sekunden sind, befriedigend zu beschreiben. Der grau hinterlegte Teil der Abbildung zeigt eine Vergrößerung für kurze Zeiten in doppelt logarithmischer Darstellung ($10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5 \mu\text{m}$ Sondenkugeln, Kräfte/Gesamtauslenkung: $3.9 \text{ pN}/14.6 \mu\text{m}$).

nicht theoretisch vorhergesagt worden und kann im Rahmen der gewöhnlichen Ersatzschaltbildtheorie nur schlecht interpretiert werden (vergl. Abb 5.15). Die neuartige, auf der osmotischen Diffusion der Filamente beruhende Theorie kann diese Zeitabhängigkeit gut erklären (Regime osmotischer Diffusion).

3. Auf langen Zeitskalen ($t > \tau_2$) zeigen die Kriechkomplianzkurven einen Übergang in ein viskoses Verhalten. Dieser Bereich ist durch einen skalierenden Exponenten von $\alpha_3 \approx 0.9$ gekennzeichnet (viskoses Regime).

Regime interner Kettendynamik Um die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Daten mit den theoretischen Vorhersagen für das Auslenkungsverhalten bei kurze Zeiten zu vergleichen, werden zunächst einzelne Kriechkomplianzkurven in doppelt logarithmischer Darstellung mit einer Potenzfunktion der Art $J(t) = At^{3/4}$ verglichen. Man erkennt die Übereinstimmung von Theorie und Messdaten schon anhand einzelner Kurven (vergl. Abb. 5.16). Allerdings lassen sich aus den von Netzwerkinhomogenitäten beeinflussten Einzelkurven schlecht weitere Parameter extrahieren.

Um die statistischen Einflüsse der Netzwerkinhomogenität zu minimieren, wurden jeweils mehrere Pulse einer Kugel gemittelt und diese gemittelten Kurven komplett für eine Messprobe dargestellt. Dies wurde für verschiedene Aktinkonzentrationen durchgeführt. Das Ergebnis für zwei verschiedene Konzentrationen ist in Abbildung 5.17 dargestellt, die große Streuung der Kurven lässt sich auf die Streuung der Kraft¹⁰ zurückführen.

Interessanterweise ergeben sich bei der Anpassung eines Potenzgesetzes mit der Potenz $\alpha_1 = 3/4$ nicht nur Abweichungen bei längeren Zeiten, sondern auch bei den ersten ein bis

¹⁰Diese beruht, wie im Kap. 3 gezeigt, hauptsächlich auf der Größenvarianz der Sondenkugeln.

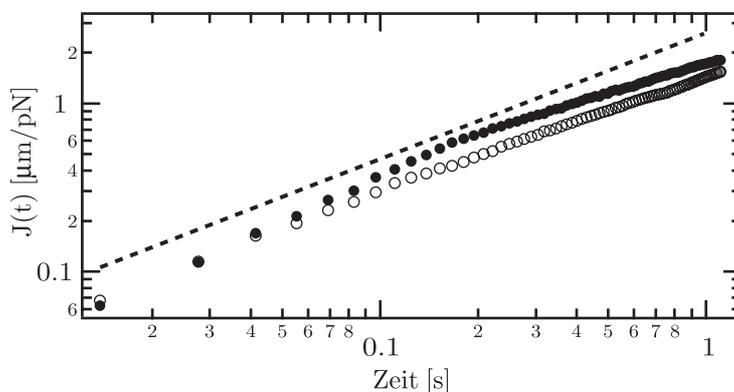
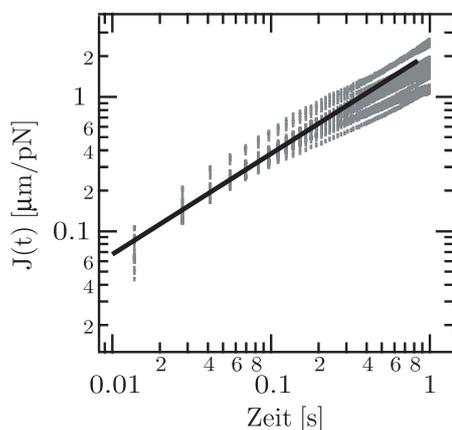
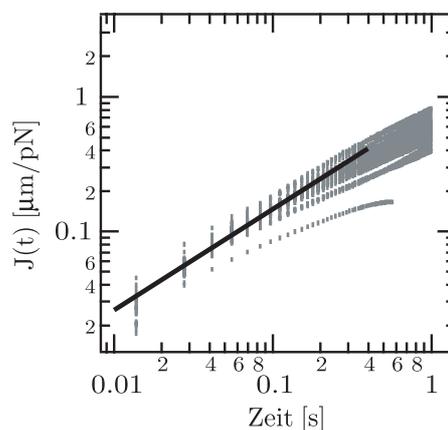


Abbildung 5.16: Kurzzeitverhalten der Kriechkomplianz. Repräsentative Auswahl zweier erzwungener Auslenkungen einer $4.5 \mu\text{m}$ Sondenkugel in einem $11 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk. Dargestellt ist der zeitliche Ausschnitt von 13.8 ms bis 1.1 Sekunden des ersten Pulses (Kraft 3.5 pN , Auslenkung bis $1 \text{ s} = 6 \mu\text{m}$, geschlossene Symbole) und des zweiten Pulses (Kraft 5.3 pN , Auslenkung bis $1 \text{ s} = 7.8 \mu\text{m}$, offene Symbole). Die dünnen Linien sind optische Hilfslinien, die gestrichelte Linie repräsentiert ein Potenzgesetz mit einer Potenz α_1 von $\alpha_1 = 3/4$.



(a)



(b)

Abbildung 5.17: Kurzzeitverhalten der gemittelten Kriechkomplianzen für verschieden Aktinkonzentrationen. Das Kurzzeitverhalten eines $11 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerkes (a) und eines $19 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerkes (b) sind qualitativ identisch. Dargestellt sind bei (a) 22 bzw. bei (b) 23 gemittelte Kurven aus jeweils 2-4 Auslenkungen einer Kugel (graue Punkte) und die beste angepasste Potenzfunktion mit fest gehaltener Potenz $\alpha_1 = 3/4$ im Bereich von 13.8 ms bis 100 ms (durchgezogene schwarze Linie).

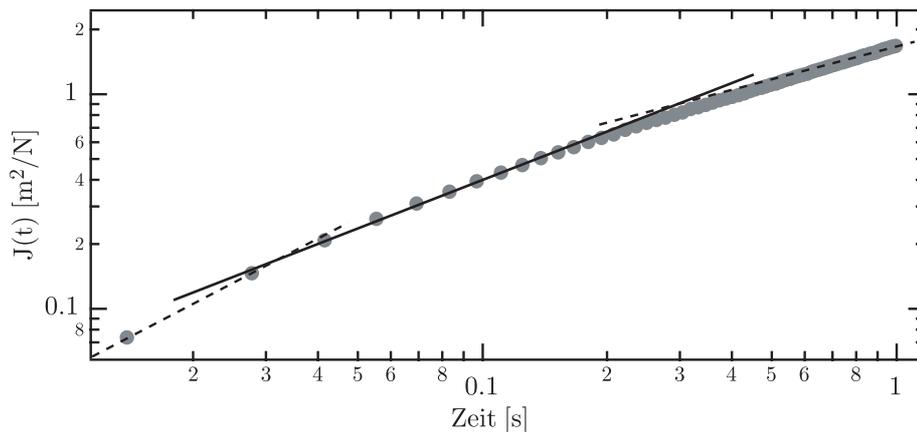


Abbildung 5.18: Kurzzeitverhalten der Kriechkomplianz gemittelt über 68 Einzelpulse bei verschiedenen Kräften (graue Punkte). Die schwarze durchgezogene Linie entspricht einem $t^{3/4}$ -Gesetz. Deutlich ist die Abweichung der ersten Messpunkte von diesem Verhalten zu erkennen (die gestrichelte Linie durch die ersten Datenpunkte hat die Steigung 1). Die zweite gestrichelte Linie hat eine Steigung von 0.5.

zwei Messpunkten. Um diese Abweichungen weiter zu quantifizieren, wurden die über die einzelnen Kugeln gemittelten Pulse erneut gemittelt. Eine der so berechneten Kurven ist in [Abbildung 5.18](#) zu erkennen.

Die Abweichungen für längere Zeiten können einfach mit dem einsetzenden Übergang in das $t^{0.5}$ -Regime erklärt werden. Die Abweichungen der ersten Messpunkte dagegen beruhen auf den speziellen Eigenschaften der Aufnahme. So wird bei der Aufnahme eines Bildes zum Zeitpunkt t_i nicht die tatsächliche momentane Kugelposition $x^{\text{th}}(t_i)$ gespeichert, sondern das Integral über alle Kugelpositionen seit der letzten Bildabfrage $x^{\text{mess}}(t_i)$:

$$x^{\text{mess}}(t_i) = \int_{t_{i-1}}^{t_i} x(t) dt \quad (5.8)$$

Der Grund dafür ist, dass die Kamera kontinuierlich belichtet. Insbesondere wird die Information des Spulenstroms nur mit derselben Frequenz wie die Bilder eingelesen und zwar *bevor* das Bild ausgelesen (d.h. die Integration durchgeführt) wird. Im Ergebnis führt das dazu, dass bei einem Start des Strompulses zwischen t_0 und t_1 die Kugel durch die Magnetkraft F schon einen gewissen Weg ausgelenkt wurde. Die zu t_0 gehörige Position wird aber (weil hier noch $F = 0$ gilt) als Nullpunkt der $x(t)$ Kurve definiert. Zusätzlich kann der Strom auch noch zu jedem beliebigen Zeitpunkt zwischen t_0 und t_1 einsetzen, so dass man im Einzelfall beim ersten Datenpunkt $x(t_1)$ die korrekte Auslenkung (der Kraftpuls setzte direkt nach t_0 ein) oder auch fast keine Auslenkung (der Kraftpuls setzte direkt vor t_1 ein) misst.

Für eine über viele Pulse gemittelte Kurve ergibt sich nun folgende Situation: Die Kamera liefert integrierte Kugelpositionen für die einsetzende Kugelbewegung. Diese integrierten Kugelpositionen wiederum müssen nun über statistisch verteilte Anfangszeiten zwischen t_0 und t_1 gemittelt werden. Dies ergibt die tatsächlich gemessene Position. Das Gleiche gilt natürlich auch für alle weiteren Datenpunkte. Dieser Sachverhalt ist schematisch in [Abbildung 5.19\(b\)](#) erklärt. Wie man leicht erkennt, ist die Abweichung der gemessenen Kurve (weiße Punkte), von der theoretischen (durchgezogene schwarze Linie) für den Nullpunkt am größten. Die gemessene Kurve nähert sich dann schnell asymptotisch der unkorrigierten Kurve. Um einen Korrekturwert für den Nullpunkt abzuschätzen, geht man folgendermaßen vor:

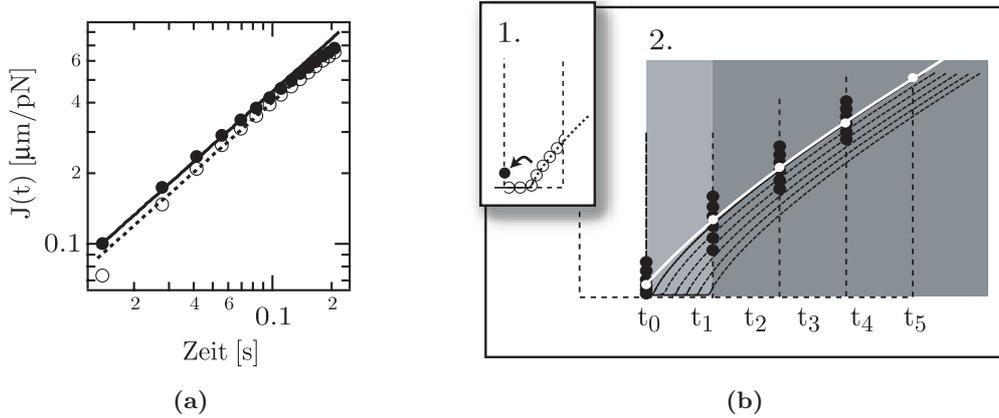


Abbildung 5.19: (a) Die gerätebedingte Abweichung von einem $t^{3/4}$ -Verhalten (schwarze gestrichelte Linie) für die ersten Datenpunkte der gemittelten Kriechkomplianz (offene Symbole) kann korrigiert werden. Schon die Korrektur des Nullpunkts liefert ein befriedigendes Resultat (geschlossene Symbole), was durch erneutes Anpassen eines $t^{3/4}$ -Gesetzes (schwarze durchgezogene Linie) gezeigt werden kann. (b) Ursache der Abweichung: 1. Die Positionen der Sondenkugel (offene schwarze Markierungen) werden zwischen zwei Bildabfragen (gestrichelte Linien) integriert und dem Stromwert zugeordnet, der vor der Integration abgefragt wurde (geschlossene schwarze Markierung; Integrierte Position). 2. Prinzipiell kann die Kraft zu einem beliebigen Zeitpunkt zwischen zwei Bildabfragen einsetzen, die mittlere integrierte Position (weiße Markierungen) ergibt sich also aus dem statistischen Mittel der integrierten Positionen (schwarze Markierung) der Kugelpositionen für alle möglichen Startzeiten. Die Abweichung von der idealen Kurve (durchgezogene schwarze Linie) ist für den Nullpunkt deutlich sichtbar am größten.

Es gilt die Annahme, dass sich die tatsächliche $x(t)$ Kurve mit einem Gesetz

$$x(t) = A t^{3/4} \quad (5.9)$$

beschreiben lässt. Der Beginn der Auslenkung (Start des Kraftpulses) erfolgt irgendwann zwischen t_0 und t_1 , der Zeitraum $\Delta t = t_1 - t_0$ wird daher in N Teile eingeteilt. Die Auslenkung beginnt dann zu einer Zeit $t^* = i \Delta t / N$ mit $i = 1 \dots N$. Die integrierte Position für den Nullpunkt ergibt sich damit zu

$$x_0^{\text{Int}} = \frac{1}{\Delta t} \int_0^{\Delta t} x(t) dt = \frac{1}{\Delta t} \int_{t^*}^{\Delta t} A t^{3/4} dt \quad (5.10)$$

Das Ausführen der Integration und das Einsetzen der Integrationsgrenze liefert den integrierten Nullpunktswert in Abhängigkeit vom Startwert (definiert durch i/N):

$$x_0^{\text{Int}}(i, N) = \frac{4}{7} A \Delta t^{3/4} \left(1 - \left(\frac{i}{N} \right)^{7/4} \right) \quad (5.11)$$

Der gemessene Wert von $x(0)$ ist dieser integrierte Wert, gemittelt über N für den Grenzfall $N \rightarrow \infty$:

$$\langle x_0^{\text{Int}} \rangle_N = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N x_0^{\text{Int}} \quad (5.12)$$

Teilt man diesen Wert durch den theoretischen Wert für den ersten gemessenen Datenpunkt $x(\Delta t) = A \Delta t^{3/4}$, erhält man als Ergebnis einen Korrekturfaktor δ für den ersten Datenpunkt. In der Praxis wird A dabei sehr genau durch Anpassen eines $t^{3/4}$ -Gesetzes an spätere

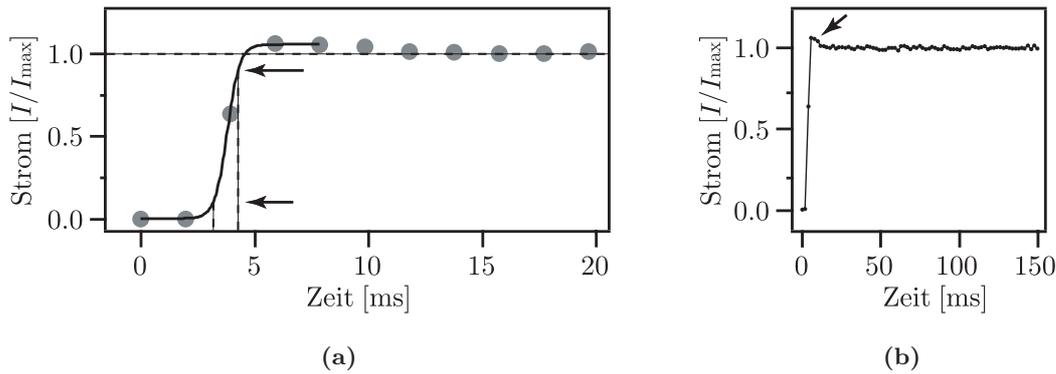


Abbildung 5.20: (a) Gemessene Einschaltkennlinie der Magnetspule (graue Symbole) mit angepasster sigmoidaler Kurve. Die Zeit, in der der Strom von 5 % auf 95 % angestiegen ist, beträgt ca. 1.4 ms (Pfeile). Die waagerechte gestrichelte Linie markiert das Langzeitsättigungsniveau des Stromes. (b) Überschwingen und Abfall des Stromes nach Pulsbeginn (Pfeil). Der Abfall kann exponentiell genähert werden, die Zeitkonstante des Abfalls beträgt etwa 5 ms. Das Überschwingen kompensiert die Einschaltverzögerung teilweise.

Datenpunkte gewonnen. Die Korrektur ergibt sich dann zu:

$$\delta = \frac{\langle x^{\text{Int}}(0) \rangle_N}{x(\Delta t)} = \frac{4}{7} \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N \left(1 - \left(\frac{i}{N} \right)^{7/4} \right) = \frac{7}{11} \quad (5.13)$$

Da für kleine Auslenkungen $F = \text{konstant}$ gilt, ist $J(t) \sim x(t)$. Die Korrektur kann also direkt auf die Kriechkomplianzkurve angewandt werden. Verschiebt man den Nullpunkt der gemittelten Kriechkomplianzkurve auf den Wert $-\frac{7}{11}A\Delta t^{3/4}$ und definiert diesen Wert als neuen (korrigierten) Nullpunkt, ergibt sich eine korrigierte Kurve, die jetzt ausgezeichnet mit $t^{3/4}$ skaliert (vergl. Abb. 5.19(a)).

Damit konnte gezeigt werden, dass die gefundene Abweichung der gemittelten Kriechkomplianzkurven für die ersten Datenpunkte ein Artefakt der Datenaufnahme ist. Dieser Fehler kann in gemittelten Kurven größenordnungsmäßig korrigiert werden. Bei Einzelkurven ist das nicht möglich, da es keine gesicherte Information darüber gibt, wann der Puls zwischen t_0 und t_1 tatsächlich beginnt.

Auch der Umstand, dass das magnetische Feld sich nicht instantan aufbaut, könnte die Messkurven verfälschen. Um diesen Beitrag abzuschätzen, wurde die Einschaltcharakteristik der Magnetspulen untersucht.

Der zeitliche Verlauf des Spulenstroms bei einem eingestellten Endstrom von 400mA ist in Abbildung 5.20 zu sehen. Es handelt sich um eine Mittelung aus mehreren Messungen bei einer Aufnahmezeit von ca. 2ms. Als Nullpunkt wurde jeweils der letzte Stromwert, der bei ca. 0A lag benutzt. Der nächste Wert repräsentiert den Anstieg, danach ist der Strom bereits über den erwünschten Wert hinausgependelt. Dabei handelt es sich um ein Einschwingverhalten (vergl. Abb. 5.20(b)). Die Anpassung eines exponentiellen Abfalls liefert eine Zeitkonstante τ von $\tau = 5$ ms für den Abfall auf den gewünschten Endwert. Eine sinnvolle Annahme für den tatsächlichen Verlauf der Stromkennlinie von null bis zum Maximum ist eine sigmoidale Kurve der Art:

$$I(t)/I_{\max} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{t_{1/2}-t}{\sigma}}} \quad (5.14)$$

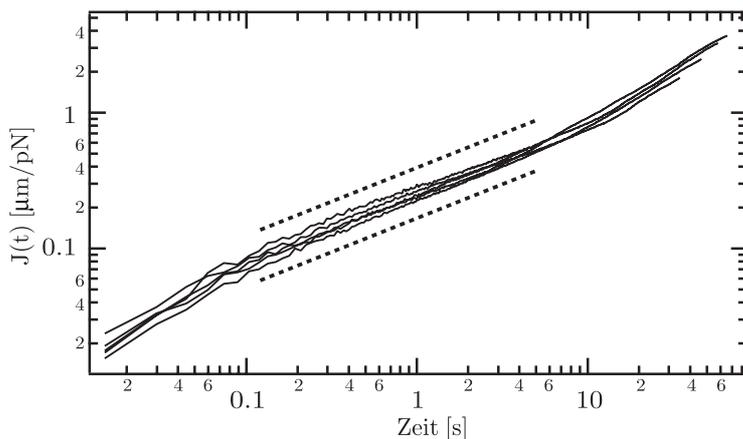


Abbildung 5.21: Auswahl von Einzelkurven der Kriechkomplianz (dünne schwarze Linien) in doppelt logarithmischer Auftragung mit Potenzgesetzen der Form $t^{1/2}$ (gestrichelte Linien). Die Übereinstimmung im Zeitfenster $0.1 < t < 5$ s ist sehr gut. ($10 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5 \mu\text{m}$ Sondenkugeln, Kräfte: 13-19 pN)

Dabei ist $t_{1/2}$ die Zeit, innerhalb derer der Strom bereits auf 50% des Maximalwerts angestiegen ist und σ die Zeitkonstante der sigmoidalen Kurve (vergl. Abb. 5.20(a)). Die so erhaltene Anpassung liefert als Zeit innerhalb welcher der Strom von 5% auf 95% seines Maximalwertes angestiegen ist, einen Wert von $t_{90} \approx 1.4$ ms. Das entspricht einem verzögerten Einschalten eines idealen Rechteckpulses von etwa $\Delta t_{\text{Ein}} \approx 0.7$ ms. Allerdings gleicht das Überschwingverhalten diesen Effekt zum Teil sogar wieder aus, so dass der Einfluss der Einschaltverzögerung noch weiter minimiert wird. Um den verbleibenden Fehler abzuschätzen wurden die Flächen zwischen der Linie $I(t)/I_{\text{max}} = 1$ und der sigmoidalen Kurve, bzw. dem exponentiellen Abfall mit korrekten Vorzeichen summiert. Daraus ergibt sich, dass das Überschwingen der Kennlinie den verzögerten Anstieg zu knapp 50% ausgleicht. Damit bleibt ein Restfehler, der einem verspäteten Einschalten eines idealen Rechteckpulses, mit einer Verzögerung von unter einer halben Millisekunde entspricht.

Berechnet man die sich daraus ergebende Veränderung des gemessenen ersten $x(t)$ Wertes mittels Gl. 5.10-5.13 und setzt als Einschaltverzögerung $\Delta t_{\text{Ein}} \approx 0.5$ ms $\approx 0.03\Delta t$ ein (wobei Δt die Aufnahmezeit von 13.8 ms ist), so ergibt sich eine Veränderung des Nullpunktwertes von $J(t)$ von unter einem Prozent.

Es konnte somit gezeigt werden, dass der Fehler der Einschaltverzögerung absolut zu vernachlässigen ist.

Regime osmotischer Diffusion Nachdem die Sondenkugel zuerst nur gegen die Undulationen der Filamente arbeitet, komprimiert sie nach weiterer Auslenkung das Netzwerk entlang ihres Bewegungspfades. Wie in Kapitel 2 beschrieben, folgt daraus direkt eine Wurzelabhängigkeit der Kriechkomplianz (Gl. 2.33).

Um die gemessenen Auslenkungen auf dieses Verhalten zu überprüfen, können zunächst Einzelkurven in doppelt logarithmischer Auftragung mit einem $t^{1/2}$ -Potenzgesetz verglichen werden (Abb. 5.21). Schon hier zeigt sich eine hervorragende Übereinstimmung. Natürlich sind Pulse geringerer Kraft stärker verrauscht und auch Pulse bei stärkeren Kräften unterliegen den Netzwerkinhomogenitäten. Um eine quantitative Aussage über die Übereinstimmung der Messungen mit einem $t^{1/2}$ -Potenzgesetz treffen zu können, wurden deshalb solche Pulse gruppiert und gemittelt, die mit ähnlichen Kräften aufgenommen worden waren. An die so

erhaltenen Mittelwertkurven wurden in dem linearen Bereich um eine Sekunde herum Potenzgesetze mit der Potenz als freiem Parameter angepasst ($J^{\text{fit}}(t) = A t_2^\alpha$). Die Auswertung von über 100 Einzelpulsen bei zwei verschiedenen Konzentrationen und Messungen ergab acht gemittelte Kurven aus je 5 bis 20 Einzelkurven (vergl. Abb. 5.23). Die freien Parameter ergaben sich zu:

Probe	α_2	Probe	α_2
	0.52		0.55
1 (10 μM)	0.50	2 (11 μM)	0.54
	0.52		0.42
	0.47		0.54

Tabelle 5.3: Exponenten eines t_2^α -Gesetzes im Bereich um 1 s. Aus Anpassungen an gemittelten Kurven (jeweils verschiedene Kraftbereiche von ca 2-30 pN und zwei verschiedene Proben). Alle Exponenten streuen im Bereich von $\alpha_2 \approx 0.5$.

Der erhaltene Mittelwert liegt mit

$$\alpha_2 = 0.51 \pm 0.05$$

in hervorragender guter Übereinstimmung mit der theoretischen Voraussage.

Um die Mechanismen, welche die Kraftantwort von Sondenkugeln in semiflexiblen Netzwerken in diesem Zeitbereich bestimmen, noch besser zu verstehen, wurden von Nikita Ter-Organessian Simulationen einer erzwungenen Kugelauslenkung in einem Netzwerk von semiflexiblen Polymeren durchgeführt. Das Modell ist eine molekulardynamische Simulation unter verschiedenen Vereinfachungen, so wurde z.B. der Einfluss des Lösungsmittels (also die gesamte Mikrohydrodynamik) vernachlässigt. Die Erwartung an die Simulation ist somit eher qualitativer als quantitativer Natur. Trotzdem vermag die Simulation das Wurzelverhalten auf kürzeren Zeitskalen gut abzubilden. Die Simulation liefert für eine simulierte Box mit 4000 Filamenten und periodischen Randbedingungen einen skalierenden Exponenten der nicht genau bei 0.5 sondern etwas darüber liegt (vergl Abb. 5.22):

$$\alpha_2^{\text{sim}} = 0.54$$

Untersucht man den skalierenden Exponenten für ein weniger verdünntes Aktinnetzwerk, ergibt sich z.B. für ein 19 μM Aktinnetzwerk ein Mittelwert von 0.54 ± 0.05 . Dieser Wert liegt im Rahmen des Fehlers zwar auch im Bereich von $\alpha_2 = 0.5$, trotzdem ist dies ein Hinweis darauf, dass mit zunehmender Netzwerkdicke der Übergang zu dem Bereich früher einsetzt, in dem ein diffusionsgetriebener Fluss der Filamente um die Kugel herum die Sondenantwort bestimmt. Andererseits könnte sich hier auch ein Einfluss der Filamente selbst bemerkbar machen, da das theoretische Modell mit starken Vereinfachungen arbeitet und die Filamente auf ihre Kreuzungspunkte mit anderen Filamenten reduziert.

Viskoses Regime Für lange Zeiten gehen die Auslenkungskurven in ein Verhalten $J(t) \sim t_3^\alpha$ mit der gemessenen mittleren Potenz $\alpha_3 = 0.9 \pm 0.1$ über. Dies entspricht dem Regime des viskosen Fließens der Kugeln im Netzwerk. Ohne große Fehler kann in diesem Bereich eine lineare Funktion der Form $J(t) = \eta^{-1}t$ angepasst werden, um die Viskosität η für lange Zeiten zu extrahieren (vergl. Abb. 5.24).

Da die Langzeitviskosität extrem empfindlich auf kleinste Veränderungen im Netzwerk reagiert, hängt sie stark von der Präparation, dem verwendeten Puffer oder dem Alter der

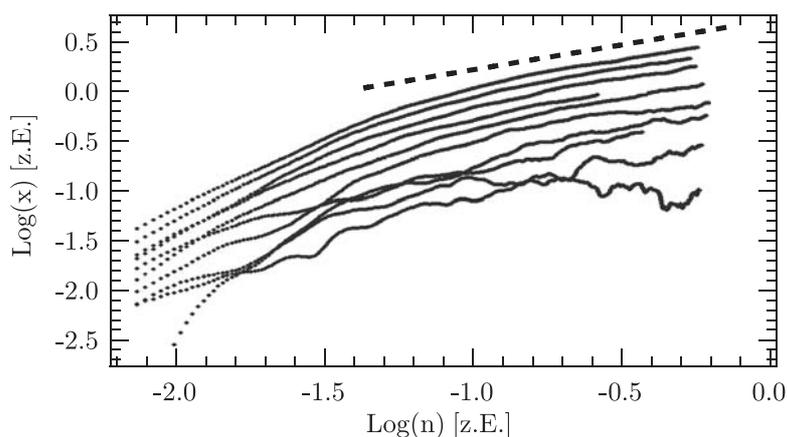


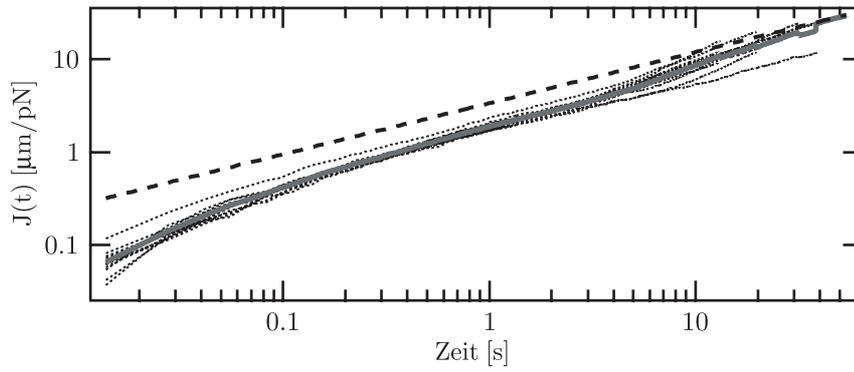
Abbildung 5.22: Molekulardynamische Simulation der erzwungenen Kugelauslenkung in einem Netzwerk semiflexibler Polymere. Dargestellt ist der Logarithmus der Auslenkung gegen den Logarithmus der Simulationsschritte, beides in zufälligen Einheiten. Von unten nach oben nimmt die Kraft zu. Die gestrichelte Linie entspricht einem Potenzgesetz $x(n) \sim n^{0.5}$, während die beste Anpassung eines Potenzgesetzes an die oberen Simulationskurven eine Potenz von $\alpha_2^{\text{sim}} = 0.54$ liefert.

Proteine ab. Absolutwerte dieser Viskosität für verschiedene Präparationen zu vergleichen macht daher wenig Sinn. So kann z.B. die über 13 Langzeitpulse gemittelte Viskosität $\eta_{\infty,1}$ einer Präparation eines $9.5 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerkes sich zu $\eta_{\infty,1} = 500 \pm 150 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ergeben (Puffer mit 300 mM KCl und 15 mM ATP/Mg), während bei einer anderen Präparation bei einer leicht höheren Konzentration von etwa $11 \mu\text{M}$ die über 8 Langzeitpulse gemittelte Viskosität $\eta_{\infty,2}$ dagegen $\eta_{\infty,2} = 70 \pm 80 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ beträgt (Puffer mit 100 mM KCl und 0.5 mM ATP/Mg). Wäre eine Vergleichbarkeit gewährleistet, müsste der zweite Wert leicht über oder doch zumindest in der Nähe des ersten Wertes liegen. Die Größenordnung der gemessenen Langzeitviskosität für F-Puffer liegt aber in dem Bereich, den z.B. auch Ziemann [Ziemann et al., 1994] gemessen hat.

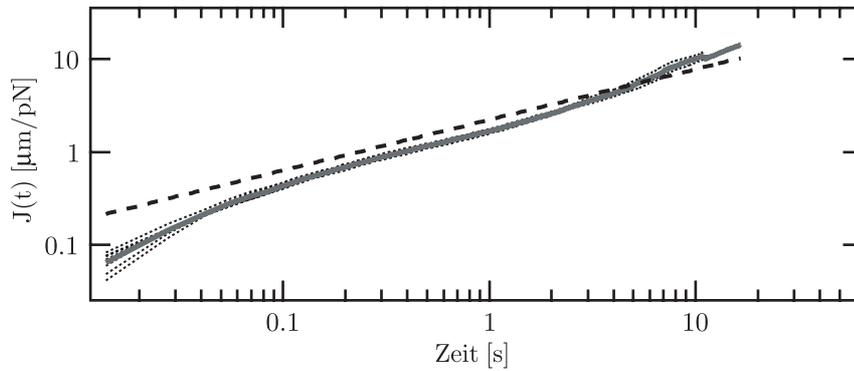
Vergleicht man dagegen die Langzeitviskositäten ein und derselben Präparation in verschiedenen Verdünnungen, um den relativen Einfluss der Maschenweite auf diese Größe zu studieren, erhält man absolut konsistente Ergebnisse. Siehe dazu Kapitel 5.6.

5.4.2.2 Zusammenfassung und Ergebnis

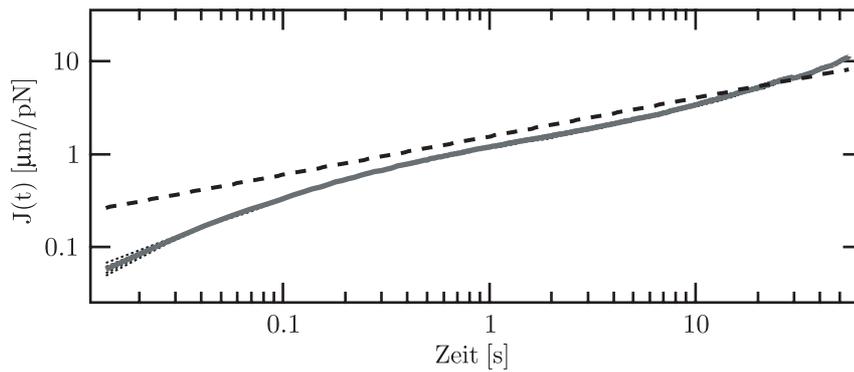
In diesem Kapitel wurde die Wurzelabhängigkeit der Kriechkomplianz für Zeiten zwischen etwa 0.1 und einigen Sekunden gezeigt. Der Mittelwert der besten angepassten Potenzen α_2 lag bei $\alpha_2 = 0.51 \pm 0.05$ und ist damit in hervorragender Übereinstimmung mit den Vorhersagen der neuen theoretischen Erklärung, die das Antwortverhalten der Sondenkugel über einen osmotischen Druck erklärt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die gemittelten Auslenkungskurven im Kurzzeitverhalten das bekannte $t^{3/4}$ reproduzieren, wobei stärkere Abweichungen in den ersten Datenpunkten mit der endlichen Aufnahmefrequenz der Kamera befriedigend erklärt werden konnte. Weiterhin wurde erstmals eine Differenz für den Nullpunkt der gemittelten Kurven berechnet, welche den Einfluss der endlichen Aufnahmefrequenz befriedigend korrigiert. Für die Langzeitviskosität wurden quantitative Vergleiche zwischen verschiedenen Experimenten vorgenommen, die die extreme Empfindlichkeit dieser Größe auf die Präparation demonstrieren.



(a)



(b)



(c)

Abbildung 5.23: Gezeigt sind drei repräsentative Beispiele für die gemittelten Komplianzkurven. Aufgetragen sind jeweils die einzelnen Komplianzkurven (dünne gepunktete Linien), der Mittelwert aus diesen Kurven (dicke graue Linie) und das nach oben verschobene angepassten Potenzgesetz $J(t) \propto t^{\alpha_2}$ (dicke gestrichelte Linien). (11 μM Aktinnetzwerk, $4.5 \mu\text{m}$ Sondenkugeln. (a) 11 Einzelkurven, Kraft: 1.5-4pN, $\alpha_2 = 0.55$. (b) 7 Einzelkurven, Kraft: 4.8-5.5pN, $\alpha_2 = 0.55$. (c) 4 Einzelkurven, Kraft: 5.6-7pN, $\alpha_2 = 0.42$.)

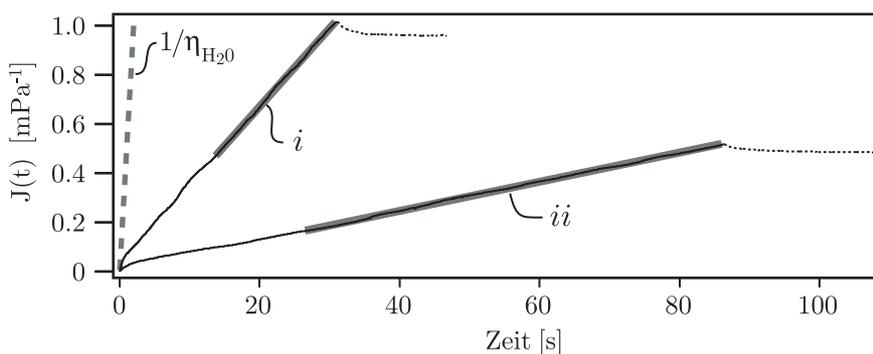


Abbildung 5.24: Repräsentative Auswahl von zwei Kriechkomplianzkurven (skaliert mit $g = 6\pi R_{\text{Kugel}}$) für lange Zeiten (der gestrichelte Teil zeigt die Relaxation nach dem Abschalten der externen Kraft). Die graue Bereiche stellen angepasste lineare Funktionen dar, deren inverse Steigung die Viskosität η_∞ der halbverdünnten Polymerlösung für lange Zeiten ist. (i) $11 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $\eta_\infty = 30 \text{ mPa}$. (ii) $35 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $\eta_\infty = 170 \text{ mPa}$. Die graue gestrichelte Linie repräsentiert die Kugelantwort in reinem Wasser ($\eta_{\text{H}_2\text{O}} = 1 \text{ mPa}$).

5.4.3 $J(t)$ für starke Kräfte bzw. für starke Kraftgradienten

Der Bereich starker Kräfte zeichnet sich dadurch aus, dass die Abweichungen der Kriechkomplianz von Potenzgesetzen der Form $J(t) \sim t^{\alpha_n}$ (für $t < \tau_e$) mit $\alpha_1 = 0.75$ (für $\tau_e < t < \tau_d$), mit $\alpha_2 = 0.5$ und mit $\alpha_3 \approx 1$ (für $\tau_d < t$), signifikant werden. Dafür gibt es zwei Ursachen:

1. Eine zunehmend gestauchte Zeitskala. Damit ist gemeint, dass die ausgelenkte Kugel bei höheren Kräften schneller Filamente vor sich aufammelt. Der Zeitpunkt τ_e des Übergangs zwischen dem zeitlichen Regime, in dem die Einzelfilamentdynamik für die Sondenantwort bestimmend ist zum Filamentdiffusion bestimmten $t^{0.5}$ -Regime findet also immer früher statt. Experimentell lässt sich feststellen, dass sich der Übergang nicht nur zeitlich verändert, sondern auch zunehmend verwischt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die eben beschriebenen Effekte gleichzeitig wirken. Repräsentative Kurven, die diesen Sachverhalt verdeutlichen, sind in Abb. 5.25 dargestellt. Die eigentliche Kraftabhängigkeit der τ_e Werte wird im nächsten Kapitel diskutiert.

Auch der Übergang zum Regime des viskosen Fließens scheint bei höheren Kräften früher und nicht so exakt abgrenzbar einzutreten, vergleiche hierzu ebenfalls das nächste Kapitel.

2. Der zunehmende Einfluss der Kraftabhängigkeit der Kriechkomplianz auf die Kurvenform. Nicht die hohe Kraft an sich ist dabei das Problem: Bei dem für diese Arbeit verwendeten Aufbau entstehen vor allem in der Nähe des Spulenkernendes hohe Kräfte. Dort ist aber auch der Gradient der Kraft besonders groß, so dass ein Sondenpartikel, das hier um einige $10 \mu\text{m}$ ausgelenkt wird, um Größenordnungen unterschiedliche Kräfte erfahren kann. Bei sehr hohen Kräften und damit sehr hohen Kraftgradienten führt das zu einem nichtlinearen Anstieg der Kurven im Langzeitregime (vergl. Abb. 5.26). Dies stellt insbesondere ein Problem dar, wenn aus der inversen Steigung der korrekt mit $g = 6\pi R_{\text{Kugel}}$ normierten Kriechkomplianzkurven die Viskosität extrahiert werden soll.

Der Einfluss des Kraftgradienten soll nun kurz diskutiert werden, um einerseits zu erklären, warum Komplianzkurven mit hohem Kraftgradient für lange Zeiten einerseits nach unten abknicken, warum aber andererseits eine Korrektur dieses Effektes bei den meisten Messungen nicht nötig ist.

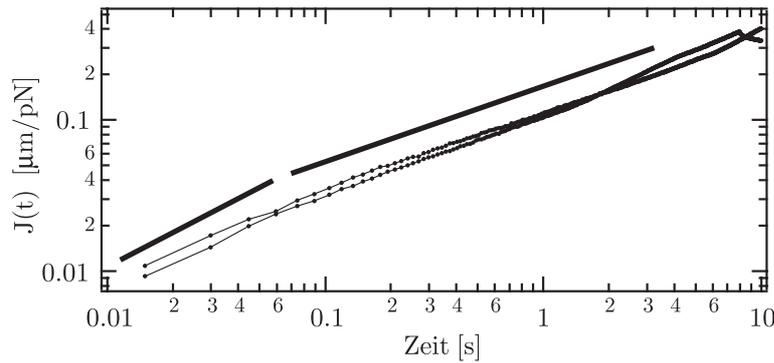


Abbildung 5.25: Zwei repräsentative Kriechkomplianzkurven für hohe Kräfte (größenordnungsmäßig 100 pN). Der Übergang zwischen dem $t^{0.75}$ - und dem $t^{0.5}$ -Regime (dicke schwarze Linien) ist weniger scharf ausgeprägt als bei kleineren Kräften (vergl. dazu auch Abb. 5.16). 9.5 μM Aktinnetzwerk, 4.5 μm Sondenkugeln.

5.4.3.1 Einfluss starker Kraftgradienten

Untersucht werden soll der Einfluss des Kraftgradienten auf das Langzeitverhalten der Kriechkomplianzkurven. Es wird angenommen, dass sich die Kugel bereits in einem Gleichgewicht befindet, also die Stoksche Gleichung $F(t) = \gamma \dot{x}$ mit $\gamma = 6\pi\eta R$, gilt.

Trägt man die, vom Sondenort $x(t)$ abhängige Kraft $F(x)$, für einen starken Kraftpuls über der Zeit auf, erhält man Kurven, wie sie beispielhaft in Abbildung 5.26 abgebildet ist. Diese Art von Kurve lässt sich für beliebige Pulse erfolgreich mit folgenden Ansatz beschreiben (vergl. Abb 5.27(a)):

$$F(t) = F_0 + A(t_e - t)^{-\alpha} \quad (5.15)$$

Dabei ist F_0 ein unveränderlicher Kraftanteil und A die zusätzliche Kraftamplitude, welche nahe der Endzeit t_e gegen Unendlich wächst. Das ist der imaginäre Zeitpunkt, an dem die Kugel auf die Magnetkernspitze treffen würde. Der Koeffizient α beschreibt die Stärke des Anstiegs der Kraft. Die korrekte, zu integrierende Bewegungsgleichung ergibt sich also zu:

$$\dot{x}(t) = \frac{1}{\gamma} (F_0 + A(t_e - t)^{-\alpha}) \quad (5.16)$$

Die Lösung $x(t)$ liefert die Integration der Differentialgleichung, wobei sich die Konstante aus der Randbedingung $x(0) = 0$ ergibt:

$$x(t) = c_1 + \frac{F_0}{\gamma} t - \frac{A}{\gamma(1-\alpha)} (t_e - t)^{1-\alpha} \quad \text{mit} \quad c_1 = \frac{A}{\gamma(1-\alpha)} t_e^{1-\alpha} \quad (5.17)$$

Teilt man Gleichung 5.17 durch Gleichung 5.15 erhält man einen Ausdruck, welcher die Kriechkomplianz im viskosen Grenzfall beschreibt:

$$\frac{x(t)}{F(t)} = \frac{1}{\gamma} \frac{F_0 t + \frac{A}{1-\alpha} (t_e^{1-\alpha} - (t_e - t)^{1-\alpha})}{F_0 + A(t_e - t)^{-\alpha}} \quad (5.18)$$

Diese Gleichung reproduziert mit geeigneten Parametern für F_0 , A , α und t_e die nach unten abknickenden Kurven der Kriechkomplianz (vergl. ebenfalls Abb. 5.26). Der Einfluss des Verhältnisses A/F_0 auf die Kriechkomplianzkurvenform ist in Abbildung 5.27(b) dargestellt. Die von den normalen Kriechkomplianzkurven abweichende Kurvenform ist damit erklärt.

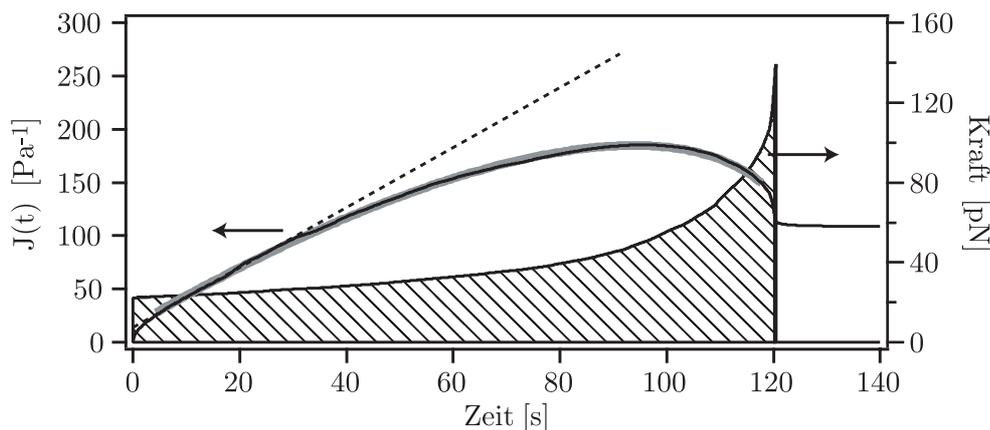


Abbildung 5.26: Typischer Kurvenverlauf einer Kriechkomplianzkurve (schwarze Linie), die mit einer sich während des Pulses stark verändernden Kraft (schraffierter Bereich), aufgenommen wurden. Bei konstanter Kraft würde die Kurve für lange Zeiten annähernd linear mit der Steigung $1/6\pi\eta R$ ansteigen (gestrichelte Linie). Eine angepasste Funktion der Art 5.18 mit einem zusätzlichen konstanten Glied J_0 , dass den elastischen Anteil einer realen Messung beschreibt, ist in grau hinterlegt.

Insbesondere handelt es sich nicht um eine nichtlineare Abhängigkeit der Langzeitviskosität des Aktinnetzwerkes von der Kraft bzw. von der Geschwindigkeit (ersteres wäre abgesehen davon auch kaum erklärbar, jedoch zumindest für zweiteres gäbe es denkbare Erklärungen). Eine Darstellung der numerisch differenzierten Auslenkungskurven in Abhängigkeit von der Kraft zeigte, wie erwartet, keine erkennbare Abhängigkeit der Geschwindigkeitsverteilung von der angelegten Kraft (Daten nicht gezeigt).

Wenn die Änderung der Kraft $A(t_e - t)^{-\alpha}$ klein gegen F_0 ist, gilt folgender Zusammenhang (vergl. Abb. 5.27(b)):

$$\frac{x(t)}{F(t)} \approx \frac{1}{\gamma} t \quad (5.19)$$

Die Auslenkungskurven entsprechen in diesem Fall denjenigen, die man bei Auslenkung mit einer konstanter Kraft erhalten würde, die genaue Berechnung der theoretischen Größe aus Gleichung 5.18 liefert in diesem Fall lediglich eine kleine Korrektur für lange Zeiten. Das ist insofern von zentraler Bedeutung, als dass dadurch garantiert wird, dass alle Kurven, die in einer gewissen Entfernung ($\Delta x \gtrsim 100 \mu\text{m}$) von der Magnetkernspitze aufgenommen wurden, ohne Korrektur so ausgewertet werden dürfen, als ob die Kraft konstant wäre. Der überwiegende Anteil der aufgenommenen Kurven erfüllt diese Bedingung, was die Auswertung der Daten erheblich vereinfacht.

Um dieses Verhalten zu quantifizieren, soll eine Bedingung gefunden werden, die garantiert, dass die Abweichungen der gemessenen Kurven von der Kurvenform, die man mit konstanten Kräften erhalten würde, klein bleiben. Die Gleichung 5.18 wird dazu erneut differenziert und anschließend wird gefordert, dass das Ergebnis weniger als z.B. 10 % von einem Gesetz $J(t)' = 1/\gamma = \text{konstant}$ abweicht:

$$\left[\frac{x(t)}{F(t)} \right]' = \frac{1}{\gamma} (1 + f(A, F_0, \tau)) \quad f(A, F_0, \tau) < \frac{1}{10} \quad (5.20)$$

Dabei ist τ das Verhältnis $\tau = t/t_e$. Eine längere Rechnung liefert die Störfunktion $f(A, F_0, \tau)$,

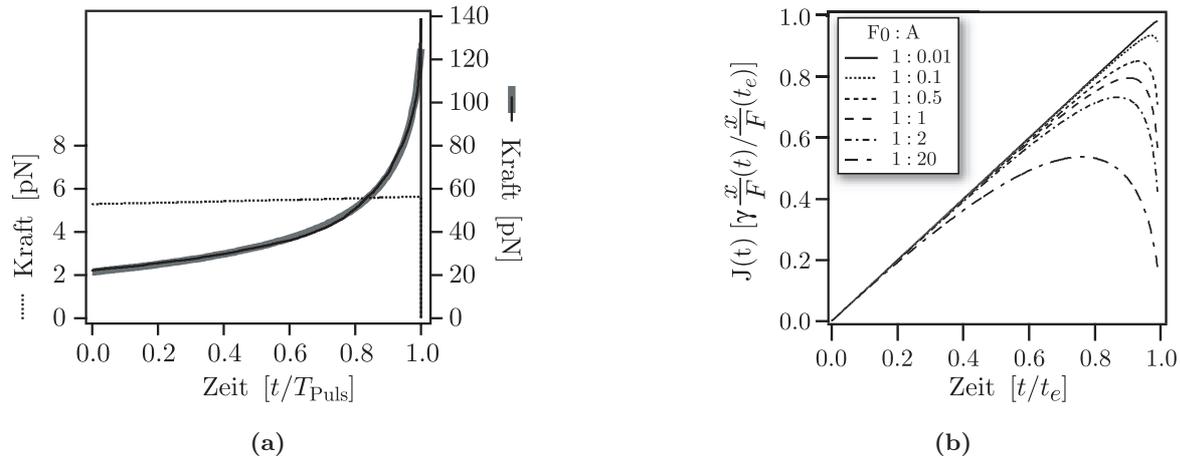


Abbildung 5.27: (a) Vergleich von Kraftkurven einer Messung bei normalem Abstand zum Spulenkernende (gestrichelte Linie) und einer Messung mit größeren Auslenkungen nahe der Spulenkernkante (schwarze Linie). Die graue Linie repräsentiert eine angepasste Funktion der Art wie in Gl. 5.15. Die Zeiten sind auf die Länge eines Kraftpulses normiert ($\mathcal{O}(60 \text{ s})$). Man sieht deutlich, dass bei einer gewöhnlichen Messung $F(T) - F(0) \ll F(0)$ gilt. (b) Theoretisch berechnete x/F -Kurven für das viskose Regime für unterschiedliche Verhältnisse F_0 zu A . Die Kurven sind so normiert, dass eine Kurve mit Steigung $m = 1$ dem Verhalten bei konstanter Kraft entspricht. Man beachte, dass für alle Kugeln, die nicht bis in die Nähe der Spulenkernkante ausgelenkt werden gilt, dass T nur ein Bruchteil von t_e beträgt.

die aufgrund ihrer Komplexität lediglich für numerische Abschätzungen verwendet wurde:

$$f(A, F_0, \tau) = \frac{A}{F_0} (\tau^2 t_e^2 (1 - 1/\tau)^{-1-\alpha} (\alpha - 1 - 1/\tau) - \tau^{-\alpha} t_e^{-\alpha}) \quad (5.21)$$

Um eine Faustregel zu erhalten, bei der man nicht darauf angewiesen ist, die Anpassung der Gleichung 5.15 an die Kraftkurven tatsächlich auszuführen (bei dieser Anpassung sind A und F_0 lediglich Parameter, so ist F_0 nicht die Kraft zur Zeit $t = 0$ sondern die nach $t \rightarrow -\infty$ extrapolierte Kraft, die insbesondere auch negativ werden kann), wird eine lineare Approximation betrachtet, die um so genauer wird, je weiter man vom Spulenkernende entfernt misst. Als Ansatz für die Kraft wird also $F(t) \approx F_0 + At$ (F_0 und $\delta = At$ sind die Kraft zum Pulsbeginn und der Kraftzuwachs bis zum Pulsende) benutzt. Einsetzen in die Differentialgleichung, integrieren, teilen durch die Kraft und erneutes Differenzieren führt zu folgendem Zusammenhang:

$$\left[\frac{x(t)}{F(t)} \right]' \approx \frac{1}{\gamma} \left(1 + \frac{\frac{1}{2}\delta^2 + F_0\delta}{(F_0 + \delta)^2} \right) \quad (5.22)$$

Die Bedingung, dass das Ergebnis weniger als q Prozent von $J(t)' = 1/\gamma = \text{konstant}$ abweichen soll, bedeutet, dass der zweite Summand in der Klammer kleiner als ein Bruchteil $1/q$ sein muss. Das Auflösen nach δ und Entwickeln der Wurzel liefert die gesuchte Bedingung:

$$\delta \lesssim \left(\sqrt{1 + \frac{1}{\frac{1}{2}q - 1}} - 1 \right) \approx \frac{1}{q - 2} = \mathcal{O}\left(\frac{1}{q}\right) \quad (5.23)$$

Als Faustregel gilt also: Bleibt die Veränderung der Kraft δ während eines Pulses unter etwa 10 %, so bleibt der maximale Fehler der Steigung m ($\sim 1/\eta$) in dieser Größenordnung.

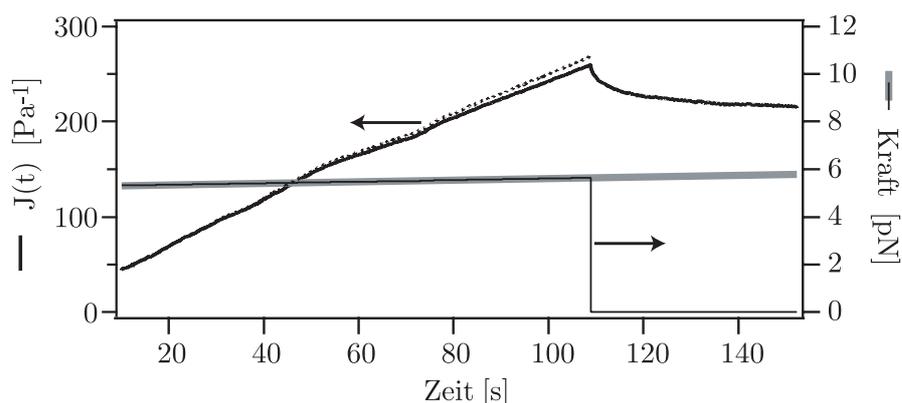


Abbildung 5.28: Gezeigt ist eine Kriechkomplianzkurve (dicke schwarze Linie), welche mit einer sich um ca. 7 % verändernden Kraft (dünne schwarze Linie) aufgenommen wurde. Die angepasste Funktion nach Gl. 5.15 ist grau dargestellt. Die mittels dieser Anpassung korrigierte Kriechkomplianz ist gestrichelt dargestellt. Die maximale Abweichung der Steigung für lange Zeiten beträgt 5%. ($35\mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5\mu\text{m}$ Sondenkugel).

Zu beachten ist dabei, dass dieser maximale Fehler bei einer realen Kraftabhängigkeit erst am Ende der Kriechkomplianzkurven auftritt. Die Korrektur einer Kriechkomplianzkurve, die mit einer Kraftvariation von etwas unter 10 % aufgenommen wurde, ist in Abb. 5.28 gezeigt.

Es sei hier nochmal betont, dass die eben beschriebenen Korrekturen überhaupt erst nötig werden, wenn deutliche Gesamtauslenkungen auftreten (was in der Regel nur nahe der Spulenkernkante der Fall ist). Für alle Prozesse, welche auf Zeitskalen unter 10 Sekunden stattfinden, ist die Korrektur für nicht konstante Kräfte absolut zu vernachlässigen.

In dem Bereich, in dem die Kurven extrem vom linearen Verhalten abweichen und somit ein Einfluss der Korrektur auf absolut gemessene Größen, wie z.B. den Plateaumodul, denkbar wäre, wurden grundsätzlich keine quantitativen Messungen durchgeführt, da in der Nähe der Spulenkernkante die Krafteichung zunehmend ungenau wird (vergl. Kap. 3).

5.4.3.2 Zusammenfassung und Ergebnis

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die nach unten abknickenden Kriechkomplianzkurven aufgrund einer starken Veränderung der Kraft während des Pulses auftreten und nicht durch z.B. eine geschwindigkeitsabhängige Reibung der Kugel im Netzwerk. Es wurde gezeigt, dass dieser Effekt für Sonden, die in deutlicher Entfernung zur Spulenkernkante ausgelenkt werden, absolut zu vernachlässigen ist. Für stärker beeinflusste Kurven wurde eine Faustformel entwickelt anhand derer man die Größenordnung der Korrektur einfach abschätzen kann.

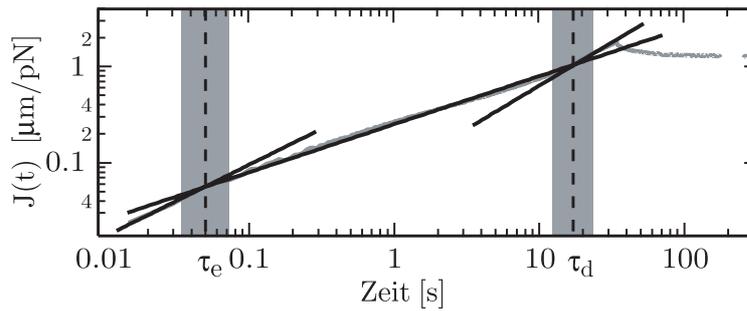


Abbildung 5.29: Experimentelle Bestimmung der charakteristischen Zeiten τ_e und τ_d (entsprechend der Diffusionstheorie) aus einzelnen Kriechkomplianzkurven durch Anpassung von Potenzgesetzen. Die grauen Bereiche sind die geschätzten Fehlerintervalle.

5.5 Kraftabhängigkeit der viskoelastischen Materialparameter

Als unerwartete Neuheit konnten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten systematischen Messungen der erzwungenen Kugelauslenkung in Aktinnetzwerken Kraftabhängigkeiten für verschiedene viskoelastische Materialparameter aufzeigen. Der Einfluss der Kraft auf die Entanglement-Zeit τ_e , die terminale Relaxationszeit der Kugelbewegung τ_d und auf den Koeffizienten A_2 des Wurzelregimes ($J(t) = A_2 t^{0.5}$) sollen im Folgenden diskutiert werden. Die Zeit τ_d ist dabei im Rahmen der zur Erklärung der Experimente verwendeten osmotischen Theorie definiert (vergl. Gl. 2.30). Praktisch werden τ_e und τ_d als die Kreuzungspunkte definiert, an denen sich die angepassten Potenzgesetze $J(t) \sim t_n^\alpha$ (mit $\alpha_n = 0.75, 0.5, 1$) schneiden (vergl. Abb. 5.29). Der Koeffizient A_2 wird ebenfalls aus den angepassten Potenzgesetzen bestimmt. Für die Berechnung der Kraftabhängigkeit wurden fünf verschiedene Experimente mit jeweils größenordnungsmäßig 30 Kurven herangezogen.

Kraftabhängigkeit der Kriechkomplianz im Wurzelregime Da die Absolutwerte von A_2 bei der Anpassung eines Gesetzes der Form $J(t) = A_2 F^{\beta_F} t^{0.5}$ von Experiment zu Experiment stark streuen, wurde jedes Experiment einzeln ausgewertet, indem jeweils die Koeffizienten A_2 gegen die Kraft aufgetragen wurden. Für den berechneten Logarithmus der Daten, aufgetragen gegen den berechneten Logarithmus der Zeit, wurden dann ein linearer Ausgleich durchgeführt.¹¹ Zusätzlich wurden maximal und minimal verträgliche Steigungen abgeschätzt, um die Größenordnung der Ungenauigkeit abzuschätzen. Zwei Beispiele dieser Auswertung sind in Abbildung 5.30 zu sehen. Außerdem sind in der Tabelle 5.4 alle Potenzen der jeweils besten Anpassung für Kräfte zwischen einem und 100 pN für fünf unterschiedliche Experimente eingetragen.

Insgesamt gilt also zwischen der Entanglement-Zeit und dem Erreichen des Gleichgewichtszustandes folgende Abhängigkeit:

$$J(t) = A_2 t^{0.5} F^{-0.27 \pm 0.08}$$

¹¹Diese Methode liefert, falls keine Fehler der Einzelmessungen für eine Wichtung der Anpassung zur Verfügung stehen, ein wesentlich genaueres Ergebnis als das Anpassen einer Potenzfunktion an die Originaldaten. Das liegt daran, dass eine sinnvolle Annahme für die Fehler ist, dass sie prozentual mit dem Messwert ansteigen. Für spätere Datenpunkte sollte in der Anpassung also eine größere Abweichung erlaubt sein als für frühere (die ja kleinere absolute Fehler haben). Die Anpassung einer Potenzfunktion an die Originaldaten erlaubt aber für lange Zeiten die gleichen absoluten Abweichungen wie für kurzen Zeiten. Das führt zu einer totalen Überbewertung der späteren Messpunkte.

Probe Nr. (c_A)	Potenz β_F	Fehler
1 (9.5 μM)	-0.25	± 0.15
2 (11 μM)	-0.29	± 0.15
3 (19 μM)	-0.26	± 0.2
4 (27 μM)	-0.27	± 0.15
5 (35 μM)	-0.31	± 0.3
Gewichteter Mittelwert	-0.27	± 0.08

Tabelle 5.4: Kraftabhängigkeit der Kriechkomplianz im Wurzelregime. Tabelliert sind die Potenzen der besten Anpassungen aus fünf verschiedenen Experimenten.

Folgende theoretische Überlegung liefert einen Erklärungsansatz für diese Kraftabhängigkeit im Rahmen des neuen Modells:

Aus der freien Energie eines Filaments in der Reptationsröhre von $\mathcal{F} \sim L/L_e$ (Länge/Entanglement-Länge) folgt für eine asymmetrisch komprimierte Röhre, wie sie auftritt, wenn ein Sondenpartikel durch das Netzwerk gezogen wird, folgende Abhängigkeit für die Entanglement-Länge [Bicout und Burkhardt, 2001]:

$$L_e \sim L_p^{1/3} \left(\frac{1}{\xi_{\parallel}^{2/3}} + \frac{1}{\xi_{\perp}^{2/3}} \right)^{-1} \quad (5.24)$$

Dabei ist ξ_{\perp} die Dimension der Röhre in komprimierte Richtung und $\xi_{\parallel} \approx \xi$ ist die Dimension parallel zur Kugeloberfläche. Die Kraft pro Längeneinheit f ist dann

$$f = (\partial\mathcal{F}/\partial\xi_{\perp})/L \sim \xi_{\perp}^{-5/3} \quad (5.25)$$

Da die Gesamtanzahl N der Filamentstücke, die mit der Kugel kollidieren können, umgekehrt proportional zu $\xi_{\parallel} \approx \xi$ ist, unterliegt die Gesamtkraft $F_{osm} = Nf$ auf die Kugel folgenden Abhängigkeiten:

$$F_{osm} \sim \xi_{\perp}^{-5/3} \xi^{-1} \quad (5.26)$$

Aus Gleichung 2.31 folgt für das Verhältnis der Konzentrationen vor und weit entfernt von der Kugel (c/c_0):

$$\frac{c}{c_0} \sim \frac{x(t)}{\sqrt{D}} \quad (5.27)$$

Mit der Annahme, dass die Diffusion von Filamentstücken der Dimension L_e wie die Diffusion steifer Stäbe beschrieben werden kann ($D \sim (L_e \ln(\xi/a))^{-1}$, Stokes), wobei $\ln(\xi/a) \approx 1$ ist und aus Gleichung 5.24 dann folgt:

$$D \sim L_c^{-1} \approx L_p^{-1/3} \xi_{\perp}^{-2/3} \quad \text{für} \quad \xi_{\perp} \ll \xi_{\parallel} \quad (5.28)$$

Einsetzen in Gleichung 5.27 liefert:

$$\frac{c}{c_0} \sim x(t) \xi^{1/3} \quad (5.29)$$

Andererseits ergibt sich aus rein geometrischen Überlegungen für die Volumina, die ein Filamentstück der Länge L_e nahe und fern der Kugel zur Verfügung hat (V_0/V), dass:

$$\frac{c}{c_0} = \frac{V_0}{V} = \frac{\xi^3}{\xi_{\perp} \xi_{\parallel}^2} \approx \frac{\xi}{\xi_{\perp}} \quad (5.30)$$

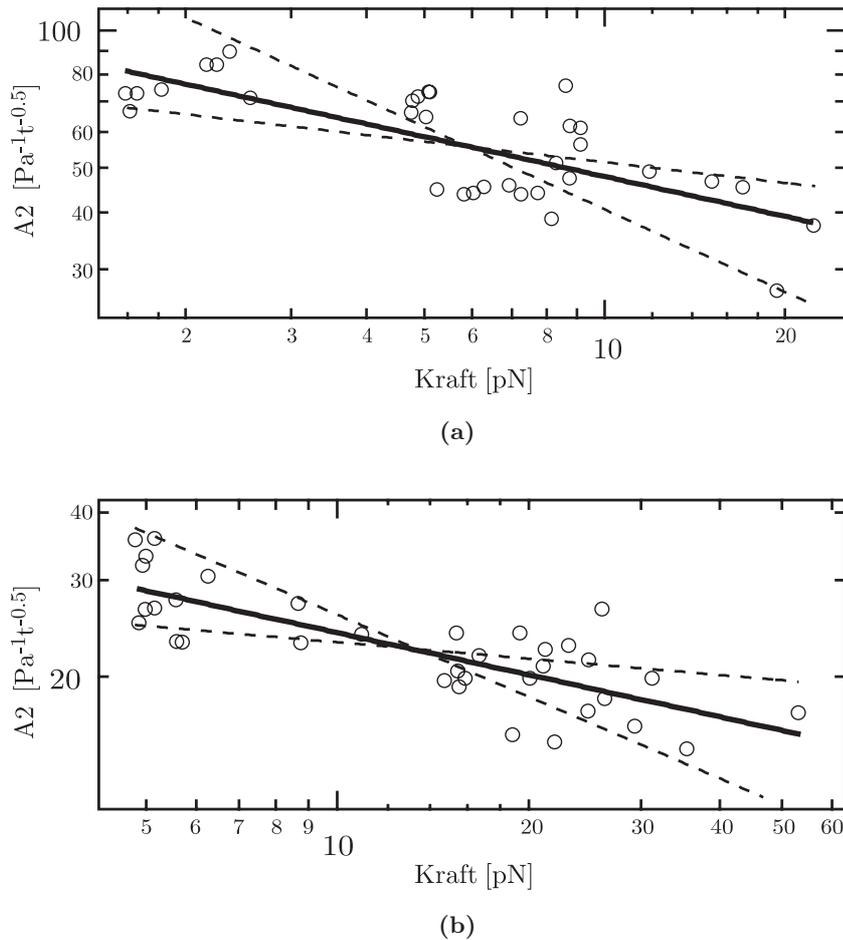


Abbildung 5.30: Zwei exemplarische Auswertungen für die Kraftabhängigkeit der Kriechkomplianz im Wurzelregime. Aufgetragen sind die Koeffizienten A_2 aus angepassten Potenzgesetzen der Form $J(t) = A_2 t^{0.5}$ gegen die Kraft in doppelt logarithmischer Darstellung. Die durchgezogene, dicke Linie repräsentiert das beste angepasste Potenzgesetz, die gestrichelten Linien repräsentieren Potenzgesetze mit minimalen und maximalen Potenzen. (a) $11 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5 \mu\text{m}$ Sondenkugeln, beste Potenz -0.29 , minimale/maximale Potenz $-0.15/-0.55$. (b) $19 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5 \mu\text{m}$ Sondenkugeln, beste Potenz -0.26 , minimale/maximale Potenz $-0.1/-0.5$.

Gleichsetzen von Gleichung 5.29 und 5.30 eliminiert c/c_0 , Einsetzen in Gleichung 5.26 und Umformen liefert die Abhängigkeit der Auslenkung von der Kraft und der Maschenweite:

$$x \sim f^{4/5} \xi^{9/5} \quad (5.31)$$

Teilen durch F liefert die Abhängigkeit der Komplianz von den eben genannten Größen:

$$J \sim x/F \sim f^{-1/5} \xi^{9/5} \quad (5.32)$$

Womit ein genäherter Ausdruck für die Kraft- und Maschenweitenabhängigkeit der Kriechkomplianz entwickelt wurde.

Diese Herleitung sagt also für das Wurzelregime folgendes Potenzgesetz voraus:

$$J^{\text{th}}(t) = A_{20} t^{0.5} F^{-0.2}$$

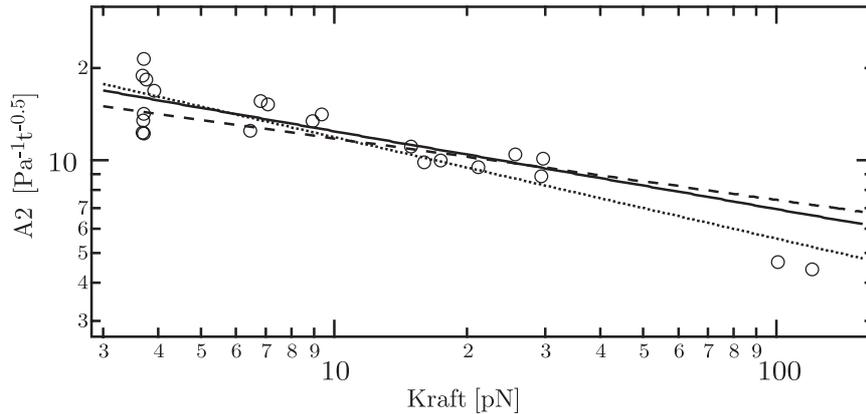


Abbildung 5.31: Vergleich der Anpassung von Potenzgesetzen an die Kraftabhängigkeit der Kriechkomplianz im Wurzelregime (Symbole) bis etwa 50 pN ($\beta_F = 0.27$, durchgezogene Linie) und über den gesamten Messbereich ($\beta_F = 0.33$, gepunktete Linie) mit der im Text beschriebenen, vereinfachten theoretischen Erklärung, die einen Exponenten von $\beta_F = 0.2$ vorhersagt (gestrichelte Linie).

Dieser Wert stimmt damit trotz des einfachen Modells gut mit dem experimentell bestimmten Exponenten der Kraftabhängigkeit überein, auch wenn die experimentell bestimmten Werte tendenziell höher liegen.

Im Bereich deutlich über 50 pN wird die Übereinstimmung möglicherweise noch etwas schlechter, dies ist exemplarisch in [Abbildung 5.31](#) gezeigt. Für das gezeigt Experiment liegt der gesamte Exponent bei $\beta_F = -0.33$

Da die Anzahl der in diesem Kraftbereich aufgenommenen Kriechkomplianzkurven jedoch nicht sehr hoch ist, sollte eine Abweichung zu höheren Potenzen für sehr große Kräfte nur als Hypothese in Betracht gezogen werden.

Kraftabhängigkeit der charakteristischen Zeiten τ_e und τ_d Auch die Entanglement-Zeit τ_e und die charakteristische Zeit, innerhalb derer die Diffusion der Filamente um die Kugel ein Gleichgewichtszustand erreicht hat (τ_d), weisen eine Kraftabhängigkeit der Form $\tau = \tau_0 F^{\beta_\tau}$ auf. Da es für dieses Phänomen noch keine ausgearbeitete Erklärung gibt, soll die Kraftabhängigkeit an dieser Stelle lediglich exemplarisch an einem Experiment aufgezeigt werden. Für alle Kurven eines Experiments, bei denen sich sowohl ein $t^{3/4}$ - als auch ein $t^{0.5}$ -Gesetz befriedigend anpassen ließen, wurde nach der am Anfang dieses Kapitels beschriebenen Methode die Übergangszeit τ_e bestimmt. Nach der gleichen Methode wurde aus allen Kurven, die lange genug aufgenommen wurden um ein annähernd lineares Regime anzupassen, die Zeiten τ_d extrahiert (vergl. [Abb. 5.29](#)).

Die Zeiten wurden jeweils in doppelt logarithmischer Darstellung gegen die zum Anfang des Pulses wirkende Kraft (für τ_e), bzw. gegen die mittlere, während des Pulses wirkende Kraft (für τ_d) aufgetragen. Die Ergebnisse sind in [Abbildung 5.32](#) und [5.33](#) zu sehen. Deutlich ist die nichtlineare Abhängigkeit der Entanglement-Zeit und der charakteristischen Diffusionszeit von der angelegten Kraft zu erkennen. Die besten Anpassungen für Potenzgesetze ergeben sich zu

$$\tau_e(F) = \tau_{e,0} F^{-0.54 \pm 0.3}$$

und

$$\tau_d(F) = \tau_{d,0} F^{-0.55 \pm 0.3}$$

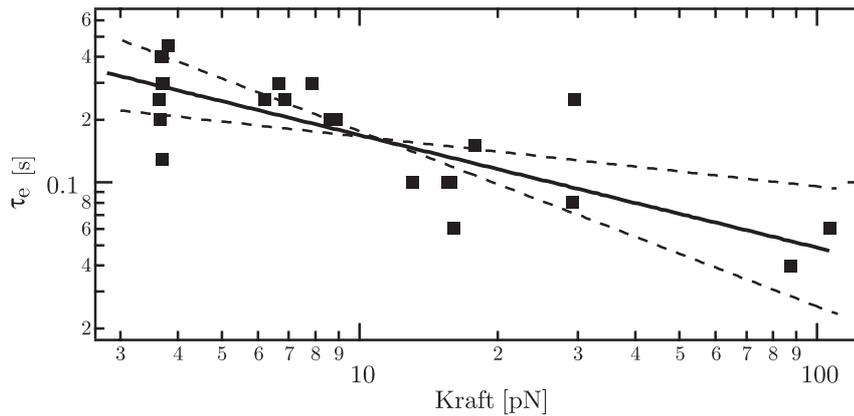


Abbildung 5.32: Kraftabhängigkeit der Entanglement-Zeit τ_e (Symbole) in doppelt logarithmischer Darstellung. Trotz der starken Streuung der Werte ist eine sublineare Abhängigkeit von τ_e von der Kraft deutlich zu erkennen. Die beste Anpassung eines Potenzgesetzes liefert eine Potenz von -0.54 ± 0.3 . Die maximal und minimal verträglichen Potenzgesetze sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. ($9.5 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5 \mu\text{m}$ Sondenkugeln).

Trotz der jeweils großen Fehler ist damit eine Kraftabhängigkeit für beide charakteristische Zeiten deutlich nachgewiesen. In beiden Fällen liegt der wahrscheinlichste Wert so, dass die Abhängigkeit ungefähr invers wurzelförmig ist, der wahre Wert liegt jedoch irgendwo zwischen $\beta_\tau \approx -0.25$ und $\beta_\tau \approx -0.85$. Der angepasste Wert von $\beta_\tau \approx -0.5$ sollte deshalb nur als Richtwert für die Größenordnung der Abhängigkeit betrachtet werden. Ob die Ähnlichkeit der Abhängigkeiten darauf beruht, dass der selbe Mechanismus für die Verschiebungen der Zeiten zuständig ist oder ob es sich um eine zufällige Koinzidenz handelt, kann an dieser Stelle nicht entschieden werden.

Aufgrund der Kraftabhängigkeit der charakteristischen Zeiten sollte beim Vergleich von Absolutwerten mit den Werten aus passiven Messungen immer ein Mittelwert über Messungen bei geringen bis mittleren Kräften gewählt werden. Da die meisten Daten für diese Arbeit genau in dem eben beschriebenen Kraftbereich aufgenommen worden sind, wurde in den bis jetzt beschriebenen Auswertungen die Kraftabhängigkeit von τ_e und τ_d nicht explizit berücksichtigt, ohne damit einen größeren Fehler zu machen.

5.5.1 Zusammenfassung und Ergebnis

In diesem Kapitel wurde erstmals nachgewiesen, dass verschiedene viskoelastische Antwortgrößen bei der erzwungenen Kugelauslenkung in einem halbverdünnten Aktinnetzwerk von der angelegten Kraft nichtlinear abhängig sind. Speziell wurde gezeigt, dass der Vorfaktor der Kriechkomplianz im Wurzelregime mit $F^{-0.27 \pm 0.08}$ abfällt. Eine einfache theoretische Abschätzung liefert eine Abhängigkeit im Bereich von $F^{-0.2}$. Dieser Wert ist tendenziell kleiner, aber immer noch in der gleichen Größenordnung wie der experimentell bestimmte Wert. Weiterhin wurde gezeigt, dass die charakteristischen Zeiten τ_e (Entanglement-Zeit) und τ_d (Diffusions-Relaxations-Zeit) etwa invers wurzelförmig von der angelegten Kraft abhängen. Hierfür gibt es noch keine ausgearbeitete theoretische Erklärung.

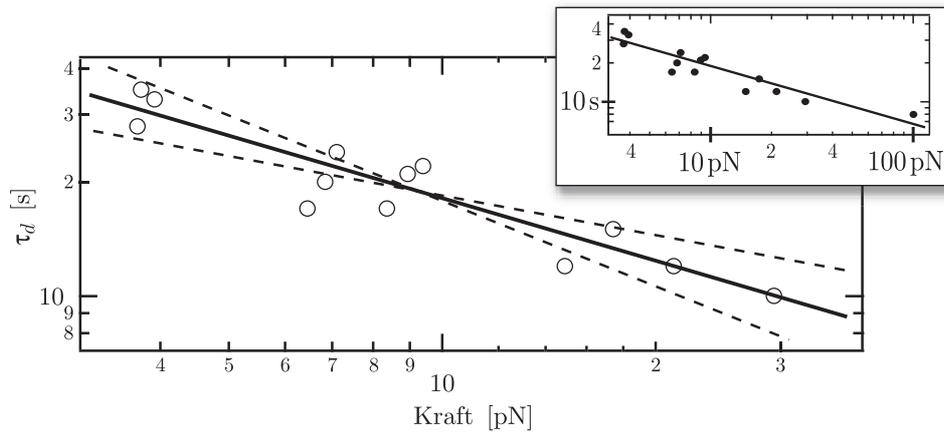


Abbildung 5.33: Kraftabhängigkeit der charakteristischen Diffusionszeit τ_d (offene Symbole) in doppelt logarithmischer Darstellung für Kräfte bis etwa 30 pN. Die beste Anpassung eines Potenzgesetzes liefert eine Potenz von -0.55 ± 0.2 . Die maximal und minimal verträglichen Potenzgesetze sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. Der Einsatz zeigt die beste Anpassung mit einem zusätzlichen τ_d -Wert bei einer Kraft von über 100 pN, die Potenz dieser Anpassung ergibt sich zu -0.45 . ($9.5 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, $4.5 \mu\text{m}$ Sondenkugeln).

5.6 Einfluss der Maschenweite bzw. der Aktinkonzentration

Wurzelregime In einem halbverdünnten Aktinnetzwerk sind die Maschenweite ξ und die Aktinkonzentration c_A durch die Beziehung 2.5 miteinander verknüpft, woraus folgt, dass $\xi \sim c_A^{-1/2}$ ist. Bei einer einfachen Abschätzung der Abhängigkeit der Kriechkomplianz J von der Maschenweite (vergl. Kap. 5.5) ergibt sich nach Gleichung 5.32 die Abhängigkeit $J \sim \xi^{9/5}$. Die Kombination dieser beiden Gesetze liefert eine theoretische Vorhersage für die Abhängigkeit der Kriechkomplianz von der Aktinkonzentration für die erzwungene Kugelauslenkung, die annähernd linear verläuft:

$$J^{\text{th,osm}} \sim c^{-0.9} \quad (5.33)$$

Dieser Wert gilt dann, wenn die Komprimierung des Netzwerkes als einziger Mechanismus angenommen wird, der eine rückstellende Kraft verursacht. Berechnungen für den Plateaumodul G_P im passiven Fall (Grenzfall: $F_{\text{ext}} \rightarrow 0$) liefern dagegen eine Abhängigkeit von $G_P \sim c^{7/5}$ [Isambert und Maggs, 1996; Hinner et al., 1998]. Da das Wurzelregime in der Zeit des Auftretens des Plateaus liegt, kann man annehmen, dass folgender Zusammenhang gilt $J \sim 1/G_P$. Daraus folgt:

$$J^{\text{th,pass}} \sim c^{-1.4} \quad (5.34)$$

Die tatsächliche Abhängigkeit sollte sich zwischen diesen beiden Extremwerten bewegen. Dabei ist anzunehmen, dass bei kleinen Konzentrationen, bei deren Verwendung mit sehr schwachen Kräften gemessen werden muss, der Einfluss der thermischen Undulationen stärker ist. Bei hohen Konzentrationen, bei deren Verwendung mit stärkeren Kräften gemessen werden muss, sollte dieser Einfluss dagegen immer schwächer werden.

Die von Nikita Ter-Organessian durchgeführten numerischen Simulationen der erzwungen Kugelbewegung mit einem Netzwerk verschlaufte semiflexibler Polymere liefern (zumindest für sehr kurze Auslenkungen) einen skalierenden Exponenten, der innerhalb des oben angegebenen Intervalls liegt:

$$J^{\text{sim}} \sim c^{-1.3} \quad (5.35)$$

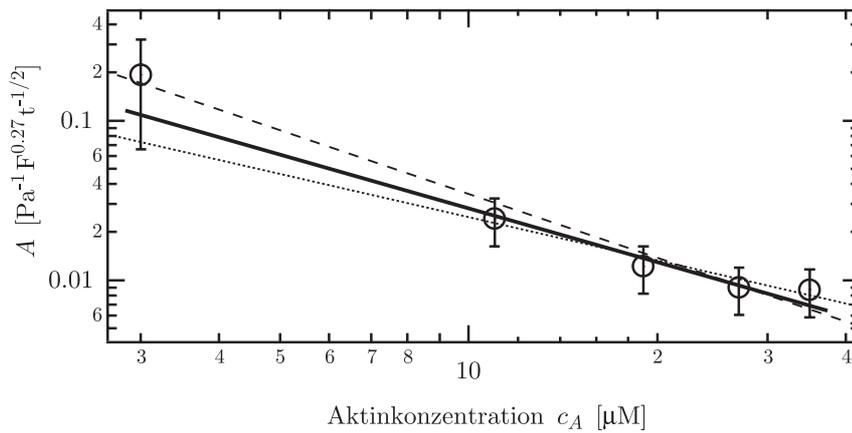


Abbildung 5.34: Konzentrationsabhängigkeit der Kriechkomplianz im Wurzelregime. Gezeigt ist die Abhängigkeit von A (A ist die Amplitude der Abhängigkeit $J = A F^{-0.27} t^{1/2}$) von der Aktinkonzentration der Probe (Symbole mit geschätztem Fehler). Die Linien repräsentieren Abhängigkeiten der Form $a \sim c^{\beta_c}$. Die unterbrochenen Linien stellen die Vorhersage der Simulation (gestrichelte Linie) und der theoretischen Abschätzung (punktierter Linie) dar. Die durchgezogenen Linien repräsentieren die beste gewichtete Anpassung über alle Datenpunkte ($\beta_c = -1.1 \pm 0.3$).

Nach der obigen Überlegung sind also die in der Simulation wirkenden Kräfte im Verhältnis zu thermischen Kräften relativ klein. Dazu passt die Tatsache, dass in der gesamten Simulation nur sehr kleine Auslenkungen Δx erreicht werden ($\Delta x < \text{Kugelradius}$).

Um die Abhängigkeit der Kriechkomplianz von der Aktinkonzentration experimentell zu untersuchen, wurden fünf verschiedene Messproben aus einer Aktinpräparation angesetzt (Konzentrationen: 3, 11, 19, 27, 35 μM). Die untere Konzentrationsgrenze ergab sich dabei aus der Forderung, dass das Netzwerk in relativ kurzer Zeit noch auspolymerisieren sollte. Die obere Grenze ergab sich aus der Maximalkonzentration der entsprechenden Aktinpräparation. Diese Proben wurden jeweils nach identischen Polymerisationszeiten mit dem High-Force Aufbau untersucht. An die Kriechkomplianzkurven wurde im entsprechenden Bereich jeweils ein Wurzelgesetz angepasst (vergl. Kap. 5.4.2) und die Amplituden dieser Anpassungen über die angelegte Kraft aufgetragen. Anschließend wurde ein kraftabhängiges Potenzgesetz mit der Potenz $\beta_F = -0.27$ an die neue Auftragung angepasst (vergl. Kap. 5.5) und die dabei erhaltenen Amplituden wiederum doppelt logarithmisch gegen die Konzentration der entsprechenden Probe aufgetragen. Die Anpassung einer Gerade an diese Darstellung entspricht der Bestimmung der Potenz β_c für folgende Abhängigkeit:

$$J^{\text{mess}} = A F^{-0.27} t^{1/2} c^{\beta_c} \quad (5.36)$$

Der Fehler der Auswertung wurde, auch im Vergleich mit anderen Experimenten, zu ca. 1/3 der Messwerte geschätzt. Da die Auswertung der Probe mit 3 μM nur sehr wenige vertrauenswürdige Kurven lieferte, ist der Wert A für diese Konzentration mit einer größeren Ungenauigkeit angegeben. Die mit diesen Ungenauigkeiten gewichtete Anpassung eines Potenzgesetzes an die Daten liefert einen skalierenden Exponenten von

$$\beta_c^{\text{mess}} = -1.1 \pm 0.3$$

Das heißt, dass sowohl die Ergebnisse der theoretischen Abschätzung als auch die Ergebnisse der Simulationsrechnung in der richtigen Größenordnung liegen.

Wie oben dargestellt, beschreibt die numerische Simulation die tatsächlichen Verhältnisse bei kleinen Konzentrationen (wegen der kleinen verwendeten Kräfte), während die theoretische Abschätzung für größere Konzentrationen (höhere verwendete Kräfte) gilt. Für diese Vermutung spricht, dass bei einer gewichteten Anpassung über die ersten vier Datenpunkte (kleine Konzentrationen) ein skalierender Exponent von $\beta_{c,kl} \approx -1.4 \pm 0.1$ gefunden wird. Bei einer gewichteten Anpassung über die letzten vier Datenpunkte (große Konzentrationen) findet man dagegen $\beta_{c,gr} \approx -0.9 \pm 0.2$ (vergl. Abhängigkeiten 5.33- 5.35). Das würde bedeuten, dass sich der Mechanismus, welcher die Konzentrationsabhängigkeit der Kriechkomplianz im untersuchten Konzentrationsbereich verursacht, in diesem Bereich tatsächlich in der oben dargestellten Weise verändert. Für diese Hypothese spricht auch, dass die Anpassung einer einzelnen Geraden in der doppelt logarithmischen Darstellung generell nicht sehr befriedigend ausfällt (vergl. Abb. 5.34).

Viskoses Regime Bis jetzt gibt es kaum verlässliche aktive Messungen der Langzeitviskosität η_0 von Aktinnetzwerken. Dementsprechend gibt es auch keine verlässlichen Messungen der Abhängigkeit dieses Materialparameters von der Netzwerkkonzentration.

Passive mikrorheologische Maßnahmen liefern ebenfalls sehr ungenaue Werte, so präsentiert [Dichtl und Sackmann, 1999] für die gleiche Aktinkonzentration Messwerte, die um ca. eine Größenordnung schwanken. Die einfache theoretische Vorhersage für die Bewegung einer Sondenkugel in einer dicht mit Partikeln gefüllten Umgebung (vergl. Kap.2) liefert eine Abhängigkeit von $\eta_0 \sim c_A$, was aber aufgrund der starken Vereinfachung des Modells lediglich die Größenordnung der Abhängigkeit aufzeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals systematisch die Abhängigkeit der auf ein Sondenpartikel wirkenden viskosen Widerstandskraft von der Aktinkonzentration untersucht. Dazu wurden, wie in Kapitel 5.4.2.1 beschrieben, an die Kriechkomplianzkurven von fünf verschiedenen Experimenten im viskosen Regime Geraden angepasst. Die verschiedenen Experimente entsprechen dabei Aktinkonzentrationen von $3\mu\text{M}$, $11\mu\text{M}$, $19\mu\text{M}$, $27\mu\text{M}$ und $35\mu\text{M}$. Die gemittelten inversen Steigungen wurden dann doppelt logarithmisch gegen die Aktinkonzentration aufgetragen. Als Ergebnis erhält man eine Darstellung der Langzeitviskosität η_0 wie in Abbildung 5.35. Die beste Anpassung liefert ein Potenzgesetz der Form

$$\eta_0 \sim c_A^{1.37 \pm 0.27}$$

Die Viskosität der stark verdünnten Probe mit einem $3\mu\text{M}$ Aktinnetzwerk liegt etwa eine Größenordnung über der von reinem Wasser ($\eta_0(\text{H}_2\text{O}) = 1\text{ mPas}$). Bei einer Aktinkonzentration von $c_A \approx 20\mu\text{M}$ ist die Viskosität schon auf das Hundertfache der Wasserviskosität angestiegen.

Wird die Abhängigkeit als Funktion des Verhältnisses aus Maschenweite ξ und Kugeldurchmesser d aufgetragen (nicht gezeigt), erhält man folgende Abhängigkeit:

$$\eta_0 \sim (\xi/d)^{-2.74 \pm 0.34}$$

5.6.1 Zusammenfassung und Ergebnis

In diesem Kapitel wurde die systematische Abhängigkeit der Absolutwerte der Kriechkomplianz von der Aktinkonzentration untersucht. Für Mikrosonden-Experimente mit Sonden, die etwa eine Größenordnung größer als die Maschenweite sind, ergibt sich dabei eine Abhängigkeit der Amplitude von $J \sim c^{\beta_c}$ mit einem skalierenden Exponenten von -1.1 ± 0.3 . Aus einer detaillierteren Analyse folgt, dass sich der Mechanismus, welcher diese Abhängigkeit

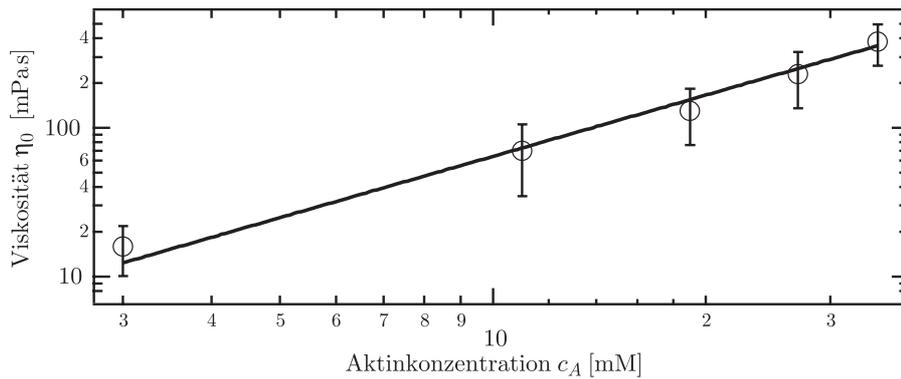


Abbildung 5.35: Konzentrationsabhängigkeit der Langzeitviskosität η_0 (Symbole mit Fehlerbalken) in doppelt logarithmischer Darstellung. Die durchgezogene Linie repräsentiert das beste angepasste Potenzgesetz der Form $\eta_0 \sim c_A^{\gamma_c}$ mit einem skalierenden Exponenten von $\gamma_c = 1.37 \pm 0.27$. Der Datenpunkt für das 3 μM Netzwerk liegt immer noch bei mehr als der zehnfachen Wasserviskosität.

verursacht, mit der angelegten Kraft verändert. Für kleine Kräfte scheint der Mechanismus demjenigen zu ähneln, der bei passive Messungen gilt, d.h. hier wird ein skalierender Exponent von ≈ -1.4 gefunden. Bei stärkeren Kräften scheinen osmotische Kräfte zu dominieren und der skalierende Exponent fällt auf ≈ -0.9 ab. Die skalierenden Exponenten entsprechen damit den theoretischen Vorhersagen für die entsprechenden Regime.

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Langzeitviskosität von der Aktinkonzentration (bzw. des Verhältnisses aus Maschenweite zu Kugeldurchmesser ξ/d) bestimmt. Es ergab sich dabei für den Konzentrationsbereich von 3-35 μM ein skalierender Exponent von $\gamma_c = 1.37 \pm 0.27$ (bzw. von -2.74 ± 0.34 für das Verhältnis ξ/d). Die Viskosität eines Aktinnetzwerkes in der hier untersuchten Konzentrationsspanne liegt grob ein bis zwei Größenordnungen über der von reinem Wasser.

5.7 Inhomogenes Langzeitverhalten der Komplianzkurven

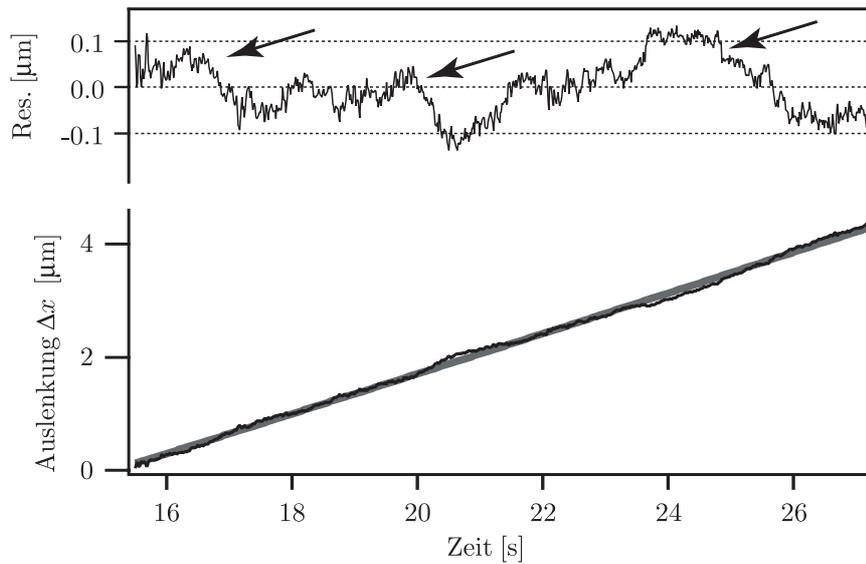
Alle Kriechkomplianzkurven, die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen wurden, zeigen mehr oder weniger starke Fluktuationen. Kleine Fluktuationen auf kurzen Zeitskalen, die bereits bei geringen Auslenkungen auftreten, sind schon früher charakterisiert worden. Die Kugelbewegung wird dabei auf langen Zeitskalen als Langevin-Gleichung mit einer ortsabhängigen Viskosität $\eta(x)$ und drei Arten von (statistischen) Fluktuationskräften F^s beschrieben: [Ziemann et al., 1994]:

$$6\pi R \eta(x) \cdot \dot{x} = F_0 + F_B^s + F_{e1}^s + F_{e2}^s \quad (5.37)$$

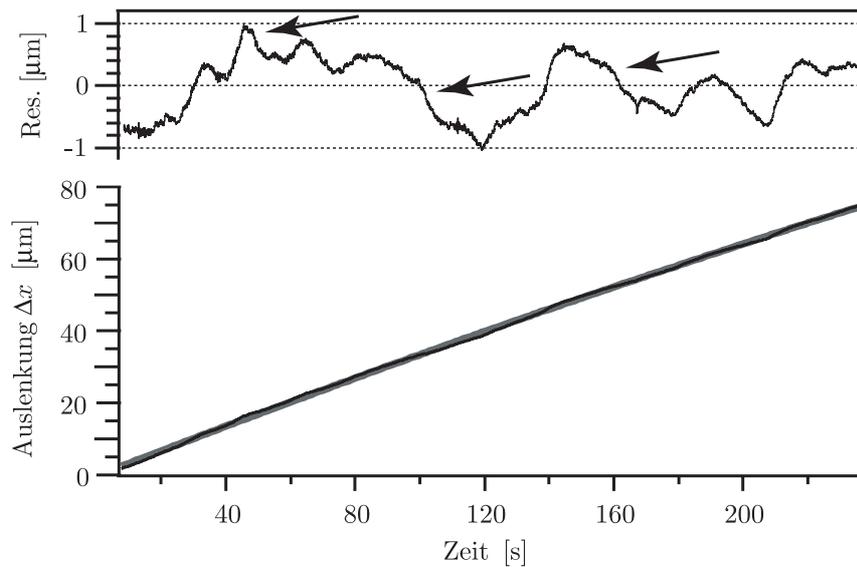
Dabei ist F_B^s die Kraft, die durch die thermischen Fluktuationen des Lösungsmittels verursacht wird. Sie ist annähernd identisch zu der entsprechenden Kraft im reinen Lösungsmittel. F_{e1}^s beschreibt die zufällige Kraft durch statistische Fluktuationen der Einzelfilamente. Es wird angenommen, dass dieser Beitrag die Sondenfluktuationen auf sehr kurzen Zeitskalen verursacht.

F_{e2}^s beschreibt die Fluktuationen der elastischen Kräfte aufgrund unterschiedlicher (lokaler) Maschenweiten vor der Kugel. Es wird angenommen, dass dieser Beitrag die Sondenfluktuationen auf Zeitskalen um eine Sekunde verursacht (vergl. Abb. 5.36(a)).

Erstmals wird hier eine Fluktuation im Langzeitverhalten der Kriechkomplianzkurven beschrieben, die erst auftritt, wenn die Auslenkungen Δx des Sondenpartikels wesentlich größer



(a)



(b)

Abbildung 5.36: (a) Dargestellt ist ein etwa 10 sekundiger Ausschnitt aus einer typischen Auslenkungskurve einer $4.5 \mu\text{m}$ Kugel in einem $35 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk (schwarze Linie). Die Differenz zu einer glatten Kurve (grau hinterlegt) ist im oberen Teil des Graphen dargestellt (Residuum, „Res.“). Deutlich zu erkennen sind die beiden unterschiedlichen Anteile der Fluktuationen: Hochfrequentes Rauschen (digitales Rauschen, Brownsche Bewegung und Einzelfilamenteinflüsse) mit mittleren Amplituden in der Größenordnung von etwa 10 nm und durch Maschensprünge der Kugel verursachte, sprunghafte Fluktuationen mit typischen Amplituden um 100 nm mit Frequenzen von $0.5\text{-}1 \text{ Hz}$ (Pfeile). Diese Fluktuationsanteile sind bereits früher von [Ziemann et al., 1994] beschrieben worden. (b) 240 sekundiger Ausschnitt der gleichen Auslenkungskurve. Wieder ist im oberen Teil das Residuum zu einer angepassten glatten Kurve dargestellt. Auf dieser Zeitskala erkennt man Sprünge mit einer typischen Amplitude von $1 \mu\text{m}$ (Pfeile) und einem typischen Abstand von etwa 20 s . Art und die Farbe der Linien entspricht denen bei (a), man beachte aber die stark unterschiedliche Skalierung auf allen drei Achsen.

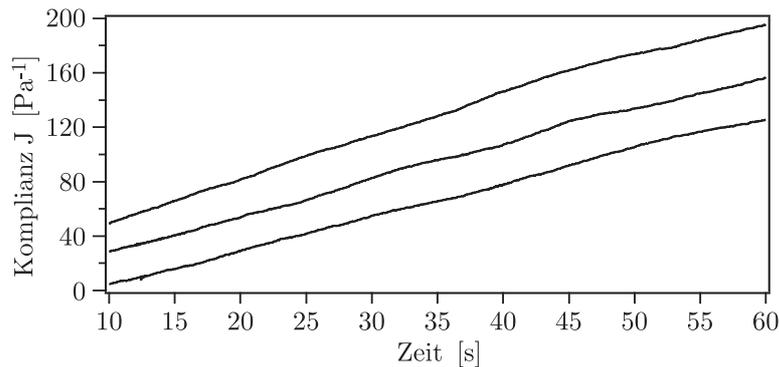


Abbildung 5.37: Repräsentative Beispiele für Fluktuationen der Kriechkomplianzkurven auf langen Zeitskalen. Die Kurzzeitfluktuationen können in diesem Maßstab nicht aufgelöst werden (vergl. dazu Abb. 5.36(a)). $4.5\mu\text{m}$ Kugeln in einem $35\mu\text{M}$ Aktinnetzwerk, Kräfte: 5.4, 5.7 und 6.5pN , Auslenkungen: 16, 18 und $24\mu\text{m}$.

als der Kugelradius wird. Diese Fluktuationen liegen auf Zeitskalen weit oberhalb einer Sekunde ($\mathcal{O}(20\text{ s})$) und weisen Fluktuationsamplituden auf, die größenordnungsmäßig über denen der Maschensprünge liegen. In den gezeigten repräsentativen Beispielen (Abb. 5.37 und 5.36) liegen die Größenordnung der Amplitude für Fluktuationen aufgrund von Maschensprüngen bei etwa 100 nm , die typische Amplitude der Langzeitfluktuationen liegt dagegen bei etwa einem Mikrometer (vergl. Abbn. 5.36(b)). Diese Werte gelten für $4.5\mu\text{m}$ Kugeln in einem $35\mu\text{M}$ Aktinnetzwerk. Ein Aktinnetzwerk dieser Konzentration weist in ungestörtem Zustand eine mittlere Maschenweite von $0.3\mu\text{m}$ auf.

Eine Erklärung dieser Fluktuation liegt in der mesoskopischen Inhomogenität von Aktinnetzwerken, die aufgrund stochastischer Prozesse bei der Polymerisation entstehen. Diese Inhomogenitäten entsprechen Regionen höherer und niedriger Netzwerkdichte mit räumlichen Abständen in der Größenordnung um $10\mu\text{m}$, was leicht ersichtlich wird, wenn man in Abbildung 5.36(b) typische Auslenkungen für die mittlere Fluktuationsfrequenz von etwa 0.05 Hz abliest. Die mesoskopische Inhomogenität von Aktinnetzwerken tritt besonders bei frisch polymerisierten Proben auf und ist deshalb von biologischer Relevanz, da in lebenden Organismen das Aktin-Zellskelett ständig modifiziert wird. Messungen der Inhomogenitäten auf diesen Skalen wurden bisher hauptsächlich mittels elektronenmikroskopischen Messungen durchgeführt, da andere Methoden (z.B. „multiple particle tracking“ oder Makrorheometrie) über diese Fluktuationen mitteln.

5.7.1 Zusammenfassung und Ergebnis

In diesem Abschnitt wurde erstmals eine Langzeitfluktuation der Kriechkomplianzkurven in Aktinnetzwerken beschrieben, die auf der mesoskopischen Inhomogenität eines Aktinnetzwerkes beruht. Typische Längenskalen für diese Netzwerkdichteschwankungen in der untersuchten Probe konnten dabei zu einer Größenordnung von $10\mu\text{m}$ bestimmt werden.

Die erzwungene Sondenauslenkung stellt eine der wenigen Methoden dar, mit der diese Art von Inhomogenitäten *in Vitro* vermessen werden können, allerdings ist ein noch besseres Verständnis der Zusammenhänge zwischen Kugelgeschwindigkeit und lokaler Netzwerkdichte (besonders im aktiven Fall) nötig, um aus den hier präsentierten Langzeitmessungen Absolutwerte für die Filamentdichteschwankungen abzuleiten. Für die Zukunft deutet sich hier eine mächtige Methode an, um mesoskopische Netzwerkdichteanalysen durchzuführen.

Kapitel 6

Erzwungene Einzelfilamentauslenkungen

Um den Einfluss von Reibungskräften der Aktinfilamente im natürlichen, inhomogenen Netzwerk zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit sog. „Enforced Reptation“-Experimente durchgeführt. Bei dieser Untersuchungsmethode werden magnetische Sondenpartikel chemisch an Einzelfilamente gebunden und diese dann gemeinsam im umgebenden Netzwerk ausgelenkt [Dichtl, 2001] (vergl. Abb. 6.1). Im Gegensatz zu älteren Arbeiten wurde besonderer Wert darauf gelegt, den Einfluss der Kugel auf das Messergebnis zu minimieren. Die bisher durchgeführten Messungen wurden meistens mit Sondenpartikeln durchgeführt, deren mittlere Durchmesser mindestens um den Faktor drei größer waren als die mittlere Maschenweite des umgebenden Netzwerkes. Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass bei diesen Dimensionsverhältnissen die Sondenkugel bei einer Auslenkung starken elastischen und dissipativen Kräften ausgesetzt ist. Da anzunehmen ist, dass die entsprechenden Kräfte auf das angehängte Filament um Größenordnungen kleiner sind, kann auf diese Weise nur sehr beschränkt Informationen über die Reibung, bzw. die Elastizität, die dieses Filament im Netzwerk verspürt, gesammelt werden.

Erst wenn der Kugeldurchmesser auf die Dimension der Maschenweite (bzw. darunter) absinkt, ist zu erwarten, dass mit Hilfe dieser Methode die Interaktionen eines einzelnen Filaments mit dem umgebenden Netzwerk bestimmt werden kann. Aus diesem Grund wurden die Versuche bei sehr geringen Netzwerkkonzentrationen von $2.5 \mu\text{M}$ Aktinkonzentration und mit sehr kleinen Sondenpartikeln (mittlerer Durchmesser $\bar{R} = 0.76 \mu\text{m}$) durchgeführt. Diese extrem kleinen magnetischen Sondenpartikel weisen jedoch leider eine sehr hohe Varianz des Durchmessers auf. Damit geht eine große Ungenauigkeit der Kräfteichung einher, was dazu führt, dass die Absolutwerte der Messungen Fehler von bis zu 50 % aufweisen. Die im Folgenden präsentierten Ergebnisse haben deshalb hauptsächlich einen qualitativen Charakter.

6.1 Präparation und Durchführung

Aktin wurde wie im Kapitel 1.2.4.1 beschrieben präpariert.

Magnetische Mikrosonden mit karboxylierten Oberflächen und einem mittleren Durchmesser von $0.76 \mu\text{m}$ wurden wie im Kapitel 1.2.4.2 beschrieben mit Gelsolin beschichtet. Die Kugeln tragen dabei keine bzw. einige wenige Gelsoline, um möglichst viele Kugeln mit einem angehängten Filament zu erhalten.

Fluoreszierende Filamente mit angehängten fluoreszierenden Magnetsonden wurden präpariert, indem eine $2 \mu\text{M}$ Rhodamin-Phalloidin stabilisierte Aktinlösung im Verhältnis

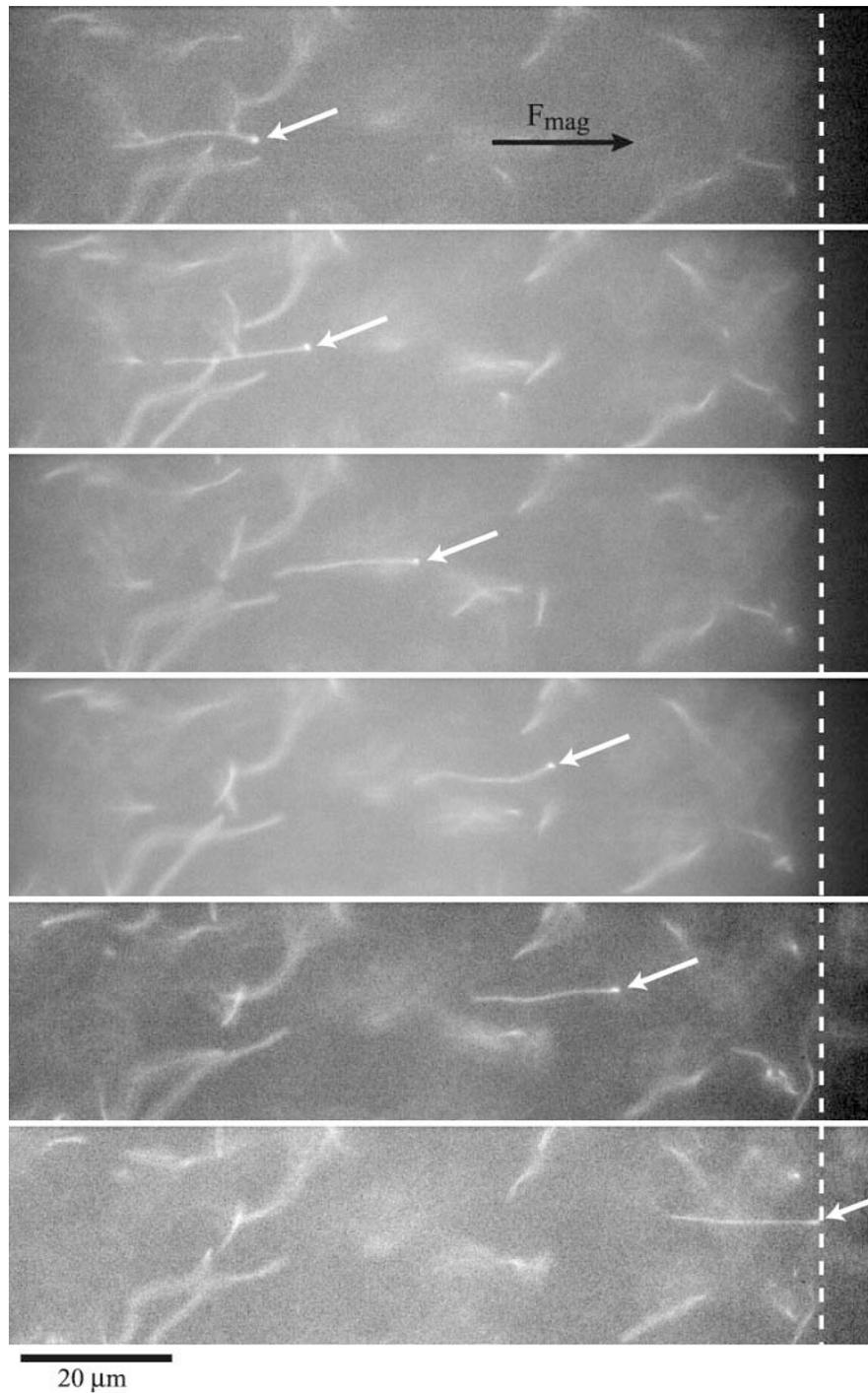


Abbildung 6.1: Die Bildabfolge zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der erzwungenen Auslenkung eines einzelnen Aktinfilaments durch ein $2.5 \mu\text{M}$ Aktinnetzwerk. Von dem umgebenden Netzwerk ist größenordnungsmäßig jedes tausendste Filament zusätzlich markiert. Weiße Pfeile zeigen die Position der $0.76 \mu\text{m}$ -Kugel, an die das Aktinfilament mittels Gelsolin gebunden ist, in Abständen von ca. 2 s. Der schwarze Pfeil weist in die Richtung der wirkenden Magnetkraft, die gestrichelte Linie markiert die Position des Spulenkernendes, welche aus einer Durchlichtaufnahme bekannt ist.

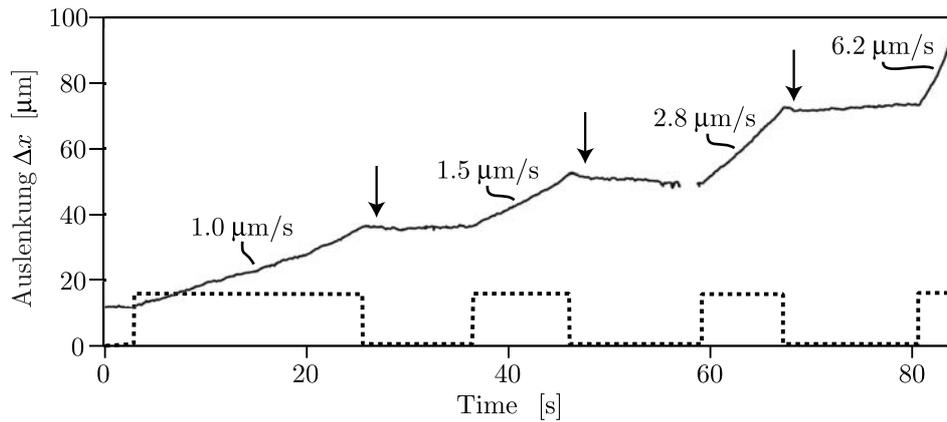


Abbildung 6.2: Repräsentative Auslenkungskurve der erzwungenen Auslenkung einer Kugel mit angehängtem Filament (durchgezogene Linie). Die Kugel ist mit einem Durchmesser R von $R \approx 0.75 \mu\text{m}$ etwas kleiner als die mittlere Maschenweite ξ (Aktinkonzentration $c_A = 2.5 \mu\text{M}$, daraus folgt $\xi = 1.05 \mu\text{m}$, vergl. Eq. 2.5, Kräfte: 0.06-0.2 pN je nach Abstand, Filamentlänge: $20 \mu\text{m}$). Die Pfeile kennzeichnen erkennbare Relaxationen der Kugel an den Pulsenden (Positionen der Kraftpulse sind durch die gestrichelte Linie repräsentiert). Die Geschwindigkeiten sind mittlere Geschwindigkeiten für den entsprechenden Kraftpuls.

1:1 mit Rhodamin-BSA passivierten, gelsolinbeschichteten Kugeln vermischt wurde. Dieser Ansatz wurde mindestens über Nacht bei 4°C auf einem Rotator gelagert, um den Gelsolinen genug Zeit zu lassen, Aktinfilamente zu zerschneiden und zu binden.

Diese Lösung aus Filamenten, Kugeln und Filamenten mit Kugeln wurde vor dem Experiment im Verhältnis 1:100 zu einem $2.5 \mu\text{M}$ Aktinansatz in Antioxidationspuffer (vergl. ebenfalls Kap. 1.2.4.1) zugegeben. Das Aktinnetzwerk polymerisierte zwar um die Filamente mit Kugeln, die angehängten Filamente verlängerten sich dabei jedoch nicht maßgeblich, da das Gelsolin das schnell wachsende Ende des Aktins blockiert.

Die Magnetkräfte wurden als Rechteckpulse appliziert, wobei unterschiedliche Stromstärken und Pulslängen von 2 bis 60 s verwendet wurden. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem fluoreszenzoptimierten Ölimmersionsobjektiv (Vergrößerung 100fach, numerische Apertur 1.3) aufgenommen und anschließend digital ausgewertet.

6.2 Ergebnisse und Diskussion

Prinzipiell erfolgt die Auswertung der Kriechkomplianzkurven mit einem stark vereinfachten Modell, indem die Auslenkung als viskoses Fließen (Viskosität η_0) mit einem, im Wert J_0 zusammengefasstem, elastischen Anteil, kombiniert wird (Maxwell-Modell, vergl. Abb. 2.5). Daraus ergibt sich die einfache Abhängigkeit $J(t) = J_0 + \eta_0^{-1}t$. Die Kriechkomplianz $J(t)$ ergibt sich (wie gehabt) zu $J(t) = g x(t)/F(t)$. Im speziellen Fall der chemisch an eine Sonde gekoppelten Filamente zerfällt g in zwei Teile, der Teil g_K beschreibt den Einfluss der Sondenkugel, der Teil g_F beschreibt den Einfluss des Filaments:

$$g = g_K(R, \xi) + g_F(L, a, \xi) \quad (6.1)$$

Dabei ist L die Filamentlänge und a der hydrodynamisch wirksame Durchmesser des Filaments.

Falls es keine Reibung der Filamente im Netzwerk analog zu einer Seilreibung gibt und die Kugel wenig mit dem Netzwerk kollidiert, kann die Größenordnung von g_K und g_F mit

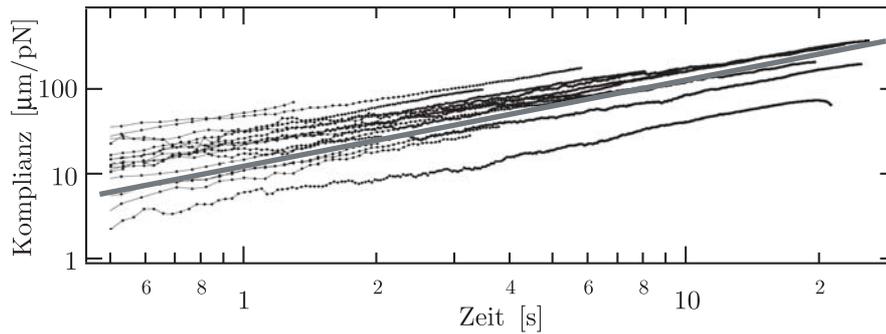


Abbildung 6.3: Doppelt logarithmischen Auftragung der zeitabhängigen Kriechkomplianz von Sondenpartikeln mit angehängten Filamenten. Die Filamentlängen variieren zwischen $6 \mu\text{m}$ und $30 \mu\text{m}$. Die dicke graue Linie repräsentiert einen linearen Anstieg (viskoses Verhalten).

folgenden Näherungen abgeschätzt werden¹:

$$g_K \approx 6\pi R \left(1 + 2.1 \frac{2R}{\xi}\right) \quad (\text{Kugel in einer Röhre}) \quad (6.2)$$

$$g_F \approx 2\pi L / \ln(\xi/a) \quad (\text{Stab in einer Röhre}) \quad (6.3)$$

Benutzt man die in den Experimenten verwendeten Größen ($R = 0.4 \mu\text{m}$, $\xi = 1 \mu\text{m}$, $\xi/a = \mathcal{O}(10)$ und $L = \mathcal{O}(10 \mu\text{m})$), erhält man in etwa die gleichen Werte für g_K und g_F . Daraus folgt, dass selbst wenn die Sondenkugel kleiner als die Maschenweite wird, die Hydrodynamik der Kugel maßgeblich das Antwortverhalten des Kugel/Filament-Systems bestimmt. Für diese Annahme spricht, dass bis etwa $15\text{-}20 \mu\text{m}$ Filamentlänge kein Einfluss derselben auf die Reibung des Kugel/Filament-Systems im Netzwerk gemessen wird (s.u.).

Eine weitere unerwartete Neuheit, die teilweise im Widerspruch zu älteren Arbeiten steht, ist der geringe elastische Anteil J_0 der Kriechkomplianzkurven. Auch zeigten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen bei wesentlich kleineren Kräften (und vergleichbaren oder kleineren Maschenweiten) viel größere Auslenkungen, als in den älteren Arbeiten angegeben. Der Grund für diese Diskrepanz liegt möglicherweise im Verhältnis aus Kugelgröße zu Maschenweite.

Eine repräsentative Auslenkungskurve einer Kugel mit angehängtem, etwa $20 \mu\text{m}$ langen Filament ist in Abbildung 6.2 zu sehen. Zu Beginn des Kraftpulses steigt die Auslenkungskurve mehr oder weniger instantan linear an (rein viskoses Verhalten). Besonders deutlich ist dieses Verhalten in einer doppelt logarithmischen Auftragung der zeitabhängigen Kriechkomplianz zu erkennen (vergl. Abb. 6.3).

Ein kleiner elastischer Anteil zeigt sich dennoch am Ende der Pulse, wenn Relaxationen dieser Spannungen die Sondenkugel etwas zurück bewegen (schwarze Pfeile in Abb. 6.2). Für diese Relaxationsbewegung sind mehrere Ursachen denkbar, die sich in ihrer Auswirkung auch überlagern können. Die unterschiedlichen Mechanismen sind:

1. Die Deformation des umgebenden Netzwerkes durch die Sondenkugel, wobei die erzeugte elastische Kraft rückstellend auf die Mikrosonde wirkt. Die Kraftübertragung geschieht entweder über das hydrodynamische Feld (dominierend für $R_{\text{Kugel}} \ll \xi$) oder durch direkte Kontakte zwischen Kugel und quer verlaufenden Filamenten (dominierend für $R_{\text{Kugel}} \gtrsim \xi$, vergl. auch Kap. 5.3.1) .

¹Der numerische Faktor 2.1 in der ersten Näherung ist das erste Glied einer Reihenentwicklung, die auf Faxén zurück geht [Faxn, 1923].

2. Die Deformation des umgebenden Netzwerkes durch die Reibung des nachgezogenen Filaments, wobei die erzeugte elastische Kraft hauptsächlich auf das Filament wirkt. Die Rückstellung der Sonde erfolgt dann indirekt über das Filament. Die Kraftübertragung geschieht wieder über das hydrodynamische Feld (dominierend für $L \lesssim \xi$) oder durch direkte Kontakte zwischen den Filamenten an Verschlaufungspunkten (dominierend für $L \gg \xi$).
3. Eine Rückstellung der Sonde als Folge der Entspannung des Filaments (Stichwort: Entropische Feder) in eine nicht gestreckte Konformation nach Abschalten des Pulses. Dieser Mechanismus würde auch ohne umgebendes Netzwerk auftreten. Die Sonde wird sich dabei nur dann deutlich zurück bewegen, wenn die Reibung auf das Filament in der Größenordnung der Reibung auf die Kugel liegt.

Da erstens die hydrodynamischen Reibungskoeffizienten von Sonde und Filament in der gleichen Größenordnung liegen (siehe oben), zweitens die Kugel nur wenig kleiner als die mittlere Maschenweite ist und drittens die meisten Filamente ausreichend lang sind, um an mehreren Verschlaufungspunkten mit dem Netzwerk zu interagieren, beruht die Relaxation der Sonde vermutlich auf einer Überlagerung aller Effekte. Die Größenordnung der gemessenen Elastizität $k = 1/J_0$ beträgt $1 \cdot 10^{-7} \text{N/m}$. Im Gegensatz dazu wird in einer älteren Arbeit der Wert der Elastizität mit $k \approx 5 \cdot 10^{-6} \text{N/m}$ angegeben und das zusätzlich noch bei einer geringeren Aktinkonzentration von $c_A \approx 1.5 \mu\text{M}$. Der Grund für die um fast zwei Größenordnungen höhere gemessene Elastizität der älteren Arbeit ist nicht ganz klar.

Um die Größe des Einflusses der Kugelreibung genauer zu bestimmen, wurden Geraden an die mit g_K normierten Kurven angepasst und aus den Steigungen die filamentlängenabhängige Viskosität $\eta_0(L)$ berechnet. Wie bereits in früheren Kapiteln diskutiert, sind die Absolutwerte der Viskosität wegen der extremen Präparationsempfindlichkeit von Aktinlösungen nicht vergleichbar. Es ist aber im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gelungen, aus einzelnen Messproben eine größere Anzahl von verwertbaren Auslenkungskurven zu erhalten. Trägt man die angepassten Viskositäten über der Filamentlänge auf, ergibt sich ein Bild, dass mit der oben angegebenen theoretischen Überlegung im Einklang steht. Bis etwa $20 \mu\text{m}$ scheint die Kugel das Antwortverhalten zu dominieren, da keine Filamentlängenabhängigkeit zu erkennen ist. Für größere Längen deutet sich eine beginnende Abhängigkeit an. Man beachte dabei die großen Ungenauigkeiten der Viskositäten, die auf der starken Größenvarianz der Kugeln² und Netzwerkinhomogenitäten beruht.

Eine Messung mit repräsentativster Längenverteilung ist in Abbildung 6.4 zu sehen.

6.3 Probleme der Methode

Obwohl es im Rahmen dieser Arbeit erstmal gelang, die Methode der „Enforced Reptation“ so weit zu verbessern, dass man pro Einzelmessung eine gewisse Anzahl von auswertbaren Kurven erhält (größenordnungsmäßig etwa 5 pro Probe, im Gegensatz zu bisher etwa 5 pro Messtag à drei bis vier Proben) und damit erste qualitative Abhängigkeiten aufzeigbar werden, stellen sich einige zur Zeit nicht überwindbare Hindernisse in den Weg, falls diese Methode genutzt werden soll, um quantitative Ergebnisse zu erhalten:

1. Ausgehend von der neuartigen Präparationsmethode müsste die effektive Ausbeute der Kugeln mit angehängten, einzelnen Filamenten weiter gesteigert werden, ohne dass ein Überschuss an Gelsolin auf der Kugeloberfläche mehrere markierte Filamente bindet

²Mit der Größe variiert das Volumen und damit die Menge der eingeschlossenen magnetischen Partikel. Deshalb variiert die magnetische Kraft mit R_{Kugel}^3 .

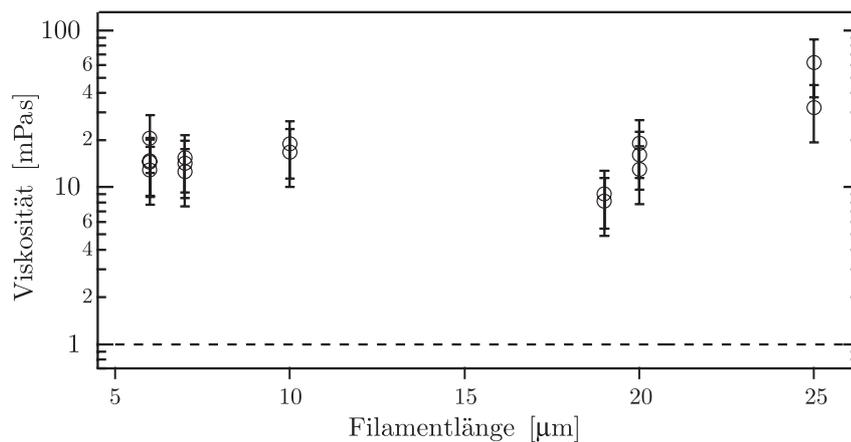


Abbildung 6.4: Aufgetragen ist die gemessene Langzeitviskosität von Filament/Kugel-Systemen in Abhängigkeit von der Länge des angehängten Filaments (Symbole mit Fehlerbalken). Die großen Varianz der Einzelmessungen beruht auf der schlechten definierten Größe der Sondenpartikel. Im Rahmen der Messgenauigkeit ist bis etwa $20 \mu\text{m}$ Filamentlänge kein Einfluss auf die Reibung zu erkennen, für größeren Längen deutet sich eine beginnende Abhängigkeit an. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Viskosität des Lösungsmittels Wasser.

(Entstehung sog. „Kraken“) oder freie, aktive Gelsoline mit dem unmarkierten Netzwerk reagieren. Diese beiden Forderungen stehen sich aber prinzipiell entgegen.

2. Es müssten mehrere Filamente mit Kugeln gleichzeitig nachverfolgt werden, da mit einigen wenigen Kraftpulsen alle beweglichen Kugel/Filament-Systeme zum Magnetkern gezogen werden. Da die Filamente aber nur mit hoch vergrößernden Ölimmersionsobjektiven aufzunehmen sind, die prinzipiell einen kleinen Bildausschnitt haben, ist diese Forderung nicht durch eine Vergrößerung des Bildausschnitts zu erfüllen. Aus dem gleichen Grund kann bei der Verwendung eines „High-Force“-Aufbaus nur in der unmittelbaren Nähe des Magnetkerns gemessen werden. In diesem Bereich steigt aber die Ungenauigkeit der Krafteichung enorm.
3. Um die zweite Forderung dennoch zu erfüllen, könnte andererseits die Menge der zugegebenen Filamente mit Sonden erhöht werden. Da jedoch eine große Anzahl von ungebundenen Filamenten bzw. ungebundenen Sonden mit den erwünschten Filament/Kugel-Systemen zugegeben wird, steigt daraufhin die Hintergrundfluoreszenz auf ein Niveau, dass keine Nachverfolgung der wenigen Kugeln mit Filamenten mehr erlaubt. Der starke Überschuss von fluoreszierendem Aktin gegenüber den Sonden und die große Anzahl von Sonden ohne aktives Gelsolin in der Präparation ist nötig, um garantiert mit fluoreszierendem Aktin gesättigte Kugeln mit möglichst nur einem angehängtem Filament zu erhalten.
4. Die angehängten Filamente sollten möglichst länger werden. Die Filamentlänge ist theoretisch nicht begrenzt, wird aber, je mehr Schritte die Präparation enthält, durch unvermeidbare mechanische Einflüsse immer kürzer. Zudem verkürzt das auf den Kugeln gebundene Gelsolin die Filamente weiter. Bei äußerster Vorsicht der Präparation gelingt es, einzelne Kugeln mit Filamenten bis etwa $30 \mu\text{m}$ Länge zu verbinden. Der überwiegende Anteil der angehängten Filamente erreicht jedoch lediglich Längen im Bereich von $5\text{-}10 \mu\text{m}$. Dieses Resultat entspricht der Beobachtung ältere Arbeiten [Marius Dichtl, private Kommunikation].

5. Als letzter jedoch wichtigster Punkt ergibt sich, dass die magnetischen Sondenpartikel bei genauerer Einhaltung des mittleren Durchmessers unbedingt kleiner werden müssen, um die Interaktionen des angehängten Filaments mit dem umgebenden Netzwerk studieren zu können. Bis jetzt gibt es aber weltweit keinen Hersteller, der so kleine magnetische Sondenpartikel mit geringer Varianz und ausreichend hohem Gehalt an magnetischem Material herstellt. Eine Möglichkeit dieses Problem zu überkommen, wäre die Entwicklung eigener Sondenpartikel geeigneter Größe und Qualität gewesen, was jedoch den zeitlichen Rahmen einer einzelnen Doktorarbeit deutlich übersteigt.

6.4 Zusammenfassung und Ergebnis

Die Methode der „Enforced Reptation“ konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals so weit verbessert werden, dass eine Anzahl von größenordnungsmäßig etwa 5 auswertbaren Kurven pro Probe gegenüber früher etwa 5 pro Messtag, erreicht wird. Damit kann erstmals eine qualitative Abhängigkeit der Langzeitviskosität des Kugel/Filament-Systems von der Filamentlänge untersucht werden. Als Ergebnis stellt sich dar, dass selbst die kleinsten auf dem Markt erhältlichen magnetischen Sondenpartikel (mit tolerabler Größenvarianz) das Antwortverhalten des Kugel/Sonde-Systems dominieren und zwar mindestens bis zu Filamentlängen von $20\ \mu\text{m}$. Ohne eine grundlegende Verbesserung der Magnetpartikel (kleiner, gleichmäßiger groß, mehr Magnetgehalt) kann diese Abhängigkeit nicht besser bestimmt werden. Als weitere Neuheit, die im Gegensatz zu Beobachtungen einer älteren Arbeit steht, wurde ein elastischer Anteil bei der Auslenkung der Kugeln (mit $2R_{\text{Kugel}} < \xi$) mit angehängtem Filament gemessen, der mit $1 \cdot 10^{-7}\text{N/m}$ fast zwei Größenordnungen unter den früher gemessenen Werten liegt.

Kapitel 7

Transiente Sondenkomplianzmessungen aktiver Aktinnetzwerken

Mikrorheologische Messungen an Aktinnetzwerken mit passiv vernetzenden Proteinen (Fila-
min und *alpha*-aktinin) wurden erstmals 1996 von Tempel et. al durchgeführt [Tempel, 1996;
Tempel et al., 1996]. Speziell für den Kreuzvernetzer *alpha*-aktinin wurden eine Gelierung
des Netzwerkes nachgewiesen. Bei höheren Konzentrationen kam es zu einer makroskopischen
Phasenseparation aus hochgradig vernetzten Aktinbündeln und unvernetzten Zonen geringer
Filamentdichte. Das Verhalten sog. aktiver Vernetzer unterscheidet sich von diesem Verhalten
grundlegend.

Als aktive Vernetzer bezeichnet man dimere Motorproteine, welche lediglich für eine ge-
wisse Zeit zwei Filamente verbinden. Innerhalb dieser Zeit wird unter ATP-Verbrauch ein
Kraftschlag (vergl. Kap. 1.2.2) ausgeführt, der die beiden gebundenen Aktinfilamente relativ
zueinander verschiebt. Erst wenn keine chemische Energie in Form von ATP mehr vorhanden
ist, binden diese Proteine permanent an ein bis zwei Aktinfilamente und zeigen dann ein
Verhalten wie gewöhnliche permanente Vernetzer (vergl. Kap. 4). In diesem Bereich kann das
Antwortverhalten des Netzwerkes sehr gut mit elastischen Theorien beschrieben werden.

Interessanter ist, ob auch schon im aktiven Zustand eine Beeinflussung der transienten
Auslenkungskurven von magnetischen Sondenpartikel detektiert werden kann. Ein Hinweis
auf die Veränderung der viskoelastischen Parameter eines aktiven Netzwerkes liefern z.B.
makrorheometrische Messungen. Rainer Tharman misst beispielsweise mittels eines Torsi-
onsrheometers für ein $10\mu\text{ M}$ Aktinnetzwerk mit HMM (bei einem Verhältnis von HMM zu
Aktin von $r_{AH} = 1:40$) eine deutliche Verflüssigung des Netzwerkes für mittlere und lange
Zeiten (Frequenzen von 0.5 bis 100 Hz, vergl. Abb. 7.1). Oszillierende Mikrorheometer sind
dagegen nicht in der Lage eine systematische Verflüssigung des Netzwerkes nachzuweisen,
meist wird eine leichte Erhöhung des elastischen Anteils gemessen, der aber vermutlich auf
eine Verunreinigung der Proben mit Rigor-Köpfen zurückzuführen ist.

Wie bereits in früheren Kapitel dargelegt, ist das Motorprotein Myosin von extremer
Bedeutung bei vielen in der Zelle stattfindenden Prozessen. Um eine definierte Aussage über
das Verhalten von aktiven Kreuzvernetzern in Aktinnetzwerken zu erlangen, wurden deshalb
im Rahmen dieser Arbeit Experimente mit dem Myosin II Subfragment HMM durchgeführt.
Wie in Kapitel 1.2.2 erwähnt, liegt HMM in dimerer Form vor und ist aufgrund der fehlenden
Schwanz-Domäne nicht in der Lage, sich wie z.B. komplettes Myosin II zu Bündeln zusammen
zu lagern. Trotzdem ist es in der Lage Aktinfilamente temporär (in Anwesenheit von ATP)

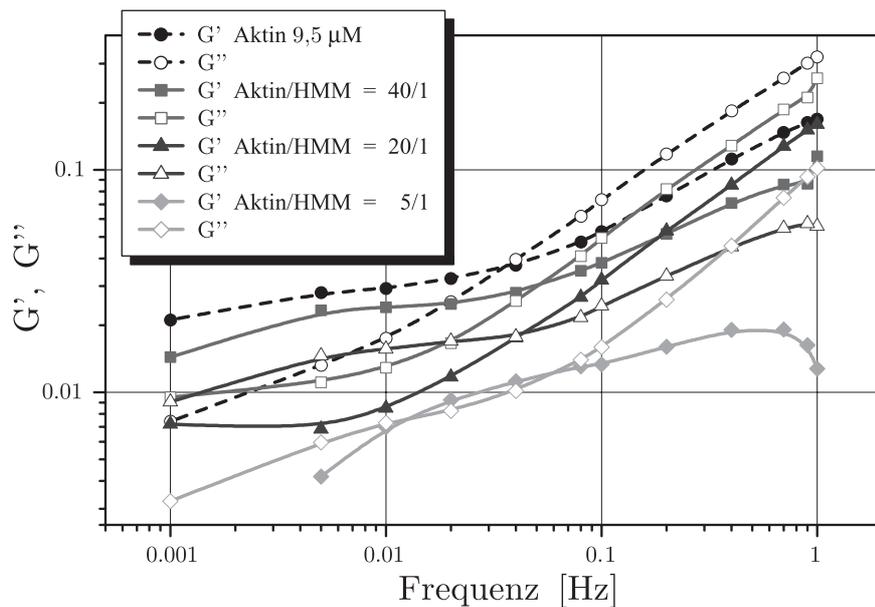


Abbildung 7.1: Makrorheometrische Messung der komplexen Relaxationsmodule eines $9.5\mu\text{M}$ Aktinnetzwerkes. Deutlich sichtbar ist die zunehmende Verflüssigung bei steigendem HMM-Anteil (Veränderung der Kurvenform). Die Kurven sind der Übersichtlichkeit halber in y-Richtung auseinander gezogen. [Mit freundlicher Genehmigung von Rainer Tharmann].

oder permanent (bei fehlendem ATP) zu vernetzen.

Um diese besonders empfindlichen Messungen nicht durch Rigor-HMM zu stören wurde ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt nach dem Auftauen der HMM-Proben eingeführt.

7.1 Präparation und Durchführung

Myosin II wurde wie in Kapitel 1.2.4.3 beschrieben präpariert. Anschließend wurde daraus das Fragment HMM wie in Kapitel 1.2.4.3 beschrieben präpariert. Nach dem Auftauen der Vorratslösung wurde das HMM weiter aufgereinigt, um eventuell denaturierte Proteine und vor allem Rigorköpfe zu entfernen. Dieser Reinigungsschritte ist ebenfalls in Kapitel 1.2.4.3 beschrieben.

Zur Durchführung der Messung wurde zu einem Ansatz für ein Aktinnetzwerk in F-Puffer mit Sondenkugeln (bei 300 mM KCl, vergl. Kap. 5.1.2) zusätzlich 2 mM DTT, 15 mM ATP und Magnesium, sowie aufgereinigtes HMM in der entsprechenden Konzentration zugegeben. Dabei wurde der Ansatz vor der Zugabe der Proteine 10 Minuten in einem Ultraschallbad behandelt, um die Probe optimal zu homogenisieren. Anschließend wurde das HMM und zuletzt das Aktin zugegeben, um eine optimale Verteilung der HMM-Moleküle zu gewährleisten.

Aufgrund mechanischer Messungen der ATPase-Rate (vergl. Anhang C) ist die Zeit bekannt, innerhalb derer das Netzwerk ohne Einschränkung als aktiv angenommen werden kann. Zur Sicherheit wurde die zugesetzte ATP Menge so dimensioniert, dass eine großzügige Zeitreserve für jede Messung zur Verfügung stand (typischerweise wurde bei einem Drittel der berechneten Gelierungszeit der entsprechenden Probe gemessen). Die Proben wurden direkt nach dem Ansetzen für einige Minuten vorsichtig umgeschwenkt, um ein Sedimentieren der Kugel zu verhindern und danach in die Probenkammer gefüllt. Nach jeweils 50 Minuten wurde mit dem Applizieren von Kraftpulsen begonnen. Die Magnetkräfte wurden als Rechteckpulse

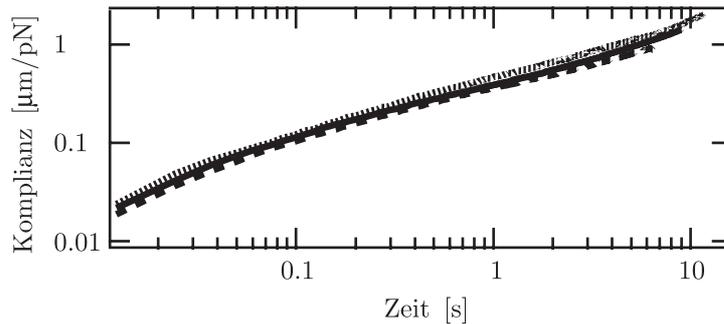


Abbildung 7.2: Doppelt logarithmische Auftragung gemittelter Kriechkomplianzkurven eines $10\ \mu\text{M}$ Aktinnetzwerkes mit verschiedenen HMM-Konzentrationen: Kein HMM (durchgezogene Linie), $r_{AH} = 50$ (gepunktete Linie) und $r_{AH} = 10$ (gestrichelte Linie). Im Rahmen normaler statistischer Schwankungen zeigen die Kurven keine signifikanten qualitativen Unterschiede. Vergleiche auch Abb. 7.3.

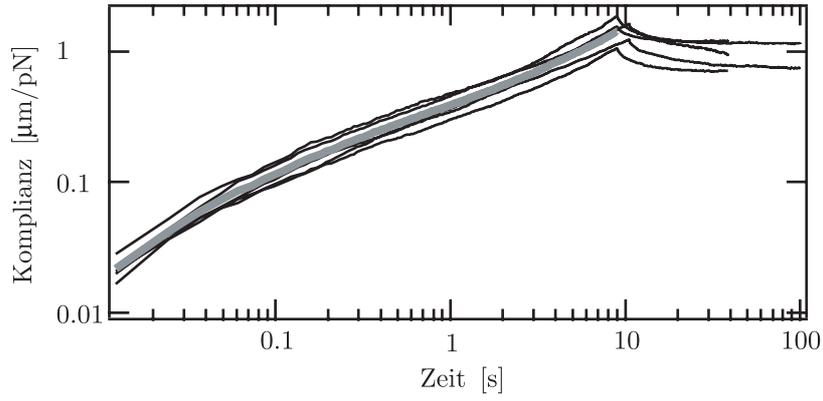
appliziert, wobei unterschiedliche Kräfte im Bereich von $1\ \text{pN}$ bis $100\ \text{pN}$ und Pulslängen von 2.5 bis 40 Sekunden verwendet wurden.

7.2 Ergebnisse und Diskussion

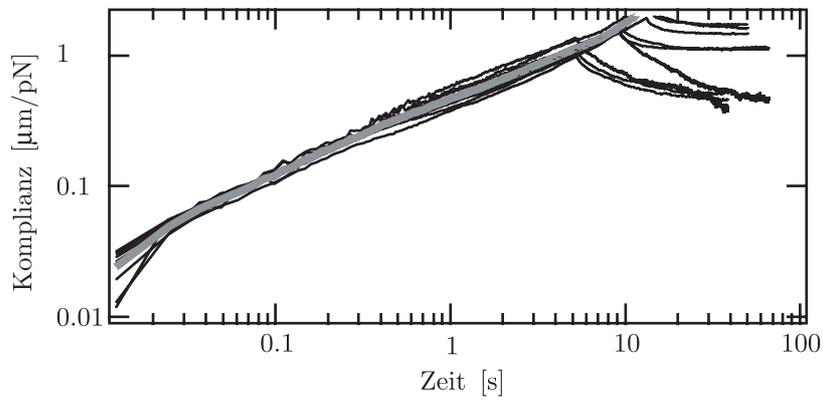
Es ergibt sich als unerwartetes Ergebnis, dass bei Messungen der viskoelastischen Eigenschaften von Aktinnetzwerken mit aktiven HMM die Ergebnisse der Messungen an passiven Netzwerken in allen qualitativen Eigenschaften reproduziert werden (vergl. Abb. 7.3 und 7.2). Betrachtet man die makrorheologischen Messungen (Abb. 7.1) ist dies nicht vorhersehbar, da diese (wie bereits erwähnt) eine Verflüssigung des Netzwerkes auf mittleren bis langen Zeiten vorhersagen.

Oszillierende mikrorheologische Messungen jedoch unterstützen dieses Ergebnis, da mit dieser Methode ebenfalls Relaxationsspektren für die mit HMM aktivierten Netzwerke gemessen werden, die (im Rahmen der natürlichen Streuung) mit denen von Messungen passiver Netzwerke übereinstimmen. Bei einigen dieser oszillierenden mikrorheologischen Messungen kann lediglich ein leichter Anstieg des Plateaumoduls nachgewiesen werden [Rainer Tharmann, private Kommunikation]. Dieser Anstieg ist möglicherweise auf eine Verunreinigung des zugesetzten HMMs mit teilweise nicht mehr funktionstüchtigen Motoren (Rigor-HMM) zurückzuführen. Diese wirken als permanente Vernetzer und können damit schon in geringer Konzentration die Elastizität des Netzwerkes stark erhöhen. Für diese Erklärung spricht, dass in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten kein Anstieg des Plateaumoduls nachgewiesen werden konnte. Dieser Umstand kann dadurch erklärt werden, dass sich in dem von mir verwendeten HMM durch den zusätzlichen eingeführten Reinigungsschritt kaum noch Rigorköpfe befinden.

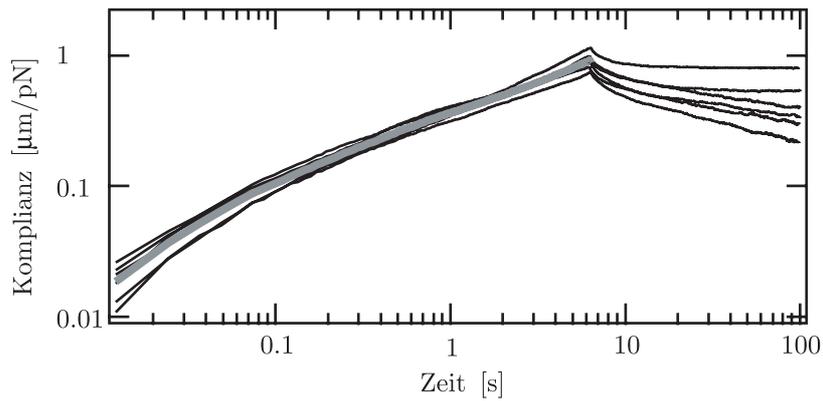
Um zu überprüfen, ob die zugesetzten aktiven HMM-Moleküle, welche mittels transien-ter Mikrorheologie gemessenen Viskositäten signifikant verändern, wurden (analog zu Kapitel 5.4.2.1) die Viskositäten für einzelne Kugeln einer Probe bestimmt (im Bereich von 20 Sekunden bis 1 Minute) und die gemittelten Viskositäten gegen das Verhältnis r_{AH} aufgetragen (vergl. Abb. 7.4). Wie man deutlich erkennt, ist keine signifikante Veränderung der Viskosität in diesem zeitlichen Bereich nachweisbar. Warum Magnetkugel-Mikrorheometer die deutliche Verflüssigung, die von Makrorheometern bei korrespondierenden Frequenzen gemessen werden, nicht detektieren ist nicht vollständig klar. Offensichtlich spielen die kleinen zusätzlichen Verschiebungen der Filamente gegeneinander, welche von den Motoren ver-



(a)

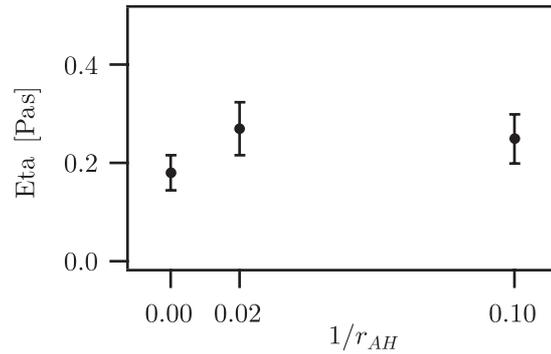


(b)



(c)

Abbildung 7.3: Doppelt logarithmische Darstellung von repräsentativen Kriechkomplianzkurven (schwarze Linien) mit jeweils einer gemittelten Kurve (dicke graue Linie) für verschiedene Verhältnisse von Aktin zu HMM r_{AH} . (a) $10 \mu\text{M}$ Aktin, kein HMM (Referenzprobe), (b) $10 \mu\text{M}$ Aktin, $0.2 \mu\text{M}$ HMM ($r_{AH} = 50$) und (c) $10 \mu\text{M}$ Aktin, $1 \mu\text{M}$ HMM ($r_{AH} = 10$). Im Rahmen normaler statistischer Schwankungen zeigen die Kurven keine signifikanten qualitativen Unterschiede. Vergleiche auch Abb. 7.2.



(a)

Abbildung 7.4: Aufgetragen ist die gemittelte Langzeitviskosität aus einem repräsentativen Experiment gegen das Verhältnis von HMM zu Aktin ($1/r_{AH}$). Es ist keine Abhängigkeit erkennbar. Aus anderen Experimenten ist bekannt, dass der Unterschied der gemessenen mittleren Langzeitviskosität aus der statistischen Streuung dieses Wertes zwischen identischen Proben erklärt werden kann.

ursacht werden, für die Spannungsrelaxation auf großen Längenskalen eine zentrale Rolle, während sie für die Relaxation auf den Längen- und Zeitskalen der aktiv gezogenen Kugeln keine nennenswerte Rolle spielen.

Die Fluktuationen der Kriechkomplianzkurven unterscheiden sich ebenfalls bei den untersuchten Kurven nicht signifikant von denen der passiven Netzwerke. Hier kann allerdings nur eine eingeschränkte Aussage gemacht werden, da aufgrund der Beschränkten Messzeit bei den aktiven Netzwerken keine Pulse von mehr als 60 Sekunden Dauer aufgenommen wurden (Daten nicht gezeigt).

7.3 Zusammenfassung und Ergebnis

Als Ergebnis der umfangreichen Versuche mit Aktin-Netzwerken, denen der aktive Motor HMM zugesetzt wurde, ergibt sich, dass die Magnetischen Pinzetten anscheinend nicht in der Lage sind, den Einfluss der Motoren auf die viskoelastischen Eigenschaften (wie sie z.B. von Makrorheometern gemessen werden) zu reproduzieren. Weder die Kurvenform, noch die Absolutwerte oder die Fluktuationen zeigen statistisch signifikante Abweichungen zu den Messungen mit reinem Aktin.

Anhang

Anhang A

Details der neuen Krafteichungsmethode

Die detaillierte Vorgehensweise für die neue Krafteichung, wie sie in Kapitel 3 vorgestellt wird, ist folgende :

1. Die Daten der Form $x_i(t_i)$ werden orts- und zeitskaliert. Die Ortskoordinaten der Messkurven werden so verschoben, dass die Position der Spulenkernkante identisch null wird.
2. Alle $x_i(t_i)$ Kurven werden einzeln dargestellt und dann wird eine lineare (für große Entfernungen) oder folgende Funktion angepasst [Feneberg, 2003]:

$$f(x) = k_0\sqrt{k_1 - x} + k_2 + k_3x + k_4x^2 \quad x_i = \text{Fitparameter}$$

um eine Kontur $x_i^*(t_i)$ zu erhalten, die um Fluktuationen und Rauschen bereinigt ist.

3. Fällt die Anpassung befriedigend aus, werden durch Einsetzen der erhaltenen Parameter in die analytischen Ableitungen der angepassten Funktion die Geschwindigkeiten $v_i(t_i)$ bestimmt.
4. Durch Multiplikation mit 6π , dem mittleren Kugelradius R und der gemessenen Viskosität der Eichlösung η , erhält man n Kraft-Zeit-Kurven für verschieden Ströme I : $F = F_{n,I}(t)$.
5. Alle Kraftkurven $F_{n,I}(t)$ und alle Ortskurven $x_{n,I}(t)$ für eine Stromstärke werden zusammengefasst, wobei t nur noch als Parameter für die Darstellung benutzt wird:

$$\begin{aligned} n \cdot F_{n,I}(t) &\rightarrow F_I^{\text{ges}}(t) \\ n \cdot x_{n,I}(t) &\rightarrow x_I^{\text{ges}}(t) \\ F_I^{\text{ges}}(t) \wedge x_I^{\text{ges}}(t) &\rightarrow F_I^{\text{ges}}(x_I^{\text{ges}}(t)) = F_I(x) \end{aligned}$$

6. An diese parametrisierte Kurve $F_I^{\text{ges}}(x)$ wird nun eine doppel-exponentielle Funktion angepasst, um die mittlere Kraft $F_I^{\text{Avg}}(x)$ bei einer Stromstärke zu erhalten. Aus den Residuumsdaten dieser Anpassung $F^{\text{Res}} = (F_I(x) - F_I^{\text{Avg}}(x))$ werden Wichtungswerte berechnet, indem die Absolutbeträge $|F^{\text{Res}}|$ erneut angepasst werden ($= |F^{\text{Res}}|^{\text{Avg}}$), wodurch man den mittleren Kraftfehler erhält (vergl. Abb. A.1).

Die Umgebung um die mittlere Kraft $F_I^{\text{Avg}}(x) \pm |F^{\text{Res}}|^{\text{Avg}}$ enthält jetzt 50 % aller Datenpunkte und ist somit ein Maß für die Streuung der Daten an jedem Punkt x . Die

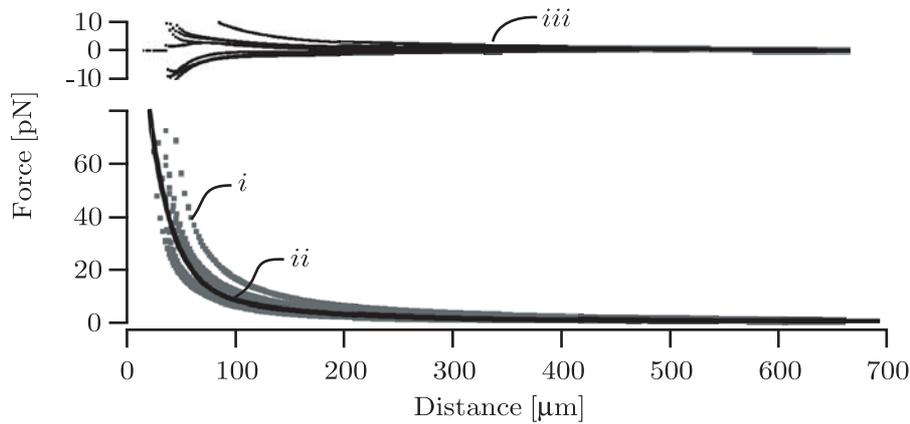


Abbildung A.1: Anpassung einer doppel-exponentiellen Funktion an die zu einem Datensatz zusammengefassten Einzelmesskurven einer Stromstärke (Daten i , Fit ii). Die angepasste Linie stellt die mittlere Kraft $F_I^{\text{Avg}}(x)$ dar. Aus den Residuumdaten (iii) dieser Anpassung wird ein Fehlerintervall und die Wichtungsmatrix für die verbesserte, zweidimensionale Anpassung bestimmt.

Wichtungsdaten $w_I(x)$ erhält man durch Inversion des Abstandes zwischen mittlerer Kraft und mittlerem Kraftfehler:

$$w_I(x) = \left(F_I^{\text{Avg}}(x) - |F^{\text{Res}}|^{\text{Avg}} \right)^{-1}$$

7. Aus den Kraftdaten $F_I^{\text{Avg}}(x)$ und den Wichtungsdaten $w_I(x)$ werden jeweils skalierte Matrizen (F_{Ix}^{Avg}) und (w_{Ix}^{Avg}) erstellt. (Darstellung der (F_{Ix}^{Avg})-Matrix in Abbildung A.3).
8. Die Kraft-Abstands-Strom Matrix (F_{Ix}^{Avg}) wird mit der Wichtungsmatrix $w_I(x)$ gewichtet und mit folgendem Funktionsansatz bis in den linearen Bereich der Kraft-Stromabhängigkeit angepasst (Produktansatz für doppel-exponentielle Abhängigkeit vom Abstand und quadratische, bzw. lineare Abhängigkeit vom Strom):

Ansatz 1:

$$\begin{aligned} F(I, x) &= \left(y_0 + A_1 e^{f_1 x} + A_2 e^{f_2 x} \right) (a + bI + cI^2) \quad \text{für } I < I_1 \\ \tilde{F}(I, x) &= \left(y_0 + A_1 e^{f_1 x} + A_2 e^{f_2 x} \right) (d + eI) \quad \text{für } I \geq I_1 \end{aligned}$$

unter folgenden numerischen Nebenbedingungen:

Nebenbedingungen:

$$\begin{aligned} \left| F(I_1, x) - \tilde{F}(I_1, x) \right| &\leq \frac{1}{100000} \cdot F(I_1, x) \\ \left| F'(I_1, x) - \tilde{F}'(I_1, x) \right| &\leq \frac{1}{10000} \cdot F'(I_1, x) \end{aligned}$$

Die Nebenbedingungen erzwingen die Stetigkeit und die Stetigkeit der Ableitung (vergl.

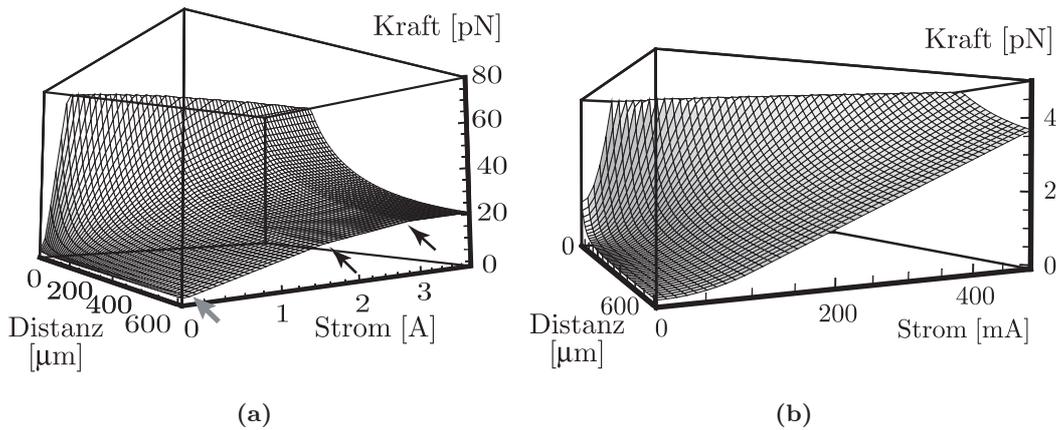


Abbildung A.2: Kraft-Strom-Abstandsabhängigkeit für die $2.8 \mu\text{m}$ Kugeln. (a) Gesamter Strombereich mit stetigem Übergang von $F(x, I) \rightarrow \tilde{F}(x, I)$ bei etwa 100 mA (grauer Pfeil) und unstetigen Übergängen im Bereich der einsetzenden Spulenkernsättigung (ca. 1.5 A und 2.8 A, schwarze Pfeile). (b) Ausschnittsvergrößerung für Ströme von 0 – 500 mA. Die Kurve ist erkennbar glatt, d.h. die Kurve ist sowohl in x als auch in I -Richtung stetig und stetig differenzierbar¹)

Kap. 3). Dieser Ansatz wurde z.B. für die Eichung der $4.5 \mu\text{m}$ Kugeln verwendet (vergl. Abb. 3.3 auf Seite 52).

Für Messungen, bei denen die Sättigung des Spulenkerns bereits eine Rolle spielt, wird folgender Ansatz verwendet (Produktansatz für doppel-exponentielle Abhängigkeit vom Abstand und quadratische, bzw. lineare Abhängigkeit vom Strom. Um der zunehmenden Spulenkernsättigung bei hohen Strömen gerecht zu werden, führt man zwei weitere lineare Anstiege ein):

Ansatz 2:

$$\begin{aligned}
 F(I, x) &= \left(y_0 + A_1 e^{f_1 x} + A_2 e^{f_2 x} \right) (a + bI^2) \quad \text{für } I < I_1 \\
 \tilde{F}(I, x) &= \left(y_0 + A_1 e^{f_1 x} + A_2 e^{f_2 x} \right) (c + dI) \quad \text{für } I \geq I_1 \\
 &\quad \dots \cdot (e + fI) \quad \text{für } I \geq I_2 \\
 &\quad \dots \cdot (g + hI) \quad \text{für } I \geq I_3
 \end{aligned}$$

Die Nebenbedingungen werden analog zu Ansatz 1 definiert, zusätzlich wird die annähernde Übereinstimmung der Funktionswerte bei I_2 und I_3 gefordert, nicht jedoch die stetige Differenzierbarkeit. Die Funktion hat in diesem Bereich also Knicke (vergl. Abb. A.2(a)). Im Bereich des Übergangs von quadratischer zu linearer Abhängigkeit vom Strom sind beide Ansätze monoton und stetig. In Abbildung A.2(b) ist dieser Bereich der Eichfunktion für die $2.8 \mu\text{m}$ Kugeln vergrößert abgebildet.

- Die Stromstärken I_i bei denen die optimalen Definitionsgrenzen der anzupassenden Funktionen liegen, werden in einem weitgehend automatisierten iterativen Verfahren berechnet. Dazu werden jeweils alle, bis auf eine Definitionsgrenze I_j , festgehalten. Diese Definitionsgrenze wird in groben Schritten verändert und anschließend jeweils eine

¹Siehe Anmerkung auf Seite 50

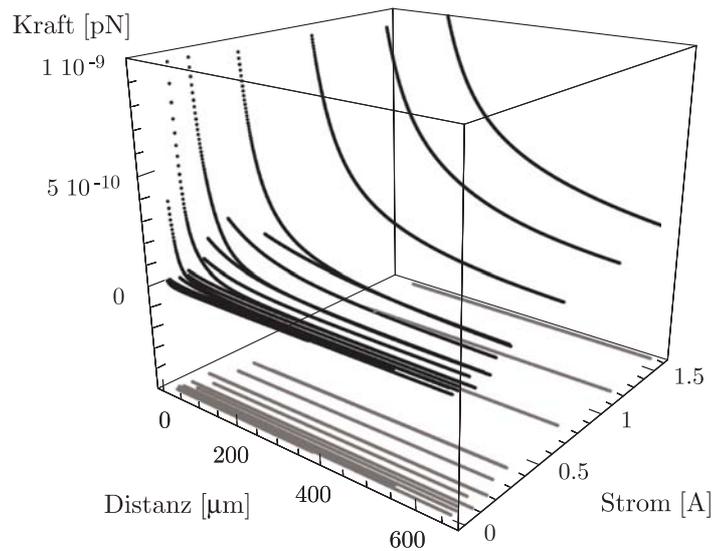


Abbildung A.3: Voller Datensatz aus mehreren unabhängigen Eichmessung der $4.5\mu\text{m}$ Kugeln, wie er für die zweidimensionale Kraft-Abstands-Anpassung benutzt wird (schwarze Linien). Der Datensatz besteht aus ca. 11000 Datenpunkten. Die Grauen Linien stellen eine Projektion der Daten auf die x - I -Ebene dar.

Anpassung der 2D-Funktion an die auf ein Fünftel ausgedünnten Messwerte durchgeführt.³ Gespeichert wird jeweils lediglich der Qualitätsfaktor χ^2 als Funktion von I_j .⁴ Die Definitionsgrenze I_j wird nach der Berechnung der kompletten χ^2 - I_j -Abhängigkeit auf den Wert gesetzt, bei dem χ^2 minimal ist. Anschließend wird eine weitere Definitionsgrenze I_k variiert und über die Minimierung von χ^2 optimiert.

Dieser Vorgang wird so oft für alle I_i wiederholt, bis die Veränderungen in den Positionen der Definitionsgrenzen beim Optimieren unter die gewählten Schrittweiten fallen. Daraufhin wird der Strombereich um die neu gefundenen I_i feiner gerastert und der gesamte Prozess wird wiederholt.

Fallen die Veränderungen in den Positionen der Definitionsgrenzen beim Optimieren in den Bereich der Genauigkeit der Strommessung, wird in einem letzten Schritt der oben beschriebene Vorgang für den vollen Satz an Messwerten durchgeführt.

10. Mit den so gefundenen Definitionsgrenzen wird die optimale 2D-Anpassung durchgeführt. Die benutzte Funktion, die Definitionsgrenzen und die Koeffizienten werden zur späteren Benutzung in einem eigenen Datensatz gespeichert, welcher von den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Krafteichungsroutinen automatisch ausgelesen werden kann.

³Das Ausdünnen der Daten ist notwendig, da ein einzelne Anpassung der 2D-Funktion an einen vollen Datensatz mehrere Minuten in Anspruch nimmt.

⁴Def.: $\chi^2 = \sum (F - F_i)/w_i$, mit F_i = Datenpunkt, F = Fitwert, w_i = Wichtungswert

Anhang B

Implementierung der Methode der nicht negativen kleinsten Quadrate

Um die Methode der nicht negativen kleinsten Quadrate (*engl.: nonnegative least square = NNLS*) zu implementieren, wurde ein C++ Quellcode benutzt, welcher von Suvrit Sra im Internet zur Verfügung gestellt wird [[Souvrit Sra \(URL\), 2003](#)]. Diese Version basiert auf einem C Quellcode der mittels des Programms *f2c* aus dem original Fortran 77 Code, den C. Lawson und R. Hanson 1973 veröffentlicht haben [[Lawson und Hanson, 1974](#)], kompiliert wurde. Der Originalcode ist frei erhältlich unter [[Lawson and Hanson \(URL\), 2003](#)]. Der C Code ist frei erhältlich unter [[Sandia National Laboratories \(URL\), 2003](#)].

Der so erhaltene C++ Quellcode wird aus dem Auswertungsprogramm *Igor* über eine sog. XOP (von *engl.: external operation*) aufgerufen.

B.0.1 Funktion und Anwendung der *Igor* XOP „MatrixNNLS“

Die XOP „MatrixNNLS“ wird von der Kommandozeile des Programms *Igor* oder aus Funktionen oder Makros in der folgenden Form aufgerufen:

- `MatrixNNLS(matrixA,vectorB,vectorX)`

Dabei wird das über- oder unterbestimmte lineare Gleichungssystem, das durch die $M \cdot N$ -dimensionale Koeffizientenmatrize `matrixA` ($\mathbf{A} = (a_{ij})$ mit $i = 1 \dots m, j = 1 \dots n$) und dem M -dimensionalen konstanten Vektor `vectorB` ($\mathbf{B} = (b_i)$) repräsentiert wird, mit den kleinsten quadratischen Abweichungen gelöst. Die Lösung wird nach der Berechnung im n -dimensionalen Vektor `vectorX` ($\mathbf{X} = (x_j)$) gespeichert. Die Funktion liefert als Rückgabewert die euklidische Norm des Lösungsvektors bei einem Aufruf in der folgenden Form

- `NumVar = MatrixNNLS(matrixA,vectorB,vectorX)`

Dabei stellt `NumVar` eine numerische Variable da. Die zweidimensionale Matrize (die sog. „2D Matrix Wave“) und die Vektoren (sog. „Waves“) müssen den gleichen numerischen Typ haben. Unterstützte numerische Igor Typen sind *single precision* und *double precision*. Bei einem unpassenden Typ einer oder mehrerer Waves (z.B. Typ *text* oder *complex*) liefert die XOP eine igorinterne, abfangbare Fehlermeldung, ebenso bei unpassenden Dimensionen der Waves.

Details

Ist $M \geq N$, berechnet MatrixNNLS eine Lösung mit kleinster quadratischer Abweichung zu einem überdeterminierten System:

$$\min_X \|(A)X - B\|_2 \quad \text{mit } x_j \geq 0$$

Ist $M < N$, berechnet MatrixNNLS die Lösung mit der kleinsten Norm der Lösungen mit kleinster quadratischer Abweichung zu einem unterdeterminierten System der Form

$$(A)X - B \quad \text{mit } x_j \geq 0$$

Kommentiertes Anwendungsbeispiel

Folgende Eingabe in die Igor Kommandozeile:

```
Make/O MatA = {{1,4,5},{10,5,1},{4,1,9},{10,12,20}}// Erstellt 3x4 Matrize
Make/O VecB = {1,3,4} // Erstellt 3-Vektor
Make/O/N=4 Solution // Erstellt 4-Vektor
MatrixNNLS(MatA,VecB,Solution)
```

berechnet die Lösung zu dem Problem:

$$\min_X \left\| \begin{pmatrix} 1 & 10 & 4 & 10 \\ 4 & 5 & 1 & 12 \\ 5 & 1 & 9 & 20 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} 1 \\ 3 \\ 4 \end{pmatrix} \right\|_2 \quad \text{mit allen } x_j \geq 0$$

Zusätzlich wird die Länge des Residuumvektors und die Anzahl der nicht negativen Koeffizienten im sog. *History*-Bereich ausgegeben.

Parameter

Um die XOP MatrixNNLS zu steuern, können folgende globale Variablen vor dem Aufruf der Funktion angelegt werden:

Variablenname	Eing./Ausg.	Bedeutung
V_NNLS_QUIET	Eingabe	Setze = 1 \Rightarrow unterdrückt <i>History</i> -Ausgabe
V_NNLS_NUMNZ	Ausgabe	Anzahl der nicht neg. Koeffizienten
V_NNLS_ITCOUNT	Ausgabe	Anzahl der benötigten Iterationen

B.0.2 Kommentiertes Listing *MatrixNNLS.c*

```
/* MatrixNNLS.c implemented by Joerg Uhde, 2003
   This XOP gets three waves and three parameters
   from Igor, stores the waves in C++ arrays and calls
   the c routine nnls(...). It returns the rnorm in the
   result field.

   // Include ANSI headers, Mac headers, IgorXOP.h, XOP.h and XOPSupport.h
#include "XOPStandardHeaders.h"
#include "MatrixNNLS.h"
// All structures are 2-byte-aligned.
#ifdef GENERATINGPOWERPC
#pragma options align=mac68k
#endif
#ifdef _WINDOWS_
#pragma pack(2)
#endif
// Global Variables
static int gCallSpinProcess = 1; // Set to 1 to all user abort (cmd dot)
// and background processing.
```

```

/* MatrixNNLS Routine()
Loads lgor matrix data in array , determaines mda, m, n and initializes
other input parameters.
Checks for errors and calls
nnls(double* a, int mda, int m, int n, double* b, double* x,
      double* rnorm, double* w, double* zz, int* index, int* mode)
when ready. Loads rnorm in result-field and returns error-code
*/
static int
MatrixNNLS(
  struct {
    waveHndl vecX;           // Reversed Order !!!
    waveHndl vecB;
    waveHndl MatA;
    DOUBLE   FuncResult;
  } * p)
{
  waveHndl wavH[3];
  int waveType;
  int numType;
  int i;
  int result;
  long numDimensions;
  long dimensionSizes[MAX_DIMENSIONS+1];
  long numBytes;
  DOUBLE *a, *b, *x, *zz, *w;
  int* index;
  double rnorm;
  int mode;
  int numnz;           // Number of non zero coeffs
  int itcount;        // Number of iterations needed
  int mda,m,n;
  char Name_MatA [MAX_OBJ_NAME+1];
  char Name_vecB [MAX_OBJ_NAME+1];
  char Name_vecX [MAX_OBJ_NAME+1];
  char Notice [256];
  DOUBLE V_ptr1[1], NILptr[1];

  p->FuncResult = -1;           // Function result is -1 if
                              // something is wrong

// Dereference
  wavH[0] = p->vecX;
  wavH[1] = p->vecB;
  wavH[2] = p->MatA;           // Reversed Order!!!

  for(i = 0; i < 3; i++){
//Wave exist?
    if (wavH[i] == NIL)
      return NOWAV;
//Input types OK?
    waveType = WaveType(wavH[i]);
    if( waveType & NT_CMPLX )
      return NO_COMPLEX_WAVE; // " Cant use a complex wave here"
    if( waveType == TEXT_WAVE_TYPE )
      return NUMERIC_ACCESS_ON_TEXT_WAVE; // "An attempt was made to
                                          // treat a text wave as if
                                          // it were a numeric wave."
  }

//Dimensions OK? + Initializing mda, m, n
// Get Dims of Matrix A
  if (result = MDGetWaveDimensions(wavH[2], &numDimensions, dimensionSizes))
    return result;
  if (numDimensions != 2)           // A not a MxN Matrix
    return MATRIX_NOT_2D;
  mda = dimensionSizes[0];         // Initialize mda = m dim of A
  n = dimensionSizes[1];          // Initialize n = n dim of A
// Get Dims of Vector B
  if (result = MDGetWaveDimensions(wavH[1], &numDimensions, dimensionSizes))
    return result;
  if (numDimensions != 1)           // B not a vector
    return B_OR_X_NOT_VECTOR;
  m = dimensionSizes[0];           // Initialize m = m dim of B
  if (m != mda)                    // dim of vecB (m) not equal to
    return DIMB_NOT_MDIMA;         // m dim of MatA (mda)
// Get Dims of Vector X
  if (result = MDGetWaveDimensions(wavH[0], &numDimensions, dimensionSizes))
    return result;
  if (numDimensions != 1)           // X not a vector
    return B_OR_X_NOT_VECTOR;
  if (dimensionSizes[0] != n)       // n dim of X not equal n dim of X
    return DIMX_NOT_NDIMA;

// Get Amount of memory needed for temp wave copys , make temp wave copys
// For the Matrix
  numBytes = WavePoints(wavH[2]) * sizeof(DOUBLE); // Bytes for Matrix
  a = (DOUBLE*) NewPtr(numBytes); // Allocate MxN-Mem for a
  if (a == NIL)
    return NOMEM;
  if (result = MDGetDPDataFromNumericWave(wavH[2], a)) { // Get a copy of the
    DisposePtr((Ptr)a); // Matrix data.
    return result;
  }
// For b and zz
// New dereference , because of possible heap scramble

```

```

wavH[1]    = p->vecB;
numBytes   = WavePoints(wavH[1]) * sizeof(DOUBLE); // Bytes for M-Vector B
b          = (DOUBLE*)NewPtr(numBytes);           // Allocate M-Mem for b
if (b == NIL)
    return NOMEM;
if (result = MDGetDPDataFromNumericWave(wavH[1], b)) { // Get a copy of the
    DisposePtr((Ptr)b); // vecB data.
    return result;
}
zz         = (DOUBLE*)NewPtr(numBytes);           // Allocate M-Mem for zz
if (zz == NIL)
    return NOMEM;
// For x, w, and Index
numBytes   = WavePoints(wavH[0]) * sizeof(DOUBLE); // Bytes for N-Vector X
x          = (DOUBLE*)NewPtr(numBytes);           // Allocate N-Mem for x
if (x == NIL)
    return NOMEM;
if (result = MDGetDPDataFromNumericWave(wavH[0], x)) { // Get a copy of the
    DisposePtr((Ptr)x); // vecB data.
    return result;
}
w          = (DOUBLE*)NewPtr(numBytes);
if (w == NIL)
    return NOMEM;
numBytes   = WavePoints(wavH[0]) * sizeof(int);
index      = (int*)NewPtr(numBytes);
if (index == NIL)
    return NOMEM;

// call to NNLS
mode       = -1;
rnorm      = -1;

result = nnls(a, mda, m, n, b, x, &rnorm, w, zz, index, &mode, &numnz, &itcount);
if (mode == 1) { // NNLS Return 1 = Successful computed NNLS
    result = 0; // Result = 0 means everything OK for Igor
    result = MDStoreDPDataInNumericWave(wavH[0], x); // Store copy of x -> wave.
    p->FuncResult = rnorm; // Stores rnorm -> Return-Field
    *V_ptr1 = 0;
    *NILptr = 0;
    if (FetchNumVar("V_NNLS_NUMNZ", V_ptr1, NILptr) & NT_FP64) { // V_NNLS_NUMNZ
        *V_ptr1 = numnz; // exists
        StoreNumVar("V_NNLS_NUMNZ", V_ptr1, NILptr); // Store num. of non 0
        // in V_NNLS_NUMNZ
    }
    *V_ptr1 = 0;
    *NILptr = 0;
    if (FetchNumVar("V_NNLS_ITCOUNT", V_ptr1, NILptr) & NT_FP64) { // V_NNLS_ITCOUNT
        *V_ptr1 = itcount; // exists
        StoreNumVar("V_NNLS_ITCOUNT", V_ptr1, NILptr); // Store number of iters
        // in V_NNLS_ITCOUNT
    }
    *V_ptr1 = 0;
    *NILptr = 0;
    FetchNumVar("V_NNLS_QUIET", V_ptr1, NILptr);
    if (*V_ptr1 == 0) {
        WaveName(wavH[2], Name_MatA);
        WaveName(wavH[1], Name_vecB);
        WaveName(wavH[0], Name_vecX);
        sprintf(Notice, "Min_%s*%s-%s | %s" CR_STR, Name_MatA, Name_vecB, Name_vecX);
        XOPNotice(Notice);
        sprintf(Notice, "Solution stored in vector '%s'." CR_STR, Name_vecX);
        XOPNotice(Notice);
        sprintf(Notice, "Euklidian norm of residual vector is: %g" CR_STR, rnorm);
        XOPNotice(Notice);
        sprintf(Notice, "Number of non zero coefficients: %d" CR_STR, numnz);
        XOPNotice(Notice);
    }
}
DisposePtr((Ptr)a); // Dispose all pointer
DisposePtr((Ptr)b);
DisposePtr((Ptr)x);
DisposePtr((Ptr)zz);
DisposePtr((Ptr)w);
DisposePtr((Ptr)index);
WaveHandleModified(wavH[0]); // Inform Igor that vecX was changed
if (mode == -1) // NNLS Return -1 = Something strange
    return ERR_520; // is wrong with NNLS
if (mode == 2) // NNLS Return 2 = BAD_DIMENSIONS Error
    return BAD_DIMENSIONS;
if (mode == 3) // NNLS Return 3 = ITERS_EXCEEDED Error
    return ITERS_EXCEEDED;

return result; // 0 if no error else Igor Error Code
}

/* RegisterFunction()
Igor calls this at startup time to find the address of the
XFUNCS added by this XOP. See XOP manual regarding "Direct XFUNCS".
*/
static long
RegisterFunction()
{
    int funcIndex;

```

Anhang B

```
funcIndex = GetXOPItem(0); // Which function is Igor asking about?
switch (funcIndex) {
    case 0: // MatrixNNLS (matrixA , vectorB , vectorX)
        return ((long)MatrixNNLS);
        break;
}
return(NIL);
}

/* XOPEntry ()

This is the entry point from the host application to the
XOP for all messages after the INIT message.
*/
static void
XOPEntry(void)
{
    long result = 0;
    switch (GetXOPMessage()) {
        case FUNCADDRS:
            result = RegisterFunction();
            break;
    }
    SetXOPResult(result);
}

/* main(ioRecHandle)
This is the initial entry point at which the host application
calls XOP. The message sent by the host must be INIT.
main() does any necessary initialization and then sets the
XOPEntry field of the ioRecHandle to the address to be called
for future messages.
*/
HOST_IMPORT void
main(IORecHandle ioRecHandle)
{
    #ifdef XOP_GLOBALS_ARE_A4_BASED
        #ifdef __MWERKS__
            // For CodeWarrior 68K XOPs.
            SetCurrentA4(); // Set up correct A4. This allows globals to work.
            SendXOPA4ToIgor(ioRecHandle, GetA4()); // and communicate it to Igor.
        #endif
    #endif

    LoadXOPSegs();
    XOPInit(ioRecHandle); // Do standard XOP initialization.
    SetXOPEntry(XOPEntry); // Set entry point for future calls.
    SetXOPResult(0L);
}

// All structures are 2-byte-aligned.
#ifdef GENERATINGPOWERPC
    #pragma options align=reset
#endif
#ifdef _WINDOWS_
    #pragma pack()
#endif
#endif
```

Anhang C

Die ATPase-Rate von HMM

Die Zeit τ_{on} , während der ein Myosinkopf an ein Aktinfilament gebunden ist, steigt erst dann an, wenn die Bindung von ATP der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt im chemomechanischen Zyklus geworden ist. Dies geschieht, sobald entweder die ATP-Konzentration aufgrund der Hydrolyse zu ADP und Phosphat genügend gesunken oder das Verhältnis von ADP zu ATP stark angestiegen ist.¹ War anfangs kein ADP vorhanden, kann damit die bis zum Beginn des Sol-Gel-Übergangs (T_{total}) verbrauchte ATP-Menge nach oben hin abgeschätzt werden, indem angenommen wird, dass alles ATP komplett hydrolysiert wird. Nimmt man die ATPase-Aktivität als konstant an, erhält man aus der Zeit bis zum Sol-Gel-Übergang T_{total} und aus der gesamten zugegebenen ATP-Menge $[ATP]_0$, die mittlere ATPase-Rate k_{ATPase} in der Probe [Keller, 2003]:

$$k_{\text{ATPase}} = \frac{[ATP]_0}{[HMM]_0 T_{\text{total}}}. \quad (\text{C.1})$$

Dabei ist $[M]_0$ die HMM-Konzentration.

Aus den Experimenten ergibt sich für eine Aktinkonzentration von $\approx 10\mu\text{M}$ eine ATPase-Rate von $k_{\text{ATPase}} \approx 0.5\text{ s}^{-1}$ in F-Puffer und 6 s^{-1} im Assay-Puffer für ein HMM-Molekül, d.h. $k_{\text{ATPase}} \approx 0.25\text{ s}^{-1}$ bzw. 3 s^{-1} für einen HMM-Kopf. Dies ist weit entfernt von der maximalen ATPase-Rate von 20 s^{-1} für HMM².

Schon anhand dieser Diskrepanz lässt sich erkennen, dass die Annahme einer gleichmäßigen ATPase-Rate mit dem Maximalwert nicht der Realität der hier vorgestellten Messungen entspricht. Der Grund dafür ist der Einfluss der Diffusion der Motormoleküle und des ATPs bei Aktinkonzentrationen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

C.0.2.1 Beeinflussung der ATPase-Rate durch Eigendiffusion der HMM-Moleküle

Nachdem ein HMM-Motorkopf ATP gebunden hat, trennt es sich vom F-Aktin. Das HMM Molekül kann erst nach der Bindung an ein weiteres Aktinfilament die Produkte der ATP-Hydrolyse freisetzen und somit den chemischen ATPase-Zyklus vollenden. Dies bedeutet, dass die Diffusion der HMM-Motoren zwischen zwei Bindungsereignissen eine zentrale Rolle im ATPase-Zyklus spielt.

¹Das liegt daran, dass das ADP mit dem ATP um die Bindungsstelle im Myosin konkurriert. Das Gleichgewicht liegt zwar weit auf der Seite von ATP aber bei genügend hohen Konzentrationen von ADP blockiert dieses die Bindungsstelle immer häufiger. Dieser Fall ist nur dann relevant, wenn zu Beginn des Versuchs zusätzlich ADP zugegeben wurde, was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht der Fall war.

²Die maximale ATPase-Rate wird für sehr hohe Aktinkonzentrationen extrapoliert.

In einer einfachen Abschätzung wird angenommen, dass ein HMM-Molekül einen hydrodynamischen Radius von $r \approx 20$ nm hat. In der Lösung mit der Viskosität $\eta = 10^{-3}$ Pa·s hat der Motor nach der Stokeschen Formel für ein sphärisches Objekt einen Reibungskoeffizienten von $\gamma = 6\pi\eta r$. Mit der Einstein-Relation $D = \gamma^{-1}k_B T$ ergibt sich die charakteristische Zeit, die das HMM-Molekül benötigt, um über die Distanz einer Maschenweite ξ zu diffundieren (k_B ist der Boltzmannfaktor und T die Temperatur):

$$t \simeq \frac{\langle x^2 \rangle}{6D} \sim \frac{\xi^2 \gamma}{6k_B T} = \frac{\xi_m^2 \pi \eta r}{k_B T} \quad (\text{C.2})$$

Für eine typische Maschenweite in der Größenordnung $\xi \sim 0.6$ μm ergibt sich $t \sim 0.006$ s.

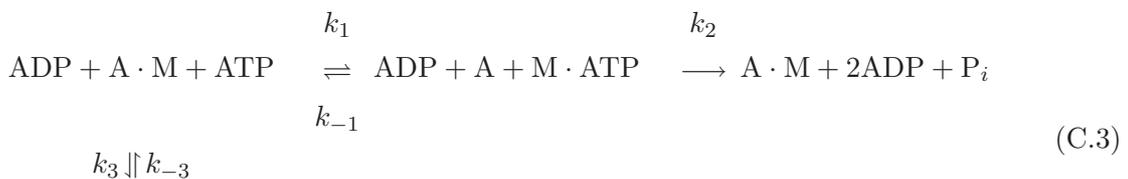
Nach der Diffusion über die Distanz ξ muss das HMM-Molekül an ein Aktinfilament binden. Aktin hat in den hier vorgestellten Experimenten einen Volumenbruchteil kleiner als 0.001. Wird das Aktinnetzwerk näherungsweise als kubisches Gitter mit Kantenlänge ξ angesehen, wobei dessen Kanten eine Breite von 8 nm (entsprechend der eines Aktinfilaments) haben, so ergibt sich ein Verhältnis von durch Aktin bedeckter Oberfläche zu freier Oberfläche von $\phi \approx 12 \cdot 0.008 \mu\text{m} \cdot 0.6 \mu\text{m} / (6 \cdot 0.6 \mu\text{m} \cdot 0.6 \mu\text{m}) \approx 1/40$. Damit ergibt die Rate, mit der ein Motor sich vom Filament trennt, diffundiert und wieder auf ein Filament trifft $k_{\text{Kontakt}} \sim \phi/t \sim 4.5 \text{ s}^{-1}$.

Die Größenordnung von k_{Kontakt} entspricht damit der ATPase-Rate von HMM in einer Aktinlösung mit Assay-Puffer, ist jedoch viel größer als in einem System mit F-Puffer. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei der spezifischen Bindung des HMM an das F-Aktin auch die elektrostatische Wechselwirkung der zwei Bindungsdomänen eine entscheidende Rolle spielt. Nachdem ein HMM-Molekül durch Diffusionsbewegung auf ein Aktinfilament trifft, könnte die elektrostatische Wechselwirkung (Debye-Abschirmlänge im nm-Bereich) die für die spezifische Bindung erforderliche Orientierung der zwei Proteine bewirken.

Um den Einfluß der ATPase-Rate noch genauer untersuchen zu können, wurde von Andrea Parmeggiani³ die Abnahme der ATPase-Rate numerisch abgeschätzt.

C.0.2.2 Numerische Abschätzung der ATPase-Rate

Die ATP-Konzentration als Funktion der Zeit wurde unter Benutzung folgender vereinfachter Reaktionskinetik für einen HMM-Kopf berechnet:



Dabei ist A Aktin und M ein Myosinkopf. Da der ratenbegrenzende Schritt bei hoher ATP-Konzentration die Diffusion des Motors zum Aktinfilament und die Bindung daran ist, kann $k_2 \simeq k_{\text{ATPase}}$ genähert werden. Die Reaktionsdynamik wurde mittels Michaelis Menten Kinetik berechnet. Da im Laufe der Zeit die ATP-Konzentration (insbesondere im Vergleich zur ADP-Konzentration) sehr niedrig werden kann, muss auch die Konkurrenz von ATP mit ADP um die freie ATP-Bindungsdomäne des HMM beachtet werden: Nachdem der Motor

³Hahn Meitner Institut, Berlin

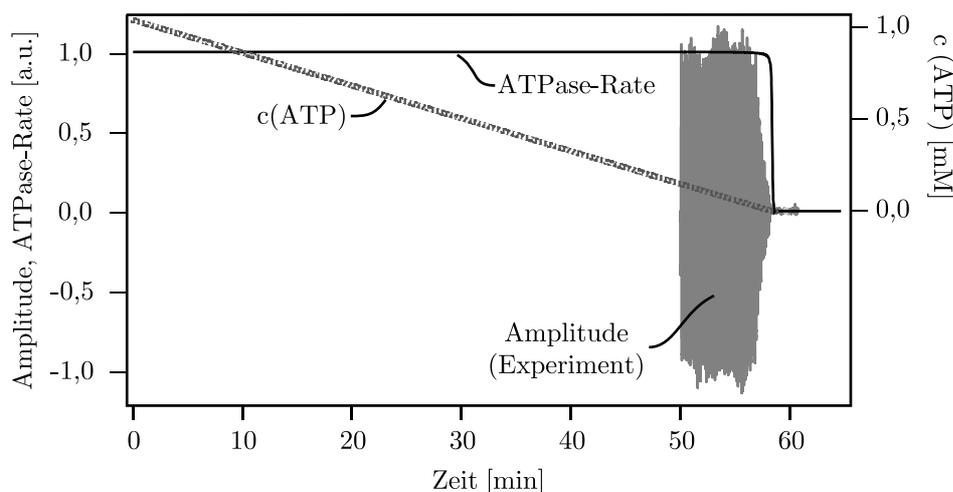


Abbildung C.1: Theorie zur ATPase-Rate von HMM. Gezeigt sind die theoretisch berechnete ATP-Konzentration (gestrichelte Linie) und die daraus abgeleitete ATPase-Rate (durchgezogene Linie). Zusätzlich ist eine Messung hinterlegt (grauer Bereich). Zu erkennen ist, dass im Bereich der Amplitudenreduktion (Sol-Gel-Übergang) die ATPase-Rate innerhalb kurzer Zeit auf null sinkt. Bis zu diesem Zeitpunkt war die ATP-Konzentration nicht Ratenbestimmend. Der Zeitpunkt des Sol-Gel-Übergangs markiert das Zeitfenster in dessen Nähe das Phänomen des aktiven Transports auftritt. Die Aktinkonzentration betrug $9.5 \mu\text{M}$ und $r_{\text{AH}} = 13$.

infolge des Power Strokes ADP freigesetzt hat, ist ein ATP-Molekül nötig, um die Aktin-HMM-Bindung zu lösen. Bindet stattdessen wieder ein ADP-Molekül, so verzögert sich die ATP-Bindung und die Lösung der Aktin-HMM-Bindung.

Sei $X(t)$ und $Y(t)$ die Konzentration derjenigen HMM-Moleküle, die zur Zeit t ATP bzw. ADP gebunden haben, dann können noch $[M]_0 - X - Y$ Motormoleküle ein Nukleotid binden. Dies beeinflusst die Reaktionsdynamik, falls die ADP-Konzentration im Vergleich zur ATP-Konzentration hoch ist. Mit den Raten $k_1 = k_3 = 5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ und $k_{-1} = 0.4 \text{ s}^{-1}$, $k_{-3} = 1000 \text{ s}^{-1}$ [Howard, 2001] ergibt sich folgendes System von gekoppelten linearen Differentialgleichungen:

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= -(k_{-1} + k_2)X + k_1[M][\text{ATP}] \\ \frac{dY}{dt} &= -k_{-3}Y + k_3[M][\text{ADP}] \\ \frac{d[\text{ATP}]}{dt} &= -k_1[M][\text{ATP}] + k_{-1}X \\ \frac{d[\text{ADP}]}{dt} &= -k_3[M][\text{ADP}] + k_{-3}Y + k_2X \\ \frac{d[M]}{dt} &= -k_1[M][\text{ATP}] + (k_{-1} + k_2)X - k_3[M][\text{ADP}] + k_{-3}Y \end{aligned}$$

Dabei gilt die Einschränkung

$$[M](t) = [M]_0 - X - Y.$$

Das Ergebnis der numerischen Lösung dieses Gleichungssystems ist in Abb. C.1 gezeigt.

In einer Aktin-HMM-Lösung, die zu Beginn kein ADP enthält, bleibt die ATPase-Rate bis zu einer ATP-Konzentration von ca. 10–15 μM konstant. Dann sinkt die ATPase-Rate innerhalb weniger Minuten auf einen Wert um null. Sowohl der Zeitpunkt, bei dem diese Änderung eintritt, als auch die Dauer der Phase stimmen sehr präzise mit dem experimentell beobachteten Sol-Gel-Übergang und damit mit der Phase des aktiven Transports überein.

Abkürzungsverzeichnis

2D	zwei Dimensionen, zweidimensional
3D	drei Dimensionen, dreidimensional
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
AD	Analog/Digital
ADP	Adenosin-Diphosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
AVI	Audio Video Interleaved, Videodatenformat
Bit	Binary Digit, Speichereinheit
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Compact Disc
CPU	Central Processing Unit, Prozessor
d.h.	das heißt
DVD	Digital Versatile Disc
<i>D. Discoideum</i>	Dictyostelium discoideum
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid, Ethylendinitrilotetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EELS	Elektronen-Verlustspektroskopie
engl.	englisch
EM	Elektronenmikroskop, elektronenmikroskopisch
F-Aktin	filamentöses (polymeres) Aktin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fl.	Fluoreszenz
G-Aktin	globuläres (monomeres) Aktin
Gew%	Gewichtsprozent
Gluc.Oxid.	Glukose Oxidase
HBO®	Warenzeichen für Quecksilberdampflampen (Osram)
HMM	Schweres Meromyosin
Id.-Nr.	Identifizierungsnummer
Inc.	Incorporated
Kap.	Kapitel
LMM	Leichtes Meromyosin
MT	Magnetic Tweezers
RCM	Rotating Crossbridge Modell
s.	siehe
SDS	sodium dodecyl sulphate polyacrylamide
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
S.	Seite
S1	Subfragment 1; Kopf des Myosinmoleküls
S2	Subfragment 2; HMM ohne beide Köpfe

sog.	sogenannt
TEM	Transfer-Elektronenmikroskop
TLCK	N(α)-p-Tosyl-L-Lysin Chlorometyl Keton
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrodaminisothiocyanat
TU	Technische Universität
u.a.	unter anderem
URL	Universal Ressource Loader
vergl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

Symbolverzeichnis

\sim	proportional
\approx	ungefähr gleich
a	hydrodynamischer Filamentdurchmesser, m
c_A	Aktinkonzentration, mol/L
η	dynamische Viskosität, Pa s
f	Frequenz, Hz
$F, F(t)$	Kraft, pN
F_0	Amplitude der Kraft, pN
(γ_{ij})	Scherungstensor, Pa
$G, G(t)$	Relaxationsmodul, Pa
G, G_0	Freie Enthalpie, Freie Standard- Reaktionsenthalpie, J
G^*	komplexer Modul, Pa
$G'(f)$	frequenzabhängiger Speichermodul, Pa
$G''(f)$	frequenzabhängiger Verlustmodul, Pa
i, j	Indizes
J	Kriechkomplianz, Pa ⁻¹
k_{ATPase}	ATPase-Rate, s ⁻¹ HMM-Kopf ⁻¹
k_B	Boltzmannfaktor, J/K
l_P	Persistenzlänge eines Polymers, μm
L	Konturlänge eines Polymers, μm
m	Masse, kg
M	molar, mol/L
M_r	Molekülmasse, Da, kDa
$\omega = 2\pi f$	Kreisfrequenz, rad/s
pH	negativer dekadischer Logarithmus des Zahlenwerts der Wasserstoffionen- konzentration $[\text{H}^+]$ (in mol/L), dimensionslos
ρ	Dichte, g/cm ³
r_{AC}	Molverhältnis Aktin zu Vernetzer, mol/mol
r	„duty ratio“, dimensionslos
R, R_{Kugel}	Kugelradius, μm
(σ_{ij})	(mechanischer) Spannungstensor, Pa
σ	mechanische Spannung, Pa
σ_0	Amplitude der mechanischen Spannung, Pa
s	Konturlängenparameter, dimensionslos
τ_d	terminale Relaxationszeit / Diffusionsrelaxationszeit, s
τ_e	Entanglementzeit, s
τ_{off}	Zeit, die ein molekularer Motor im gebundenen Zustand verbringt, s
τ_{on}	Zeit, die ein molekularer Motor im ungebundenen Zustand verbringt, s
τ_{total}	Dauer des ATPase-Zyklus, s
t	Zeit, s
T_{Kamera}	Belichtungszeit der Kamera, s
$x, \Delta x$	Auslenkung, μm
ξ	Maschenweite, μm

Abbildungsverzeichnis

1.1	Leitsaum und Stressfasern einer Zelle	5
1.2	Zellbewegung (Chemotaxis) einer Amöbe	5
1.3	Muskel-Myofibrille (EM und schematischer Aufbau)	6
1.4	Aktin (Kalottenmodell und Rekonstruktion aus Röntgenstruktur)	7
1.5	Schema der Aktinpolymerisation	8
1.6	Nachweis der Aktinpolymerisation über Zunahme der NBD-Fluoreszenz	9
1.7	Myosin und Myosinverdauung (schematisch)	11
1.8	Das „Rotating Crossbridge“-Modell	12
1.9	Phalloidin (Strukturformel) / Gelsolin (Kalottenmodell aus Röntgenstruktur)	15
1.10	Fluoreszenzaufnahme von qualitativ hochwertigem F-Aktin	17
1.11	SDS-Polyacrylamid-Gel der HMM-Aufreinigung	20
1.12	Motility Gliding Assay (schematisch)	21
1.13	Magnetische Pinzetten: Der „High Force“-Aufbau	24
1.14	Foto des „High Force“-Aufbaus	25
1.15	Verbesserte Messkammer des „High Force“-Aufbaus (schematisch)	26
1.16	Verbesserungen des Aufbaus (Strommessung / Entmagnetisierung / Hysterese)	28
1.17	Vereinfachtes Termschema eines fluoreszierenden Moleküls	29
2.1	End-zu-End-Abstand Verteilungsfunktion bei Filamentfluktuationen (theoretisch)	33
2.2	Reptationsmodell (schematisch)	35
2.3	MSD-Verlauf für Fluktuationen quer zur Filamentachse (qualitativ)	36
2.4	Scherung eines Würfelements	37
2.5	Generalisiertes Maxwell-Modell / Generalisiertes Voigt-Modell	39
2.6	Theoretischer Verlauf der komplexen Relaxationsmodulen von Aktin	41
2.7	Osmotischer Widerstand einer bewegten Kugel in einem Polymernetzwerk (I)	43
2.8	Osmotischer Widerstand einer bewegten Kugel in einem Polymernetzwerk (II)	44
2.9	Simulation der Bewegung einer Kugel in einem verschlauften Polymernetzwerk	45
2.10	Spulenstrom-Kraft-Abhängigkeit für paramagnetische Sondenpartikel	46
3.1	Abstandsabhängigkeit des prozentualen Fehlers der Krafteichung	50
3.2	Vergleich alte und neue Eichmethode	51
3.3	Daten und 3D-Anpassung für die 4.5 μm Kugeln	52
4.1	Kontrollexperiment zum Wachstum der Reporterfilamente (Doppelfärbung)	54
4.2	Magnetkugelamplitude bei periodischer Anregung (versteifendes Aktin/HMM-Netzwerk)	55
4.3	Filamenttrajektorie eines aktiv transportierten Filaments	57
4.4	Darstellung des prozentualen Anteils transportierter Filamente	58
4.5	Torsion des Netzwerks in der Nähe des Sol-Gel-Übergangs	58
4.6	Einfrieren der Fluktuationen	59
4.7	Histogramme der Geschwindigkeiten v_i der Filamentenden	60
4.8	Verschiebung von Filamenten entlang ihrer Kontur (aktiv transportiert / thermisch)	61
4.9	Relation der Transportparameter	62
4.10	Einfluss der Aktinkonzentration auf die Transporteigenschaften	64
4.11	Einfluss der HMM-Konzentration auf die Transporteigenschaften	65
4.12	Einfluss der Alterung des HMM auf die Transporteigenschaften	66

4.13	Der Reißverschluss-Mechanismus (schematisch)	71
5.1	Vergleich: Berechnung des Relaxationsmoduls aus $J(t)$ (Hopkins & Hamming / Liu)	78
5.2	Umrechnung von $J(t)$ nach $G(t)$ (für Aktin) mit der Methode nach Liu	80
5.3	Einfluss des Wichtungsfaktors auf den berechneten Relaxationsmodul	81
5.4	Einfluss der Pulslänge auf die $G(t)$ Berechnung	81
5.5	Relaxationsspektrum von Aktin (gemessen)	83
5.6	Theoretisch berechnetes komplexes Relaxationsspektrum von Aktin	83
5.7	Relaxationsspektrum aus Messungen mit oszillierenden Magnetischen Pinzetten	85
5.8	Einfluss der Pulslänge auf die komplexen Module	87
5.9	Kraftabhängigkeit des Gummiplateaus	90
5.10	Thermisches Rauschen der Komplianzkurven	94
5.11	Rauschen für kurze Zeiten	95
5.12	Totale Relaxation der Sondenauslenkung bei kleinen Kräften	96
5.13	Komplianzkurvensättigung bei kleinen Kräften	97
5.14	Vergleich sättigende/normale Kurve	98
5.15	Anpassung eines erweitertes Zener-Modell	100
5.16	Kurzzeitverhalten der Kriechkomplianz (repräsentative Auswahl)	101
5.17	Kurzzeitverhalten der gemittelten Kriechkomplianzen	101
5.18	Abweichung der Kriechkomplianz von $t^{3/4}$ bei den ersten Messpunkten	102
5.19	Korrektur der ersten Datenpunkte	103
5.20	Einschaltkennlinie der Spule	104
5.21	$t^{1/2}$ -Abhängigkeit der Kriechkomplianz (Auswahl von Einzelkurven)	105
5.22	Molekulardynamische Simulation der erzwungenen Kugelauslenkung	107
5.23	Details der $t^{0.5}$ -Abhängigkeit (gemittelte Komplianzkurven)	108
5.24	Linearer Anstieg der Kriechkomplianz für lange Zeiten (repräsentative Auswahl)	109
5.25	Verwischter Regimeübergang für hohe Kräfte	110
5.26	Abknickende Kriechkomplianzkurve für hohen Kraftgradienten	111
5.27	Korrektur für hohe Kraftgradienten	112
5.28	Kleine Langzeitkorrektur für eine Kriechkomplianzkurve	113
5.29	Bestimmung der charakteristischen Zeiten τ_e und τ_d	114
5.30	Kraftabhängigkeit der Kriechkomplianz (exemplarische Auswertungen)	116
5.31	Vergleich der Potenzgesetzanpassung an die Kraftabhängigkeit (Theorie / Experiment)	117
5.32	Kraftabhängigkeit von τ_e	118
5.33	Kraftabhängigkeit von τ_d	119
5.34	Konzentrationsabhängigkeit der Kriechkomplianz im Wurzelregime	120
5.35	Konzentrationsabhängigkeit der Langzeitviskosität	122
5.36	Fluktuationen der Auslenkungskurve (typische Ausschnitte)	123
5.37	Fluktuationen der Kriechkomplianzkurven (repräsentative Beispiele)	124
6.1	Bildabfolge einer erzwungenen Auslenkung eines Aktinfilaments (Fluoreszenzaufnahme)	126
6.2	Auslenkungskurve der erzwungenen Auslenkung einer Kugel mit Filament	127
6.3	Kriechkomplianz von Sondenpartikeln mit angehängten Filamenten	128
6.4	Viskosität des Filament/Kugel-Systemen in Abhängigkeit von der Länge des Filaments	130
7.1	Verflüssigung eines Aktin/HMM-Netzwerkes (makrorheometrische Messung)	133
7.2	Gemittelte Kriechkomplianzkurven HMM/Aktinnetzwerk (verschiedene r_{AH})	134
7.3	Repräsentative Kriechkomplianzkurven aktiver Netzwerke (verschiedene r_{AH})	135
7.4	Langzeitviskosität (HMM/Aktin) in Abhängigkeit von $1/r_{AH}$	136
A.1	Anpassung doppel-exponentieller Funktion an die zusammengefassten Einzeleichkurven	III
A.2	Kraft-Strom-Abstandsabhängigkeit für die $2.8 \mu\text{m}$ Kugeln	IV
A.3	Kraft-Strom-Abstandsabhängigkeit für die $4.5 \mu\text{m}$ Kugeln	V
C.1	Theorie zur ATPase-Rate von HMM (theoretisch)	XIII

Tabellenverzeichnis

1.1	Der Hydrolysekreislauf von Akto-Myosin	13
1.2	Übersicht über die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.	16
1.3	Übersicht über die verwendeten Mikropartikel	19
5.1	Zusammenstellung der Entanglement-Zeiten für Aktinnetzwerke	86
5.2	Zusammenstellung der Plateaumodule für Aktinnetzwerk	89
5.3	Zusammenstellung der t_2^a -Exponenten für das Wurzelregime	106
5.4	Zusammenstellung der Kraftabhängigkeit der Kriechkomplianz im Wurzelregime	115

Literaturverzeichnis

- H. Faxn. Die bewegung einer starren kugel lngs der achse eines mit zher flssigkeit gefllten rohres. *Arkiv Mat. Astron. Fys.*, 17(27):1–28, 1923. [1](#)
- I.L. Hopkins und R.W. Hamming. On creep and relaxation. *J. Appl. Phys.*, 28:906–909, 1957. [\(document\)](#), [2.1.1](#)
- A. F. Huxley. The contraction of muscle. *Sci. Am.*, 199(5):67–72, Nov 1958. [1.2.2](#)
- L.D. Landau und E.M. Lifschitz. *Lehrbuch der theoretischen Physik, Band VII (Elastizitätstheorie)*. Akademie-Verlag, Berlin, 1970. [2.1](#), [2.1.1](#)
- J A Spudich und S Watt. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem*, 246(15):4866–71, Aug 1971. [1.2.4.1](#)
- K. Furusawa, W. Norde, und J. Lyklema. A method for preparing surfactant-free polystyrene latices of high surface charge. *Kolloid ZZ Polymere*, 250(9):908, 1972. [1.2.3](#)
- R.H. Ottewill und J.N. Shaw. Studies on the preparation and characterization of monodisperse polystyrene latices. *Kolloid ZZ Polymere*, 215:161–166, 1972. [1.2.3](#)
- K. Soda. Dynamics of stiff chains: I. equation of motion. *J. Phys. Soc. Jpn.*, 35:866–870, 1973. [2.1](#)
- TW Houk und K Ue. The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods. *Anal Biochem*, 62(1):66–74, Nov 1974. [1.2.4.1](#)
- C.L. Lawson und R.J. Hanson. *Solving Least Squares Problems*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs,N.J., Jul 1974. [2.1.1](#), [B](#)
- A Wegner. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*, 108(1):139–50, Nov 1976. [1.2.1](#)
- A.G. Weeds und B. Pope. Studies on the chymotryptic digestion of myosin. effects of divalent cations on proteolytic susceptibility. *J. Mol. Biol.*, 111(2):129–157, 1977. [1.2.4.3](#)
- J.A. Sleep, D.D. Hackney, und P.D. Boyer. Characterization of phosphate oxygen exchange reactions catalyzed by myosin through measurement of the distribution of 18-o-labeled species. *J. Biol. Chem.*, 253(15):5235–5238, Aug. 1978. [1.2.2](#)
- M.R. Webb, G.G. McDonald, und D.R. Trentham. Kinetics of oxygen-18 exchange between inorganic phosphate and water catalyzed by myosin subfragment 1, using the 18o shift in 31p nmr. *J. Biol. Chem.*, 153(9):2908–2911, May 1978. [1.2.2](#)
- J.W. Cardon und P.D. Boyer. The rate of release of atp from its complex with myosin. *Eur. J. Biochem.*, 92(2):443–448, Dez. 1978. [1.2.2](#)
- H.L. Yin und T.P. Stossel. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature*, 281(5732):583–586, Okt 1979. [1.2.3](#)
- P.G. de Gennes. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell Univ. Pr., 1979. [2.1](#), [2.1.1](#)

- S MacLean-Fletcher und TD Pollard. Identification of a factor in conventional muscle actin preparations which inhibits actin filament self-association. *Biochem Biophys Res Commun*, 96(1):18–27, Sep 1980. [1.2.4.1](#)
- J.D. Ferry. *Viscoelastic properties of polymers*. John Wiley & Sons, New York, 1980. [2.1.1](#)
- P. Detmers, A. Weber, M. Elzinga, und R.E. Stephens. 7-chloro-4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazole actin as a probe for actin polymerization. *J. Bio. Chem.*, 256(1):99–105, Jan. 1981. [1.2.1](#)
- S.S. Margossian und S. Lowey. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Meth. Enzym.*, 85(Pt B):55–72, 1982. [1.2.4.3](#)
- T. Odijk. On the statistics and dynamics of confined or entangled stiff polymers. *Macromol.*, 16:1340, 1983. [2.1](#)
- K.A. Johnson. Pathway of the microtubule-dynein atpase and the structure of dynein: a comparison with actomyosin. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 14:161–88, 1985. Review. [1.2.2](#)
- A.N. Semenov. Dynamics of concentrated solutions of rigid-chain polymers. i. brownian motion of persistent macromolecules in isotropic solution. *Chem.Soc., Faraday Trans. 1i*, 82:317–329, 1986. [2.1](#)
- S.J. Kron und J.A. Spudich. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(17):6272–76, 1986. Review. [1.2.2](#), [1.2.4.3](#), [4.4.1](#)
- G.N. Jr. Phillips, J.P. Fillers, und C. Cohen. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J. Mol. Biol.*, 192(1):111–31, Nov 1986. [2](#)
- R. Cooke, K. Franks, G.B. Luciani, und E. Pate. The inhibition of rabbit skeletal muscle contraction by hydrogen ions and phosphate. *J. Physiol.*, 395:77–97, Jan 1988. [1.2.2](#)
- E. S. Bullitt, D.J. DeRosier, L. M. Coluccio, und L. G. Tilney. Three-dimensional reconstruction of an actin bundle. *J Cell Biol*, 107(2):597–611, Aug 1988. [1.2.1](#)
- Y.Y. Toyoshima, C. Toyoshima, und J.A. Spudich. Bidirectional movement of actin filaments along tracks of myosin heads. *Nature*, 341(6238):154–156, Sep 14 1989. [1.2.2](#), [4.4.3](#), [4.4.3](#)
- Christop F. Schmidt, Michael Bärmann, Gerhard Isenberg, und Erich Sackmann. Chain dynamics, mesh size, and diffusive transport in networks of polymerized actin. a quasielastic light scattering and micrfluorescence study. *Macromolecules*, 22:3638–3649, 1989. [2.1](#), [5.1.1](#)
- N.W. Tschoegel. *The Phenomenological Theory of Linear Viscoelastic Behavior*. Springer Verlag, Berlin, 1989. [\(document\)](#), [2.1.1](#), [2.1.1](#), [2.1.1](#)
- M. Doi und S. F. Edwards. *The Theory of Polymer Dynamics*. Oxford Science Publications, 1989. [2.1](#), [2.1](#), [2.1](#), [2.1.1](#), [2.2.1](#), [5.1.1](#)
- K C Holmes, D Popp, W Gebhard, und W Kabsch. Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347 (6288):44–9, Sep 1990. [1.2.1](#)
- M. Wilchek und E.A. Bayer. Introduction to avidin-biotin technology. *Methods. Enzymol.*, 184:5–13, 1990. Review. [1.2.3](#)
- TQ Uyeda, SJ Kron, und JA Spudich. Myosin step size. Estimation from slow sliding movement of actin over low densities of heavy meromyosin. *J Mol Biol*, 214(3):699–710, Aug 1990. [4.4.1](#)
- S. J. Kron, Y. Y. Toyoshima, T. Q. Uyeda, und J. Spudich. Assays for actin sliding movement over myosin-coated surfaces. *Meth. Enzymol.*, 196:399–416, 1991. [1.2.4.3](#)
- M. A. Geeves. The dynamics of actin and myosin association and the crossbridge model of muscle contraction. *Biochem. J.*, 274(Pt 1):1–14, Feb. 1991. Review. [1.2.2](#)

- R Door, D Frsch, und R. Martin. Estimation of section thickness and quantification of iron standards with eels. *J. Microsc.*, 162(Part 1):15–22, April 1991. [3.0.2](#)
- K Takiguchi. Heavy meromyosin induces sliding movements between antiparallel actin filaments. *J Biochem (Tokyo)*, 109(4):520–7, Apr 1991. [4.4.1](#)
- R.A. Alberty und R.N Goldberg. Standard thermodynamic formation properties for the adenosine 5'-triphosphate series. *Biochemistry*, 31(43):10610–10615, Nov. 1992. [1.2.2](#), [1.2.2](#)
- S. Kaufmann, J. Käs, W. H. Goldmann, E. Sackmann, und G. Isenberg. Talin anchors and nucleates actin filaments at lipid membranes. *FEBS Letters*, 314:203–205, 1992. [1.2.1](#), [2.1](#), [5.2.2.2](#)
- M.H. Lu, C. DiLullo, T. Schultheiss, S. Holtzer, J.M. Murray, J. Choi, D.A. Fischman, und H. Holtzer. The vinculin/sarcomeric-alpha-actinin/alpha-actin nexus in cultured cardiac myocytes. *J. Cell Biol.*, 117(5):1007–22, 1992. [2](#)
- G. Gittes, B. Mickey, J. Nettleton, und J. Howard. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.*, 120(4):923–934, 1993. [2.1](#)
- C. R. Bagshaw. *Muscle Contraction*. Chapman & Hall, London, UK, 2nd edition, 1993. [1.2.2](#), [1.2.2](#), [4.4.1](#)
- Y.Z. Ma und E.W. Taylor. Kinetic mechanism of myofibril atpase. *Biophys. J.*, 66(5):1542–1553, May 1994. [1.2.2](#)
- F. Ziemann, J. Rädler, und E. Sackmann. Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using an oscillating magnetic bead micro-rheometer. *Biophys. J.*, 66(6):2210–2216, Jun 1994. [1.3](#), [5.1.1](#), [5.2.2.2](#), [5.4.2.1](#), [5.7](#), [5.36](#)
- B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, und J. D. Watson. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York, 4 edition, 1994. [1.1](#), [1.2](#), [1.3](#)
- J.T. Finer, R.M. Simmons, und J.A. Spudich. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometer steps. *Nature*, 368(6467):113–119, 1994. [1.2.2](#)
- Lexander Yu. Grosberg und Alexei R. Khokhlov. *Statistical Physics of Macromolecules*. AIP Press, 1994. [2.2.1](#), [2.2.1](#)
- E. Pate, G.J. Wilson, und M. Bhimani R. Cooke. Temperature dependence of the inhibitory effects of orthovanadate on shortening velocity in fast skeletal muscle. *Biophys. J.*, 66(5):1554–1562, März 1994. [1.2.2](#)
- J. Trinick. Titin and nebulin: protein rulers in muscle? *Trends Biochem Sci.*, 19(10):405–9, Oct 1994. Review. [2](#)
- Donald Voet und Judith G. Voet. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, New York, second edition, 1995. [1.1](#), [1.2.2](#)
- M. Tempel. *Aktinbindende Proteine als Membran/Zytoskelett-Koppler und als Modulatoren der Viskoelastizität von Aktinnetzwerke*. PhD thesis, Technische Universität München / Physikdepartment, 1996. [2.1](#), [2.1.1](#), [5.2.2.1](#), [7](#)
- H. Isambert und A.C. Maggs. Dynamics and rheology of actin solutions. *Macromol*, 29:1036–1040, 1996. [2.1](#), [2.1](#), [5.1.1](#), [5.6](#)
- J Ks, H Strey, JX Tang, D Finger, R Ezzell, E Sackmann, und PA Janmey. F-actin, a model polymer for semiflexible chains in dilute, semidilute, and liquid crystalline solutions. *Biophys J*, 70(2):609–25, Feb 1996. [1.2.4.1](#)

- Marcus Tempel, Gerhard Isenberg, und Erich Sackmann. Temperature-induced sol-gel transition and microgel formation in α -actinin cross-linked actin networks: A rheological study. *Phys. Rev. E*, 54(2):1802–1810, 1996. [2.1](#), [7](#)
- J. Howard. The movement of kinesin along microtubules. *Annu. Rev. Physiol.*, 58:703–29, 1996. Review. [1.2.2](#)
- Hatsumi Nakazawa und Ken Sekimoto. Polarity sorting in a bundle of actin filaments by two-headed myosins. *J. Phys. Soc. Jpn.*, 65(8):2404–2407, August 1996. doi: 10.1143/JPSJ.65.2404. [4.4.1](#)
- Jan Wilhelm und Erwin Frey. Radial distribution function of semiflexible polymers. *Phys. Rev. Lett.*, 77(12):2581–2584, 1996. [2.1](#)
- Frank G. Schmidt, Florian Ziemann, und Erich Sackmann. Shear field mapping in actin networks by using magnetic tweezers. *Eur. Biophys. J.*, 24:348–353, 1996. [1.3](#)
- F. Amblard, A. C. Maggs, B. Yurke, A. N. Pargellis, , und S. Leibler. Subdiffusion and anomalous local viscoelasticity in actin networks. *Phys. Rev. Lett.*, 77:44704473, 1996. doi: 10.1103/PhysRevLett.77.4470. URL <http://link.aps.org/abstract/PRL/v77/p4470>. [2.1.1](#), [5.1.1](#), [5.2.2.2](#), [5.2.2.2](#), [1](#)
- T M Svitkina, A B Verkhovskiy, K M McQuade, und G G Borisy. Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol*, 139(2):397–415, Oct 1997. [1.1](#)
- M.A. Dichtl. Anwendung kolloidaler Sonden zur Untersuchung der Reptation von Aktinfilamenten. Master’s thesis, TUM München, 1997. [5.2.2.2](#)
- L.D. Burtnick, E.K. Koepf, J. Grimes, E.Y. Jones, D.I. Stuart, P.J McLaughlin, und R.C Robinson. The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell.*, 90(4):661–670, Aug 1997. [1.2.3](#)
- A.D. Mehta, J.T. Finer, und J.A. Spudich. Detection of single-molecule interactions using correlated thermal diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(15):7927–7931, Jul. 1997. [1.2.2](#)
- B. Schnurr, F. Gittes, F. C. MacKintosh, und C. F. Schmidt. Determining microscopic viscoelasticity in flexible and semiflexible polymer networks from thermal fluctuations. *Macromolecules*, 30:7781–7792, 1997. [5.1.1](#), [5.2.2.2](#)
- R. Granek. From semi-flexible polymers to membranes:anomalous diffusion and reptation. *J.Phys.II France*, 7:1761–1788, 1997. [2.1](#)
- J Howard. Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. *Nature*, 389(6651):561–7, Oct 1997. [4.4.1](#), [4.4.2](#), [4.4.3](#), [4.4.3](#)
- F. Ziemann. *Untersuchungen der lokalen viskoelastischen Eigenschaften von Zellen und Zellmodellen mit einem Magnetkugel-Mikrorheometer*. PhD thesis, Technische Universität München / Physikdepartment, 1997. [1.3.5](#), [2.1.2](#), [3.0.1](#), [5.2.2.1](#), [5.4.1.2](#)
- F. Gittes und F. C. MacKintosh. Dynamic shear modulus of a semiflexible polymer network. *Phys. Rev. E*, 58(2):1241R1244, August 1998. doi: 10.1103/PhysRevE.58.R1241. URL <http://link.aps.org/abstract/PRE/v58/pR1241>. [2.1.1](#), [5.2.2.2](#), [1](#)
- Bernard Hinner, Markus Tempel, Erich Sackmann, Klaus Kroy, und erwin Frey. Entanglement, elasticity, and viscous relaxation of actin solutions. *Phys. Rev. Lett.*, 81(12):2614–2617, 1998. [2.1](#), [5.1.1](#), [5.2.2.2](#), [5.2.2.2](#), [5.2.2.2](#), [5.6](#)
- A.C. Maggs. Micro-bead mechanics with actin filaments. *Phys. Rev. E*, 57:2091–2094, 1998. [5.2.2.2](#)
- David C. Morse. Viscoelasticity of concentrated isotropic solutions of semiflexible polymers. 1. linear response. *Macromolecules*, 31:7044–7067, 1998a. [2.1](#), [5.1.1](#)

- David C. Morse. Viscoelasticity of concentrated isotropic solutions of semiflexible polymers. 1. model and stress tensor. *Macromolecules*, 31:7030–7043, 1998b. [5.1.1](#)
- D.C. Morse. Viscoelasticity of tightly entangled solutions of semiflexible polymers. *Phys. Rev. E*, 58(2):R1237R1240, Aug 1998c. [2.1.1](#), [5.1.1](#), [5.2.2.2](#), [5.6](#), [5.2.2.2](#), [5.2.2.2](#), [1](#)
- K. Kroy. *Viskoelastizität von Lösungen halbsteifer Polymere*. PhD thesis, Technische Universität München / Physikdepartment, München, 1998. [2.1](#)
- I. Papa, C. Astier, O. Kwiatek, F. Raynaud, C. Bonnal, M.C. Lebart, C. Roustan, and Y. Benyamin. Alpha actinin-capz, an anchoring complex for thin filaments in z-line. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.*, 20(2):187–97, Feb 1999. [2](#)
- M.A. Dichtl und E. Sackmann. Colloidal probe study of short time local and long time reptational motion of semiflexible macromolecules in entangled networks. *New J. Phys.* (<http://www.njp.org>), 1:18.1–18.11, 1999. [1.3](#), [5.1.1](#), [5.2.2.2](#), [5.2.2.2](#), [5.2.2.2](#), [5.4.1.1](#), [5.6](#)
- R. Everaers, F. Jülicher, A. Ajdari, und A.C. Maggs. Dynamic fluctuations of semiflexible filaments. *Phys. Rev. Lett.*, 82:3717–3720, 1999. [2.1](#)
- Andreas R. Bausch, Winfried Möller, und Erich Sackmann. Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophys. J.*, 76:573–579, 1999. [1.3](#)
- A.R. Bausch. *Mikromechanische Untersuchung des Zytoplasmas, der Zellmembran und der Adhäsion mittels Magnetischer Pinzetten*. PhD thesis, Technische Universität München / Physikdepartment, 1999. [1.3](#)
- F.G. Schmidt. *Mikrorheologie von Netzwerken semiflexibler Biopolymere*. PhD thesis, Technische Universität München / Physikdepartment, 1999. ([document](#)), [1](#), [5.2.1](#), [5.2.2.1](#), [5.4.1.2](#), [5.15](#)
- T. Gisler und D. A. Weitz. Scaling of the microrheology of semidilute f-actin solutions. *Phys. Rev. Lett.*, 82(7):1606–1609, 1999. [5.1.1](#), [5.2.2.2](#)
- M.J. Tyska, D.E. Dupuis, W.H. Guilford, J.B. Patlak, G.S. Waller, K.M. Trybus, D.M. Warshaw, und S. Lowey. Two heads of myosin are better than one for generating force and motion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:44024407, 1999. [1.2.2](#)
- E. G. Yarmola, T. Somasundaram, T. A. Boring, I. Spector, und M. R. Bubb. Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J Biol Chem*, 275(36):28120–28127, Sep 2000. [1.1](#)
- K Kruse und F Jlicher. Actively contracting bundles of polar filaments. *Phys Rev Lett*, 85(8):1778–81, Aug 2000. [4.4.1](#)
- T. Sakamoto, I. Amitani, E. Yokota, und T. Ando. Direct observation of processive movement by individual myosin V molecules. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 272(2):586–590, 2000. [1.2.2](#)
- Charbel Haber und Denis Wirtz. Magnetic tweezers for dna micromanipulation. *Rev. Sci. Inst.*, 71(12):4561–4570, 2000. [1.3](#)
- Frank G. Schmidt, Bernhard Hinner, und Erich Sackmann. Microrheometry underestimates the values of the viscoelastic moduli in measurements on f-actin solutions compared to macrorheometry. *Phys. Rev. E*, 61(5):5646–5652, 2000. [5.1.1](#), [5.2.2.2](#), [5.2.2.2](#), [5.2.2.2](#)
- T.G. Mason, T. Gisler, K. Kroy, E. Frey, und D.A. Weitz. Rheology of f-actin solutions determined from thermally driven tracer motion. *J. Rheol.*, 44(4):917–927, 2000. [5.1.1](#), [5.2.2.2](#), [3](#), [5.2.2.2](#)
- Erwin Frey. Actin as modell system for polymer physics. 2001. [2.1.1](#), [5.2.2.2](#), [1](#)
- Yunkang Liu. Calculation of discrete relaxation modulus and creep compliance in rheology. NA 13, Cambridge Numerical Analysis Group, 2001a. ([document](#)), [2.1.1](#)

- Yunkang Liu. A direct method for obtaining discrete relaxation spectra from creep data. *Rheol. Acta.*, 40(3):256–260, May 2001b. (document), 2.1.1
- C. Maier. *Entwicklung einer neuen mikromechanischen Methode zur Messung der Biegesteifigkeit von einzelnen Mikrotubuli*. PhD thesis, Technische Universität München / Physikdepartment, 2001. 2.1
- Jonathon Howard. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, USA, 2001. 1.1, 1.2.2, C.0.2.2
- M.A. Dichtl. *Moleküldynamik und Mikrorheologie von Biopolymernetzwerken: Eine Untersuchung mit kolloidalen Sonden*. PhD thesis, Technische Universität München / Physikdepartment, 2001. 1.3.2, 2.1, 6
- M. Keller, J. Schilling, und E. Sackmann. Oscillatory magnetic bead rheometer for complex fluid microrheometry. *Rev. Sci. Inst.*, 72(9):3626–3634, 2001a. 1.3.1
- M. Keller, J. Schilling, und E. Sackmann. Oscillatory magnetic bead rheometer for complex fluid microrheometry. *Review of Scientific Instruments*, 72(9):3626–3634, September 2001b. 5.2.2.2, 5.2.2.2
- D.J. Bicout und T.W. Burkhardt. Simulation of a semiflexible polymer in a narrow cylindrical pore. *J. Phys. A*, 34:5745–5750, July 2001. doi: 10.1088/0305-4470/34/29/301. URL stacks.iop.org/0305-4470/34/5745. 5.5
- W. Feneberg, M. Westphal, und E. Sackmann. *Dictyostelium* cells’ cytoplasm as an active viscoplastic body. *Eur. Biophys. J.*, 30(4):284–294, 2001. 1.3, 5.1.1
- David C. Morse. Tube diameter in tightly entangled solutions of semiflexible polymers. *Phys. Rev. E*, 63:031502–1–031502–22, 2001. 5.1.1
- T.B. Liverpool, A.C. Maggs, und A. Ajdari. Viscoelasticity of solutions of motile polymers. *Phys. Rev. E*, 86(18):4171–4174, 2001. 4.3.1
- D Humphrey, C Duggan, D Saha, D Smith, und J Ks. Active fluidization of polymer networks through molecular motors. *Nature*, 416(6879):413–6, Mar 2002. 4.3.1, 4.4.1
- M.A. Dichtl und E. Sackmann. Microrheometry of semiflexible actin networks through enforced single-filament reptation: frictional coupling and heterogeneities in entangled networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99(10):6533–6538, 2002. 1.3
- L. Le Goff, F. Amblard, und E.M. Furst. Motor driven dynamics in actin-myosin networks. *Phys. Rev. Lett.*, 88(1):018101, 2002. Epub 2001 Dec 14. 4.3.1
- M. Keller. *Aktive und passive Aktin-Myosin-Netzwerke*. PhD thesis, Technische Universität München / Physikdepartment, 2003. 1.2.4.3, 1.3, 4.2.1, 4.3.3, C
- S.H. Leuba, M.A. Karymov, M. Tomschik, R. Ramjit, P. Smith, und J. Zlatanova. Assembly of single chromatin fibers depends on the tension in the dna molecule: magnetic tweezers study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100(2):495–500, 2003. Epub 2003 Jan 09. 1.3
- Günther Gerisch (URL). Cell motility: videos. <http://www.biochem.mpg.de/gerisch/home.htm>, 2003. 1.2
- Jörg Schilling. *Entwicklung einer schnellen digitalen Bildverarbeitungstechnik und einer interferometrischen 2λ Mikroskopietechnik: Anwendung in der Zell-Biophysik*. PhD thesis, Technische Universität München / Physikdepartment, 2003. 1.3.1, 1.3.5, 5.4.1.1
- James L McGrath, Narat J Eungdamrong, Charles I Fisher, Fay Peng, Lakshminarayanan Mahadevan, Timothy J Mitchison, und Scot C Kuo. The force-velocity relationship for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *Curr Biol*, 13(4):329–32, Feb 2003. 5.1.1

- S. Gönnenwein. *Generic and Specic Cell Adhesion: Investigations of a Model System by Micro-Interferometry*. PhD thesis, Technische Universität München / Physikdepartment, 2003. [2.3](#)
- Univ. Vermont (URL). In vitro motility assay. <http://physiology.med.uvm.edu/warshaw/TechspgInVitro.html>, 2003. [1.12](#)
- J. Uhde, M. Keller, E. Sackmann, A. Parmeggiani, und E. Frey. Internal motility in stiffening actin-myosin networks. *Eingereicht Phys. Rev. Lett.*, 2003. [1.3](#), [4](#)
- Zeiss (URL). Mikroskopie/Zubehör und Kameras/Filtersätze. <http://www.zeiss.com>, 2003. [1.3.1](#)
- A. Yildiz, J.N. Forkey, S.A. McKinney, T. Ha, Y.E. Goldman, und P.R. Selvin. Myosin v walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, 300(5628):2061–2065, Jun 2003. [1.2.2](#)
- Souvrit Sra (URL). Non negative least squares (nnls). <http://www.cs.utexas.edu/users/suvrit/work/progs/nnls.html>, 2003. [B](#)
- Lawson and Hanson (URL). Non negative least squares (nnls). <http://www.netlib.org/lawson-hanson/all>, 2003. [B](#)
- Sandia National Laboratories (URL). Non negative least squares (nnls). http://software.sandia.gov/appspack/nnls_8c-source.html, 2003. [B](#)
- J. Uhde, W. Feneberg, E. Sackmann, und A. Boulbitch. Osmotic resistance during the magnetic bead microrheometry in entangled actin networks. *Eingereicht Phys. Rev. Lett.*, 2003. [2.2](#), [5.4.2](#)
- PDB (URL). Research collaboratory for structural bioinformatics. <http://www.rcsb.org/pdb/index.html>, 2003. [1.4](#), [1.9](#)
- Manfred Keller, Rainer Tharmann, Marius A. Dichtl, Andreas R. Bausch, und Erich Sackmann. Slow filament dynamics and viscoelasticity in entangled and active actin networks. *Review. Submitted to Royal Society*, 2003. [5.2.1](#)
- S Vorobiev, B Strokopytov, DG Drubin, C Frieden, S Ono, J Condeelis, PA Rubenstein, und SC Almo. The structure of nonvertebrate actin: implications for the ATP hydrolytic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10):5760–5, May 2003. [1.4](#)
- W. Feneberg. *Viskoelastische Mikroskopie der Zellhülle von humanen Endothelzellen*. PhD thesis, Technische Universität München / Physikdepartment, 2003. [1.1](#), [2.1.1](#), [2.3](#), [5.2.1](#), [5.2.1.1](#), [2](#)
- N. Ter-Organessian und A. Boulbitch. Osmotic resistive force in microrheological measurements. *Unveröffentlicht*, 2004. [2.2](#), [2.2.2](#)

Danksagung

Mein Dank gilt ...

- ... Prof. Sackmann für die geduldige Betreuung meiner Arbeit und für die Freiheit die er mir für meine Forschung gewährt hat
- ... A. Boulbitch für seinen großartigen theoretischen Beitrag zu meiner Arbeit und die unermüdliche Hilfe in theoretischen Fragen
- ... N. Ter-Organessian für die beeindruckende Simulation des von mir untersuchten Systems
- ... Prof. A. Bausch und Prof. M. Rief für die professionelle „Ersatzbetreuung“ bzw. für die Unterstützung bei der Prüfung
- ... Manfred Keller nicht nur für die hervorragenden gemeinsamen Experimente zum Flitzer Phänomen, sondern auch für schöne Bergbegleitung, ob geklettert oder gewandert
- ... Monika Rusp, Hulda Kirpal und dem Rest der BioChem-Crew für Präparationen und Hilfsbereitschaft in allen Belangen
- ... Ana Smith und Dr. Wolfgang Feneberg für diverse verratschte Kaffeepausen aber besonders auch für diverse hilfreiche und tiefe Diskussionen über fachliche Fragen.
- ... Rainer Tharmann und Bernd Wagner für den Brückenschlag zur Makrorheometrie (Danke für eure Daten!)
- ... Kathrin Prechtel, Dr. Barbara Lorz, Christian Daniel, Felix Linke und der ganze E22-Rasselbande für Diskussionen, neun-Uhr-Dreißig-Kaffee spontane Grillfeiern, Praktikumbier (special thanks to Motomu's group!), Resiwirt und was sonst noch die tolle Atmosphäre an unseren Lehrstuhl ausmacht
- ... nicht zuletzt Rudi Lehrhuber (Werkstatt) und Claudine Völker (Sekretariat) ohne die meine Promotion auch nicht möglich gewesen wäre

Im speziellen gilt mein Dank den Menschen, die ich liebe:

- ... Meinen Freunden aus München, dem Rest von Deutschland und auch aus der Schweiz, bei denen ich mich in letzter Zeit ach so selten gemeldet habe, die mich aber trotzdem nicht aufgegeben haben, die mit mir in den Urlaub fahren, mich besuchen oder sich von mir besuchen lassen. Kurz: Bei denen ich mich einfach aufgehoben fühle.
- ... Meinen Eltern und meine drei Schwestern, die alle immer an mich geglaubt haben und ertragen mussten, dass ich mich am Ende nur noch etwa alle 6 Monate habe Zuhause blicken lassen
- ... und natürlich meiner Partnerin Sabine, die mich jeden Tag ertragen muss(te) und die mir trotzdem die beste Unterstützung zukommen ließ(lässt), die möglich ist. Danke! Ich liebe Dich!