

---

# Untersuchung mechanischer und dynamischer Eigenschaften von polymerisierten Aktinlösungen

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Inka Lauter**  
aus  
**Lüneburg**

Bonn 2011

---

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck

Tag der Promotion: 06. Juli 2011

Erscheinungsjahr: 2011

*Für meine Eltern  
Rüdiger und Elvira Lauter*



**Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:**

J. Glaser, D. Chakraborty, K. Kroy, &

I. Lauter, M. Degawa, N. Kirchgeßner, B. Hoffmann, R. Merkel, M. Giesen  
*Tube Width Fluctuations in F-Actin Solutions*, Phys. Rev. Lett. **105**, 037801 (2010)



# Zusammenfassung

Aktin ist ein wesentlicher Bestandteil in nahezu allen eukaryotischen Zellen. Neben der Relevanz der Erforschung der physikalischen Eigenschaften von Aktinpolymeren bezüglich biologischer Fragestellungen, ist *in vitro* polymerisiertes Aktin darüber hinaus auch ein sehr gutes Modellsystem, um die Eigenschaften von semiflexiblen Polymeren im Hinblick auf Gleichgewichts- und Nichtgleichgewichtsphänomene zu untersuchen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den topologischen und dynamischen Eigenschaften semiflexibler Aktinfilamente in ungestörten sowie in gescherten Aktinlösungen. Die Untersuchungen erfolgen mittels konfokaler fluoreszenzmikroskopischer Messtechniken.

Ein theoretisches Konzept zur Beschreibung der dynamischen Eigenschaften einzelner Polymere in einer Polymerlösung ist das Röhrenmodell. In diesem phänomenologischen Modell wird der Raum, innerhalb dessen ein Filament aufgrund seiner thermischen Energie fluktuiert, durch die topologischen Einschränkungen der benachbarten Filamente beschrieben und besitzt näherungsweise eine röhrenartige Form.

Während bisherige theoretische Modelle zur Beschreibung semiflexibler Polymere in erster Näherung von einem konstanten Röhrenradius ausgehen, zeigen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente, dass die Röhrenradien vielmehr heterogen entlang der Filamentkontur verteilt sind. Basierend auf den experimentell gemessenen Häufigkeitsverteilungen wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kroy (Universität Leipzig) zusätzlich erstmalig die Form der Verteilung der Röhrenradien als Funktion der Aktinkonzentration mit der sogenannten *Segment-Fluid*-Theorie beschrieben. Darüber hinaus genügen die experimentell bestimmten mittleren Röhrenradien dem von der Theorie vorhergesagtem Skalengesetz. Außerdem wird gezeigt, dass die Abklinglänge der Autokorrelation der Röhrenradien entlang der Filamentkontur sowie die *entanglement*-Länge, welche die mittlere Distanz zwischen Kollisionspartnern der Röhren beschreibt, dem gleichen Skalengesetz genügen.

Verschiedene Experimente an rein physikalisch vernetzten F-Aktinlösungen haben gezeigt, dass F-Aktinlösungen in bestimmten Konzentrationsbereichen viskoelastische Eigenschaften aufweisen. Um zu verstehen, welche Rolle mikroskopische Mechanismen für die makroskopische Eigenschaft der Viskoelastizität spielen, wird in dieser Arbeit ein weiteres Experiment vorgestellt, bei dem polymerisierte Aktinlösungen unter dem Einfluss einer Scherung untersucht werden. Hierzu wurde eine Konus-Platte-Scherkammer mit einem inversen konfokalen Fluoreszenzmikroskop kombiniert und die mikroskopisch zugänglichen Parameter, wie Orientierung, Kon-

turlängen und Krümmungen von Filamenten, analysiert.

Die Experimente zeigen, dass die Häufigkeitsverteilung von Filamentkrümmungen einen exponentiellen Abfall zu höheren Filamentkrümmungen aufweist. In einem Konzentrationsbereich von 0.02 bis 0.15 mg/ml nimmt die Ausprägung des exponentiellen Abfalls mit steigender Konzentration deutlich zu, zeigt jedoch bis zu einem bestimmten Bereich keine signifikante Abhängigkeit von der Scheramplitude. Darüber hinaus zeigt sich, dass die mittlere Länge von Filamenten in Aktinlösungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 0.02 bis 0.3 mg/ml selbst bei sehr hohen Scheramplituden erhalten bleibt, dafür aber die Wahrscheinlichkeit für stark gekrümmte und verschlaufte Filamentkonformationen zunimmt, welche in Aktinlösungen im thermischen und dynamischen Gleichgewicht aufgrund der intrinsischen Biegesteifigkeit von semiflexiblen Filamenten sehr unwahrscheinlich sind.

Die erstmalig gemessene Häufigkeitsverteilung der Röhrenradien in F-Aktinlösungen liefert eine mögliche Erklärung bezüglich Fragestellungen in der Mikrorheologie. Darüber hinaus leisten die Ergebnisse dieser Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der makroskopischen Eigenschaft der Viskoelastizität von polymerisierten Aktinlösungen und demonstrieren, dass die Kombination aus Scherkammer und der Technik der konfokalen Mikroskopie eine hervorragende Möglichkeit darstellt Prozesse auf mikroskopischer Ebene zu beobachten.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Grundlegende Eigenschaften des Proteins Aktin . . . . .	3
1.2	F-Aktin als Modellsystem für semiflexible Polymere . . . . .	6
1.2.1	Das <i>Worm-Like-Chain</i> (WLC)-Modell . . . . .	8
1.2.2	Das Röhrenmodell . . . . .	9
1.2.3	Die <i>Segment-Fluid</i> -Theorie . . . . .	12
1.2.4	Lösungen semiflexibler Polymere . . . . .	14
1.2.5	Viskoelastische Eigenschaften von Biopolymerlösungen . . . . .	16
1.3	Ziele dieser Arbeit . . . . .	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	23
2.1.1	Konfokales Einzel-Lochblenden-System . . . . .	26
2.1.2	Konfokales Vielfach-Lochblenden-System . . . . .	26
2.1.3	Die Punktspreizfunktion (PSF) der abbildenden Systeme . . . . .	28
2.2	Scherkammer . . . . .	30
2.2.1	Kalibrierung der Scherkammer . . . . .	32
2.3	Aktinaufreinigung aus Kaninchenmuskelfleisch . . . . .	35
2.4	Experiment zur Bestimmung der Röhrenradien in F-Aktinlösungen . . . . .	38
2.4.1	Probenpräparation . . . . .	39
2.4.2	Mikroskopie . . . . .	40
2.4.3	Datenanalyse . . . . .	41
2.5	Polymerlösungen unter Scherung . . . . .	46
2.5.1	Probenpräparation . . . . .	46
2.5.2	Mikroskopie und Scherprotokoll . . . . .	47
2.5.3	Datenanalyse . . . . .	49
<b>3</b>	<b>Verteilung der Röhrenradien in F-Aktinlösungen</b>	<b>55</b>
3.1	Ergebnisse . . . . .	55
3.1.1	Häufigkeitsverteilung von Röhrenradien . . . . .	55
3.1.2	Die Linienspreizfunktion (LSM) des abbildenden Systems . . . . .	59
3.1.3	Vergleich Theorie und Experiment . . . . .	63
3.1.4	Mittelwerte der Röhrenradien . . . . .	63
3.1.5	Autokorrelation der Röhrenradien . . . . .	64
3.2	Diskussion . . . . .	66
<b>4</b>	<b>Polymerlösungen unter Scherung</b>	<b>71</b>
4.1	Ergebnisse . . . . .	71
4.1.1	Analyse der verdünnten Aktinlösung . . . . .	73

---

4.1.2	Orientierung der Filamente . . . . .	77
4.1.3	Konturlängen und normierter End-zu-End-Abstand . . . . .	81
4.1.4	Häufigkeitsverteilung von Filamentkrümmungen . . . . .	84
4.2	Diskussion . . . . .	89
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>95</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>99</b>
A.1	Liste der verwendeten Materialien und Chemikalien . . . . .	100
A.2	Zusammensetzung und pH-Werte der verwendeten Pufferlösungen . .	102
A.3	Kontrollexperimente . . . . .	103
	<b>Danksagung</b>	<b>106</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>

# 1. Einleitung

Lebende Zellen haben bemerkenswerte mechanische und dynamische Eigenschaften. Sie können nicht nur ihre Form innerhalb kurzer Zeit ändern, sondern auch hohen Deformationen standhalten. Beides wird durch das Zytoskelett ermöglicht, einem hochkomplexen System aus Biopolymeren unterschiedlicher Längen und Steifigkeiten und einer Vielzahl von vernetzenden Proteinen.

In Abbildung 1.1 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Zytoskeletts eines kardialen Fibroblasten gezeigt. In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass das Zytoskelett aus Faserbündeln und netzartigen Strukturen besteht. Im Wesentlichen werden diese Strukturen aus drei Komponenten gebildet: Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und filamentösem Aktin. Bei diesen Komponenten handelt es sich um Biopolymere, welche aus kleineren Untereinheiten (monomere Proteine) zu Filamenten polymerisieren. Die Dynamik der einzelnen Komponenten beeinflusst die Gesamtdynamik der Zelle [1]. Aus diesem Grund haben diese Strukturen einen entscheidenden Einfluss z.B. auf Zellmigration, Muskelkontraktion oder auch auf Zellteilung. Mikrotubuli und filamentöses Aktin tragen dabei den größten Anteil zur Widerstandsfähigkeit und Flexibilität der Zelle bei [2]. Um die komplexen kollektiven Eigenschaften dieser Strukturen zu verstehen, ist es von wesentlicher Bedeutung, die zugrundeliegenden physikalischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten zu untersuchen. In Abbildung 1.2 ist eine Zelle gezeigt, in der gezielt das Protein Aktin für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (Kapitel 2.1) markiert wurde. In dieser Aufnahme ist zu erkennen, dass ein Großteil der Faserbündel und netzar-

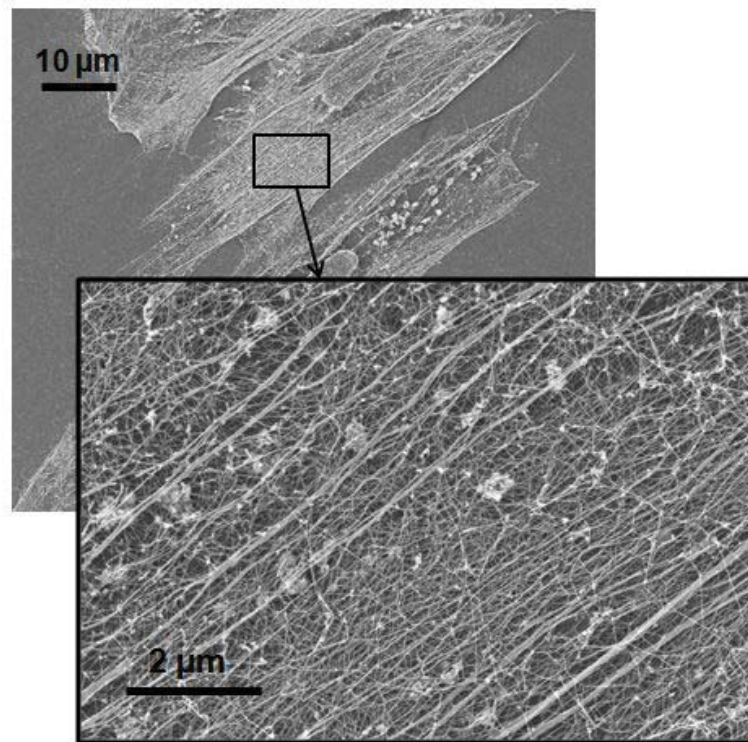


Abbildung 1.1: Raster-Elektronen-Mikroskopie-Aufnahme eines kardialen Fibroblasten (Herzbindegewebszelle). Die vergrößerte Darstellung zeigt netzartige Strukturen und Faserbündel im Zytoskelett. (Thorsten Jonas, ISC-7)

tigen Strukturen, welche auch in Abb. 1.1 zu sehen sind, durch das Protein Aktin gebildet werden. Aktin spielt eine aktive und zentrale Rolle in der Kraftübertragung [3] und Krafterzeugung [4] in Zellen. Um die komplexen Eigenschaften hinter dieser Kraftübertragung zu untersuchen, bedarf es eines gut kontrollierbaren Modellsystems zu denen *in vitro* polymerisiertes Aktin zählt [5, 6]. Modellsysteme sind ein wesentlicher Bestandteil der Biophysik, da sie über die Eingrenzung des Parameter-raums, wie z.B. Proteinkonzentration, Anzahl an kreuzvernetzenden Proteinen sowie Temperatur, eine Überprüfung mathematischer Modelle zur Beschreibung der physikalischen Eigenschaften von Zellen und Zellkomponenten ermöglichen. Sie tragen so zur Weiterentwicklung mathematischer Modelle und zum Verständnis biologischer Systeme bei. Neben der Anwendung als Modellsystem in der Biophysik ist reines, *in vitro* polymerisiertes Aktin darüber hinaus ein ideales Modellsystem für die Klärung von Fragestellungen in der Polymer- und Nichtgleichgewichtsphysik [7].

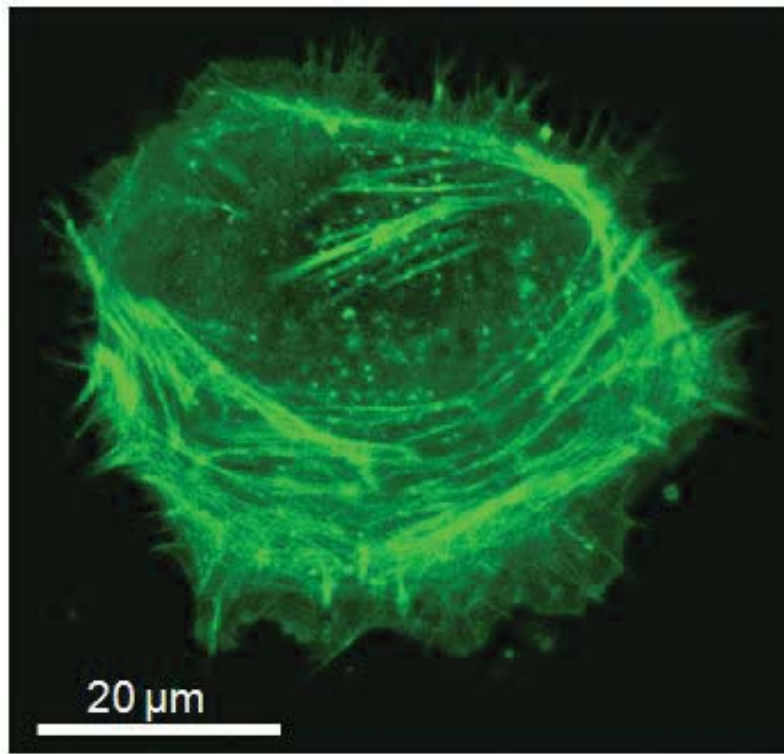


Abbildung 1.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer lebenden Keratinozyte (Hornbildende Zelle in der Epidermis). Lebendzellfärbung des Aktin-Zytoskeletts mit Grünfluoreszierendem-Protein (GFP). (Claudia Schäfer, ICS-7)

## 1.1 Grundlegende Eigenschaften des Proteins Aktin

Aktin ist ein Strukturprotein, welches in nahezu allen eukaryotischen Zellen enthalten ist. Die Genfamilie ist hochkonserviert [8]. Dies bedeutet, dass sich die Aminosäuresequenz im Verlauf der Evolution nur sehr wenig verändert hat. In dieser Arbeit wurde  $\beta$ -Aktin (aus Kaninchen) untersucht. Das einzelne Aktin-Molekül dieser Isoform besteht aus 375 Aminosäuren<sup>1</sup> und hat eine Molekülmasse von 42 kDa<sup>2</sup>. Unter niederionischen Pufferbedingungen liegt Aktin globulär vor [9, 10] und wird in dieser Form als G-Aktin bezeichnet. Physiologische Pufferbedingungen und Zufuhr von chemischer Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) führt zur Poly-

<sup>1</sup>NCBI Referenz Sequence: NP\_001095153.1; Die Anzahl der Aminosäuren kann bei anderen Isoformen leicht abweichen.

<sup>2</sup>Die Einheit kDa ist eine Abkürzung für 'kilo Dalton'. 'Dalton' ist eine unter anderem in der Biochemie gebräuchliche Masseneinheit und entspricht der atomaren Masseneinheit  $u$ :  $1 Da = 1 u = 1.66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ .

merisation von G-Aktin zu filamentösem Aktin, welches in dieser Form als F-Aktin bezeichnet wird [11]. Bei dem Prozess der Polymerisation lagern sich die Proteine über nicht kovalente Bindungen leicht versetzt an, so dass Filamente mit einer helikalen Struktur (Ganghöhe 36 nm) [12] und einem Durchmesser von 8 nm [13] entstehen.

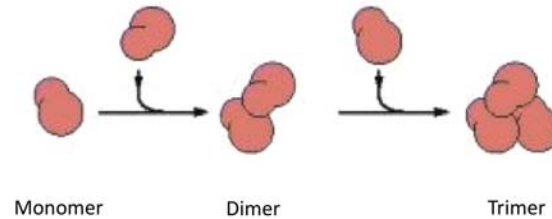


Abbildung 1.3: Dargestellt ist die Keimbildung aus Aktin-Monomeren. Zunächst bildet sich ein schwach gebundenes Dimer, welches durch Bindung eines weiteren Monomers einen stabilen Keim bildet. Verändert nach [1].

Wird die Salzkonzentration erhöht, kommt es über einen statistisch dominierten Prozess zu einer Bindung von Monomeren. Hierbei ist die Bindung von zwei Monomeren (Dimer) relativ schwach. Bildet sich ein (Trimer) (Abb. 1.3), also ein Komplex bestehend aus drei Monomeren, ist die Bindung hingegen relativ stabil [1]. Ist ein sogenannter Keim, bestehend aus drei oder mehr Monomeren (Oligomer), gebildet, kommt es, ebenfalls über einen statistisch dominierten Prozess, zur weiteren Anlage von Monomeren. Die Wahrscheinlichkeit mit der ein Monomer angelagert wird ist hierbei über die Geschwindigkeitskonstante  $k_{on}$  [Einheit:  $M^{-1}s^{-1}$ ] gegeben. Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Monomer wieder abgebaut wird, wird durch  $k_{off}$  [Einheit:  $s^{-1}$ ] bestimmt [1]:



Die Anzahl  $n$  der Monomere, welche an das Polymer angebaut werden, ist proportional zu der Konzentration der in der Aktinlösung befindlichen freien Monomere  $c_M$ . Die Zahl der Monomere, welche wieder abgebaut werden, ist hingegen unabhängig

von  $c_M$ . Daraus folgt, dass sowohl der Prozess der Verlängerung als auch des Abbaus unabhängig von der Größe der Oligomere ist [14]. Eine räumliche Ausrichtung der Monomere und deren asymmetrische Struktur lässt zwei unterschiedliche Enden entstehen: Am sogenannten (+)-Ende des Filaments läuft die Polymerisation schneller ab [15, 16], wohingegen der Abbauprozess am (-)-Ende dominiert (Abb. 1.4). Dieser Nukleations-Verlängerungs-Prozess wurde zuerst durch Oosawa und Kasai [17] theoretisch beschrieben.

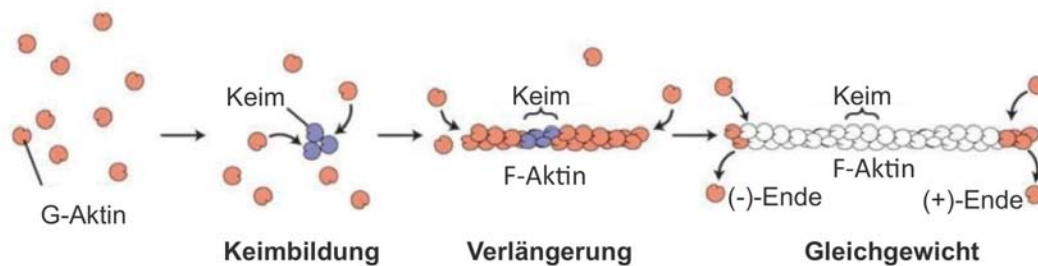


Abbildung 1.4: Darstellung des Polymerisationsprozesses von globulärem zu filamentösem Aktin. Zunächst bilden sich Polymerisationskeime aus mindestens drei Monomeren, welche dann an beiden Seiten verlängert werden. Wenn ein Gleichgewicht erreicht ist, werden am (+)-Ende genauso viele Monomere angebaut, wie am (-)-Ende abgebaut werden, wobei die mittlere Länge des Polymers erhalten bleibt. Verändert nach [18].

Während der Verlängerung der Polymere wird die Zahl der freien Monomere  $c_M$  reduziert bis schließlich eine kritische Monomer-Konzentration  $c_k$  erreicht ist. Bei dieser Konzentration sind der Verlängerungs- und der Abbauprozess im Gleichgewicht [1]:

$$k_{on}[M^{-1}s^{-1}] \cdot c_M[M] = k_{off}[s^{-1}] \quad (1.2)$$

Es findet ein sogenannter *treadmilling*-Prozess statt [19], bei dem Filamente am (-)-Ende abgebaut und gleichzeitig am (+)-Ende verlängert werden, wobei die mittlere Länge des Filaments erhalten bleibt. Bei der Polymerisation entstehen Filamente unterschiedlicher Längen. *In vitro* beträgt die mittlere Filamentlänge durchschnittlich  $22 \mu\text{m}$  [20].

Obwohl Aktin schon seit Jahrzehnten bekannt ist, ist die genaue atomare Struktur bisher noch immer ungeklärt. Die aktuelle Forschung lässt vermuten, dass G-Aktin

nicht nur mit einem einzigen atomaren Modell beschrieben werden kann, sondern eher als ein Ensemble aus verschiedenen Zuständen betrachtet werden muss [21], was wiederum Fragestellungen bezüglich der Struktur von F-Aktin beantworten kann [22].

## 1.2 F-Aktin als Modellsystem für semiflexible Polymere

In Abbildung 1.5 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines einzelnen Aktin-Filaments zu verschiedenen Zeitpunkten (Die Nummerierung 0 – 5 spiegelt die zeitliche Reihenfolge wider.) dargestellt. Im ersten Bild sieht man eine deutliche Krümmung der Kontur in etwa der Mitte des Filaments. Im zweiten Bild erkennt man eine Reduzierung der Krümmung, welche im Laufe der weiteren Bilder wieder deutlicher wird. Das Filament fluktuiert demnach über die Zeit.

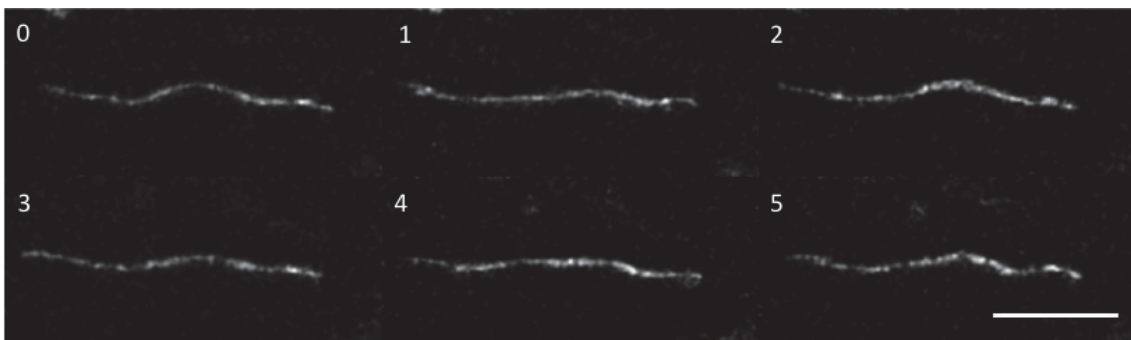


Abbildung 1.5: Zweidimensionale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (LSM 510 meta, Zeiss; Kapitel 2.1.1) eines einzelnen Aktin-Filaments (Lösungskonzentration 0.4 mg/ml) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Nummerierung spiegelt die zeitliche Reihenfolge wider. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

Die Konformationsdynamik des filamentösen Aktins hängt von verschiedenen Parametern, wie unter anderem der Steifigkeit des Filaments als auch von der Entropie, ab. Ein Maß für die Steifigkeit von Polymeren ist die Persistenzlänge. Sie wird definiert über die Korrelationsfunktion der Richtungstangenten an die Filamentkontur der Länge  $L$ . Die Kontur kann über eine kontinuierliche Raumkurve  $\mathbf{r}(s)$  dargestellt werden, wie sie in Abbildung 1.6 gezeigt ist. Die Kurve ist durch die Bogenlänge  $s$



parametrisiert. Mit den Richtungstangenten  $\mathbf{t}(s) = \partial \mathbf{r} / \partial s$  entlang der Kurve ergibt sich die Persistenzlänge  $l_p$ :

$$\langle \mathbf{t}(s) \cdot \mathbf{t}(s+l) \rangle = \langle \cos(\vartheta(l)) \rangle = \exp\left(-\frac{l}{l_p}\right) \quad (1.3)$$

Je nach Größe von  $l_p$  klassifiziert man Polymere in unterschiedliche Steifigkeitsbereiche (Abb. 1.7): Ist  $l_p \ll L$ , bezeichnet man die Filamente als flexibel, da die Korrelation der Tangenten entlang des Filaments schon auf kurzen Distanzen verschwindet. Ist  $l_p \gg L$ , sind die Filamente steif. Die Korrelation bleibt entlang der gesamten Konturlänge erhalten. Für den intermediären Fall  $l_p \sim L$  werden die Filamente als semiflexibel bezeichnet. Sie weisen sowohl Eigenschaften von flexiblen als auch von steifen Filamenten auf.

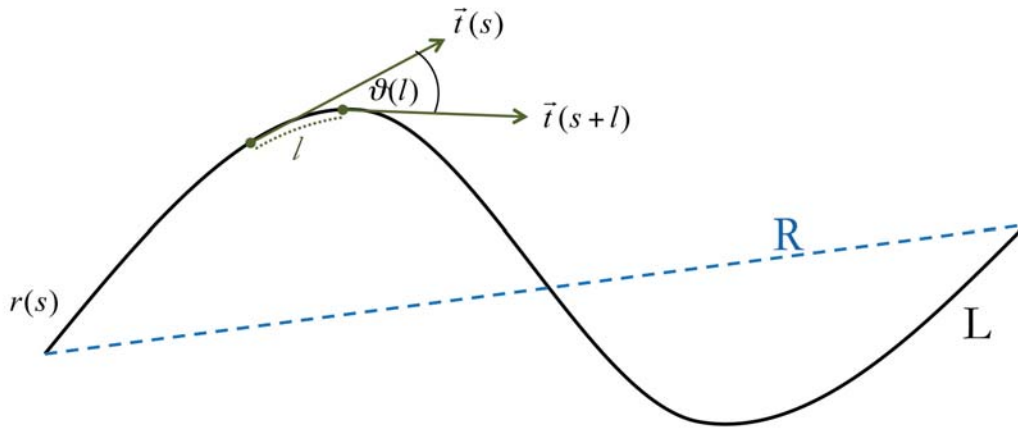


Abbildung 1.6: Dargestellt ist eine kontinuierliche Raumkurve  $\mathbf{r}(s)$ , mit Konturlänge  $L$ , End-zu-End-Abstand  $R$ , Abstand  $l$  zwischen Punkten entlang der Kurve und Tangenten  $\mathbf{t}(s)$  mit eingeschlossenem Winkel  $\vartheta$ .

Die Persistenzlänge von *in vitro* polymerisiertem Aktin beträgt 9-18  $\mu\text{m}$  [23–26]. Die durchschnittliche Konturlänge von Aktin beträgt wie in Kapitel 1.1 erwähnt 22  $\mu\text{m}$ . F-Aktin gehört somit zu der Klasse der semiflexiblen Polymere.

Der End-zu-End-Abstand  $R$  der Filamente ist im Zusammenhang mit der Konturlänge  $L$  ein Maß für die Konformation von Filamenten. Der normierte End-zu-End-Abstand  $R/L$  gibt an, wie gestreckt ein Filament ist:  $R/L \mapsto 1$  bedeutet, dass das

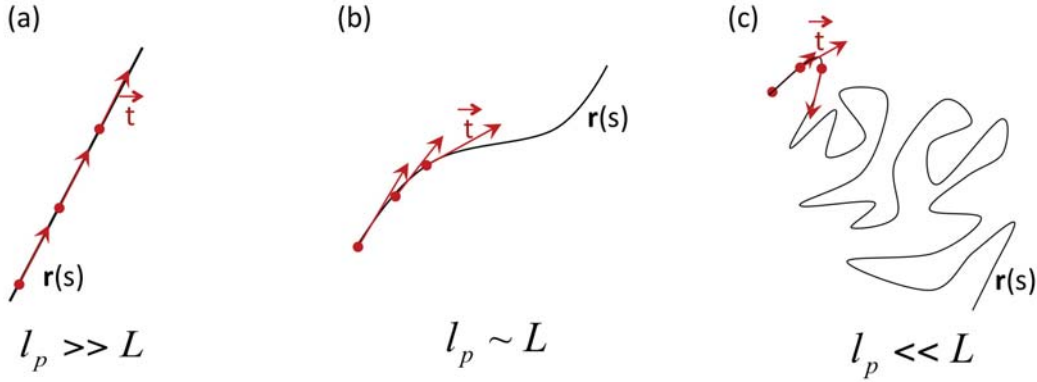


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Klassifizierung von Polymeren in (a) steife, (b) semiflexible und (c) flexible Filamente anhand der Persistenzlänge  $l_p$ . Die Tangenten der Raumkurven  $\mathbf{r}(s)$  sind durch rote Pfeile dargestellt.

Filament maximal gestreckt ist,  $R/L \mapsto 0$  bedeutet, dass das Filament eine geschlossene Kurve bildet.

Für die Beschreibung von steifen bzw. semiflexiblen Polymeren wird das *Worm-Like-Chain*(WLC)-Modell verwendet, welches im Folgenden dargestellt wird.

### 1.2.1 Das *Worm-Like-Chain*(WLC)-Modell

Das *Worm-Like-Chain*(WLC)-Modell [27] basiert auf einer 1949 von Kratky und Prorod [28] entwickelten Beschreibung eines semiflexiblen Fadenmoleküls durch eine, wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigte, Raumkurve  $\mathbf{r}(s)$  mit Persistenzlänge  $l_p$ . Die statistischen Eigenschaften einer thermisch fluktuierenden WLC mit Biegesteifigkeit  $\kappa$  werden dabei durch ein Energiefunktional  $\mathcal{H}$  beschrieben:

$$\mathcal{H} = \frac{\kappa}{2} \int_0^L \left( \frac{\partial^2 \mathbf{r}(s)}{\partial s^2} \right)^2 ds \quad (1.4)$$

Der Term  $\partial^2 \mathbf{r}_s / \partial s^2$  entspricht der Krümmung der Kurve. Somit wird die gesamte elastische Energie eines Filaments durch seine lokalen Krümmungen, gewichtet mit der Biegesteifigkeit  $\kappa$ , bestimmt. Die Längenerhaltung des Filaments wird durch die Bedingung  $|\mathbf{t}(s)| = 1$  erzwungen. Aus den Tangentenkorrelationen der WLC im thermischen Gleichgewicht erhält man einen definierten Zusammenhang zwischen

der Biegesteifigkeit  $\kappa$  und der Persistenzlänge  $l_p$ ,  $\kappa = k_B T l_p$ . Hierbei ist  $k_B$  die Boltzmann-Konstante und  $T$  die absolute Temperatur. Das WLC-Modell liefert eine gute Beschreibung für semiflexible, isolierte Polymere in Lösung.

Betrachtet man ein einzelnes Polymer in einer Lösung aus anderen Polymeren, so wird die Dynamik des einzelnen Filaments nicht nur von seinen intrinsischen physikalischen Eigenschaften sondern darüber hinaus auch durch die kollektiven Eigenschaften von den miteinander wechselwirkenden Filamenten beeinflusst. Zur Beschreibung der dynamischen Eigenschaften unter Wechselwirkung mit benachbarten Filamenten wird das Röhrenmodell angewendet, welches im Folgenden detailliert beschrieben wird.

### 1.2.2 Das Röhrenmodell

In Abbildung 1.8 a ist ein einzelnes Polymer in einer Lösung aus Polymeren schematisch dargestellt. Der mittlere Abstand zwischen zwei Kreuzungspunkten von Filamenten wird durch die Maschenweite  $\xi$  beschrieben und hängt von der Anzahl der umgebenden Polymere ab. Das heißt,  $\xi$  ist eine Funktion der Polymerkonzentration. Bei endlichen Temperaturen und im thermischen Gleichgewicht (Formel 1.4), fluktuiert das Filament innerhalb des von den übrigen Filamenten begrenzten Volumens. Abbildung 1.8 b zeigt einige Konformationsmöglichkeiten des in (a) gezeigten Filaments. Die einschränkenden Filamente bilden eine Art Röhre. Diese Röhre kann für flexible Polymere durch das von Edwards eingeführte Röhrenmodell beschrieben werden [29], welches von Odijk [30] und Semenov [31] auf steife bzw. semiflexible Polymere erweitert wurde. Basierend auf dem Modell der Röhre lassen sich physikalische Eigenschaften von Biopolymeren berechnen [32–36].

Überträgt man das Konzept der Röhre auf alle Filamente in einer Polymerlösung so wird klar, dass die Einschränkung eines einzelnen Filaments auch gleichzeitig für die umgebenden Filamente selber gelten muss. Es gibt demnach eine gegenseitige Wechselwirkung. Fluktuationen auf Längenskalen unterhalb der Maschenweite  $\xi$  relaxieren sehr schnell ( $\sim 10$  ms) [37]. Wohingegen auf größeren Längenskalen die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Filamenten und die große Konturlänge der Filamente (im Vergleich zu ihrem Durchmesser) eine solch schnelle Relaxation verhindern. Ein Herauskriechen (engl. *reptation*) des Filaments aus seiner Röhre

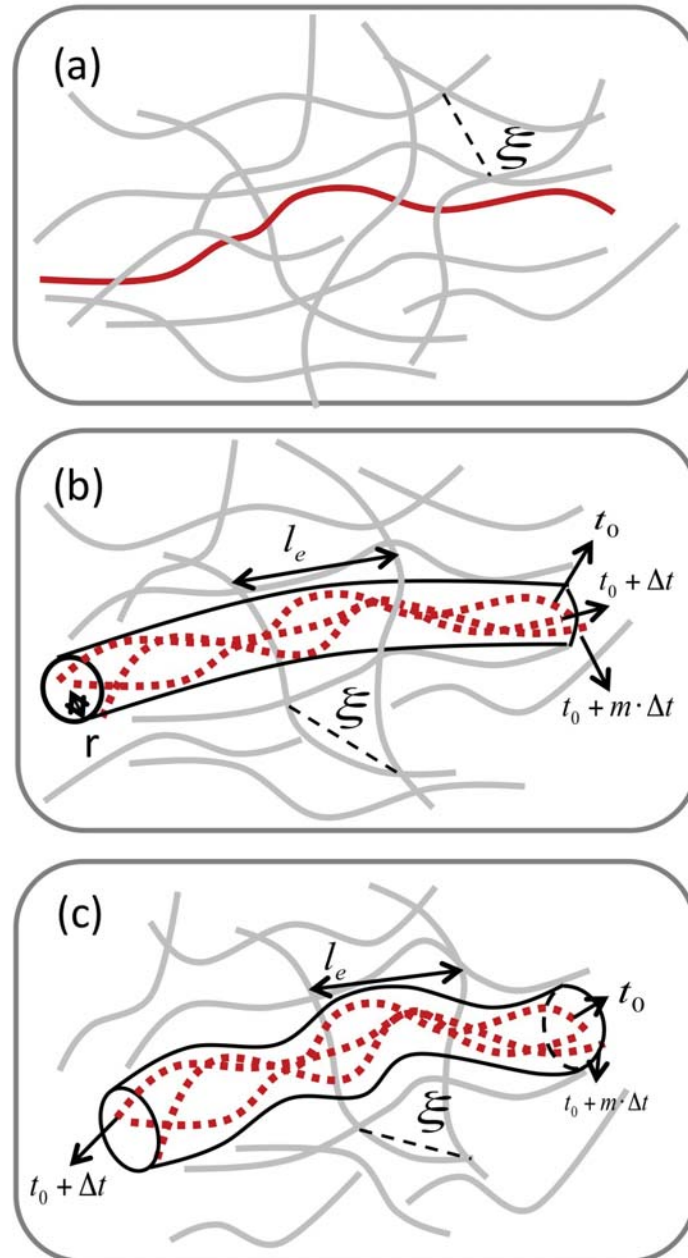


Abbildung 1.8: (a) Schematische Darstellung eines einzelnen Polymeren in einer Lösung aus anderen Polymeren. Gezeigt ist der mittlere Abstand zwischen zwei Kreuzungspunkten, die sogenannte Maschenweite  $\xi$ . (b) Schematische Darstellung des Röhrenmodells. Gezeigt sind einige Konformationsmöglichkeiten (rot gestrichelt) des in (a) gezeigten Filaments zu unterschiedlichen Zeitpunkten  $t$ . Die umgebenen Polymere schränken die Fluktuationen des Filaments ein. Sie bilden hierbei eine Art Röhre mit Radius  $r$ . Die mittlere Distanz zwischen Kollisionspartnern der Röhre werden durch die *entanglement*-Länge  $l_e$  beschrieben. (c) Schematische Darstellung der durch Nachbarfilamente gebildeten Röhre unter Berücksichtigung eines nicht konstanten Röhrendurchmessers.

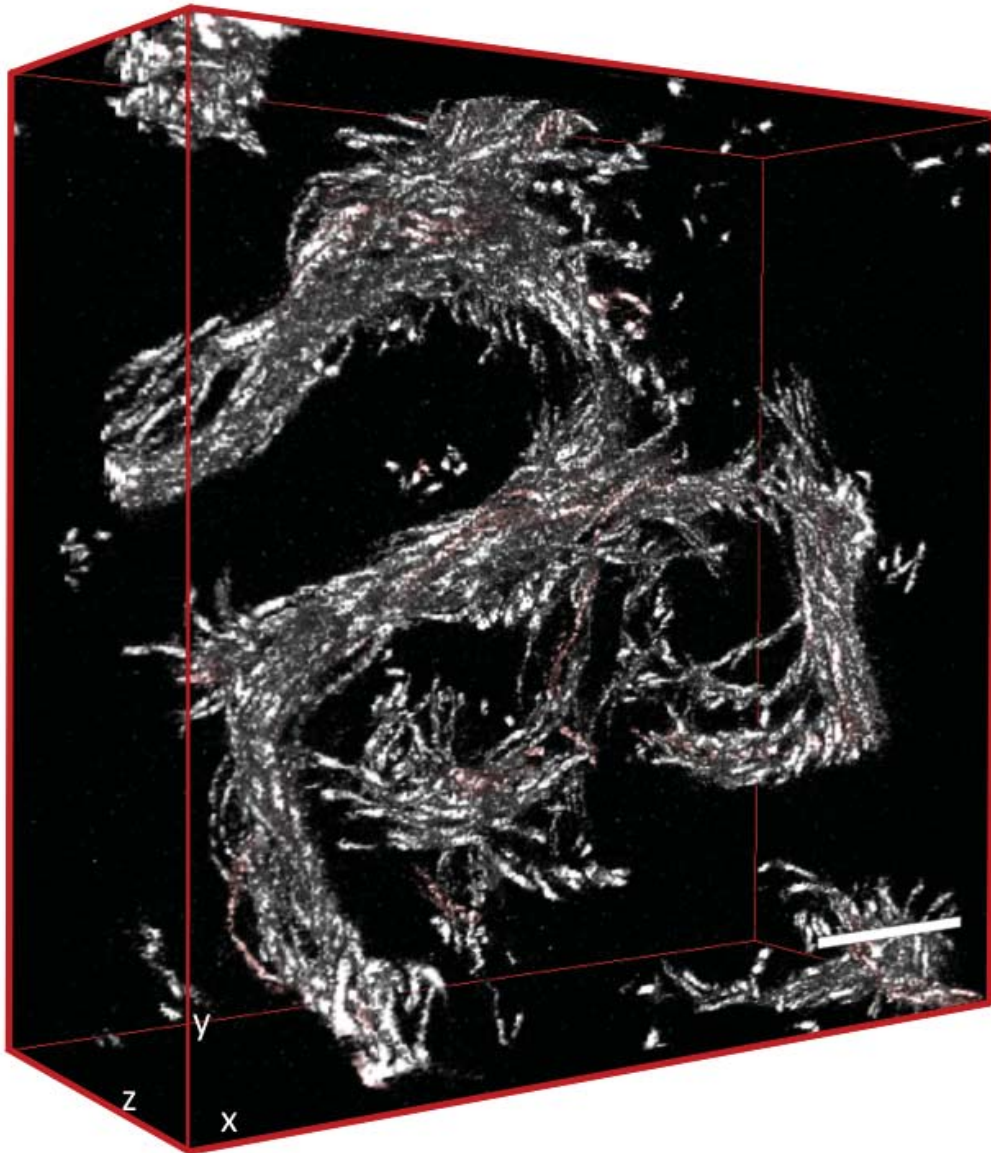


Abbildung 1.9: Zeitliche Überlagerung von 10 dreidimensionalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (LSM 510 meta, Zeiss; Kapitel 2.1.1) eines F-Aktin-Netzwerkes. Aktin-Konzentration:  $c = 0.02$  mg/ml. Weiße Filamente: fluoreszenzmarkiertes F-Aktin. Verhältnis von markiertem zu unmarkiertem F-Aktin; 1:2000. Maßstab:  $10\ \mu\text{m}$

findet bei Filamenten ( $L \sim l_p$ ) im Bereich von  $10^6$  s statt [38]. Die Röhre ist somit ein dynamisches Konzept. In theoretischen Arbeiten zu F-Aktinlösungen wurde in erster Näherung der Röhrenradius als Konstante behandelt [34]. Verschiedene Experimente [38–42] und auch Simulationen [35] lassen allerdings vermuten, dass der Röhrenradius nicht konstant (Abb. 1.8 c) ist, sondern eine Verteilung von Radien vorliegt .

Zur Veranschaulichung des Röhrenkonzepts an einem Experiment zeigt Abbildung 1.9 eine zeitliche Überlagerung von 10 dreidimensionalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen einer physikalisch vernetzten F-Aktinlösung. In dieser Aufnahme sind nur einige Filamente mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Details Kapitel 2.1). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Fluktuationen der einzelnen Filamente eingeschränkt sind. Abbildung 1.10 a zeigt eine über 150 Einzelaufnahmen gemittelte zweidimensionale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines rot-markierten Aktin-Filaments (Details Kapitel 2.1), welches sich in einer  $10x$  höher konzentrierten Aktinlösung (hier grün markiert) befindet, als die Filamente in Abb 1.9. In dieser Aufnahme ist bedingt durch die Lösungskonzentration eine stärkere Einschränkung des einzelnen Filaments zu erkennen. Abb. 1.10 b zeigt die Überlagerung der ersten 50 Filamentkonturen<sup>3</sup> der 150 Einzelaufnahmen. In dieser Art der Darstellung ist eine Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte des Filaments aus (a) zu erkennen.

Sowohl Abb. 1.9 als auch Abb. 1.10 zeigen, dass der Röhrenradius nicht konstant ist, jedoch ist die Häufigkeitsverteilung von Röhrenradien bislang ungeklärt.

### 1.2.3 Die *Segment-Fluid*-Theorie

Im Rahmen einer Kollaboration unserer Arbeitsgruppe in Jülich wurde parallel zu dieser Doktorarbeit von der Arbeitsgruppe von Prof. K. Kroy (Theoretische Physik, Universität Leipzig) eine Theorie entwickelt, welche die topologischen Einschränkungen in physikalisch vernetztem F-Aktin und eine heterogene Röhrenradienverteilung beschreibt. In diesem Modell wird nicht die direkte Kollision zweier Filamente betrachtet, sondern die Kollision ihrer Röhren, bzw. der röhrenartigen Potentiale. Die

---

<sup>3</sup>Für die Überlagerung der Filamentkonturen wurden die Einzelaufnahmen des in Abb. 1.10 a gezeigten Filaments mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ [43] skelettiert und das Ergebnis von 50 Skelettierungen addiert.

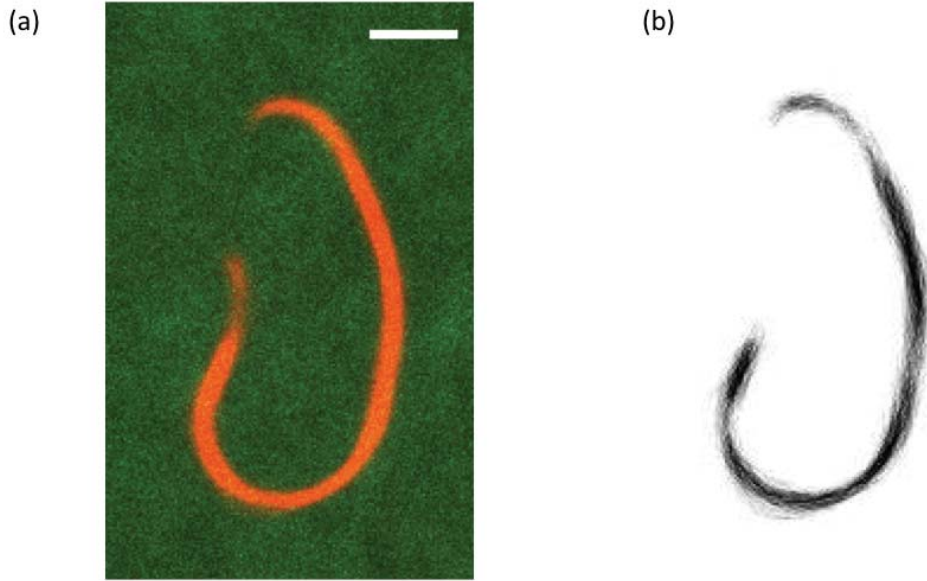


Abbildung 1.10: **(a)** Überlagerung von 150 zeitlich aufeinander folgender fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen (LSM 510 meta, Zeiss; Kapitel 2.1.1) eines einzelnen rot-markierten Aktin-Filaments in einer Lösung aus grün-markiertem F-Aktin. Aufnahme-dauer insgesamt: 150 s. Aktin-Konzentration: 0.2 mg/ml, Verhältnis von roten zu grünen Filamenten 1:2000. Maßstab: 5 µm **(b)** Darstellung der Überlagerung von 50 Filamentkon-turen aus (a).

Theorie basiert auf den Arbeiten von Morse [34]. Für die Verteilung der Röhrenradien  $r$  ergibt sich in diesem Modell [44, 45]:

$$P(r) = \frac{8}{3r\Gamma(k)} \exp(-y)y^k \quad \text{mit} \quad y \equiv \frac{1}{4 l_p^{1/3} r^{8/3} \Theta} \quad (1.5)$$

Wobei  $k = 4.013 \rho l_s \langle r \rangle$  und  $\Theta = 0.125 (l_s \langle r \rangle^2)^{-1}$ .  $\Gamma(k)$  bezeichnet die Eulersche Gammafunktion [46],  $r$  ist der Röhrenradius und  $\langle r \rangle$  entsprechend der Mittelwert der Röhrenradien.  $\rho$  ist die Längen-Konzentration in Polymerlänge pro Volumen, welche proportional zur Massendichte der Monomere ist.  $l_s$  bezeichnet die Segment-Länge. Eine vernünftige Annahme ist, dass  $l_s$  mit der sogenannten *entanglement*-Länge  $l_e$  skaliert.  $l_e$  beschreibt die mittlere Distanz zwischen Kollisionspartnern der Röhren (Abb. 1.8). Laut Semenov [31] skaliert  $l_e \propto c^{-2/5}$ . Dieses Skalengesetz kann durch Simulationen oder empirisch über eine Anpassung der Funktion (Formel 1.5) mit der

Zwangsbedingung  $l_s \propto l_e$  an einen experimentell ermittelten Datensatz für Röhrenradienverteilungen für verschiedene Aktin-Konzentrationen überprüft werden (Kapitel 3.1.3).

## 1.2.4 Lösungen semiflexibler Polymere

Mechanische und dynamische Eigenschaften von Polymerlösungen hängen von der Konzentration der Lösung und der Biegesteifigkeit der Filamente ab. Da in dieser Arbeit ausschließlich semiflexible Filamente untersucht wurden, beschränke ich mich im Folgenden auf die Eigenschaften speziell dieser Polymerklasse. Aufgrund der Abhängigkeit der physikalischen Eigenschaften von der Konzentration der Lösung wird zwischen verdünnten, halbverdünnten und konzentrierten Lösungen unterschieden [47]:

$$c_p \ll \frac{1}{L^3} \quad \text{verdünnte Lösung} \quad (1.6)$$

$$\frac{1}{L^3} \ll c_p \ll \frac{1}{F_d \cdot L^2} \quad \text{halbverdünnte Lösung} \quad (1.7)$$

$$c_p \gg \frac{1}{F_d \cdot L^2} \quad \text{konzentrierte Lösung} \quad (1.8)$$

Hierbei bezeichnet  $c_p$  die Konzentration der Polymerlösung in Partikel pro Volumen.  $L$  kennzeichnet die Länge und  $F_d$  den Durchmesser der Polymere.

### Verdünnte Lösungen

In verdünnten Lösungen (Formel 1.6) ist der durchschnittliche Abstand zwischen den Filamenten viel größer als die durchschnittliche Konturlänge  $\langle L \rangle$  der Filamente, so dass die Wechselwirkung zwischen einzelnen Polymeren zu vernachlässigen ist. Verdünnte F-Aktinlösungen eignen sich, um die mechanischen und dynamischen Eigenschaften einzelner Filamente in Lösung zu untersuchen, wie z.B. die Analyse der Persistenzlänge (Kapitel 1.2). Unter anderem wurde an freien Filamenten die Kraft ( $\sim 600$  pN) gemessen, der ein einzelnes Filament standhalten kann, bevor es reißt



[48]. Darüber hinaus eignen sich verdünnte Lösungen um in engen Kanälen, die Einschränkung zu untersuchen, welche ein einzelnes Filament in dichten zytoskelettalen Netzwerken erfährt. Hierzu wurden in Arbeiten von Köster et al. [49, 50] Mikrofluidikkanäle mit wohldefinierten Dimensionen und Konformationen verwendet. Durch die Variation der Dimensionen dieser Kanäle lassen sich Skalengesetze herleiten, welche das Fluktuationsverhalten einzelner Filamenten in Abhängigkeit seiner Einschränkung und in Abhängigkeit der Länge der Filamente beschreiben.

### Halbverdünnte Lösungen

In halbverdünnten Lösungen (Formel 1.7) ist die Bewegung einzelner Polymere durch benachbarte Filamente eingeschränkt. Die dynamischen Eigenschaften der Polymere werden dadurch beeinflusst, dass sich benachbarte Filamente mit endlichem Durchmesser  $F_d$  in einer Ebene nicht kreuzen können (Abb. 1.11). Es kommt zu einer physikalischen Vernetzung (Verschlaufung) der Polymere. Aufgrund der komplexen Wechselwirkung zwischen den Filamenten, unter anderem über die Vernetzungspunkte, weisen diese Lösungen viskoelastische Eigenschaften (Kapitel 1.2.5) auf [47].

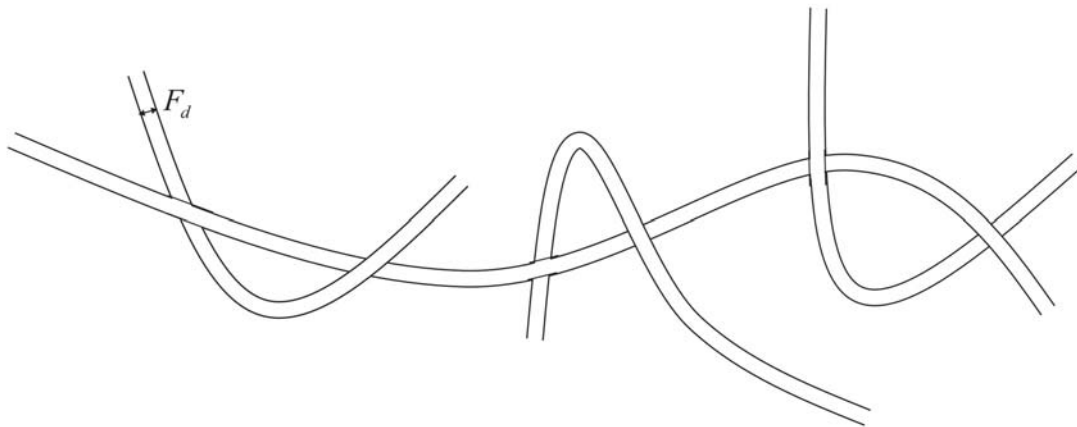


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der physikalischen Vernetzung (Verschlaufung) semiflexibler Polymere mit endlichem Filamentdurchmesser  $F_d$ . Filamente werden durch die Konformationen benachbarter Filamente sterisch eingeschränkt.

F-Aktinlösungen in diesem Konzentrationsbereich, im thermischen und dynamischen Gleichgewicht, sind isotrope Flüssigkeiten, wie in Abbildung 1.12 am Beispiel einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme gezeigt, in der keine Vorzugsrichtung der

Filamente zu erkennen ist.

### Konzentrierte Lösungen

In konzentrierten Lösungen (Formel 1.8) wird der Einfluss der Wechselwirkung zwischen Polymeren so groß, dass sich benachbarte Filamente in gleicher Weise ausrichten. Im Grenzfall  $c_p = (F_d L^2)^{-1}$  erfolgt die Ausrichtung auf einer makroskopischen Skala und die Lösung geht in einen flüssig-kristallinen Zustand über. Die derzeitige Forschung beschäftigt sich unter anderem mit dem Phasenübergang zwischen isotropen und flüssig-kristallinen F-Aktinlösungen [51].

### Polydisperse F-Aktinlösungen

*In vitro* polymerisiertes Aktin weist eine polydisperse Längenverteilung zwischen  $2 - 70 \mu\text{m}$  auf [20]. Da die Einteilung in verdünnte, halbverdünnte bzw. konzentrierte Lösungen stark von der Konturlänge  $L$  abhängt (Formel 1.6-1.8), ist die Einordnung von polydispersen F-Aktinlösungen nicht eindeutig und hängt im Wesentlichen von der mittleren Konturlänge  $\langle L \rangle$  der Filamente ab. In dieser Arbeit werden Polymerlösungen mit  $\langle L \rangle \sim l_p$  untersucht. Bei einer durchschnittlichen Filamentlänge von  $\langle L \rangle \sim 22 \mu\text{m}$  werden in der Literatur F-Aktinlösungen in einem Konzentrationsbereich von  $36 \mu\text{g/ml} - 2.0 \text{mg/ml}$  als halbverdünnt beschrieben [52, 53] und weisen demnach viskoelastische Eigenschaften auf. Für das weitere Verständnis ist eine kurze Einführung in die Grundlagen der Viskoelastizitätslehre hilfreich, welche im Folgenden am speziellen Beispiel für Biopolymerlösungen gegeben wird.

## 1.2.5 Viskoelastische Eigenschaften von Biopolymerlösungen

Viskoelastische Materialien weisen sowohl Eigenschaften von viskosen Flüssigkeiten als auch von elastischen Festkörpern auf. Mit dem mechanischen Verhalten von elastischen Festkörpern beschäftigt sich die Elastizitätstheorie. Bei Festkörpern ist die Spannung  $\sigma$  proportional zur Deformation  $\gamma$  und unabhängig von der Scherrate  $\dot{\gamma}$ . Dieses Verhalten wird durch das Hookesche Gesetz beschrieben. Viskose Flüssigkeiten dagegen werden durch die Hydrodynamik beschrieben. Bei viskosen Flüssigkeiten

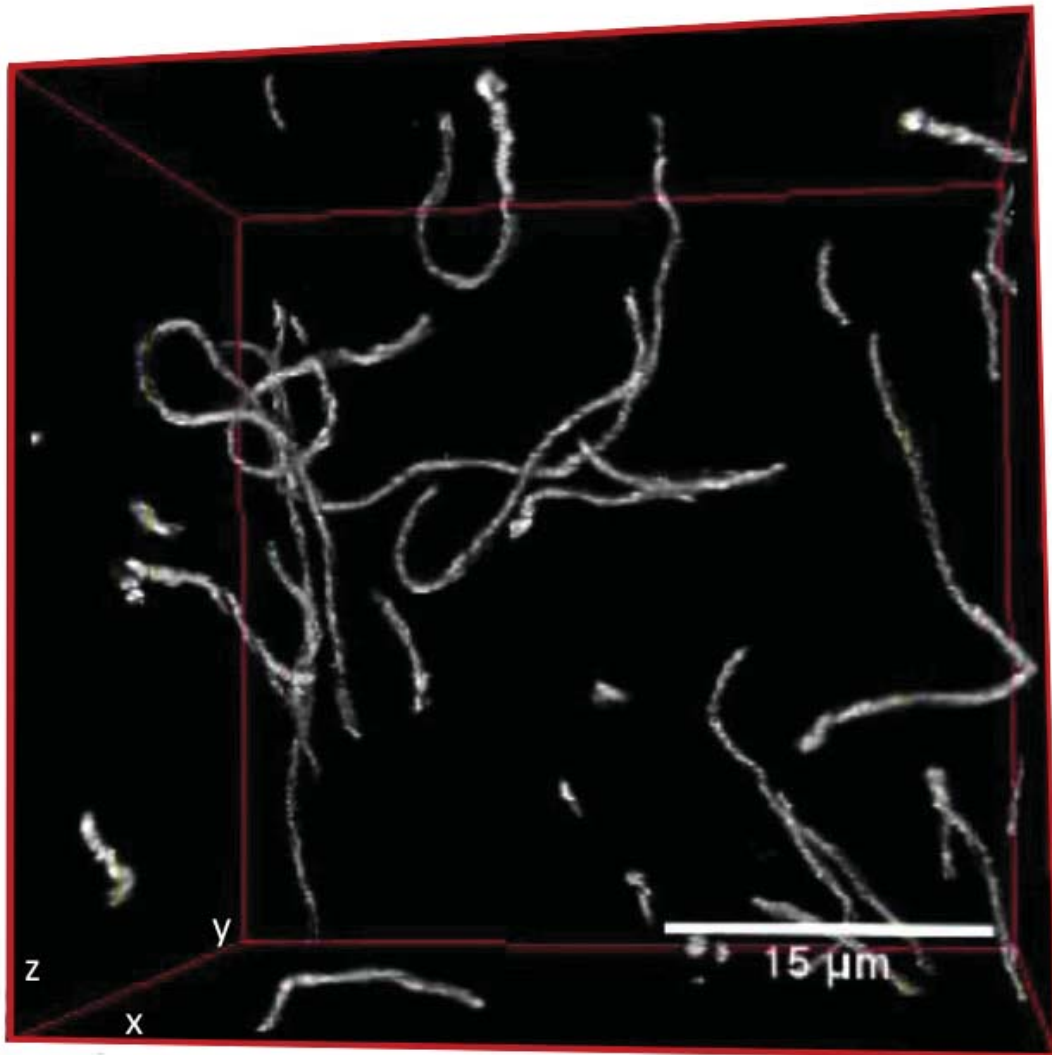


Abbildung 1.12: Dreidimensionale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (LSM 510 meta, Zeiss; Kapitel 2.1.1) eines F-Aktin-Netzwerkes. Aktin-Konzentration:  $c = 0.2$  mg/ml. Weiße Filamente: Fluoreszenzmarkiertes F-Aktin. Verhältnis von markiertem zu unmarkiertem F-Aktin; 1:2000.

ist die Spannung  $\sigma$  proportional zur Scherrate  $\dot{\gamma}$  aber unabhängig von der Deformation  $\gamma$ . Dieses Verhalten wird durch das Newtonsche Gesetz beschrieben. Bei viskoelastischen Flüssigkeiten ist der Zusammenhang zwischen Spannung, Deformation und Scherrate wesentlich komplizierter. Insbesondere halbverdünnte, physikalisch vernetzte Biopolymerlösungen, wie sie in dieser Arbeit untersucht wurden, zeigen ausgeprägte Abweichungen vom Newtonschen Gesetz für viskose Flüssigkeiten. [54] Das viskoelastische Verhalten von Biopolymerlösungen, welche entweder sowohl rein physikalisch, also nur durch die Verschlaufung der Filamente (Kapitel 1.2.4), als auch über kreuzvernetzende Proteine vernetzt sind, wird aktuell auf vielfältige Weise erforscht: Die makroskopischen Eigenschaften werden beispielsweise durch mechanische Verformung unter Verwendung von Scherrheometern [55] untersucht, welche den Widerstand der Lösung während einer Verformung messen. In diesem Zusammenhang ermöglicht die Methode der dynamischen (oszillatorischen) rheologischen Messung die Berechnung des Speicher- und Verlustmoduls der Lösung [54]:

$$\text{Speichermodul} \quad G' = \frac{\sigma(\omega)}{\gamma} \cos \delta(\omega) \quad (1.9)$$

$$\text{Verlustmodul} \quad G'' = \frac{\sigma(\omega)}{\gamma} \sin \delta(\omega) \quad (1.10)$$

Hierbei ist  $\sigma$  die Spannung,  $\omega$  die Frequenz der oszillatorischen Messung und  $\delta$  der Phasenwinkel. Die Deformation  $\gamma$  ist definiert über:

$$\gamma = \frac{\Delta x}{h} \quad (1.11)$$

Mit  $\Delta x$  als Strecke der Deformation und  $h$  Höhe des gescherten Volumens (Abb. 1.13).  $\gamma = 1$  bedeutet demnach, dass die Verschiebung der Flüssigkeit gleich der Höhe der Kammer ist, in der sich die Flüssigkeit befindet. Das Speichermodul ist ein Maß dafür, wie mechanische Energie in dem System durch den elastischen Anteil der Lösung gespeichert wird. Das Verlustmodul hingegen ist ein Maß dafür, wieviel Energie im viskosen Anteil durch Dissipation umgewandelt wird. Im Bereich von kleinen Deformationsamplituden,  $\gamma < 1$ , ist das frequenzabhängige mechanische Verhalten von

viskoelastischen Biopolymerlösungen linear [56]. Oberhalb einer kritischen Amplitude der Deformation, welche stark von den Eigenschaften der Biopolymerlösung abhängt (z.B. Konturlänge der Filamente, Konzentration der Lösung, Temperatur), ist das Verhalten nichtlinear [37, 57]. Nimmt das Speichermodul mit steigender Spannung bzw. Deformation zu, spricht man von *stress-stiffening* bzw. *strain-stiffening* (von engl. *strain* „Deformation“, *stress* „Spannung“). Nimmt das Speichermodul hingegen ab, spricht man entsprechend von *stress-softening* bzw. *strain-softening*. [58]

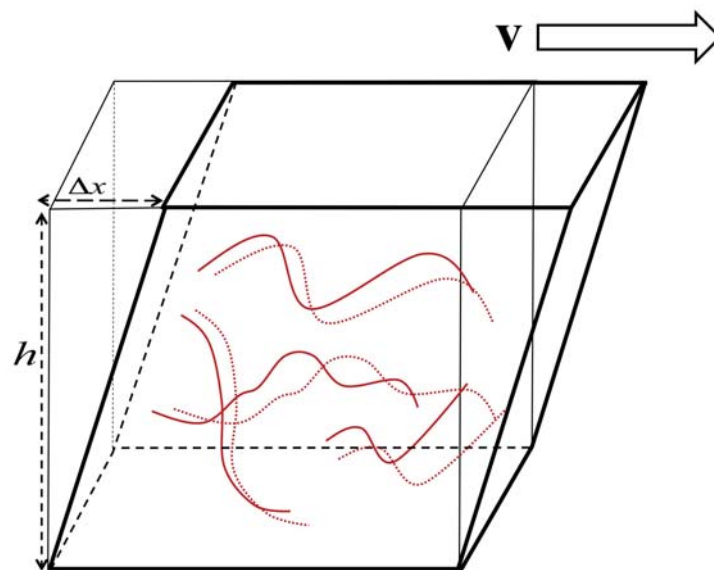


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung eines gescherten Volumens mit Höhe  $h$ . Die roten Kurven stellen Filamente mit endlicher Länge und endlichem Durchmesser dar. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Positionen der Filamente nach einer linearen Deformation um den Betrag  $\Delta x$ .  $\mathbf{v}$  kennzeichnet die Richtung des Schergeschwindigkeitsvektors.

*Stress-stiffening* wurde bei stark kreuzvernetzten F-Aktinlösungen unter Verwendung verschiedener kreuzvernetzender Proteine [59, 60, 62] oder auch bei Netzwerken aus Intermediärfilamenten [61] beobachtet. Beim *stress-stiffening* verdichtet sich das Netzwerk in Richtung des Schergeschwindigkeitsvektors  $\mathbf{v}$  und übt negative Spannung aus [63]. In rein physikalisch vernetzten Aktinlösungen [37], in Aktinlösungen mit einem geringen Anteil kreuzvernetzender Proteine [60, 64, 65] oder auch in reinen Lösungen bestehend aus Mikrotubuli [57] konnte *stress-softening* beobachtet werden, also ein Abfall des Speichermoduls. Dies wird im Allgemeinen einem Zereis-

sen des Netzwerkes zugeschrieben [66], da F-Aktinlösungen, bestehend aus kurzen Filamenten, einen geringeren elastischen Anteil aufweisen, als Lösungen mit langen Filamente. Dies liegt in der geringeren Anzahl von möglichen Vernetzungspunkten bei kurzen Filamenten begründet.

Das mechanische Verhalten von zytoskelettalen Netzwerken kann von der Längenskala abhängen, auf der die Messung durchgeführt wird [58]. Aus diesem Grund werden neben der eben beschriebenen makroskopischen rheometrischen Messung auch mikrorheologische Messungen an vernetzten Polymerlösungen durchgeführt. Bei der Mikrorheologie werden die rheologischen Eigenschaften der Lösungen unter Verwendung von magnetischen oder optischen Pinzetten auf mikroskopischer Ebene untersucht, indem mikroskopisch kleine Partikel ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) in die Lösung eingebracht werden. Hierbei wird zwischen passiver und aktiver Mikrorheologie unterschieden. Bei der passiven Mikrorheologie wird die Brownsche Molekularbewegung der Partikel untersucht, welche durch das Biopolymernetzwerk eingeschränkt ist [67–69]. Bei der aktiven Mikrorheologie werden die Partikel [70, 71] mit einer definierten Kraft ausgelenkt und ihr Widerstand auf die erzwungene Bewegung analysiert. In der Mikrorheologie werden die Ergebnisse z. B. des Plateaumoduls, also dem Wert bei dem der viskose Anteil der Lösung gleich dem elastischen Anteil ist, stark von Heterogenitäten im Netzwerk beeinflusst welche in der selben Größenordnung liegen wie die Partikel mit denen die Messung vorgenommen wird [72].

Für die Analyse dynamischer Eigenschaften von Aktinlösungen werden darüber hinaus unter anderem die Methode der Lichtstreuung [73, 74] oder auch die Fluoreszenzmikroskopie verwendet [41, 53].

### 1.3 Ziele dieser Arbeit

Verschiedene Experimente an rein physikalisch vernetzten F-Aktinlösungen haben gezeigt, dass diese Lösungen in bestimmten Konzentrationsbereichen viskoelastische Eigenschaften aufweisen (Kapitel 1.2.5). Diese Eigenschaft muss demnach in der Wechselwirkung zwischen den Filamenten begründet sein. Die sterische Einschränkung der Dynamik von Filamenten in physikalisch vernetzten F-Aktinlösungen (Kapitel 1.2.4) wird durch das Konzept des Röhrenmodells beschrieben. In Experimen-

ten an physikalisch vernetzten F-Aktinlösungen wurde eine heterogene Verteilung von Röhrenradien beobachtet (Kapitel 1.2.2), jedoch war die Form der Häufigkeitsverteilung bis jetzt ungeklärt. Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Dynamik von Aktin-Filamenten auf Grundlage der Form der Häufigkeitsverteilung der Röhrenradien besser zu verstehen.

Um mehr über die mikroskopischen Mechanismen hinter der makroskopischen Eigenschaft der Viskoelastizität unter Einfluss einer Deformation zu erfahren, wurde in dieser Arbeit das mechanische Verhalten von F-Aktinlösungen auf mikroskopischer Ebene unter Einfluss einer Scherdeformation untersucht. Ziel hierbei war es mittels mikroskopisch zugänglicher Parameter, wie Orientierung, Konturlängen und Krümmungen von Filamenten, zu verstehen, welche Rolle mikroskopische Mechanismen bei der makroskopischen Eigenschaft der Viskoelastizität spielen.





## 2. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Methoden und die Durchführung der Experimente beschrieben. Eine Liste der verwendeten Materialien und Chemikalien ist in Tabelle A.1 im Anhang zu finden.

### 2.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Aufgrund ihres geringen Kontrasts, können verschiedene Strukturen innerhalb einer Zelle in der konventionellen Lichtmikroskopie nicht unterschieden werden. Basierend auf der konventionellen Lichtmikroskopie wird für die Analyse spezifischer Zellstrukturen die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, bei der Teile der Probe gezielt mit fluoreszenten Farbstoffen markiert und im Mikroskop abgebildet werden.

#### Fluoreszenzmarkierung von Aktin *in vitro*

Im Fall der Fluoreszenzmarkierung von Aktin *in vitro* wird häufig die Markierung über Phalloidin-Fluorophor-Konjugate erreicht [26, 39, 75–77]. Hier sind die Fluorophore kovalent an Phalloidin ( $C_{35}H_{48}N_8O_{11}S$ ) gebunden. Die Markierung von filamentösem Aktin wird über nichtkovalente, aber sehr selektive Wechselwirkung zwischen Phalloidin und F-Aktin erreicht. Bei Phalloidin handelt es sich um das Hepatotoxin des Pilzes *Amanita phalloides*. Die Bindung an das Aktin erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte hochspezifisch an jeweils drei Untereinheiten des polymerisierten Aktins [78, 79]. Phalloidin stabilisiert das

Filament [80, 81] und vermeidet den Aktinabbau an den Enden nahezu gänzlich [82, 83]. Zudem verringert es die kritische Aktin-Konzentration  $c_k$  (Kapitel 1.1) und ermöglicht so die Untersuchung von freien Filamenten in Lösung. Phalloidin gekoppelte Farbstoffe unterliegen jedoch einer Bindungskinetik [84], wodurch es bei Mikroskopie-Experimenten, welche über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, zu einer Verschlechterung des Kontrasts kommen kann. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Fluoreszenzmikroskopie von einzelnen Aktin-Filamenten in einer Lösung aus F-Aktin nur ein geringer Teil der Lösung fluoreszenzmarkiert ist. Hier kommt es zu einer Bindung des Phalloidin-Konjugats an zuvor unmarkierte Filamente. Ein Beispiel für diesen Prozess ist anhand einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme in Kapitel A.3 gezeigt. Die Phalloidinkinetik kann durch die Verwendung von Saccharose in der Pufferlösung verlangsamt und dieser Effekt somit reduziert werden [85]. In den Experimenten an Polymerlösungen unter Scherung (Kapitel 2.5) hat sich die Verwendung einer Pufferlösung mit einem Saccharose-Anteil von 30% bewährt. Dies ermöglichte einen gleichbleibend guten Kontrast für die gesamte Dauer der Scherexperimente.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass sich Farbstoffe im roten Spektralbereich dazu eignen F-Aktin zu markieren, da sie eine höhere Photostabilität aufweisen, als Fluorophore, welche im energiereicheren Wellenlängenbereich angeregt werden. Für die Aufnahmen am Einzel-Lochblendensystem (Kapitel 2.1.1) wurde folgendes Phalloidin-Fluorophor-Konjugat verwendet:

- **Tetramethyl-Rhodamine-Isothiocyanate (TRITC)-Phalloidin** (Sigma)  
Anregungswellenlänge:  $\lambda_A \sim 543$  nm, Emissionswellenlänge:  $\lambda_E \sim 560$  nm

Für die Aufnahmen am Vielfach-Lochblenden-System (Kapitel 2.1.2) wurde ein Fluorophor-Konjugat verwendet, welches im Vergleich zum TRITC-Phalloidin mit einer noch energieärmeren Wellenlänge angeregt werden kann:

- **Atto647N-Phalloidin** (Atto-Tec, Siegen)  
Anregungswellenlänge:  $\lambda_A \sim 647$  nm, Emissionswellenlänge:  $\lambda_E \sim 670$  nm

Bei der Durchführung der in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden zwei unterschiedliche Mikroskope verwendet, welche im nächsten Abschnitt im Detail beschrieben werden.

## Aufbau von konfokalen Fluoreszenzmikroskopen

Fluoreszierende Farbstoffe werden mit Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs angeregt. Im Strahlengang von Fluoreszenzmikroskopen befindet sich im Allgemeinen ein dichroitischer Spiegel. Durch diesen Spiegel und zusätzliche Sperrfilter wird das Emissions- vom Anregungslicht getrennt.

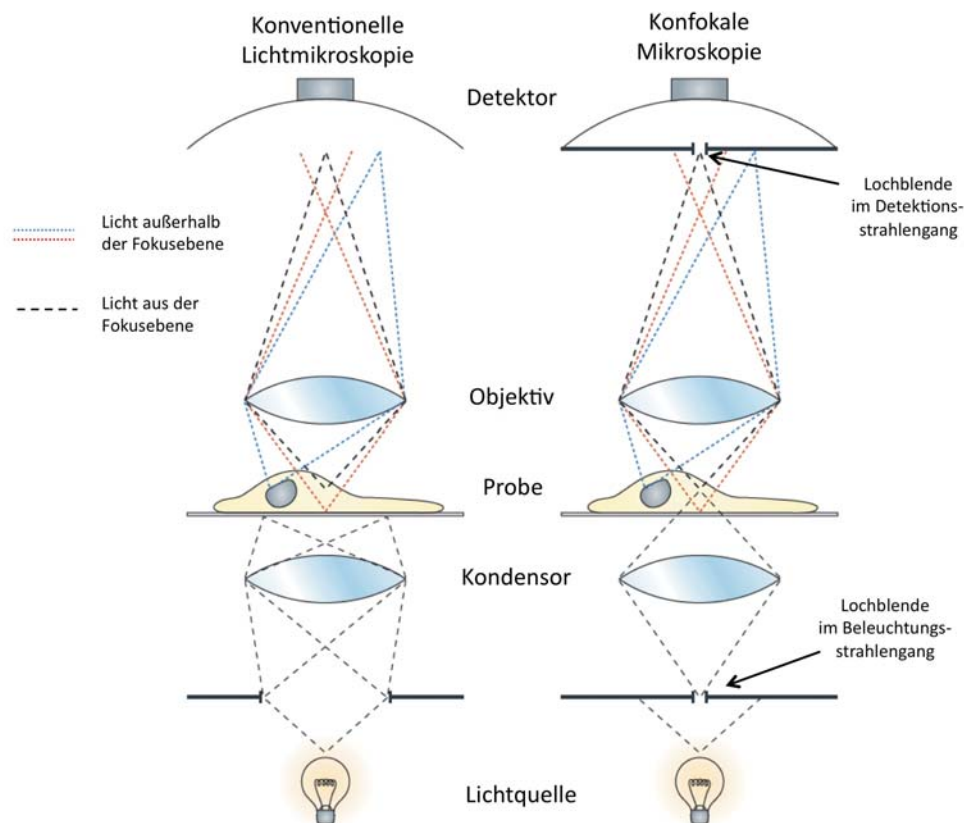


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der konfokalen Mikroskopie im Vergleich zur konventionellen Mikroskopie. Verändert nach [86].

Durch die Kombination der Fluoreszenzmikroskopie mit der konfokalen Mikroskopie [87] wird der Kontrast von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen deutlich verbessert. Dies wird unter anderem durch Blenden im Beleuchtungs- und Detektionsstrahlengang erreicht. In Abbildung 2.1 ist sowohl die konventionelle Mikroskopie als auch die konfokale Mikroskopie skizziert. Bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie, im Unterschied zur konventionellen Lichtmikroskopie, wird nicht die gesamte Probe beleuchtet, sondern (im Idealfall) nur ein beugungsbegrenzter Punkt. Dies wird über eine Lochblende im Beleuchtungsstrahlengang erreicht und dadurch, dass die Probe Punkt für Punkt, im Allgemeinen mittels Galvanometerscannern, abgerastert wird.

Das Emissionslicht aus dem Teil der Probe, welcher durch den Lichtpunkt beleuchtet wurde, trifft dann im Detektionsstrahlengang auf eine Lochblende (oder auch eine Matrix aus Lochblenden). Durch die Lochblende wird Licht ausgeblendet, welches nicht aus der Fokusebene emittiert wird. Durch diese Methode wird Streulicht aus Ebenen, welche außerhalb der Fokusebene liegen, vermieden und eine Erhöhung des Kontrasts erzielt. Der Durchmesser der Lochblende entscheidet hierbei über die Größe des Bereichs (konfokale Schichtdicke) aus dem Licht auf den Detektor treffen kann. Für jeden beleuchteten Punkt in der Probe wird das Emissionslicht, welches die Lochblende passiert, detektiert und im Rechner das Gesamtbild rekonstruiert. Darüber hinaus wird durch die konfokale Technik eine Verringerung der Schärfentiefe bzw. eine Verbesserung der Auflösung entlang der optischen Achse erreicht. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche konfokale Systeme verwendet, welche im Folgenden kurz beschrieben werden.

### 2.1.1 Konfokales Einzel-Lochblenden-System

Für einen Teil der Experimente wurde ein inverses, konfokales Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss verwendet (LSM 510 meta). Bei diesem Mikroskop wird das Anregungslicht durch galvanometrische Spiegel auf die Probe gelenkt. Diese wird in x- und y-Richtung Punkt für Punkt abgerastert. Das von der Probe emittierte Licht fällt zunächst durch eine stationäre Lochblende variabler Größe und wird dann weiter auf einen Photonenvervielfältiger gelenkt. Durch die variable Größe der Lochblende im Detektionsstrahlengang lässt sich durch Änderung des Durchmessers der Lochblende die Größe der konfokalen Schichtdicke variieren. Für die Anregung des Fluorophores wurde in dieser Arbeit ein Helium/Neon-Laser mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 543 \text{ nm}$  verwendet. Mit diesem Aufbau wurde die Verteilung der Röhrenradialen in F-Aktinlösungen untersucht (Kapitel 2.4 und 3).

### 2.1.2 Konfokales Vielfach-Lochblenden-System

Für die Untersuchung von Polymerlösungen unter Scherung (Kapitel 2.5 und 4.1) wurde ein konfokales Vielfach-Lochblenden-System verwendet. Als konfokale Einheit diente ein Hochgeschwindigkeits-Vielfach-Lochblenden-System, *VT-Infinity-I*,

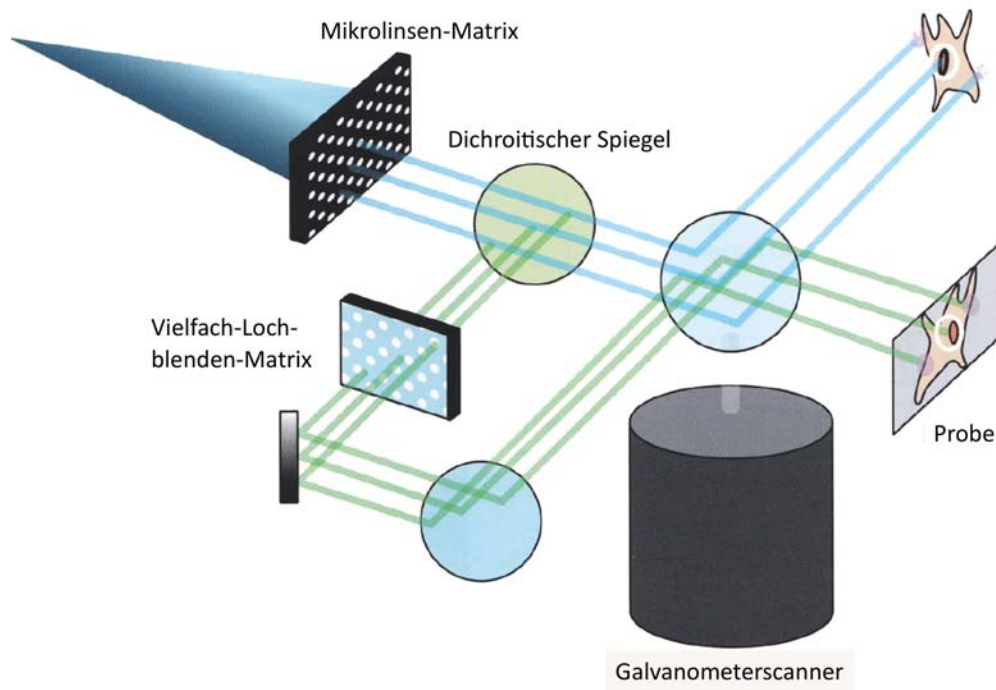


Abbildung 2.2: Darstellung des Aufbaus des VT-Infinity-I. Verändert nach [88].

der Firma *VisiTech* (Abb.2.2), welches zusammen mit einem inversen Mikroskop der Firma Zeiss (Axiovert 200 M) das konfokale Vielfach-Lochblenden-System bildet.

Als Anregungsquelle diente die 647 nm Linie eines Argon/Krypton Lasers (Stabilität 2250, Spectra-Physics). Die Beleuchtungseinheit des *VT-Infinity-I* besteht aus einer ortsfesten Mikrolinsen-Matrix. Licht, welches die Matrix passiert, wird mittels eines Galvanometerscanners über die Probe gelenkt. Anregungs- und Emissionslicht werden über einen dichroitischen Spiegel und zusätzliche Sperrfilter voneinander getrennt. Das Emissionslicht wird auf eine stationäre Vielfach-Lochblenden-Matrix gespiegelt, welche das konfokale Bild in der Bildebene erzeugt. Licht, welches die Matrix passiert hat, wird auf eine EMCCD<sup>1</sup>-Kamera geleitet. Für die in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen wurde eine EMCCD-Kamera der Firma Andor eingesetzt (*iXon-back illuminated DU-897*), mit einer physikalischen Pixelgröße von  $16\ \mu\text{m} \times 16\ \mu\text{m}$ . Als Objektiv wurde ein *Epiplan-Neofluar 50x/1.0 Oil Pol* der Firma Zeiss verwendet. Eine Bestimmung der objektseitigen Pixelgröße für diesen Aufbau

<sup>1</sup>electron multiplying charge coupled device

lieferte einen Wert von  $296 \text{ nm} \pm 0.4 \text{ nm}$ , in jeweils x- und y-Richtung<sup>2</sup>.

### 2.1.3 Die Punktspreizfunktion (PSF) der abbildenden Systeme

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, bestimmt man die Dimension der Röhre aus der zeitlichen Mittelung unterschiedlicher Konformationen einzelner Filamente. Aufgrund des limitierten Auflösungsvermögens von Lichtmikroskopen wird der Durchmesser von Aktin-Filamenten (Kapitel 1.1) entlang der Filamentkontur verbreitert dargestellt. Bei der zeitlichen Überlagerung der Filamentkonturen muss dieser Effekt für die Bestimmung der Röhrenradien berücksichtigt werden. Eine Abbildung eines Objekts entspricht einer Faltung des Objekts mit einer für das Abbildungssystem spezifischen Auflösungsfunktion, der sogenannten Punktspreizfunktion (PSF). In Abb. 2.3 ist eine durch das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ generierte zweidimensionale PSF eines störungsfreien Abbildungssystems gezeigt. Die Intensitätsverteilung des Beugungsbildes wird durch die Airy-Funktion beschrieben. Für die Quantifizierung der PSF wird die Intensitätsverteilung in der Airy-Scheibe, sie entspricht der 0. Ordnung der Airy-Funktion, mit einer zweidimensionalen Gauß-Funktion angenähert.

Die Auflösung  $d$  beschreibt den Abstand, den zwei Objekte mindestens haben müssen, um noch getrennt voneinander abgebildet werden zu können. Bei einem konfokalen Mikroskop hängt  $d$  im Wesentlichen von der Anregungswellenlänge  $\lambda_A$  und der Auflösung des verwendeten Objektivs ab [88]:

$$d = 0.61 \frac{\lambda_A}{NA} \quad (\text{Abbe'sche Formel}) \quad (2.1)$$

$NA$  steht für die numerische Apertur<sup>3</sup> des verwendeten Objektivs.

<sup>2</sup>Standardabweichung:  $\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \langle x \rangle)^2}$ ; Mit  $x$  = Messwert,  $\langle x \rangle$  Mittelwert von  $x$  und  $n = 10$  Messungen eines  $100 \mu\text{m}$ -Maßstabs.

<sup>3</sup> $NA = n \cdot \sin(\alpha)$ .  $n$  ist der Brechungsindex des verwendeten Immersionsmittels und  $\alpha$  ist der halbe Öffnungswinkel des verwendeten Objektivs.

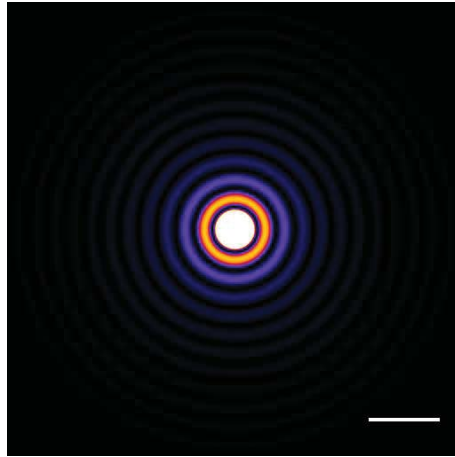


Abbildung 2.3: Darstellung einer generierten Punktspreizfunktion (ImageJ, Falschfarbendarstellung) eines störungsfreien Abbildungssystems. Parameter: Numerische Apertur:  $NA = 1.2$ , Brechungsindex:  $n = 1.33$ , Anregungswellenlänge:  $\lambda_{ill} = 543$  nm. In den Randbereichen des Intensitätsmaximums ist das durch Beugungseffekte verursachte Interferenzmuster deutlich zu erkennen. Maßstab:  $1 \mu\text{m}$ .

Um die PSF experimentell zu bestimmen, werden Objekte kleiner als  $d$  mikroskopiert, deren Abmessungen aber bekannt sind. Im Folgenden werden die Vorgehensweisen zur Bestimmung der PSF der beiden in dieser Arbeit verwendeten Mikroskope beschrieben.

### Bestimmung der PSF des LSM 510 meta

Zur Bestimmung der PSF für das in dieser Arbeit verwendete LSM 510 meta wurden fluoreszierende Kugeln (FluoSpheres,  $\varnothing 0.17 \mu\text{m}$ , 540/560, Invitrogen) in einer 0.8% Agaroselösung (Volumenverhältnis 1:10) verwendet. Die Abbildung der Kugeln erfolgte unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie die Untersuchung der F-Aktinlösungen (Details hierzu in Kapitel 2.4.3). Zur Analyse der PSF wurden Bilderstapel aufgenommen, die jeweils eine gesamte Kugel abbilden. Die Schrittweite in Richtung der optischen Achse betrug  $100$  nm. Die Größe der Pixel betrug  $30$  nm x  $30$  nm. Das Ergebnis der PSF ist in Kapitel 3.1.2 dargestellt.

### 3D-Punktspreizfunktion des Vielfach-Lochblenden-Systems

Für das Vielfach-Lochblenden-System wurde die dreidimensionale PSF bestimmt, um die Größe der konfokalen Schichtdicke unter experimentellen Bedingungen zu bestimmen. Hierzu wurden fluoreszierende Kugeln (FluoSpheres,  $\varnothing 0.17 \mu\text{m}$ , 633/660,

Invitrogen) in 2% Agaroselösung verwendet (Volumenverhältnis 1:10). Als Probenbehälter dienen Kammerobjektträger (LabtekChambers, Thermo Scientific).

Für die Bestimmung der PSF wurde anstatt der EMCCD-Kamera der Firma Andor (s.o.) eine EMCCD-Kamera der Firma Hamamatsu verwendet, da sie im Vergleich zur Andor-Kamera über eine geringere physikalische Pixelgröße von  $8\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$  verfügt. Unter Verwendung der Hamamatsu-Kamera wurde die objektseitige Pixelgröße auf  $148\ \text{nm} \pm 0.3\ \text{nm}$  in jeweils x- und y-Richtung reduziert<sup>4</sup>. Die axiale Schrittweite wurde auf  $100\ \text{nm}$  festgelegt und über ein Piezoelement eingestellt. Über die Anpassung einer eindimensionalen Gauß-Funktion der PSF entlang der optischen Achse erhält man für diesen Aufbau eine Abschätzung der konfokalen Schichtdicke von  $\sim 3\ \mu\text{m}$ . Die laterale Auflösung des Systems beträgt etwa  $0.4\ \mu\text{m}$ .

## 2.2 Scherkammer

Für die Scherexperimente wurde eine sich gegeneinander drehende Konus-Platte-Scherkammer verwendet [89, 90]. Sie besteht aus einer Halterung für ein Deckglas (80 mm) und einem von oben absenkbaaren Konus aus Edelstahl. Dieser hat einen Öffnungswinkel von  $\alpha = 1.4^\circ$  (Abb. 2.4).

Das Volumen der Kammer  $V_K$  wurde über folgende Formel berechnet:

$$V_K = \frac{2}{3}\pi r^3 \tan \alpha \quad (2.2)$$

Dies ergibt ein für die Experimente benötigtes Probenvolumen von  $\sim 3.2\ \text{ml}$ . Um zu gewährleisten, dass das gesamte Kammervolumen während der Experimente mit Lösung befüllt war, wurde ein Probenvolumen von  $3.5\ \text{ml}$  verwendet. Der Konus ist so konzipiert, dass überschüssige Lösung an ihm vorbei fließen kann.

Um einen Kontakt zwischen Konus und Deckglas zu vermeiden, ist die Spitze des Konus um  $30\ \mu\text{m}$  verkürzt. Die für die Experimente verwendeten Deckgläser, mit einer Dicke von  $170\ \mu\text{m} \pm 10\%$  (Deckglas 80 mm, Menzel), wurden zwischen zwei

---

<sup>4</sup>Die objektseitige Pixelgröße wurde auf die gleiche Weise wie bei der Andor-Kamera bestimmt. Standardabweichung:  $\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \langle x \rangle)^2}$ ; Mit  $x$  = Messwert,  $\langle x \rangle$  Mittelwert von  $x$  und  $n = 10$  Messungen eines  $100\ \mu\text{m}$ -Maßstabs.



Teflonringen gehalten und von einer Metallscheibe unterstützt. Die Scheibe wurde, bevor das Deckglas aufgelegt wurde, mit Immersions-Öl benetzt, um Schwingungen im Aufbau während der Mikroskopieaufnahme zu dämpfen.

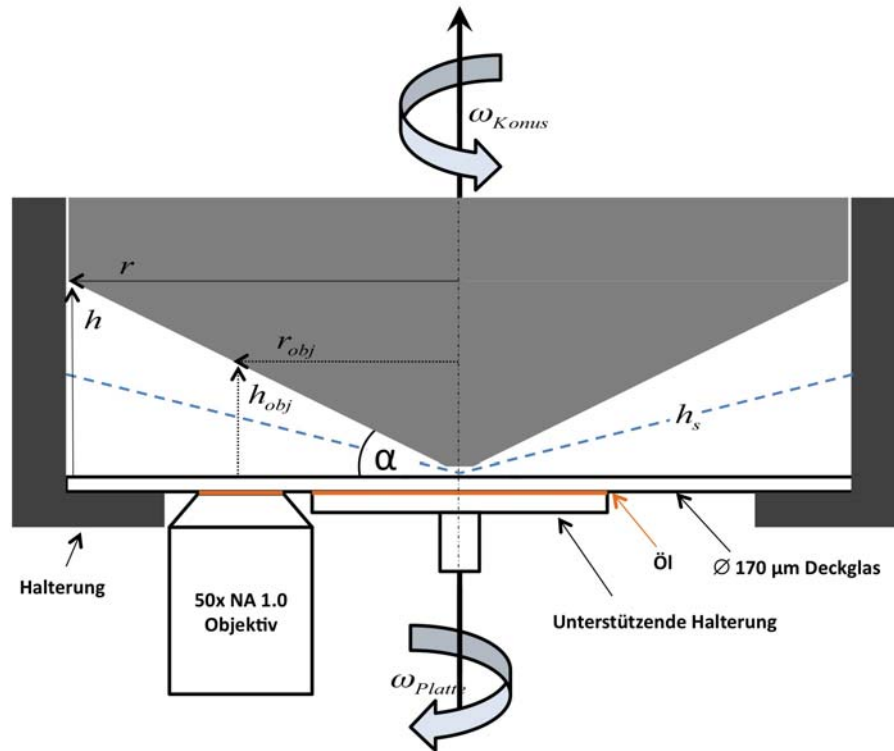


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Scherkammeraufbaus. Gezeigt ist die Position des Objektivs und die für die Kalibrierung der Scherkammer relevanten Parameter, Höhe  $h$  und Radius  $r$  der Scherkammer, sowie Höhe  $h_{obj}$  und Radius  $r_{obj}$  zwischen Rotationsachse und Sichtfeld des Objektivs; Höhe der stationären Ebene  $h_s$  und Winkel des Konus  $\alpha$ . Winkelgeschwindigkeiten an der Platte sind  $\omega_{Platte}$  und am Konus  $\omega_{Konus}$ .

Die Scherkammer ist so konzipiert, dass sie auf einem inversen Mikroskop montiert werden kann.

Für die Untersuchungen an Polymerlösungen unter Scherung wurde die Kammer mit dem in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Vielfach-Lochblenden-System verwendet.

Die Halterung des Deckglases und der Konus wurden über Servomotoren angetrieben und in entgegengesetzte Richtungen rotiert.

Eine Charakteristik des Konus-Platte-Aufbaus ist, dass der Geschwindigkeitsgradi-

ent  $\dot{\gamma}$  an allen radialen Positionen gleich ist [91]:

$$\dot{\gamma} = \frac{\Delta\omega}{\tan \alpha} \quad (2.3)$$

Hierbei ist  $\alpha$  der Öffnungswinkel des Konus und  $\Delta\omega$  die Winkelgeschwindigkeit,  $\Delta\omega = \omega_{Konus} - \omega_{Platte}$ . Somit hat der Geschwindigkeitsgradient  $\dot{\gamma}$  die Einheit  $s^{-1}$  und wird im Allgemeinen als Scherrate bezeichnet.

Die Höhe, in der  $\mathbf{v} = 0$  ist, wird als stationären Ebene  $h_s$  bezeichnet. Sie wird über das Verhältnis der Beträge der Geschwindigkeiten von Konus und Platte bestimmt:

$$h_s = \frac{|\omega_{Konus}|}{|\omega_{Platte}|} \cdot \tan(\alpha) \cdot r \quad (2.4)$$

Im Experiment wurde die Winkelgeschwindigkeit  $\Delta\omega$  über ein Steuerungsprogramm als Frequenz vorgegeben. Die Umrechnung der Frequenz in Scherraten erfolgte über folgende Formel:

$$\dot{\gamma} = \frac{2\pi r_{obj}}{h_{obj}} \cdot \Delta\omega \quad (2.5)$$

Hierbei ist  $h_{obj}$  die Höhe der Kammer über dem Sichtfeld des Objektivs und  $r_{obj}$  der Abstand zwischen Rotationsachse und Sichtfeld. Diese Werte wurden über Kalibrierungsmessungen ermittelt, welche im Folgenden im Detail erläutert werden.

### 2.2.1 Kalibrierung der Scherkammer

#### Bestimmung des Parameters $r_{obj}$

Der Abstand zwischen Rotationsachse und Sichtfeld des Objektivs  $r_{obj}$  wurde über folgende Formel berechnet:

$$r_{obj} = \frac{v_{exp}}{2\pi \cdot \omega_{Platte}} \quad (2.6)$$

Hierbei ist  $v_{exp}$  die experimentell bestimmte Geschwindigkeit an der Platte des Rheometers, im Bereich des Sichtfeldes des Objektivs und  $\omega_{Platte}$  die softwareseitig angegebene Winkelgeschwindigkeit der Platte der Scherkammer.

Um  $v_{exp}$  zu messen, wurden fluoreszierende Kugeln ( $\varnothing 0.5 \mu\text{m}$ , Latex beads, Sigma) an der Glasoberfläche eines Deckglases in der Scherkammer physisorbiert. An die Platte des Rheometers wurden drei verschiedene Geschwindigkeiten angelegt und 100 Aufnahmen der Kugeln mit einer Belichtungszeit von jeweils 100 ms aufgenommen. Über die zurückgelegte Strecke  $\Delta x$  der Kugeln in einem Zeitraum  $\Delta t$  wurde die Geschwindigkeit der Kugeln gemessen. Über lineare Regression der Ergebnisse der unterschiedlichen Geschwindigkeiten wurde der Radius auf  $r_{obj} 22.7\text{mm} \pm 0.21 \mu\text{m}$  bestimmt<sup>5</sup>.

### Bestimmung des Parameters $h_{obj}$

Die Kammerhöhe über dem Sichtfeld des Objektivs  $h_{obj}$  wurde über folgende Formel berechnet:

$$h_{obj} = -\frac{2\pi r \omega_{Konus} - 2\pi r \omega_{Platte}}{b} \quad (2.7)$$

$$\text{mit } b = \frac{v_{exp}(\Delta h) - 2\pi r \omega_{Platte}}{\Delta h} \quad (2.8)$$

Hierbei ist  $v_{exp}(\Delta h)$  die Geschwindigkeit in Abhängigkeit der Höhe  $\Delta h$  hinter dem Deckglas (wobei  $h_{Deckglas} = 0 \mu\text{m}$ ).  $v_{exp}(\Delta h)$  wurde experimentell bestimmt, indem die Geschwindigkeit  $\Delta x/\Delta t$  von fluoreszierenden Kugeln in unterschiedlichen Höhen  $\Delta h$  gemessen wurden.

Für die Messung wurden Bilderstapel von fluoreszierenden Kugeln ( $\varnothing 0.5 \mu\text{m}$ , Latex beads, Sigma) unter Scherung aufgenommen. Die Kugeln befanden sich in einer Lösung, welche einen Saccharose-Anteil von 30% enthielt (Die gleiche Lösung, wie sie auch in den Scherexperimenten an F-Aktin verwendet wurde (Kapitel 2.5.1)). Dieser

<sup>5</sup>Als Fehler ist die Genauigkeit der linearen Regression an die Daten angegeben.

Anteil an Saccharose sorgte dafür, dass die Kugeln während der Dauer der Aufnahme nicht sedimentierten. Darüber hinaus wurde die Brownsche Molekularbewegung der Kugeln stark eingeschränkt, so dass sich dieses System gut eignete, um die Kalibrierungsmessungen durchzuführen.

Nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz werden Lichtstrahlen am Übergang von Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes gebrochen. So entsteht ein Unterschied zwischen geometrischer und optischer Weglänge. In den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten zur Untersuchung von Polymerlösungen unter Scherung wurde ein Objektiv mit Öl als Immersionsmedium verwendet. Das Öl besitzt einen Brechungsindex von  $n_{\text{öl}} = 1.518$ . Der Brechungsindex der in den Experimenten verwendeten Pufferlösung  $n_{\text{Puffer}}$  hingegen liegt nahe dem Brechungsindex von Wasser ( $n_{\text{Puffer}} \approx n_{\text{Wasser}} = 1.33$ ). Aus diesem Grund muss das Ergebnis der geometrischen Höhe der Kammer  $h_{\text{obj}}$  bezüglich der optischen Weglänge korrigiert werden. [88]

$$h_{\text{obj}}^k = n_k \cdot h_{\text{obj}} \quad (2.9)$$

Der Korrekturfaktor  $n_k$  wurde über zwei unabhängige Methoden bestimmt: Zum einen wurde zwei Kapillaren mit einer bekannten Kammerhöhe von  $100 \mu\text{m} \pm 10\%$  mit der gleichen Lösung befüllt, wie sie auch zur Bestimmung der Höhe der Scherkammer verwendet wurde und der Korrekturfaktor über das Verhältnis zwischen bekannter Höhe der Kammer  $h_{\text{Kapillare}}$  und gemessener geometrischer Weglänge zwischen den Kammerwänden  $h_{\text{geo}}$  ermittelt. Zum anderen wurde der Brechungsindex  $n_{\text{Puffer}}$ , von zwei unabhängig voneinander präparierten Pufferlösungen, mittels eines Refraktometers (AR-3-6, Krüss Optronic) bestimmt und der Korrekturfaktor über das Verhältnis der Brechungsindizes zwischen Pufferlösung und Immersionsöl berechnet:

$$n_k = \frac{h_{\text{Kapillare}}}{h_{\text{geo}}} \approx \frac{n_{\text{Puffer}}}{n_{\text{öl}}} \quad (2.10)$$

Das Ergebnis dieser Berechnung liefert einen Mittelwert<sup>6</sup> von  $\langle n_k \rangle = 0.9 \pm 0.04$ .

<sup>6</sup>Der Fehler ist die Standardabweichung der vier Messungen.

Die Messungen zur Bestimmung von  $h_{obj}$  wurde an vier verschiedenen Referenzgeschwindigkeiten  $\Delta\omega$  durchgeführt. Die Korrektur mit  $n_k = 0.9$  liefert einen Mittelwert<sup>7</sup> für die Kammerhöhe von  $\langle h_{obj}^k \rangle = 634 \mu\text{m} \pm 34 \mu\text{m}$ .

### Fehlerbetrachtung

Unter Verwendung der Kalibrierungsparameter und Formel 2.5 werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit Scherraten  $\dot{\gamma}$  anstelle von Winkelgeschwindigkeiten  $\Delta\omega$  angegeben.

In die Berechnung der Scherrate fließen mehrere Parameter ein, welche nicht exakt bestimmt werden können und somit einen systematischen Fehler in der Angabe der Scherrate  $\dot{\gamma}$  verursachen: Für die Bestimmung des Parameters  $h_{obj}$  wurde die optische Weglänge benötigt, deren Wert von der Bestimmung des Korrekturfaktors  $n_k$  abhing, der mit einer Genauigkeit von  $\pm < 5\%$  gemessen werden konnte. Der Parameter  $r_{obj}$  wurde über die lineare Regression an einen Datensatz bestimmt. Der Fehler der linearen Regression lag bei  $\pm < 1\%$ . Die Genauigkeit der Fertigung der Deckgläser wurde vom Hersteller mit  $\pm 10\%$  angegeben. Während der Scherung kann es also zu einer Varianz in der Höhe der Scherkammer von  $\pm 3\%$  kommen.

Dies liefert eine Abschätzung der Genauigkeit des Parameters  $\dot{\gamma}$  von  $\approx \pm 10\%$ .

## 2.3 Aktinaufreinigung aus Kaninchenmuskelfleisch

Bei der Isolation und Präparation des Aktins für die Experimente wurden verschiedene Pufferlösungen verwendet. Die genauen Zusammensetzungen sind in Tabelle A.2 beschrieben.

Aktin wurde nach einer Methode von Spudich und Watt [92] aus frischem Kaninchenmuskelfleisch isoliert. Das so erhaltene Aceton-Pulver wurde in 10 g-Fractionen bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Aufreinigung aus dem Pulver erfolgte nach einem modifizierten Protokoll, basierend auf MacLean-Fletcher und Pollard [93]. Soweit nicht anders angegeben erfolgten alle unten beschriebenen Aufreinigungsschritte im Kühlraum bei  $4^\circ\text{C}$ . Im ersten Schritt wurden 10 g Aceton-Pulver in 200 ml vorgekühltem G-Puffer rehydriert und die Lösung langsam für 30 min auf Eis gerührt. Danach

<sup>7</sup>Standardabweichung:  $\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \langle X \rangle)^2}$ ; Mit  $X = h_{obj}$  und  $n = 4$  Messungen.

wurde die Lösung für 20 min bei 4°C zentrifugiert ( $1.8 \cdot 10^4$  x g; *Rotor* JA-10, Avanti J-20XP Centrifuge). Der Überstand wurde durch vier Lagen Verbandmull (Gazin, Lohmann Rauscher) in einen Erlenmeyerkolben filtriert. Das Sediment wurde abermals in 200 ml vorgekühltem G-Puffer resuspendiert, für 30 min gerührt und, wie bereits beschrieben, zentrifugiert.

Im Anschluss wurde der Überstand in den Erlenmeyerkolben filtriert und das Sediment verworfen. Das auf diese Weise extrahierte G-Aktin wurde unter Zugabe von 50 mM KCl und 2 mM MgCl<sub>2</sub> für 1.5 h bei Raumtemperatur polymerisiert. Danach wurde die Lösung erneut für 15 min zur Abkühlung auf Eis langsam gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf eine Endkonzentration von 0.8 M KCl gebracht. Die hohe KCl-Konzentration dient dazu, Tropomyosin<sup>8</sup> in Lösung zu bringen, um es vom polymerisierten Aktin zu trennen. Die Lösung wurde weitere 1.5 h auf Eis gerührt und anschließend bei 4°C zentrifugiert ( $1.7 \cdot 10^5$  x g; *Rotor* Type-45 Ti, Optima LE-80K Ultracentrifuge). Bei diesem Aufreinigungsschritt wird ausgenutzt, dass polymerisiertes Aktin ein wesentlich höheres Molekulargewicht als die übrigen Proteine sowie das unpolymerisierte Aktin hat. Letztere werden so vom polymerisationsfähigen Aktin getrennt.

Der Überstand wurde verworfen und die Sedimente mit insgesamt 16 ml G-Puffer in Lösung gebracht. Diese Lösung wurde homogenisiert (Dounce Homogenisator, Wheaton; 17 ml/loose) und 36 h in Dialyseschläuchen (Spectra/Por, Spectrum: MWCO 25000) gegen 1 l G-Puffer dialysiert (Pufferwechsel alle 12 h).

Etwa 2 h nach dem letzten Pufferwechsel wurde das (nun depolymerisierte) Aktin erneut bei 4°C zentrifugiert ( $1.4 \cdot 10^5$  x g; *Rotor* SW-60Ti, Optima LE-80K Ultracentrifuge), um denaturiertes und gegebenenfalls noch nicht depolymerisiertes, filamentöses Aktin von der G-Aktin-Lösung zu trennen. Hierzu wurde der Überstand mit einer Pipette (Eppendorf Research, 1 ml) abgenommen und das Sediment mitsamt  $\sim 3$  mm der untersten Flüssigkeitssäule im Zentrifugenröhrchen verworfen.

Für die weitere Aufreinigung wurde das Verfahren der Gelpermeationschromatographie (Größenausschlusschromatographie) angewendet. Dabei werden Proteine nach ihrem hydrodynamischen Volumen aufgetrennt [94]. Hierzu wurde eine Säule der Firma GE Healthcare (Modell XK 50) und als Säulenmaterial Sephacryl (S-300, GE

---

<sup>8</sup>Tropomyosin ist ein fibrilläres Strukturprotein, welches an der Kontraktion von Muskelzellen beteiligt ist und stark an Aktin bindet.

Healthcare) verwendet<sup>9</sup>. Der Überstand nach dem oben beschriebenen Zentrifugationsschritt wurde auf die mit frischem G-Puffer äquilibrierte Säule gebracht. Nach Durchlaufen der Säule wurden die Lösungen fraktioniert. Eine typische Elutionskurve des für diese Arbeit aufgereinigten Aktins ist in Abbildung 2.5 gezeigt. Für die Experimente wurde grundsätzlich nur Aktin aus den Fraktionen mit der maximalen Proteinkonzentration verwendet.

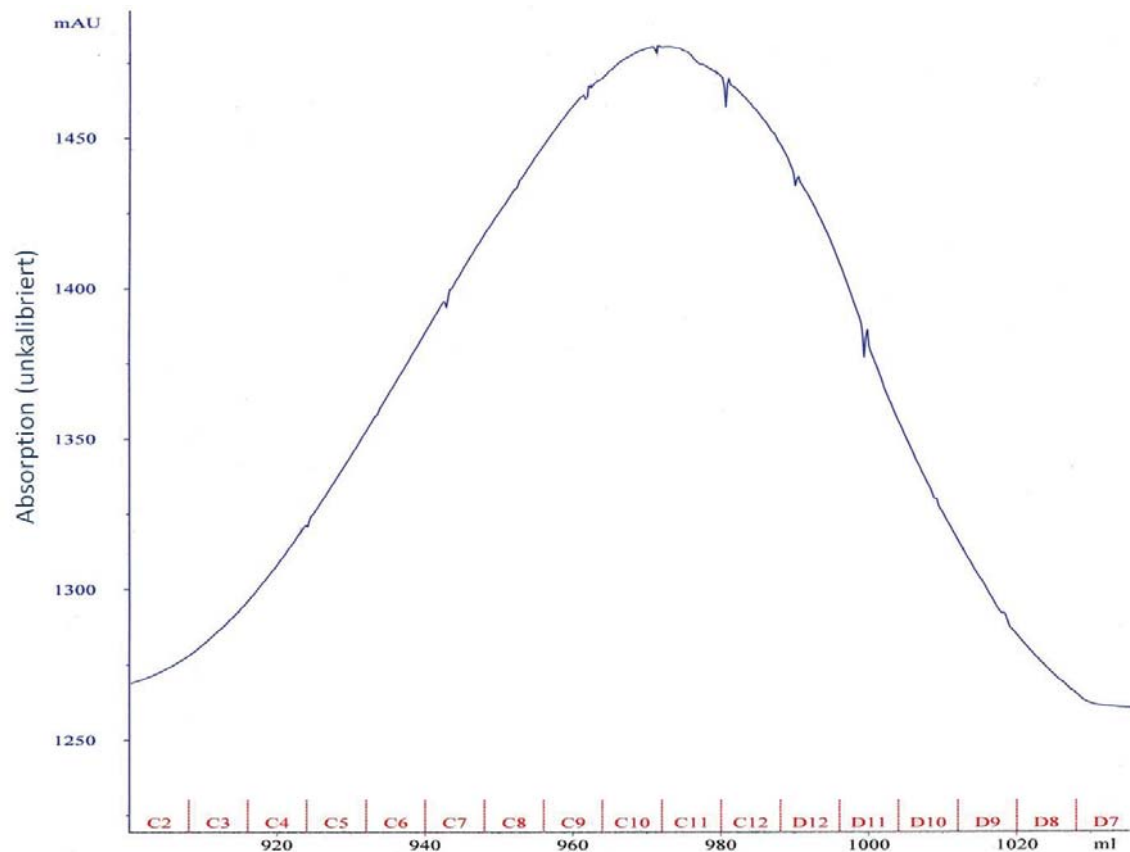


Abbildung 2.5: Elutionskurve nach der Aufreinigung über die Gelpermeationschromatographie-Säule. Für die Experimente wurden nur die Proben mit maximaler Protein-Konzentration verwendet. Für dieses Beispiel C10 und C11.

Die Konzentration der Aktinlösung wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurde ein *Nanodrop*-Spektrometer (ND-100, Peqlab, Erlangen) verwendet und die Extinktion  $E_{290}$  bei einer Wellenlänge von 290 nm gemessen. Unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 0.617 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$  für Aktin [95] wurde die Protein-

<sup>9</sup>Der Prozess wurde mit einer Chromatographie-Anlage UPC-900 (GE Healthcare) gesteuert.

konzentration  $c$  berechnet:

$$c = \frac{E_{290}}{\epsilon \cdot d} \quad (\text{Lambert-Beersches Gesetz}) \quad (2.11)$$

Mit  $d = 1$  mm: Schichtdicke der durchstrahlten Lösung.

Die Qualität des Aktins nach der Gelpermeationschromatographie wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Das SDS-Polyacrylamid-Gel in Abbildung 2.6 zeigt ein für diese Arbeit typisches SDS-Polyacrylamid-Gel. Aufgetragen sind drei unterschiedlich große Mengen an Protein (0.5, 1.0 und 2.0  $\mu\text{g}$ ) derselben Fraktion. Für die Färbung des Gels wurde die sehr sensitive Methode der Silberfärbung (Nachweisgrenze  $\sim 30$  ng) [94] gewählt. Es ist zu erkennen, dass selbst bei einer eingesetzten Menge von 2  $\mu\text{g}$  Protein keine weiteren Banden sichtbar sind. Das in dieser Arbeit verwendete Aktin weist demnach eine sehr hohe Reinheit auf und eignet sich somit hervorragend für die Untersuchung mechanischer und dynamischer Eigenschaften von *in vitro* polymerisierten Aktinlösungen ohne den Einfluss von kreuzvernetzenden Proteinen.

## 2.4 Experiment zur Bestimmung der Röhrenradien in F-Aktinlösungen

Für die Untersuchungen zur Bestimmung der Röhrenradien wurden die G-Aktinfraktionen entweder innerhalb einer Woche nach der Aufreinigung aus Acetonpulver genutzt oder zur späteren Verwendung mit 2 mg Saccharose pro 1 mg Aktin versetzt [96] und lyophilisiert. Das lyophilisierte Aktin wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert und vor der Verwendung mit G-Puffer rekonstituiert und 36 h gegen frischen G-Puffer dialysiert (Pufferwechsel alle 12 h). Dieser Dialyseschritt dient vor allem dazu, die Saccharose zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  ( $1.4 \cdot 10^5 \times g$ ; *Rotor* SW-60Ti, Optima LE-80K Ultracentrifuge), um denaturiertes Protein zu entfernen. Unter Zugabe von 10x F-Puffer<sup>10</sup> wurde die Polymerisation in-

---

<sup>10</sup>Der 10x F-Puffer wurde in 1 ml Fraktionen bei  $-20^\circ\text{C}$  ohne ATP und DTT gelagert und vor der Nutzung frisch mit ATP und DTT versetzt.



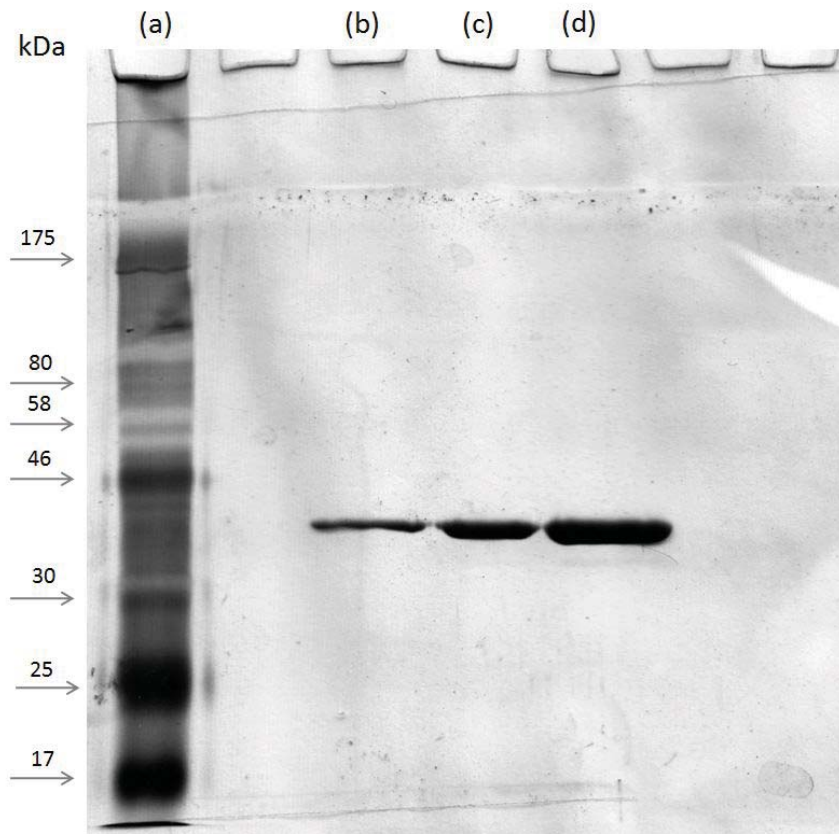


Abbildung 2.6: SDS-Polyacrylamid-Gel (10%) (Silberfärbung). (a) Prestained Protein Marker, Broad Range (P7708S). Gezeigt ist die Auftrennung von (b) 0.5  $\mu\text{g}$  (c) 1  $\mu\text{g}$  und (d) 2  $\mu\text{g}$  Protein.

itiiert (Volumenverhältnis 10x F-Puffer zu Aktinlösung; 1:10) und die Lösung 1.5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Polymerlösung bei 20°C zentrifugiert ( $1.4 \cdot 10^5 \times g$ ; *Rotor* SW-60Ti, *Optima* LE-80K Ultracentrifuge), um das F-Aktin von nicht mehr polymerisationsfähigem G-Aktin zu trennen. Im Anschluss wurde das Sediment in frischem G-Puffer gelöst, homogenisiert (Dounce Homogenisator, Wheaton; 1 ml/tight) und weitere 36 h gegen frischen G-Puffer dialysiert (Pufferwechsel alle 12 h), um es zu depolymerisieren.

### 2.4.1 Probenpräparation

Experimente wurden an Polymerlösungen mit fünf unterschiedlichen Aktinkonzentrationen durchgeführt: ( $c = 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1.0 \text{ mg/ml}$ )<sup>11</sup>. Hierzu wurden

<sup>11</sup>Die Angabe der Konzentration versteht sich inklusive 10x F-Puffer.

je Konzentration eine 500  $\mu\text{l}$ - und eine 100  $\mu\text{l}$ -Lösung vorbereitet. Das kleinere Volumen wurde mit dem Farbstoff TRITC-Phalloidin (Kapitel 2.1) in einem äquimolaren Verhältnis markiert. Die Polymerisation erfolgte unter Zugabe von 10x F-Puffer. Die Proben wurden nach Initialisierung der Polymerisation für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einem Volumenverhältnis 1:1000 mit unmarkierten Filamenten gemischt<sup>12</sup>.

Nach 20 min Inkubationszeit wurde eine rechteckige Kapillare (Vitrotubes 5010, Vitrocom, Dimensionen: 0.1 x 1.0 x 50 mm; Wandstärke: 100  $\mu\text{m} \pm 10\%$ ) in die Probe gehalten. Durch die Kapillarkräfte wurde die Lösung in die Kammer gezogen. Anschließend wurde die Rechteck-Kapillare sofort mit Hämatokrit-Versiegelungskit verschlossen. Damit werden Verdunstungsverluste und ein daraus resultierendes Fließen der Lösung verhindert.

## 2.4.2 Mikroskopie

Die Mikroskopieexperimente wurden an einem inversen, konfokalen Fluoreszenzmikroskop (LSM 510 meta, Zeiss; Kapitel 2.1.1) bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Bildaufnahmen wurde ein *C-Apochromat 63x/1.2 W Korr* der Firma Zeiss verwendet. Als Anregungsquelle diente die 543 nm Linie eines Helium/Neon Lasers. Es wurde ein 488/543 Strahlteiler und ein 560 Langpass Emissionsfilter verwendet. Die Lochblende und die galvanometrischen Spiegel des konfokalen Mikroskops wurden vor der Messung kalibriert, um eine maximale Intensität bei der Beleuchtung und eine gleichmäßige Pixelgröße zu gewährleisten. Die konfokale Schichtdicke betrug 2.3  $\mu\text{m}$  ( $\emptyset$  Lochblende: 300  $\mu\text{m}$ ). Es wurden nur Filamente aufgenommen, welche auf ihrer gesamten Länge innerhalb der konfokalen Schichtdicke (Kapitel 2.1) lagen. Bei der Datenaufnahme wurde auf die Mitte der Kapillare fokussiert. Dadurch wurden ausschließlich Filamente untersucht, die keiner Wechselwirkung mit den Glaswänden der Kapillare unterlagen.

Die Größe eines Pixels wurde nach dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem [97] gewählt und betrug 0.12  $\mu\text{m} \times 0.12 \mu\text{m}$ . Von jedem analysierten Filament wurde eine

---

<sup>12</sup>Die Mischung von polymerisierten Filamenten erfolgte grundsätzlich vorsichtig unter Verwendung abgeschnittenener Pipettenspitzen (Pipette, Eppendorf Research). Dies reduziert beim Pipettieren die Scherkräfte an der Pipettenspitze und vermindert den Bruch von Filamenten.

Zeitserie von typischerweise 150 Bildern aufgenommen. Die Grauwerttiefe der Einzelbilder betrug 12 bit. Die Aufnahmezeit betrug  $1 \text{ s}^{-1}$ , mit einer durchschnittlichen Belichtungsdauer von 500 ms.

### 2.4.3 Datenanalyse

Die Programme zur Datenanalyse wurden mit Matlab (R2007a-R2010b, The Mathworks, Natick, USA) entwickelt.

#### Bestimmung der Filamentkontur

Für die Analyse der Röhrenradien in F-Aktinlösungen wurden Zeitserien, zweidimensionaler fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen, einzelner Filamente gemittelt. In Abbildung 2.7 ist dies an einem Beispiel gezeigt. Die Abbildungen (a)-(c) zeigen Einzelbilder eines Aktinfilaments aus einer Lösung mit einer Konzentration von  $c = 0.4 \text{ mg/ml}$ . Für die Darstellung in (d) wurden 150 solcher Aufnahmen gemittelt. Der gesamte Zeitraum der Aufnahmen in (d) umfasst 150 s.

Um die mittlere Kontur der Intensitätsverteilung in den zeitgemittelten Bildern zu finden, wurde von Dr. Norbert Kirchgeßner<sup>13</sup> ein Programm basierend auf dem sogenannten *Snake*-Algorithmus [98, 99] geschrieben. Als Startpositionen für den Algorithmus wurden einige Stützpunkte entlang der Intensitätskontur manuell im zeitgemittelten Bild vorgegeben. Der Algorithmus berechnet zusätzliche Punkte in einem vorgegebenen Abstand. Für die hier beschriebene Auswertung wurde der Punktabstand auf  $\sim 500 \text{ nm}$  gesetzt. Bei der Berechnung von Positionen entlang der Röhrenkontur basierend auf dem *Snake*-Algorithmus werden zwei Kriterien gleichermaßen berücksichtigt. Die errechneten Koordinaten sollen einen möglichst hohen Grauwert besitzen, gleichzeitig dürfen sie aber nicht zu weit von den benachbarten Punkten entfernt liegen. Es werden also keine großen Krümmungen zwischen den Positionen zugelassen. Auf diese Weise wurde für jedes Filament eine diskrete Positionsfolge in dem vorgegebenen Abstand von  $\sim 500 \text{ nm}$  gefunden, welche das Maximum der Intensitätsverteilung nach visueller Prüfung gut repräsentiert.

Das Röhrenmodell (Kapitel 1.2.2) ist für Filamente gültig, welche auf ihrer gesamten Länge von anderen Filamenten eingeschränkt werden. Während für die Gesamtlänge

---

<sup>13</sup>Derzeitige Adresse: ETH Zürich, Institut f. Agrarwissenschaften.

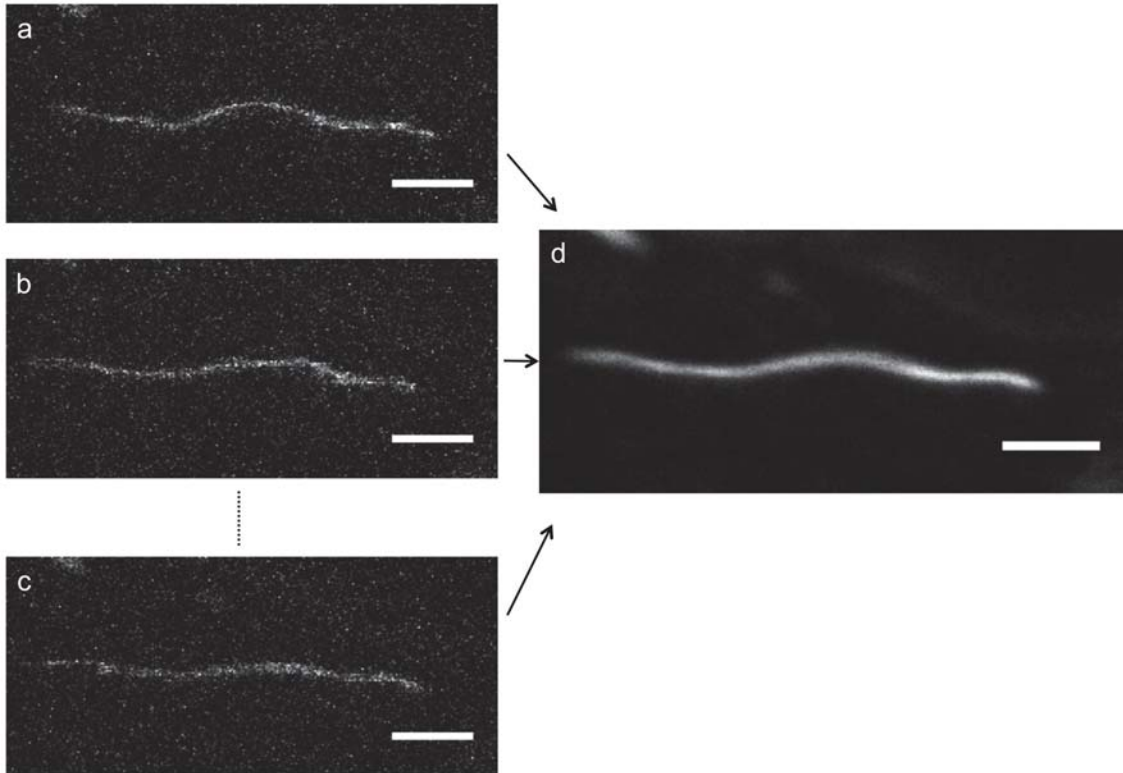


Abbildung 2.7: Darstellung der zeitlichen Überlagerung von Einzelbildern, zweidimensionaler fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen, eines Filaments in einer Aktinlösung ( $c = 0.4 \text{ mg/ml}$ ). (a)-(c) Drei Beispiele von insgesamt 150 Einzelaufnahmen über einen Zeitraum von 150 s; (d) Zeitliche Mittelung aus den 150 Einzelaufnahmen. Maßstab:  $5 \mu\text{m}$ .

eines Filaments die Reptation aus seiner Röhre innerhalb der Dauer des Experiments sehr unwahrscheinlich ist (Kapitel 1.2.2), gilt dies nicht zwangsläufig für die Enden von Filamenten. Diese erfahren unter Umständen wechselnde topologische Umgebungsbedingungen. Da diese speziellen Effekte an den Filamentenden die Analyse der Röhrenradien beeinflussen können, wurden die Endbereiche der Punktkoordinaten in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt. In Abbildung 2.8 ist diese Vorgehensweise am Beispiel des zeitgemittelten Bildes aus Abbildung 2.7 d gezeigt.

### Bestimmung der Röhrenradien

Die so erhaltene diskrete Punktfolge wurde nach der Bogenlänge  $s$  parametrisiert und mit einer approximierenden Spline-Kurve  $f(s)$  angenähert. Spline-Kurven sind stückweise aus Polynomen (hier 4-ten Grades) zusammengesetzt. Die Anzahl der Knotenpunkte, also Stellen an denen sich die Polynome berühren, ist so gewählt,

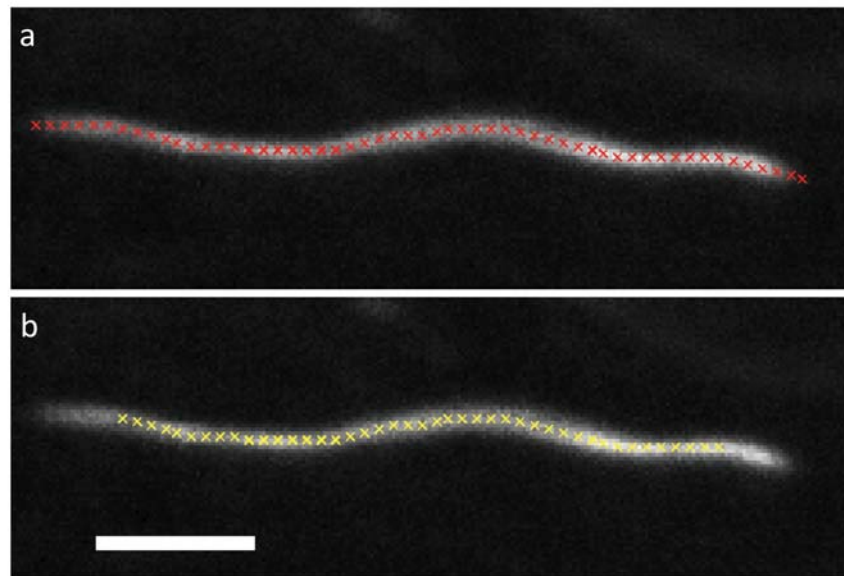


Abbildung 2.8: **(a)** Zeitlich gemittelttes Bild: Rote Kreuze repräsentieren die Positionen aus dem Algorithmus zum Finden der Filamentkontur. **(b)** Die gelben Kreuze zeigen die neuen Punktkoordinaten ohne Berücksichtigung der Endbereiche. Maßstab 5  $\mu\text{m}$ .

dass bei jedem Filament die Knotenpunkte in einem Abstand von etwa 2  $\mu\text{m}$  liegen. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.9 für das in Abb 2.8 b gezeigte Filament dargestellt.

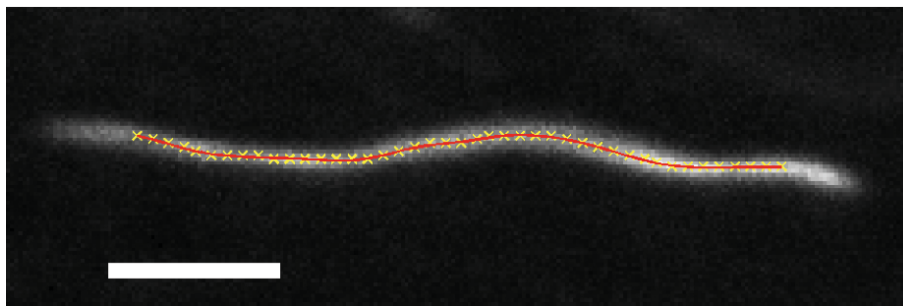


Abbildung 2.9: Gezeigt ist die Anpassung einer approximierenden Spline-Kurve (rote Linie) an die Koordinaten (gelbe Kreuze) entlang der Filamentkontur aus Abbildung 2.8 b. Maßstab 5  $\mu\text{m}$ .

Im nächsten Schritt wurde in Abständen von  $\sim 60$  nm entlang der Kontur<sup>14</sup>. Dies ist in Abbildung 2.10 das Intensitätsprofil senkrecht zur Spline-Kurve auf einer Länge von  $\sim 3$   $\mu\text{m}$  ermittelt dargestellt. Hierbei markiert in Abb. 2.10 a die weiß gestri-

<sup>14</sup>60 nm entsprechen in etwa einem halben Pixel

chelte Linie die Stelle, an der das in Abb. 2.10 b dargestellte Intensitätsprofil (blaue Kreuze) ermittelt wurde. Die durchgezogene rote Linie repräsentiert die Anpassung einer Gauß-Funktion an die Daten:

$$f(x) = y \cdot \exp\left(-\frac{1}{2} \left(\frac{x - x_{max}}{r_{exp}}\right)^2\right) + y_0 \quad (2.12)$$

Die Standardabweichung der Gauß-Funktion  $r_{exp}$  ist der Radius der Röhre. Dieser Radius ist jedoch mit der PSF des abbildenden Systems verwaschen (Kapitel 2.1.3). Die Vorgehensweise zur Korrektur dieses Einflusses ist in Kapitel 3.1.2 gezeigt.

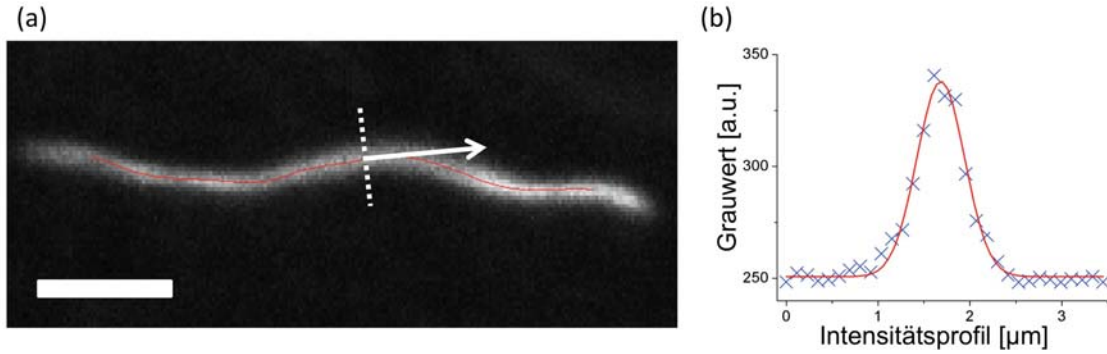


Abbildung 2.10: **(a)**: Zeitlich gemittelte Darstellung des Bildes aus Abb. 2.7 d. Die weiß gestrichelte Linie markiert die Stelle, an der das in (b) dargestellte Intensitätsprofil quer zur Tangente (weißer Pfeil) ermittelt wurde. **(b)** Blaue Kreuze: Grauwerte entlang der gestrichelten Linie in (a). Rote Linie: Anpassung einer Gauß-Funktion an die Grauwerte des Intensitätsprofils.

### Bestimmung der Autokorrelationsfunktion entlang der Röhrenkontur

Abbildung 2.11 zeigt die so ermittelten Röhrenradien entlang der Röhrenkontur des Beispielfilaments aus Abbildung 2.10.

Für die Analyse der Autokorrelationsfunktion entlang der Bogenlänge  $s$  wurde die Autokorrelationsfunktion (AKF) für jedes einzelne Filament folgendermaßen berechnet:

$$AKF(l) = \frac{\sum_{s=0}^N (r_s - \langle r \rangle) (r_{s+l} - \langle r \rangle)}{\sum_{s=0}^N (r_s - \langle r \rangle)^2} \quad (2.13)$$

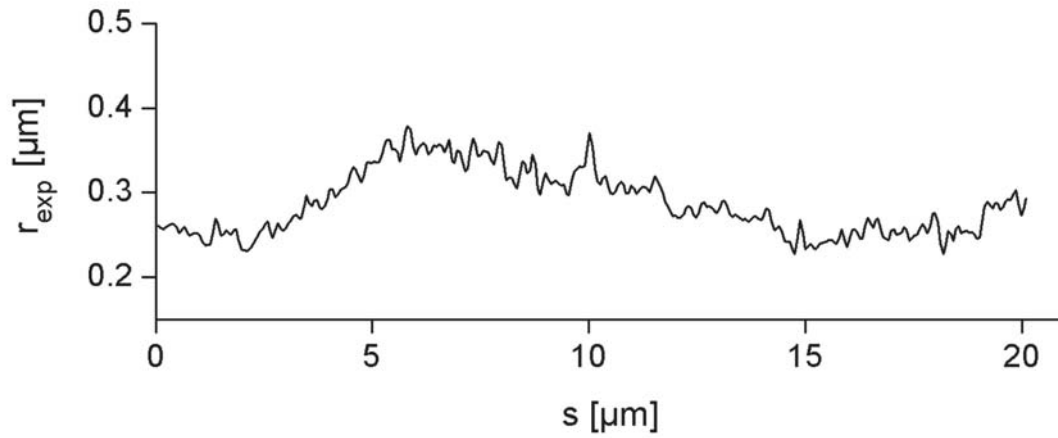


Abbildung 2.11: Gezeigt ist der Betrag der Röhrenradien, ermittelt entlang der Bogenlänge  $s$  des Beispielfilaments aus Abb. 2.10 a

Hierbei ist  $r = r_{\text{exp}}$ ,  $s$  Bogenlänge und  $l = \Delta s$  (Kapitel 1.2) in diskreten Schritten von  $\sim 60$  nm.  $N = L - l$ , wobei  $L$  die Konturlänge ist.

Für jede Aktin-Konzentration wurde der Mittelwert aller Autokorrelationsfunktionen bestimmt.

## 2.5 Polymerlösungen unter Scherung

Die Experimente zur Untersuchung von Polymerlösungen unter Scherung wurde in Kollaboration mit Priv. Doz. Dr. Pavlik Lettinga und Donald Guu (Institute of Complex Systems: Weiche Materie (ICS-3), Arbeitsgruppenleiter Prof. Dhont) durchgeführt.

### 2.5.1 Probenpräparation

Die Experimente unter Scherung wurden an Polymerlösungen fünf verschiedener Aktin-Konzentrationen durchgeführt:  $\sim 0.15 \cdot 10^{-3}$ , 0.02, 0.08, 0.15 und 0.3 mg/ml. Für die Untersuchungen wurde ausschließlich frisches, nicht lyophilisiertes Aktin verwendet. Für die Markierung von Aktin-Filamenten wurden entweder 100  $\mu$ l Proben<sup>15</sup> einer 0.2 mg/ml oder einer 0.6 mg/ml Aktinlösung präpariert und mit Atto-647N-Phalloidin in einem äquimolaren Verhältnis markiert. Die Polymerisation wurde mit 10% 10x F-Puffer initialisiert und die Proben 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Unmarkiertes Aktin wurde in drei verschiedenen Lösungskonzentrationen präpariert:  $c = 0.2, 0.3$  und 0.6 mg/ml. Die Polymerisation der Aktinlösung erfolgte in Anwesenheit von reinem Phalloidin (ohne Farbstoff) in einem äquimolaren Verhältnis, unter Zugabe von 10x F-Puffer. Diese Proben wurden ebenfalls 1 h inkubiert.

Um markierte Filamente mit unmarkierten Filamenten zu mischen, wurden zunächst die auspolymerisierten, markierten Aktinlösungen in einem Volumenverhältnis von 1:2000 bzw. 1:4000 in 2 ml GFS-Pufferlösung (10% 10x F-Puffer, 60%-Saccharose in G-Puffer) pipettiert<sup>16</sup>.

Um Lösungen der Konzentrationen 0.15 mg/ml und 0.3 mg/ml zu präparieren, wurden die auspolymerisierten und unmarkierten Proben der Konzentrationen 0.3 mg/ml und 0.6 mg/ml im gleichen Volumenverhältnis mit den markierten 2 ml GFS-Pufferlösungen verdünnt. Die Mischung der Polymerlösungen erfolgte durch langsames Bewegen des Reaktionsgefäßes (15 ml, BD Falcon, BD Biosciences). Um Lösungen

---

<sup>15</sup>Angaben der Polymerisations-Konzentrationen verstehen sich immer inkl. 10x F-Puffer.

<sup>16</sup>Polymerisierte Lösungen wurden grundsätzlich unter Verwendung abgeschnittenener Pipettenspitzen pipettiert (Pipette, Eppendorf Research), um ein Zerreißen und nachträgliches Zusammenheilen der Filamente durch die Art der Präparation zu minimieren (Details Kapitel A.3).



der Konzentrationen 0.02 mg/ml und 0.08 mg/ml zu präparieren, wurden auspolymerisierte und unmarkierte Proben der Konzentration 0.2 mg/ml nach der Polymerisation zunächst mit GF-Puffer (10% 10x F-Puffer und 90% G-Puffer) auf 0.04 mg/ml und 0.16 mg/ml<sup>17</sup> verdünnt und anschließend mit den markierten 2 ml GFS-Pufferlösungen vermischt. Auf diese Weise entsprachen alle im Experiment verwendeten Lösungen physiologischen Pufferbedingungen und enthielten zudem eine 30 %-Saccharoselösung. Für die Lösungskonzentration  $c \approx 0.15 \cdot 10^{-3}$  mg/ml wurde eine weitere Polymerlösung präpariert. Hierzu wurde 1  $\mu$ l der markierten Polymerlösung ( $c = 0.6$  mg/ml) zunächst mit 2 ml GF-Puffer verdünnt und anschließend mit 2 ml GFS-Pufferlösung vermischt. Damit ergab sich eine Endkonzentration von  $\sim 0.15 \cdot 10^{-3}$  mg/ml. In Aktinlösungen dieser geringen Konzentration können die Filamente als isoliert betrachtet werden (Kapitel 1.2.5).

In allen Experimenten wurden schließlich 3.5 ml der jeweiligen Polymerlösung in die Scherkammer auf zuvor mit Analyse-Ethanol gereinigte Deckgläser pipettiert.

## 2.5.2 Mikroskopie und Scherprotokoll

Die Experimente zur Untersuchung von Polymerlösungen unter Scherung wurden an dem konfokalen Vielfach-Lochblenden-System durchgeführt, welches in Kapitel 2.1.2 beschrieben wurde.

Es wurden Messungen an fünf unterschiedlichen Lösungskonzentrationen durchgeführt:  $c = 0.15 \cdot 10^{-3}$ , 0.02, 0.08, 0.15 und 0.3 mg/ml. An allen Lösungen wurde ein Experiment mit ansteigender Scherrate (Kapitel 2.2), wie es in Abbildung 2.12 a skizziert ist, durchgeführt. Auf der linken y-Achse ist die Entwicklung der Deformationsamplitude  $\gamma$  (Kapitel 1.2.5) dargestellt und auf der gegenüberliegenden y-Achse die entsprechende Scherrate  $\dot{\gamma}$ . Der Zusammenhang zwischen Deformationsamplitude und Scherrate ist über  $\gamma = \dot{\gamma} \cdot t$  gegeben. Hierbei ist  $t$  die Dauer der Scherung. Die Erhöhung der Scherrate erfolgte nicht kontinuierlich, sondern gemäß einer Stufenfunktion. Im Experiment lag die Scherrate zu Beginn bei  $0.08 \text{ s}^{-1}$ . Nach jeweils 5 min wurde die Scherrate auf  $0.17 \text{ s}^{-1}$ ,  $0.25 \text{ s}^{-1}$  und  $0.33 \text{ s}^{-1}$  erhöht. Nach weiteren 5 min wurde die Scherung der Polymerlösung beendet.

---

<sup>17</sup>Im Rahmen dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass eine Polymerisation unter 0.2 mg/ml nicht sinnvoll ist, da keine reproduzierbaren Polymerisationsergebnisse erzielt werden konnten.

Ein weiteres Scherexperiment wurde an F-Aktinlösungen der Konzentrationen  $c = 0.02, 0.08$  und  $0.15$  mg/ml durchgeführt. Dieses ist in Abb. 2.12 b skizziert. Bei diesem Experiment wurden die Lösungen für 5 min mit einer konstanten Scherrate von  $0.33$  s<sup>-1</sup> geschert. Nach weiteren 5 min ohne Scherung wurde die Probe für 1 min mit einer Rate von  $37$  s<sup>-1</sup> geschert.

Für beide Experimente wurde eine Zeitserie von konfokalen Bilderstapeln (Grauertiefe: 12 bit) aufgenommen ( $150$   $\mu\text{m}$  x  $150$   $\mu\text{m}$  lateral und  $50$   $\mu\text{m}$  axial). Die erste aufgenommene konfokale Schicht der Bilderstapel lag  $30$   $\mu\text{m}$  hinter dem Deckglas (geometrische Weglänge). Dies gewährleistete, dass nur Filamente analysiert wurden, die nicht einer Wechselwirkung mit dem Deckglas unterlagen. Der Abstand zwischen den Einzelbildern innerhalb eines Bilderstapels entlang der optischen Achse betrug  $1$   $\mu\text{m}$ . Die Belichtungsdauer für jedes Bild betrug  $100$  ms, die Aufnahmedauer für einen gesamten Bilderstapel  $\sim 7.2$  s. Die Aufnahmedauer des in Abb. 2.12 a skizzierten Experiments betrug insgesamt  $\sim 23$  min und für das in (b) skizzierte Experiment  $15$  min.

Die Analyse der Bilddaten, wie sie im folgenden Kapitel beschrieben werden, wurden in Abhängigkeit von Deformationsamplitude  $\gamma$  bzw. Scherrate  $\dot{\gamma}$  durchgeführt.

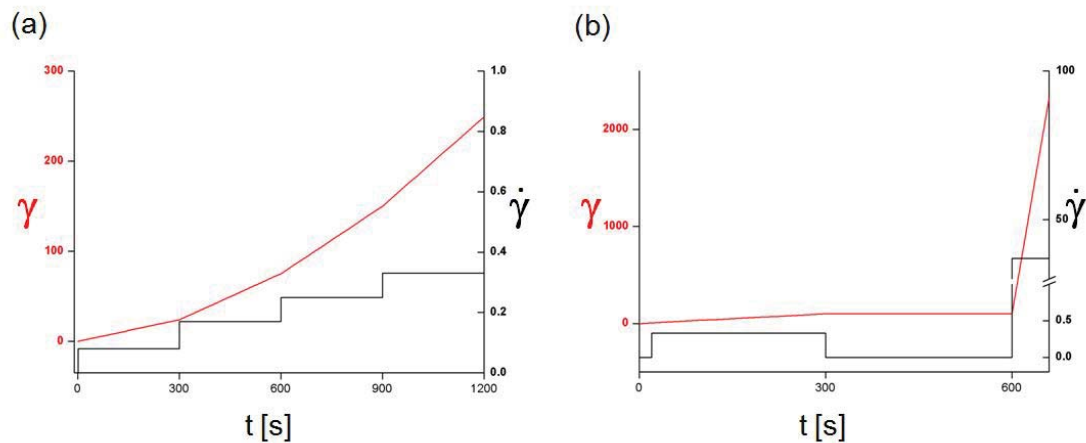


Abbildung 2.12: Skizzierung der Scherprotokolle. Gezeigt sind die Scherrate  $\dot{\gamma}$  (schwarze Linie) und die entsprechende Deformationsamplitude  $\gamma$  (rote Linie) als Funktion der Scherdauer  $t$ . (a) Experiment mit ansteigender (gemäß einer Stufenfunktion) Scherrate  $\dot{\gamma}$ . (b) Experiment mit konstanter und anschließend sehr hoher Scherrate  $\dot{\gamma}$ .

Als Referenzmessung zu den Analysen gescherter Polymerlösungen dienten Bildaufnahmen ungescherter ( $\gamma = 0$ ) Lösungen. Diese wurden jeweils vor einem Scherexpe-

riment vor dem Aufsetzen des Konus aufgenommen. Die Aufnahmeparameter waren dabei entsprechend dem nachfolgend durchgeführten Scherexperiment gewählt.

### 2.5.3 Datenanalyse

Die Analyse der Daten wurde sowohl mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ [43] als auch mit Matlab (R2010b, The Mathworks, Natick, USA) durchgeführt.

#### Bestimmung der Filamentkontur

Zunächst wurde der konfokale Bilderstapel auf ein Bildvolumen reduziert, welches nur ein zu analysierendes Filament enthielt (Abb. 2.13 a). Dieser Schritt der Auswertung wurde manuell durchgeführt. Anschließend wurde das auf diese Weise ermittelte Bildvolumen auf die xy-Ebene projiziert (Abbildung 2.13 b). Für die Bestimmung der Filamentkontur wurden die maximalen Werte der Intensitätsverteilung der Grauwerte im projizierten Bild visuell identifiziert und manuell bestimmt (Abb. 2.13 c). Diese Analyse wurde für alle markierten Filamente ( $\sim 40$ ) in einem Bilderstapel durchgeführt.

#### Berechnung der Konturlänge $L$ und des End-zu-End Abstandes $R$

Der Abstand  $R$  zwischen den Filamentenden wurde wie folgt berechnet:

$$R = \sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2} \quad (2.14)$$

Hierbei sind  $\Delta x$  und  $\Delta y$  die Abstände zwischen den Koordinaten der Endpunkte des Filaments in x- und y-Richtung.

Die Konturlänge  $L$  der Filamente wurde über die kumulative Summe der Abstände zwischen den manuell bestimmten Koordinaten berechnet.

#### Analyse der mittleren Orientierung der Filamente

An die Koordinaten der Filamentkontur wurde eine approximierende Spline-Kurve  $\mathbf{f}(s)$  angepasst (Abb. 2.14 a). Die Spline-Kurven sind aus Polynomen 4-ten Grades zusammengesetzt. Die Anzahl der Knotenpunkte (Kapitel 2.4.3) ist so gewählt, dass bei jedem Filament die Knotenpunkte in einem Abstand von etwa  $2 \mu\text{m}$  liegen.

Die erste Ableitung der Spline-Kurve  $\mathbf{f}(s)$  nach der Bogenlänge  $s$  liefert die Richtung

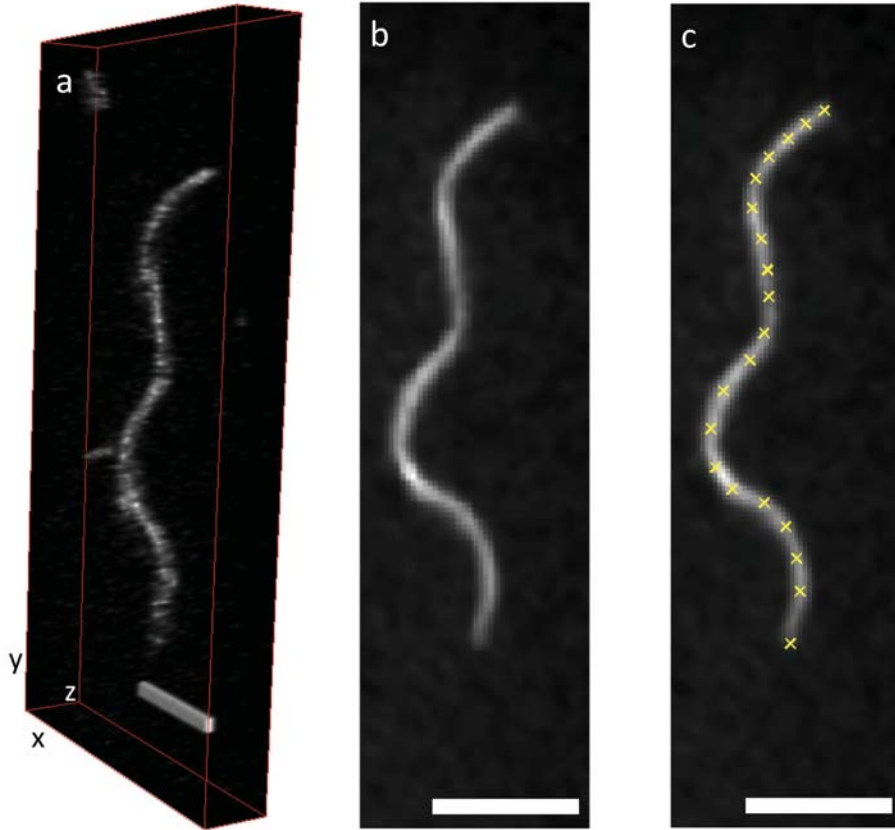


Abbildung 2.13: Darstellung der Bestimmung der Filamentkontur anhand eines Beispiels. In **a**) ist ein Volumen gezeigt, welches ein einzelnes Filament in einer Aktinlösung ( $c = 0.15 \text{ mg/ml}$ ) enthält (Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Konfokales Vielfach-Lochblenden-System, Kapitel 2.1.2). **b**) Projektion des Volumens aus (a) auf die  $xy$ -Ebene. **c**) Gelbe Kreuze zeigen die manuell bestimmten Positionen entlang der Filamentkontur. Maßstab:  $10 \mu\text{m}$ .

der Tangenten  $\mathbf{t}$  in jedem Punkt  $s$ :

$$\mathbf{t}(x, y) = \frac{d\mathbf{f}(s)}{ds} \quad \text{mit} \quad \left| \frac{d\mathbf{f}(s)}{ds} \right| = 1 \quad (2.15)$$

Mit  $x$  und  $y$ : Komponenten des Tangentenvektors. In Abbildung 2.14 b sind am Beispiel der Spline-Kurve aus (a) exemplarisch die Tangenten entlang der Kurve in einem Abstand von  $\sim 1.5 \mu\text{m}$  dargestellt.

Der Winkel  $\varphi$  der Tangenten relativ zum Vektor der Schergeschwindigkeit  $\mathbf{v}$  (Kapitel 1.2.5) wurde entlang der Kurven in einem diskreten Abstand  $\Delta s$  von  $\sim 300 \text{ nm}$

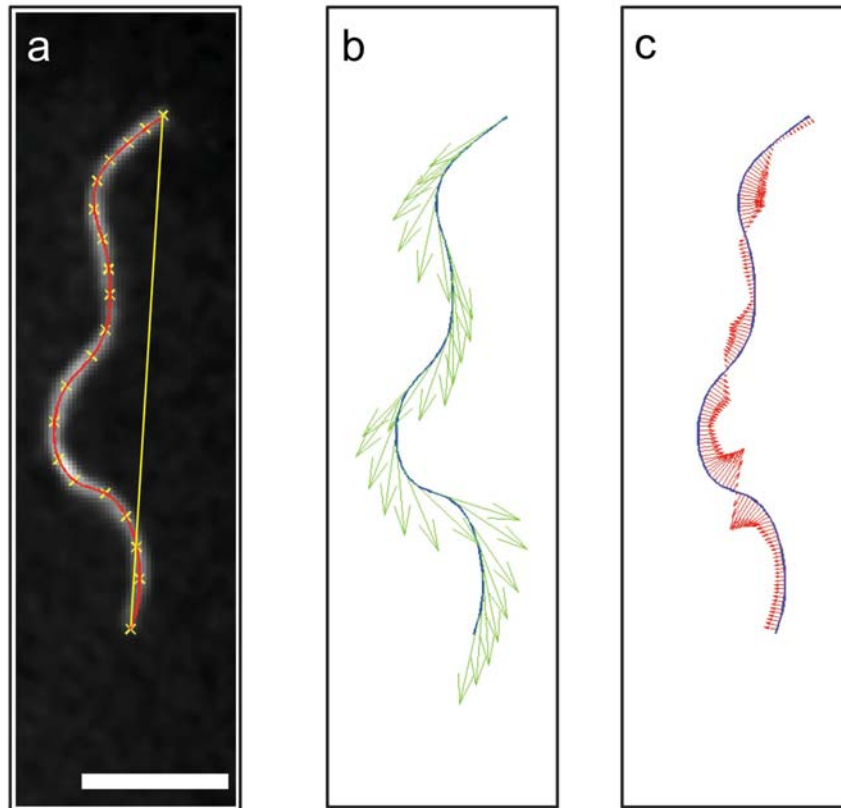


Abbildung 2.14: **(a)** Darstellung der approximierenden Spline-Kurve (rot) innerhalb der projizierten Abbildung aus Abb. 2.13 c. Die gelben Kreuze repräsentieren die manuell bestimmten Positionen entlang der Filamentkontur. Die gelbe Linie zeigt den End-zu-End-Abstand  $R$ . Maßbalken:  $10\ \mu\text{m}$ . **(b)** Darstellung der Tangenten (grüne Pfeile) entlang der Spline-Kurve (blau) in einem Abstand von  $\sim 1.5\ \mu\text{m}$ . **(c)** Darstellung der Krümmungen  $\zeta(s)$  (rote Pfeile) in einem Abstand von  $\sim 300\ \text{nm}$  entlang der Spline-Kurve.

wie folgt berechnet:

$$\varphi = \tan^{-1} \left( \frac{t(x)}{t(y)} \right) \cdot \frac{180}{\pi} \quad (2.16)$$

Als Referenz gilt die Richtung des Vektor der Schergeschwindigkeit  $\mathbf{v}$  mit einem Winkel von  $\varphi = 0^\circ$ . Die Werte senkrecht dazu betragen demzufolge  $-90^\circ$  bzw  $90^\circ$ . Für die Analyse der mittleren Orientierung der Filamente in jedem Bilderstapel wurde die Häufigkeitsverteilung der Winkel  $\varphi$  aller Filamente berechnet.

### Berechnung des Ordnungsparameters

Der Ordnungsparameter wurde mittels eines auf Matlab basierten Programms errechnet. Dieses wurde von Dr. Ronald Springer (ICS-7) geschrieben und beruht auf den Veröffentlichung von Eberhardt und Clarke [100]. Hierzu wurden die Eigenwerte  $\lambda$  folgender Matrix bestimmt:

$$a_{ij} = \frac{1}{n} \left( \sum_{k=1}^n a_i^k a_j^k \right) = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix} \quad i, j = 1, 2 \quad (2.17)$$

Mit  $n$  Anzahl der Winkel  $\varphi^k$  für jeden Bilderstapel,  $k = 1 \dots n$ , und den Elementen:

$$a_{11}^k = \sin^2 \varphi^k$$

$$a_{12}^k = \cos \varphi^k \cdot \sin \varphi^k$$

$$a_{21}^k = \cos \varphi^k \cdot \sin \varphi^k$$

$$a_{22}^k = \cos^2 \varphi^k$$

Gewöhnlich ist ein Ordnungsparameter im Wertebereich von 0 bis 1 definiert, mit  $S = 0$  für isotrope Verteilungen. Da für die Bestimmung eines Ordnungsparameters in dieser Arbeit zur Berechnung jedoch der größte Eigenwert  $\lambda$  der Matrix (Formel 2.17) verwendet wurde ist  $S$  im Wertebereich von 0.5 bis 1 definiert. So ist  $S = 0.5$  für isotrope Verteilungen und  $S = 1$  bei maximale Ausrichtung der Filamente.

### Analyse der Häufigkeitsverteilung von Filament-Krümmungen

Die Krümmungen  $\zeta(s)$  als Funktion der Bogenlänge  $s$  wurden über die zweite Ableitung der Spline-Kurve nach der Bogenlänge bestimmt:

$$\zeta(s) = \frac{d^2 \mathbf{f}(s)}{ds^2} = \frac{x'(s) \cdot y''(s) - x''(s) \cdot y'(s)}{(x'(s)^2 + y'(s)^2)^{3/2}} \quad (2.18)$$

Das Ergebnis der Krümmung hängt von der Diskretisierung der Bogenlänge  $\Delta s$  ab. In dieser Auswertung betrug  $\Delta s \approx 300$  nm. In Abbildung 2.14 c ist die  $\zeta$  entlang der Spline-Kurve aus Abb. 2.14 a dargestellt. Die Häufigkeitsverteilung der Krümmungen wurde für alle Filamente eines Bilderstapels berechnet.

### Fehlerbetrachtung

Da für jedes Experiment und jede Konzentration eine Messung durchgeführt wurde, ist die Angabe eines systematischen Messfehlers, z.B. verursacht durch die Präparation der Lösung vor der eigentlichen Messung, nicht möglich. In der Darstellung von Häufigkeitsverteilungen der analysierten Parameter ( $L$ ,  $R/L$ ,  $\varphi$ ,  $\zeta$ ) wird in dieser Arbeit, sofern nicht anders angegeben, die Varianz zwischen den Häufigkeitsverteilungen von jeweils drei aufeinanderfolgenden Bilderstapeln als Fehler angegeben:

$$\sigma_v(K) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X(K)_i - \langle X(K) \rangle)^2} \quad (2.19)$$

Mit  $K$  Anzahl der Klassen der untersuchten Wertebereiche und  $X = L$ ,  $R/L$ ,  $\varphi$ ,  $\zeta$ .  $X(K)_i$  Ergebnis für jede Klasse  $K$  der  $i$ ten ( $i = 1, 2, 3$ ) Messung und  $\langle X(K) \rangle$  Mittelwert von  $X(K)$  aus den  $n = 3$  Einzelmessungen.

Bei der Angabe von Mittelwerten bezüglich des Ordnungsparameters  $\langle S \rangle$ , der Konturlängen  $\langle L \rangle$  und des normierten End-zu-End Abstandes  $\langle R/L \rangle$  in Abhängigkeit von  $c$  bzw.  $\gamma$  ist als Fehler ebenfalls die Varianz zwischen den einzelnen Ergebnissen von jeweils drei ausgewerteten Bilderstapeln angegeben:

$$\sigma_v = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \langle X \rangle)^2} \quad (2.20)$$

Mit  $X = S$ ,  $L$ ,  $R/L$  für jeden einzelnen Bilderstapel ( $n = 3$ ) und  $\langle x \rangle$  Mittelwertbildung über  $X$ .

Sofern bei der Darstellung der Ergebnisse der Referenzmessungen ( $\gamma = 0$ ) der Mittelwert bzw. die mittlere Häufigkeitsverteilung aus allen acht Referenzmessungen angegeben ist, so ist der Fehler ebenfalls über die Varianz (Formel 2.19), hier mit  $n = 8$ , berechnet.

In Darstellungen in denen das Ergebnis der Analyse eines einzelnen Bilderstapels gezeigt ist, ist kein Fehler angegeben.

Die Genauigkeit der Angabe der Deformationsamplitude  $\gamma$  wird durch die Genauigkeit der Angabe der Scherrate  $\dot{\gamma}$  beeinflusst, welche in Kapitel 2.2.1 beschrieben wird.





# 3. Verteilung der Röhrenradien in F-Aktinlösungen

## 3.1 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse aus der Analyse der Experimente zur Bestimmung der Röhrenradien zusammengefasst. Die Durchführung sowie die Analyse der Experimente sind in Kapitel 2.4 beschrieben.

### 3.1.1 Häufigkeitsverteilung von Röhrenradien

In dieser Arbeit wurde die Häufigkeitsverteilung der Röhrenradien  $P(r)$  in Abhängigkeit der Aktin-Konzentration  $c$  untersucht<sup>1</sup>. In Abbildung 3.1 sind die Ergebnisse dieser Analyse für jedes unabhängige Experiment in Abhängigkeit der Aktin-Konzentration dargestellt. Für die Aktin-Konzentrationen  $c = 0.2, 0.4$  und  $0.6$  mg/ml wurden Experimente sowohl an frischem als auch an rekonstituiertem lyophilisiertem Aktin durchgeführt. Es zeigt sich, dass  $P(r_{exp})$  für frisches und rekonstituiertes lyophilisiertes Aktin in Abb. 3.1a-c geringe Unterschiede aufweisen, die generelle Form der Verteilung jedoch gleich bleibt. Bei allen untersuchten Lösungskonzentrationen ist die Form von  $P(r_{exp})$  asymmetrisch. Die Asymmetrie zeigt

---

<sup>1</sup>Die dargestellten Häufigkeitsverteilungen der Röhrenradien  $r_{exp}$  bzw.  $r_{LSF}$  zeigen Histogramme im Wertebereich von 0 bis  $0.6 \mu\text{m}$  in 60 Klassen zu jeweils 10 nm. Die Flächen unterhalb der Kurven sind auf 1 normiert.

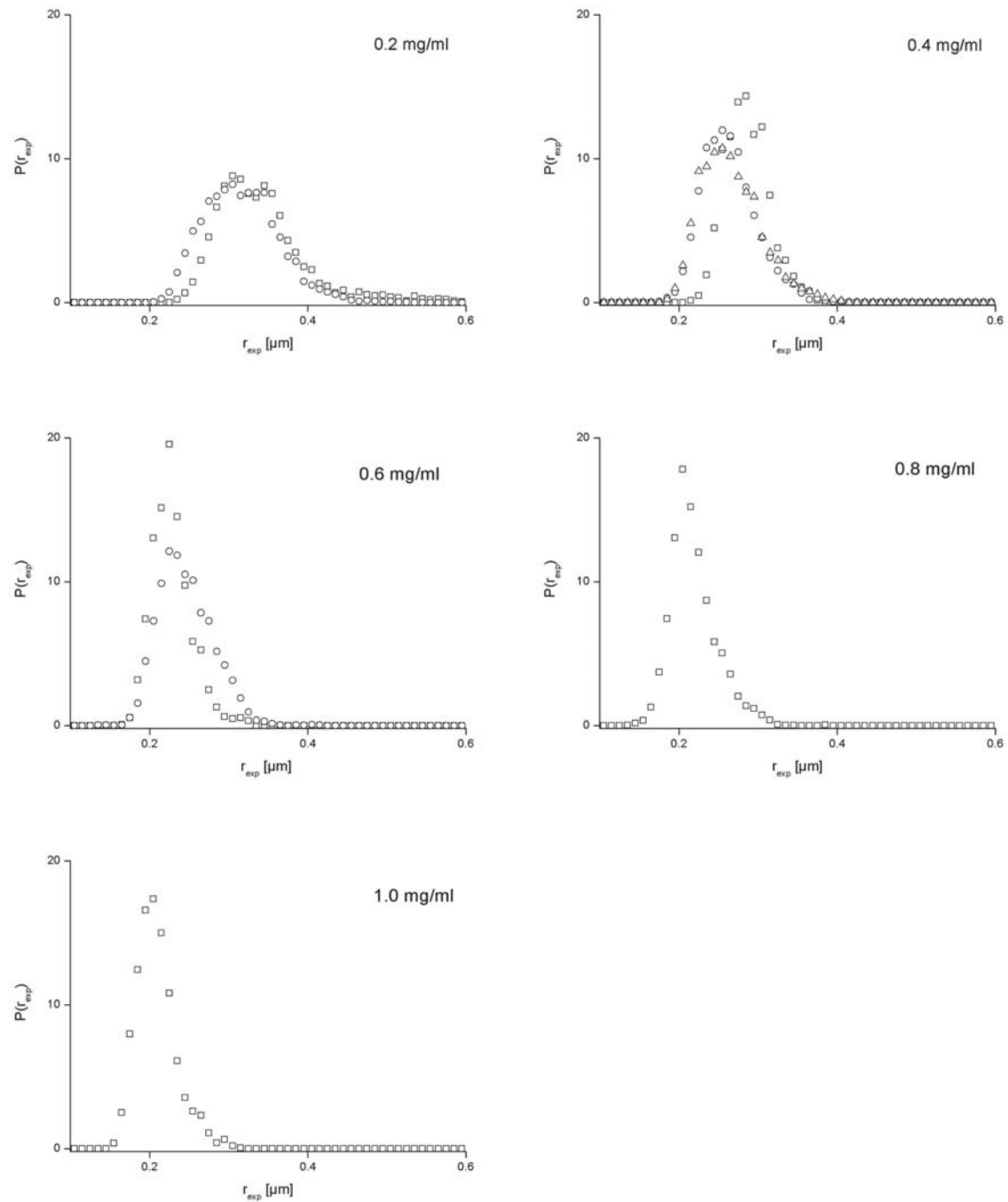


Abbildung 3.1: Ergebnis der Analyse der Häufigkeitsverteilung von Röhrenradien  $P(r_{exp})$ . Quadratsymbole: Experimente an frischem Aktin. Kreis- bzw. Dreiecksymbole: Experimente an rekonstituiertem lyophilisiertem Aktin. Die Flächen unterhalb der Kurve sind auf 1 normiert.

sich durch einen steilen Anstieg der Verteilung bei kleineren Röhrenradien und einen langgestreckten exponentiellen Abfall zu größeren Röhrenradien.

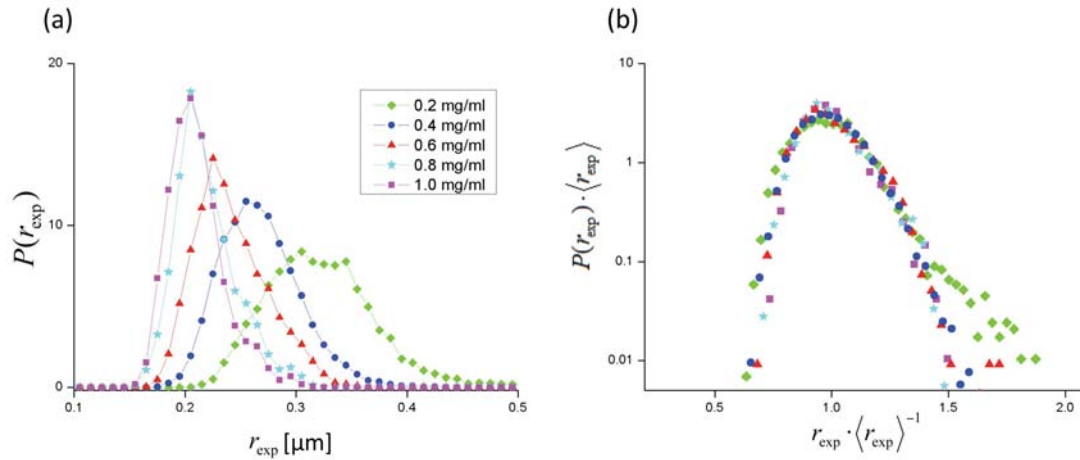


Abbildung 3.2: (a) Häufigkeitsverteilung der Röhrenradien der fünf Aktin-Konzentrationen  $c$ . Die Flächen unterhalb der Kurven sind auf 1 normiert. (b) Reskalierte Verteilung der Ergebnisse in semilogarithmischer Darstellung. Die Achsen wurden für jede Aktin-Konzentration mit dem jeweiligen Mittelwert (Tabelle 3.1, Kapitel 3.1.4) der Röhrenradien  $\langle r_{exp} \rangle$  reskaliert.

In Abbildung 3.2 a sind die Verteilungen aus Abb. 3.1 a-e in einer Abbildung dargestellt. Für die Aktin-Konzentrationen  $c = 0.2, 0.4$  und  $0.6$  mg/ml ist die mittlere Verteilung der unabhängigen Messungen aus Abb. 3.1a-c in Abhängigkeit von der Aktin-Konzentration  $c$  in einer Abbildung dargestellt. Aus den Verteilungen wird deutlich, dass  $P(r_{exp})$  mit abnehmender Aktin-Konzentration breiter ist und das Maximum von  $P(r_{exp})$  abnimmt. Abbildung 3.2 b zeigt die Häufigkeitsverteilung in reskalierter Darstellung. Der Reskalierungsparameter für jede Verteilung in Abhängigkeit der Aktin-Konzentration ist der jeweilige Mittelwert der Röhrenradienverteilung in  $\langle r_{exp} \rangle$  (Tabelle 3.1, Kapitel 3.1.4). In dieser Darstellung ist die Asymmetrie der Häufigkeitsverteilung zwischen kleinen und großen Werten der Röhrenradien gut zu erkennen. Darüber hinaus fällt auf, dass die Verteilung für  $c = 0.2$  mg/ml vom generellen Trend für große Röhrenradien abweicht. Diese Abweichung könnte darauf basieren, dass bei niedrigen Lösungskonzentrationen die Einschränkungen der Fluktuationen geringer sind als bei hohen Lösungskonzentrationen und somit höhere Fluktuationsamplituden auftreten können. Das hat zur Folge, dass bei niedrigen Lösungskonzentrationen, im Vergleich zu höheren Lösungskonzentrationen, insgesamt

mehr Fluktuationsmoden aufgenommen werden müssen, bevor die Dichteverteilung der Filamentkonturen die Röhre repräsentiert (Kapitel 1.2.2). Für die Überprüfung, ob gegebenenfalls eine zu geringe Statistik (zu geringe Aufnahmezeit) die Abweichung für  $c = 0.2 \text{ mg/ml}$  in Abb. 3.2 b von  $P(r_{exp})$  erklären kann, wurde am Beispiel des in Kapitel 2.4.3 gezeigten Filaments ( $c = 0.4 \text{ mg/ml}$ ) die Auswertungen der Röhrenradien entlang der Bogenlänge  $s$  bei einer zeitlichen Überlagerung von 150 Aufnahmen (Abb. 3.3 a) und bei einer zeitlichen Überlagerung von 30 Aufnahmen (Abb. 3.3 b) verglichen (Abb. 3.3 c).

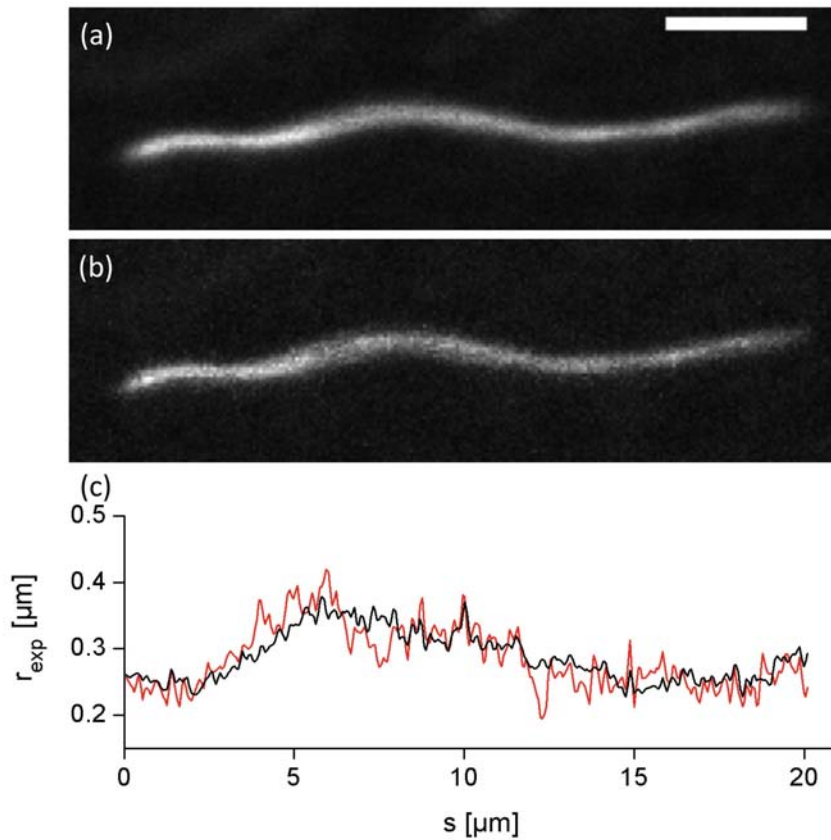


Abbildung 3.3: Zeitlich gemittelte Bilder über (a) 150 und (b) 30 Einzelaufnahmen. Maßstab: 5 µm. (c) Gezeigt ist der Betrag der Röhrenradien, ermittelt entlang der Kontur (Bogenlänge  $s$ ) der Beispielfilamente aus (a) [schwarze Linie] und (b) [rote Linie].

Bei der Analyse des über 150 Aufnahmen gemittelten Bildes <sup>2</sup> ist  $\langle r_{exp} \rangle = 0.288 \pm 0.038 \text{ µm}$  und bei dem über 30 Aufnahmen gemittelten Bildes ist  $\langle r_{exp} \rangle = 0.285 \pm 0.047 \text{ µm}$ . Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant. Demnach reicht schon 1/5 der Messzeit aus, um die Röhrenradien sicher zu bestimmen. Eine längere

<sup>2</sup>Standardabweichung:  $\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (r_i - \langle r \rangle)^2}$ ;  $n$  = Anzahl der Röhrenradien.

Messzeit verbessert jedoch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Die Abweichung für  $c = 0.2 \text{ mg/ml}$  werden durch die Aufnahmetechnik also nicht erklärt. Weitere mögliche Ursachen für die Abweichung werden in Kapitel 3.2 diskutiert.

### 3.1.2 Die Linienspreizfunktion (LSM) des abbildenden Systems

Wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, ist die Abbildung eines Objekts das Ergebnis der tatsächlichen Größe des Objekts gefaltet mit der spezifischen Auflösungsfunktion (PSF) des abbildenden Systems. Um diesen Effekt bei der weiteren Analyse der Daten aus der Röhrenradienbestimmung zu berücksichtigen, wurde die PSF des verwendeten Mikroskops (LSM 510 meta, Zeiss; Kapitel 2.1.1) bestimmt.

In Abbildung 3.4 ist das Ergebnis der dreidimensionalen PSF gezeigt. Da die Messungen der Aktin-Filamente in einer Ebene stattgefunden haben, wurde im nächsten Schritt die zweidimensionale PSF in der Ebene des konfokalen Schnitts bestimmt. Hierzu wurde an die Grauwertverteilung in jeder Ebene des Bilderstapels eine eindimensionale Gauß-Funktion in sowohl x- als auch in y-Richtung angepasst. Die Ebene mit maximaler Amplitude der Gauß-Funktion wurde als Fokusebene und somit als zweidimensionale PSF identifiziert.

Da Aktin-Filamente keine punktförmigen, sondern linienförmige Objekte sind, wird für die genaue Bestimmung der Verbreiterung der Filamentkontur die sogenannte Linienspreizfunktion (LSF) benötigt. Hierzu wurde das Bild der Kugel (in der Fokusebene) mit einer Linie gefaltet (Abb. 3.5) und senkrecht zu dieser Linie eine eindimensionale Gaußfunktion angepasst. Die Standardabweichungen der Gauß-Funktionen von insgesamt 16 analysierten Kugeln lieferte einen Wert für die LSF von  $\sigma_{LSM} = 154 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$ .

Für die Analyse des Mittelwertes der Röhrenradien wurden die Werte für  $r_{exp}$  mit  $\sigma_{LSM}$  dekonvuliert:

$$r_{LSF} = \sqrt{r_{exp}^2 - \sigma_{LSF}^2} \quad (3.1)$$

Abbildung 3.6 zeigt den Vergleich zwischen den Verteilungen aus Abb. 3.2 vor und

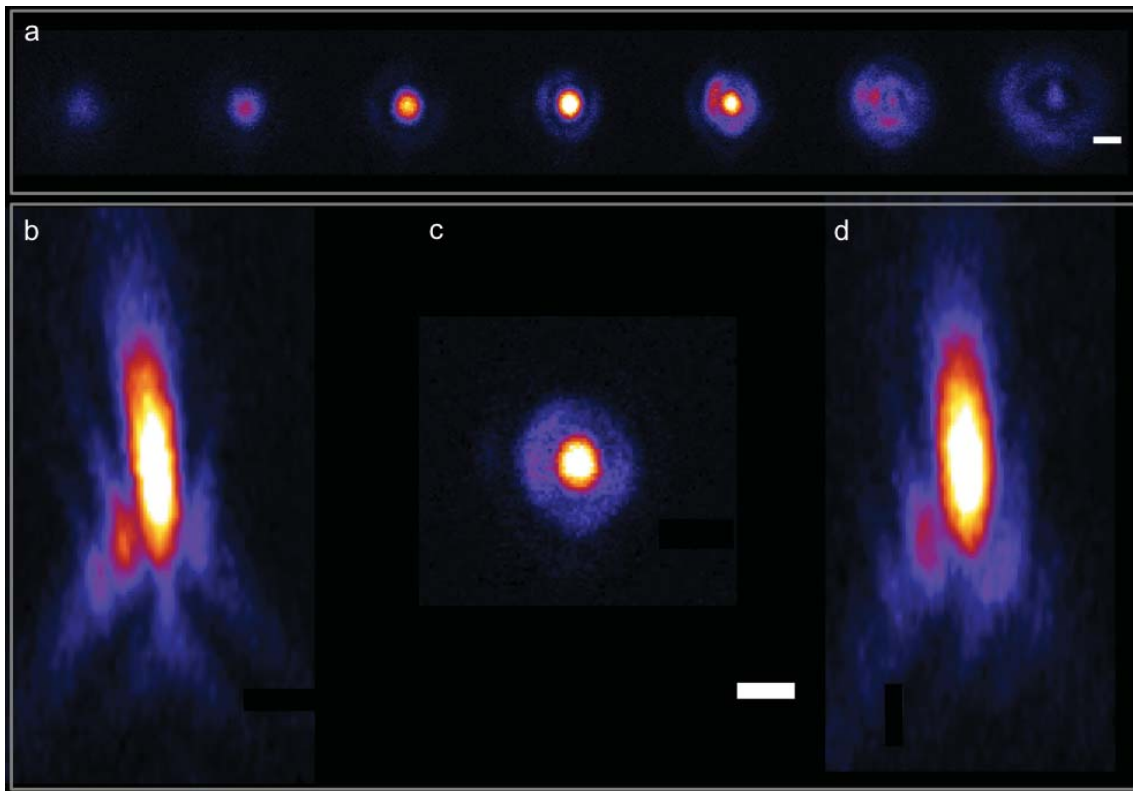


Abbildung 3.4: Experimentell bestimmte PSF des Einzel-Lochblenden-Systems (LSM 510 meta, Zeiss; Kapitel 2.1.1) (a) Abbildungen von zweidimensionalen (xy) Punktspreizfunktionen einer einzelnen fluoreszierenden Kugel in einem Abstand (entlang der optischen Achse  $z$ ) von  $1\ \mu\text{m}$ . Mittleres Bild zeigt die Ebene des konfokalen Schnitts. Diese ist in (c) vergrößert dargestellt. (b) 2D-PSF (xz) und (d) 2D-PSF (yz). (Falschfarbendarstellung) Maßstab:  $1\ \mu\text{m}$ .



Abbildung 3.5: Darstellung der 2D-PSF aus Abb. 3.4 a gefaltet mit einer Linie. (Falschfarbendarstellung) Maßstab:  $500\ \text{nm}$ .

nach der Korrektur. Mit steigender Konzentration ist die Häufigkeitsverteilung nach der Korrektur  $P(r_{\text{LSF}})$  im Vergleich zu der Verteilung der Rohdaten  $P(r_{\text{exp}})$  breiter.

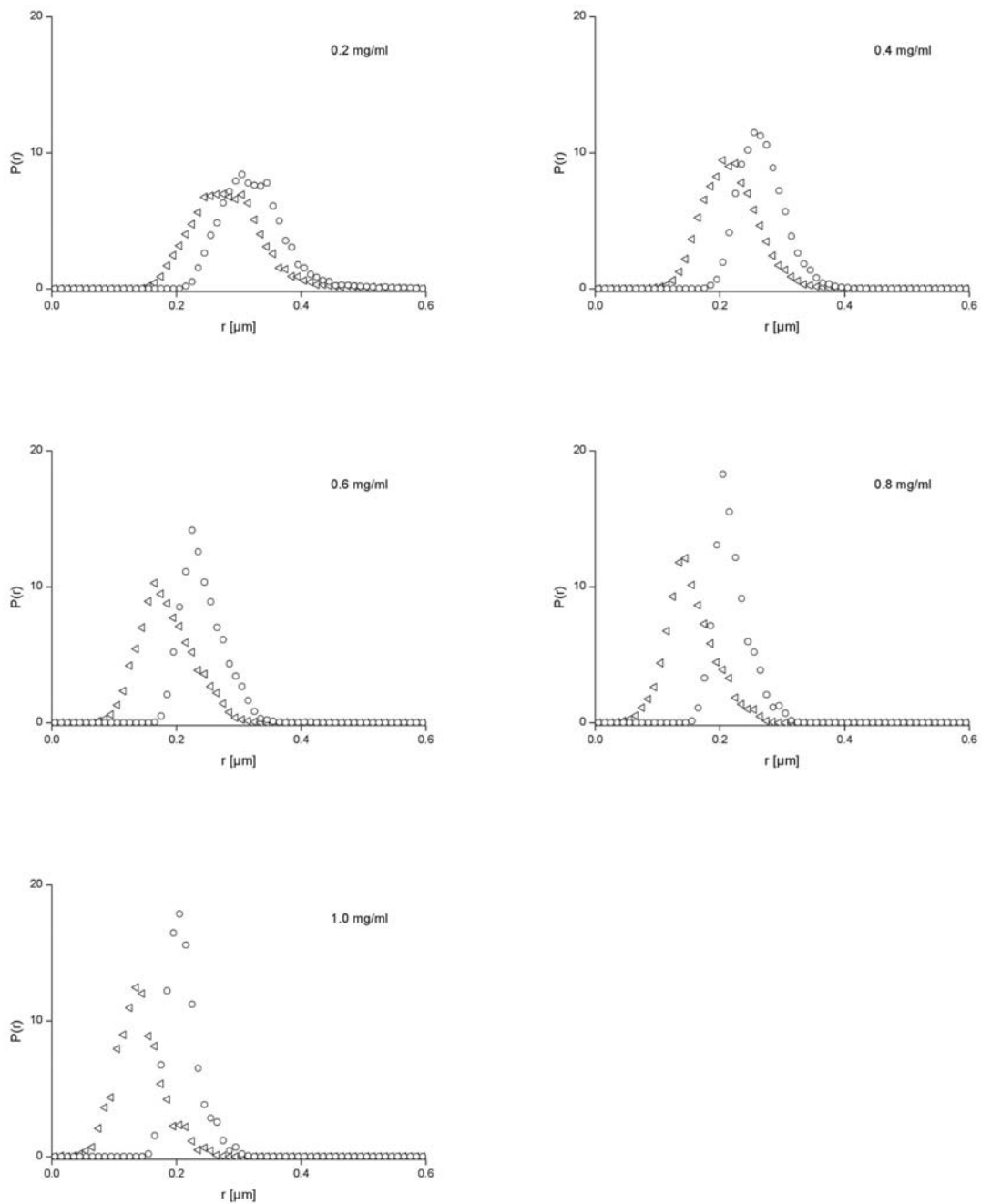


Abbildung 3.6: Vergleich zwischen den einzelnen Häufigkeitsverteilungen der Röhrenradien vor (Kreise)  $P(r_{exp})$  und nach der Korrektur (Dreiecke)  $P(r_{LSF})$  bezüglich der Linienspreizfunktion (LSF) in Abhängigkeit der Aktin-Konzentration  $c$ .

Abb. 3.7 a zeigt alle Verteilungen  $P(r_{\text{LSF}})$  in einer Darstellung. Der Unterschied zu  $P(r_{\text{exp}})$  wird besonders in der reskalierten Darstellung deutlich. Entsprechend der Vorgehensweise in Abb. 3.2 ist der Reskalierungsparameter hier  $\langle r_{\text{LSF}} \rangle$  (Tabelle 3.1, Kapitel 3.1.4). Es ist zu erkennen, dass die Datenpunkte der Häufigkeitsverteilungen nicht mehr auf einer Kurve liegen, wie es bei der Analyse der Rohdaten der Fall war (Abb. 3.2 b).

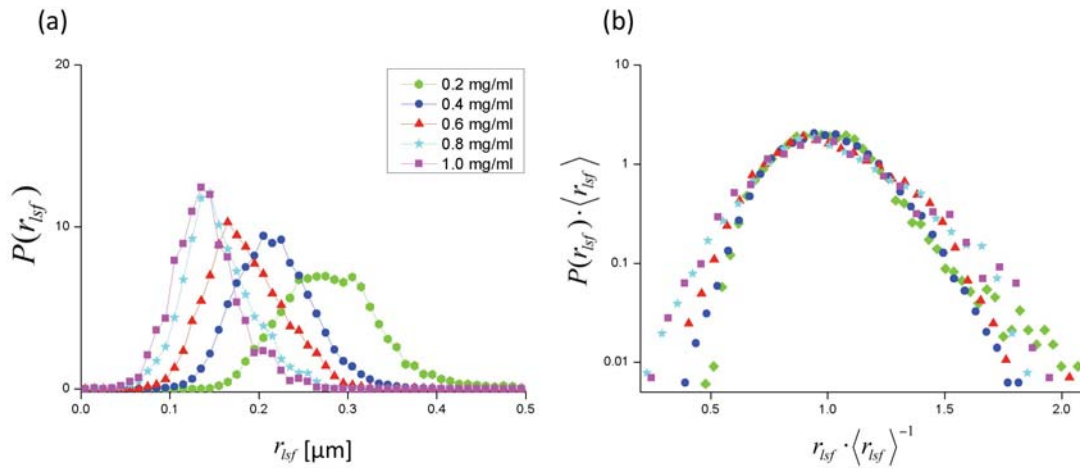


Abbildung 3.7: (a) Häufigkeitsverteilung der Röhrenradien der fünf Aktin-Konzentrationen  $c$ . (b) Reskalierte Verteilungen in semilogarithmischer Darstellung. Die Achsen wurden für jede Aktin-Konzentration mit dem jeweiligen Mittelwert der Röhrenradien  $\langle r_{\text{LSF}} \rangle$  (Tabelle 3.1, Kapitel 3.1.4) reskaliert.

Dass die Daten in Abb. 3.7 nicht mehr auf einer Kurve liegen, ist dem Nachteil der Methode der Dekonvolution bei Werten in der gleichen Größenordnung wie die Auflösungsfunktion des abbildenden Systems selbst geschuldet. Der statistische Fehler der experimentell bestimmten LSF von  $\sim 4\%$  schlägt sich bei der Korrektur von  $r_{\text{exp}}$  durch Formel 3.1 in der Fehlerfortpflanzung nicht linear, sondern quadratisch nieder. Der Einfluss der Korrektur von kleineren Werten für  $r_{\text{exp}}$  ist somit umso deutlicher. Um die Daten mit der Theorie (Kapitel 1.2.3) aus der Arbeitsgruppe von Prof. K. Kroy (Theoretische Physik, Universität Leipzig) zu vergleichen, wurde daher der Wert der LSF ( $\sigma_{\text{LSF}}$ ) in der theoretischen Funktion selbst (Formel 1.5) berücksichtigt, welche an die Rohdaten  $P(r_{\text{exp}})$  angepasst wurde.



### 3.1.3 Vergleich Theorie und Experiment

Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis der Anpassung der Theorie an die experimentell bestimmten Häufigkeitsverteilungen aus Abb. 3.2. Es ist zu erkennen, dass die Theorie mit den Daten im Konzentrationsbereich ( $c = 0.4 - 1.0 \text{ mg/ml}$ ) sehr gut übereinstimmt. Bei  $c = 0.2 \text{ mg/ml}$  hingegen ist eine signifikante Abweichung zu erkennen. Bei der Anpassung der theoretischen Funktion an alle fünf Verteilungen wurden  $l_s/l_e$  und  $\rho/c$  als freie Parameter gewählt. Sofern die Segmentlänge  $l_s$  mit der *entanglement*-Länge  $l_e$  vergleichbar ist (Kapitel 1.2.3), sollte  $l_s/l_e \approx 1$  sein, was sich für die Anpassung der Funktion bestätigte. Laut Morse [34] ist die Längen-Konzentration (Polymerlänge pro Volumen)  $\rho = 39 \mu\text{m}^{-2} \text{ ml mg}^{-1} c$ . Bei der Anpassung der Formel 1.5 an die experimentellen Daten war jedoch  $\rho = 5.95 \mu\text{m}^{-2} \text{ ml mg}^{-1} c$ , also  $\sim 6.6 x$  kleiner als erwartet. Auf die Abweichung des Parameters  $\rho$  und die Abweichung zwischen  $P(r_{exp})$  und der Theorie bei  $c = 0.2 \text{ mg/ml}$  wird in Kapitel 3.2 eingegangen.

### 3.1.4 Mittelwerte der Röhrenradien

In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der Mittelwertbestimmung für  $\langle r_{exp} \rangle$  und  $\langle r_{LSF} \rangle$  zusammengefasst. Die Abweichungen von den jeweiligen Röhrenradienmittelwerten  $\sigma_{exp}$  und  $\sigma_{LSF}$  wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (r_{X_i} - \langle r_X \rangle)^2} ; \quad X = \text{exp oder LSF} \quad (3.2)$$

Mit  $n$  Anzahl der ermittelten Röhrenradien.

Die Anzahl  $N$  der für jede Konzentration ausgewerteten Filamente ist in der zweiten Spalte der Tabelle eingetragen. Die Summe über die Konturlängen  $L$  aller  $N$  Filamente ist in der dritten Spalte aufgeführt und ist ein Maß für die Höhe der Statistik, welche der jeweiligen Auswertung zu Grunde liegt.

In Abbildung 3.9 ist die Darstellung der korrigierten Röhrenradienmittelwerte  $\langle r_{LSF} \rangle$  in Abhängigkeit von  $c$  gezeigt. Laut Semenov [31] ist  $\langle r_{LSF} \rangle$  proportional  $c^{-3/5}$ . Experimentelle Untersuchungen konnten dies bereits bestätigen [41]. Die rote Linie in Abb 3.9 zeigt eine Anpassung mit einer Funktion  $\langle r_{LSF} \rangle \propto c^{-3/5}$ . Im Rahmen der

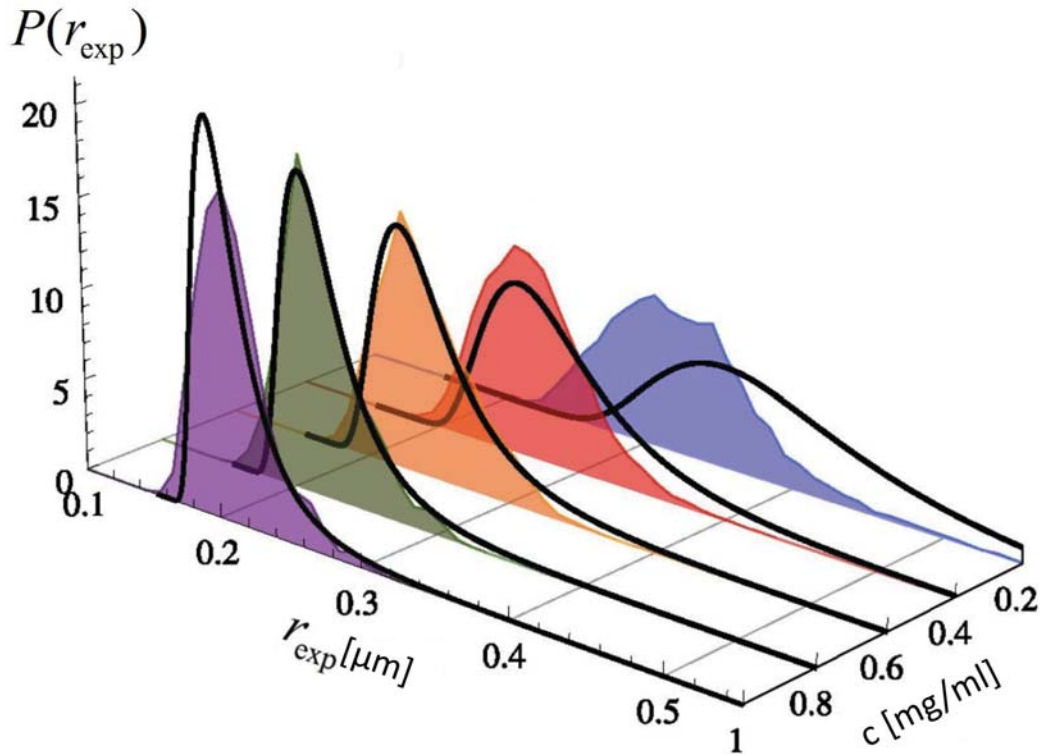


Abbildung 3.8: Ergebnis der Häufigkeitsverteilung der Röhrenradien  $P(r_{exp})$  mit einer Anpassung (schwarze Linien) der Funktion (Formel 1.5) aus der *Segment-Fluid*-Theorie [44]. Es ist eine sehr gute Übereinstimmung zwischen Experiment und Theorie im Konzentrationsbereich  $c \geq 0.4$  mg/ml zu erkennen.

experimentellen Fehlerbalken stimmen die Daten gut mit der theoretischen Vorhersage überein.

### 3.1.5 Autokorrelation der Röhrenradien

Es ist eine vernünftige Annahme, dass die Abklinglänge  $\lambda$  der AKF, mit der *entanglement*-Länge  $l_e$  skalieren sollte, welche laut Semenov [31] proportional zu  $c^{-2/5}$  ist. Um dies zu überprüfen wurde die Autokorrelation (Kapitel 2.4.3, Formel: 2.13) der Röhrenradien an allen ( $N$ , Tabelle 3.1) untersuchten Filamenten für jede der fünf Konzentrationen der Polymerlösungen analysiert. In Abbildung 3.10 a ist der Mittelwert der Autokorrelationsfunktion (AKF) in Abhängigkeit von  $c$  dargestellt. Aufgrund der limitierten Auflösung des Messsystems sind die ersten Datenpunkte artifiziell hoch korreliert. Die ersten vier Datenpunkte ( $0.23 \mu\text{m}$ ) wurden daher in

$c_M[\text{mg/ml}]$	$N$	$\sum_1^N L[\mu\text{m}]$	$\langle r_{\text{exp}} \rangle [\mu\text{m}]$	$\sigma_{\text{exp}}[\mu\text{m}]$	$\langle r_{\text{LSF}} \rangle [\mu\text{m}]$	$\sigma_{\text{LSF}}[\mu\text{m}]$
0.2	28	535	0.323	0.051	0.283	0.058
0.4	47	803	0.268	0.035	0.218	0.043
0.6	29	301	0.242	0.033	0.185	0.043
0.8	27	224	0.219	0.028	0.154	0.039
1.0	14	116	0.210	0.025	0.141	0.037

Tabelle 3.1: Ergebnisse aus der Analyse der Röhrenradien: Aktin-Konzentrationen  $c$ , die Anzahl  $N$  ausgewerteter Filamente, Summe der ausgewerteten Konturlängen  $L$ , Mittelwert der Röhrenradien ohne Korrektur  $\langle r_{\text{exp}} \rangle$  und unter Berücksichtigung der Linienstreuizfunktion (Kapitel 2.1.3),  $\langle r_{\text{LSF}} \rangle$ , mit den jeweiligen Standardabweichungen  $\sigma_{\text{exp}}$  und  $\sigma_{\text{LSF}}$ .

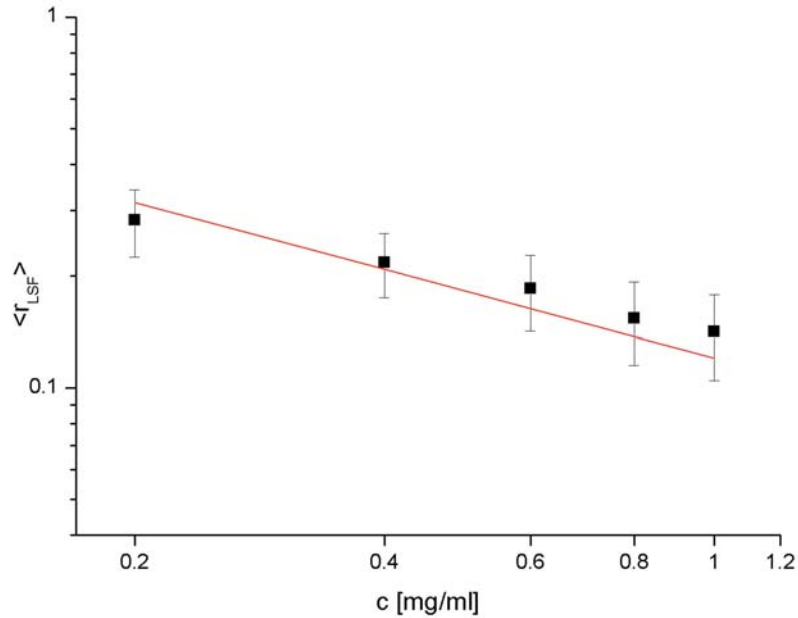


Abbildung 3.9: log-log-Darstellung der korrigierten Mittelwerte  $\langle r_{\text{LSF}} \rangle$  der Röhrenradien in Abhängigkeit der Konzentration der Polymerlösung. Rote Linie: Anpassung mit einer Funktion  $\langle r_{\text{LSF}} \rangle \propto c^{-3/5}$ .

der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Abklinglänge  $\lambda$  wurde über folgende Formel ermittelt:

$$AKF(s) = AKF(0) \left( 1 - \frac{l}{\lambda} \right) \quad (3.3)$$

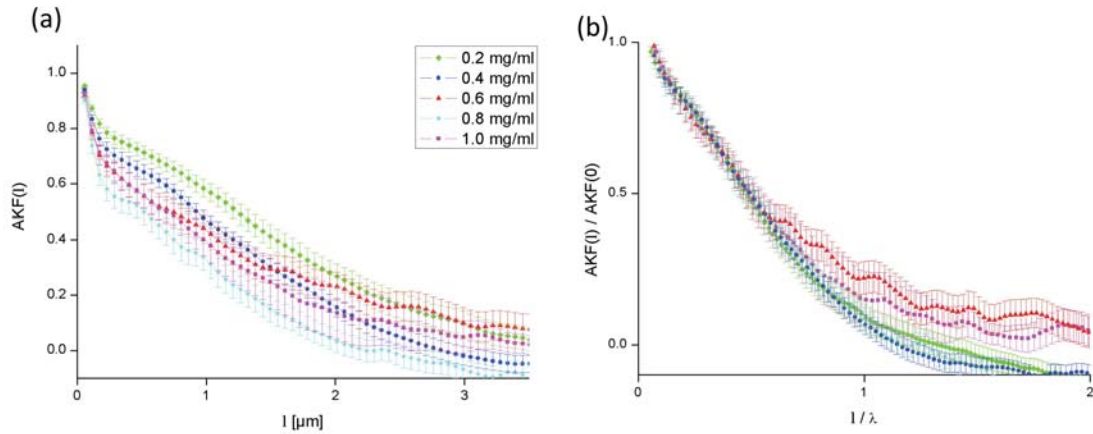


Abbildung 3.10: (a) Ergebnis der AKF in Abhängigkeit der Aktin-Konzentration  $c$ . (b) Darstellung der nach  $AKF/AKF(0)$  und  $l/\lambda$  reskalierten AKF.

Hierbei ist  $l$  Intervallgröße entlang der Röhrenkontur.  $AKF(0)$  wird über eine lineare Regression der Daten ohne die ersten vier Datenpunkte bestimmt. Da die AKF nur auf einer relativ kurzen Distanz linear ist und der Wert von  $AKF(0)$  und somit (Vgl. Formel 3.3) auch  $\lambda$  von der Größe des Intervalls  $l$  für die Anpassung abhängt, wurde  $l$  variiert und  $\lambda$  als Funktion von  $l$  ermittelt. Diese Analyse wurde von Jens Glaser (Theoretische Physik, Universität Leipzig) durchgeführt. Um  $\lambda(l=0)$  zu erhalten wurde eine quadratische Extrapolation durchgeführt. Abbildung 3.11 zeigt die Ergebnisse für  $\lambda(l=0)$  in Abhängigkeit der Aktin-Konzentration  $c$ .

Abbildung 3.10 b zeigt die nach  $AKF/AKF(0)$  und  $l/\lambda$  reskalierten AKF. Abbildung 3.11 zeigt eine log-log-Auftragung der aus Abb. 3.10 b ermittelten Werte von  $\lambda$  in Abhängigkeit der Lösungskonzentration  $c$ . Die rote Linie zeigt eine Anpassung der Daten mit einem Potenzgesetz  $\lambda \propto c^{-2/5}$ . Im Rahmen der experimentellen Fehlerbalken stimmen die Daten gut mit der theoretischen Vorhersage überein.

## 3.2 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Häufigkeitsverteilungen stark asymmetrisch sind (Kapitel 3.1.1). Sie weisen einen steilen Anstieg der Verteilung bei kleinen Röhrenradien und einen langgetreckten exponentiellen Abfall bei höheren Röhrenradien auf. Die Breite der Verteilung nimmt mit abnehmender

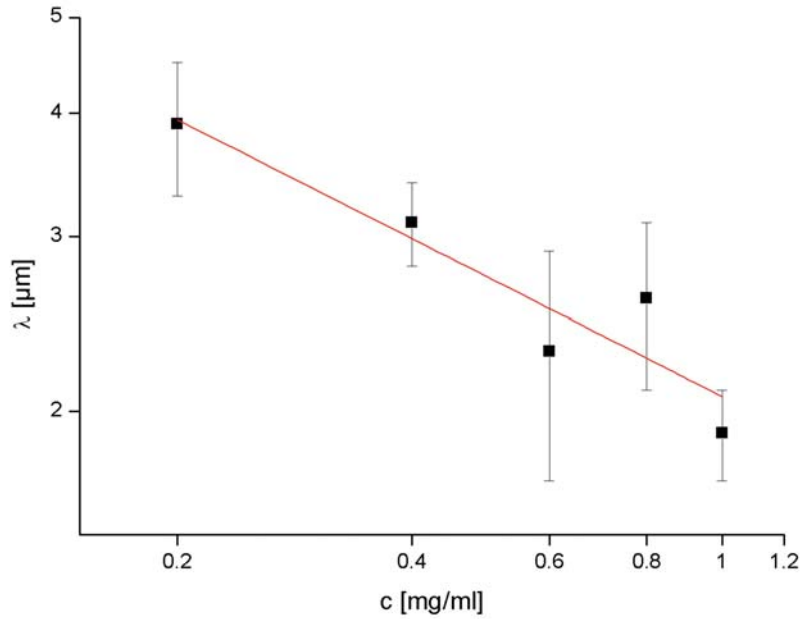


Abbildung 3.11: log-log-Darstellung von  $\lambda$  in Abhängigkeit der Lösungskonzentration  $c$ . Rote Linie: Anpassung der Daten mit einem Potenzgesetz  $\lambda \propto c^{-2/5}$

F-Aktin-Konzentration zu. Damit konnte bestätigt werden, dass die Verteilung der Röhrenradien, wie auch schon zuvor in anderen Experimenten [38–42] und in Simulationen [35] gezeigt, heterogen ist. Die Röhre ist demnach kein starres Objekt, wie in Theorien in erster Näherung angenommen [34], sondern weist in Abhängigkeit ihrer Kollisionspartner starke Asymmetrien auf.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die *Segment-Fluid*-Theorie [44, 45] die experimentell ermittelten Daten der Häufigkeitsverteilung der Röhrenradien für Aktin-Konzentrationen  $c \geq 0.4 \text{ mg/ml}$  sehr gut beschreibt. Für  $c = 0.2 \text{ mg/ml}$  ist jedoch eine Diskrepanz zu erkennen. Es wurde vermutet, dass dies im Zusammenhang mit der Beobachtung stehen könnte, dass  $\rho$   $6.6x$  kleiner ist als von Morse [34] berechnet. Da  $\rho$  bei der Anpassung der *Segment-Fluid*-Theorie von den Maxima von  $P(r)$  abhängt, ist diese Abweichung mit einem größeren, als von der Theorie erwarteten, absoluten Betrag der experimentell bestimmten Röhrenradien zu erklären. Hierfür kann es verschiedene Ursachen geben:

Dynamische Lichtstreuungsmessungen [74] haben gezeigt, daß bei der Bestimmung des Röhrenradius  $r$  die Messzeit ein wesentlicher Faktor ist. Bei einer zu kurzen Messzeit haben die Filamente noch nicht den gesamten, ihnen zur Verfügung stehenden

Raum durchquert. Die minimale Messzeit muss demnach die gesamte Bewegung eines Filaments abdecken. Bei längeren Messzeiten nähert sich der Wert des Röhrenradius einem maximalen Wert asymptotisch an. Dies wird auch durch Messungen von Wang et al. [42] bestätigt. Dort wurde über einen Zeitraum von 0.5 s gemessen. Deren Werte für  $\langle r \rangle$  liegen vom Betrag her durchschnittlich  $1/3$  unter den in dieser Arbeit ermittelten Werten, genügen aber dem gleichen Skalengesetz  $\langle r \rangle \propto c^{-3/5}$ . Die Messzeit allein kann die Abweichung von dem durch die Anpassung der theoretischen Funktion ermittelten Wert und dem errechneten Wert für  $\rho$  jedoch nicht erklären. Ein weiterer Grund für die Abweichung können kollektive Moden des F-Aktins sein, wie sie in der *Effektive-medium*-Näherung durch Morse [34] diskutiert werden. Hier skaliert der Röhrenradius mit der Maschenweite  $\xi \equiv \rho^{-1/2}$  mit  $r = 0.42\xi$ . Der Beitrag von kollektiven Moden wurde durch Glaser und Kroy [101] (noch nicht publiziert) ausführlich untersucht. Es zeigte sich, dass unter Berücksichtigung der kollektiven Moden die Häufigkeitsverteilung der Röhrenradien bei 0.2 mg/ml durch die Theorie besser beschrieben wird als in Abb. 3.8. Diese Vorgehensweise reduziert die Abweichung von  $\rho$  auf einen Faktor von  $\approx 3$ .

Ein weiterer Effekt, den es zu berücksichtigen gilt, ist die nematische Ausrichtung der Filamente, welche bei der Präparation der Proben in Kapillaren (Kapitel 2.4.1) verursacht wird. Eine Abschätzung ergab, dass die Filamente sich beim Befüllen der Kapillare (verursacht durch die kapillaren Kräfte) im Bereich von  $\pm 20^\circ$  in Bezug auf die Flussrichtung ausrichten. Basierend auf Onsagers [102] Analyse der Verteilung des nematischen Ordnungsparameters wurde von Jens Glaser eine Abschätzung des Einflusses der nematischen Ordnung auf die Fluktuationsamplituden durchgeführt. Im Ergebnis reduziert dies die Abweichung von  $\rho$  auf  $\approx 2.6$ .

Weitere Gründe für die Abweichungen der Messwerte von der Theorie sind systematischer Natur. Die photometrische Messung der Aktin-Konzentration (Kapitel 2.3) liefert eine Ungenauigkeit von etwa 10%. Darüber hinaus hat die Bestimmung der Linienspreizfunktion (Kapitel 3.1.2) einen systematischen Fehler von 4% ( $\sim 6$  nm). Jeder oben beschriebene Einfluss für sich, kann die Abweichung zwischen Theorie und Experiment für die Lösungskonzentration  $c = 0.2$  mg/ml und den durch die Anpassung erhaltenen 6.6 x kleineren Wert für  $\rho$  nicht erklären. Jedoch würde eine Kombination aus den beschriebenen Einflüssen eine Erklärung liefern. Hierzu sind weiterführende Experimente denkbar, welche in Kapitel 5 beschrieben werden.

---

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durchgeführten Experimente dazu geeignet sind, die Häufigkeitsverteilung von Röhrenradien systematisch und präzise zu untersuchen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Daten mit der theoretischen Beschreibung durch die *Segment-Fluid*-Theorie übereinstimmen. Die Ergebnisse der Experimente und der Theorie sind in der Lage die breite Verteilung der Plateau-Moduli [40, 72], welche in der Mikrorheologie beobachtet wurden, auf die asymmetrische Form der Verteilung von Heterogenitäten im F-Aktin-Netzwerk zurückzuführen.





# 4. Polymerlösungen unter Scherung

## 4.1 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente zur Analyse von Polymerlösungen unter Scherung zusammengefasst. Die Durchführung sowie die Analyse der Experimente sind in Kapitel 2.5 beschrieben. Es wurden zwei unterschiedliche Experimente durchgeführt, eines mit ansteigender und eines mit konstanter Scherrate (Details Kapitel 2.5.2). Sofern nicht anders angegeben liegen den in diesem Kapitel zusammengefassten Ergebnissen die Analysen der letzten drei Bilderstapel zugrunde, bevor die Scherrate geändert oder abgeschaltet wurde bzw. die Analyse des ersten Bilderstapels nach einer Deformationsamplitude  $\gamma \approx 2500$ . In Abbildung 4.1 sind zur Veranschaulichung diese Zeitpunkte in der Skizze der Experimente, analog der Skizze in Abb. 2.12 (Kapitel 2.5.2), markiert und die entsprechenden Deformationsamplituden  $\gamma$  und Scherraten  $\dot{\gamma}$  angegeben.

Die Angabe der Fehlerbalken in den Abbildungen sowie die Fehlerangabe von Mittelwerten wurden in Kapitel 2.4.3 erläutert.

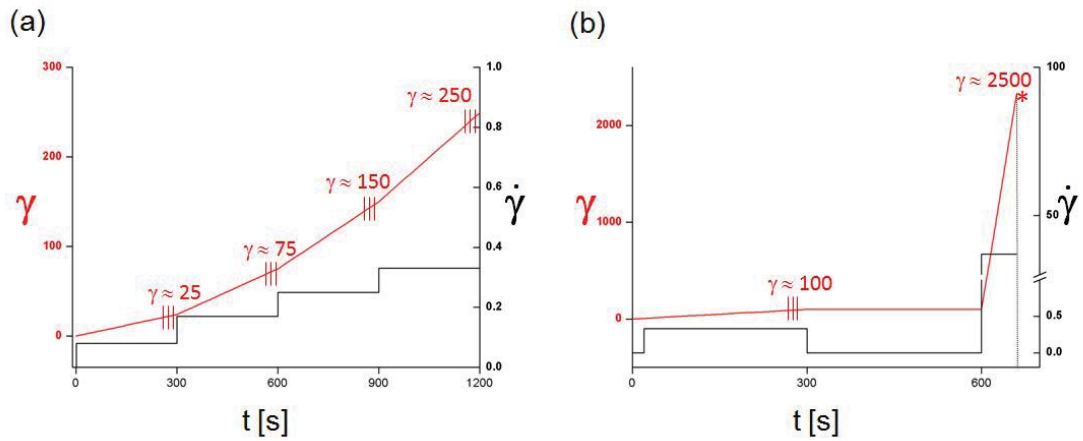


Abbildung 4.1: Skizzierung der Experimente und Markierung (rote Striche bzw. Sternchen) der ausgewerteten Bilderstapel. Gezeigt sind die Scherrate  $\dot{\gamma}$  (schwarze Linie) und die entsprechende Deformationsamplitude  $\gamma$  (rote Linie) als Funktion der Scherdauer  $t$ . (a) Experiment mit ansteigender (gemäß einer Stufenfunktion) Scherrate  $\dot{\gamma}$ . (b) Experiment mit konstanter und anschließend sehr hoher Scherrate  $\dot{\gamma}$ . Gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt des Abschaltens der Scherrate bei  $\gamma \approx 2500$ . Das rote Sternchen markiert den ersten Bilderstapel nach Abschalten der Scherrate  $\dot{\gamma}$ .

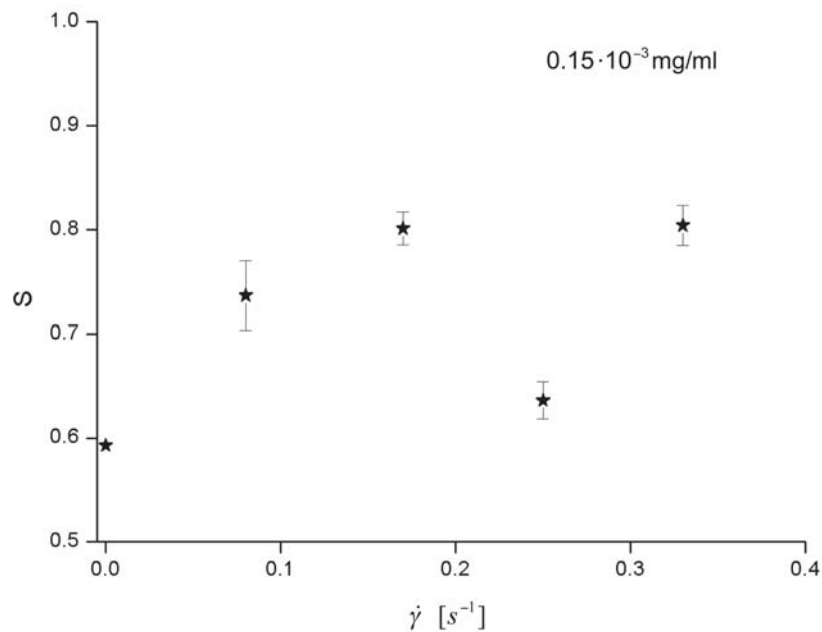


Abbildung 4.2: Darstellung der Ordnungsparameters  $S$  in Abhängigkeit der Scherrate  $\dot{\gamma}$ .  $c = 0.15 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$ .

### 4.1.1 Analyse der verdünnten Aktinlösung

Wie in Kapitel 1.2.5 beschrieben, können Aktinlösungen der Konzentration  $c = 0.15 \cdot 10^{-3}$  mg/ml als verdünnte Lösungen betrachtet werden, da der mittlere Abstand zwischen den Filamenten größer ist als die durchschnittliche Konturlänge  $L$  der Filamente. Ohne die Wechselwirkung zwischen Filamenten sind die Lösungen rein viskos. Daher ist die Angabe einer Deformationsamplitude nicht sinnvoll (Kapitel 1.2.5). Aus diesem Grund sind die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse zum Ordnungsparameter und zur Krümmungsverteilung<sup>1</sup> der Aktinlösung mit  $c = 0.15 \cdot 10^{-3}$  mg/ml in Abhängigkeit der Scherrate  $\dot{\gamma}$  dargestellt.

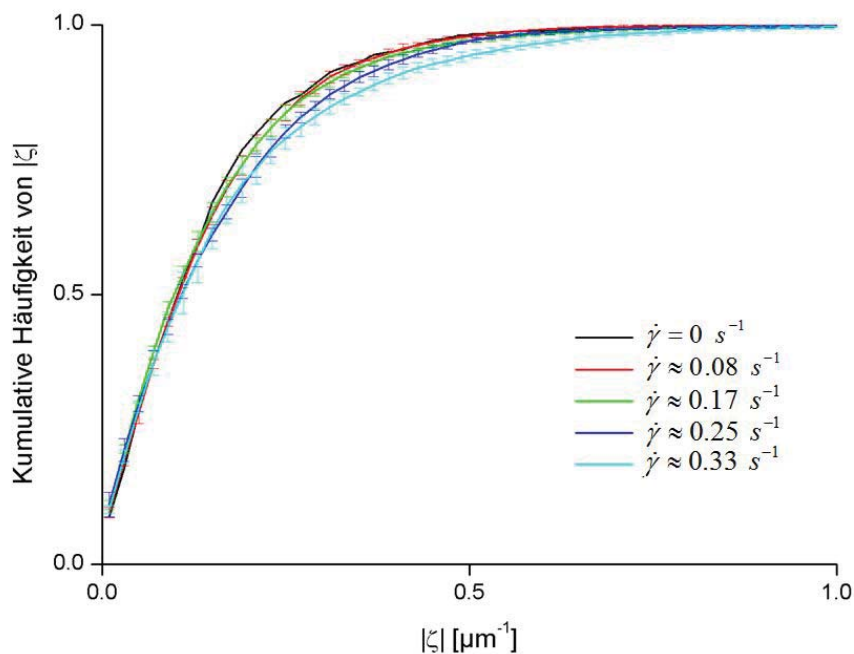


Abbildung 4.3: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Filamentkrümmungen  $|\zeta|$  in Abhängigkeit der Scherrate  $\dot{\gamma}$ .  $c = 0.15 \cdot 10^{-3}$  mg/ml.

Abbildung 4.2 zeigt das Ergebnis der Analyse des Ordnungsparameters. Es ist eine Zunahme des Ordnungsparameters mit der Scherrate zu erkennen, jedoch fällt auf, dass  $S$  bei  $\dot{\gamma} \approx 0.25 \text{ s}^{-1}$  deutlich vom Verlauf der übrigen Werte abweicht. Hierauf wird in Kapitel 4.2 näher eingegangen.

Abbildung 4.3 zeigt die Häufigkeitsverteilung  $P(|\zeta|)$  von Filamentkrümmungen. Zwischen  $\dot{\gamma} \approx 0.17 \text{ s}^{-1}$  und  $\dot{\gamma} \approx 0.25 \text{ s}^{-1}$  ist eine signifikante Verschiebung der Häufigkeitsverteilung der Krümmungen zu höheren Krümmungsradien zu erkennen. Es ist

<sup>1</sup>Die Analyse selbst wurde analog zu den übrigen Lösungskonzentrationen durchgeführt.

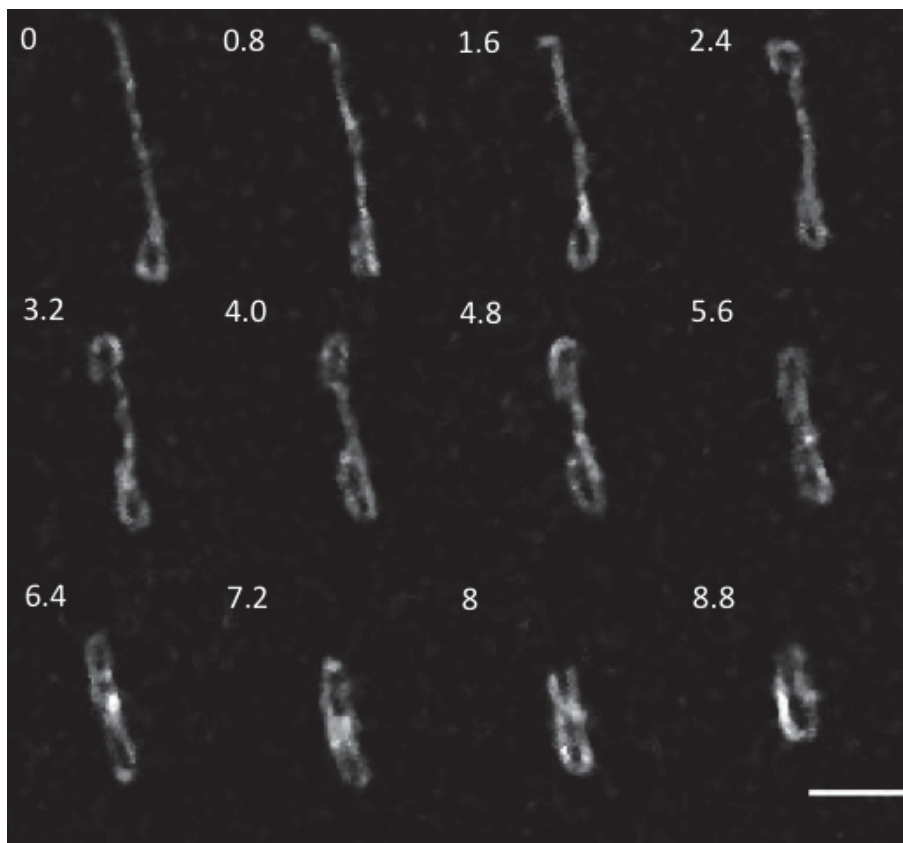


Abbildung 4.4: Gezeigt ist eine Zeitserie zweidimensionaler fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen (Konfokales-Vielfach-Lochblenden-System, Kapitel 2.1.2) einer F-Aktinlösung unter Scherung ( $c = 0.15 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$ ,  $\dot{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$ ), als Beispiel für eine signifikante Konformationsänderung eines einzelnen Filaments über die Zeit (Zeitlicher Abstand zwischen den Bildern  $\sim 800 \text{ ms}$ ). Die Zahlen geben den Zeitpunkt der Aufnahmen an, beginnend mit 0 s. Maßstab:  $10 \mu\text{m}$

zu vermuten, dass es eine Art kritische Scherrate geben könnte, ab der Filamente trotz ihrer intrinsischen Biegesteifigkeit eine verschlaufte Konformation annehmen. Um dies genauer zu untersuchen, wurde eine Zeitserie zweidimensionaler fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen der F-Aktinlösung unter Erhöhung der Scherrate durchgeführt.

Eine visuelle Analyse ergab, dass die Filamente ab einer Scherrate von  $\dot{\gamma} \approx 0.12 \text{ s}^{-1}$  eine auffällige Konformationsänderung erfahren, wie sie in Abb. 4.4 am Beispiel eines einzelnen Filaments gezeigt ist. Diese Konformationsänderung führt lokal zu sehr hohen Krümmungen. Die Wahrscheinlichkeit für diese signifikante Konformationsänderung stieg mit zunehmender Scherrate sichtbar an. Diese Beobachtung wird in Kapitel 4.2 diskutiert.

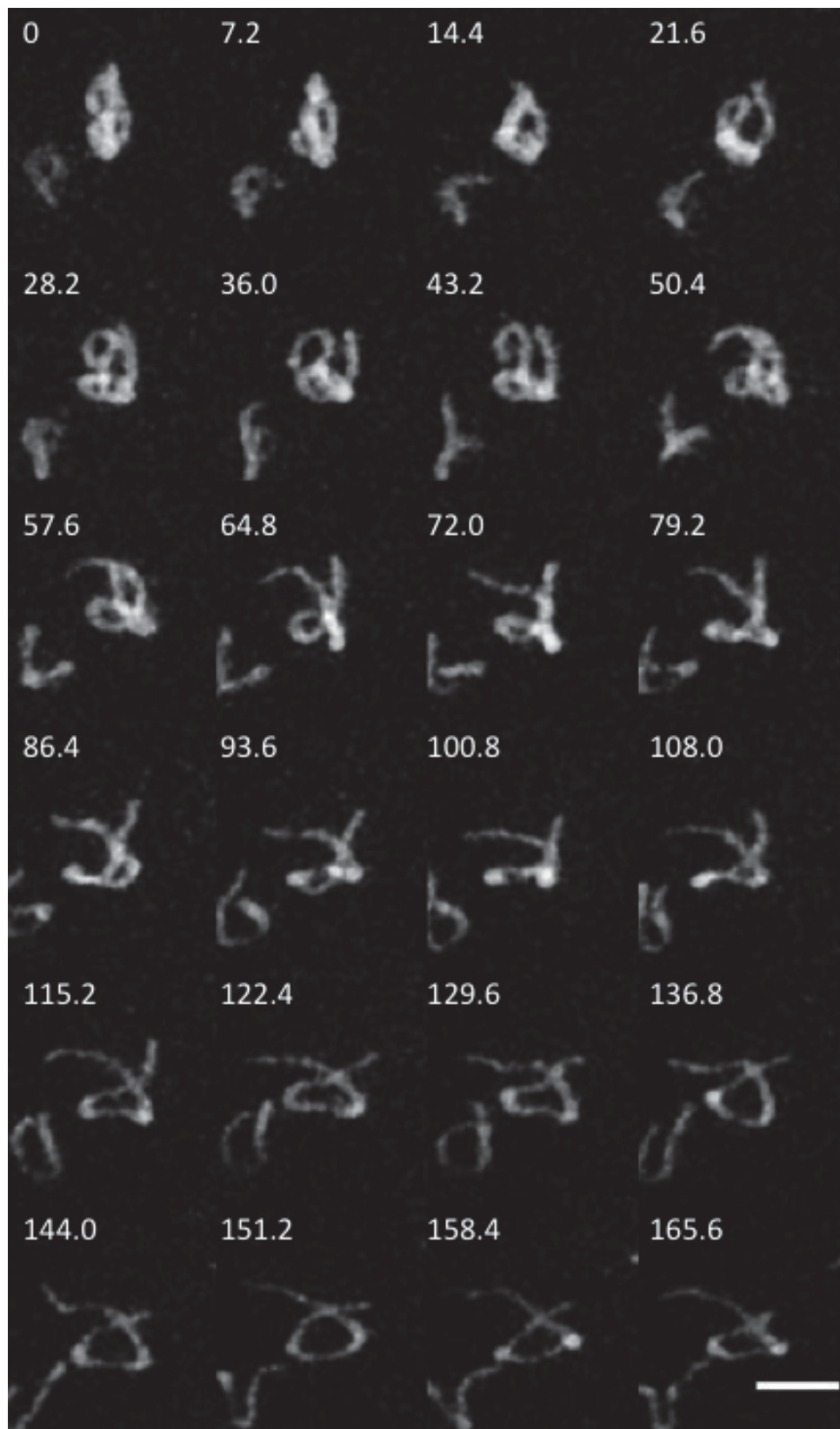


Abbildung 4.5: Gezeigt ist die Projektion ( $\sim 9 \mu\text{m}$ ) einer dreidimensionalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme über die Zeit (Konfokales-Vielfach-Lochblenden-System, Kapitel 2.1.2) einer F-Aktinlösung ( $c = 0.15 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$ ) direkt nach dem Abschalten der Scherung ( $\dot{\gamma} = 37 \text{ s}^{-1}$ ). Darstellung des Relaxationsprozesses zwei einzelner Filamente über die Zeit (zeitlicher Abstand zwischen den Bildern  $\sim 7.2 \text{ s}$ ). Die Zahlen geben den Zeitpunkt nach Abschalten der Scherung an, beginnend mit 0 s. Maßstab:  $10 \mu\text{m}$

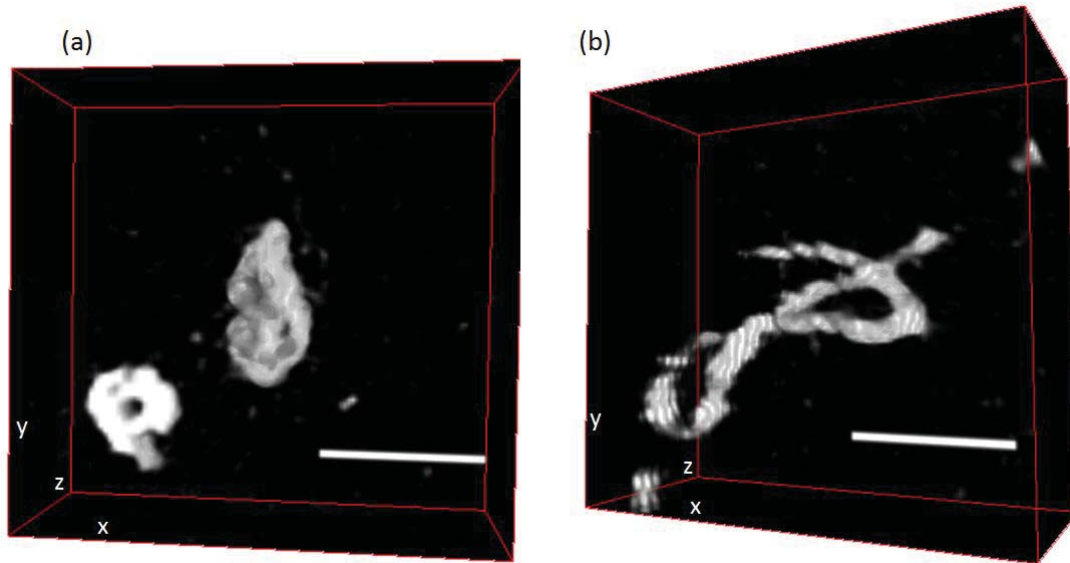


Abbildung 4.6: Dreidimensionale Darstellung der Filamente aus Abb. 4.5 zum Zeitpunkt (a)  $t = 0\text{ s}$  und (b)  $t = 165.6\text{ s}$ . Maßstab:  $10\text{ }\mu\text{m}$

In freien Lösungen sollten semiflexible Filamente nach Abschalten der Scherung aufgrund ihrer Biegesteifigkeit und der fehlenden Wechselwirkung mit anderen Filamenten innerhalb weniger Sekunden in ihren Gleichgewichtszustand zurückkehren (Kapitel 1.2.2). Abbildung 4.5 zeigt 24 Bilder einer projizierten<sup>2</sup> dreidimensionalen Zeitserie. Die gesamte Aufnahme zeigt den Relaxationsprozess von zwei Filamenten über einen Zeitraum von insgesamt  $\sim 3\text{ min}$  direkt nach Abschalten der Scherung ( $\dot{\gamma} \approx 37\text{ s}^{-1}$ ). Der Abstand zwischen den Aufnahmen beträgt  $\sim 7.2\text{ s}$ . Im ersten Bild ( $t = 0\text{ s}$ ) sind zwei *verknäuelte* Filamente zu erkennen. Es ist zu sehen, dass sich die anfangs stark gekrümmten Filamentkonturen über die Zeit entspannen, die Filamente demnach relaxieren. Um einen Eindruck für die Filamentkonformation in drei Dimensionen zu vermitteln, zeigt Abbildung 4.6 die Anfangskonformationen der Filamente gleich nach Abschalten der Scherung zum Zeitpunkt  $t = 0\text{ s}$  unter Abbildung aller drei Raumachsen. Die entsprechende Abbildung zum Zeitpunkt  $t = 165.6\text{ s}$  zeigt, dass beide Filamente über den gesamten hier dargestellten Bereich entlang der optischen Achse ( $\sim 12\text{ }\mu\text{m}$ ) ausge dehnt sind. Vergleicht man die dreidimensionale Abbildung zum Zeitpunkt  $t = 165.6\text{ s}$  mit der entsprechenden projizierten Aufnahme, ist zu erkennen, dass die Krümmungen in der Projektion

<sup>2</sup>Es wurde ein Bereich von  $\sim 9\text{ }\mu\text{m}$  (10 Bildebenen) projiziert. Die Bilderstapel entsprechen den ersten 24 Aufnahmen nach Abschalten der Scherung ( $\dot{\gamma} \approx 37\text{ s}^{-1}$ ).

überschätzt wurden. Zieht man den Projektionsfehler in Betracht scheint nach etwa 100 s eine Art Gleichgewichtszustand bezüglich der Filamentkonformation erreicht. Dieser Gleichgewichtszustand sollte jedoch schon nach wenigen Sekunden erreicht sein. Dieser verzögerte Relaxationsprozess wird in Kapitel 4.2 diskutiert.

### 4.1.2 Orientierung der Filamente

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse zu höher konzentrierten Aktinlösungen dargestellt. Um zu klären, ob die Abhängigkeit von der Deformationsamplitude  $\gamma$  gegenüber der Abhängigkeit von der Scherrate  $\dot{\gamma}$  überwiegt (wie man es bei viskoelastischen Lösungen erwarten würde), werden die Resultate in Abhängigkeit der Deformationsamplitude  $\gamma$  angegeben.

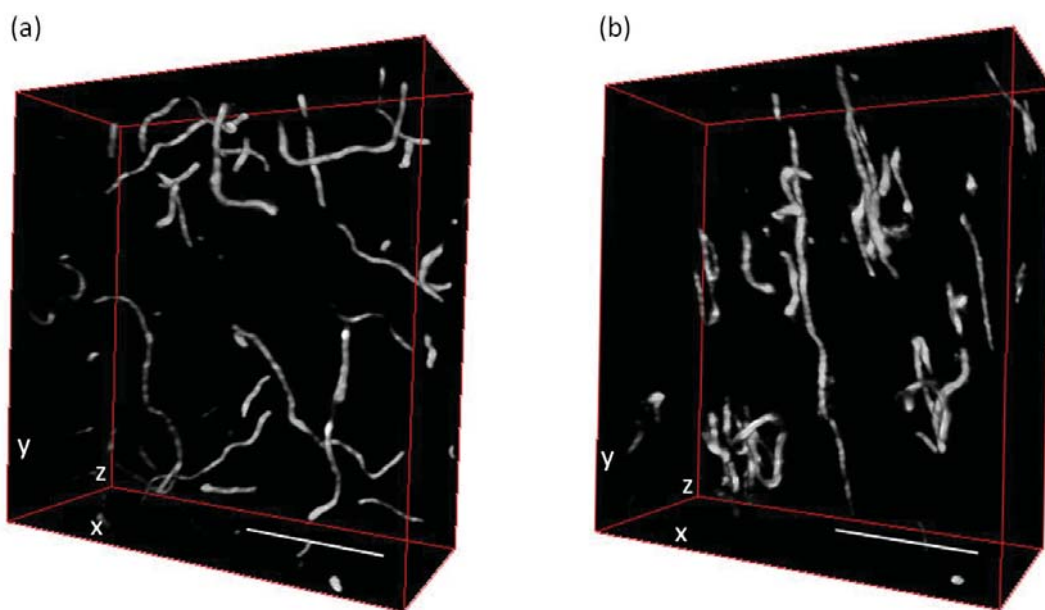


Abbildung 4.7: Dreidimensionale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Konfokales Vielfach-Lochblenden-System, Kapitel 2.1.2) von F-Aktin-Netzwerken. Aktinkonzentration:  $c = 0.08$  mg/ml. **(a)** Referenzmessung ( $\gamma = 0$ ) **(b)** F-Aktinnetzwerk unter Einfluss einer Deformationsamplitude ( $\gamma \approx 250$ ) (Details zur F-Aktin-Präparation Kapitel 2.5.1). Maßstab:  $30 \mu\text{m}$

Abbildung 4.7 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Lösungskonzentration  $c = 0.08$  mg/ml. In (a) ist die Aufnahme der Referenzmessung vor Beginn des Experiments (Kapitel 2.5.2) gezeigt und in (b) die Messung bei  $\gamma \approx 250$ . In letzterer

ist eine deutliche Ausrichtung der Filamente entlang der  $y$ -Achse (entspricht Richtung des Schergeschwindigkeitsvektors  $\mathbf{v}$  (Kapitel 1.2.5)) zu erkennen, wohingegen die Filamente in (a) keine Vorzugsrichtung aufweisen.

Um die Orientierung der Filamente zu bestimmen, wurden, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, die Winkel zwischen den Tangenten entlang der Filamentkonturen und dem Geschwindigkeitsvektor  $\mathbf{v}$  für jeden ausgewerteten Bilderstapel berechnet.

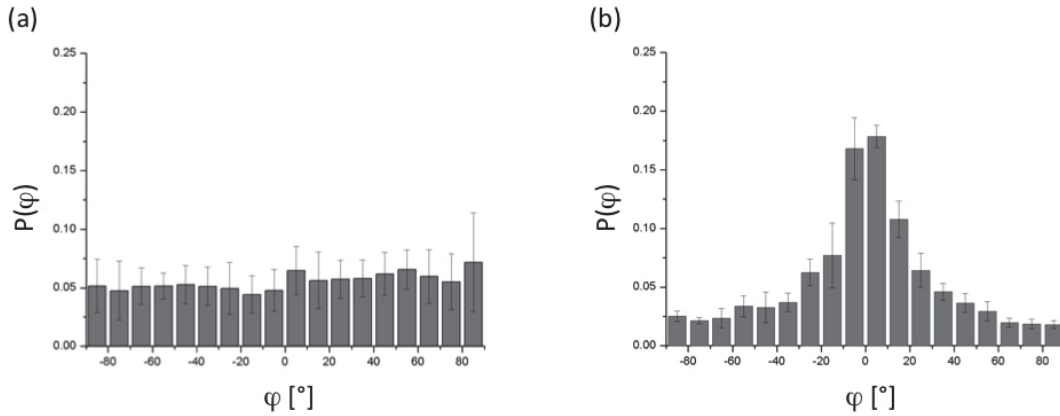


Abbildung 4.8: **(a)** Häufigkeitsverteilung der Winkel  $P(\varphi)$  aus den Referenzmessungen aller untersuchten Polymerlösungen ohne Einfluss einer Deformationsamplitude ( $\gamma = 0$ ). **(b)**  $P(\varphi)$  unter Einfluss einer Scherdeformation  $\gamma \approx 250$  am Beispiel einer F-Aktinlösung mit einer Konzentration von  $c = 0.08$  mg/ml. Der Winkel  $\varphi = 0^\circ$  entspricht der Richtung des Schergeschwindigkeitsvektors  $\mathbf{v}$  (Kapitel 1.2.5). Histogramm von  $\varphi = -90^\circ$  bis  $+90^\circ$  in 18 Klassen von jeweils  $10^\circ$ .

Abb. 4.8 a zeigt die mittlere Häufigkeitsverteilung der Winkel  $P(\varphi)$  aller Referenzmessungen ( $n = 8$ ,  $\gamma = 0$ ). Hierbei entspricht  $\varphi = 0^\circ$  der Richtung von  $\mathbf{v}$  und  $\varphi = \pm 90^\circ$  entsprechen den Richtungen senkrecht zu  $\mathbf{v}$ . In (a) ist zu erkennen, dass  $P(\varphi)$  der Referenzmessung ( $\gamma = 0$ ) isotrop verteilt ist. Die Filamente zeigen demnach keine Vorzugsrichtung, wie bereits für das Beispiel in Abb. 4.7 a zu erkennen. Die Häufigkeitsverteilung der Winkel unter Scherung ( $\gamma \approx 250$ ) (Abb. 4.8 b) bestätigt die auch schon qualitativ in Abb. 4.7 b beobachtete Orientierung der Filamente in Richtung von  $\mathbf{v}$  ( $\varphi = 0^\circ$ ).

Für die Beispiele in Abbildung 4.8 beträgt der Ordnungsparameter (Kapitel 2.5.3) für die Referenzmessung  $S = 0.60 \pm 0.056$  und für das Beispiel in (b)  $S = 0.82 \pm 0.008$ . Das heißt der Ordnungsparameter der Referenzmessung ist nahe dem einer isotropen Verteilung ( $S = 0.5$ ), der Ordnungsparameter der gescherten Lösung hingegen



zeigt eine deutliche Abweichung von dem der isotropen Verteilung. F-Aktinlösungen im thermischen und dynamischen Gleichgewicht können demnach als isotrope Flüssigkeiten betrachtet werden, wohingegen sich die Verteilung unter Einfluss einer Deformation zu Gunsten eines Vorzugswinkels in Richtung des Schergeschwindigkeitsvektors  $\mathbf{v}$  verschiebt und somit auf eine signifikante Ausrichtung der Filamente hinweist.

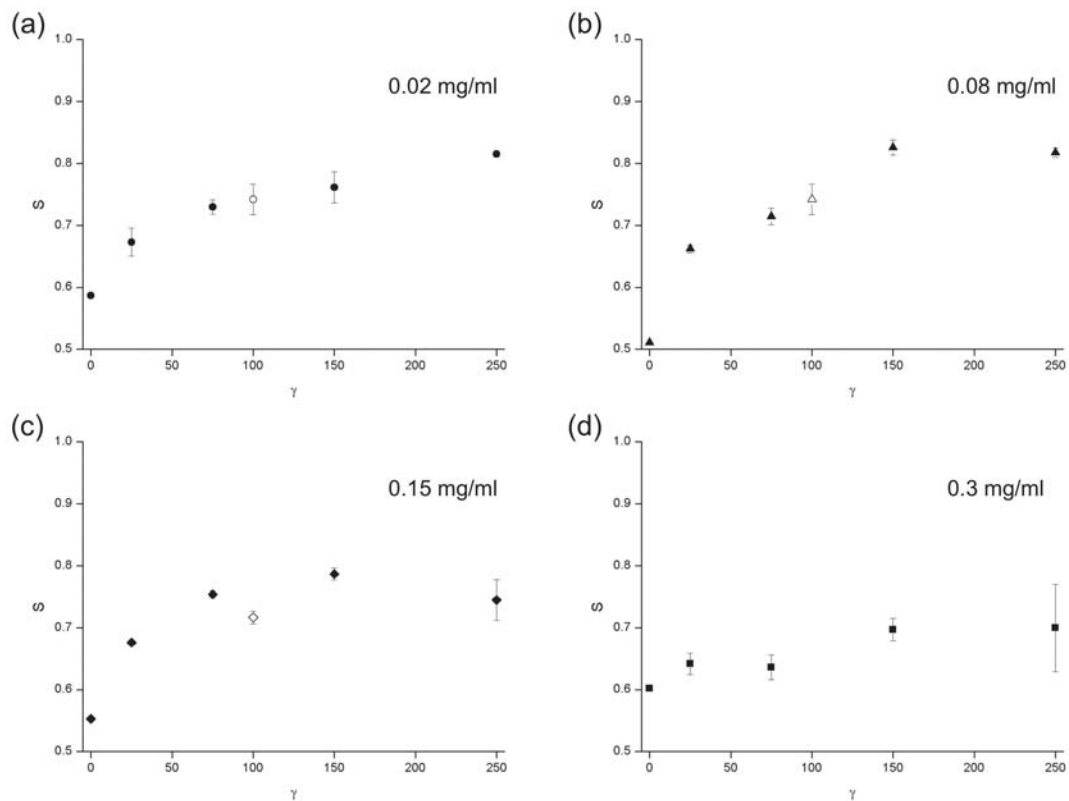


Abbildung 4.9: Dargestellt ist der Wert des Ordnungsparameters  $S$  in Abhängigkeit der Deformationsamplitude  $\gamma$ . Geschlossene Symbole: Experiment Abb. 4.1 a, Offene Symbole: Experiment Abb. 4.1 b

Abbildung 4.9 zeigt die Zusammenfassung aller gemessener Ordnungsparameter  $S$  für die verschiedenen Lösungskonzentrationen  $c$  in Abhängigkeit der Deformationsamplitude  $\gamma$ . Die geschlossenen Symbole zeigen  $S$  in Abhängigkeit von  $\gamma$  für das Experiment mit ansteigender Scherrate (gemäß Abb. 4.1 a) und die offenen Symbole in Abb. 4.9 a-c für das Experiment bei konstanter Scherrate (gemäß Abb. 4.1 b). Die Ergebnisse aus dem Scherexperiment mit konstanter Scherrate passen gut in den Entwicklungsverlauf des Ordnungsparameters für das Experiment mit ansteigender Scherrate, was dafür spricht, dass bei der Ausrichtung der Filamente die Deforma-

tionsamplitude  $\gamma$  eine dominantere Rolle spielt als die Scherrate  $\dot{\gamma}$ .

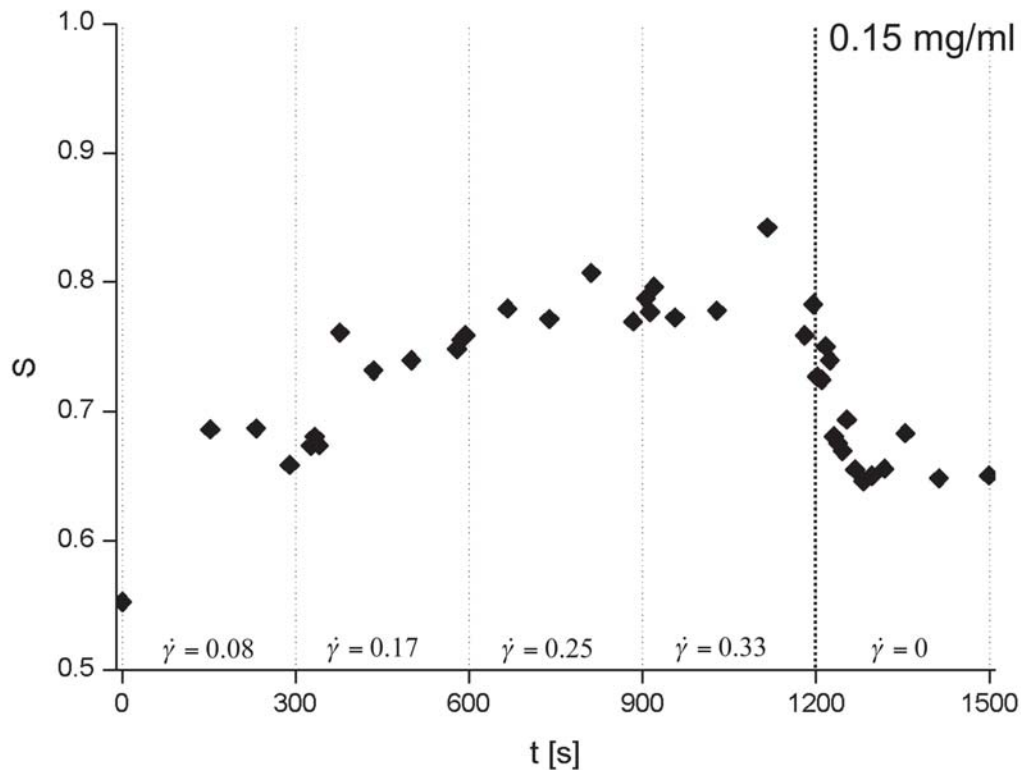


Abbildung 4.10: Dargestellt ist der Wert des Ordnungsparameters  $S$  in Abhängigkeit der Dauer  $t$  des Scherexperiments (Vgl. Abb. 4.1 a) für  $c = 0.15 \text{ mg/ml}$ . Die gepunkteten Linien kennzeichnen die Zeitpunkte an denen die Scherrate  $\dot{\gamma}$  erhöht wurde und die gestrichelte Linie den Zeitpunkt an dem die Scherung abgeschaltet wurde.

Abb. 4.10 zeigt  $S$  für  $c = 0.15 \text{ mg/ml}$  in Abhängigkeit der Scherdauer  $t$  und der Scherrate  $\dot{\gamma}$  für das Experiment mit ansteigender Scherrate  $\dot{\gamma}$  analog zu Abb. 4.9 d, jedoch mit einer größeren Anzahl ausgewerteter Bilderstapel. In dieser Darstellung ist darüber hinaus der Verlauf des Ordnungsparameters nach Abschalten der Scherung gezeigt. Bereits nach einem Zeitraum  $< 1 \text{ min}$  erreicht der Wert des Ordnungsparameters ein Plateau, welches für die Gesamtdauer des Experiments nicht weiter unterschritten wurde und deutlich über dem Wert der Referenzmessung liegt. Die Abnahme der Ordnung der Filamente und das Erreichen eines Plateaus für den Ordnungsparameter nach Abschalten der Scherung wird in Kapitel 4.2 diskutiert.

### 4.1.3 Konturlängen und normierter End-zu-End-Abstand

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss eine Deformationsamplitude auf die Verteilung der Konturlängen  $L$  und den normierten End-zu-End-Abstand  $R/L$  von Filamenten in F-Aktin-Lösungen hat.

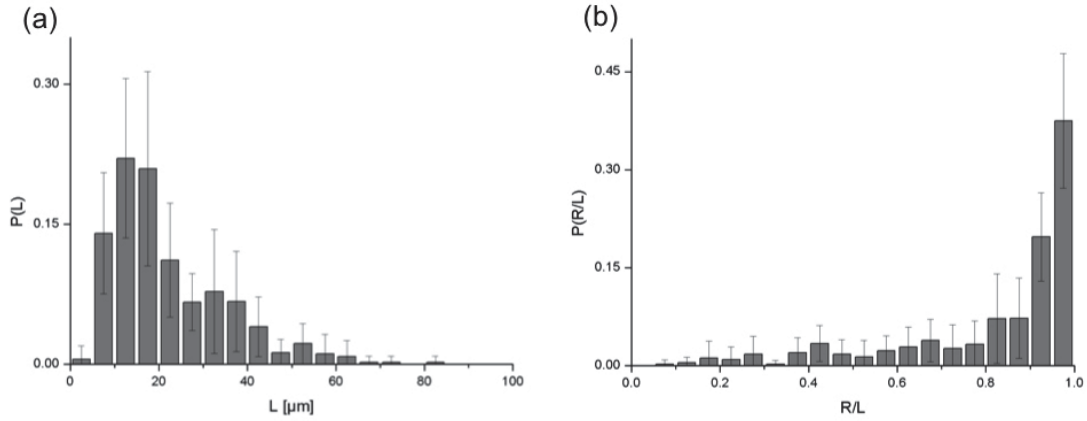


Abbildung 4.11: Häufigkeitsverteilung der (a) Konturlängen  $P(L)$  und (b) des End-zu-End-Abstands  $P(R/L)$  aus den Referenzmessungen ( $\gamma = 0$ ) aller untersuchten Polymerlösungen ohne Einfluss einer Deformationsamplitude.

Abbildung 4.11 a zeigt das Histogramm<sup>3</sup> der Häufigkeitsverteilungen der Konturlängen  $P(L)$  der Referenzmessungen ( $\gamma = 0$ ), gemittelt über alle Konzentrationen. Die Verteilung der Konturlängen ist breit und asymmetrisch, mit einem ausgeprägten Abfall zu größeren Werten von  $L$ . Die Konturlängen  $< 5 \mu\text{m}$  sind durch die manuelle Auswertung unterrepräsentiert, da nur Filamente analysiert wurden, die mindestens dreimal länger waren als die durchschnittliche, durch die optische Auflösung verwaschene, Breite der Filamentkonturen (etwa  $1 \mu\text{m}$ ). Abb. 4.11 b zeigt das Histogramm<sup>4</sup> der Häufigkeitsverteilung des normierten End-zu-End-Abstandes  $P(R/L)$ , ebenfalls gemittelt über alle Referenzmessungen ( $\gamma = 0$ ). Die Verteilung zeigt eine Häufung der Wahrscheinlichkeit für Werte von  $R/L$  nahe 1 (also eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für gestreckte Filamentkonformation) und einen steilen Abfall zu kleineren Werten von  $R/L$ .

Die roten Balken in Abbildung 4.12 zeigen das Ergebnis von  $P(L)$  und  $P(R/L)$  für die drei Lösungskonzentrationen unter Einfluss einer Scherdeformation  $\gamma \approx 250$  (gemittelt über  $c = 0.02, 0.08, 0.15 \text{ mg/ml}$ ) im direkten Vergleich zu der Referenzmes-

<sup>3</sup>Wertebereich des Histogramms von  $L = 0 - 100$  in 20 Klassen von  $5 \mu\text{m}$ .

<sup>4</sup>Wertebereich des Histogramms von  $L = 0 - 1$  in 20 Klassen.

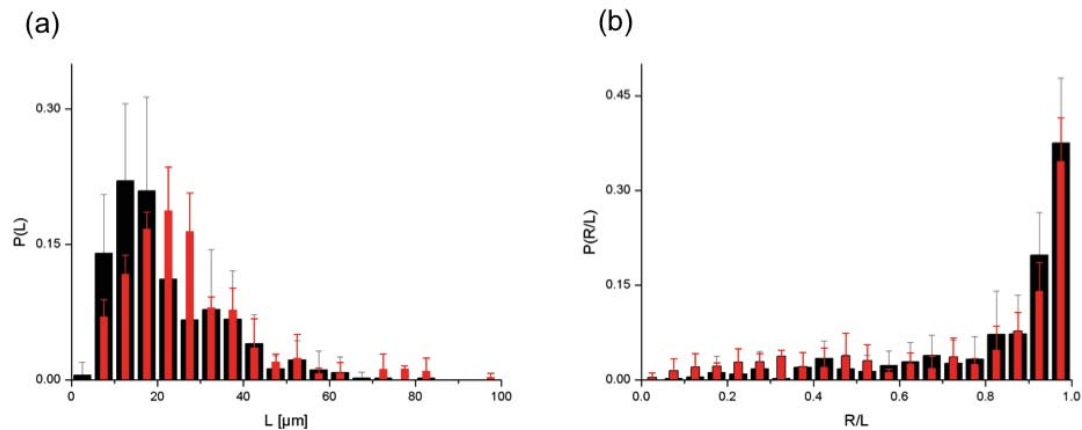


Abbildung 4.12: Vergleich der Häufigkeitsverteilung der (a) Konturlängen  $P(L)$  und (b) des End-zu-End-Abstandes  $P(R/L)$  der Referenzmessungen (schwarze Balken) aus Abb. 4.11 mit den jeweiligen Häufigkeitsverteilungen bei einer Deformationsamplitude  $\gamma \approx 250$ . (Vgl. Abb. 4.1 a)

sung ( $\gamma = 0$ ) aus Abb. 4.11 (schwarze Balken).  $P(L)$  bei  $\gamma \approx 250$  (Vgl. Abb. 4.1 a) zeigt im Vergleich zur Referenzmessung ( $\gamma = 0$ ) eine leichte Verschiebung zu längeren Filamenten, jedoch ist die Form der Verteilung ebenfalls breit und asymmetrisch, mit einem ausgeprägten Abfall zu größeren Werten von  $L$ .  $P(R/L)$  bei  $\gamma \approx 250$  zeigt im Vergleich zu der Referenzmessung ( $\gamma = 0$ ) eine leichte Zunahme der Wahrscheinlichkeit für nicht-gestreckte Filamentkonformationen.

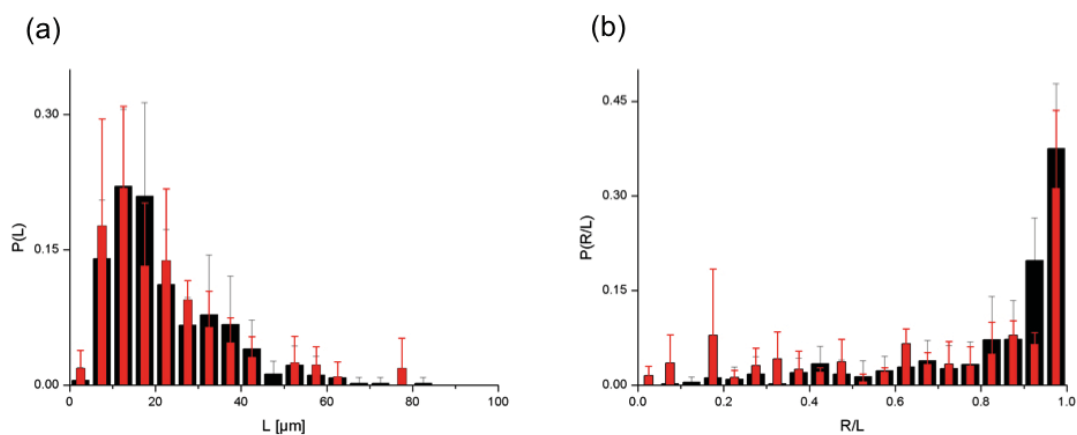


Abbildung 4.13: Vergleich der Häufigkeitsverteilung der (a) Konturlängen  $L$  und (b) des End-zu-End-Abstandes  $R/L$  der Referenzmessungen (schwarze Balken) aus Abb. 4.11 mit den jeweiligen Häufigkeitsverteilungen nach Anwendung einer Deformationsamplitude  $\gamma \approx 2500$ . (Vgl. Abb. 4.1 b)

Um zu kontrollieren, ob eine Erhöhung der Deformationsamplitude unter Verwendung einer hohen Scherrate ( $\dot{\gamma} \approx 37 \text{ s}^{-1}$ ) einen Einfluss auf  $P(L)$  und  $P(R/L)$  hat, wurde die Analyse der Häufigkeitsverteilung an dem jeweils ersten Bilderstapel nach Abschalten der Scherung bei einer Deformationsamplitude von  $\gamma \approx 2500$  durchgeführt (Vgl. Abb. 4.1 b). Die roten Balken in Abbildung 4.13 zeigen die Häufigkeitsverteilung des normierten End-zu-End-Abstandes analog zu Abbildung 4.12. Auch hier ist ebenfalls eine breite und asymmetrische Verteilung der Konturlängen zu erkennen.  $P(R/L)$  bei  $\gamma \approx 2500$  hingegen zeigt im Vergleich zur Referenzmessung ( $\gamma = 0$ ) eine deutliche Zunahme der Wahrscheinlichkeit für nicht-gestreckte Filamentkonformationen.

In Tabelle 4.1 ist eine Übersicht der Ergebnisse für die mittlere Konturlänge  $\langle L \rangle$  und des mittleren normierten End-zu-End-Abstandes  $\langle R/L \rangle$  in Abhängigkeit der Deformationsamplitude  $\gamma$  dargestellt. Hier wird deutlich, dass die Deformationsamplitude keinen signifikanten Einfluss auf die mittlere Konturlänge der Filamente hat.  $\langle R/L \rangle$  nimmt hingegen leicht ab, die Wahrscheinlichkeit für nicht-gestreckte Filamentkonformationen nimmt also mit steigender Deformationsamplitude zu.

$\gamma$	$\langle L \rangle$	$\sigma_L$	$\langle R/L \rangle$	$\sigma_{R/L}$
0	22.1	4.71	0.82	0.199
250	23.5	5.18	0.75	0.277
2500	22.2	6.73	0.68	0.290

Tabelle 4.1: Ergebnisse der mittleren Konturlänge  $\langle L \rangle$  und des mittleren normierten End-zu-End-Abstandes  $\langle R/L \rangle$  in Abhängigkeit der Amplitude der Scherdeformation  $\gamma$

Die Analyse der Häufigkeitsverteilung der Konturlänge  $P(L)$  hat gezeigt, dass eine Scherdeformation  $\gamma$  keinen signifikanten Einfluss auf die Längenverteilung der Filamente in F-Aktinlösungen mit einer Konzentration zwischen 0.02 – 0.15 mg/ml hat. Die Analyse der Häufigkeitsverteilung des End-zu-End-Abstandes  $P(R/L)$  hingegen, zeigt unter Einfluss einer Scherdeformation eine Zunahme der Wahrscheinlichkeit für nicht-gestreckte Filamentkonformationen, was besonders in den Abb. 4.12 b und 4.13 b im erhöhten Anstieg des Abfalls zu kleineren Werten  $R/L$  deutlich wird.

Filamente weisen demnach unter Einfluss einer Deformationsamplitude mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit Konturen auf, bei denen die Enden der Filamente näher

zusammenliegen als ohne Einfluss einer Deformation. Es ist zu vermuten, dass durch Scherung ausgerichtete Filamente, bei denen die Enden nahe beieinander liegen, lokal erhöhte Krümmungen aufweisen. Dieses wurde im Folgenden untersucht.

#### 4.1.4 Häufigkeitsverteilung von Filamentkrümmungen

Zunächst wurde überprüft, ob die Häufigkeitsverteilung der Filamentkrümmungen  $P(\zeta)$  eine gleiche Wahrscheinlichkeit für positive als auch für negative Krümmungen aufweist. Dies ist am Beispiel von  $c = 0.08$  mg/ml in Abbildung 4.14 gezeigt. Es ist gut zu erkennen, dass  $P(\zeta)$  der Referenzmessung (Quadrate) und der Messung bei  $\gamma \approx 250$  (Kreise) symmetrisch sind. Um die Statistik in der Darstellung der Häufigkeitsverteilung von Krümmungen zu erhöhen, wurde aufgrund der Symmetrie der Wahrscheinlichkeit für positive und negative Filamentkrümmungen im weiteren Verlauf der Analyse die Beträge der Krümmungen  $|\zeta|$  analysiert.

Die Analyse von  $P(|\zeta|)$  in Abhängigkeit von  $\gamma$  und  $c$  ergab, dass sich die Verteilung in Abhängigkeit der Deformationsamplitude im Bereich  $\gamma = 0 - 250$  für die untersuchten Lösungskonzentrationen  $c = 0.02, 0.08, 0.15$  und  $0.3$  mg/ml nicht signifikant ändert. Dies ist am Beispiel des Ergebnisses für  $c = 0.15$  mg/ml in Abbildung 4.15 gezeigt. Für die weitere Analyse wurden die Ergebnisse für jede Lösungskonzentration über die vier analysierten Deformationsamplituden  $\gamma \approx 25, 75, 150, 250$  gemittelt. Abbildung 4.16 zeigt die gemittelten Ergebnisse für  $P(|\zeta|)$  in Abhängigkeit der Lösungskonzentration  $c$ . Es ist eine Verschiebung der Wahrscheinlichkeit zu größeren Werten der Krümmung mit zunehmender Lösungskonzentration bis einschließlich  $c = 0.15$  mg/ml zu erkennen. Zudem zeigen die Verteilungen einen exponentiellen Verlauf im Bereich größerer Werte für  $|\zeta|$ . Das Ergebnis für  $c = 0.3$  mg/ml weicht nicht signifikant von dem Ergebnis für  $c = 0.15$  mg/ml ab. Dies lässt vermuten, dass im Bereich dieser beiden Konzentrationen eine maximale physikalische Vernetzung der Filamente erreicht ist und somit eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für hohe Filamentkrümmungen gegebenenfalls nur durch Erhöhung der Scherrate hervorgerufen werden kann. Aufgrund dieser Vermutung wurde im Weiteren der Einfluss einer hohen Scherrate bzw. Deformationsamplitude untersucht.

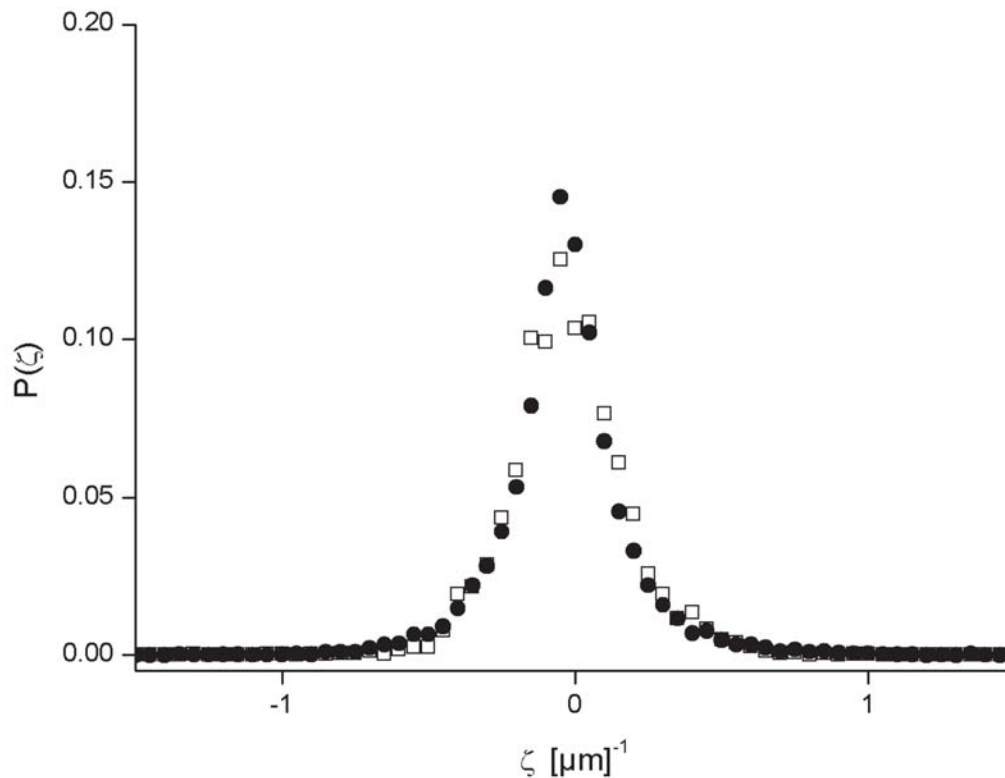


Abbildung 4.14: Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Filamentkrümmungen  $P(\zeta)$  für die Referenzmessung (offene Quadrate) und die Messung bei  $\gamma \approx 250$  (geschlossene Kreise).  $c = 0.15 \text{ mg/ml}$ .

Abbildung 4.17 zeigt die Ergebnisse aus Abb. 4.16 b ( $c = 0.02, 0.08$  und  $0.15 \text{ mg/ml}$ )<sup>5</sup> im Vergleich zu den Ergebnissen nach Anwendung einer Deformationsamplitude  $\gamma \approx 2500$ . Es ist zu erkennen, dass die Wahrscheinlichkeit der Krümmungsverteilung zu höheren Krümmungen nach  $\gamma \approx 2500$  deutlich zugenommen hat. Eine Erklärung für die Verschiebung der Häufigkeitsverteilung hin zu höheren Krümmungen unter Einfluss einer hohen Scheramplitude könnte in der Konformation von Filamenten mit  $R/L < 0.8$  liegen. Bei einigen dieser Filamente konnte beobachtet werden, dass die Filamente im 3D-Raum eine Art Schlaufe bilden, wie in Abb.4.18 am Beispiel einer zweidimensionalen Projektion gezeigt. Diese Schlaufen weisen lokal sehr hohe Krümmungen auf. Um die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Schlaufen  $P(\kappa)$  innerhalb einzelner Filamente in Abhängigkeit der eingebrachten Deformation  $\gamma$  zu bestimmen, wurden die verschlauften Filamente  $\kappa$ , also Filamente mit mindestens

<sup>5</sup>Für die Konzentration  $0.3 \text{ mg/ml}$  wurde kein Experiment bei mit  $\gamma \approx 2500$  durchgeführt (Kapitel 2.5.2).

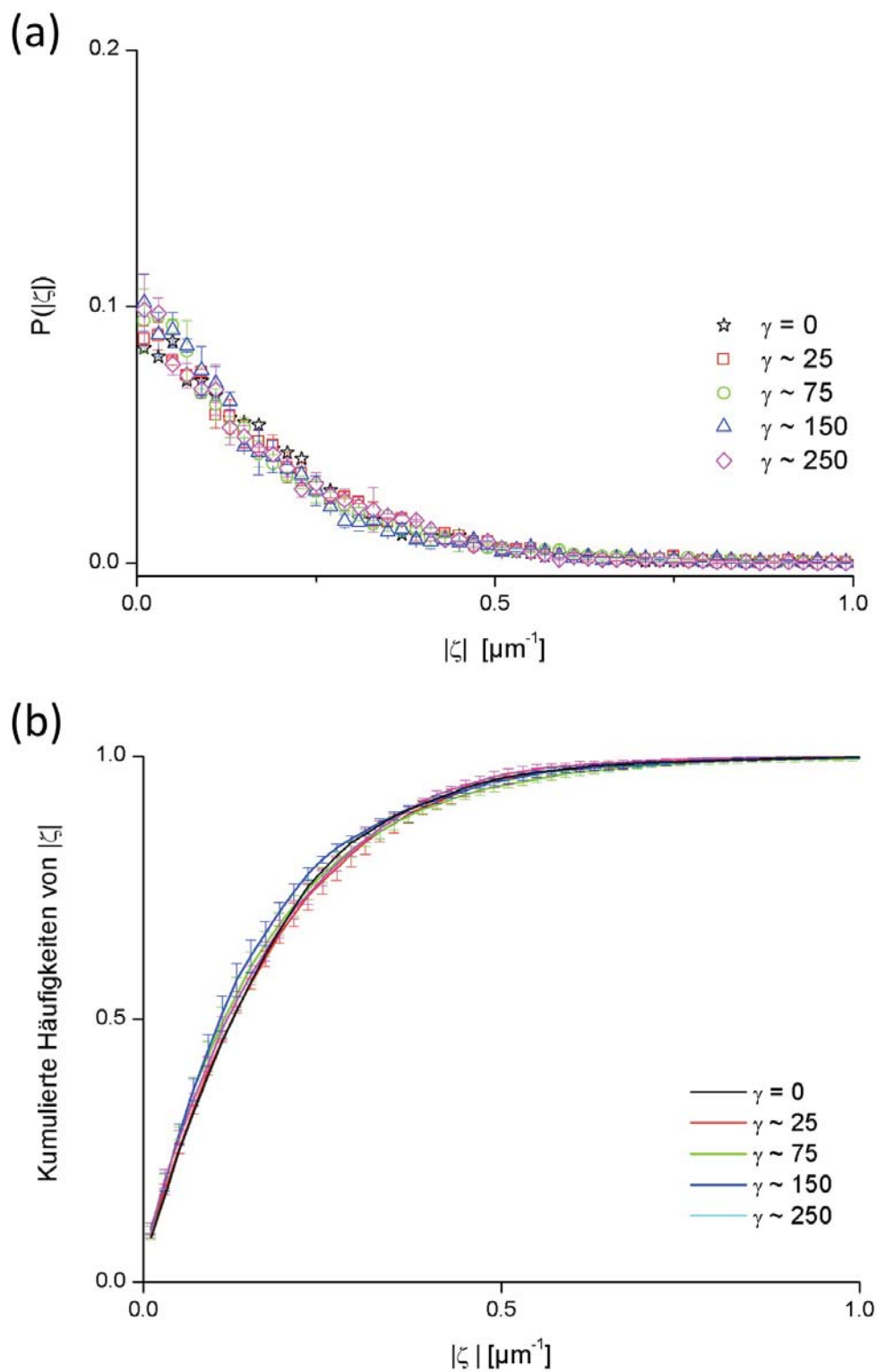


Abbildung 4.15: (a) Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Filamentkrümmungen  $P(|\zeta|)$  in Abhängigkeit der Deformationsamplitude  $\gamma$  am Beispiel von  $c = 0.15$  mg/ml. (b) Darstellung der kumulativen Häufigkeitsverteilung aus (a).



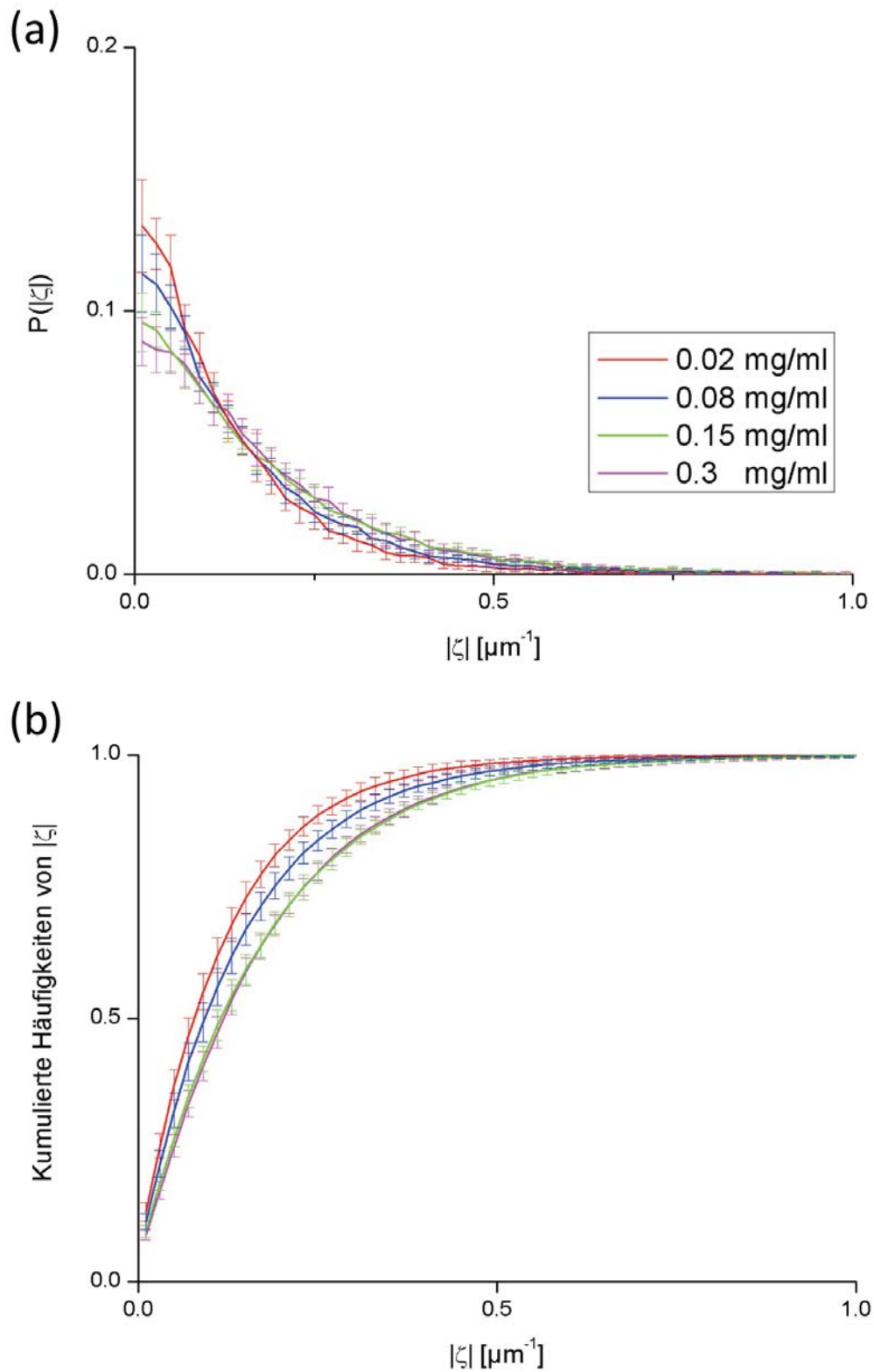


Abbildung 4.16: (a) Darstellung der über die Deformationsamplituden ( $\gamma \approx 25 - 250$ ) gemittelten Häufigkeitsverteilung der Filamentkrümmungen  $P(|\zeta|)$  in Abhängigkeit der Lösungskonzentration  $c$  (b) Darstellung der kumulativen Häufigkeitsverteilung aus (a).

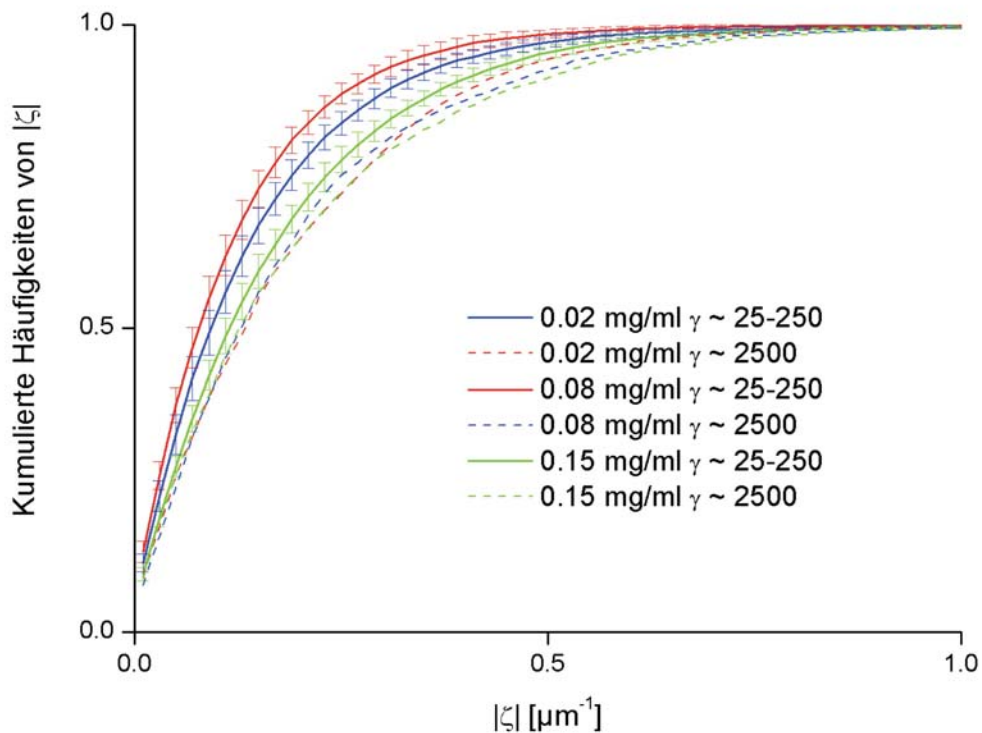


Abbildung 4.17: Vergleich zwischen der gemittelten Häufigkeitsverteilung der Filamentkrümmungen  $P(|\zeta|)$  aus Abb. 4.16 b ( $\gamma \approx 25 - 250$ ) mit der kumulativen Häufigkeitsverteilung nach Anwendung einer Deformationsamplitude  $\gamma \approx 2500$  für die Lösungskonzentrationen  $c = 0.02, 0.08$  und  $0.15$  mg/ml

einem Kreuzungspunkt in der Projektion des Filaments, gezählt. Aufgrund der relativ geringen Anzahl der untersuchten Filamente pro Bilderstapel, wurde die Anzahl der verschlauften Filamente über alle Lösungskonzentrationen summiert und als prozentualer Anteil im Vergleich zu Filamenten ohne Schlaufe ermittelt (Abb. 4.19). Die Analyse zeigte, dass sich die Wahrscheinlichkeit für Schlaufen bis zu einer Deformationsamplitude  $\gamma \approx 250$  nicht signifikant ändert und unterhalb von  $\sim 5\%$  liegt. Bei der maximalen Deformationsamplitude  $\gamma \approx 2500$  steigt die Wahrscheinlichkeit für F-Aktin-Schlaufen hingegen auf über  $15\%$  an.

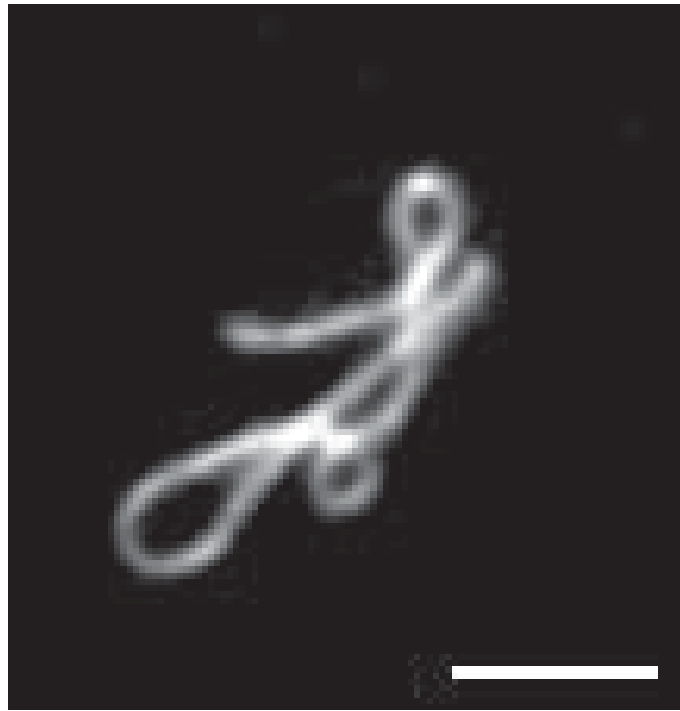


Abbildung 4.18: Projizierte Abbildung einer dreidimensionalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (Konfokales-Vielfach-Lochblenden-System, Kapitel 2.1.2) eines einzelnen Aktin-Filament, als Beispiel für ein Filament, in dem sich Schlaufen gebildet haben. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$

## 4.2 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war durch die Analyse der mikroskopisch zugänglichen Parameter, die Mechanismen hinter der makroskopischen Eigenschaft der Viskoelastizität besser zu verstehen.

Die Analyse der Krümmungen von Filamenten in einem Konzentrationsbereich zwischen  $c = 0.02 - 0.3 \text{ mg/ml}$ , gemittelt über die Deformationsamplituden bis  $\gamma \approx 250$ , hat eine deutliche Abhängigkeit der Häufigkeitsverteilung der Filamentkrümmungen von der Lösungskonzentration im Bereich zwischen  $c = 0.02 - 0.15 \text{ mg/ml}$  gezeigt. Die Verteilungen selbst zeigen alle einen ausgeprägten exponentiellen Abfall zu höheren Filamentkrümmungen. Hierbei steigt die Wahrscheinlichkeit für hohe Krümmungen mit Zunahme der Lösungskonzentration mit Ausnahme für die Lösungen  $c = 0.15$  und  $0.3 \text{ mg/ml}$ , welche keinen signifikanten Unterschied zueinander aufweisen. Letztere Beobachtung befindet sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeit von Romanowska et al. [41], in der Aktinlösungen im thermischen und dynamischen Gleichgewicht untersucht worden sind. Dort wurde bei Lösungen im

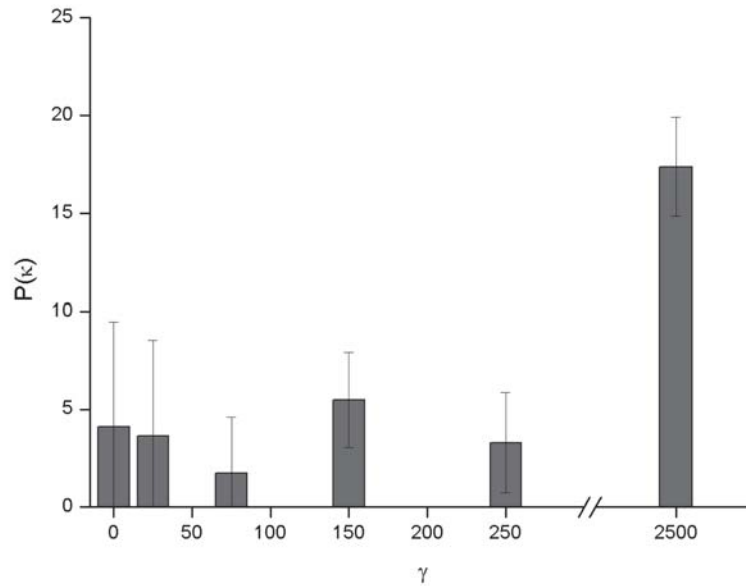


Abbildung 4.19: Darstellung der Wahrscheinlichkeit ( $P(\kappa)$ ) für Filamente mit mindestens einem Kreuzungspunkt in der Projektion des Filaments auf die  $xy$ -Ebene gemittelt über alle Konzentrationen in Abhängigkeit der Scheramplitude  $\gamma$

Konzentrationsbereich  $c = 0.3 - 1.5$  mg/ml ebenfalls keine signifikante Abhängigkeit der Krümmungsverteilung von  $c$  beobachtet. Gleichzeitig wurde in der Arbeit ebenfalls ein ausgeprägter exponentieller Abfall der Häufigkeitsverteilung zu höheren Röhrenradien hin beschrieben. Die Beobachtung, dass in dieser Arbeit die Konzentrationen  $c = 0.02 - 0.15$  mg/ml eine Konzentrationsabhängigkeit in der Krümmungsverteilung aufweisen, lässt vermuten, dass die Konzentrationen am Übergang zwischen dem verdünnten und halbverdünnten Konzentrationsregime (Kapitel 1.2.5) liegen. F-Aktin-Lösungen mit einer durchschnittlichen Konturlänge der Filamente von  $\langle L \rangle \sim 22$   $\mu\text{m}$ , wie sie auch in dieser Arbeit ermittelt wurde, wurden in der Arbeit von Käs et al. [53] in einem Konzentrationsbereich von  $0.1 - 2.0$  mg/ml und durch MacKintosh et al. [52] in einem Konzentrationsbereich von  $0.036 - 2.0$  mg/ml als halbverdünnt beschrieben. Somit kann der Anstieg der Wahrscheinlichkeit zu hohen Filamentkrümmungen im Konzentrationsbereich  $c = 0.02 - 0.15$  mg/ml mit der Wechselwirkung zwischen schwach physikalisch vernetzten Filamenten erklärt werden. In diesem Konzentrationsbereich ist die Wahrscheinlichkeit für lokal hohe Filamentkrümmungen noch gering, nimmt aber mit ansteigender Lösungskonzentration soweit zu bis im Bereich von  $c \geq 0.15$  mg/ml eine maximale Verschlaufung

erreicht ist, welche durch die Biegesteifigkeit der Filamente im thermischen und dynamischen Gleichgewicht limitiert ist.

Unter Einfluss einer Deformation wurde in schwach kreuzvernetzten Aktinlösungen ( $c \approx 0.4 \text{ mg/ml}$  [60],  $c \approx 1 \text{ mg/ml}$  [65]) und auch in rein physikalisch vernetzten Aktinlösungen ( $c \approx 0.4 \text{ mg/ml}$ ) [37] bei dynamischen rheologischen Experimenten eine Abnahme des Speichermoduls beschrieben, der viskose Anteil nimmt also gegenüber dem elastischen Anteil zu. Da in einer rein physikalisch vernetzten Polymerlösung die Zahl der möglichen Vernetzungspunkte, welche die Viskoelastizität vermitteln, von der Länge der Filamente abhängt, wird in den Arbeiten die Abnahme des Speichermoduls auf ein Zerreißen der Filamente zurückgeführt. Die in dieser Arbeit beobachtete Schlaufenbildung innerhalb einzelner Filamente eröffnet jedoch eine alternative Interpretation der makroskopischen Beobachtung der Abnahme des Speichermoduls, da auch eine Verschlaufung einzelner Filamente zu einer Reduzierung möglicher Vernetzungspunkte führen kann. Diese Vermutung wird durch die Analyse der Längenverteilung gestützt, in der keine Abnahme der mittleren Konturlänge von Filamenten, jedoch eine Zunahme der Wahrscheinlichkeit von nicht-gestreckten Filamentkonformationen beobachtet wurde. Aufgrund der in dieser Arbeit untersuchten relativ niedrigen Konzentrationen, müssen weitere Experimente klären ob eine Schlaufenbildung von Filamenten als alternative Erklärung für die Abnahme des Speichermoduls in Frage käme.

Die in Abb. 4.11 gezeigte Form der Häufigkeitsverteilung des normierten End-zu-End-Abstands von Filamenten in Lösungen, welche sich im thermischen und dynamischen Gleichgewicht befinden, wird durch die theoretische Arbeit von Wilhelm und Frey [103] bestätigt, welche eine Häufung der Wahrscheinlichkeit für den normierten End-zu-End-Abstand nahe 1 und einen steilen Abfall zu kleineren Werten beschreibt. Die Änderung des normierten End-zu-End-Abstands in Abhängigkeit der Deformationsamplitude befindet sich jedoch im Widerspruch dazu, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen Filamentkrümmungen und Deformationsamplitude festgestellt werden konnte. Grund hierfür könnte sein, dass einige Abschnitte des Filaments unter Verringerung des End-zu-End-Abstands zwar eine höhere Krümmung erfahren, andererseits aber Fluktuationsamplituden durch die nematische Ausrichtung der Filamente reduziert werden und somit andere Filamentabschnitte gestreckt werden, was im Mittel, bei der hier vorliegenden Statistik, zu keiner signifikanten

Änderung der Filamentkrümmungen führt.

Die Analyse der Orientierung der Filamente unter Einfluss einer ansteigenden Scherrate ergab, dass sich die Filamente im Konzentrationsbereich zwischen  $0.02 - 0.3 \text{ mg/ml}$  ausrichten. Durch die Experimente mit konstanter Scherrate, im Vergleich mit den Daten aus den Experimenten mit ansteigender Scherrate, konnte geklärt werden, dass dieser Prozess von der Deformationsamplitude abhängt, da die Daten sich gut in den Verlauf des Ordnungsparameters in Abhängigkeit der Deformationsamplitude einfügen. Jedoch lassen sie keine Aussage darüber zu, wie groß der Einfluss der Scherrate bei der Ausrichtung ist, da es keine Vergleichsmessungen in Abhängigkeit verschiedener Scherraten gibt. Das Experiment mit ansteigender Scherrate lässt deshalb keine Aussage über den Einfluss der Scherrate zu, weil die Lösungen (außer  $c = 0.15 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$ ) nicht unabhängig von der zuvor angewendeten Deformation betrachtet werden können. Die Beobachtung, dass nach dem Abschalten der Scherung der Ordnungsparameter sofort abnimmt und nach weniger als 1 min ein Plateau erreicht, kann durch die unterschiedlichen Relaxationsprozesse in Polymerlösungen semiflexibler Filamente erklärt werden. In der Arbeit von Isambert [104] wurden verschiedene Relaxationsprozesse berechnet. Die Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass in dem Zeitraum der hier vorgestellten Messungen nur eine Relaxation von Filamentabschnitten stattgefunden hat. Eine Umorientierung der Röhren mit einem damit verbundenen Verlust der nematischen Ordnung bis hin zu einer isotropen Verteilung der Filamente findet über den beobachteten Zeitraum demnach nicht statt.

Die Analyse der hochverdünnten Aktinlösung ( $c = 0.15 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$ ) ergab eine Abhängigkeit von der Scherrate. Das Ergebnis wies darauf hin, dass es eine Art kritische Scherrate geben muss, ab der Filamente trotz ihrer intrinsischen Biegesteifigkeit verschlaufte Konformationen annehmen, welche im thermischen und dynamischen Gleichgewicht nicht möglich sind. Dies bestätigte sich in der Analyse der Zeitserie der zweidimensionalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme. Hier wurde eine signifikante Konformationsänderung, welche mit hohen Krümmungen einhergehen, erst ab einer minimalen Scherrate von  $\dot{\gamma} \geq 0.12 \text{ s}^{-1}$  beobachtet. Die Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für verschlaufte Filamentkonformation wird durch die Arbeit von Winkler [105] gestützt in der gezeigt wurde, dass die Flexibilität von semiflexiblen Filamenten mit steigenden Scherrate zunimmt.

Zudem wurde in dieser Arbeit eine Anomalie im Relaxationsverhalten der Filamente beobachtet. Entgegen der Erwartung, dass freie Filamente aufgrund ihrer Biegesteifigkeit und aufgrund der fehlenden Wechselwirkung mit anderen Filamenten im Bereich weniger Sekunden in ihren Gleichgewichtszustand relaxieren sollten (Kapitel 1.2.2), wurde eine solche schnelle Relaxation nicht beobachtet. Käs et al. [106] haben in einem anderen Zusammenhang vermutet, dass Aktin-Filamente kleine Defekte in ihrer helikalen Struktur aufweisen könnten. Ein Nachgeben der Filamente an diesen Stellen aufgrund der hohen Scherrate, könnte die Beobachtung der verzögerten Relaxation erklären. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass der Einfluss der Saccharoselösung mit einer Viskosität  $\eta$  von  $\eta(20^\circ\text{C}) \approx 3 \text{ Ns m}^2$  ( $\sim$  dreifache Viskosität von Wasser bei  $20^\circ\text{C}$ ) bei dieser verzögerten Relaxation eine Rolle spielt. Ein mögliches Kontrollexperiment wäre die Analyse der Fluktuationsmoden in Abhängigkeit der Konzentration der Saccharoselösung.

In dieser Arbeit ist die Analyse eines kleinen Teils zur Verfügung stehender Rohdaten gezeigt. Dies beruht darauf, dass die Analyse in Ermangelung eines automatisierten verlässlichen Algorithmus zum Finden der Filamentkonturen manuell durchgeführt wurde und daher die Analyse aller aufgenommenen Bilderstapel in dem Zeitrahmen dieser Doktorarbeit nicht möglich war.





## 5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Analyse von mikroskopisch zugänglichen Parametern, wie Orientierung, Konturlängen, Krümmungen von Filamenten und die Form der Häufigkeitsverteilung von Röhrenradien zum Verständnis der makroskopischen Eigenschaft der Viskoelastizität beitragen.

Als denkbare Experiment für die Zukunft könnte, mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Experiment zur Analyse der Röhrenradien, der Einfluss von zweiwertigen Ionen, wie beispielsweise  $Mg^{2+}$ , auf die Häufigkeitsverteilung von Röhrenradien untersucht und mit den Vorhersagen der *Segment-Fluid*-Theorie verglichen werden, um die kurzlebigen elektrostatischen Anziehungskräfte zu untersuchen, welche durch zweiwertige Ionen vermittelt werden [107, 108].

Eine naheliegende Fortsetzung der Scherexperimente liegt zunächst in der Auswertung der bisher noch nicht analysierten Rohdaten. Hierfür ist die Programmierung eines verlässlichen Algorithmus zum Finden der Filamentkonturen in allen drei Raumrichtungen unerlässlich. Eine automatisierte Auswertung in drei Dimensionen hat gegenüber der manuellen Auswertung zum einen den Vorteil, die Statistik an ausgewerteten Filamenten deutlich zu erhöhen, zum anderen kann der Fehler vermieden werden, welcher durch die Projektion der Daten auf die xy-Achse entsteht.

Für die Überprüfung der Hypothese, dass Filamentschlaufen im Zusammenhang mit der in makro-rheologischen Experimenten beobachteten Abnahme des Speichermoduls stehen, wären zunächst dynamische rheologische Messungen im nichtlinearen Bereich (Kapitel 1.2.5) mit einem Rheometer durchzuführen, um den Parameterraum

(z.B. Konzentration der Probe oder benötigte Deformationsamplitude sowie Scherrate) bei dem der Effekt der Abnahme des Speichermoduls auftritt, einzugrenzen. Danach könnten an den gleichen Lösungen (um die gleiche Längenverteilung der Filamente zu gewährleisten) ebenfalls dynamische Messungen mit der Scherkammer, unter Verwendung der durch die rheometrischen Messungen erhaltenen Parameter für Scherrate und Deformationsamplitude durchgeführt werden, um so die mikroskopischen Mechanismen hinter dem nichtlinearen viskoelastischen Verhalten zu beantworten. Für die Kontrolle der mittleren Konturlänge und eine Reduzierung der breiten Verteilung von Filamentlängen wäre die Verwendung des Proteins Gelsolin denkbar, welches in der Lage ist, die Längenverteilung von F-Aktin zu beeinflussen [109].

Diese Arbeit lieferte einen Hinweis darauf, dass die Ausrichtung von Filamenten unter Scherung von der Amplitude der Deformation abhängt. Die Größe des Einflusses der Scherrate hingegen konnten diese Experimente nicht klären. Um den Einfluss der Scherrate systematisch zu untersuchen, muss, aufgrund der Abhängigkeit der Ausrichtung der Filamente von der Amplitude der Deformation, für jede Scherrate eine neue Probe verwendet werden. Die in dieser Arbeit verwendete Scherkammer ist aufgrund des relativ großen benötigten Probenvolumens von  $\sim 3.2$  ml jedoch nicht für diese Untersuchung geeignet, da Aktin im Allgemeinen nicht in großen Mengen vorrätig ist<sup>1</sup>. Für die systematische Untersuchung des Einflusses der Scherrate wäre der Aufbau einer Scherkammer denkbar, welche deutlich weniger Probenvolumen benötigt, gleichzeitig jedoch mit der Fluoreszenzmikroskopie kombinierbar ist, welche sich zur Zeit bei unserem Kollaborationspartner (ICS-3; Forschungszentrum Jülich) in Planung befindet.

Im Hinblick auf das in dieser Arbeit beobachtete ungewöhnliche Relaxationsverhalten von F-Aktin in geringer Lösungskonzentration, würde eine systematische Analyse des Relaxationsverhaltens in Abhängigkeit des Saccharoseanteils in der Lösung eine Interpretation der hier gezeigten Daten ermöglichen. Desweiteren könnte eine Analyse in Abhängigkeit der F-Aktin Konzentration das Langzeitverhalten von Relaxationsprozessen beleuchten. So könnte man klären, in welchem Zeitraum eine vollständige Erholung (also maximale Isotropie bezüglich der Orientierung der Fila-

---

<sup>1</sup>Jede für diese Arbeit durchgeführte Aktin-Aufreinigung ergab etwa 24 ml einer reinen Aktinlösung mit einer Konzentration von  $\approx 1$  mg/ml.

mente) des Netzwerkes in Abhängigkeit der Lösungskonzentration und Filamentlänge zu erwarten ist.

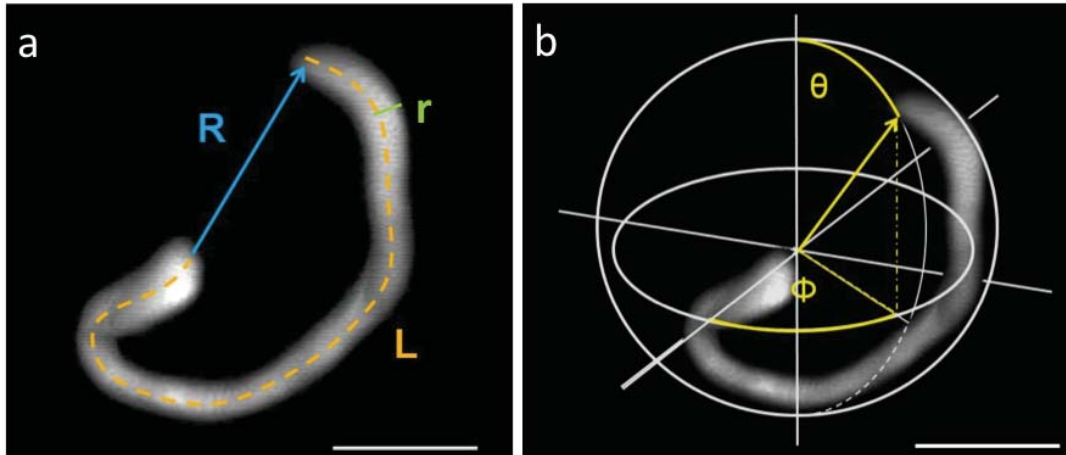


Abbildung 5.1: Zeitliche Überlagerung von 6 dreidimensionalen Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (LSM510 meta) eines einzelnen Aktin-Filaments. Aktin-Konzentration: 0.2 mg/ml, Verhältnis von markierten zu unmarkierten Filamenten 1:2000. Dargestellt sind die Parameter, welche für eine Analyse in drei Dimensionen für Aufnahmen dieser Qualität zugänglich sind (a) Konturlänge  $L$ , End-zu-End-Abstand  $R$  und Röhrenradius  $r$  sowie (b) die Orientierung im Raum über die Winkel  $\Theta$  und  $\Phi$ . Maßstab: 10  $\mu\text{m}$

Mit einer Kombination aus der Analyse der nematischen Ordnung von F-Aktinlösungen und der Analyse der Häufigkeitsverteilung von Röhrenradien wäre eine systematische Analyse des Einflusses der nematischen Ordnung auf die Häufigkeitsverteilung der Röhrenradien möglich, wie es am Beispielfilament in Abbildung 5.1 demonstriert ist. Damit könnte der Beitrag den die nematische Ausrichtung der Filamente auf die Größe der Röhrenradien hat, genau bestimmt und die Abweichung der *Segment-Fluid*-Theorie im niedrigen Konzentrationsbereich aufgeklärt werden. Für die Durchführung des Experiments wäre das in dieser Arbeit verwendete LSM 510 meta von Zeiss geeignet, da es über eine ausreichend hohe Auflösung verfügt. Für die Markierung von F-Aktin ist das Phalloidin-Konjugat Atto647N-Phalloidin empfehlenswert, weil hier im Vergleich zu der Verwendung anderer Phalloidin-Konjugate der beste Kontrast in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erzielt werden konnte. Als Kontrollmessung von F-Aktin ohne den Einfluss einer nematischen Ordnung wäre die Verwendung von speziellen Kammerobjektträgern (LabtekChambers, Thermo Scientific) ratsam, welche sich im Laufe dieser Arbeit als Alternative mit

nur geringfügiger Verdunstung erwiesen haben. Kammern, welche nicht ausreichend vor Verdunstung geschützt sind, haben den Nachteil, dass die thermisch dominierte Fluktuationsbewegung der Filamente durch die durch Verdunstungseffekte getriebene Bewegung der Filamente überlagert ist und dadurch das Ergebnis der Analyse des Röhrenradius beeinflusst wird.

## A. Anhang

## A.1 Liste der verwendeten Materialien und Chemikalien

Bezeichnung	ggf. Kennzeichnung	Hersteller
<b>Technische Geräte</b>		
Zentrifuge	Avanti J-20XP Centrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge	Optima LE-80K Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor	JA-10	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor	Type-45 Ti,	Beckman Coulter, Krefeld
Rotor	SW-60Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Homogenisator	Dounce, 17 ml /loose	Wheaton, Millville, NJ, USA
Homogenisator	Dounce, 1 ml /tight	Wheaton, Millville, NJ, USA
Lyophilisator	Modulyo D	Thermo Scientific, Karlsruhe
Nanodrop	ND-100	Peqlab, Erlangen
Refraktometer	AR-3-6	Krüss Optronic, Hamburg
Pipette	<i>verschiedene Fassungsvermögen</i>	Eppendorf Research, Wiesbaden
Äktapurifier	UPC-900	GE Healthcare, München
Säule	XK 50	GE Healthcare, München
Säulenmaterial	Sephacryl S-300	GE Healthcare, München
<b>Einzel-Lochblenden-System</b>		
Mikroskop	LSM 510 meta	Zeiss, Jena
Objektiv	<i>C-Apochromat 63x/1.2 W corr</i>	Zeiss, Jena
<b>Vielfach-Lochblenden-System</b>		
Mikroskop	Axiovert 200 M	Zeiss, Jena
Konfokale Einheit	VT-Infinity-I	Visitron Systems, Puchheim
Argon/Krypton Laser	Stabilite 2250	Spectra-Physics, Darmstadt
Objektiv	<i>Epiplan-Neofluar 50x/1.0 Oil Pol</i>	Zeiss, Jena
Kamara EMCCD	C9100-02	Hamamatsu, Herrsching
Kamara EMCCD	iXon DU-897 (back illuminated)	Andor, South Windsor, CT, USA
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
Verbandmull	Gazin	Lohmann Rauscher, Neuwied
Rechteckige Kapillaren	Vitrotubes 5010	Vitrocom, Shipley, UK

Dialyseschläuche	Spectra/Por MWCO 25000	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Reaktionsgefäße</i>	BD Falcon, 15 ml	BD Biosciences, Fernwald
<i>Reaktionsgefäße</i>	1.5 und 2 ml Safe-Lock	Eppendorf, Wiesbaden
<i>Reaktionsgefäße</i>	1.5 ml Safe-Lock (blickdicht)	Eppendorf, Wiesbaden
Deckgläser	80 mm	Menzel, Braunschweig
Kammerobjektträger	LabtekChambers	Thermo Scientific, Braunschweig
<b>Chemikalien</b>		
FluoSpheres 540/560	Ø 0.17 µm	Invitrogen, Darmstadt
FluoSpheres 633/660	Ø 0.17 µm	Invitrogen, Darmstadt
Fluoreszierende Kugeln	Ø 0.5 µm Latex beads L3280	Sigma, Taufenkirchen
TRITC-Phalloidin	P1951	Sigma, Taufenkirchen
Atto647N-Phalloidin	Atto647N	Atto-Tec, Siegen
Phalloidin	P2141	Sigma, Taufenkirchen
Tris Base	93362	Sigma, Taufenkirchen
CaCl <sub>2</sub>	1.02382.0500	Merck, Darmstadt
KCl	P933	Sigma, Taufenkirchen
MgCl <sub>2</sub>	M2670	Sigma, Taufenkirchen
Adenosintriphosphat	ATP, A2383	Sigma, Taufenkirchen
Dithiothreitol	DTT, 31.11474.0005	Merck

Tabelle A.1: Liste der verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien

## A.2 Zusammensetzung und pH-Werte der verwendeten Pufferlösungen

Für die Experimente zur Bestimmung der Röhrenradien wurden Pufferlösungen in den Konzentrationszusammensetzungen verwendet, wie sie zuvor auch in anderen Arbeiten mit Aktinlösungen verwendet wurden [41, 53] (Vgl. erste und zweite Spalte der Tabelle A.2), mit dem Unterschied, dass bei dem G-Puffer ATP vor der Einstellung des pH-Werts zugegeben wurde. Die Zugabe nach dem Einstellen des pH-Wertes, führt für den Fall, dass der auf Tris basierende Puffer an die Grenzen seiner Pufferkapazität gerät, zu einem Absinken des pH-Wertes auf einen Wert  $< \text{pH} 7$ , da ATP in Lösung eine Säure ist. Dies wiederum kann zur Bildung von Aktin-Aggregaten innerhalb der Polymerlösung führen.

Für die Untersuchung von Polymerlösungen unter Scherung wurden sowohl die Molaritäten als auch die pH-Werte beider verwendeter Pufferlösungen verändert. Die Anpassung des pH-Wertes und der Molarität des Puffers in den Scherexperimenten (Vgl. dritte und vierte Spalte in der Tabelle) gewährleistete einen stabilen pH-Wert von  $\text{pH} 7.4$  während der Polymerisation und des Experiments. Im Laufe der Arbeit zeigte sich, dass die Erhöhung der Pufferkapazität und die Erhöhung des pH-Wertes der Pufferlösungen die Reproduzierbarkeit der Polymerisation verbesserte und gleichzeitig die Bildung von Aktin-Aggregaten gänzlich vermieden wurde.

Experiment zur Bestimmung der Röhrenradien		Scherexperiment	
G-Puffer	10x F-Puffer	G-Puffer	10x F-Puffer
2.0 mM Tris	20 mM Tris	5.0 mM Tris	20 mM Tris
0.2 mM $\text{CaCl}_2$	2.0 mM $\text{CaCl}_2$	0.2 mM $\text{CaCl}_2$	2.0 mM $\text{CaCl}_2$
0.2 mM ATP	1.0 M KCl	0.2 mM ATP	1.0 M KCl
0.2 mM DTT	20 mM $\text{MgCl}_2$	0.2 mM DTT	20 mM $\text{MgCl}_2$
pH 8.0	pH 7.5	pH 7.4	pH 8.5
	5.0 mM ATP		5.0 mM ATP
	2.0 mM DTT		2.0 mM DTT

Tabelle A.2: **Zusammensetzung und pH-Werte der verwendeten Pufferlösungen**



## A.3 Kontrollexperimente

In diesem Abschnitt werden anhand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen das Zusammenheilen von Filamentbruchstücken und die Bindungskinetik von Phalloidin-Konjugaten verdeutlicht.

### Zusammenheilen von Filamentbruchstücken

In den in dieser Arbeit gezeigten Scherexperimenten war es wegen der Analyse der Längenverteilung von Filamenten von besonderer Bedeutung sicher zu stellen, dass das im Fluoreszenzmikroskop sichtbare Filament auch auf seiner gesamten Länge sichtbar war. Schon seit Ende 1980 ist bekannt, dass Aktinfilamente unter dem Einfluss von Ultraschall in kleine Filamentabschnitte zerbrechen und anschließend in der Lage sind Filamente mit der gleichen Länge zu formen wie vor dem Einfluss von Ultraschall [110–112]. Bei der Präparation von polymerisiertem F-Aktin kann es beim Pipettieren leicht zu Filamentbruch kommen, was bei der Präparation für die Fluoreszenzmikroskopie zu gegebenenfalls unerwünschtem Zusammenheilen von markierten mit unmarkierten Filamentstücken führen kann. Um zu überprüfen ob es bei der in dieser Arbeit verwendeten Mischungsmethode zu Filamentbruch kommt, wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Hierzu wurden zwei Aktinlösungen gleicher Konzentration (0.2 mg/ml) mit unterschiedlichen Phalloidin-Fluorophor-Konjugaten markiert und für 1 h polymerisiert. Danach wurden die Proben auf zwei unterschiedliche Weisen miteinander gemischt. Zum einen wurde eine abgeschnittene Pipettenspitze verwendet und die beiden Proben sehr vorsichtig einige Male ( $\sim 5x$ ) pipettiert. Zum anderen wurden die Proben mit einer nicht abgeschnittenen Pipettenspitze (Eppendorf, 1 ml), unter Einfluss sehr hoher Scherkräfte an der Pipettenspitze, gemischt. Danach wurden beide gemischten Proben 20 min inkubiert. Im Anschluss wurde von jeder der beiden Proben 1  $\mu\text{m}$  mit 1 ml GF-Pufferlösung (Kapitel 2.5.1) verdünnt und mikroskopiert. Während die vorsichtig gemischte Probe kaum zusammengeheilte Filamente enthielt (Abbildung A.1 a), war der Anteil der zusammengeheilten Filamente in der Lösung, welche unter Einfluß hoher Scherkräfte pipettiert wurde, sehr hoch. Abbildung A.1 b zeigt eine Aufnahme von zusammengeheilten Filamenten. Dieses Kontrollexperiment hat gezeigt, dass die in dieser Arbeit verwendete vorsichtige Mischungsmethode geeignet ist Filamentbruch zu verhindern. Somit konnte sichergestellt werden, dass die untersuchten Filamente auf ihrer gesamten Länge für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar waren.

### Bindungskinetik des Phalloidins

Ein weiterer Effekt, welcher in einem Kontrollexperiment untersucht wurde, ist die

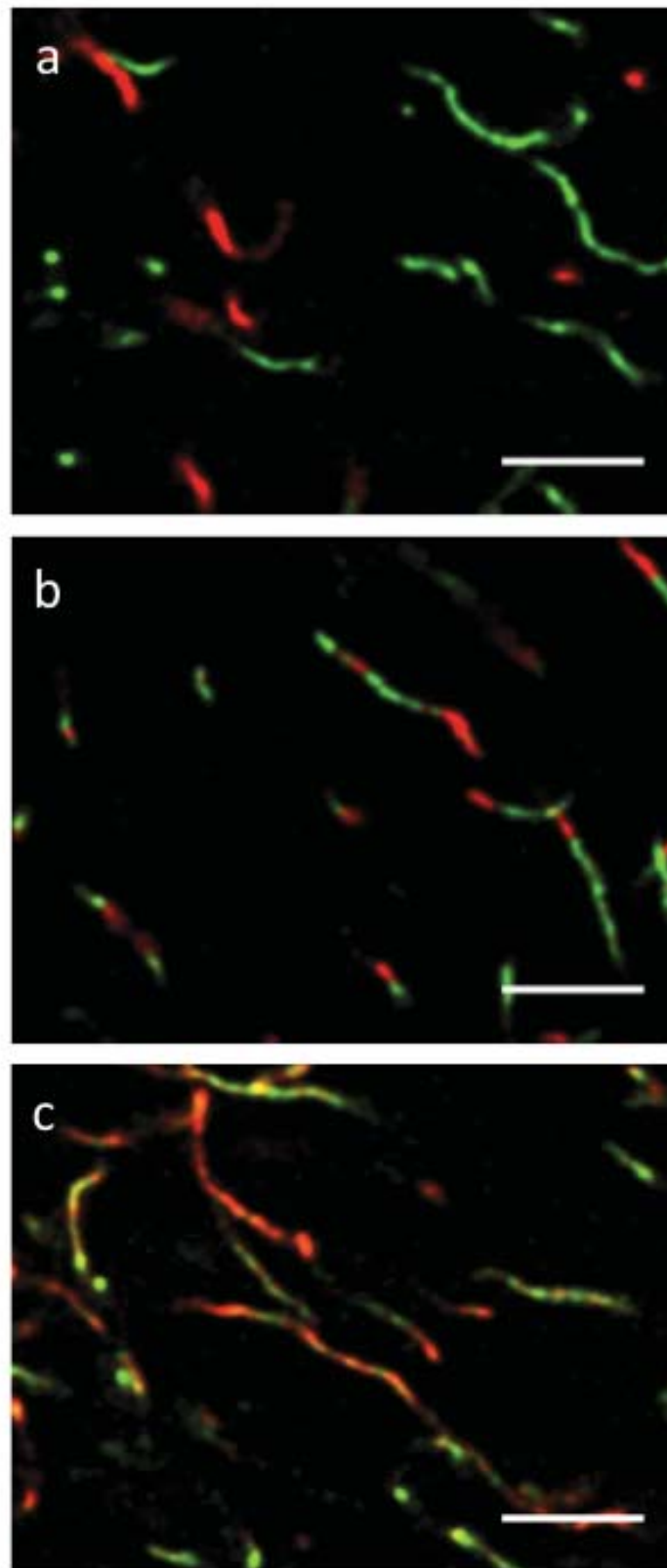


Abbildung A.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (LSM 510 meta, Zeiss) **(a)** In diesem Experiment wurden die unterschiedlich gefärbten Proben vorsichtig gemischt und anschließend 20 min inkubiert. Danach 1:1000 mit Pufferlösung verdünnt. **(b)** In diesem Experiment wurden die Proben unvorsichtig gemischt und anschließend analog **(a)** präpariert. **(c)** wurde analog **(a)** präpariert, aber nach der oben beschriebenen vorsichtigen Mischung 2.5 h inkubiert. Maßstab: 15  $\mu\text{m}$ .

Bindungskinetik des Phalloidins. Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, führt die Bindungskinetik des Phalloidins zu einer Verschlechterung des Kontrasts [84]. Um zu überprüfen, in welchem Ausmaß diese Kinetik Einfluss auf die Markierung der Filamente hat, wurde die oben beschriebene vorsichtig gemischte Probe weitere 2.5 h inkubiert und danach, analog zum oben beschriebenen Experiment, 1  $\mu\text{m}$  dieser Lösung mit 1 ml GF-Pufferlösung verdünnt und mikroskopiert (Abb. A.1 c). Die Bereiche in denen der Austausch der Phalloidin-Konjugate in einem großen Ausmaß stattgefunden hat, erscheinen durch die Überlagerung von rotem und grünen Signal orange. Damit hat dieses Kontrollexperiment gezeigt, dass der Austausch von unterschiedlichen Phalloidin-Konjugaten zu einer Ummarkierung der Filamente führt. Durch die in Kapitel 2.1 beschriebene Verwendung einer 30%-Saccharoslösung konnte der Austausch reduziert werden, was zu einem gleichbleibend guten Fluoreszenzsignal für die Dauer des Scherexperiments führte.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke....

... **Prof. Rudolf Merkel**, dass er mir als Quereinsteiger aus der Atomphysik diese Doktorarbeit anvertraut hat und dafür, dass seine Tür immer offen steht, ob es konkrete Fragen zu meiner Arbeit oder auch grundsätzliche, wissenschaftliche Diskussionen betrifft.

... **Prof. Kubitscheck** für die Übernahme des Korreferates.

... **Priv. Doz. Dr. Margret Giesen**, für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und ihre Geduld bei der Korrektur dieser Doktorarbeit. Es gibt wohl niemanden der lesbarere und konstruktivere Kritik übt und das in einem Zeitrahmen der an Hexerei grenzt. Ein ganz großes Dankeschön!

... **Dr. Bernd Hoffmann** für die sehr gute Betreuung bezüglich der Aktin-Aufreinigung und für die geduldige Beantwortung aller Fragen „die auch nur ein Physiker“ im Zusammenhang mit Biologie stellen kann.

... **Wolfgang Rubner** für die Unterstützung bei technischen Fragen und für seinen unnachahmlich trockenen Humor.

... **Prof. Klaus Kroy, Jens Glaser** und **Dr. Dipanjan Chakraborty** vom Institut für theoretische Physik in Leipzig für die erfolgreiche Kooperation. Insbesondere möchte ich Jens für seine konstruktive Kritik bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit danken.

... **Prof. Jan Dhont** (ICS-3, FZ-Jülich) für die Möglichkeit meine Messungen an seinem Institut durchzuführen und **Priv. Doz. Dr. Pavlik Lettinga** und **Donald Guu** für die hervorragende Zusammenarbeit und die interessanten, wenn auch gelegentlich verwirrenden, Diskussionen bezüglich der Schermessungen. Dank u wel!

... **Dr. Norbert Kirchgeßner, Sebastian Houben, Georg Dreisen** und **Dr. Ronald Springer** für die Unterstützung bei allen Fragen rund um Matlab.

... **Simone Born, Verena Niediek, Nico Hampe** und **Nils Hersch** für die Unterstützung im Labor.

... **Kevin Küpper** für die Hilfe bei allen Fragen rund um ImageJ.

... **Claudia Schäfer** für die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Keratinozyte und für die letzten zwei Jahre als meine Bürokollegin.

... **Thorsten Jonas** für die elektronenmikroskopische Aufnahme des kardialen Fibroblasten und seine moralische Unterstützung während des Zusammenschreibens.

... den Mitarbeitern der Werkstatt und der IT für ihre kompetente und schnelle Hilfe. Ohne diese unkomplizierte Zusammenarbeit, wären einige Arbeiten oftmals ins Stocken geraten.

Ein großes Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Im Speziellen möchte ich den Menschen danken, die ich liebe.

Ich danke meinen Eltern, meinen drei Schwestern, meinen sechs Nichten und Neffen und dem Rest meiner großen Familie, die ich in den letzten drei Jahren viel zu selten gesehen habe.

Ich möchte mich bei allen Kollegen bedanken, die ich zu meinen Freunden zählen darf. Es ist ein Geschenk, wenn Beruf und Privatleben so wunderbar harmonieren.

Chrissi und Ulla danke ich für ihre moralische Unterstützung.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinem Freund David, dafür, dass er in den letzten drei Jahren mein Leben nicht nur beruflich sondern auch privat bereichert hat.

*Vor allem danke ich Dir dafür, dass Du mir in den letzten drei Monaten während des Zusammenschreibens so bedingungslos den Rücken freigehalten hast.*

*Ich liebe Dich!*

# Literaturverzeichnis

- [1] **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.** *Molecular Biology of the Cell* (Garland Publishing, New York, **2002**), 4th edition
- [2] **Kasza, K. E., Rowat, A. C., Liu, J., Angelini, T. E., Brangwynne, C. P., Koenderink, G. H., Weitz, D. A.** *The cell as a material*. *Current Opinion in Cell Biology* (**2007**) 19; 101–107
- [3] **Kirchenbüchler, D., Born, S., Kirchgeßner, N., Houben, S., Hoffmann, B., Merkel, R.** *Substrate, focal adhesions, and actin filaments: a mechanical unit with a weak spot for mechanosensitive proteins*. *Journal of Physics: Condensed Matter* (**2010**) 22; 194109
- [4] **Tokuraku, K., Kurogi, R., Toya, R., Uyeda, T. Q. P.** *Novel mode of cooperative binding between myosin and  $Mg^{2+}$ -actin filaments in the presence of low concentrations of ATP*. *Journal of Molecular Biology* (**2009**) 386; 149–162
- [5] **Bausch, A., Kroy, K.** *A bottom-up approach to cell mechanics*. *Nature Physics* (**2006**) 2; 231–238
- [6] **Frey, E.** *Physics in cell biology: actin as a model system for polymer physics*. *Advances in Solid State Physics* (**2001**) 356; 345–356
- [7] **Frey, E.** *Physikalische Fragestellungen aus der Zellbiologie*. *Physikalische Blätter* (**2001**) 57; 63–68
- [8] **Skarp, K.-P., Vartiainen, M. K.** *Actin on DNA—an ancient and dynamic relationship*. *Cytoskeleton* (**2010**) 67; 487–495

- [9] **Smith, P. R., Fowler, W. E., Pollard, T. D., Aebi, U.** *Structure of the actin molecule determined from electron micrographs of crystalline actin sheets with a tentative alignment of the molecule in the actin filament.* Journal of Molecular Biology (1983) 167; 641–660
- [10] **Maruyama, K., Tsukagoshi, K.** *Effects of KCl, MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> Concentrations on the Monomer-Polymer Equilibrium of Actin in the Presence and Absence of Cytochalasin D.* Journal of Biochemistry (1984) 96; 605
- [11] **Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y., Narita, A.** *The nature of the globular- to fibrous-actin transition.* Nature (2009) 457; 441–445
- [12] **Korn, E. D.** *Actin polymerization and its regulation by proteins from non-muscle cells.* Physiological Reviews (1982) 62; 672–737
- [13] **Fujii, T., Iwane, A. H., Yanagida, T., Namba, K.** *Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy.* Nature (2010) 467; 724–728
- [14] **Wegner, A., Engel, J.** *Kinetics of the cooperative association of actin to actin filament.* Biophysical Chemistry (1975) 3; 215–225
- [15] **Wegner, A.** *Head to tail polymerization of actin.* Journal of Molecular Biology (1976) 108; 139–150
- [16] **Coluccio, L. M., Tilney, L. G.** *Under physiological conditions actin disassembles slowly from the nonpreferred end of an actin filament.* The Journal of Cell Biology (1983) 97; 1629
- [17] **Oosawa, F., Kasai, M.** *A theory of linear and helical aggregations of macromolecules.* Journal of Molecular Biology (1962) 4; 10–21
- [18] **Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.** *Molecular Cell Biology* (Media Connected, New York, 2000), 4th edition
- [19] **Neuhaus, J., Wanger, M., Keiser, T., Wegner, A.** *Treadmilling of actin.* Journal of Muscle Research and Cell Motility (1983) 4; 507–527



- [20] **Kaufmann, S., Käs, J., Goldmann, W. H., Sackmann, E., Isenberg, G.** *Talin anchors and nucleates actin filaments at lipid membranes. A direct demonstration.* FEBS Letters (1992) 314; 203–205
- [21] **Galkin, V. E., Orlova, A., Schröder, G. F., Egelman, E. H.** *Structural polymorphism in F-actin.* Nature Structural & Molecular Biology (2010) 17; 1318–1323
- [22] **Holmes, K. C.** *Structural biology: actin in a twist.* Nature (2009) 457; 389–930
- [23] **Ott, A., Magnasco, M., Simon, A., Libchaber, A.** *Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy.* Physical Review E (1993) 48; 1642
- [24] **Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., Howard, J.** *Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape.* The Journal of Cell Biology (1993) 120; 923
- [25] **Isambert, H., Venier, P., Maggs, A., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., Carlier, M.** *Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins.* Journal of Biological Chemistry (1995) 270; 11437
- [26] **van Mameren, J., Vermeulen, K. C., Gittes, F., Schmidt, C. F.** *Leveraging single protein polymers to measure flexural rigidity.* The Journal of Physical Chemistry. B (2009) 113; 3837–3844
- [27] **Saitô, N., Takahashi, K., Yunoki, Y.** *The Statistical Mechanical Theory of Stiff Chains.* Journal of the Physical Society of Japan (1967) 22; 219–226
- [28] **Kratky, O., Porod, G.** *Diffuse small-angle scattering of X-rays in colloid systems.* Journal of Colloid Science (1949) 4; 35–70
- [29] **Edwards, S. F.** *The statistical mechanics of polymerized material.* Proceedings of the Physical Society (1967) 92; 9–16
- [30] **Odijk, T.** *The statistics and dynamics of confined or entangled stiff polymers.* Macromolecules (1983) 16; 1340–1344

- [31] **Semenov**, A. N. *Dynamics of concentrated solutions of rigid-chain polymers. Part 1. Brownian motion of persistent macromolecules in isotropic solution.* Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2 (1986) 82; 317
- [32] **Morse**, D. C. *Viscoelasticity of Concentrated Isotropic Solutions of Semiflexible Polymers. 2. Linear Response.* Macromolecules (1998) 31; 7044–7067
- [33] **Morse**, D. C. *Viscoelasticity of Concentrated Isotropic Solutions of Semiflexible Polymers. 3. Nonlinear Rheology.* Macromolecules (1999) 32; 5934–5943
- [34] **Morse**, D. C. *Tube diameter in tightly entangled solutions of semiflexible polymers.* Physical Review E (2001) 63; 031502
- [35] **Hinsch**, H., **Wilhelm**, J., **Frey**, E. *Quantitative tube model for semiflexible polymer solutions.* The European Physical Journal E (2007) 24; 35–46
- [36] **Fernández**, P., **Grosser**, S., **Kroy**, K. *A unit-cell approach to the nonlinear rheology of biopolymer solutions.* Soft Matter (2009) 5; 2047
- [37] **Semrigh**, C., **Larsen**, R. J., **Bausch**, A. *Nonlinear mechanics of entangled F-actin solutions.* Soft Matter (2008) 4; 1675
- [38] **Dichtl**, M., **Sackmann**, E. *Colloidal probe study of short time local and long time reptational motion of semiflexible macromolecules in entangled networks.* New Journal of Physics (1999) 1; 18
- [39] **Käs**, J., **Strey**, H., **Sackmann**, E. *Direct imaging of reptation for semiflexible actin filaments.* Nature (1994) 368; 226–229
- [40] **Luan**, Y., **Lieleg**, O., **Wagner**, B., **Bausch**, A. *Micro- and macrorheological properties of isotropically cross-linked actin networks.* Biophysical Journal (2008) 94; 688–693
- [41] **Romanowska**, M., **Hinsch**, H., **Kirchgessner**, N., **Giesen**, M., **Degawa**, M., **Hoffmann**, B., **Frey**, E., **Merkel**, R. *Direct observation of the tube model in F-actin solutions: Tube dimensions and curvatures.* EPL (Europhysics Letters) (2009) 86; 26003

- [42] **Wang, B., Guan, J., Anthony, S. M., Bae, S. C., Schweizer, K. S., Granick, S.** *Confining Potential when a Biopolymer Filament Reptates*. Physical Review Letters (2010) 104; 118301
- [43] **Rasband, W.** *ImageJ*. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; <http://imagej.nih.gov/ij/> (1997-2011)
- [44] **Glaser, J., Chakraborty, D., Kroy, K., Lauter, I., Degawa, M., Kirchgessner, N., Hoffmann, B., Merkel, R., Giesen, M.** *Tube Width Fluctuations in F-Actin Solutions*. Physical Review Letters (2010) 105; 037801
- [45] **Glaser, J.** *Semiflexible Polymer Networks*. Dissertation, Universität Leipzig (2010)
- [46] **Bronstein, I. N., Semendjajew, K. A., Musiol, G.** *Der Bronstein* (Verlag Harry Deutsch, Frankfurt, 2008)
- [47] **Doi, M., Edwards, S. F.** *The Theory of Polymer Dynamics* (University Press, Oxford, 1986)
- [48] **Tsuda, Y., Yasutake, H., Ishijima, A., Yanagida, T.** *Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by in vitro micromanipulation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1996) 93; 12937
- [49] **Köster, S., Steinhauser, D., Pfohl, T.** *Brownian motion of actin filaments in confining microchannels*. Journal of Physics: Condensed Matter (2005) 17; S4091
- [50] **Köster, S., Pfohl, T.** *An in vitro model system for cytoskeletal confinement*. Cell Motility and the Cytoskeleton (2009) 66; 771–776
- [51] **Viamontes, J., Oakes, P., Tang, J.** *Isotropic to Nematic Liquid Crystalline Phase Transition of F-Actin Varies from Continuous to First Order*. Physical Review Letters (2006) 97; 118103
- [52] **MacKintosh, F., Käs, J., Janmey, P.** *Elasticity of Semiflexible Biopolymer Networks*. Physical Review Letters (1995) 75; 4425

- [53] **Käs, J., Strey, H., Tang, J. X., Finger, D., Ezzell, R., Sackmann, E., Janmey, P.** *F-actin, a model polymer for semiflexible chains in dilute, semidilute, and liquid crystalline solutions.* Biophysical Journal (1996) 70; 609–625
- [54] **Ferry, J. D.** *Viscoelastic Properties of Polymers* (Wiley, 1980), 3rd edition
- [55] **Hinner, B., Tempel, M., Sackmann, E., Kroy, K., Frey, E.** *Entanglement, Elasticity, and Viscous Relaxation of Actin Solutions.* Physical Review Letters (1998) 81; 2614
- [56] **Xu, J., Palmer, A., Wirtz, D.** *Rheology and Microrheology of Semiflexible Polymer Solutions: Actin Filament Networks.* Macromolecules (1998) 31; 6486–6492
- [57] **Lin, Y.-C., Koenderink, G. H., MacKintosh, F. C., Weitz, D. a.** *Viscoelastic Properties of Microtubule Networks.* Macromolecules (2007) 40; 7714–7720
- [58] **Gardel, M., Kasza, K., Brangwynne, C., Liu, J., Weitz, D.** *Mechanical Response of Cytoskeletal Networks.* Methods in Cell Biology (2008) 89; 487–519
- [59] **Xu, J., Tseng, Y., Wirtz, D.** *Strain hardening of actin filament networks. Regulation by the dynamic cross-linking protein alpha-actinin.* The Journal of Biological Chemistry (2000) 275; 35886
- [60] **Gardel, M. L., Shin, J. H., MacKintosh, F. C., Mahadevan, L., Matsudaira, P., Weitz, D. a.** *Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks.* Science (2004) 304; 1301–1305
- [61] **Storm, C., Pastore, J., MacKintosh, F., Lubensky, T., Janmey, P.** *Non-linear elasticity in biological gels.* Nature (2005) 435; 191–194
- [62] **Gardel, M. L., Nakamura, F., Hartwig, J. H., Crocker, J. C., Stossel, T. P., Weitz, D. a.** *Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2006) 103; 1762

- [63] **Janmey, P. A., McCormick, M. E., Rammensee, S., Leight, J. L., Georges, P. C., MacKintosh, F. C.** *Negative normal stress in semiflexible biopolymer gels.* Nature Materials (2007) 6; 48–51
- [64] **Xu, J., Wirtz, D., Pollard, T. D.** *Dynamic cross-linking by alpha-actinin determines the mechanical properties of actin filament networks.* The Journal of Biological Chemistry (1998) 273; 9570
- [65] **Tseng, Y., An, K. M., Esue, O., Wirtz, D.** *The bimodal role of filamin in controlling the architecture and mechanics of F-actin networks.* The Journal of Biological Chemistry (2004) 279; 1819
- [66] **Janmey, P.** *Mechanical properties of cytoskeletal polymers.* Current Opinion in Cell Biology (1991) 3; 4–11
- [67] **Koenderink, G., Atakhorrami, M., MacKintosh, F., Schmidt, C.** *High-Frequency Stress Relaxation in Semiflexible Polymer Solutions and Networks.* Physical Review Letters (2006) 96; 138307
- [68] **Liu, J., Gardel, M., Kroy, K., Frey, E., Hoffman, B., Crocker, J., Bausch, A., Weitz, D.** *Microrheology Probes Length Scale Dependent Rheology.* Physical Review Letters (2006) 96; 118104
- [69] **Tassieri, M., Evans, R., Barbu-Tudoran, L., Khaname, G., Trinick, J., Waigh, T.** *Dynamics of Semiflexible Polymer Solutions in the Highly Entangled Regime.* Physical Review Letters (2008) 101; 198301
- [70] **Keller, M., Schilling, J., Sackmann, E.** *Oscillatory magnetic bead rheometer for complex fluid microrheometry.* Review of Scientific Instruments (2001) 72; 3626
- [71] **Ziemann, F., Raedler, J., Sackmann, E.** *Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using an oscillating magnetic bead microrheometer.* Biophysical journal (1994) 66; 2210–2216
- [72] **Waigh, T. A.** *Microrheology of complex fluids.* Reports on Progress in Physics (2005) 68; 685–742

- [73] **Janmey, P., Hvidt, S., Käs, J., Lerche, D., Maggs, A., Sackmann, E., Schliwa, M., Stossel, T. P.** *The mechanical properties of actin gels. Elastic modulus and filament motions.* The Journal of biological chemistry (1994) 269; 32503
- [74] **Semrigh, C., Storz, T., Glaser, J., Merkel, R., Bausch, A. R., Kroy, K.** *Glass transition and rheological redundancy in F-actin solutions.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2007) 104; 20199
- [75] **Burlacu, S., Janmey, P., Borejdo, J.** *Distribution of actin filament lengths measured by fluorescence microscopy.* American Journal of Physiology- Cell Physiology (1992) 262; C569
- [76] **Claessens, M. M. a. E., Tharmann, R., Kroy, K., Bausch, A.** *Microstructure and viscoelasticity of confined semiflexible polymer networks.* Nature Physics (2006) 2; 186–189
- [77] **Lieleg, O., Claessens, M., Heussinger, C., Frey, E., Bausch, A.** *Mechanics of Bundled Semiflexible Polymer Networks.* Physical Review Letters (2007) 99; 088102
- [78] **Vandekerckhove, J., Deboen, A., Nassal, M., Wieland, T.** *The phalloidin binding site of F-actin.* The EMBO journal (1985) 4; 2815–2818
- [79] **Lorenz, M., Popp, D., Holmes, K. C.** *Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm.* Journal of Molecular Biology (1993) 234; 826–836
- [80] **Wieland, T., Faulstich, H.** *Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous Amanita mushrooms.* CRC Critical Reviews in Biochemistry (1978) 5; 185–260
- [81] **Bihan, T., Gicquaud, C.** *Stabilization of actin by phalloidin: A differential scanning calorimetric study.* Biochemical and Biophysical Research Communications (1991) 181; 542–547

- [82] **Coluccio**, L. M., **Tilney**, L. G. *Phalloidin enhances actin assembly by preventing monomer dissociation*. The Journal of Cell Biology (1984) 99; 529
- [83] **Sampath**, P., **Pollard**, T. D. *Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments*. Biochemistry (1991) 30; 1973
- [84] **De La Cruz**, E. M., **Pollard**, T. D. *Transient kinetic analysis of rhodamine phalloidin binding to actin filaments*. Biochemistry (1994) 33; 14387
- [85] **De La Cruz**, E. M., **Pollard**, T. D. *Kinetics and thermodynamics of phalloidin binding to actin filaments from three divergent species*. Biochemistry (1996) 35; 14054
- [86] **Schuldt**, A. *Seeing the wood from the trees*. Nature Cell Biology (2009)
- [87] **Minsky**, M. *Microscopy Apparatus*. US Patent 3,013,467 (1961)
- [88] **Pawley**, J. P. *Biological Confocal Microscopy* (Springer, New York, 2006), 3rd edition
- [89] **Paques**, M., **Imhof**, A., **van Blaaderen**, A., **Nicolas**, Y. *Method and device for imaging the dynamic behaviour of microstructures under the influence of deformation*. European Patent Application (2003) ; 1312910
- [90] **Nicolas**, Y. *Microrheology: new methods to approach the functional properties of food*. Food Hydrocolloids (2003) 17; 907–913
- [91] **Macosko**, C. W. *Rheology: Principles, Measurements, and Applications* (Wiley, 1994)
- [92] **Spudich**, J. A., **Watt**, S. *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*. The Journal of Biological Chemistry (1971) 246; 4866
- [93] **MacLean-Fletcher**, S., **Pollard**, T. D. *Identification of a factor in conventional muscle actin preparations which inhibits actin filament self-association*. Biochemical and Biophysical Research Communications (1980) 96; 18–27

- [94] **Rehms, H., Letzel, T.** *Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics* (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2010**), 6 edition
- [95] **Gordon, D., Yang, Y., Korn, E. D.** *Polymerization of Acanthamoeba actin. Kinetics, thermodynamics, and co-polymerization with muscle actin.* Journal of Biological Chemistry (**1976**) 251; 7474
- [96] **Goddette, D. W., Frieden, C.** *Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D.* The Journal of Biological Chemistry (**1986**) 261; 15974
- [97] **Nyquist, H.** *Certain Topics in Telegraph Transmission Theory.* Transactions of the American Institute of Electrical Engineers (**1928**) 47; 617–644
- [98] **Amini, A., Weymouth, T., Jain, R.** *Using dynamic programming for solving variational problems in vision.* IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence (**1990**) 12; 855–867
- [99] **Malcolm Slaney, C. B.** *Snakes, interval technical report IRC 1995-017* (**1995**)
- [100] **Eberhardt, C., Clarke, A.** *Fibre-orientation measurements in short-glass-fibre composites. Part I: automated, high-angular-resolution measurement by confocal microscopy.* Composites Science and Technology (**2001**) 61; 1389–1400
- [101] **Glaser, J., Kroy, K.** *Segment fluid representation of entangled stiff polymers.* arxiv: 1011.5980 (**2010**)
- [102] **Onsager, L.** *The effects of shape on the interaction of colloidal particles.* Annals of the New York Academy of Sciences (**1949**) 51; 627–659
- [103] **Wilhelm, J., Frey, E.** *Radial Distribution Function of Semiflexible Polymers.* Physical Review Letters (**1996**) 77; 2581
- [104] **Isambert, H., Maggs, A. C.** *Dynamics and Rheology of Actin Solutions.* Macromolecules (**1996**) 29; 1036–1040



- [105] **Winkler**, R. *Conformational and rheological properties of semiflexible polymers in shear flow*. The Journal of Chemical Physics (2010) 133; 164905
- [106] **Käs**, J., **Strey**, H., **Baermann**, M., **Sackmann**, E. *Direct Measurement of the Wave-Vector-Dependent Bending Stiffness of Freely Flickering Actin Filaments*. Europhysics Letters (EPL) (1993) 21; 865–870
- [107] **He**, J., **Viamontes**, J., **Tang**, J. *Counterion-Induced Abnormal Slowdown of F-Actin Diffusion across the Isotropic-to-Nematic Phase Transition*. Physical Review Letters (2007) 99; 068103
- [108] **He**, J., **Mak**, M., **Liu**, Y., **Tang**, J. *Counterion-dependent microrheological properties of F-actin solutions across the isotropic-nematic phase transition*. Physical Review E (2008) 78; 011908
- [109] **Sun**, H. Q. *Gelsolin, a Multifunctional Actin Regulatory Protein*. Journal of Biological Chemistry (1999) 274; 33179
- [110] **Murphy**, D. B., **Gray**, R. O., **Grasser**, W. a., **Pollard**, T. D. *Direct demonstration of actin filament annealing in vitro*. The Journal of Cell Biology (1988) 106; 1947
- [111] **Hama**, H., **Kasai**, M., **Maruyama**, K., **Noda**, H. *Natural F-actin IV. Length distribution and its change studied by electron microscopy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure (1969) 194; 470–477
- [112] **Carlier**, M. F., **Pantaloni**, D., **Korn**, E. D. *Steady state length distribution of F-actin under controlled fragmentation and mechanism of length redistribution following fragmentation*. The Journal of Biological Chemistry (1984) 259; 9987

